

速報

シイタケ原木栽培におけるヒポクレア属菌の感染経路の推定^{*1}宮崎和弘^{*2}・新田 剛^{*3}・中武千秋^{*3}・川口真司^{*4}

宮崎和弘・新田剛・中武千秋・川口真司：シイタケ原木栽培におけるヒポクレア属菌の感染経路の推定 九州森林研究 68：165－167, 2015 九州地域では、ここ数年ヒポクレア属菌による被害の報告が相次ぎ、大きな被害を受けているシイタケ栽培現場が見られる。主に被害を与え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ているが、被害拡大における感染経路については未解明な部分が多い。そこで、両菌の感染経路の推定を行うために、被害が発生している人工ほだ場の資材（パイプ、フララ）、土壌、ほだ木上のシイタケ菌糸紋からの分離ならびに分離菌の同定を行った。また、施設内に浮遊する菌の捕捉を落下菌調査により行い、落下菌として分離された菌の同定を行った。また、調査の簡便化をはかるために、両菌の種を簡易に識別するための種識別用プライマーペアの開発を行った。調査の結果、資材からヒポクレア属菌が分離され、ならびに空中落下菌としてヒポクレア属菌が分離されたことから、調査現場では空気感染が被害拡大の主要因であると推定した。

キーワード：シイタケ原木栽培、種特異的プライマーペア、ヒポクレア属菌

I. はじめに

ここ数年、ヒポクレア属菌によって引き起こされている被害が、九州地域のシイタケ生産地から相次いで報告されるようになった（宮崎ほか，2013，2014）。報告されている被害現場で被害を与えているヒポクレア属菌は、主に *Hypocrea lactea* および *H. peltata* の2種で、両種とも菌糸伸長が速くシイタケ菌糸に対する侵害力が強いことが確認されている（宮崎ほか，2013）。そのため、この両種の発生がシイタケ栽培に与える影響は大きく、被害の拡大や激害化につながっていると考えられる。しかしながら、被害現場における、この両ヒポクレア属菌の感染経路について調査された例はなく、未解明な点が多い。被害対策を考える上で、感染経路を特定しておくことは非常に重要な点となることから、今回被害の発生している人工ほだ場において分離試験を行い、被害拡大における感染経路の推定を試みた。

II. 材料と方法

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

解析用 DNA の調整は、CTAB 法 (Murray and Thompson, 1990) により行った。一次増幅およびシーケンス解析のためのプライマーとして、ITS4 と ITS5 (White, 1990) を用いた。一次増幅は、反応液量 25 μ l、反応液組成は、20 mM Tris-HCl (pH 8.5)、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、0.16mM dNTPs、0.08 μ M プライマー、5ng ゲノム DNA、および 0.25units *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) とした。反応条件は、95 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱変性処理後、95 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒 - 56 $^{\circ}$ C \cdot 90 秒 - 72 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒を 1 サイ

クルとするプログラムを 35 サイクル行った。増幅産物を GenElute キット (Sigma-Aldrich 社) により精製後、BigDye Terminator v3.1 (アプライド・バイオシステムズ社) でシーケンス反応を行った。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 BLAST 検索を利用し、相同性検索を行った。

2. 種特異的プライマーの設計及び PCR 条件

KRCF 1308 (*Trichoderma polysporum*), KRCF 889 (*T. harzianum*), KRCF 890 (*T. atroviride*), KRCF 895 (*T. konigiopsis*), KRCF 1067 (*H. lactea*), KRCF 1150 (*H. lactea*), KRCF 1074 (*H. peltata*), KRCF 1068 (*H. peltata*) の ITS 領域の塩基配列データを CLUSTAL W でマルチプルアライメント解析を行い、*H. lactea* および *H. peltata* に特異的な配列を検出し、それぞれの種特異的に PCR フラグメントが増幅される様にプライマー設計を行った。

