

速報

トリコデルマ属菌のベノミル感受性と病原力に関する試験*¹宮崎和弘*² ・ 新田 剛*³

宮崎和弘・新田 剛：トリコデルマ属菌のベノミル感受性と病原力に関する試験 九州森林研究 61：155-157, 2008 きのご栽培に被害を与える病原菌として発生頻度の高いトリコデルマ属菌を用い、ベノミル感受性およびきのこの菌糸に対する病原力に関する試験を行った。ベノミル感受性については、ベノミル添加培地を用いて培養を行った場合の感受性の変化について検討を行った。試験を行った結果、ベノミル添加培地上で5回培養を行った菌株については、ベノミルを添加した培地上での菌糸伸長は対照区よりも速く、濃度別培養試験からも感受性が低下したと考えられた。しかし、10回培養を行った菌株では、ベノミル添加培地上での菌糸伸長速度は対照区と変わらず、濃度別培養試験の結果ではむしろ感受性は対照区に比べ上昇していた。また、きのこの培養菌糸上で培養を続けたトリコデルマ属菌の病原力の変化について試験を行ったところ、病原力が上がる場合、変わらない場合、下がる場合と様々なパターンが見られた。ベノミル感受性試験、病原力試験ともに結果に一定の傾向が認められなかった原因として、同一コロニー内であっても菌糸は不均一になっていることが影響していると考えられた。

キーワード：トリコデルマ属菌、ベノミル感受性、病原力

I. はじめに

きのこの栽培を行う上で、トリコデルマ属菌の発生は、栽培方法を問わず問題になることが多い。トリコデルマ属菌の発生を抑える方法のひとつとして、農薬を使用することが考えられるが、使用できる薬剤は限られており、使用の際には耐性菌の発生に注意が必要である。実際に北海道のシイタケ栽培施設で、ベノミルに対する感受性の低いペニシリウム属菌が分離された例がある(3)。そこで今回、きのこの栽培現場から分離されたトリコデルマ属菌を使って、ベノミルを含む培地上で培養し、ベノミルに対する感受性の変化について試験を行った。

また、トリコデルマ属菌のうち、トリコデルマ・ハルチアナムにおいて、野外からの分離菌は、栽培現場から分離された菌に比べ、対峙培養試験におけるきのこの菌糸への侵害力が低いという現象が観察された(2)。このことは、きのこの栽培施設に定着した系統が、きのこの菌糸との接触を続けることで、病原力が向上していくことを示唆していると考えられた。そこで、実際にきのこの菌糸上で培養を行うことで、トリコデルマ属菌のきのこの菌糸に対する病原力が向上するのかが確認するための実験を行った。

本稿では、前述したトリコデルマ属菌のベノミル感受性の変化に関する試験結果と、病原力の向上に関する試験結果について報告する。

II. 材料と方法

1. 供試菌株

試験には、森林総合研究所九州支所保存菌株であるトリコデルマ属菌2菌株(KRCF175: *Trichoderma harzianum*, KRCF349: *T. harzianum*)を用いた。KRCF175は、シイタケ菌床栽培施設(熊本県芦北町)から、KRCF349は、鹿児島県奄美大島の野生きのこのから分離された。KRCF175は、ベノミル感受性の変化に関する試験に用い、KRCF349は病原力の向上に関する試験に用いた。

2. ベノミル感受性試験

(1) ベノミル添加培地上での菌株の継代培養

ベノミル系水和剤には、きのこ用ベンレート(住友化学)(以下、ベノミル)を用いた。ベノミル有効成分濃度を0.5ppm(薬剤濃度:1.0ppm)に調整したPDA平板培地(以下、ベノミル添加PDA培地)を用いた。ベノミル添加培地で約10日間、25℃で培養を行い、コロニーの周縁部分から菌糸をとり、別のベノミル添加PDA培地上に移し、継代培養を繰り返すことで感受性の異なる菌株の作出を試みた。繰り返し数5回および10回、対照区として0回の処理区を設定し、それぞれの処理回数により菌株を、KRCF175-ben-5、KRCF175-ben-10、およびKRCF175-ben-0として試験に用いた。

(2) 菌糸伸長速度の測定

前述の方法で作出した菌株の菌糸伸長速度の測定は、ベノミル濃度0.5ppmに調整した2MA平板培地(2%モルトエキス, 1.5%寒天)(以下、ベノミル添加MA培地)を用い、培養温度25℃で行った。接種点を中心に、直角に交わる2方向において、コロニー直径を数時間おきに測定した。菌糸伸長速度として、測定点から最小二乗法によって求められる回帰直線の勾配を用いた。各菌株、5枚の培地を用いた合計10方向での菌糸伸長速度を算出

*¹ Miyazaki, K. and Nitta, T.: Studies on sensitivity against benomyl and pathogenicity of *Trichoderma* spp.

