

## きのこ栽培の害菌, *Trichoderma* 属菌の探索, 分子系統解析と代謝産物パターン解析

奥田 徹<sup>1</sup>・五十嵐康弘<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 玉川大学 学術研究所

[〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1]

<sup>2</sup> 富山県立大学 生物工学研究センター

[〒939-0398 富山県射水市黒河 5180]

### *Trichoderma* strains isolated from mushroom cultivation farms, their identification, molecular phylogeny and metabolite production profiles

Toru OKUDA<sup>1</sup> and Yasuhiro IGARASHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tamagawa University Research Institute

<sup>2</sup>Toyama Prefectural University

#### 1. はじめに

近年, *Trichoderma* の新種が特殊な生態環境下から見つかった。また土壌由来の *Trichoderma* は汎世界種が多いが, 樹木や他の基質由来の *Hypocrea* と *Trichoderma* は地域限定的なことが多く, 異なった大陸では異なった種が生息すると考えられている。日本からは今後も多くの新種が発見されることが期待されている(Jaklitsch, 2009)。

*Trichoderma* 属は多様な二次代謝産物を生産することが知られているが, Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c, 1992)以降種数が増大し, 代謝産物の報告の時期によって種名が現在のものと変わっていることがある。Degenkolb ら (2006, 2008) はペプチン化合物や trichothecans などの代謝産物の分析を導入して新しい *T. brevicompactum* クレードの分子系統を化学分類から支持するとしている。

以上のような状況下で, 我々のこれまでの経験から, 1) きのこ栽培農家で害菌として発生した *Trichoderma* には興味深いものが認められることから, わが国でも土壌以外の基質からの分離株には未記載種の *Trichoderma* がありうる, 2) わが国の南方, つまり九州, 南西諸島には興味深い種がありうる, 3) これらの分離株の生理活性, 代謝産物の生産パターンを調べることは基礎データとしてのみならず, きのこ栽培の害菌診断への応用に発展する可能性がある。重要であると考えた。

## 2. 材料および方法

### 1) 探索概要と収集成果

2009年6月17日から22日、10月9日から12日の2回にわたり、南西諸島および岩手県を訪問し、シイタケ栽培原木、シイタケ栽培菌床、キクラゲ栽培菌床などを収集した(表1, 図1). 採集したサンプルは湿室法, 直接分離法, 表面殺菌法を用いて, 菌株の分離に供試した. このようにして得られた *Trichoderma* 属菌は, 玉川大学学術研究所菌学応用研究センターの菌株ライブラリおよびNIAS ジーンバンクに登録し, 筆者らが過去に収集した菌株とともに以後の解析に供した(表2).

表1. 探索・収集日程

年月日	行程	摘要
平成21年6月17日	神奈川県～沖縄県	移動と探索 図1-①
6月18日～21日	沖縄県	探索 図1-①, ②, ③
6月22日	沖縄県～神奈川県	移動
平成21年10月9日	神奈川県～岩手県	移動と探索 図1-④
10月10日～11日	岩手県	移動と探索 図1-⑤
10月12日	岩手県～神奈川県	移動

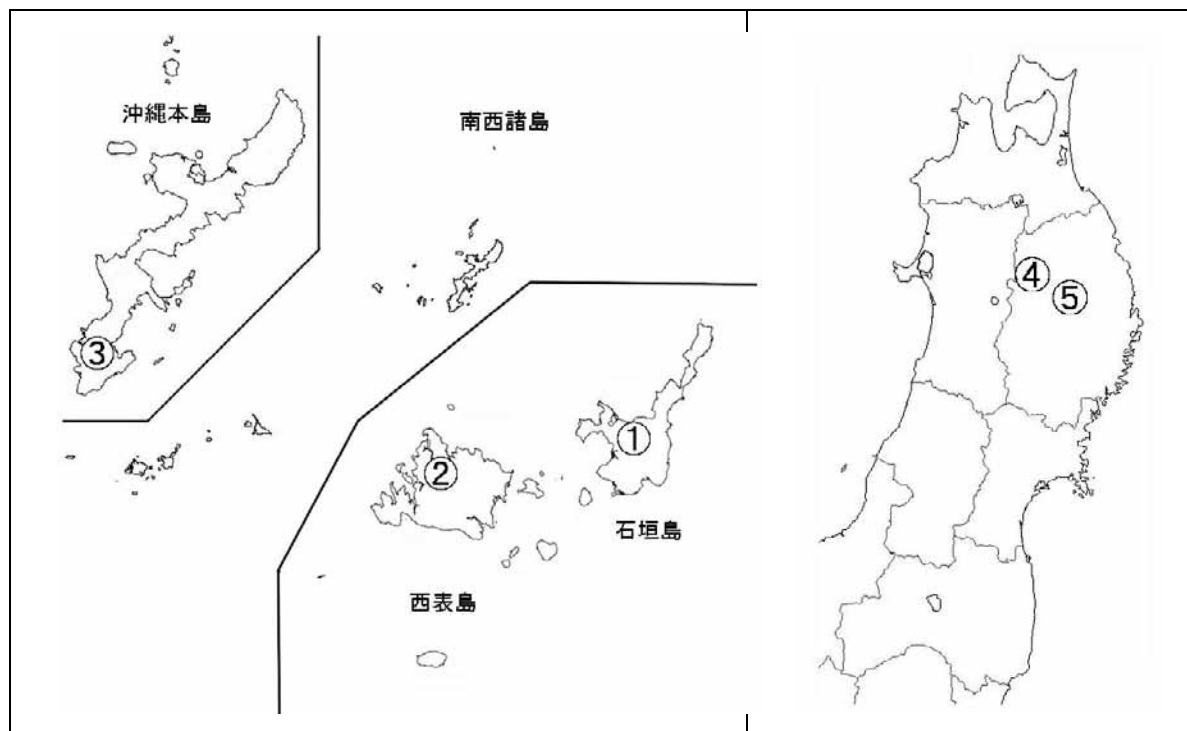


図1. 探索場所

① 沖縄県石垣島, ② 同西表島, ③ 同島尻郡, ④ 岩手県岩手郡, ⑤ 同八幡平市.

