

速報

菌床シイタケ栽培施設における害菌感染経路の特定^{*1}

—宮崎県北浦町の事例—

新田 剛^{*2} ・ 宮崎和弘^{*3}

新田 剛・宮崎和弘：菌床シイタケ栽培施設における害菌感染経路の特定 九州森林研究 56：257-258, 2003 宮崎県内のある菌床シイタケ栽培施設において、落下菌調査およびDNA分析技術等の手法を用い、害菌の感染経路の特定を試みた。その結果、落下菌調査から、各施設における害菌の密度および分布状況が明らかとなった。また、被害菌床から分離した菌株と同一種と判断された落下菌 (*P. sp.1*) を RAPD 分析したところ、すべて同一系統であること、および施設全体に分布していることが示唆された。落下菌数の結果も含め、調査した施設では、滅菌後の放冷・接種室内で最も高頻度に感染が起きていると判断した。

キーワード：菌床シイタケ、害菌、感染経路、落下菌、RAPD分析

I. はじめに

キノコ生産現場では、さまざまな害菌が発生し被害を与えることがある。この害菌対策を考える上で重要なことの一つに、感染経路の特定があげられる。特に菌床栽培では工程が多く、害菌の感染がどの工程であったのか特定できれば、対策を効果的に実施することが容易になると考えられる。今回、宮崎県内の菌床シイタケ栽培施設において落下菌および被害菌床から害菌を分離し、DNA解析技術等を用いて感染経路の特定を試みたので報告する。

II. 施設等の概要

今回調査した生産者は、宮崎県東臼杵郡北浦町において、平成13年5月から菌床製造～発生までの一貫生産を行っている。施設は、幅15.8m、奥行き63mの旧養鶏施設を改造したもので、屋外にオガコ堆積場、屋内にミキサー1基、培地詰め機1機、滅菌釜1基、放冷・接種室が1室、20坪と35坪の培養室が各1室、35坪の発生室が2室、パック作業場兼事務室が1室ある。滅菌釜は片開き式で、滅菌した菌床を直接クリーンな部屋に運び込めない施設構造である。害菌被害の状況は、平成14年8月2日調査時において、培養初期の多数の菌床(上部肩口部)に、害菌(*Penicillium*属菌)が出現していることが確認できた。

III. 材料及び方法

1. 菌株の採取

菌株は、平成14年8月2日に被害菌床および各施設の落下菌等を採用し、その被害部位およびコロニーから分離した。被害菌床

からは被害部位を掻き取りPDA平板培地に分離した。落下菌は、各施設(釜周り、放冷・接種室、培養室、発生室)において、落下菌調査用培地(培地組成;表-1)を直径9cmのシャーレに15~20ml分注して調整した平板培地を5分間開放して行った。また、冷凍機および接種機からは、滅菌した脱脂綿に滅菌水を少量含ませたもので拭き取り、落下菌調査用培地に塗布した。

2. 落下菌数の測定と分離菌株の同定

落下菌数の測定は、採取した落下菌調査用培地を温度25℃の環境下で培養し、コロニー形成単位として計測した。また、同定は、被害菌床および落下菌等から分離した菌株をループ状の柄付き針で掻き取りPDA平板培地に画線して約1日培養後、単コロニーを新しいPDA平板培地に分離し温度25℃の環境下で培養して、目視によるコロニーの特徴と、顕微鏡による分生子柄や分生子の観察結果から属レベルの同定を行った。

*Penicillium*属菌については、Pitt (I) による分類に従い、CYA平板培地で5, 25および37℃での培養、MEA平板培地およびG25N平板培地で25℃での培養を行い、菌糸成長量比較、コロニーの特徴および検鏡結果と併せて、種レベルでの分類を行った(培地組成;表-1)。

3. PCRおよびRAPD分析

被害菌床および落下菌等から分離した菌株を、SMY液体培地(シヨ糖1%, 麦芽エキス1%, 酵母エキス0.4%)を用い、温度25℃の環境下で培養した。DNAの抽出は、培養した菌糸体をろ過後蒸留水で水洗して水分をとり、約80mgを凍結粉砕後、DNA自動分離装置「クラボウPI-50α」(倉敷紡績社)を用いて全DNAを単離(改変CTAB法)した。

RAPD分析には、任意のプライマー(Operon Technologies社) A-01~20, C-01~20, D-01~12, W-01~08の60プライ

^{*1} Nitta, T. and Miyazaki, K.: Determination of infection route of the noxious fungi in the Sawdust-based cultivation of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) - A case of the facility in Kitaura, Miyazaki Pref. -

^{*2} 宮崎県林業技術センター Miyazaki Pref. Forestry Tech. Ctr., Saigou, Miyazaki 883-1101

^{*3} 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. & Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

