

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

2017 年

有馬 忍

目 次

第Ⅰ章 緒言	1
第Ⅱ章 栽培きのこの生育を阻害する要因	5
第1節 原木栽培シイタケに発生した褐変腐敗症状	6
第1項 発生調査	6
1 材料および方法	6
2 結果	8
第2項 考察	14
第2節 菌床栽培エリンギに発生した軟化腐敗症状	18
第1項 発生調査	18
1 材料および方法	18
2 結果	19
第2項 考察	20
第Ⅲ章 原木栽培シイタケに発生した褐変腐敗症状	22
第1節 原因菌の分離と同定	22
第1項 細菌の分離	22
1 材料および方法	22
2 結果	22
第2項 分離菌の病原性	23
1 材料および方法	23
1) 供試菌株	23
2) 原木シイタケを用いた接種試験	23
3) 菌床シイタケを用いた簡易病原性の検定	25
2 結果	27
第3項 分離菌の同定	28
1 材料および方法	28
1) 供試菌株	28
2) 細菌学的性質の調査	29
3) 16S rRNA 遺伝子の解析	29
2 結果	30

第4項	選択培地の作製	32
1	材料および方法	32
1)	供試菌株	32
2)	炭素源, 窒素源および阻害剤の検討	32
3)	集落の特徴と平板効率	33
4)	選択培地によるシイタケ子実体からの分離	33
5)	選択培地で分離した細菌の抗血清反応と病原性	34
2	結果	34
第5項	考察	39
第IV章	シイタケ腐敗病菌の栽培きのこからの分離と病原性	45
第1節	シイタケ腐敗病菌の各種栽培きのこに対する病原性	45
第1項	採取後の子実体および培養菌糸に及ぼす影響	45
1	材料および方法	45
2	結果	46
第2項	考察	47
第2節	シイタケ腐敗病菌の栽培きのこからの分離	47
第1項	病原細菌の分離	47
1	材料および方法	47
2	結果	48
第2項	シイタケに対する病原性	49
1	材料および方法	49
1)	供試菌株	49
2)	菌床シイタケを用いた簡易病原性の検定	49
2	結果	49
第3項	ヒラタケに対する病原性	50
1	材料および方法	50
1)	供試菌株	50
2)	ヒラタケのビン栽培	51
3)	ヒラタケの芽出し工程における接種試験	51
2	結果	52
第4項	考察	55

第V章 シイタケ腐敗病菌の感染経路の解明	58
第1節 シイタケ栽培環境からの分離	58
第1項 ほだ木からの分離	58
1 材料および方法	58
2 結果	59
第2項 伏せ込み地およびほだ場の土壌からの分離	59
1 材料および方法	59
2 結果	60
第3項 分離菌のシイタケに対する病原性および 16SrRNA の遺伝子解析	60
1 材料および方法	60
2 結果	60
第4項 考察	62
第VI章 シイタケ腐敗病の防除	63
第1節 薬剤を用いた防除	63
第1項 ほだ木の殺菌剤処理	63
1 材料および方法	63
1) 供試ほだ木	63
2) 供試薬剤および処理方法	63
2 結果	63
第2項 ほだ木の食酢処理	65
1 材料および方法	65
1) 供試ほだ木	65
2) 供試薬剤および処理方法	65
2 結果	65
第3項 考察	66
第VII章 菌床栽培エリンギに発生した軟化腐敗症状	68
第1節 エリンギから分離される白色糸状菌の同定	68
第1項 糸状菌の分離	68
1 材料および方法	68
2 結果	68
第2項 分離菌の形態	69
1 材料および方法	69
2 結果	70

第3項	考察	71
第2節	エリンギわたかび病菌の栽培きのこに対する病原性	72
第1項	エリンギに対する病原性	72
1	材料および方法	72
1)	供試菌株	72
2)	接種試験	72
2	結果	73
第2項	各種栽培きのこに対する病原性	76
1	材料および方法	76
1)	供試菌株	76
2)	接種試験	76
2	結果	76
第3項	考察	78
第3節	エリンギわたかび病菌の感染経路	79
第1項	栽培工程と発病	79
1	材料および方法	79
1)	供試菌株	79
2)	接種試験	79
2	結果	80
第2項	考察	84
第4節	エリンギわたかび病の防除	85
第1項	被覆資材の薬剤処理	85
1	材料および方法	85
1)	供試菌株および薬剤	85
2)	分生子の発芽阻害試験	86
3)	菌糸の伸長阻害試験	86
4)	被覆資材へのわたかび病菌接種による汚染試験	87
5)	汚染キャップの薬剤処理と持続性試験	87
2	結果	87
第2項	エリンギ系統のわたかび病菌に対する感受性	93
1	材料および方法	93
2	結果	94
第3項	考察	94

第Ⅷ章 総合考察	97
引用文献	102
要旨	113
Summary	119

第 I 章 緒言

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状況を調査し、病原菌の特定および同定、感染経路の解明、防除方法の開発を目的とした。

全国におけるきのこ生産は、戦後本格的に行われるようになった。生産量は順調に増加し、2014年には生産量約43.7万トン、生産額約2,294億円に達している（総務省統計局，2014）。この間、栽培方法の改善や開発は進み、原木栽培から菌床栽培へと急速に移行し、新規のきのこが栽培されるようになった。これに伴いきのこ生産への企業の参入や国内需給バランスの崩れによる外国産の輸入急増が起こり、激しい産地間競争が繰り広げられている。このような状況の中、消費者の安全安心、自然志向が高まり、産地側には消費者ニーズを捉えた商品の安定供給が強く求められている。

我国のきのこ生産における阻害要因として、病害虫の発生に起因することは良く知られている（有田，1985；時本，1991；古川・野淵，1996；古川，2008；宮崎，2010；北島，2012）。きのこの栽培方法は種類によって異なるため、生産地では病害虫の発生によって多くの問題が生じており、発生原因の究明と対策が講じられてきた（山中・柿本，1991；古川・野淵，1996）。しかし、きのこ生産の継続が困難になる大きな被害や新たな問題も起こっており、特に気象や環境条件に大きな影響を受ける自然栽培は、生産期間が長期に及ぶことから、防除対策の実施が困難な場合が多い。