### 2) 形態観察と分子系統解析

形態観察には三浦寒天(LCA)培地, オートミール寒天(OA)培地, 2%麦芽エキス寒天(MA)培地を使用した. 各培地に3点植菌した後, ブラックライト照射下, 室温もしくは25°Cで3～

表 2. 供試菌株リスト<sup>a)</sup> と TrichoKEY, TrichoBLAST 検索結果 (その 1)

種名	MAFF 番号	採集地	基質	採集年月	塩基配列 寄託番号	TrichoKEY 検索結果	相同性 検索結果	
<i>Gliocladium viride</i>	242453	熊本県阿蘇郡南小国町	マイタケ栽培施設 内空中落下菌	2006年2月	AB298706		<i>Gliocladium viride</i> (99%)	
<i>Trichoderma atroviride</i>	242473	岩手県岩手郡滝沢村	シイタケ栽培原木	2009年10月	AB563713	<i>T. atroviride</i>		
	242475	岩手県岩手郡滝沢村	シイタケ栽培原木	2009年10月	AB563715			
	242493	大分県玖珠郡九重町	硬質きのこ	2009年10月	AB570248			
	242494	福岡県福岡市	エノキタケ栽培菌床	2005年10月	AB249680			
<i>T. citrinoviride</i>	242487	岩手県岩手郡滝沢村	シイタケ栽培原木	2009年7月	AB570242	<i>T. citrinoviride</i>		
	242488	岩手県岩手郡滝沢村	シイタケ栽培原木	2009年7月	AB570243			
<i>T. harzianum</i>	242469	福岡県福岡市	エノキタケ栽培菌床	2007年3月	AB374278		<i>T. harzianum</i> (98%)	
	242470	北海道上川郡愛別町	シイタケ栽培施設 内空中落下菌	2006年8月	AB374279	<i>T. harzianum</i>		
	242471	大分県豊後大野市	マイタケ栽培菌床	2007年1月	AB374280			
	242474	沖縄県石垣市	朽ち木	2009年6月	AB563714			
	242479	沖縄県島尻郡八重瀬町	キクラゲ栽培菌床用 木片	2009年6月	AB563719			
	242484	沖縄県石垣市	朽ち木	2009年6月	AB563725			
	242490	佐賀県武雄市	空中落下菌	2009年5月	AB570245			
	242491	佐賀県武雄市	シイタケ栽培菌床	2009年5月	AB570246			
	<i>T. cf. harzianum</i>	242454	徳島県阿南市	シイタケ栽培菌床	2005年12月	AB298701		<i>T. harzianum</i> (98%)
	<i>T. koningiopsis</i>	242472	福岡県三潴郡大木町	エノキタケ栽培施設 空中落下菌	2007年3月	AB374281	<i>T. koningiopsis</i>	
<i>T. cf. pleuroticola</i>	242458	福岡県三潴郡大木町	エノキタケ栽培施設 空中落下菌	2002年7月	AB298696	<i>T. pleuroticola</i>		
	242459	長野県飯山市	ブナシメジ栽培施設	2002年10月	AB374269			
	242460	福岡県福岡市	エノキタケ栽培施設 栽培ビン	2005年	AB298697			
	242461	熊本県阿蘇郡南小国町	マイタケ栽培菌床	2006年2月	AB374270			
	242462	長崎県西彼杵郡西彼町	きのこ栽培施設内	2006年9月	AB374271			
<i>T. cf. pleurotum</i>	242463	福岡県三潴郡大木町	エノキタケ栽培施設 空中落下菌	2007年3月	AB374272			
	242480	沖縄県島尻郡八重瀬町	キクラゲ栽培菌床用 木片	2009年6月	AB563720	<i>T. pleurotum</i>		
	242485	沖縄県島尻郡八重瀬町	エリンギ栽培菌床	1996年3月	AB570240			
<i>T. polysporum</i>	242455	長崎県島原市	シイタケ栽培原木, 白カビ被害	1996年3月	AB298695	<i>T. polysporum</i>		
<i>T. reesei</i>	242486	沖縄県島尻郡八重瀬町	エリンギ栽培菌床	1996年3月	AB570241	<i>T. reesei</i>		
<i>T. cf. stramineum</i>	242456	福岡県山門郡山門町	シイタケ菌床	1992年3月	AB298692		<i>T. stramineum</i> (98%)	
<i>Trichoderma</i> sp. 1	242464	北海道上川郡愛別町	シイタケ栽培施設 内空中落下菌	2006年8月	AB374273		<i>T. harzianum</i> (98%)	
	242465	北海道上川郡愛別町	シイタケ栽培施設 内空中落下菌	2006年8月	AB374274			
	242466	北海道上川郡愛別町	シイタケ栽培菌床	2006年8月	AB374275			
	242467	岩手県	シイタケ栽培菌床	2006年8月	AB374276			
<i>Trichoderma</i> sp. 2	242468	大分県豊後大野市	シイタケ栽培菌床	2007年1月	AB374277			
<i>Trichoderma</i> sp. 3	242457	大分県由布市庄内町	シイタケ栽培菌床	1995年3月	AB298694		<i>T. stramineum</i> (98%)	
<i>Trichoderma</i> sp. 4	242476	岩手県岩手郡滝沢村	シイタケ栽培原木	2009年10月	AB563716		<i>T. koningiopsis</i> (99%)	

表 2. 供試菌株リスト<sup>a)</sup> と TrichoKEY, TrichoBLAST 検索結果 (その 2)

種名	MAFF 番号	採集地	基質	採集年月	塩基配列 寄託番号	TrichoKEY 検索結果	相同性 検索結果
<i>Trichoderma</i> sp. 5	242477	沖縄県島尻郡八重瀬町	キクラゲ栽培菌床用 木片	2009年6月	AB563717		<i>T. thailandicum</i> (98%)
	242478	沖縄県島尻郡八重瀬町	キクラゲ栽培菌床用 木片	2009年6月	AB563718		
	242481	沖縄県島尻郡八重瀬町	キクラゲ栽培菌床用 木片	2009年6月	AB563721		
	242482	沖縄県島尻郡八重瀬町	キクラゲ栽培菌床用 木片	2009年6月	AB563722		
	242483	沖縄県島尻郡八重瀬町	キクラゲ栽培菌床用 木片	2009年6月	AB563724		
<i>Trichoderma</i> sp. 6	242489	佐賀県武雄市	シイタケ栽培菌床	2009年5月	AB570244		<i>T. virens</i> (96%)
<i>Trichoderma</i> sp. 7	242492	佐賀県武雄市	シイタケ栽培菌床	2009年5月	AB570247		<i>T. harzianum</i> (98%)

a) 今回の探索・収集によって得られた菌株と、筆者らが過去に収集した菌株を供試した。

7日培養したのち、肉眼および顕微鏡下で形態観察を行った。

改変 MA 培地で培養した培養菌体を DNA の抽出に用いた。DNA の増幅と塩基配列のシーケンシングには ITS4 および ITS5 プライマー (ITS 領域, White et al., 1990), EF1-983F と EF1-2218R プライマー (EF-1 $\alpha$  領域), f RPB2-5F と fRPB2-7cR プライマー (RPB2 領域, Chaverri and Samuels, 2003) を使用した。得られた ITS 領域塩基配列データは TrichoKEY (Druzhinina et al, 2005, 2006) (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>) もしくは TrichoBLAST (<http://www.isth.info/tools/blast/index.php>) を用いて同定および相同性検索を行った。

TrichoKEY で *T. pleuroticola* となった MAFF 242458~MAFF 242463, 該当種がなかった *Trichoderma* sp. 1 MAFF 242464~MAFF 242467, *Trichoderma* sp. 2 MAFF 242468 については EF 領域と RPB2 領域の塩基配列を用いた系統解析を行った。系統解析は PAUP4.0beta10 を用い, International subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* taxonomy (ISTH ; <http://isth.info/index.php> ) , DNA DATA BANK OF Japan ( DDBJ ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) のデータベースから入手した配列も加えた上で, 近隣結合法で解析した。

### 3) 代謝産物の生産のための培養と生理活性

培養には 150 ml 容のポリプロピレン製フラスコに入れた雑穀培地と押し麦培地の 2 種類の固体培地に植菌し, 25°C, 12 日間静置培養した。培養終了後, ブタノール抽出物を濃縮乾固して, スクリーニング・サンプルのマスター・プレートとした。

### 4) 抗菌抗真菌・抗腫瘍アッセイ

抗菌抗真菌アッセイの検定菌としてグラム陰性菌 *Escherichia coli* NIH JC2, グラム陽性菌

*Micrococcus luteus* ATCC 9343, 酵母 *Candida albicans* NBRC 1594, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8635 と *Saccharomyces cerevisiae* SC3 を用いた. さらに, マウス固形癌細胞 S-180, ヒト乳癌細胞 MCF7 等の細胞を用い MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) アッセイを行った. 活性評価値 0~1 を強い活性あり (++) , 2~3 を活性あり (+) , 4~5 を弱い活性あり (w) , 6 以上は活性なし (-) と判定した.