マーを用いた。PCR 反応液 (10 μl) の組成は、40ng 鋳型 DNA, PCR Buffer (10mM Tris-HCl, 10mM KCl, pH8.3), 0.20mM 各 dNTP, 0.25 μM プライマー, 3.0mM MgCl₂, 0.5Units Ampli-Taq[®] DNA Polymerase Stoffel Fragment (Applied Biosystems 社, 以下 AB 社) とした。サーマルサイクラーは GenAmp[®] PCR System 9700 (AB 社) を使用し、94℃ で60秒間熱変成した後、94℃ 10秒 (変性), 36℃ 30秒 (アニーリング), 72℃ 60秒 (伸長) を45回繰り返し、最後に72℃ 120秒の伸長反応を行った。PCR で得られた増幅産物は、2.0%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーター上で DNA バンドを観察した。

IV. 結果と考察

落下菌数の測定結果を図-1に、害菌の分布状況を表-2に示す。図-1から放冷・接種室に害菌密度が高いこと、表-2から害菌の分布状況 (生息範囲や数) が把握できた。また、*Penicillium* 属菌について6つの種が存在することがわかった。*Penicillium* 属菌や *Cladosporium* 属菌の検出度が高いことは、富樫ら (2) の報告と一致した。

宮崎 (3) によって RAPD 分析は *Trichoderma* 属菌の個体レベルの識別が可能であることが確認されている。今回、菌床への被害状況と害菌の分布状況を考慮した上で、菌床に特に出現頻度の

高い *Penicillium* 属菌 (*P. sp.1*) の菌株を任意に選択し、RAPD 分析を試みた。その結果、使用した60のプライマーのうち、47のプライマーで反応が認められたが、どのプライマーにおいても DNA バンドパターンに多型は見られなかった。よって供試した菌株は高い確率で同一系統であることが推察された。

以上のことから、今回の宮崎県北浦町の栽培施設における害菌の感染経路については、放冷・接種室内での感染頻度が最も高いことが考察された。

謝 辞

本試験を行うにあたり、終始適切なお助言・ご指導をいただいた独立行政法人森林総合研究所きのこ・微生物研究領域きのこ研究室の角田光利氏、砂川政英氏に深謝の意を表す。

引用文献

- (1) John, I. P. (1980) The Genus *Penicillium* and its telemorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces* : 16-23.
- (2) 富樫巖ほか (1997) 北海道林産試験場報 11 (2) : 1-4.
- (3) 宮崎和弘 (1996) 日本木材学会研究発表要旨集 46 : p.594.

表-1. 培地組成

培地	組 成
落下菌	ペプトン 6g, デキストロース 10g, KH ₂ PO ₄ 0.5g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g, ローズベンガル 0.05g, 寒天 16g, ストレプトマイシン 0.04g, 蒸留水 1,000ml
PDA	日本製ポテトデキストロース寒天 39g, 蒸留水 1,000ml
CYA	NaNO ₃ 3g, K ₂ HPO ₄ 1g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g, KCl 0.5g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01g, ショ糖 30g, 酵母エキス 5g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000ml
MEA	麦芽エキス 20g, ペプトン 1g, ブドウ糖 20g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000ml
G25N	NaNO ₃ 3g, K ₂ HPO ₄ 1g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g, KCl 0.5g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01g, 酵母エキス 3.7g, グリセリン 250g, 寒天 12g, 蒸留水 700ml

表-2. 害菌の分布状況

区 分	落下菌等						被害菌床	
	放冷・		冷凍機	接種機	培養室	発生室	07.22 接種	07.23 接種
	釜廻り	接種室						
シャーレ枚数及び菌床個数	4	7	-	-	6	3	4	2
コロニー数及び分離数計	18	142	11	8	30	22	9	4
<i>Penicillium</i> spp.	1	78	10	8	10	12	7	4
<i>P. sp. 1</i>	1	71	7	6	4	8	6	4
<i>P. sp. 2</i>	-	-	2	1	-	-	1	-
<i>P. sp. 3</i>	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>P. sp. 4</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>P. sp. 5</i>	-	5	1	-	5	4	-	-
<i>P. sp. 6</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Cladosporium</i> spp.	5	57	-	-	4	2	-	-
<i>Trichoderma</i> spp.	2	-	-	-	4	4	-	-
<i>Aspergillus</i> spp.	-	1	-	-	4	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> spp.	-	-	-	-	-	-	2	-
<i>Rhizopus</i> sp.	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Mucor</i> sp.	1	-	-	-	-	-	-	-
Bacteria	-	5	-	-	2	-	-	-
不明	9	1	1	-	5	4	-	-

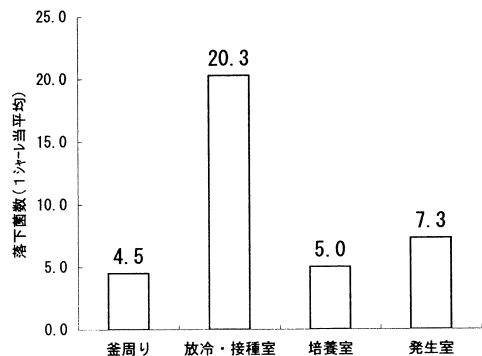


図-1. 落下菌数の測定結果