国内におけるシイタケ (*Lentinula edodes*) の栽培歴は比較的長く、生産量の多いきのこである。生シイタケは約90%が菌床栽培で生産されているが、乾シイタケは主に原木栽培で生産されている（総務省統計局，2014）。原木栽培は自然環境を利用した栽培法で、種菌接種（以下植菌）から子実体採取まで長期間野外で行われるため、病害虫による影響を受けやすい。ほだ木育成は、一般的に原木の伐採跡地、林内および

簡易な施設で行われ、種菌からシイタケ菌糸が伸長し、原木組織を徐々に腐朽させることでシイタケ菌糸体量を増加させる重要な栽培工程である。原木栽培は、菌床栽培と異なり培養基を殺菌しないため、シイタケ菌以外の担子菌や子のう菌が原木内に優先的に繁殖すると、シイタケ菌の生育範囲は限られ、子実体発生量の減少要因になる。すなわち、原木内部にシイタケ菌糸を優先的に蔓延させるために、栽培環境を整えることがシイタケ子実体の安定生産にとって不可欠である。

大分県の乾シイタケ栽培は、原木伐採跡地で2夏（約20ヶ月）経過したほだ木を、林内や人工ほだ場に移動（ほだ起し）し、子実体の採取作業を行う方法が一般的である。生産者は伏せ込み地の環境を整えるための作業を行うが、ほだ起し作業中にほだ木の異状に気づくことは少なくない。大分県では、1970年頃からシイタケほだ木の黒腐病（安藤ら、1980；松尾、1980；有馬、1994）が発生し、当時甚大な経済的損失を与えた。小松（1976）は、この原因を *Trichoderma* 属菌がほだ木内部のシイタケ菌糸を死滅させることに起因すると報告した。また、ほぼ同時期に長崎県対馬から移入した原木に混入して、ハラアカコブカミキリ（*Moechotypa diphysis*）が侵入し、大分県内の伏せ込み地でほだ木を食害する被害が発生した（藤本、1975；堀田・高橋、1981）。ハラアカコブカミキリの生育範囲は徐々に拡大し、九州本土の各地の原木栽培地で認められるようになった（大長光・金子、1988）。その他、ほだ木育成段階の病害虫に関する研究は比較的多い（有田、1971；大平、1974；角田・安藤、1981；時本、1985；加藤、1986；阿部、2003；村上・宿利、2006；村上、2015）。

一方、子実体の生育および採取段階では、採取量の極端な減少や変形子実体の発生に関する問題がしばしば起こってきた。これらの問題は、ほだ木内部のシイタケ菌糸体量の不足、誤った発生操作、極端な気象変化や栽培環境の不良に起因することが多い。しかし、生育中のシイタケ幼子実体が生長を停止し、褐変腐敗する症状が散見されるようになり、小松・後藤（1974）は本症状を *Pseudomonas fluorescens* による細菌病害として報告した。また、陶山・藤井（1993）および Tsuneda ら（1995b）は、同

じ症状のシイタケ子実体から *Ps. tolaasii* を分離し、シイタケ黒腐細菌病として報告した。*Ps. tolaasii* はツクリタケ褐変病菌として世界中で知られ (Fletcher and Gaze, 2008), 国内ではヒラタケ腐敗病およびエノキタケ黒腐細菌病の原因菌であることが報告されている (陶山・藤井, 1993, 白田ら, 1995)。また, シイタケ子実体の病害として, リケッチア様微生物による矮化病 (Fukumasa and Matsumoto, 1999) が報告されている。しかし, これらのシイタケ子実体に対して病原性を示す原因菌の感染経路は明らかにされておらず, 防除方法は確立されていない。以上のように, 屋外で栽培される原木シイタケ子実体に発生する病害に関する研究は少なく, 今後も甚大な経済的損失が生じることが懸念されていた。このような状況中, 1994 年に大分県内でシイタケ子実体が褐変または黒変して腐敗する症状 (以下褐変腐敗症状) の発生情報が寄せられたことから調査を開始し, 原因菌の特定および同定, 感染経路の解明, 防除法の確立を目的に研究を行った。

近年, 生鮮きのこ類の多くは菌床栽培で生産されるようになり, 店頭で販売されるきのこの種類は徐々に増加してきた。その中で, エリンギ (*Pleurotus eryngii*) は急速に生産が拡大したきのこのひとつである。

エリンギは日本国内に自生せず, ヨーロッパ, 北アフリカ, 中央アジアに自生する食用きのこである (衣川, 1982)。ヨーロッパでは古くからエリンギの人工栽培に関する研究が行われてきた (Cailleux and Diop, 1974 ; Zadrazil, 1974,1978)。日本では 1993 年から実用的な生産を目的として菌株を導入し, ヒラタケ (*Pleurotus osteratus*), ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) およびエノキタケ (*Flammulina velutipes*) など既存の栽培施設を利用して, 試験的な導入が始まった (澤, 1994 ; 山中・鈴木, 1994 ; 宮内ら, 1998)。エリンギの味覚は消費者の嗜好に合い, 市場での取引も順調に増加し, エリンギを主体に栽培する生産者が出現した (木村, 1999 ; 伊藤, 2010)。さらに, 民間企業がエリンギ栽培に参入し, 工場生産が本格的に稼働し始めた。その結果, エリンギ生産は飛躍的に増加し, 2014 年の全国生産量は 39,645 トンに達した (総務

