

速報

シイタケ原木栽培における特定防除資材を用いた病原菌対策に関する研究Ⅱ
—病原菌類の培養菌糸に対する食酢処理の効果について—^{*1}宮崎和弘^{*2}・新田 剛^{*3}・中武千秋^{*3}

宮崎和弘・新田剛・中武千秋：シイタケ原木栽培における特定防除資材を用いた病原菌対策に関する研究Ⅱ —病原菌類の培養菌糸に対する食酢処理の効果について— 九州森林研究 70：117－120，2017 九州地域におけるシイタケの原木栽培現場では，近年 *Hypocrea* 属菌による被害報告が相次いでいる。その対策方法として農薬取締法によって使用が認められている特定防除資材による防除効果等について予備的な試験を行ったところ，食酢が *Hypocrea lactea* の培養菌糸を死滅させる効果があることが示唆された。そこで，今回その再現性を確認するため，同様の試験の繰り返し試験を行った。また，未試験であった *H. peltata*, *Trichoderma harzianum* に対する食酢処理の効果を検討した。その結果，*H. lactea* の培養菌糸に対して食酢で処理を行った場合において，再現的に菌糸を死滅させる効果があることが確認された。また，*H. peltata*, *T. harzianum* に対しても培養日数が2日間の菌糸であれば，食酢により培養菌糸が死滅することを確認した。また，*H. lactea* の子のう果形成試験では，シイタケの培養駒に *H. lactea* の菌糸を接種し，*H. lactea* を培養した駒をシイタケほだ木に接種することで一部子のう果の形成を誘導することに成功した。

キーワード：シイタケ原木栽培，*Hypocrea* 属菌，*Trichoderma harzianum*，特定防除資材

I. はじめに

九州地域のシイタケ原木栽培現場では，近年 *Hypocrea* 属菌の被害報告が相次いでいる（宮崎ほか，2013，2014）。その原因のひとつとして，地球温暖化が影響を与えていることが考えられる。IPCC（気候変動に関する政府間パネル）の予測では，今後も地球温暖化が進行するとされており（環境省，2014），今後さらに *Hypocrea* 属菌等シイタケ栽培上の病原菌被害リスクが高まることが予想される（宮崎ほか，2015）。そこで，筆者らは害菌被害対策として，特定防除資材（特定農薬）を利用した防除の可能性を探るため，*Hypocrea lactea* の培養菌糸に対して，食酢および重曹（炭酸水素ナトリウム）による処理後，菌糸再生の有無を観察した。その結果，食酢には *H. lactea* の培養菌糸を死滅させる効果があると考えられた（宮崎ほか，2016）。

そこで，今回食酢の防除資材としての信頼性を検証することを目的として，同様の試験を繰り返し行うことで，再現性の確認を行った。また，防除対象となる病原菌を広げるため，あらたに *H. peltata*, *Trichoderma harzianum* に対する試験を行った。加えて，各種の処理試験を行う上で必要となる *Hypocrea* 属菌による被害木を安定的に作出するために，*H. lactea* の子のう果形成試験を行った。

II. 材料と方法

1. 使用菌株

培養菌糸に対する処理効果を確認するための試験には，*H. lactea* として森林総合研究所九州支所保存菌株の KRCF 1095，

H. peltata として KRCF 1673，*T. harzianum* として KRCF 131，シイタケ菌株として菌興 697 号（以下，K 697）を用いた。子のう果形成試験には，*H. lactea* の KRCF 1685 を用いた。

