

氏名	有馬 忍
学位(専攻分野の名称)	博士(農学)
学位記番号	乙第920号
学位授与の日付	平成29年2月20日
学位論文題目	栽培きのこに発生する病害の病原特定、発生生態および防除に関する研究
論文審査委員	主査 教授・博士(農学) 根岸 寛光 教授・博士(農学) 篠原 弘亮 教授・博士(林学) 江口 文陽

### 論文内容の要旨

本研究はきのこ生産上の重要な生育阻害要因である微生物に注目し、細菌および糸状菌に起因する子実体の病害に関する研究を行ったものである。すなわち、生産地における発生実態を調査し、病原菌の特定および同定、感染経路の解明、防除法の開発を目的とした。

1994年から2014年にかけて、ほだ木上のシイタケ子実体が生育中に褐変または黒変し、異臭を放って腐敗する症状の発生情報が寄せられた。発生調査を行ったところ、本症状は大分県内11市2町の林内ほだ場、人工ほだ場およびビニールハウス、合計32か所で確認された。また、生産者の約60%は、本症状の発生を散発的に認めていることがアンケート調査から判明した。本症状は、一般的に使用されている市販9品種の幼子実体から成熟子実体に認められ、激害発生地は大きな経済的被害を受けていた。発生地の環境および気象条件を調査した結果、激害の発生は高湿度ほだ場において降雨の多い秋期と春期に多かったが、中～軽害の発生は乾燥傾向のほだ場においても発生することがわかった。本症状の発生したほだ木を、試験場に持ち帰って継続調査を行った結果、2013年11月に持ち帰ったほだ木は2014年10月から2015年4月にかけて、本症状を呈する子実体のみが認められた。また、別の調査地から2014年12月に持ち帰ったほだ木は、2015年2月から4月に本症状の発生を確認した。さらに、本症状の発生が植菌時期の違いによって異なった事例や試験場内の人工ほだ場において交配した1系統のみに本症状の発生が確認された。以上のことから、本症状の発生が見られたほだ木からは、翌シーズンも本症状が発生すること、シイタケ菌の生理的活性および感受性の違いが重要な発病因子であると考えられた。

本症状は、既知のシイタケ褐変腐敗病および黒腐細菌病に酷似することから、細菌の起因によるシイタケ子実

体の病害と判断し、発生地から持ち帰ったサンプルを用いて細菌の分離を行った。優先的に分離された細菌は、普通寒天培地で白色、円形の集落を形成した。分離菌(LE1001)の高濃度懸濁液をほだ木上のシイタケ幼子実体に塗布接種した結果、接種4日目に菌傘および菌柄の一部が褐変し、7日目には子実体全体が異臭を放って褐変した。以上のことから、分離菌をシイタケの褐変腐敗症状の原因菌と特定した。

しかし、ほだ木を用いた接種試験は実施時期が限定され、生育条件の同じ幼子実体を揃えることおよび接種後のほだ木管理が困難であった。そこで、分離菌のシイタケに対する病原性を効率的に検定する方法として、菌床シイタケを用いた方法の開発を行った。接種試験には除袋後4または5日目に1時間の散水を行った菌床を用い、ネジ込み式で針の交換が可能なガスタイトシリンジで、分離菌の細菌懸濁液(約 $10^9$  cfu/mL) 0.1 mLをシイタケ幼子実体に注入接種すると、接種5日目に成長停止または菌柄内部の褐変が高率に認められた。さらに、接種10日目には成長停止した幼子実体は異臭を放って腐敗することを確認した。また、きのこ病原細菌 *Pseudomonas tolaasii* (814) を菌床シイタケに接種したところ、同様な症状が発生することを確認した。したがって、菌床シイタケを用いた注入接種法は、分離菌のシイタケに対する病原性を確認するための簡易方法として効率的であると判断し、季節を問わず接種試験が可能になった。

褐変腐敗したシイタケからの分離菌20菌株の細菌学的性質を調査した結果、既知のシイタケ褐変腐敗病菌 *Ps. fluorescens* および黒腐細菌病菌 *Ps. tolaasii* とは異なり、エノキタケ褐色腐敗病菌 *Erwinia* sp. に酷似することがわかった。さらに、16S rRNA 遺伝子解析の結果、分離菌はイギリス、ニュージーランド、韓国および

エジプトで発生したツクリタケの菌柄内部壊死病菌 *Ewingella americana* と 99% 以上の相同性を示すことが判明した。以上のことから、ほだ木上のシイタケ子実体が褐変腐敗する症状は、*Ew. americana* に起因する細菌性の病害と判断した。これまでに *Ew. americana* によるシイタケの病害報告はないので、病名をシイタケ腐敗病 (Brown rot) と命名することを提案した。

