

シイタケ (*Lentinula edodes*) を植菌した木材の分解呼吸速度と環境ストレスへの応答Response to environmental stresses of decomposition respiration of dead wood inoculated with *Lentinula edodes*

栗山知子*¹・上村真由子*¹・松室諒*¹・丸山温*¹・山口宗義*²・小松雅史*²
Tomoko Kuwayama*¹, Mayuko Jomura*¹, Ryo Matsumuro*¹, Yutaka Maruyaka*¹,
Muneyoshi Yamaguchi*², Masabumi Komatsu*²

*1 日本大学生物資源科学部

Nihon University, College of Bioresource Sciences

*2 森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute

要旨: 倒木などの粗大有機物は森林生態系の重要な構成要素である。気候変動によって引き起こされる極端な気象条件は木材分解者へ影響を与えると考えられている。そこで本研究では、環境ストレスに対する分解呼吸速度の応答を見るための実験系を開発し、その応答を観察することを目的とした。直径 6cm, 厚さ 3cm のコナラ材にシイタケの種駒を植え付けた。非植菌サンプルとして種駒を植え付けない材も用意した。これらの木材をガラス瓶に入れて平均 23°C で室内培養した。培養開始から 2 ヶ月経過後、植菌サンプルを 4 群に分け、環境ストレス無し、高温、湛水、乾燥ストレスを与えた。培養初期は月に 1 度程度、環境ストレスを与えた後は週に 1 度程度の頻度で、呼吸速度の測定を行った。呼吸速度は、どのストレスにおいてもストレス無しの植菌サンプルに比べて 6, 7 割に低下した後、高温ストレスではストレス無しの植菌サンプルと同様に増加、湛水ストレスでは漸増、乾燥ストレスではその後の乾燥に応じて減少した。ストレスの種類により呼吸速度の応答の大きさは異なり、菌糸の成長が回復する場合としない場合があった。環境ストレスが分解者の生理に与える影響が大きいことが伺えた。

キーワード: 粗大有機物, 室内培養, 高温ストレス, 湛水ストレス, 乾燥ストレス

Abstract: Dead wood is an important component of forest ecosystems. The extreme climate conditions including high temperature and drought caused by climate change seem to influence wood decomposers and decomposition processes. We incubated wood disks inoculated with *Lentinula edodes* in a laboratory and added environmental stresses such as high temperature, flooding and drought to the disks and examined the response of the decomposition respiration rate to these stresses. We obtained disks (diameter: 6cm, thickness: 3cm) from living tree branches of *Quercus serrata* inoculated with *Lentinula edodes*. We prepared wood disks without the inoculation as a control. Each disk was inserted in a glass bottle and incubated at 23 °C in a laboratory. Two months after the inoculation, we separated the disks into 4 groups: without stress, high temperature, flooding, and drought stress. We measured respiration rate a month before the stress treatment and once a week after the stress treatment. The respiration rate of each stress decreased between 60 to 70% to the inoculated samples without stress, then the respiration rate with high temperature stress increased similarly to its increase of inoculated samples without stress, that of flooding stress slightly increased and that of drought stress decreased along with the decrease of water content. Significant decrease was observed in the flooding and drought stress samples. Environmental stresses would have severe effects on the physiology of wood decomposing microbes.

Key-word: Coarse woody debris, incubation, high temperature stress, flooding stress, drought stress

I はじめに

気候変動によって高温や豪雨といった極端な気象現象の強度や頻度が増えている(6)。これらの気象条件が生物にストレスを与え、生態系の機能に影響を及ぼすことが示

されている(9)。同様に微生物も影響を受けると考えられるが、環境ストレス(以降、ストレスと呼ぶ)に対する様々な適応メカニズムによって生態系の物質循環を変える可能性も示されている(10)。気候変動による微

生物を通じた生態系機能の変化を知るためには、ストレスに対する微生物の応答を理解することが不可欠である。

微生物の生理活性の一つの示標である微生物呼吸は、温度や含水比の変化に応答する(7, 12)。微生物、特に真菌の成長は、高温域で成長阻害が起こり(4)、乾燥に応じて低下することが知られている(8)。また、湛水(酸素欠乏)条件でも低下することが知られている(4)。しかし、ストレスの種類や強度や、ストレスからの経過時間が呼吸速度に及ぼす影響は明らかにされていない。

