

速報

地球温暖化がシイタケ原木栽培の害菌問題に及ぼす影響に関する研究*¹宮崎和弘*²・新田 剛*³・中武千秋*³・矢吹俊裕*⁴・奥田 徹*⁵

宮崎和弘・新田 剛・中武千秋・矢吹俊裕・奥田 徹：地球温暖化がシイタケ原木栽培の害菌問題に及ぼす影響に関する研究 九州森林研究 68: 173 - 176, 2015 地球温暖化の進行により、シイタケ原木栽培において発生する害菌類による被害の顕在化や激害化が懸念される。すでに、問題が顕在化していると考えられる被害が九州地域を中心に報告されてきている。今後さらなる進行が予測される地球温暖化の影響を評価するために、全国に設置した試験地での害菌分離率の調査、温度別のトリコデルマ属菌との対峙培養試験、九州地域で分離されたヒボクレア属菌の温度別菌糸伸長速度の測定を行った。その結果、*Trichoderma harzianum* の分離率が高いこと、30℃以上日数と *T. harzianum* の分離率に相関関係があること、対峙培養試験において 30℃以上で侵害されやすくなること、ヒボクレア属菌の菌糸伸長は 25℃もしくは 30℃で最大となることが分かった。

キーワード：シイタケ原木栽培、地球温暖化、ヒボクレア属菌

I. はじめに

地球温暖化の進行は、シイタケ原木栽培における害菌被害を助長させる恐れがある。現にここ数年、九州地域のシイタケ生産地からヒボクレア属菌によって引き起こされている被害が、相次いで報告されるようになった（宮崎ほか、2013, 2014）。報告されている現場で被害を与えているヒボクレア属菌は、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襲力強いことがすでに確認されている（宮崎ほか、2013）。また、シイタケ栽培上の害菌として発生頻度の高いトリコデルマ属菌も 30℃近くに至適温度を持つ種が多く、温暖化の進行により被害が助長されることが懸念される。

しかしながら、気温と害菌被害の関係についての試験に関するデータが乏しく、温暖化の影響が被害の拡大につながるのか、明確に断言することは難しい。そこで、地球温暖化の影響との関連性をより明確にするために、日本各地における害菌分離試験、温度別の対峙培養試験、分離菌の温度別の培養試験等を実施したので、その結果について報告する。

II. 材料と方法

1. 供試菌

菌糸伸長速度の測定には、ヒボクレア属菌 2 菌株（KRCF 1069: *H. peltata*、宮崎県諸塚村にて分離 KRCF 1150: *H. lactea*、大分県豊後大野市にて分離）、シイタケ 1 菌株（M 290: 森 290 号）を用いた。温度別対峙培養試験には、トリコデルマ属菌 1 菌株（KRCF 131: *Trichoderma harzianum*、熊本県芦北町にて分離）

およびシイタケ 1 菌株（H 600: 北研 600 号）を用いた。

2. シイタケほだ木からの害菌分離試験

クスギ原木（長さ：1m、直径：10cm-15cm）に、シイタケ菌株（M 290）の木片駒を 1 本あたり 25 駒ずつ 2011 年 2 月 4 日に接種し、森林総合研究所九州支所構内にて、横積みにし上から寒冷紗をかけ 5 月末まで管理した。その後、試験地 1: 沖縄県名護市、沖縄県森林資源研究センター構内、試験地 2: 鹿児島県蒲生町、鹿児島県森林技術総合センター構内、試験地 3: 大分県豊後大野市、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、試験地 4: 長野県塩尻市、長野県林業総合センター構内、試験地 5: 群馬県榛東村、群馬県林業試験場構内、試験地 6: 岩手県矢巾町、岩手県林業技術センター構内、試験地 7: 北海道札幌市、北海道大学構内、の各試験地に供試木を配送し、各試験地のほだ場内で管理を行った。なお、気象データは、気象庁の各試験地に最も近い地点の観測データを使用した。