H. lactea 識別用としてフォワード側プライマーを 3 種類 (HlacITSas-F 1: 5' TTTTTCGGTCTTGCACGAC 3', HlacITSas-F 2: 5' TGCCTCGCGGGTTATTTCC 3', HlacITSas - F 3: 5' TTTTTCGGTCTTGCACGAC 3'), リバース用プライマーを 2 種類 (HlacITSas-R 1: 5' TTTCGGGGCCGCGAACGAC 3', HlacITSas-R 2: 5' TTTCGGGGCCGCGAACAAAC 3'), *H. peltata* 用としてフォワード側プライマーを 3 種類 (HpITSas-F 1: CCGTTGCCTCGCGGGAGGC, HpITSas-F 2: TCCGTTGCCTCGCGGAAGG, HpITSas-F 3:

^{*1} Miyazaki, K., Nitta, T., Nakatake, C., Kawaguchi, M.: Presumption of infection route of *Hypocrea* spp. in the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) bed-log cultivation field.

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

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

^{*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 Prefectural Agr., Forestry and Fisheries Research Ctr., Forestry Div., Mushroom Group. Akamine, Mie, Oita 879-7111.

GGATCTTACCTCTGAGACTC), リバース側プライマーを2種類 (HpITSas-R 1: GTTTTTCGACGGCGTGGCTCG, HpITSas-R 2: TGCATTTTCGGGCGGCTCC) 合成し, 検証を行った。検証のためのPCRには3GプラントPCRキット(日本ジェネティクス)を用い, 反応液量は12.5 μ lとした。アニーリング温度条件を62~64 $^{\circ}$ Cの中で変えながら検討を行った。

3. 施設からの生息菌の分離方法

宮崎県諸塚村の人工ほだ場において生息菌の採取を行った(図-1)。資材(パイプおよびフララ)からの採取は2013年11月12日に行った。採取は, 滅菌水をサンプリング箇所へ吹きつけ, 消毒済みの綿棒を用いて吹き付けた滅菌水を吸い取り, 新しい平板のPDA培地上に塗布した。パイプおよびフララのそれぞれ異なる3カ所からサンプリングを行った。土壌からのサンプリングは2014年5月8日に実施した。施設内の4カ所において土壌サンプルを深さ約5cm, 10cm, 20cm, 30cmおよび40cmのところから採取し土壌1gを, 200mlの滅菌水に懸濁後, 懸濁液を平板のPDA培地に広げた。当年接種のほだ木の木口面からシイタケ菌糸が露出した菌糸紋から2014年6月23日および2014年7月21日にサンプリングを行った。それぞれ薪積みされたシイタケほだ木の上部と下部にあるほだ木の菌糸紋から菌糸を5点ずつ採取し, 平板培地(PDA培地)で培養を行った。それぞれの試験において平板培地からの再生菌糸をあらたに試験管の斜面培地(PDA培地)に移植した。

空中落下菌調査は, 2013年11月12日, 2014年5月28日および2014年8月12日に実施した。きのこ栽培施設調査用に改良された培地組成(宮崎ほか, 2006)の平板培地(直径:90mm)を用いて, 5分間開放で5箇所を行った。室温(約25 $^{\circ}$ C)で3-5日間培養後, 再生した菌をあらたに試験管の斜面培地(MA培地:2%モルトエキス, 1.5%寒天)に移した。