*² 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

*³ 宮崎県林業技術センター Miyazaki Pref. Forestry Tech. Center, Misato, Miyazaki 883-1101

し、対照区と比較したt検定による有意差検定を行った。

また、ベノミル濃度を0.5ppm刻みで、0ppmから10ppmまで変化させた2MA平板培地を準備し、各菌株あたり3枚接種し、25℃で培養した。5日目、および10日目にコロニーの観察を行い、コロニーの長径が1cmを超えた場合を+、超えない場合を-と判断した。+となったシャーレの数をポイントとして、濃度別感受性の検定を行った。

3. きこの菌糸に対する病原力試験

トリコデルマ属菌の培養に用いるきこのには、エノキタケ、ブナシメジ、エリンギの3種類を用いた。接種用の培地は、あらかじめ準備したオガクズ培地（ブナおがこと米ぬかを容量比4:1で混合、含水率65%に調整、オートクレーブで121℃・1時間殺菌）に各きのこ菌糸を25℃で培養したものをを用いた。なお、接種したトリコデルマ属菌が生菌糸上で伸長する場合はそのまま培養に用い、伸長しない場合はオートクレーブで105℃・2分間の処理を行った培地を培養に用いた。トリコデルマ属菌は25℃で約2週間この培地で培養後、新たなきのこ菌糸上に移植する操作を4回繰り返した菌株を用いた。それぞれ、培養に用いたきのこの種類と培養回数により、KRCF349-Fv-4（エノキタケ菌糸上）、KRCF349-Hm-4（ブナシメジ菌糸上）、KRCF349-Pe-4（エリンギ菌糸上）の3菌株を用意した。また、対照区としてきのこ菌糸上での培養を行っていないKRCF349-0を用いた。病原力の検定は、宮崎ほか(1)による両口試験管を用いた対峙培養試験により行った。

Ⅲ. 結果

1. ベノミル感受性試験

供試した3菌株（KRCF175-ben-0、-5、および-10）のベノミル添加MA培地、および無添加MA培地で測定した菌糸伸長速度を表-1に示した。ベノミルを添加していない培地上では、対照区（KRCF175-0）と比較して、KRCF175-ben-5およびKRCF175-ben-10のどちらの菌株も同程度の菌糸伸長を示した。ベノミル濃度0.5ppmの培地では、どの菌も菌糸生長が抑えられたが、対照区とKRCF175-ben-5の検定では、5%水準で菌糸伸長速度に有意な差が認められた。このことは、KRCF175-ben-5では、ベノミルに対する感受性が低下していることを意味している。しかし、KRCF175-ben-10は菌株の菌糸伸長速度は、KRCF175-ben-5に比べ遅く、対照区と比較しても有意差は認められなかった。

KRCF175-ben-0、-5、および-10の3菌株のベノミル濃度別感受性の検定結果を表-2に示した。供試した3菌株の中では、KRCF175-ben-5が5.0ppm濃度の培地で、10日目で1ポイントと最も感受性が低かった。しかし、KRCF175-ben-10は、

5日目で比較したときにはKRCF175-ben-0よりも感受性が低く判断されたものの、10日目では、むしろKRCF175-ben-0よりも感受性が高いという結果になり、必ずしもベノミルと接触している時間が長い方が感受性が下がるとは考えられなかった。

2. きこの菌糸に対する病原力試験

きのこ菌糸に対する病原力試験の結果を図-1から4に示した。図中縦軸は、対峙培養で両菌が接触したところを0とし、その後きのこの菌糸接種側から菌糸が伸びていく方向を+とした際の境界部分の位置を表している。つまり、下方向（-方向）に急な角度で侵入していく菌株ほど病原力が高いことを示す。どのきのこに対してもエノキタケ上で培養した、KRCF349-Fv-4は侵入する能力が低く、試験前の想定と異なる結果となった。一方、KRCF349-Pe-4およびKRCF349-Hm-4は、対照区と比べて若干侵害力が高い、もしくはほとんど変わらないという結果になった。

Ⅳ. 考察

今回の試験から、トリコデルマ属菌のベノミル感受性や、きのこ菌糸に対する病原力は、変化しやすい形質であることが示唆された。特に、ベノミル濃度別感受性試験の結果では、同じコロニーから分離した菌であっても、感受性の発現に差異がみられる場合があった。このことは、同一コロニー内でも、細胞レベルではベノミルに対する感受性が不均一になっていると考えられる。病原力試験においても、きのこの菌糸上で培養したからといって必ずしも病原力が上がるわけではなく、一部病原力が下がる現象も見られた。このことも、菌の不均一性が影響している可能性が考えられる。今後、同様の試験を進めていく上では、このような菌糸の不均一性を考慮に入れた菌株の固定方法を検討する必要があるだろう。また、培養回数や菌株数についても、条件を拡げて試験を行う必要があると考える。