2012 年 7 月～9 月に、各試験地において、ほだ木 10 本ずつから、それぞれのほだ木の上部、中部、下部の 3 カ所から樹皮下の辺材部分を彫刻刀（三角刀）を用いて切り出し、マイクロチューブに分注した PDA 培地（ストレプトマイシン含：50ppm）に置床した。しばらく室温（約 25℃）で培養し、再生した菌糸をさらに新しい 2 MA 培地のスラントに移植し、試験用の菌株を調整した。

3. 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クエンス解析のためのプライマーとして、ITS 4 と ITS 5（White, 1990）を用いた。一次増幅の反応液量は 25 μ l、反応液組成は、20 mM Tris-HCl (pH 8.5)、50 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、0.16 mM dNTPs、0.08

*¹ Miyazaki, K., Nitta, T., Nakatake, C., Yabuki, T., Okuda, T.: A study on evaluation of influence by the global heating into problems caused by microbe against shiitake-mushroom bed-log cultivation.

*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 日本国際湿地保全連合 Wetland International Japan, Ningyo-cho, Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo 103-0013.

*⁵ 東京大学大学院理学系研究科 Univ. Tokyo, Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0001.

μM プライマー, 5 ng ゲノム DNA, および 0.25 units *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) とした。反応条件は, 95℃で1分間の熱変性処理後, 95℃・30秒-56℃・90秒-72℃・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) でシーケンズ反応を行った。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 のウェブサイト (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) の BLAST 検索を利用し, 相同性検索を行った。

4. 温度別対峙培養試験

長さ 20cm, 内径 22mm の両口試験管にオガ培地 (ブナ木粉: 米ぬか: 4:1, 含水率約 65%) を詰め, オートクレーブ滅菌 (121℃・1時間) したものを試験に使用した。先に, PDA (ポテトデキストロース寒天) 培地で培養したシイタケの菌糸を, コルクポーター (内径: 4mm) で打ち抜き, そのディスクを片側に接種し, 室温 (約 25℃) で 14 日間培養を行った。その後, 反対側に 2MA 培地で培養したトリコデルマ菌糸をコルクポーター (内径: 4mm) で打ち抜き, そのディスクを接種し, 室温 (約 25℃) で 1 日間培養を行った後, 各試験温度 (21℃, 24℃, 27℃, 30℃および 33℃) の恒温器で対峙培養を行った。トリコデルマ菌糸接種後 12 日目, および 16 日目にシイタケ菌糸接種側から培地の一部をピンセットで取り出し, 新しい 2MA 平板培地に置床し, 室温 (約 25℃) にて 3~5 日間培養を行い, 再生した菌糸がシイタケの菌糸かトリコデルマ属菌の菌糸かを判断した。

5. 培養温度別の菌糸伸長速度測定

菌株の菌糸伸長速度の測定は, 2MA 平板培地 (2% モルトエキス, 1.5% 寒天) を用い, 培養温度 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃で試験を行った。事前に 2MA 培地で培養したコロニーをコルクポーター (内径: 4mm) で打ち抜き, そのディスクを平板培地中央部分に接種した。接種したディスクの中心を通る直角に交わる 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 方向で測定し, 菌糸伸長速度 (mm/h) を算出した。

Ⅲ. 結果

1. ほだ木からの害菌分離試験

各試験地における害菌分離試験の結果を表-1に示した。分離菌の ITS 領域の塩基配列を解析した結果, 分離菌のほとんどはトリコデルマ属菌であることがわかった。トリコデルマ属菌の中でも特に *T. harzianum* の分離頻度が高く, すべての試験地から分離された。*T. harzianum* 以外では, *T. atoroviride* が5試験地から, *T. polysporum* が1試験地 (試験地7) から, 未同定のトリコデルマ属菌が4試験地から分離された。トリコデルマ属菌の分離率及び, *T. harzianum* の分離率と 2012 年 6~9 月の平均気温および 2012 年の最高気温 30℃以上の日数の間で解析した相関関係を図-1~4に示した。最も相関係数 (R) が高かったのは, *T. harzianum* 分離率と最高気温 30℃以上の日数で, 相関係数は