2. 培養菌糸に対する防除効果ならびに薬害効果試験

H. lactea, *H. peltata*, *T. harzianum* の培養菌糸への影響を評価するために，各供試菌を直径 90 mm のガラス製シャーレに詰めた木粉・米ぬか培地（容量比で木粉：米ぬかを 4:1 で混合し，水道水にて含水率約 65 % に調整後，121 °C で 30 分間滅菌）で，25 °C ・9 日間培養し試験に用いた。*H. peltata* および *T. harzianum* に関しては，さらに5日間および2日間の培養菌糸に対する試験を行った。シイタケ菌糸への影響を評価するための試験には，K 697 を同様の培地で，25 °C ・21 日間培養した培養菌糸を用いた。処理方法は，(1) 滅菌水（コントロール），(2) 食酢原液（酸度：4.2 %）（株式会社ミツカン醸造酢，型番：MAV-A），(3) 4.2 % 酢酸，(4) 5 % 炭酸水素ナトリウム，とし，木粉・米ぬか培地上の培養菌糸にそれぞれの処理溶液を 20 ml 添加し，10 秒間（10 sec），および10分間（10 min）処理後，20 ml の滅菌水で3回洗浄を行った。処理枚数を2枚とし，シャーレ1枚あたり5箇所，計10箇所から分離を行った。分離後の培養は，ポテトデキストロース寒天（PDA）平板培地（直径：60 mm）を用いて行った。

3. 完熟ほだ木を用いた薬害効果試験

直径7～8 cm の完熟ほだ木（クヌギ原木に K 697 の形成菌接種後，3年半経過）を長さ約 18 cm に切り出し，試験に用いた。処理方法は，(1) 滅菌水（コントロール），(2) 食酢原液（酸度：4.2 %）（株式会社ミツカン醸造酢，型番：MAV-A），(3) 4.2 % 酢酸，で，各溶液に供試したほだ木3本を10分間完全に

^{*1} Miyazaki, K., Nitta, T. and Nakatake, C.: A study on countermeasures for pathogenic fungi of shiitake mushroom cultivation with bed-logs using designated harmless agricultural chemicals II :About utility of treatments using edible vinegar for vegetative mycelia of pathogenic fungi.

^{*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

沈め、その後、樹皮を約3cm四方で取り除き、辺材部分から各試験木あたり4箇所ずつ切り出しを行い、PDA平板培地（直径：60mm）上で培養を行った。評価は、滅菌水に浸漬した試験区のシイタケ菌糸の再生数を分母とし、食酢原液（酸度：4.2%）および4.2%酢酸に浸漬した試験区の再生数を分子とし、百分率（%）で表した。

4. 子のう果形成試験

長さ1mのクスギ原木に、K697の形成菌を各原木の直径（cm）の4倍数接種した。なお、原木の直径は、両木口面の長径と短径を測定し、計4直径の平均により算出した。接種日は、2016年2月23日であった。形成菌の接種後、枕木の上に棒積みとし、寒冷紗をかぶせ雨が降らない期間には、2日に1回を目安に15分間散水しながら仮伏を行った。仮伏後の2016年4月11日に本伏のため森林総合研究所九州支所立田山試験林内のほだ場に試験木を移動し、合掌になるよう並べた。*H. lactea*の接種源は、2種類準備した。ひとつは、K697を850ml容のPPビンで2ヶ月間培養した木片駒に、2MA（2%モルトエキス、1.5%寒天）平板培地にて1週間培養したKRCF1685のディスク（直径：4mm）を5片接種し、1週間25℃で培養を行った木片駒（以下、ラクテア培養駒）を接種源とし、コントロール区としてなにも培養していない木駒の接種区を設定した。もうひとつは、KRCF1685を2MA平板培地で1週間培養したコロニーを、内径12mmのコルクボーラーで抜き取ったディスク10片を、100mlの滅菌水に入れ、ホモジナイザー（Nissei, Ace homogenizer）を用いてホモジナイズ（10,000rpm, 1min.）した懸濁液（以下、ラクテア懸濁液）を接種源とし、コントロール区として滅菌水塗布区を設定した。ラクテア培養駒は、原木直径（cm）の半分の値を目安に、(1)シイタケ接種駒付近、(2)シイタケ接種駒と接種駒の中間、の2種類の接種方法で、ラクテア懸濁液は、ペンテル画筆（XZBS2-10）で3回ずつ塗布する方法で、(1)シイタケの接種駒に直接塗布、(2)シイタケの接種駒間の樹皮上に塗布、の2種類の方法で接種を行った。2016年5月23日に各試験区を供試ほだ木10本ずつに行い、翌5月24日に、立田山実験林内と宮崎県林業技術センター構内にそれぞれ1試験区あたり5本ずつを設置した。7月以降不定期に子のう果形成の観察を行い、子のう果が観察された場合、その観察日と観察された試験木のナンバーを記録した。