省統計局，2014)。

大分県では1995年頃から2,3のきのこ菌床栽培生産者がエリンギを導入し、ビン栽培を開始したが、1997年夏にエリンギ子実体が白色糸状菌に覆われ、軟化腐敗する症状（以下軟化腐敗症状）の発生情報が寄せられた。エリンギの栽培歴は浅く、これまでに病害発生の記録がないことから、軟化腐敗症状は今後エリンギ栽培上重要な病害になると考えられた。1997年、エリンギ軟化腐敗症状の発生情報の寄せられた生産地で発生調査を開始し、原因菌の同定、感染経路の特定および防除方法の確立を行うことを目的に研究を行った。

本論文をとりまとめるにあたり、懇切、丁寧なご指導とご校閲を賜り、ご激励とご助言を戴いた東京農業大学教授 根岸寛光博士に衷心から感謝申し上げます。本研究の遂行に当たりご指導とご助言並び論文をとりまとめるにあたりご示唆とご校閲を戴いた東京農業大学教授 篠原弘亮博士、江口文陽博士、同助教 キム オッキョン博士に対して衷心から感謝申し上げます。また、長年にわたって研究遂行上多大なるご指導とご支援を戴いた元大分県きのこ研究指導センター所長 古川久彦博士および、故陶山一雄博士に対して厚くお礼申し上げます。さらに、森林総合研究所 根田 仁博士、元長野県野菜花き試験場 中村公義氏、角田茂幸氏、秋田県林業研究研修センター 菅原冬樹氏には、菌株の分譲やサンプルの採取、森林総合研究所九州支所 宮崎和弘博士には、有益なご助言を戴いた。長年を要した研究の遂行には、多くの関係者のご理解と力強いご支援を頂戴した。特に、歴代の東京農業大学農学部農学科植物病理学研究室の学生諸氏ならびに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の職員、大分県地方振興局のシイタケ普及員や行政関係者、大分県椎茸農業協同組合、種菌製造販売会社の職員およびきのこ生産者には、現地調査や実験の補助に多大な協力戴いた。記して感謝の意を表す。

第Ⅱ章 栽培きのこの生育を阻害する要因

人工栽培されているきのこの生育阻害に関する研究は、安定生産および品質向上に寄与する重要なものと考えられる。国内のきのこ生産の原点である原木栽培は、中山間地を利用した自然環境下で行われ、栽培期間が長いことから生育阻害要因を解明することが困難な場合が多い。一方、菌床栽培は温湿度を制御した空調施設内で行われ、比較的安定した周年生産が可能である。しかし、一旦生育阻害が起こると、甚大な経済的損失を伴う場合が多く、早急な対応が優先されるため、生産現地における発生状況は不明な点が多く残されている。

シイタケ原木栽培は、ほだ木育成と子実体発生の2段階に分けられる。ほだ木育成段階では、シイタケ菌糸に対して病原性を示す *Hypocrea* および *Trichoderma* 属菌(有田, 1971; 小松, 1976; 時本, 1985), シイタケ菌糸と競合する木材腐朽菌のシトネタケ (*Diatrype stigma*; 大平, 1974), ニマイガワキン (*Graphostroma platyatoma*; 角田・安藤, 1981; 角田ら, 1996; Tunoda, 2003) およびクロコブタケ (*Hypoxylon truncatum*; 阿部, 2003) を対象にした詳細な研究が行われ、生産地における防除対策が示されている。一方、子実体発生段階では、細菌(小松・後藤, 1974; Nakai et al., 1982; 陶山・藤井, 1993; Tsuneda et al., 1995b), 子のう菌(Tsuneda et al., 1995a, 1997; 渡邊ら, 2014) およびウイルス(馬替・砂川, 2005) に関する研究が行われてきた。しかし、これらの先行研究では、生産地における病害の発生状況は、ほとんど明らかにされていない。このような状況の中、大分県において原木シイタケ子実体の褐変腐敗症状の発生情報が寄せられたことから、本症状の発生状況を明らかにするために調査を行った。

一方、菌床栽培は、当初培地の殺菌不良(河野・寺下, 1984; 北本ら, 1987), 接種および培養中の培養基内への糸状菌の侵入(原田, 1977; 古川・野淵, 1996) に起因する問題が大きかったが、子実体の変色や腐敗を引き起こす細菌(土屋ら, 1985;

陶山・藤井, 1993 ; 白田ら, 1995, ; Okamoto et al., 1999), 糸状菌 (中村ら, 1996 ; Okada et al., 1998 ; 長野県野菜花き試験場菌茸部, 1999) およびウイルス (Magae and Hayashi, 1999) の発生も認められるようになってきた。このような状況の中, 大分県では新規に導入したエリンギ生産者から, 子実体の軟化腐敗症状の発生情報が寄せられたので発生調査を行った。

第1節 原木栽培シイタケに発生した褐変腐敗症状

ほだ木上で生育中のシイタケ子実体が褐変腐敗する症状の発生実態を明らかにするために, 発生調査および生産者を対象にしたアンケート調査を行った。なお, 本研究では, シイタケの菌傘が開いていない子実体を「幼子実体」, 開傘して菌褶の見られる子実体を「成熟子実体」と呼称する。

第1項 発生調査

1994-2014年にかけて, 発生情報が寄せられた大分県内のほだ場を中心に発生調査を行った。なお, 本論文では調査地の所在地名は現在の名称, シイタケの品種名は調査当時の名称で記載した。

1. 材料および方法

発生調査：第1回の調査は, 1994年12月に玖珠郡玖珠町, 1995年10月に杵築市大田, 1996年11月に豊後大野市三重町および大野町の4箇所在林内ほだ場で実施した。ほだ場で褐変腐敗症状の発生を確認後, 品種, 栽培管理方法, 環境および気象条件等について, 生産者から聞き取り調査を行った。

第2回の調査は, 1999年3-4月に佐伯市本匠, 玖珠郡九重町および豊後大野市三重町(2箇所)の合計4箇所のほだ場で実施した。ほだ場で褐変腐敗症状の発生を確認後, 聞き取り調査するとともに, 発生の程度を調査した。発生の程度は, 調査時に