表-1. ほだ木からの害菌分離試験結果

試験地	トリコデルマ属菌*	トリコデルマ属菌以外の菌	シイタケ
試験地 1	7 (6)	0	23
試験地 2	4 (2)	0	26
試験地 3	3 (2)	1	26
試験地 4	9 (5)	0	21
試験地 5	7 (4)	1	22
試験地 6	2 (2)	0	28
試験地 7	5 (1)	0	25

* 括弧内の数値は, *T. harzianum* の分離された数

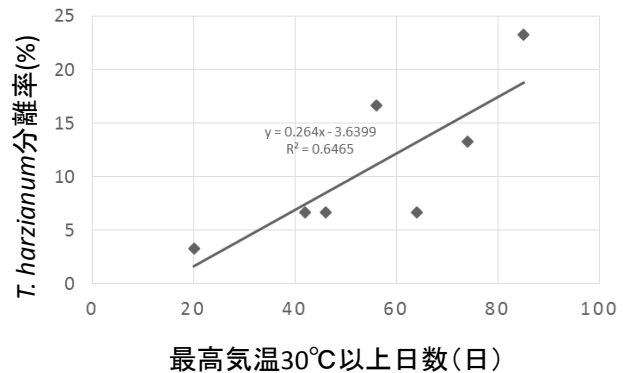


図-1. *T. harzianum* 分離率と最高気温 30℃以上日数の相関

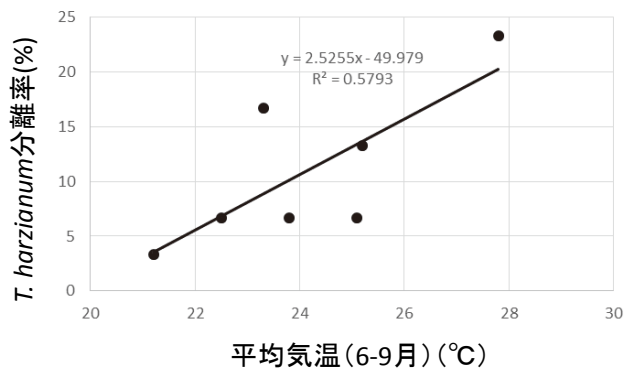


図-2. *T. harzianum* 分離率と平均気温の相関

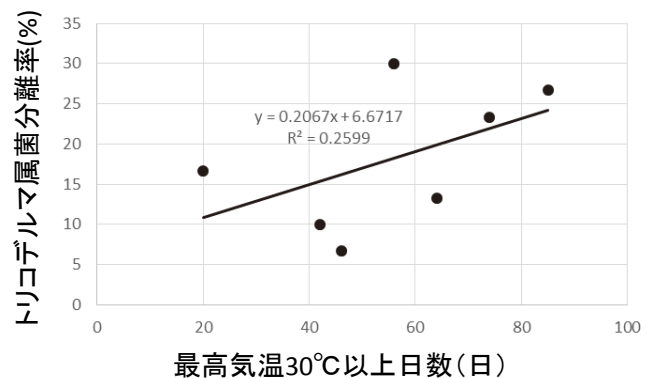


図-3. トリコデルマ属菌分離率と最高気温 30℃以上日数の相関

0.80であった。

2. 温度別対峙培養試験

温度別の対峙培養試験の結果を表-2に、試験の様子を図-5に示した。培養温度30℃からトリコデルマ菌糸のシイタケ菌接種側からの分離が確認され、33℃においてより高頻度で分離された(表-2)。帯線形成の観察では、21-30℃までは明瞭な帯線が接触部分で形成されたが、33℃では帯線は観察されなかった(図-5)。これらの結果から、シイタケ菌は30℃でトリコデルマ菌糸に対する抵抗力が下がり、33℃ではさらに抵抗力が下がることが、分離試験ならびに帯線形成能の喪失から確認された。