シイタケは木材腐朽菌、特に白色腐朽菌であり、東アジアや日本において重要な林産物であることから、室内培養や野外における栽培手法が確立している。従って、シイタケを植菌した木材にストレスを与え、呼吸速度と対応させることで、木材腐朽菌のストレス応答を調べることができると考えられる。

そこで本研究では、シイタケを用いたストレスに対する分解呼吸速度の応答を見るための実験系を開発し、その応答を観察することを目的とした。

II 方法

1. 材料 日本大学藤沢演習林において、2016年7月にコナラ(*Quercus serrata*)の生立木から、直径6cm程度の枝を10本ほど採取した。70°Cの乾燥機で絶乾させた後、卓上ボーラーを用いて直径9mm、深さ3cmの穴を開け、バンドソーを用いて、枝を3cm間隔で切断し、107個の穴開きの円盤を得た。

2. 調査項目 得られた円盤は浸水した状態でオートクレーブ処理し、103個の円盤については、クリーンベンチ内でシイタケの種駒(森290, 森産業)を植え付けた(以降、植菌サンプルと呼ぶ)。残りの4個の円盤は、非植菌サンプルとしてシイタケを植え付けなかった(以降、非植菌サンプルと呼ぶ)。オートクレーブ処理をしたガラス瓶(直径9cm、高さ10cm)にこれらの円盤を1枚ずつ入れ、蓋をし、ビニール袋で覆って実験室内で培養した。

2016年8月9日より、植菌サンプルと非植菌サンプルの呼吸速度を測定した。呼吸の測定は、アクリル製のチャンパー(縦12cm、横12cm、高さ21cm)、赤外線ガスアナライザー(GMP343, Vaisala社製)とデータロガー(GL200, Graphtech社製)を用いた。呼吸速度の測定後、円盤の生重を測定し、紙袋へ入れて70°Cの乾燥機で絶乾させ、乾燥重量を測定した。培養瓶内の温度や湿度はセンサー(おんどとり Jr, TandD社製)を用いて測定した。

測定開始から2か月程度で植菌サンプルの呼吸速度が安定したため、シイタケが円盤内に十分に蔓延したと判断し、2016年10月12日(培養開始後73日目)に、56個

のサンプルを4群に分け、環境ストレス無し、高温、湛水、乾燥ストレスを与えた。高温ストレスを与えるために、植菌サンプルの入ったガラス瓶を40°Cの恒温機に4時間入れた。湛水ストレスを与えるために、植菌サンプルの入ったガラス瓶にサンプルが浸水する程度の滅菌水を入れて4時間放置した。乾燥ストレスを与えるために、2016年10月17日から21日まで、送風するクリーンベンチ内に植菌サンプル入りのガラス瓶を置き、蓋を開けて乾燥させた。ストレスを与えた後は、ストレスを与える前と同様に実験室内に静置し、室内培養を行った。ストレス処理後もストレス前と同様に、ストレス無しの植菌サンプル、高温処理サンプル、湛水処理サンプル、乾燥処理サンプル、非植菌サンプルそれぞれ4個ずつ、呼吸速度の測定を行った。測定後、サンプルを紙袋へ入れて、70°Cの乾燥機で絶乾させて、乾燥重量を測定した。含水比は以下の式によった。

$$\theta = (FW - DW) / DW$$

θ : 含水比(g/g), FW : 生重(g), DW : 乾重(g)である。呼吸速度、含水比ともに、ストレス無しの植菌サンプルに対する各ストレス処理サンプルの差の検定のために t 検定を用いた。

III 結果

培養瓶内の温度と湿度は平均で23°C、75%であった。植菌サンプルでは、値が上下するものの培養期間を通して呼吸速度が増加した(図-1)。非植菌サンプルでは呼吸がほとんど観測されなかった。ストレス無しの植菌サンプルと比較して、高温処理サンプルの呼吸速度が6割程度になり、その後培養期間が経つにつれ呼吸速度は増加した。湛水処理サンプルの呼吸速度は7割程度まで低下し、その後漸増した。乾燥処理サンプルの呼吸速度は7割程度まで低下し、その後減少した。湛水処理および乾燥処理サンプルでは測定期間を通じてストレス無しの植菌サンプルより呼吸速度が低下した。