子実体が見られるるほだ木のみを対象とし、各ほだ場で 50-120 本のほだ木を無作為に選び、それぞれについてほだ木の子実体を観察し、異状の見られないほだ木（－）、褐変した子実体が見られるほだ木（＋）、褐変腐敗した子実体が見られるほだ木（＋＋）およびほとんどの子実体が褐変腐敗しているほだ木（＋＋＋）に類別した。

第 3 回の調査は、2000 年 3-12 月に発生情報が寄せられた 4 箇所および第 1 回および第 2 回の調査地以外の無作為抽出した 25 箇所、合計 29 箇所の林内ほだ場、人工ほだ場およびビニールハウスで実施した。一部のほだ場では、褐変腐敗症状の発生したほだ木の割合を調査した。

第 4 回の調査は、褐変腐敗症状の発生情報寄せられた 2003 年 4 月に杵築市山香、10-11 月に臼杵市野津町の林内ほだ場で実施した。

第 5 回調査は、褐変腐敗症状の発生情報寄せられた 2011 年 3 月に日田市天瀬町および杵築市山香の林内ほだ場で実施した。

第 6 回の調査は、褐変腐敗症状の発生情報寄せられた 2013 年 11 月に玖珠郡玖珠町、2014 年 12 月に中津市耶馬溪町の林内ほだ場で実施した。また、2014 年 10 月に豊後大野市三重町（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、以下試験場）の人工ほだ場を調査対象とした。調査地から発病ほだ木を持ち帰り、試験場内の人工ほだ場で継続調査した。

アンケート調査は、1997 年 9 月から 1998 年 1 月にかけて実施した。原木シイタケ生産者を対象にした研修会で、褐変腐敗症状の説明を行った後、予め準備したアンケート用紙に直接記入する方法で行った。アンケートの調査項目は、褐変腐敗症状の発生の有無、発生した年月や品種とした。調査は旧玖珠九重地方振興局管内（20 名、玖珠町、九重町）、旧大分地方振興局管内（9 名、大分市、由布市）、旧別杵速見地方振興局管内（13 名、別府市）、旧西高地方振興局管内（9 名、豊後高田市）で行い、合計 51 名の生産者から回答を得た。

2. 結果

発生調査 1： 調査した 4 箇所在林内ほだ場において、シイタケ子実体が異臭を伴って褐変から黒変する症状が共通して確認された。褐変腐敗症状はほだ木上の幼子実体から採取適期の成熟子実体に認められた。異臭を放つ幼子実体は菌傘および菌柄の一部が褐変し、成長は既に停止していると判断された (Fig.1a)。成熟子実体は異臭を放って腐敗し、糸状菌に覆われる子実体も認められた。ほだ木ごとに調査したところ、同一ほだ木には健全子実体と異状の認められる子実体が混在し、全ての子実体が褐変や腐敗症状を示すことは少なかった。しかし、外観上は健全な成熟子実体の菌傘組織が軟化し、菌褶のみが褐変する症状も稀に認められた (Fig.1b)。



Fig.1 Symptoms on the natural growing fruiting bodies of *Lentinula edodes* cultivated with bed logs in Oita prefecture.

- a. Natural symptoms of pileus and stipe on the fruiting bodies of *L.edodes* in Kituki city at 1994.
- b. Natural symptoms of gill on the fruiting bodies of *L.edodes* in Kituki city at 1994.
- c. Brown rot symptoms on the old fruiting bodies of *L.edodes* in Bungo-ohno city at 1999.
- d. Brown rot symptoms on the young fruiting bodies of *L.edodes* in Saiki city at 1999.

調査した4箇所のほだ場において、褐変腐敗症状の発生が共通して確認された品種は、初秋から子実体が採取可能な森290であった。また、ほだ場環境を調査したところ、豊後大野市大野町および三重町のほだ場は通風が悪く、やや過剰な散水管理を実施しており、比較的多湿傾向であった。しかし、他の2箇所のほだ場は平均的な環境条件であった。

発生調査2：1999年3-4月に調査した4箇所のほだ場において、生産者は2月下旬頃から、幼子実体の成長停止および軽度の褐変腐敗症状を認めていた。本症状は徐々に目立つようになり、調査を行った3-4月には異臭を伴った腐敗が確認された。なかでも佐伯市本匠および豊後大野市三重町では、林内ほだ場の全体に悪臭が漂い、菌泥を伴って激しく腐敗する子実体が認められた（**Fig.1c**）。さらに、佐伯市本匠では、褐変腐敗した幼子実体付近のほだ木内樹皮も激しく褐変していた（**Fig.1d**）。また、同時期に豊後大野市三重町の人工ほだ場と玖珠郡九重町の林内ほだ場において、褐変腐敗症状の発生を確認した。4箇所のほだ場で発生の程度を調査した結果、佐伯市本匠および豊後大野市三重町（林内ほだ場）において、90%以上のほだ木で褐変腐敗症状を確認した（**Table 1**）。

Table 1. Results of occurrence research for brown rot disease on *Lentinula edodes* in Oita prefecture at 1999.

Location	Fruiting yard	Strain	Year of bed logs ¹⁾	Degree of severity (%) ²⁾			
				+++	++	+	—
Honjo Saiki city	Natural	Meiji 908	2	43.8	24.8	22.3	9.1
Mie-machi Bungo-ohno city	Artificial	Mori 290	1	20.3	28.8	37.3	13.6
Mie-machi Bungo-ohno city	Natural	Mori 121	2	60.7	24.7	12.3	2.3
Kusu-machi Kusu-gun	Natural	Kinko 115	1,2	2.0	22.6	37.7	38.7

1) The year of bed logs at fruiting yard.