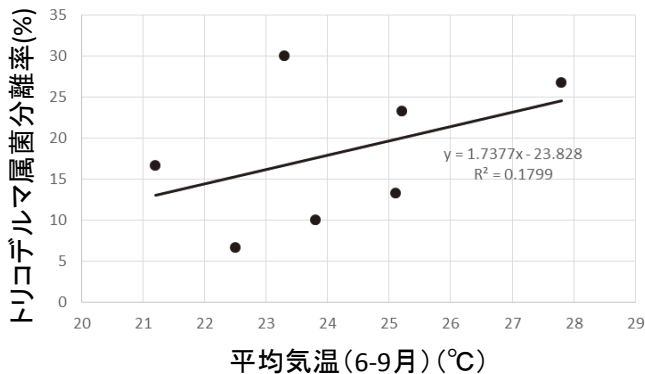


図-4. トリコデルマ属菌分離率と平均気温の相関

表-2. 各培養温度での *T.harzianum* 分離率

培養温度 (°C)	<i>T. harzianum</i> 分離率 (%)	
	12日後*	16日後
21	0	0
24	0	0
27	0	0
30	20	20
33	60	100

* *T. harzianum* 接種後の日数

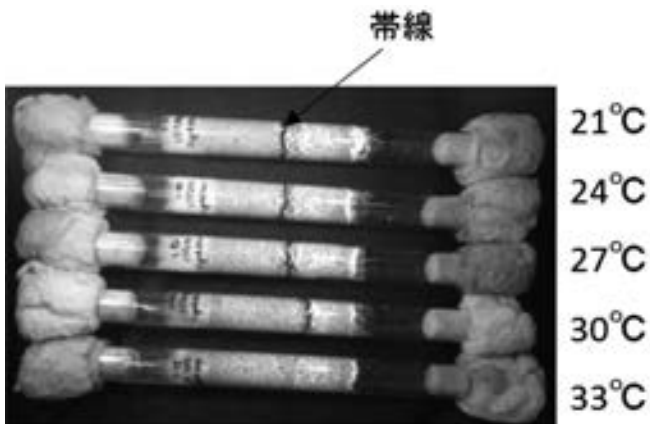


図-5. *T. harzianum* とシイタケの対峙培養試験の様子

3. 培養温度別の菌糸伸長速度測定

供試菌株の各温度条件における菌糸伸長速度を図-6に示した。シイタケ菌は、25℃で最大の菌糸伸長速度(0.20mm/h)を示し、30℃では菌糸伸長速度が下がり、35℃では菌糸は伸長しなかった。一方、ヒポクレア属菌のうち、*H. peltata* は30℃で最大の菌糸伸長速度(0.95mm/h)を示した。*H. lactea* は25℃で最も菌糸伸長が速く(0.93mm/h)、30℃で若干下がったものの0.87mm/hという高い値を示した。

