

報 文

九州地域で発生しているヒポクレア属菌の被害調査と特性評価について*1

宮崎和弘*2・中武千秋*3・甲斐 充*4・有森由美*5

宮崎和弘・中武千秋・甲斐 充・有森由美：九州地域で発生しているヒポクレア属菌の被害調査と特性評価について，九州森林研究 66：158－161，2013 九州地域のシイタケ生産地では，ここ数年ヒポクレア属菌による被害の報告が相次いでいる。そこで，発生地域における現地調査を行い，発生しているヒポクレア属菌子座の収集ならびに分離，被害ほだ木の回収と材部分からの分離試験，各分離菌の ITS (internal transcribed spacer) 領域の塩基配列解析，シイタケ菌糸に対する侵害力検定等を行った。その結果，形態的な特徴に加え ITS 領域の塩基配列解析からも，発生しているヒポクレア属菌は，*Hypocrea lactea* および *H. peltata* であることが確認された。また，シイタケ菌糸に対する侵害力は両菌とも高かった。しかしながら，材からの分離率には違いが見られ，*H. lactea* の方が，被害ほだ木からの分離率が高い傾向が見られた。

キーワード：ヒポクレア属菌，ITS 領域，*H. lactea*，*H. peltata*

I. はじめに

ヒポクレア属菌による被害は，昔から散見されることはあった(小松，1976)が，それほど大規模な被害に至ることはなかった。しかしながら，ここ数年は大規模な被害が，九州地域の生産地から相次いで報告されるようになった。また，被害が報告された県は，宮崎県，大分県，佐賀県，長崎県(対馬)と広範囲に渡っている。

そこで，まず被害現状の把握のため，被害報告のあった現場での現地調査を行い，被害を及ぼしている菌の同定，ならびに分離菌の特性の評価を行うこととし，いくつか明らかにしてきた点について報告する。

II. 材料と方法

1. 分離方法

発生している子座からの菌の分離は，マイクロマニピレーターを利用した単子の分離，もしくは子座組織の懸濁液の希釈平板法により分離した。

被害ほだ木からの分離は，樹皮をノミではぎとり材部分を露出させ，材片を約 2mm 角で切り出し，2% 麦芽寒天 (MA) 培地 (ストレプトマイシン含) 上に置床，菌糸再生後，新しい 2%MA の斜面培地に植え継ぎ，この操作を 2 度繰り返して菌株とした。

成形駒接種部分からの分離は，発泡スチロールのふたを取り外し，接種オガ部分をよく焼いたピンセットで取り出し，上記材部分からの分離と同様の方法で菌株を得た。

2. ITS (internal transcribed spacer) 領域の塩基配列解析

培養菌株の菌糸部分を寒天培地ごと柄付き針で約 1 cm 角で切り出し，TE バッファー中でペレットミキサーを用いてすりつぶし，遠心分離後，上澄み液を回収した。得られた上澄み液を滅菌水で 10 倍に希釈し，PCR のためのテンプレート DNA とした。はじめに，増幅のためのプライマーとして，ITS 4 と ITS 5 (White *et al.*, 1990) を使い，ITS 領域の増幅を行った。次に，増幅産物を，GenElute キット (Sigma-Aldrich 社) により精製後，BigDyeTerminator v 3.1 (アプライド・バイオシステムズ社) でシーケンシング反応を行い，反応産物をエタノール沈殿処理後，オートシーケンサー ABI 310 (アプライド・バイオシステムズ社) によって塩基配列の決定を行った。得られた配列データは，DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) の BLAT 検索もしくは，TrichOkey (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>) を利用し，相同性検索を行った。

3. 対峙培養試験による侵害力検定

対峙培養試験の方法は宮崎ら (1995) の方法に従った。試験は，3 本の両口試験管で行い，害菌接種から 4 週間後にシイタケ接種側の培地を一部取り，新しい 2%MA 平板培地上に置床し，再生した菌を観察した。なお，対峙培養には，シイタケ菌株として KRCF 1097 を用いた。

III. 結果

1. 現地調査

被害報告のあった，宮崎県諸塚村 1カ所，佐賀県伊万里市 3カ所 (ほだ場 1～3)，大分県豊後大野市 1カ所の，合計 5カ所で調査を行った。外観的な観察では，宮崎県諸塚村の施設では，大型

*1 Miyazaki, K., Nakatake, C., Kai, M., and Arimori, Y. : Researches and evaluations of property on *Hypocrea* spp. breaking out at shiitake mushroom cultivation fields in Kyushu area.

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

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

*4 大分県農林水産研究指導センター林業研究部きのこグループ Oita Pref. Agr., For. and Fish Res. Ctr. Mushroom Div., Mie, Bungo-Ohno, Oita 879-7111, Japan.