2) The percentage of fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms. Degree of brown rotting symptoms on fruiting bodies of *L. edodes*. +++:severe with rot, ++:medium, +:slight, -: no browning

Rate (%) = (Number of bed logs on fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting symptoms / number of bed logs on flashing fruiting bodies) × 100)

調査対象とした品種およびほだ木の発生年数は、佐伯市本匠は明治 908 の 2 年ほだ木、豊後大野市三重町（林内ほだ場）は森 121 の 2 年ほだ木、豊後大野市三重町（人工ほだ場）は森 290 の 1 年ほだ木、玖珠郡九重町は菌興 115 の 1 年および 2 年ほだ木であった。玖珠郡九重町のほだ場では、12 月から 1 月に長期間ビニールで被覆を行ったほだ木に発生が集中していた。しかし、その他のほだ場では特別な発生操作は実施しておらず、ほだ木の管理方法と褐変腐敗症状の発生との関連は不明であった。また、ほだ場の立地条件を調査したところ、標高は佐伯市本匠が約 150 m の山間地に位置し、ほだ場の横に小川が流れており、湿度が高いほだ場であった（Fig.2a）。豊後大野市三重町（林内ほだ場）も同様な環境条件であった。豊後大野市三重町の人工ほだ場は標高約 200 m に位置し、1998 年秋に完成した新しい施設で、通風および排水の良い環境条件であった。一方、玖珠郡九重町の調査地は標高 650 m の高冷地に位置していたが、南向きの明るいほだ場であった。



Fig.2 Fruiting yards of *Lentunula edodes* cultivated with bed logs in Oita prefecture.

- a. Natural fruiting yards of severe brown rot symptoms on the fruiting bodies of *L.edodes* in Saiki city at 1999.
- b. Natural fruiting yards of slight brown rot symptoms on the fruiting bodies of *L.edodes* in Kusu machi at 2013.

発生調査 3：調査は、発生情報の寄せられた中津市耶馬溪町のビニールハウス、佐伯市本匠と豊後大野市三重町の人工ほだ場、佐伯市弥生の林内ほだ場および発生情報

の寄せられていない生産現地で実施した。2000年10月に中津市耶馬溪町において、原木生シイタケ栽培用の品種（品種：セッコーH3）に初めて褐変腐敗症状の発生を確認した。生産者は原木伐採跡地で育成したほだ木を数時間浸水し、ビニールハウスに展開、栽培管理を行っていた。異状は展開して数日後から見られ、調査時にはすべての子実体が褐変から黒変し、異臭を放って激しく腐敗していた。また、発生情報の寄せられたほだ場における褐変腐敗症状の発生割合は、佐伯市本匠および豊後大野市三重町の人工ほだ場で65%および31%、佐伯市弥生の林内ほだ場で89%であった。

一方、無作為抽出したほだ場で調査においても、子実体の褐変腐敗症状は認められた。なかでも、2000年11月に調査した佐伯市本匠の3箇所在林内ほだ場では、褐変腐敗症状の発生は比較的激しかった。また、軽度の発生は、2000年3月に佐伯市宇目および弥生の林内ほだ場、竹田市の人工ほだ場、2000年4月に国東市国見の林内ほだ場および由布市庄内のビニールハウス、2000年10-11月に国東市国見、豊後高田市香々地および宇佐市安心院の林内ほだ場と人工ほだ場で確認した。しかし、その他の調査地では、子実体が僅かに褐変する程度であった。今回無作為に抽出した25箇所の生産現地のうち、10箇所の林内ほだ場、4箇所の人工ほだ場および3箇所のビニールハウスにおいて、褐変腐敗症状の発生が確認された。

発生調査4：2003年4月に調査した杵築市山香の林内ほだ場は谷筋に位置し、通風管理が不十分なため湿度が高い状況であった。ほだ場では菌泥を伴い激しく腐敗した子実体が見られた。褐変腐敗症状の認められた品種は明治905のみで、他品種に異状はなかった。また、2003年11月に調査を行った臼杵市野津町の林内ほだ場は、川沿いの谷筋に位置し、湿度が高い環境条件であった。加えて頻繁に散水を実施しており、調査時に激しい褐変腐敗症状が発生していた。本症状が発生した品種は、菌興170の2年ほだ木のみであり、同一ほだ場の1年ほだ木には異状は見られなかった。

発生調査 5: 2011 年 3 月に調査した日田市天瀬町の生産者は、以前から成長中のシイタケ幼子実体が腐敗することを散発的に確認していた。本症状の発生が確認された品種は森ゆう次郎で、多くの幼子実体は異臭を放って成長停止していた。一方、杵築市山香の生産者は、森 290 を 10 年間使用してきたが、褐変腐敗症状の発生は認めなかった。しかし、2010 年秋に起こしたほだ木に初めて異状を認め、3 月の発生調査においてシイタケ子実体が褐変腐敗する症状が確認された。褐変腐敗症状の発生は所有する 2 箇所の林内ほだ場で見られ、中央に水路のあるほだ場の症状は激しかった。

発生調査 6: 2013 年 11 月に調査した玖珠郡玖珠町（以下玖珠調査地）の生産者は、林内ほだ場にクヌギ原木を搬入し、シイタケ種菌を原木に植菌して伏せ込み、2 夏経過後に同ほだ場内に立て込む方法で栽培を行っていた。ほだ場は尾根筋に位置したアカマツと広葉樹の混合林（**Fig.2b**）で、風通しは良好であった。発生調査を行ったところ、2011 年植菌（子実体採取 2 年目）および 2012 年植菌（子実体採取 1 年目）のほだ木上の子実体に異状が認められた。ほだ木上の成熟子実体の一部は褐変から黒変し、異臭を放って腐敗していた。発生は 1 品種（品種：セッコー11）のみで見られ、同ほだ場で栽培中の他品種に異状は見られなかった。生産者からの聞き取りでは、採取 2 年目のほだ木で前年（1 年目）も同じ症状のシイタケ子実体が点在することを確認していた。

2011 年植菌および 2012 年植菌のほだ木各 3 本を持ち帰り、試験場内の人工ほだ場で管理したところ、2014 年 10-11 月、2015 年 2-4 月、すべてのほだ木上で褐変腐敗症状の発生を確認した。一方、2013 年に植菌したほだ木 3 本からは、異状は見られなかった。