### 5) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による低分子代謝産物の分析

培養物のブタノール抽出濃縮サンプルを HPLC システム (Hewlett Paccard HP-1090) および逆相シリカゲル・カラム (C18, 3 mmφ MICROSORB 4.6×75 mm, Rainin Instrument Co., Ltd) にて CH<sub>3</sub>CN - 0.15% Phosphate buffer (pH 3.5)を用いたグラジエント条件で分析した. 溶出時間(Retention time; RT)と Photodiode array 検出器による UV 吸収スペクトルから, 研究室所有のデータベースおよび Dictionary of Natural Products のデータベースを検索して, 基本骨格もしくは化合物を推定した.

### 6) LC/MS(SIM)分析, Selective ion の設定

培養物の n-ブタノール抽出物を LC/MS (Scan mode) で測定した. Neuhof ら (2007) により報告されている *Trichoderma* 属菌のペプタイボル代謝産物由来の 164 個のイオンについて, *T. pleuroticola* CBS 124383 培養抽出物の Scan mode 測定データを用いて検出されるイオンを調べ, 比較のための指標として 16 個のイオンを選定した. その後, 比較に用いる *Trichoderma* 属菌培養物の n-ブタノール抽出物について SIM 分析を行い, ペプタイボル代謝産物の生成を調べた. 相似度は Sneath (1957)の連合係数を用いて表した.

Korean Collection of Type Cultures (KCTC, 韓国・ソウル)および Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, オランダ・ユトレヒト)から分譲を受けた *Trichoderma pleuroticola* KCTC 26315, CBS 12383, *T. pleurotum* CBS 121700, CBS 124387, *T. aggressivum* f. *europaeum* CBS 433.95, CBS 100526 を LC/MS 比較のために用いた.

## 3. 結果と考察

### 1) 形態と分子系統解析

形態的性質と分子系統解析の結果を表 2 と 3 に示したが, 特筆すべき菌株のみ以下に記載する.

#### (1) *Trichoderma koningiopsis* Samuels, C. Suarez & H.C. Evans MAFF 242472

福岡県三潁郡大木町のエノキタケ栽培施設内の空中落下菌である. 形態的性質は *T. koningii* もしくは *T. koningiopsis* と矛盾しない. TrichOKEY で検索した結果, *T. koningiopsis* と同定され, 形態的特徴も支持したので, *Trichoderma koningiopsis* Samuels, C. Suárez & H. C. Evans と同定した. 日本新産種である.

表 3. 分離株の形態的諸性状

種名	MAFF番号	コロニー	分生子構造	分生子の形態	分生子の大きさ(平均)	その他
<i>Gliocladium viride</i>	242453	緑色	密な <i>Gliocladium</i> 型	広楕円形	3.0 x 2.0 μm, L/W 1.39	
<i>Trichoderma atroviride</i>	242473(ほか)	青みがかった緑色	分生子柄はよく分岐し、フィアライドが輪生するが、不規則	球形から亜球形, 平滑	3.0~3.5×3.0~3.2 μm	
<i>T. citrinoviride</i>	242487(ほか)	緑色	分枝はほとんど輪生せず、不規則に分岐	円筒形, 平滑	3.0~3.5×2.0 μm, L/W 1.474	寒天中に黄色色素産生
<i>T. harzianum</i>	242469(ほか)	黄みがかった緑色	規則正しくほぼ直角に輪生分岐を繰り返す、樹木状	球形から楕円形, 倒卵形	2.4~3.0×2.0~2.7 μm, L/W 1.00~1.14	
<i>T. cf. harzianum</i>	242454	鮮黄緑色~青緑	よく分枝, 樹木状となり、フィアライドが輪生密生	楕円形から円筒形	4.0×2.0 μm, L/W平均 1.69	<i>T. harzianum</i> よりも分生子が記載より細長い
<i>T. koningiopsis</i>	242472	灰緑色	規則的な樹木状, 分岐の間隔は広く, 数個のフィアライドが輪生, 単生	円筒形	3.5-4.5×2.0-3.0 μm	
<i>T. cf. pleuroticola</i>	242458	褐色	規則的な樹木状	倒卵形~円筒形, 楕円形	3.0 x 2.5 μm L/W 1.20	
	242459			3.0 x 2.0 μm L/W 1.34		
	242460			2.5 x 2.0 μm L/W 1.44		
	242461			倒卵形	2.5 x 2.0 μm L/W 1.32	
	242462	緑色		2.5 x 2.0 μm L/W 1.14		
	242463			亜球形~倒卵形	2.5 x 2.0 μm L/W 1.26	
<i>T. cf. pleurotum</i>	242480	淡緑色	<i>T. virens</i> 様 <i>Gliocladium</i> 型, フィアライドが内側に湾曲して多数輪生	球形から亜球形, 平滑	2.5×2.5 μm, L/W 1.101	分生子がほぼ球形小型で <i>T. pleurotum</i> と異なる
	242485		<i>Verticillium</i> 型	大型で楕円形	5.0×3.0 μm, L/W1.723	分生子, フィアライドとも大型で, <i>Verticillium</i> 型
<i>T. polysporum</i>	242455	白色	鞭状の不稔分生子柄主軸	小型, 円筒形で無色		
<i>T. reesei</i>	242486	淡緑色から灰緑色	フィアライドが主軸に直角に単生, <i>Longibrachiatum</i> 型	楕円形から長倒卵形, 平滑	3.5×2.5 μm, L/W 1.406	
<i>T. cf. stramineum</i>	242456	淡緑色から鮮黄緑色	様々	楕円形から倒卵形	3.0-5.5×1.5-3.0 μm	
<i>Trichoderma</i> sp. 1	242464(ほか)	緑色	細長いフィアライドが密着する <i>G. viride</i> 型と <i>Verticillium</i> 型	円筒形ないし楕円形	3.5-5.5×2.5-3.0 μm	
<i>Trichoderma</i> sp. 2	242468	鮮緑色	<i>Pachybasium</i> 型もしくは <i>Harzianum</i> 型	楕円形	長さ3-5 μm	
<i>Trichoderma</i> sp. 3	242457	淡緑色から濃緑色	<i>Verticillium</i> 型~ <i>Gliocladium</i> 型	楕円形から長楕円形	3.5-6.5×2.0-3.0 μm	
<i>Trichoderma</i> sp. 4	242476		複数の枝が直角より少し鋭角に輪生し <i>Verticillium</i> 様	球形から亜球形, 平滑	3.8×3.4 μm	
<i>Trichoderma</i> sp. 5	242477(ほか)	緑色	密な <i>Koningii</i> 型で樹木状を呈し, フィアライドは主軸に直角に輪生	球形から亜球形, 倒卵形	2.0-3.0×2.0-2.5 μm	<i>Trichoderma harzianum</i> に類似
<i>Trichoderma</i> sp. 6	242489	鮮黄緑色	<i>Verticillium</i> 型	楕円形から円筒形, 平滑	3.0×2.5 μm	
<i>Trichoderma</i> sp. 7	242492		<i>Verticillium</i> 型, 大型のフィアライドが主軸に少し鋭角に輪生	亜球形から楕円形	3.5×2.5 μm	