*5 佐賀県林業試験場 Saga Pref. Forest Exp. Stn., Yamato, Saga 840-0212, Japan.



写真-1 大型の子座を作るヒポクレアによる被害ほだ木
(宮崎県諸塚村)



写真-2 背着性の子座を作るヒポクレアによる被害木
(大分県豊後大野市)

表-1. 発生した子座からの分離菌

KRCF No.	子座回収場所	検索方法	検索で上位となった種名	分離方法	DDBJ Accession No.
1067	宮崎県諸塚村	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>	単子のう分離	AB742523
1068	宮崎県諸塚村	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>	単子のう分離	
1069	宮崎県諸塚村	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	AB742524
1070	宮崎県諸塚村	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	
1071	宮崎県諸塚村	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	
1072	宮崎県諸塚村	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	
1074	佐賀県伊万里市	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	AB742525
1075	佐賀県伊万里市	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	
1076	佐賀県伊万里市	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	AB742526
1077	佐賀県伊万里市	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	AB742527
1078	佐賀県伊万里市	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>	単子のう分離	
1095	大分県豊後大野市	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>	希釈平板	AB742528

の子座を形成するものと背着性の子座を形成する2種類のヒポクレア属菌が観察された(写真-1, 2)。また、佐賀県伊万里市では、大型の子座を作るもののみ、大分県豊後大野市では背着性の子座を作るもののみが観察された。ただし、大分県では2008年に大型の子座を形成するヒポクレアの発生が見られた、とのことであった。外観的な特徴から、大型の子座を形成するヒポクレアは、*Hypocrea peltata*、背着性の子座を形成するヒポクレアは*H. lactea*と考えられた。両菌とも、ほだ木辺材部分や接種駒周りでの発生が観察され、シイタケ菌糸に積極的に取りついているように見えた。

2. ヒポクレア属菌の子座からの分離および分離菌のITS領域塩基配列解析結果

子座からの分離で得られた菌株を表-1に示した。最終的に、合計12の菌株を得た。得られた菌株のITS領域の塩基配列を決定後、DDBJのウェブサイト上で利用できるBLAST検索によるホモロジー検索を行ったところ、大型の子座からの分離菌はすべて*H. peltata*と相同性が高く、背着性の子座からの分離菌はすべて*H. lactea*と相同性が高かった(表-1)。これらの結果と外観的な特徴の一致から、それぞれを*H. peltata*、*H. lactea*と同定した。

3. 被害ほだ木の材部分およびオガ菌接種部分からの分離試験結果

次に、材および接種駒からの分離菌について、同様にITS領域の塩基配列解析結果を利用しながら同定をすすめた。宮崎県諸塚村における被害ほだ木からの調査結果を表-2に、佐賀県伊万里市における被害ほだ木からの調査結果を表-3に示した。

4. 対峙培養試験による検定結果

対峙培養試験によるシイタケ菌糸に対する侵害力の検定結果について、シイタケ菌株KRCF 1097との試験結果を表-4に示した。なお、対照のため過去の試験に使用した、*Trichoderma harzianum* (KRCF 131) および *T. pleuroticola* (KRCF 541) の試験も行った。その結果、どちらのシイタケ菌株に対しても、分離菌*H. lactea* および *H. peltata* の侵害力は、対照に用いた *T. harzianum* および *T. pleuroticola* よりも高いという結果になった(表-4)。

IV. 考察

発生しているヒポクレア属菌の子座から分離した菌は、ITS領域の塩基配列結果から、大型の子座由来の分離菌が*H. peltata*、背着性の子座由来の分離菌が*H. lactea*であることが支持された。この両菌の分離菌はほとんど分生子を作らないことから、培養菌糸の形態的な特徴で同定することは実質不可能である。そのため、

表-2. 宮崎県諸塚村の被害現場での分離試験結果

KRCF No.	回収場所	分離箇所	検索方法	種名
1050	人工ほだ場	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1051	ハウス	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1052	ハウス	材部分	クランプ確認	<i>Lentinula edodes</i>
1053	人工ほだ場	材部分	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>
1054	ハウス	材部分	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>
1055	人工ほだ場	成形駒	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma sp.</i>
1056	人工ほだ場	材部分	ITS-BLAST	<i>Lentinula edodes</i>
1057	人工ほだ場	成形駒	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>
1058	人工ほだ場	材部分	未解析	<i>Trichoderma sp.</i>
1059	ハウス	材部分	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>
1060	ハウス	材部分	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>
1061	人工ほだ場	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma sp.</i>
1062	ハウス	成形駒	ITS-BLAST	<i>Hypocrea lactea</i>
1063	人工ほだ場	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1064	人工ほだ場	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1066	ハウス	材部分	クランプ確認	<i>Lentinula edodes</i>