III. 結果

1. 種特異的プライマーペアとPCR条件の決定

はじめに, *H. lactea* 2菌株(KRCF 1067, KRCF 1095), *H. peltata* 2菌株(KRCF 1069, KRCF 1074)の抽出DNAを用い, アニーリング温度62 $^{\circ}$ Cの条件で, *H. lactea* 検出のためのプライマーペアとして, HlacITSas-F 1 x HlacITSas-R 1, HlacITSas-F 1 x ITS 4, ITS 5 x HlacITSas-R 1, *H. peltata* 検出のためのプライマーペアとして, HpITSas-F 1 x HpITSas-R 1, HpITSas-F 1 x ITS 4, ITS 5 x HpITSas-R 1の6通りの組み合わせによる増幅を行ったが, 予想される種特異的な増幅パターンが認められなかった。次に, *H. lactea* 検出用プライマーペアとして, HlacITSas-F 2 x ITS 4, HlacITSas-F 3 x ITS 4, ITS 5 x HlacITSas-R 2, *H. peltata* 検出用プライマーペアとして, HpITSas-F 2 x ITS 4, HpITSas-F 3 x ITS 4, ITS 5 x HpITSas-R 2による増幅を行ったところ, *H. lactea* の識別用にHlacITSas-F 2 x ITS 4, *H. peltata* の識別用にHpITSas-F 3 x ITS 4のプライマーペアが有望に思われた。そこで次に, サンプル数をそれぞれ5菌株, 合計10菌株に増やし, アニーリング温度64 $^{\circ}$ Cで増幅を行ったところ, HlacITSas-F 2 x ITS 4のプライマーペアで*H. lactea* のサンプルのみ, HpITSas-F 3 x ITS 4のプライマーベ

アで*H. peltata* のサンプルのみでバンドが確認された(図-2)。よって, 以後それぞれのプライマーペアを種識別用のプライマーペアとし, アニーリング温度64 $^{\circ}$ Cで検出することとした。

2. 分離試験の結果

各分離試験において分離された菌株をITS領域の塩基配列解析, もしくは種特異的プライマーペアによる解析によって同定を行った。各試験における, ヒポクレア属菌の分離結果を表-1に示した。

表-1. 分離試験結果

調査箇所	調査日時	分離された菌株数	
		<i>H. lactea</i>	<i>H. peltata</i>
資材			
パイプ	2013年11月12日	3	0
フララ	2013年11月12日	4	0
土壌	2013年11月12日	0	1
菌糸紋	2014年6月23日	0	0
	2014年7月21日	0	0
落下菌	2013年11月12日	3	0
	2014年5月28日	2	0
	2014年8月12日	17	0

資材からの分離では, パイプから6菌株, フララから4菌株の合計10菌株の分離菌を得た。ITS領域の塩基配列解析から, パイプからの分離菌のうち3菌株, フララからの分離菌のうち4菌株を*H. lactea*と同定した。

土壌からの分離菌として7菌株を得て, ITS領域の塩基配列解析から, そのうち1菌株を*H. peltata*と同定した。

菌糸紋からの分離試験を2回行い, 合計22の菌株を分離したが, いずれの分離菌もヒポクレア属菌ではなく, 18菌株は緑色の分生子を形成するトリコデルマ属菌であった。

落下菌の調査から分離された菌株については, 種特異的プライマーペアによるPCRにより判定を行った。3回行った落下菌調査のいずれの調査においても*H. lactea*が分離され, 2013年11月の調査において3菌株, 2014年5月の調査において2菌株, 2014年8月の調査において17菌株であった。*H. peltata*についてはいずれの調査においても分離されることはなかった。

IV. 考察

被害を与えている*H. lactea*および*H. peltata*はどちらも分生子を形成することがなく, 形態からの同定が実質不可能であることから, これまでITS領域の塩基配列を決定し, BLAST検索することによって同定を行ってきた。しかしながら, この方法では結果を得るまでにかかる時間ならびにコストにおいて, 負担が大きかった。このどちらの問題点に対しても, 今回両種を識別するために開発したプライマーペアを用いたPCR法による簡易同定方法は有効であった。これまで行ってきた調査では, 九州地域で

発生している *H. peltata* は、すべて同じ配列を有していた（宮崎ほか, 2013）。また、*H. lactea* は2種類に分かれる（宮崎ほか, 2013; 一部未発表データを含む）ものの、今回の *H. lactea* 識別用に開発したプライマーペアは、九州地域での分離菌に共通の配列に配慮して設計していることから、九州地域の他の現場から分離される菌の生態的な調査を行う際にも使用可能と考えられる。