(2) *Trichoderma cf. pleuroticola* MAFF 242458～MAFF 242463

いずれも福岡，熊本，長崎，長野のエノキタケやマイタケ栽培農家から分離された株である（宮崎ら，2004 および 2010）。MAFF 242458～MAFF 242461 の4株のコロニーはビロード状から羊毛状で茶褐色，分生子は  $2.5\text{-}3.0\times 2.0\text{-}2.5\ \mu\text{m}$ ，MAFF 242462，MAFF 242463 の2株のコロニーはビロード状から羊毛状で緑色，分生子は6株の平均で  $2.5\text{-}3.0\times 2.0\text{-}2.5\ \mu\text{m}$  であった。Park ら（2006）の記載によると，コロニーは緑がかった灰色から灰緑色から濃緑色になり，分生子は  $2.9\text{-}4.5\times 2.4\text{-}3.5\ \mu\text{m}$ ，平均  $3.3\times 2.7\ \mu\text{m}$ ，Komon-Zelazowska ら（2007）の記載では，コロニーは緑がかった灰色，灰緑色から暗緑色で分生子は  $2.6\text{-}5.0\times 2.4\text{-}3.7\ \mu\text{m}$ ，平均  $3.7\times 2.8\ \mu\text{m}$  とされている。MAFF 242458～MAFF 242461 のコロニーの色調は，茶褐色を呈し，記載とは明らかに異なる。また，すべての分離株において，分生子の大きさが記載と比べて小さい。しかしながら，Samuels（2010）の記載によると，*T. pleuroticola* の分生子は

$2.5\text{-}3.2(3.5)\times(2.0)2.2\text{-}3.0(3.2)\ \mu\text{m}$  で，分離株6株と一致するが，コロニーの色調はやはり濃緑色で，褐色の MAFF 242458 ～ MAFF 242461 とは異なる。しかし肉眼での色調は必ずしも重要な性質ではなく（Samuels, 2008），たとえば褐色の分生子帯が特徴の *T. flavofuscum* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Bissett は緑色の *T. virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx の異名とされている（Chaverri and Samuels, 2003）。

一方，ITS 塩基配列を TrichoKEY で検索した結果，6株すべてが *T. pleuroticola* S. H. Yu & M. S. Park と一致した。さらに EF-1 $\alpha$  領域と RPB2 領域のシーケンス配列を TrichoBLAST で検索した

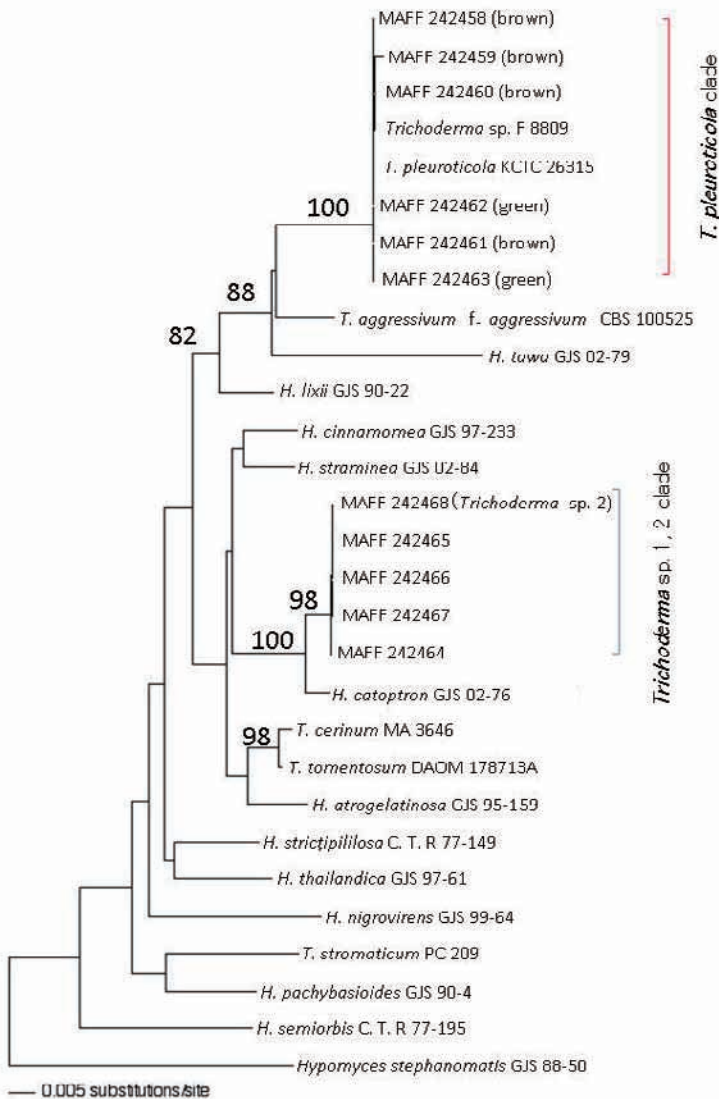


図2. EF-1 $\alpha$  領域を用いた *T. pleuroticola* の近隣結合系統樹

ところ、すべての株で *T. tawa*, *T. aggressivum*, *T. harzianum* と EF-1 $\alpha$  領域で 97-95%, RPB2 領域で 96-94%の相同性を示した. EF-1 $\alpha$  領域と RPB2 領域とも近隣結合系統樹は同じ樹形を示し, MAFF 242458~MAFF 242463 の全 6 株が, 標準株である *T. pleurotica* KCTC 26315 とブートストラップ値 100 でクレードを形成し, コロニーの色によらず, 単系統群であることが確認された(図 2).

そこで, 正確な分類上の所属については今後精査することとし, これらすべてを *Trichoderma* cf. *pleurotica* として取り扱いたい. 日本新産種であると判断した.

### (3) *Trichoderma* cf. *pleurotum* MAFF 242480, MAFF 242485

いずれも沖縄県島尻郡八重瀬町のキクラゲ栽培菌床とエリンギ栽培菌床から分離された株である. ITS 領域を用いた TrichOKEY による検索では両株とも *T. pleurotum* S. H. Yu & M. S. Park となるため, 仮に *T. cf. pleurotum* として扱いたい. なお MAFF 242480 では *Gliocladium* 型の分生子構造が認められるが, 分生子がほぼ球形で小さい点で *T. pleurotum* と異なり, MAFF 242485 では分生子の形は一致するが Komon-Zelazowska ら (2007) の記載と比較すると大型であり, 分生子構造も *Verticillium* 型でフィアライドも大型である点が異なる.