含水比については、ストレス無しの植菌サンプル、高温処理サンプルともに含水比は0.8から1.0g/gの範囲を示し、ほとんど変化しなかった(図-2)。湛水処理サンプルでは、処理後含水比が1.7倍となるが、すぐに減少しストレス無しの植菌サンプルと同程度になった。乾燥処理サンプルでは、処理後含水比が0.5倍になり、その後も減少した。

ストレス無しの植菌サンプルの平均呼吸速度と比較してすべてのストレス処理サンプルで平均呼吸速度の減少が観測された。ストレスの影響の大きさは高温<湛水<乾燥であったが、有意に減少したものは、湛水、乾燥ス

トレスサンプルであった(図-3)。

IV 考察

植菌サンプルでは、非植菌サンプルよりも呼吸速度が大きくなった。これは、シイタケ菌の蔓延に伴い呼吸速度が増加したためだと考えられる。植菌サンプルでは、40日までは呼吸速度が増加し、60日程度で安定し、その後は値が上下しつつも増加した。これは、培養期間を通じて菌体バイオマスが増加したためだと考えられる。

高温処理サンプルでは、ストレス無しの植菌サンプルに比べて呼吸速度は6割程度となったが、その後ストレス無しの植菌サンプルと同様に増加した。シイタケの最適温度は26から28℃(9)であることや、連続した高温下では菌糸成長が止まり、菌糸の回復が見込めない(1)ことから、40℃ 4時間の高温処理はシイタケを失活させるほどではないが、菌体になんらかの影響を与えたと考えられる。

湛水処理サンプルでは、ストレス無しの植菌サンプルに比べて呼吸速度は7割程度まで低下し、その後漸増した。湛水処理により、含水比が2.0g/gまで上昇したこと、木材の基質の密度を1.5g/cm³と仮定(2)して計算された木材中の間隙体積に比べて、水の体積が同等か少し大きかったことから、間隙は水で満たされていたと考えられる。酸素欠乏はシイタケの活性を下げることも示されている(11)。これらにより、湛水直後は酸素欠乏により木片内の菌糸の活性が低下したが、その後の水分の蒸発やシイタケによる滲出により、含水比が適度に保たれ、菌糸の成長が続いたと考えられる。

乾燥処理サンプルでは、ストレス無し植菌サンプルに比べて呼吸速度は7割程度となり、最終的には3割程度まで低下した。シイタケ子実体の含水比は0.8g/g以上(13, 14)、シイタケを植菌して3, 4ヶ月後のホダ木の含水比は0.45から0.54g/g(5)との報告があるが、本研究では、含水比が0.5g/g程度まで下がることで菌体に何らかの不可逆な反応が生じ、菌糸の成長が回復しなかったと考えられる。

高温、湛水、乾燥いずれのストレスでも、シイタケの分解呼吸速度は低下したが、その後の応答は異なった。今後は、ストレスの種類や強度が呼吸に与える影響を詳細に解明するために、呼吸の大きさに密接な関係を持つ菌体バイオマスの変化を調べる必要がある。

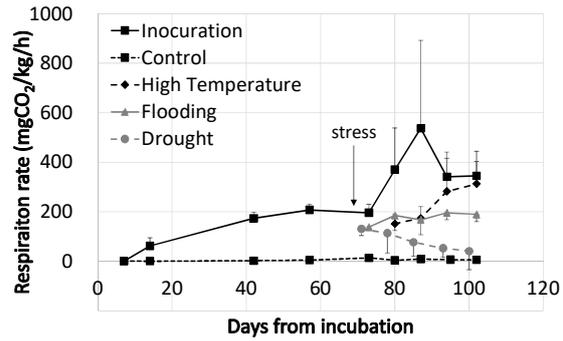


図-1. 呼吸速度の変化(エラーバーは標準偏差を示す)
Fig.1 Change in respiration rate. Asterisks mean a significant decrease from the inoculated samples without stress (bars represent standard deviation).