ヒポクレア属菌による被害が数年間発生している人工ほだ場における生息菌の調査の結果から、人工ほだ場設置のための資材（パイプ、フララ）からの *H. lactea* の分離、土壌からの *H. peltata* の分離、落下菌としての *H. lactea* の分離が確認された。特に、資材からの分離は、現場においてヒポクレア属菌の子のう果がほとんど観察されない11月に実施したにもかかわらず複数の菌株が分離された。また、落下菌調査においても2013年11月および2014年5月の調査時点では、目立った子のう果形成は認められなかったにもかかわらず、*H. lactea* がそれぞれの調査において3菌株と2菌株分離された。これらの結果は、被害が発生した施設では、少なくとも *H. lactea* については、一年を通して、空気中からの感染が生じている可能性があることを示唆している。また、被害ほだ木での子のう果形成が観察された2014年8月の調査では、*H. lactea* が17菌株と最も多く分離され、子のう果形成の時期に空気中を浮遊している密度が高いことも確認された。なお、生産者からの聞き取りによると2014年の被害状況としては、*H. peltata* の被害が5%程度、*H. lactea* による被害が10%程度で *H. lactea* による被害率の方が高く、落下菌の分離結果との関連が認められた。逆に、土壌サンプルからの分離試験では、*H. peltata* が1菌株分離されたのみで、今回の調査では、土壌から *H. peltata* の感染が生じている可能性は否定出来ないものの、主たる感染経路として支持することは難しい。少なくとも、2014年に主に被害を与えている *H. lactea* が分離されていないことから、*H. lactea* の被害拡大には土壌からの感染よりも、空気中からの感染の方が寄与していると考えられた。なお、現場では土壌からの感染防止のため、ビニールシートを敷いたり、コンクリートブロックを最下部に設置するなどして接種ほだ木が土壌と直接接触しないような対策がなされている。そのため、土壌からの感染を考える上では、媒介者として昆虫やダニ類の関与も考慮する必要があり、調査方法に検討の余地がある。

謝辞

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

- 宮崎和弘ほか (2006) 九州森林研究 59: 275-276.
 宮崎和弘ほか (2013) 九州森林研究 66: 158-161.
 宮崎和弘ほか (2014) 九州森林研究 67: 83-85.
 Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
 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.
 (2014年11月5日受付; 2015年1月19日受理)

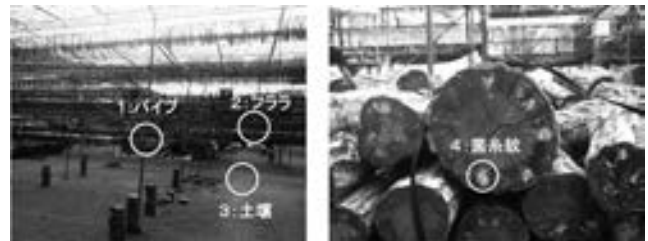


図-1. 調査施設の様子とサンプリング箇所

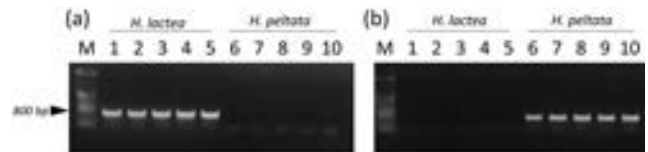


図-2. 種特異的プライマーペアを用いた種識別結果
 M: 100 bp ラダーマーカー、レーン1: KRCF 1067,
 レーン2: KRCF 1054, レーン3: KRCF 1057,
 レーン4: LRCF 1059, レーン5: KRCF 1060,
 レーン6: KRCF 1069, レーン7: KRCF 1077,
 レーン8: KRCF 1078, レーン9: KRCF 1080,
 レーン10: KRCF 1342, (a) HlacITSas-F 2 x ITS 4,
 (b) HpITSas-F 3 x ITS 4.