### (4) *Trichoderma* cf. *stramineum* MAFF 242456

福岡県のシイタケ菌床から分離された株である. TrichOKEY で検索した結果, 該当する種が認められなかった. TrichoBLAST では, *T. stramineum* P. Chaverri & Samuels と 98%の相同性を示した. 形態的には *T. stramineum* に特徴的な不稔の分生子柄が存在せず, 分生子はより長い点で異なる. そこで現時点では *Trichoderma* cf. *stramineum* としておきたい. *T. stramineum* であれば日本新産種となる.

### (5) *Trichoderma* sp. 1 MAFF 242464~MAFF 242467

これら 4 株は, 北海道や岩手のシイタケ栽培菌床あるいは施設内の空中落下菌として分離された. 分生子構造は細長いフィアライドが密着する *Gliocladium viride*-type と *Verticillium*-type で分生子は円筒形ないし楕円形で, かなり大型. TrichOKEY を検索した結果, 該当種がなかったが, TrichoBLAST を検索した結果, すべての株において ITS 領域では *T. harzianum* と 98%, EF-1 $\alpha$  領域と RPB2 領域では *T. catoptron* と 98%の相同性を示した. 以上の結果からまだ精査の必要があり, 当面 *Trichoderma* sp.1 としてまとめておくが, いくつかの種が含まれる可能性もある. EF-1 $\alpha$  領域と RPB2 領域の系統解析では, *Trichoderma* sp. 1 MAFF 242464-MAFF 242467 と *Trichoderma* sp. 2 MAFF 242468 の 5 株はそれぞれブートストラップ値 98, 100 でクレードを形成し, 単系統群であり, かつ, *T. catoptron* と最も近縁 (ブートストラップ値ともに 100) であることが示唆された. これらの株は新種であると思われるが, *Trichoderma* sp. 1 と 2 は大型の分生子を形成する点では一致するが, 分生子構造が



異なることから、その正確な所属については今後、精査する必要がある。

#### (6) *Trichoderma* sp. 2 MAFF 242468

大分県豊後大野市のシイタケ栽培菌床から分離された株であり、コロニーは鮮緑色の分生子形成帯を生じ、顕微鏡下では *Pachybasium* タイプもしくは *Harzianum* タイプの分生子構造をもち、フィアライドは特徴的に太く短く、分生子は楕円形であるが、*Trichoderma* sp. MAFF 242464 などと同様大きい。TrichoBLAST を検索した結果、ITS 領域では *T. harzianum* と 98%、EF-1 $\alpha$  領域、RPB2 領域では *T. catoptron* と 98%の相同性が確認された。本菌と TrichOKEY で一致する菌株はなく、当面 *Trichoderma* sp.2 としておく。

#### (7) *Trichoderma* spp. MAFF 242457, MAFF 242476, MAFF 242477, MAFF 242478, MAFF 242481, MAFF 242482, MAFF 242483, MAFF 242489, MAFF 242492

これらの分離株はいずれも *Trichoderma* 属に属することは間違いないが、ITS 領域の塩基配列を TrichOKEY で検索したところ、すべての株で該当種が認められなかった。これら 9 株は新種の可能性もある。

MAFF 242457 は *T. koningiopsis* と 99%の相同性を示したが、分生子の形態が異なるため当面 *Trichoderma* sp. 4 としておく。

MAFF 242477, MAFF 242478, MAFF 242481, MAFF 242482, MAFF 242483 はいずれも沖縄県島尻郡八重瀬町のキクラゲ栽培菌床から分離された株で、*T. harzianum* に類似する。TrichoBLAST では *T. thailandicum* と 98%の相同性を示したが、分生子がより小さい (*T. thailandicum* の分生子は 3.2-3.5 $\times$ 3.0-3.2  $\mu$ m)。そこで、当面は *Trichoderma* sp. 5 としておく。

MAFF 242489 は佐賀県武雄市のシイタケ栽培菌床から分離された。コロニーは鮮やかな黄緑色を呈し、分生子構造は *Verticillium* 型、細長いフィアライドを形成する。分生子は楕円形から円筒形、滑面である。TrichoBLAST では *T. virens* と 96%の相同性を示したが、分生子がより小さいことから、当面 *Trichoderma* sp. 6 と称す。

MAFF 242492 も佐賀県武雄市のシイタケ栽培菌床から分離された。分生子構造は *Verticillium* 型、大型のフィアライドが主軸に直角より少し鋭角に輪生し、分生子は垂球形から楕円形である。TrichoBLAST では *T. harzianum* と 98%の相同性を示したが、分生子の形態が異なるため、当面 *Trichoderma* sp. 7 としておく。

## 2) 培養抽出物の生理活性

*Trichoderma* 属菌の培養抽出物の抗菌・抗真菌、および抗腫瘍活性評価を表 4 に示した。供試したサンプルに *E. coli* に対する抗菌活性を示すものはなかったが、多くの菌株で *C. albicans*, *K. marxianus* など酵母に対する抗真菌活性を示した。また、グラム陽性細菌である *M. luteus* やヒト乳癌細胞(MCF-7)、マウス固形癌細胞(S-180)に MTT 活性を指標とした腫瘍細胞増殖抑

表 4. 培養抽出物の抗菌・抗真菌・抗腫瘍活性

種名	菌株番号	CA	KM	SC	EC	ML	MCF7	S180
<i>Gliocladium viride</i>	MAFF 242453	+++	+++	+	-	+	++	++
<i>Trichoderma atroviride</i>	MAFF 242494	-	w	-	-	-	+	+
<i>T. harzianum</i>	MAFF 242469	+++	+++	++	-	w	++	++
	MAFF 242470	+++	+++	+	-	w	++	++
	MAFF 242471	+++	+++	+	-	-	++	++
<i>T. cf. harzianum</i>	MAFF 242454	+++	+++	-	-	-	w	+
<i>T. koningiopsis</i>	MAFF 242472	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	CBS 433.95	-	-	ND	-	+	ND	ND
	CBS 100526	-	-	ND	-	++	ND	ND
<i>T. pleurotum</i>	CBS 121700	+++	+++	ND	-	+	ND	ND
	CBS 124387	+++	+	ND	-	w	ND	ND
<i>T. pleuroticola</i>	KCTC 26315	+++	+++	ND	-	+	ND	ND
	CBS 124383	+++	+++	ND	-	++	ND	ND
<i>T. cf. pleuroticola</i>	MAFF 242458	+++	+++	+	-	-	++	++
	MAFF 242459	+++	+++	+++	-	+	++	++
	MAFF 242460	+	+++	w	-	+	++	++
	MAFF 242461	+++	+++	+++	-	w	++	++
	MAFF 242462	+++	+++	+++	-	++	++	++
	MAFF 242463	+++	+++	+++	-	w	++	++
<i>T. polysporum</i>	MAFF 242455	+++	w	-	-	-	-	-
<i>T. cf. stramineum</i>	MAFF 242456	+	-	-	-	-	w	+
<i>Trichoderma</i> sp. 1	MAFF 242464	+++	+++	+++	-	+	-	-
	MAFF 242465	-	-	-	-	-	-	-
	MAFF 242466	-	-	-	-	-	-	w
	MAFF 242467	-	-	-	-	+	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 2	MAFF 242468	+	w	-	-	w	w	w
<i>Trichoderma</i> sp. 3	MAFF 242457	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. citrinoviride</i>	IMI 288111	+++	+++	ND	-	++	ND	ND
<i>T. longibrachiatum</i>	NBRC 4847	+++	+++	ND	-	++	ND	ND
<i>T. pseudokoningii</i>	CBS 818.68	+++	+++	ND	-	++	ND	ND
<i>T. reesei</i>	IMI 345107	+++	+++	ND	-	++	ND	ND