表-3. 佐賀県伊万里市内の被害現場での分離試験結果

KRCF No.	調査箇所	分離箇所	検索方法	種名
1079	ほだ場-2	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma atroviride</i>
1080	ほだ場-2	材部分	ITS-BLAST	<i>Hypocrea peltata</i>
1081	ほだ場-2	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma atroviride</i>
1082	ほだ場-2	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma atroviride</i>
1083	ほだ場-2	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma atroviride</i>
1084	ほだ場-2	材部分	クランプ確認	<i>Lentinula edodes</i>
1085	ほだ場-2	材部分	クランプ確認	<i>Lentinula edodes</i>
1086	ほだ場-2	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1087	ほだ場-2	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1088	ほだ場-3	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1089	ほだ場-3	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Gliocladium deliquescens</i>
1090	ほだ場-3	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>
1091	ほだ場-3	材部分	ITS-BLAST	<i>Sistotrema brinkmannii</i>
1092	ほだ場-3	材部分	ITS-TrichOKEY	<i>Trichoderma harzianum</i>

表-4. シイタケ (KRCF 1097) との対峙培養試験結果

KRCF No.	害菌種名	結果*
131	<i>T. harzianum</i>	0/3
541	<i>T. pleuroticola</i>	0/3
1067	<i>H. lactea</i>	3/3
1068	<i>H. lactea</i>	3/3
1069	<i>H. peltata</i>	3/3
1074	<i>H. peltata</i>	2/3
1075	<i>H. peltata</i>	3/3
1095	<i>H. lactea</i>	3/3

* 害菌分離本数 / 供試本数

培養菌糸からの ITS 領域の塩基配列決定および BLAST 検索による同定が可能であることは、この両菌の生態等を調べる上で非常に有効な方法になると考えられた。

この結果を前提として行った被害ほだ木の分離菌の調査から、*H. lactea* の被害ほだ木から *H. lactea* と考えられる分離菌が、*H. peltata* の被害ほだ木から *H. peltata* と考えられる分離菌がそれ

ぞれ分離された (表-2, 3)。しかしながら、*H. lactea* の被害ほだ木からの分離調査では、*H. lactea* の分離頻度が 30.8% であったのに対し、*H. peltata* の被害ほだ木からの *H. peltata* の分離頻度は 7.1% と、その分離頻度には違いが見られた。しかしながら、対峙培養試験によるシイタケ菌糸への侵害力の検定においては、どちらの菌もシイタケに対する侵害力が、*T. harzianum* および *T. pleuroticola* よりも高いという結果であった (表-4)。小松 (1976) の行った寒天培地による試験においても、この両種の侵害力はどちらも高いと評価されており、かなり普遍的にシイタケに対する侵害力は高いと考えられる。このため、シイタケ菌糸に対する侵害力の違いが、分離頻度の違いとなっているとは考えられなかった。どちらの菌の被害ほだ木からも、*Trichoderma* 属菌等他の菌も分離されており、これらの菌との競合に違いが見られる可能性もあるが、今回の試験からは判断が出来なかった。

ヒポクレア属菌は一般的にベノミル系水和剤に感受性があり、農薬の使用により被害を軽減化出来ると考えられるが、栽培現場では農薬の使用には抵抗があるため、今後同菌の被害を回避する方法としては、生態的な防除を考える必要がある。そのためには、

今後被害発生の要因を特定するため、発生における気象条件の精査や各分離菌の温度特性の試験、伏せ込み方法を変えた場合の防除効果などを検討していく必要がある。また、ここ数年での被害の大規模化には気象条件のみではなく、強病原性の系統、もしくは増殖能力の高い系統の拡大も疑われる。よって、各被害地から分離された菌の異同判別なども行っていく必要があると考えられる。

謝辞

本試験を行うにあたり、長崎県農林技術開発センターの田嶋幸一氏、川本啓史郎氏に、サンプルの提供や情報の提供をいただき

た。ここに深謝の意を表す。また、本研究は農林水産省委託プロジェクト「地球温暖化が森林及び林業分野に与える影響評価」の一環として行われた。

参考文献

- 小松光雄 (1976) 菌草研報 13: 1-113.
 宮崎和弘ら (1995) 日林九支研論 48: 233-2.
 田原博美・宮崎和弘 (2000) 日林九支研論 53: 163-164.
 White, T.J. (1990) In PCR Protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds) : 315-322, Academic Press.

(2012年11月4日受付：2013年4月10日受理)