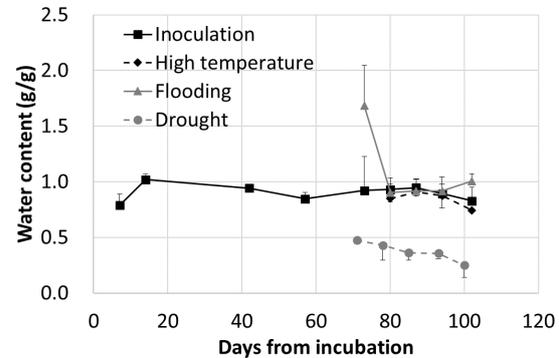


図-2. 含水比の変化(エラーバーは標準偏差を示す)
Fig.2 Change in water content. Asterisks mean a significant decrease from the inoculated samples without stress (bars represent standard deviation).

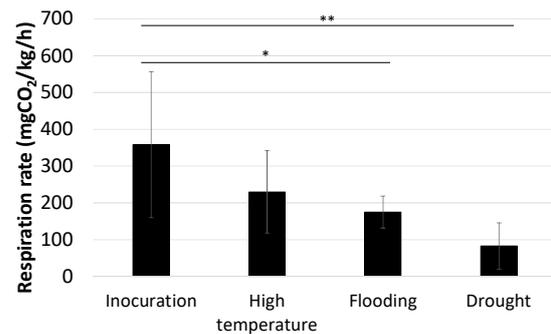


図-3. ストレス後の平均呼吸速度
*は p<0.05, **は p<0.01 で植菌サンプルに対する有意差を示す エラーバーは標準偏差を示す
Fig.3 Mean respiration rate after stress treatment. Asterisks mean a significant decrease from the inoculated samples without stress
*: p<0.05; **: p<0.01, t-test, bars represent standard deviation.

謝辞：本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力を得て行うことができました。日本大学大学院生物資源科学森林資源科学科森林生態学研究室の皆様、森林植物・微生物学研究室の太田祐子教授には研究に関する多くのご助力をいただき大変お世話になりました。ここに記して厚く御礼申し上げます。本研究は科学研究費補助金(17K07848)を受けて行われました。

引用文献

- (1) 阿部正範・飯田繁・大賀祥治 (2002) シイタケ子実体発生に及ぼす培養温度の影響. 日本応用きのこ. 10(3) : 129-134
- (2) 浅野猪久夫 (1982) 木材の事典. 朝倉書店.
- (3) EASTERLING, D.R., MEEHL, G.A., PARMESAN, C., CHANGNON, S.A., KARL, T.R. AND MEARNES, L.O. (2000) Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science*. 289 : 2068–2074
- (4) GRIFFIN, D.H. (1994) *Fungal Physiology*. Wiley-Liss, Inc.
- (5) 本田耕吉・吉川郁夫・作野友康・岸本 潤 (1981) シイタケ原木としてのコナラ・クヌギの水分挙動について. 鳥大農演報. 13 : 49-57
- (6) IPCC (2013) *Climate Change 2013: the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press : 871
- (7) JOMURA, M., KOMINAMI, Y., TAMAI, K., MIYAMA, T., GOTO, Y., DANNOURA, M., KANAZAWA, Y. (2007) The carbon budget of coarse woody debris in a temperate broad-leaved secondary forest in Japan. *Tellus B*. 59 : 211-222
- (8) MANZONI, S., SCHIMMEL, J.P., PORPORATO, A. (2012) Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta analysis. *Ecology*. 93 : 930-938
- (9) 中村克哉(1982) キノコの事典. 朝倉書店.
- (10) SCHIMMEL, J., BALSER, T.C., WALLENSTEIN, M. (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*. 88 : 1386–1394.
- (11) SHEN, Q., LIU, P., WANG, X., ROYSE, J. D. (2008) Effects of substrate moisture content, log weight and filter porosity on shiitake yield. *Bioresour Technol*. 99: 8212-8216
- (12) SUSEELA, V., CONANT, R., WALLENSTEIN, M., DUKES, J. (2012) Effects of soil moisture on the temperature sensitivity of heterotrophic respiration vary seasonally in an old-field climate change experiment. *Glob Chang Biol*. 18 : 336-348
- (13) 辻村進・北宅善昭・清田信・相賀一郎 (1992) 環境調節施設内における菌床シイタケ子実体形成に対する温度と給水量の影響. *生物環境調節*. 30(4) : 153-160
- (14) 吉田博・菅原龍幸・林 淳三 (1987) シイタケ子実体の収穫後における有機酸の変化. *日本食品低温保蔵*. 34(5) : 274-281