CA, *Candida albicans* NBRC 1594; KM, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8635; SC, *Saccharomyces cerevisiae* SC3; EC, *Escherichia coli* NIH JC2; ML, *Micrococcus luteus* ATCC 9343; MCF7, human breast cancer cell line MCF7; S180, mouse sarcoma murine cell line S180; ++, 強い活性 (評価値 0~1); +, 活性あり (2~3); w, 弱い活性 (4~5); -, 活性なし (6以上); ND, データなし.

制活性が認められたものも多かった。供試したサンプルが多くないので一概には言えないが、*T. harzianum* と *T. cf. harzianum* は 4 株とも抗真菌活性と抗腫瘍活性を示した。同様に *T. cf. pleurotica* とした 6 株はいずれも抗真菌活性，抗 *M. luteus* 活性（MAFF 242458 を除く），抗腫瘍活性を示し，代謝産物生産の均一性を示唆した。*Trichoderma atroviride* MAFF 242494 は弱い抗真菌活性と抗腫瘍活性を示したが，イソニトリル抗生物質を生産している可能性がある（Fujiwara et al., 1982 ; Fujimori and Okuda, 1994）。

### 3) 低分子代謝産物の分析

HPLC HP-1090 を用いて代謝産物のプロファイリングを行った結果を表 5 に示す。*Trichoderma atroviride* MAFF 242494 は Retention time (RT) 11.1 min に pyrone 骨格に特徴的な UV 吸収を示す物質を溶出した。Pyrone 骨格と思われるピークは *T. cf. pleurotica* MAFF 242463 でも確認されたが，7.3 min と RT が早い。*Trichoderma* に特徴的な pyrone 骨格の代謝産物の代表例は 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone である。本物質は，天然物が発見される以前から，合成化合物が香料として利用されている。*Trichoderma* 属菌からの報告は，Collins and Halim (1972) が最初であり，生産菌は *T. viride* とされた。その後 *T. harzianum*, *T. koningii*, *Trichoderma* spp. からもココナツ臭の揮発性物質として類縁体が単離された (Dickinson, 1993)。Rifai (1969) も *T. viride* のココナツ臭に言及しているが，Okuda ら (1982) はココナツ臭生産菌として *T. hamatum* Type 1, *T. koningii* Type 1, *T. harzianum* Type 1 (すなわち *T. atroviride*)，*T. viride* をあげている。

Benzenoid 物質は polyketide 由来の naphthalene や xanthone を含む多様な化合物群だが，今回は *Trichoderma* sp. 1 MAFF 242467 で RT 22.7 min と 23.0 min に検出された。同じく polyketide 由来の物質としては種々の糸状菌が生産する色素の anthraquinone がある。

表 5. 高速液体クロマトグラフィーによる低分子代謝産物生産プロファイル

種名	菌株番号	Benzenoid	Enone	Pigment	Pyrone	Triene
<i>Trichoderma atroviride</i>	MAFF 242494	—	—	—	+	+
<i>T. harzianum</i>	MAFF 242470	—	+	+	—	+
<i>T. cf. pleurotica</i>	MAFF 242458	—	—	—	—	+
	MAFF 242459	—	+	—	—	+
	MAFF 242460	—	—	+	—	+
	MAFF 242461	—	—	+	—	+
	MAFF 242462	—	+	+	—	+
	MAFF 242463	—	+	—	+	—
<i>Trichoderma</i> sp. 1	MAFF 242464	—	—	—	—	+
	MAFF 242465	—	—	—	—	+
	MAFF 242466	—	—	—	—	+
	MAFF 242467	+	—	—	—	—
<i>Trichoderma</i> sp. 2	MAFF 242468	—	+	—	—	+

+: 検出された, —: 検出されない。

*Trichoderma* の場合は他の菌類と対峙したときに生産することもある。 *T. cf. pleurotica* の 3 株で検出された RT 22.7 min のピークは、 *T. pleurotica* が *Pleurotus ostreatus* と対峙すると褐色色素を生産するという報告があるので、その色素に相当する可能性がある。その他、enone 骨格や triene 骨格は様々な代謝産物に認められ、特徴的とは言えないまでも、今回の分析によって多くの菌株から検出された。

Dermadine, trichoviridin, isonitrins を含むイソニトリル抗生物質は限られた種の *Trichoderma* 属菌で生産されることが知られている(Fujimori and Okuda, 1994; Fujiwara et al., 1978, 1982; Okuda et al., 1982)。しかし今回は生理活性の部分で言及したこと以外、証拠となるデータは得られなかった。

#### 4) ペプチン化合物の生産プロファイル解析

ペプチンは N-末端、C-末端がそれぞれアセチル基、アミノアルコールにより保護され、 $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib), Isovaline (Iva) を多く含む分子量が 1,000~10,000 のペプチド化合物で、多数の *Trichoderma* 属菌から報告があるが、同族体が極めて多いことから完全に単離精製することは至難とされている(Sivasithamparam and Ghisalberti, 1998)。最近、分子系統とペプチンのサブクラスの生産性に関連性があるという報告がなされている(Degenkolb et al., 2006, 2008)。

本研究では日本新産種の *T. pleurotica* と思われる菌株が多数分離されているので、本種を中心に分子量 2,000 以下のペプチン化合物の生産プロファイルを検討した(金廣ら, 2010)。*Trichoderma pleurotica* は従来の分類基準からは *T. harzianum* とされていた菌群である。本種が独立した種であるとする論文では、ヒラタケに被害をもたらす種として *T. aggressivum* f. *europaeum* や *T. pleurotum* との比較がなされている(Park et al., 2006; Komon-Zelazowska et al., 2007)。そこでこれらの標準菌株も含めてペプチン化合物の生産プロファイルを調べた。表 6 に示すとおり(雑穀培地のデータのみを示した)、*T. pleurotica* 標準株 CBS 124383 の生産プロファイルを基準、すなわち Neuhof (2007) の報告にある MALDI-TOF MS による *Trichoderma* 属菌に特徴的なペプチンのフラグメント・イオンのうち、CBS 124383 で検出された 16 のイオンと同一 m/z を示すイオンの存否を他の菌株で分析し、CBS 124383 を基準として Sneath (1957) の連合係数を算出した。その結果、わが国で分離された *T. cf. pleurotica* とした菌株は、雑穀培地の場合、MAFF 242463 を除き 0.625~1.00 という高い相似度を示した。わが国の菌株 6 株のうち、福岡の MAFF 242458, 長野の MAFF 242459, 福岡の MAFF 242460, 熊本の MAFF 242461 はいずれも褐色の分生子形成帯を形成し、見た目では *T. pleurotica* とは全く異なる菌叢であるが、長崎の MAFF 242462 と福岡の MAFF 242463 は緑色である。これらの色の異なる菌株間では、MAFF 242463 との連合係数が低いこと以外に区別はできなかった。