Ⅲ. 結果

1. 培養菌糸に対する処理試験

*H. lactea*を9日間培養した菌糸に対し、各種処理を行ったときの再生率（試験繰り返し回数：6回）を表-1に示した。滅菌水、5%炭酸水素ナトリウム溶液で処理を行った試験区では、処理時間（10secおよび10min）にかかわらず、すべて再生率は100%であり、特定防除資材のうち炭酸水素ナトリウム、いわゆる重曹は*H. lactea*の培養菌糸に対する殺菌効果が認められなかった。その他の処理では、食酢原液（酸度：4.2%）および4.2%酢酸を10min処理した試験区（試験区4および試験区6）ではすべて再生率が0%であり高い殺菌効果が確認された。処理時間10secでは結果に幅があり、食酢原液（酸度：4.2%）（試験区3）で0~30%、4.2%酢酸（試験区5）では0~60%であった（表-1）。

*H. peltata*を9日間培養した菌糸に対して処理を行った場合には、試験区6（4.2%酢酸・処理時間：10min）においてのみ再生率の低下が認められたものの、*H. lactea*ほど感受性がなかった（表-2）。そのため、培養日数を短くしたところ、培養日数5日間において試験区4においてもわずかに再生率の低下が観察された。さらに、培養日数2日間の菌糸に対する試験において、試験区3、4、5、6、および8において再生率の低下が観察された（表-2）。

次に、*T. harzianum*の培養菌糸に対する処理試験では、培養日数が9日間、および5日間では、すべての試験区で再生率が100%であり（表-3）、*H. peltata*に比べてもさらに感受性が低いことが示唆された。培養日数2日間では、試験区4、5、および6において再生率の低下が認められ、4.2%酢酸で10min処理する試験区6では再生率は0%であった（表-3）。

シイタケ菌糸に対する薬害効果を確認するために行った、シイタケ菌糸（3週間培養）に対する処理試験においては、2回繰り返し行った試験のうち、2回とも再生率の低下が認められたのは4.2%酢酸で10min処理した試験区6だけであった（表-4）。

2. 完熟ほだ木を用いた薬害効果試験

評価結果を表-5に示す。合計3回繰り返しで行った試験ではすべて食酢原液に比べ、4.2%酢酸に浸漬させた試験区で再生率が低かった（表-5）。また、食酢原液による浸漬処理では、3回中2回は滅菌水による試験区と同じ再生割合（100%）であり、低下が認められた3回目の試験でも91.7%と滅菌水処理試験と

表-1. *H. lactea* 培養菌糸に対する各処理後の再生率

試験区	処理方法	処理時間	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均値±標準誤差
1	滅菌水	10 sec	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100±0%
2	滅菌水	10 min	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100±0%
3	食酢原液（酸度：4.2%）	10 sec	0%	30%	0%	10%	0%	10%	8.3±5.2%
4	食酢原液（酸度：4.2%）	10 min	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0±0%
5	4.2%酢酸	10 sec	0%	60%	20%	0%	0%	0%	13.3±10.8%
6	4.2%酢酸	10 min	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0±0%
7	5%炭酸水素ナトリウム	10 sec	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100±0%
8	5%炭酸水素ナトリウム	10 min	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100±0%