2014 年 12 月に調査した中津市耶馬溪町（以下耶馬溪調査地）の生産者は、2013 年 2 月上旬と 3 月下旬にコナラ原木の生育地でシイタケ種菌を植菌し、同場所で伏せ込みを行った。植菌から 2 夏経過後にほだ木を、やや湿度の高い環境条件のスギ林内

に立て込んで採取作業を行っていたところ、2014年11月にシイタケ子実体の菌褶が淡赤色を呈していることを認めた。発生調査を行ったところ、ほだ木上の幼子実体は褐変から黒変し、異臭を放って激しく腐敗していた。発生は2013年3月下旬にセッコー11を植菌したほだ木（以下3月植菌ほだ木）に集中して見られ、外観上健全な子実体と混在していた。しかし、2月上旬にセッコー11を植菌したほだ木（以下2月植菌ほだ木）では、異状子実体の発生は見られなかった。生産者からの聞き取りから、2月上旬に植菌した種菌は事前に購入保管していたものを使用したが、3月下旬に植菌した種菌は追加注文により購入したことが判明した。

2月植菌および3月植菌ほだ木を各5本持ち帰り、試験場内の人工ほだ場で管理したところ、2015年2-4月にかけて、3月植菌ほだ木に外観上健全な子実体に混在し、褐変から黒変して腐敗するシイタケ子実体の発生を確認した。一方、2月植菌ほだ木からは健全な子実体のみが採取された。調査対象のほだ木の2015年秋から春にかけて発生状況を調査したが、褐変腐敗症状を呈する子実体の発生は見られなかった。

2014年10月に試験場内の人工ほだ場において、栽培中のほだ木上に子実体全体が激しく褐変から黒変し、異臭を放って成長停止する症状を認めた。本症状は2013年3月に交配株（系統：7-26）を植菌したほだ木7本のみに見られ、ほだ木上のすべての子実体が同様な症状を呈していた。同じ人工ほだ場で管理中の他の交配株24系統および市販品種を植菌したほだ木からは、異状子実体は認められなかった。発生ほだ木を引き続き観察したところ、2015年10月に褐変腐敗症状を確認したが、生育した子実体個数は昨年と比較して大きく減少した。

アンケート調査：シイタケ栽培技術研修会に参加した生産者の51名からアンケート調査の結果を回収した。多くの生産者の栽培歴は、20年以上の中核的生産者であった。アンケート調査の結果、31名の生産者は自身のほだ場において褐変腐敗症状を認識していた。発生の認識は旧玖珠九重管内および旧別杵速見管内の生産者で高

く、旧大分管内および旧西高管内では発生を認識していない生産者が多い傾向が認められた。褐変腐敗症状の発生時期は、9-11月および3-4月の秋および春の採取時期に多く、低温期である12-2月は少ないとする回答が多かった。発生の見られた品種は、20名の生産者が森290と回答した。しかし、生産者は森121、森ゆう次郎、明治908、菌興115、菌興241号にも本症状の発生を認めていた。また、生シイタケ用の品種（品種：ヤクルト763）と回答した生産者も存在した。本症状の発生を認めた最初の時期は、1974年とする生産者が存在したが、1990年から1994年と回答した生産者が最も多かった。特に、1992年および1993年に経済的な被害が大きかったと回答した生産者が多かった。

第2項 考察

1994年12月に玖珠郡玖珠町のほだ場を調査し、ほだ木上でシイタケ幼子実体の菌傘および菌褶が褐変または黒変し、腐敗する症状を確認した（有馬ら、1997）。以降、発生情報の寄せられたほだ場を中心に調査を行ったところ、成熟子実体に菌泥が溢出し、激しく腐敗する症状も認められた（有馬・陶山、2009）。ほだ木上のシイタケ子実体は、採取せずに放置すると全体が徐々に赤褐色に変色する。しかし、過乾燥や低温が原因で成長停止または枯死した幼子実体および採取されず放置した成熟子実体は、異臭を放つことはなく、ほだ場における両者の識別は容易であった。

1994年から1996年の秋から初冬の調査において、褐変腐敗症状の発生した品種は森290であった。この品種は、気温が比較的高い時期に子実体を形成する温度特性を有している。初めて褐変腐敗症状の発生情報が寄せられた頃、本県では春子の発生割合が高く、春期の採取および乾燥作業と原木の玉切り、種菌が重複することで作業の遅れが懸念されていた。したがって、秋期の発生割合が高く、発生量の多い森290は、生産者から急速に受け入れられるようになった。この品種のほだ起こし時期は、最低気温が14℃を下がる頃が目安とされ、標高の高い高冷地では、9月下旬頃から

ほだ木のほだ場への移動が行われていた。また、秋期に子実体の生育を促すために、ほだ場に移動したほだ木に対して、散水管理が推奨されていた（石井・有馬，2003；山下ら，2006）。したがって、通風および排水が悪いほだ場では、過剰な散水や長雨による影響も発生要因の一つとして考えられた。しかし、褐変腐敗症状の確認されたほだ場の環境は、必ずしも湿度が高い状況ではなかった。褐変腐敗症状の発生の程度は、調査時前の降雨によるほだ場の水分条件に影響を及ぼすと考えられ、1回目の調査では解明できなかった。

1999年3-4月の調査では、褐変腐敗症状の発生の程度について調査した。4箇所のほだ場の中で、佐伯市本匠は90.9%、豊後大野市三重町は97.7%のほだ木に褐変腐敗症状が認められた。本症状の認められた品種は、明治908、森290、森121および菌興115であった。多量の菌泥が見られた佐伯市本匠および豊後大野市三重町の林内ほだ場の湿度は比較的高く、3月以降の降雨量が多かった影響を受けて、病勢が進展したと考えられた。一方、玖珠郡九重町では、厳寒期にビニールで被覆したほだ木のみ褐変腐敗症状が確認された。以上のことから、褐変腐敗症状は森290以外の3品種（明治908、森121、菌興115）の春に採取するシイタケにも認められ、湿度の高い条件下で激害が発生しやすいことが判明した。