さらに、*T. pleurotum* CBS 121700 とは雑穀培地では 0.750, 押し麦培地では 0.571, *T. aggressivum* f. *europaeum* の標準菌株とは雑穀培地では 0.750~0.813, 押し麦培地では 0.714

表 6. LC/MS によるペプチン生産パターン (雑穀培地)

種名	菌株	m/z		1122	1184	1190	1198	1199	1212	1213	1214	1226	1227	1229		1245		1466	$S_{(Sneath)}$
		16	16.3	14.7	15.8	15.2	15.3	15.7	15.8	15.2	16.1	16.1	14.9	15.4	14.1	14.5	9.2		
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	CBS 100526			+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		0.75~0.813
	CBS 433.95			+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		0.75
<i>T. atroviride</i>	KRCF 222	+	+																0.125
	MAFF 242494	d	d															d	0~0.188
<i>T. harzianum</i>	MAFF 242470			d	d	+	+	d	d	+	+	+	d	+	d	+			0.5~0.688
	MAFF 242471					+	d	+	+	+	+	+		+		+			0.5~0.563
	MAFF 242484	+	+																0.125
<i>T. cf harzianum</i>	MAFF 242454													+	+	+			0.188
<i>T. koningiopsis</i>	MAFF 242472	d																	0~0.063
<i>T. pleuroticola</i>	CBS 124383	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1.00
	KCTC 26315	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1.00
<i>T. cf pleuroticola</i>	MAFF 242458	d	d	+	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	+	+	+	d	0.625~1.00
	MAFF 242459	+	d	+	d	+	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.813~0.938
	MAFF 242460	+	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	0.75~0.938
	MAFF 242461	+	d	+		d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.75~0.813
	MAFF 242462	d	+	+	d	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+		0.688~0.938
	MAFF 242463	d	d	+		+	+	+	+	+	+	d	d					d	0.375~0.688
<i>T. pleurotum</i>	CBS 121700		d	+	d	+	+	d	+	+	d			+	+	+	+	+	0.75
	CBS 124387																		0
<i>T. polysporum</i>	MAFF 242455																		0
<i>T. cf stramineum</i>	MAFF 242456													d	d	d			0~0.188
	MAFF 242464													d	d	d			0~0.188
<i>Trichoderma</i> sp. 1	MAFF 242465													d	d				0~0.125
	MAFF 242466													d					0~0.063
	MAFF 242467																		0
<i>Trichoderma</i> sp. 2	MAFF 242468													d	d	d	d		0~0.125

+: 検出された, d: 検出されることもある, 空欄: 検出されない。

~0.786 と高い相似度を示した。また, *T. harzianum* ではいくつかの菌株 (雑穀培地での MAFF 242470, MAFF 242471, 押し麦培地での MAFF 242469, MAFF 242490) が 0.500~0.714 と相似度が高かった。しかし, その他の種ではいずれの培地でも連合係数が 0.5 を超えるものはなかった。ペプチン生産プロファイルは, 培地による差などまだ不安定要素が残るが, *T. pleuroticola* 類縁菌株の間では総じて類似性が高いと結論できる。

*Trichoderma pleuroticola* と *T. aggressivum* は, 分子系統の上からも類縁性は高い。一方, *T. pleurotum* の分生子構造は *Gliocladium* 型で形態的には前者のグループと異なるが, 分子系統的には近縁であるとされる。*Trichoderma pleuroticola*, *T. aggressivum*, *T. pleurotum* はいずれもヨーロッパ, 韓国などで栽培きのこの害菌として報告されており, わが国のきのこ栽培農家から *T. cf. pleuroticola* が相次いで分離されたことは意義深く (宮崎ら, 2004, 2010; 土屋ら, 2008), さらに分類学的検討などを行う必要がある。

#### 4. 結論

沖縄本島, 石垣島, 西表島, 熊本, 長野, 岩手などの栽培きのこ農家から試料を集めて, *Trichoderma* 関連株合計 42 株について形態観察, 分子系統解析を行うとともに, HPLC 分析, LC/MS による代謝産物プロファイリングを行った。当初予測されたとおり, これまでの筆者

らの土壌分離菌での経験をもとにすると、栽培きのこ現場からは、わが国で未報告の *Trichoderma* 属菌がかなりあることが分かった。その中には、最近海外からもたらされた可能性のあるものもある。

*Trichoderma harzianum* は、土壌からも頻度高く分離される汎世界種だが、今回の栽培きのこ農家からも高頻度で分離された。一方、*T. hamatum* を代表とする分生子柄主軸が不稔の緑色 *Trichoderma* や *T. viride* を代表とする分生子が粗面の *Trichoderma* はまったく認められなかった。

*Trichoderma* cf. *pleuroticola* とした MAFF 242458, MAFF 242459, MAFF 242460, MAFF 242461, MAFF 242462, MAFF 242463 は、近年相次いで栽培きのこ農家から分離された菌株である。分子系統では ITS, EF-1 $\alpha$ , RPB2 いずれでも標準株と単系統群であることが確認されたが、前者 4 株はいずれも褐色の分生子形成帯を形成し、肉眼的には *T. pleuroticola* とは異なる。また、ペプチン産生プロファイル調べると、*T. pleuroticola* 標準株の生産プロファイルと相似度が高かった。さらに、*T. pleuroticola* 近縁種である *T. pleurotum*, *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. harzianum* のペプチン産生プロファイルも、*T. pleuroticola* と相似度が高いものが多かった。

*Trichoderma* sp. 5 とした MAFF 242477, MAFF 242478, MAFF 242481, MAFF 242482, MAFF 242483 の 5 株を採集した沖縄の栽培きのこ現場では、キクラゲを瓶で栽培しているが、培養している間に植菌部分から黒変してキクラゲの収量が落ちるといった情報を当地で得ることができた。この菌床材料は台湾から輸入し、国内で加工しているということであり、先の *T. cf. pleuroticola* 同様、移入の可能性はある。*Trichoderma* sp. 5 はタイで報告されている *T. thailandicum* との相同性も高いので、興味深い研究材料である。

以上の結果、まだ精査する必要があるものの、分子系統解析とペプチン産生プロファイルの詳細に検討すれば *Trichoderma* の新種、日本新産種が多く発見される可能性がある。

## 5. 謝辞

本研究を行うにあたり技術的にご尽力、ご協力いただいた玉川大学学術研究所菌学応用研究センターの土屋有紀（分離・分類・同定）、須藤ユリ（生理活性評価）、金廣達也（抗菌抗真菌活性評価・LC/MS 解析）諸氏および石崎孝之（採集・分離）、田副正明両博士（LC/MS 解析）、株式会社 VSN の前田 豊氏（LC/MS 解析）、富山県立大学生物工学研究センターの福田隆雄氏（LC 解析）、森林総合研究所九州支所の宮崎和弘博士（分離・分類・同定）、東京家政大学家政学部の藤森文啓博士（抗腫瘍活性評価）に感謝する。

## 6. 引用文献

- 1) Bissett, J. (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiaum* sect. nov. Can. J. Bot. 62: 924-931.