表-2. *H. peltata* 培養菌糸に対する各処理後の再生率

試験区	処理方法	処理時間	培養日数		
			9日間	5日間	2日間
1	滅菌水	10 sec	100%	100%	100%
2	滅菌水	10 min	100%	100%	100%
3	食酢原液 (酸度:4.2%)	10 sec	100%	100%	70%
4	食酢原液 (酸度:4.2%)	10 min	100%	90%	70%
5	4.2%酢酸	10 sec	100%	100%	20%
6	4.2%酢酸	10 min	80%	80%	0%
7	5%炭酸水素ナトリウム	10 sec	100%	100%	100%
8	5%炭酸水素ナトリウム	10 min	100%	100%	80%

表-3. *T. harzianum* 培養菌糸に対する各処理後の再生率

試験区	処理方法	処理時間	培養日数		
			9日間	5日間	2日間
1	滅菌水	10 sec	100%	100%	100%
2	滅菌水	10 min	100%	100%	100%
3	食酢原液 (酸度:4.2%)	10 sec	100%	100%	100%
4	食酢原液 (酸度:4.2%)	10 min	100%	100%	20%
5	4.2%酢酸	10 sec	100%	100%	50%
6	4.2%酢酸	10 min	100%	100%	0%
7	5%炭酸水素ナトリウム	10 sec	100%	100%	100%
8	5%炭酸水素ナトリウム	10 min	100%	100%	100%

表-4. シイタケ培養菌糸に対する各処理後の再生率

試験区	処理方法	処理時間	試験	
			1回目	2回目
1	滅菌水	10 sec	100%	100%
2	滅菌水	10 min	100%	100%
3	食酢原液 (酸度:4.2%)	10 sec	100%	100%
4	食酢原液 (酸度:4.2%)	10 min	100%	90%
5	4.2%酢酸	10 sec	100%	100%
6	4.2%酢酸	10 min	70%	40%
7	5%炭酸水素ナトリウム	10 sec	100%	100%
8	5%炭酸水素ナトリウム	10 min	100%	100%

表-5. 完熟ほだ木に対する処理効果

処理方法	コントロール区と比較した再生割合		
	1回目	2回目	3回目
食酢原液 (酸度:4.2%)	100.0%	100.0%	91.7%
4.2%酢酸	72.7%	66.7%	66.7%

表-6. *H. lactea* の子のう果形成試験結果

試験区	接種源	接種箇所	形成率
1	滅菌水	駒直接	0%
2	ラクテア懸濁液	駒直接	0%
3	滅菌水	駒間	0%
4	ラクテア懸濁液	駒間	0%
5	木駒	駒付近	0%
6	ラクテア培養駒	駒付近	30%
7	木駒	駒間	0%
8	ラクテア培養駒	駒間	10%

大きな違いはなかった。

3. 子のう果形成試験

H. lactea の子のう果形成試験では、コントロールとして行った滅菌水塗布区 (試験区1および3)、および生駒接種区 (試験区5および7) では、いずれも子のう果の形成は無く、自然感染での子のう果形成は無かったと考えられた。次に、ラクテア懸濁液を接種した試験区でも子のう果の形成は認められず、たとえシイタケの接種駒上に培養菌糸の懸濁液を直接塗布 (試験区2) しても感染には至らなかったと考えられる。形成数は低いもののラクテア培養駒を接種した試験 (試験区6および8) においてのみ *H. lactea* の子のう果の形成が認められた (表-6)。