謝辞

本試験は農林水産省予算の先端技術を活用した農林水産研究高度化事業（課題番号：1742）の一部として行われた。

参考文献

- (1) 宮崎和弘ほか(1995) 日林九支研論 48: 233-234.
 - (2) 新田剛・宮崎和弘(2007) 九州森林研究 60: 155-158.
 - (3) 富樫巖ほか(1996) 木材学会誌 42: 1258-1263.
- (2007年11月19日受付；2008年2月7日受理)

表-1. 各菌株の菌糸伸長速度測定結果

| サンプル | ベノミル無添加 MA 培地 | | ベノミル添加 MA 培地 | |
|----------------|---------------|--------|--------------|--------|
| | 菌糸伸長速度 | | 菌糸伸長速度 | |
| | (mm/h) | t 検定結果 | (mm/h) | t 検定結果 |
| KRCF175-ben-0 | 1.01±0.02 | ns | 0.228±0.009 | ns |
| KRCF175-ben-5 | 1.03±0.03 | ns | 0.238±0.011 | * |
| KRCF175-ben-10 | 1.01±0.02 | ns | 0.238±0.020 | ns |

ns: 有意差なし

*: 5%水準で有意差有り

表-2. ベノミル濃度別感受性試験結果

| ベノミル濃度 (ppm) | KRCF175-ben-0* | | KRCF175-ben-5* | | KRCF175-ben-10* | |
|-----------------|----------------|--------|----------------|--------|-----------------|--------|
| | 5 days | 10days | 5 days | 10days | 5 days | 10days |
| 1.5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 2.0 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 2.5 | 0 | 0 | 3 | 3 | 1 | 2 |
| 3.0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 0 | 2 |
| 3.5 | 0 | 2 | 3 | 3 | 0 | 2 |
| 4.0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| 4.5 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 5.0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 5.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*接種した3枚の培地のうち長径が1 cm以上生長した枚数

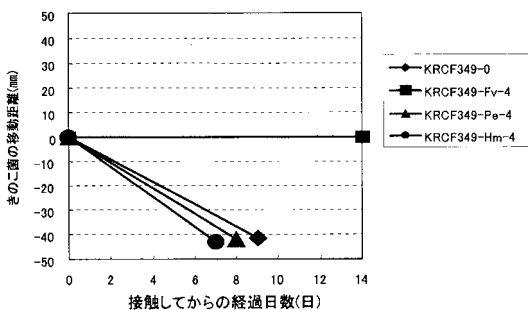


図-1. エノキタケとの対峙培養試験結果

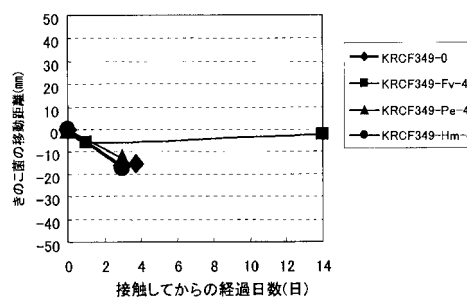


図-2. シイタケとの対峙培養試験結果

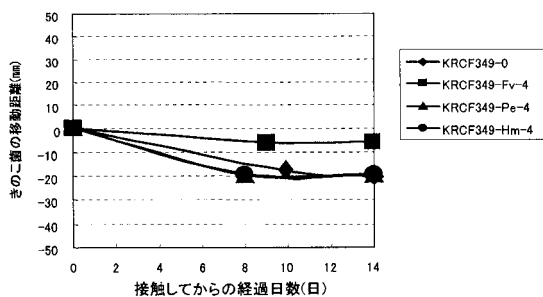


図-3. ブナシメジとの対峙培養試験結果

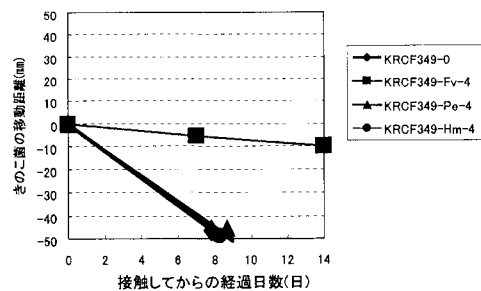


図-4. エリンギとの対峙培養試験結果