2000年の調査では、生シイタケ用の品種に初めて褐変腐敗症状の発生を確認した。浸水後のほだ木を発生舎（ビニールハウス）に並べたところ、ほとんどの子実体が生育途中で褐変または黒変し、発生舎内は強い異臭が漂っていた。前後に浸水したほだ木からは、健全子実体が採取されており、栽培管理と本症状の発生との関係は不明であった。また、任意に調査行った25箇所のほだ場では、13箇所（52%）のほだ場等で軽度の褐変腐敗症状が確認され、県下全域に広く発生していることがわかった。

2003年の現地調査で新たに2箇所のほだ場において、異臭を伴う激しい褐変腐敗症状の発生を認めた。発生の見られた品種は、これまで調査事例のない2品種（品種：明治905および菌興170）で、ほだ場の湿度は非常に高かった。

2013年および2014年の調査で褐変腐敗症状が確認されたセッコー11は、森290と同様に秋と春に採取する品種である。玖珠調査地ではセッコー11を植菌したほだ木は、2年連続して褐変腐敗症状の発生が認められた。しかし、2014年に植菌したセッコー11のほだ木からは、異状は認められなかった。さらに、耶馬溪調査地では、追加購入したセッコー11を植菌したほだ木（3月植菌ほだ木）に褐変腐敗症状の発生が見られ、ほだ木を試験場内の人工ほだ場に移動させた後も発生することを確認した。一方、事前購入し、しばらく保管していた種菌を植菌したほだ木（2月植菌ほだ木）には異状は認められなかった。1994年から2003年に実施した発生調査において、同じ品種で褐変腐敗症状の発生に違いが見られることがあった（有馬・陶山；2009）。この原因として、伏せ込み中に原因菌の感染程度が異なることを推察していたが、今回の調査結果から種菌による影響を否定できないと考えられた。また、試験場内の人工ほだ場で選抜中の交配株1系統に、褐変から黒変して異臭を放って腐敗する症状を認めた。しかし、同じ人工ほだ場で管理中の、同一交配株から作られた他菌株には本症状の発生は認められなかった。以上のことを総合的に考えると、シイタケ菌の生理的活性（山中，1995；古川，2008）および感受性の違いが、褐変腐敗症状の重要な発病因子であることが示唆された（有馬ら；2016）。

発生調査の結果から、シイタケの褐変腐敗症状は1994年から2014年にかけて、大分県内11市2町の32箇所を確認（**Fig.3, Table 2**）され、9品種（森290，森121，森ゆう次郎，明治905，明治908，菌興115，菌興170，セッコーH3，セッコー11）に発生していることが明らかになった（有馬ら，1997；有馬・陶山，2009）。

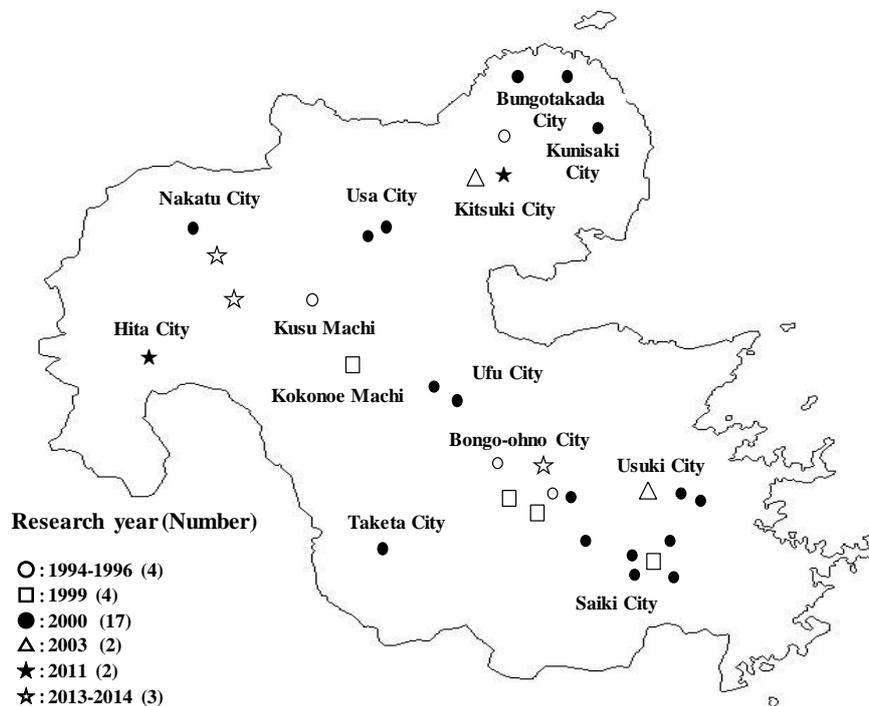


Fig. 3 Distribution of brown rot symptoms on the fruiting bodies of *Lentinula edodes* in Oita prefecture.

Table 2. Results of occurrence research for brown rot disease on *Lentinula edodes* in Oita prefecture.