IV. 考察

H. lactea の培養菌糸に各処理を行う試験から、複数回の試験を行っても炭酸水素ナトリウム溶液による処理では、処理時間の長短 (10 sec および 10 min) にかかわらず、分離試験における再生率に低下は認められず (表-1)、6回の試験すべてで100%の再生であることから *H. lactea* の防除資材としての効果は全く期待出来ないと判断出来る。また、*H. peltata* および *T. harzianum* の培養菌糸に対する培養期間を変えた試験 (表-2および表-3) でも、唯一 *H. peltata* の2日間培養菌糸において80%に下がった以外はすべて100%再生しており、*H. lactea* だけではなく病原菌類全般に対して、防除資材としての効果は期待出来ない結果が得られた。食酢および酢酸に関しては、まず *H. lactea* に対して見てみると、10 min 処理した場合にはいずれも6回の試験すべてで再生率0%と高い殺菌効果を示し、前回の試験 (宮崎ら, 2016) で得られた結果をより強く支持する結果となった。処理時間10 sec では結果が振れることもあったが、食酢原液 (酸度:4.2%) では6回中3回で0%、4.2%酢酸で6回中4回で再生率が0%と10 sec という短い暴露時間でも高い殺菌効果が認められた。このことから、特定防除資材のうち食酢は実際の *H. lactea* の防除用資材として活用しようと考えられる。また、その他の病原菌として *H. peltata* および *T. harzianum* の培養菌糸に対する処理試験も行ったが、*H. lactea* における結果ほど感受的ではなかったものの培養期間の短い菌糸に対しては殺菌効果が認められたことから、食酢で処理することで発菌間もない菌糸にはダメージを与えることができるのではないかと考えられる。

3週間培養したシイタケの培養菌糸は、食酢処理ではほとんど再生率の低下が認められず、十分に生長したシイタケ菌糸に対しては殺菌効果は低いと考えられた。ただし、再生した菌糸を観察すると、菌糸伸長が遅れるケースも認められた。よって、シイタケの菌糸は完全に死滅してはいないものの何らかのダメージを受けていることが考えられた。この伸長の遅れが一時的なものであるのか、今後試験をしておく必要があると考えられる。完熟ほだ木を食酢原液および酢酸溶液に10 min 浸漬した試験では、食酢ではほぼコントロールである滅菌水処理時に再生した再生率と同等の再生が認められたが、酢酸溶液に浸漬した方では、若干の再生率の低下が認められた。しかしながら、実際の生産現場では10 min の浸漬処理は難しく、表面に散布する程度では樹皮下のシイタケの菌糸にはほとんど影響はないのではないかと考えられ

る。これらの結果から、少なくともシイタケの原木栽培では、食酢使用による葉害は生じないのではないかと予想される。最終的には、ほだ木に食酢処理を行う、栽培試験による確認が必要であろう。

また、シイタケほだ木に対して各種の処理を行った際の防除効果を試験するためには、*Hypocrea* 属菌の子のう果を人為的に誘導出来ることが望まれる。しかしながら、これまでに *Hypocrea* 属菌の子のう果形成を人為的に誘導した事例がないため、今回接種方法の検討から行った。結果としては、*Hypocrea* 属菌の培養菌糸の懸濁液を接種した場合には子のう果形成まで誘導することが出来ず、シイタケの種駒に *H. lactea* を接種したラクテア培養駒を接種した試験区でわずかに子のう果の形成が認められた。事前にシイタケを接種した近傍にラクテア培養駒を接種した方で子のう果形成が10本中3本で認められ、シイタケを接種したところから離れた箇所にラクテア培養駒を接種した試験における10本中1本よりも高い割合であった。これらのことから、*H. lactea* をほだ木内部に接種する方が子のう果形成まで至る可能性が高く、またシイタケの菌糸がほだ木内で伸長しているところに接種する方が確率が高いようであった。今回接種源としたラクテア培養駒は、*H. lactea* の培養期間が1週間と短かったことから、

培養期間をより長くするなど接種源の工夫をすることで子のう果形成の割合を高めることが出来るのではないかと考えられる。

V. 謝辞

本研究の一部は、森林総合研究所交付金プロジェクト「シイタケの原木栽培現場において気候変動の影響を低減化させるための予備的研究」の試験として行われた。

引用文献

- 環境省 (2014) IPCC 第5次評価報告書の概要. URL : http://www.env.go.jp/earth/ipcc/5th/pdf/ar5_wg1_overview_presentation.pdf (2016年11月1日利用).
- 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.
- 宮崎和弘ほか (2015) 九州森林研究 68 : 173-176.
- 宮崎和弘ほか (2016) 九州森林研究 69 : 149-151.
(2016年12月4日受付; 2017年1月24日受理)