シイタケ腐敗病菌 *Ew. americana* を効率的に分離するため、選択培地の作製を行った。植物病原細菌 *Erwinia* 属菌の選択培地 D3 培地を基礎培地とし、炭素源および窒素源を検討したところ、きのこに広く含まれる糖アルコールである D(+) アラビトールを添加すると選択性が高く、カザミノ酸ビタミンフリーを窒素源とすることで集落の色調が安定することがわかった。さらに添加剤の検討を行い、A-D3 培地【蒸留水：1000mL, D(+) アラビトール：10g, カザミノ酸ビタミンフリー：5g, 塩化リチウム：7g, グリシン：3g, 塩化ナトリウム：5g, 硫酸マグネシウム七水和物：0.3g, ドデシル硫酸ナトリウム：50mg, プロモチモールブルー：60mg, 寒天：15g, pH 7.2】を開発した。A-D3 培地上で *Ew. americana* を 28°C で 72 時間培養すると、直径 0.8–1.0mm, 周囲が白色を呈する黄色集落を形成した。A-D3 培地の平板効率は 66% と高く、褐変腐敗した子実体から分離された 93% の黄色集落は、*Ew. americana* の血清と沈降帯を形成したことから、生態的調査に使用できると判断した。

シイタケ腐敗病菌 *Ew. americana* の感染場所を明らかにするため、伏せ込み環境からの A-D3 培地を用いた分離を行った結果、原木生育地やほだ場の土壌、伏せ込み中のほだ木表面およびシイタケ子実体から *Ew. americana* が分離された。また、発病ほだ木をストレプトマイシン水和剤 1000 倍液に 6 時間浸漬する処理すると、シイタケ子実体の褐変腐敗症状は認められず、*Ew. americana* は分離されなかった。これらの試験結果から、原木生育地の土壌に生息しているシイタケ腐敗病菌 *Ew. americana* は、伏せ込み期間中にほだ木の樹皮表面で増殖し、幼子実体に感染することでシイタケ腐敗病が発生すると推察された。以上のことを総合的に考察すると、シイタケ腐敗病の防除はシイタケ菌の生理的な活性を低下させることなく、ほだ木表面に生息する *Ew. americana* の生育密度を低下させることが効果的な対策であると考えられる。

施設栽培されたクロアワビタケ、ヤナギマツタケ、ヒラタケ、エノキタケ、エリンギおよびヤマブシタケの変色または腐敗した子実体から A-D3 培地を用いて分離す

ると、*Ew. americana* (LE1001) と同じ集落形状を示す細菌が分離された。分離菌は 16S rRNA 遺伝子解析の結果、*Ew. americana* と 99% 以上の相同性を示した。これら分離菌を菌床シイタケに接種した結果、病原性を有することが確認された。さらに、菌掻き直後のヒラタケ栽培ビンに接種すると、菌傘の一部またはすべてが黄褐色に変色した子実体が発生し、接種後の温度が高いと激しい病徴を呈した。一方、*Ps. tolaasii* (814) をヒラタケの栽培ビンに接種すると、ヒラタケ子実体の菌傘上に褐色の斑点が生じ、徐々に融合して広がり、菌傘全体が黄褐変することが確認され、*Ew. americana* を接種した病徴とは明らかに異なった。以上のことから、*Ew. americana* は自然栽培のシイタケに加えて、施設栽培のヒラタケに対して生育阻害要因になることがわかった。

1997 年夏、大分県内においてビン栽培のエリンギ子実体が白色の糸状菌に覆われ、軟化腐敗する症状の発生情報が寄せられた。発生調査を行った 2 か所の栽培地では、従来ブナシメジまたはヒラタケの生産を行っていたが、今後需要の増加が見込まれるエリンギ栽培を試験的に開始した。当時エリンギは国内での栽培事例は少ないが、ブナシメジやヒラタケ栽培に準拠する方法で栽培が可能であったことから、生産者は本格的な導入に移行していた。しかし、エリンギ子実体が白色糸状菌に覆われる症状が徐々に見られ、菌掻き後の栽培ビンに白色糸状菌の蔓延が散見されるようになると、経済的な被害は急速に大きくなった。

エリンギ子実体上で生育する白色糸状菌は、ポテトデキストロース寒天培地で分離培養が可能で、培地上に多量の分生子を形成することから、分生子を健全なエリンギ子実体に接種する方法で病原性の確認を行った。分離菌 (OMI 9801) の分生子懸濁液 (約  $10^6$  個/mL) を生育中のエリンギ幼子実体に噴霧接種すると、3 日後の子実体上に白色糸状菌の生育が認められ、7 日後には子実体全体を覆い、軟化腐敗したことから原病徴が再現された。また、再分離菌と接種菌の培養性状は一致したことから、エリンギ軟化腐敗症状の原因菌を特定した。原因菌は培養および形態的特徴から、既知のエノキタケおよびブナシメジのわたかび病菌と同一種 *Cladobotryum varium* と同定した。*C. varium* によるエリンギの病害は報告例がないことから、本病をエリンギわたかび病 (White mould) と命名した。