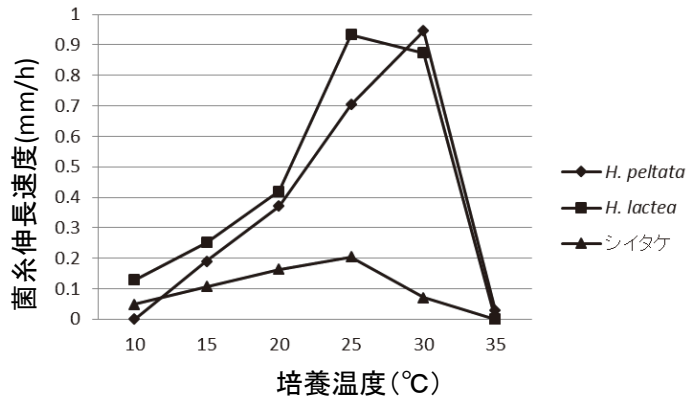


図-6. ヒポクレア属菌の温度別菌糸伸長速度

IV. 考察

野外で行った分離試験において、平均気温よりも最高気温30℃以上日数の方がトリコデルマ属菌および *T. harzianum* の分離率との相関が高く、最高気温30℃以上の日数が多いほど、分離率が高くなる傾向が確認された。相関係数が高かったのは、トリコデルマ属菌全体の分離率よりも *T. harzianum* の分離率の方であったが、これは、試験地7(札幌市)でトリコデルマ属菌の中では、比較的低温での菌糸伸長が速い *T. polysporum* (小松, 1976) が分離された結果が反映されていると考えられた。他の試験地では、*T. polysporum* は分離されず、同菌が分離されることは、むしろ低温な環境にあることを示していると考えられる。*T. harzianum* はすべての試験地で分離が確認されており、至適温度が30℃付近にある株が多い(小松, 1976; 宮崎ほか, 2004)。今後の温暖化の影響を評価する上では、全国に分布し、分離頻度が高く、高温の影響を反映する *T. harzianum* の分離率で行うことが妥当であると考えられる。対峙培養試験の結果でも、30℃でシイタケ菌糸が *T. harzianum* の菌糸に侵害されはじめ、33℃でより顕著に侵害されることが確認された。

近年九州地域で被害を与えているヒポクレア属菌の2種 (*H. peltata* および *H. lactea*) は、シイタケ菌が生長が劣ってくる30℃の培養温度で、それぞれ菌糸伸長速度が0.95 mm/h, 0.87 mm/hと高い値を示した。この値は、シイタケ菌の30℃での菌糸伸長速度(0.07mm/h)に比べ10倍以上あり、その差が最も大きくなった。培養温度35℃では、シイタケ菌だけでなくヒポクレア属菌も菌糸伸長が出来なくなった。ヒポクレア属菌の子のう果の発生状況を現場で観察すると、7月と9月に盛んで、盛夏

の8月頃には新たな子のう果はほとんど形成されない。このことは、気温が高すぎてヒボクレア属菌自体の活性が下がっていることが影響していると考えられた。

野外における害菌分離試験、温度別の対峙培養試験、菌糸伸長速度試験の結果を合わせて考えると、30-33℃の温度環境においてシイタケ菌が、トリコデルマ属菌およびヒボクレア属菌に侵害されやすくなると推察された。

V. おわりに

今回の各試験結果から、30℃を超えた環境になるとシイタケ菌はトリコデルマ属菌やヒボクレア属菌の影響を受けやすくなることが示唆された。よって、今後の地球温暖化の影響により、最高気温が30℃以上となる日数が増えてくると、害菌被害のリスクが高まることが予想される。現在、大きな被害を受けていない生産地でも、今後注意深く生産現場の観察を行うことで、被害を最小限に抑えるといった対応が必要となってくるだろう。

謝辞

本試験を進めるにあたり、沖縄県森林資源研究センターの伊藤

俊輔氏、岩手県林業技術センターの成松眞樹氏、群馬県林業試験場国友幸夫氏、長野県林業総合センターの増野和彦氏、同古川仁氏、片桐一弘氏、大分県農林水産研究指導センター林業研究部きこのグループの石井秀之氏、鹿児島県森林技術総合センターの重森宙一氏、北海道大学の玉井裕氏の御厚意を賜った。ここに記して、心より御礼申し上げます。なお、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) 菌蕈研究所研究報告 13: 1-113.
宮崎和弘ほか (2004) 九州森林研究 57: 284-285.
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, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J., eds): 315-322, Academic Press.
(2014年11月20日受付; 2015年1月26日受理)