- 2) Bissett, J. (1991a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J. Bot.* 69: 2357-2372.
- 3) Bissett, J. (1991b). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69: 2372-2417.
- 4) Bissett, J. (1991c). A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* 69:2418-2420.
- 5) Bissett, J. (1992). *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Bot.* 70:639-641.
- 6) Chaverri, P. and Samuels, G.J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud in Mycol.* 48: 1-116.
- 7) Collins, R.P. and Halim, A.F. (1972). Characterisation of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* Pers. *J. Agric. Food Chem.* 20: 437-438.
- 8) Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Nirenberg, H.I., Gams, W. and Brückner, H. (2006). *Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). *J. Agric. Food Chem.* 54: 7047-7061.
- 9) Degenkolb, T., von Dchren, H., Nielsen, K.F., Samuels, G.J. and Brückner, H. (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem. Biodiv.* 5: 671-680.
- 10) Dickinson, J.M. (1993). Microbial pyran-2-ones and dihydropyran-2-ones. *Nat. Prod. Rep.* 10: 71-98.
- 11) Druzhinina, I.S., Komon-Zlazowska, M. and Kopchinskiy, A.G. (2006). TrichOKEY2. <http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>.
- 12) Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G. and Kubicek, C.P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fun. Gen. Biol.* 42: 813-828.
- 13) Fujimori, F. and Okuda, T. (1994). Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. *Fungi. J. Antibiot.* 47: 173-182.
- 14) Fujiwara, A., Okuda, T., Masuda, S., Shiomi, Y., Miyamoto, C., Sekine, Y., Tazoe, M. and Fujiwara, M. (1982). Fermentation, isolation and characterization of isonitrile antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1803-1809.
- 15) Fujiwara, M., Fujiwara, A. and Okuda, T. (1978). Antibiotic from *Trichoderma* culture. *Japan Kokai* 78 26,395.
- 16) Jaklitsch, W.M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Stud. in Mycol.* 63: 1-93.

- 17) 金廣達也・土屋有紀・宮崎和弘・田副正明・奥田徹 (2010). P23 *Trichoderma pleuroticola* の二次代謝産物プロファイリングと系統分類. 日本菌学会第 54 回大会(東京)講演要旨集 p.90.
- 18) Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S. (2007). Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms. *App. Environ. Microbiol.* 73: 7415-7426.
- 19) 宮崎和弘・永守直樹・川端良夫 (2004). エノキタケ栽培施設で発生したトリコデルマ被害について. 九州森林研究 57:284-285.
- 20) 宮崎和弘・土屋有紀・新田剛・奥田徹 (2010). きのか栽培施設に発生した病原菌類 *Cladobotryum varium* および *Trichoderma cf. pleuroticola* の RAPD 解析による菌株識別. 日本きのこ学会誌 (投稿中) .
- 21) Neuhof, T., Dieckmann, R., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. and von Döhren, H. (2007). Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? *Microbiology* 153: 3417-3437.
- 22) Okuda, T., Fujiwara, A. and Fujiwara, M. (1982). Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1811-1822.
- 23) Park, M.S., Bae, K.S. and Yu, S.H. (2006). Molecular and morphological analysis of *Trichoderma* isolates associated with green mold epidemic of oyster mushroom in Korea. *J. Huazhong Agric Univ* 23: 157-164.
- 24) Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116: 1-56.
- 25) Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96: 195-206.
- 26) Samuels, G.J. (2008). 私信.
- 27) Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F. and McCray, E.B. (2010). *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved May 8, 2010, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.
- 28) Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E.L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma & Gliocladium*, Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics (Kubicek, C.P. and Harman, G.E., eds). pp.139-191. Taloer & Ffancis Ltd., London.
- 29) Sneath, P.H.A. (1957). The application of computers to taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 17: 201-226.
- 30) 土屋有紀・宮崎和弘・奥田徹 (2008). P92 きのか栽培施設内で分離されたきのこ病原性



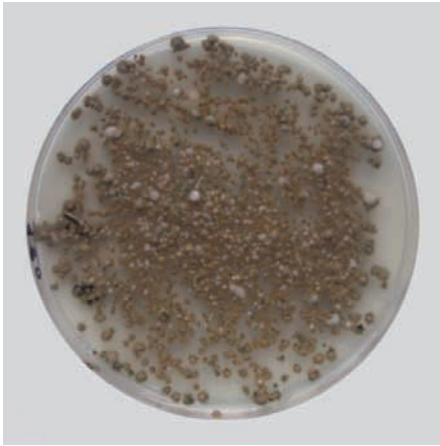
*Trichoderma* 属 2 種の帰属先は？ 日本菌学会第 52 回大会（三重）講演要旨集 p.88.

- 31) White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols: a guide to methods and applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., eds). pp.315-322. Academic Press, San Diego, CA.

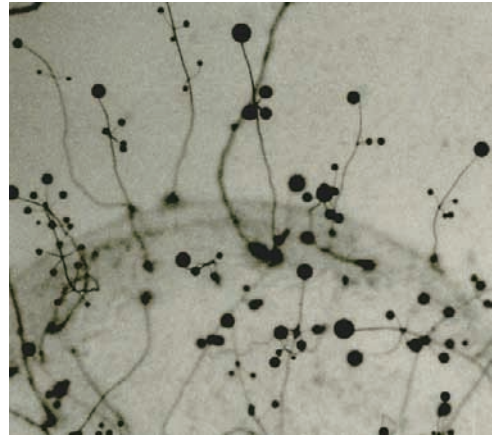
### Summary

*Trichoderma* strains were isolated from samples collected from mushroom cultivation farms in Okinawa, Ishigaki, Iriomote, Kumamoto, Nagano, and Iwate. Forty-two isolates in total were morphologically examined, followed by molecular phylogeny analysis. Several strains were compared with authentic strains of *Trichoderma* obtained from CBS and KCTC. The isolates were assayed for antimicrobial, antifungal and anti-cancer activities. The cultured extracts were analyzed by HPLC and LC/MS for their metabolite production profiling, as well. Seven known species, 6 probably undescribed species, and 4 species new to Japan were recognized so that unknown *Trichoderma* species are still awaited for discovery in Japan. The ITS, EF-1 $\alpha$ , and RPB2 sequencing revealed that 6 strains among them were monophyletic with *T. pleuroticola*. They also showed similar patterns of peptibol production profile to those of *T. pleuroticola* and its related species.

## 微生物遺伝資源の調査プロフィール



トマト葉かび病菌 (*Passalora fulva*) のコロニー (飯田)



細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の子実体 (川上)



*Corynespora cassiicola* の分生子 (下元)



キクラゲ栽培菌床用木片から分離された *Trichoderma* sp. 5 (奥田・五十嵐)



褐色 *Trichoderma* cf. *pleuroticola* MAFF 242460 のコロニー (奥田・五十嵐)