エリンギわたかび病菌 *C. varium* の分生子をエリンギの生育工程毎に噴霧接種すると、約  $10^2$  個/mL 以上の濃度で子実体の変性が見られ、原基形成期に感染すると

激しい病徴を発現することがわかった。また、エリンギ培養段階に接種すると、約  $10^6$  個/mL の接種では栽培ビンの側面に拮抗線が見られ、これらの栽培ビンからは健全なエリンギ子実体は生育しなかった。しかし、約  $10^6$  個/mL 以下の接種では、菌掻き時の栽培ビンに外観上異状を認めなかったが、約  $10^2$  個/mL 以上の濃度で接種した栽培ビンからは、変性した子実体の発生が認められた。したがって、低濃度で感染した培養ビンを種菌として利用すると、短期間でエリンギわたかび病が拡大する可能性が示唆された。

エリンギわたかび病菌 *C. varium* の分生子をエノキタケ、ブナシメジおよびヒラタケの栽培ビンに接種すると、各子実体上において *C. varium* が生育することを確認した。発病調査を行った2箇所の栽培施設では、同一発生舎においてエリンギとヒラタケまたはブナシメジを同時に栽培していたが、生産者はエリンギ栽培を開始する以前に、ヒラタケおよびブナシメジに白色糸状菌が生育する症状を稀に認めていた。したがって、*C. varium* はエリンギ栽培を開始する以前からヒラタケおよびブナシメジの発生舎に生息し、新たに同一発生舎で栽培したエリンギに対して、激しい生育阻害を起こしと推察した。

きのこの菌床栽培は閉鎖的な施設で行われるため、一旦病害が発生すると大きな経済的被害を及ぼすことが知られている。発病確認後の対策として、変性子実体や培養不良ビンの早期除去を基本とする栽培環境の清浄化が行われている。そこで、エリンギわたかび病が発生した

栽培施設において、有効な清浄方法を確立する目的に、エリンギわたかび病菌 *C. varium* の分生子発芽および菌糸伸長に及ぼす薬剤の影響を調査した。*C. varium* の分生子を有効成分  $500\mu\text{g/mL}$  のヒビテン、オスバンおよびマイクロトール H で5分間処理することで、発芽は完全に阻害された。しかし、これらの薬剤はエリンギ菌糸の生育を阻害するので、使用場面は限定されることがわかった。*C. varium* の菌糸伸長阻害効果は、ベンレートおよびパンマッシュで高く、エリンギの原基形成期に使用する被覆資材を薬剤処理することでエリンギわたかび病の発病は防止され、その効果は持続することを確認した。以上のことから、エリンギわたかび病の伝染防止には、これらの薬剤を適正濃度で使用し、施設内の消毒を行えば有効であると考えられる。また、エリンギわたかび病の発病は、エリンギの培養期間の影響を受けることが判明し、エリンギ菌株間で耐性に差があることもわかったことから、耐病性品種の作出によって、発病を防止する可能性を示すことができた。

本論文は、原木栽培のシイタケを褐変腐敗させる細菌および菌床栽培のエリンギに寄生する糸状菌を、基質上で生育中の幼子実体に接種する方法で病原性を確認し、原因菌の同定、感染経路の特定および防除方法の検討を行ったものである。これらの研究成果は、きのこ生産地で発病の防止または軽減させる対策を講じるための基礎的かつ応用的な知見が含まれ、きのこの安定生産に大きく貢献するものである。

## 審査報告概要

きのこ栽培産業は近年発展の一途を遂げているが、その主要な生産阻害要因として病害の発生が世界各地で認められるようになってきた。申請者はこれら病害の中で病原が特定されていなかったシイタケ子実体の褐変腐敗症状およびエリンギの軟化腐敗症状に着目し、その病原を明らかにして病名を確定させるとともに、発生生態を調査して病害発生抑制のための防除指針を策定した。特にシイタケ腐敗症状については、既報の病原に加えてそれまでわが国に発生の認められていなかった新たな病原細菌を見出し、これを *Ewingella americana* と同定し腐敗病と命名した。また栽培環境や野外での発生状況を入念に調査して病害発生の経路を推定し、病害発生抑制

手段として新たなほだ木の管理手法を提案した。さらにエリンギのわたかび症状については、他種のきのこに発生するわたかび病と同様 *Cladobotryum varium* が病原であることを確定するとともに、エリンギでは初発となるためわたかび病と命名し、エリンギをはじめとする種々のビン栽培きのこでの本病発生を抑制するための管理手法を提案した。以上、本論文は栽培きのこ類について大きな被害を与える病害の病原を明らかにするとともに、栽培環境の改善や消毒手法について生産現場における具体的な手法を提案して病害発生を抑制することに大きく貢献したものであり、審査員一同は著者に博士（農学）の学位を授与するに値すると判断した。