Research year	Fruiting yard			Degree of severity (%) ¹⁾		
	Natural	Artificial	Green house	+++	++	+
1994-1996	4				2	2
1999	3	1		3	1	
2000	10	4	3	3	4	10
2003	2			2		
2011	2				2	
2013-2014	2	1			2	
Total	23	6	3	8	12	12

1) Degree of brown rotting symptoms on fruiting bodies of *L. edodes*. +++:severe, ++:medium, +:slight

アンケート調査からは、生産者の約 60%は褐変腐敗症状を比較的以前から確認していること、発生は比較的内地部のほだ場が多いことがわかった。また、褐変腐敗症状を 1974 年に認めたと回答する生産者も存在したが、多くの回答から 1990 年代に発生が顕在化し、他品種より高温期に採取される森 290 に発生が多いことが判明した（有馬・陶山，2004）。この傾向は発生調査の結果と一致した。褐変腐敗症状の発生を認めた生産者の多くは、対応策として品種の変更を行う考えを持っており、ほだ場環境および発生操作を問題として考える生産者は少数であった。

以上のことから、ほだ木上のシイタケ子実体の褐変腐敗症状は、県内各地で比較的古くから散発的に発生し、シイタケ生産上の大きな阻害要因になっていることがわかった。褐変腐敗症状は細菌に起因することが推察されることから、原因菌の特定、感染経路の解明を行い、防除法の確立を目的とした研究を開始した。

第 2 節 菌床栽培エリンギに発生した軟化腐敗症状

大分県では、1995 年頃から 2,3 のきのこ菌床栽培生産者がエリンギを導入し、栽培を開始したが、1997 年夏にエリンギ子実体が白色糸状菌に覆われ、軟化腐敗する症状の発生情報が寄せられた。エリンギの栽培歴は浅く、これまでに病害発生の記録がないことから発生調査を実施した。

第 1 項 発生調査

大分県内でエリンギ生産を開始し、発生情報の寄せられた 2 箇所の栽培地で発生調査を実施した。生育室で症状を確認後、発生の経緯、栽培方法について、生産者から聞き取り調査を行った。

1. 材料および方法

発生調査は、1997 年 6 月に大分市佐賀関、1997 年 8 月および 1998 年 1 月に杵築市

山香のエリンギ栽培施設で行った。

2. 結果

2箇所の栽培施設ではエリンギのビン栽培を行っており，両生産地とも健全子実体に混在して白色糸状菌に覆われた子実体の発生が確認された。白色糸状菌はエリンギ幼子実体の基部から立ち上がるように生育していた。軽症子実体では菌褶から菌柄の一部に綿状の白色菌糸が僅かに見られた（**Fig.4a**）。重症子実体では子実体全体が白色の菌糸に覆われ軟化腐敗し，着生菌は多量の分生子を形成していた（**Fig.4b**）。また，原基が形成される前に感染した菌床では，菌床表面が白色菌糸に完全に覆われ，幼子実体への成長が完全に阻害されていた（**Fig.4c**）。



Fig.4 Symptoms appeared on the natural growing fruiting bodies of *Pleurotus eryngii* cultivated in Oita prefecture at 1997.

- White mould (arrow) appeared on the old fruiting bodies of *P. eryngii* in Oita city.
- Severe symptoms appeared on the old fruiting bodies of *P. eryngii* in Kituki city.
- Severe symptoms appeared on the young fruiting bodies of *P. eryngii* in Kituki city.

1998年1月に行った杵築市山香の発生調査では、約39%の栽培ビンで軟化腐敗症状の発生が確認され、大きな減収要因になっていた。しかし、エリンギ軟化腐敗症状の発生が確認された生育室内において、栽培管理中のブナシメジに異状は認めなかった。同様に、大分市佐賀関ではヒラタケが同一栽培舎で栽培されたが、ヒラタケに異状は確認されなかった。

第2項 考察

大分県では1995年頃からエリンギ栽培が試験的に行われるようになったが、生育中の幼子実体に白色菌糸が着生し、軟化腐敗する症状の発生情報が寄せられたので、2箇所の栽培地で発生調査を実施した。

大分市佐賀関ではヒラタケのビン栽培が行われてきたが、需要の減少に伴う単価の低迷傾向に歯止めがかからない状況の中で、エリンギ栽培を検討するようになった。ヒラタケと同じ培地を用いてビン栽培を試みると、エリンギは培養期間がやや長くなるが、健全な子実体が生育した。菌掻きおよび芽出し作業もヒラタケと同様な方法で行い、当初エリンギ子実体は順調に栽培された。しかし、ヒラタケと同じ生育室内で栽培を繰り返すと、採取前の成熟子実体が白色の糸状菌に覆われる症状が見られるようになり、その症状は徐々に拡大した。この生産地のヒラタケ栽培歴は比較的長いですが、培養不良が以前から問題になっていた。原因は接種作業および培養中のビン内部への糸状菌の混入であった。しかし、同じ発生舎では健全なヒラタケ子実体が採取されており、エリンギで見られた軟化腐敗症状は確認されなかった。

杵築市山香では主にブナシメジを生産していたが、今後安定した需要が見込まれる新規のきのことしてエリンギに着目し、ブナシメジと平行して栽培を開始した。栽培方法はブナシメジに準拠して行い、同じ生育室で両者の栽培ビンを管理していた。発生調査時の状況は大分市佐賀関と比較して甚大で、幼子実体および成熟子実体が白色の糸状菌で覆われ、軟化腐敗した子実体も多数認められた。また、菌掻き処理後に原

基形成が見られないビンが散見されることから、比較的早い段階に白色糸状菌の感染を受けたと考えられた。菌掻き後の芽出しに使用するビニールシートは、洗浄することなく再利用されており、感染拡大の要因になっていると推測された。生産者は、以前から栽培中のブナシメジ子実体に、白色糸状菌が着生していることを認めていたが、その発生頻度は低かったので対策を講じなかった。1回目の調査で栽培環境の清浄度を改善する助言を行ったが、生産を一旦中断することは経済的損失が大きいため実行されなかった。5ヶ月後の発生調査でも軟化腐敗症状の発生が継続しており、エリンギ栽培を断念する方向で検討を始める事態になった。なお、今回調査した2箇所の栽培地では、技術的な交流は全く行われていなかった。

以上のことから、エリンギの栽培を開始した2箇所の現地で、ほぼ同時期に子実体が白色糸状菌に覆われる症状が認められ、子実体は軟化腐敗することが明らかになった（有馬・陶山；1998）。本症状の発生や拡大は、エリンギ生産の安定化を図る上で重要な阻害要因になることが推察されたことから、原因菌の特定および感染経路の解明を行い、防除方法の確立を行うことを目的に研究を開始した。

第Ⅲ章 原木栽培シイタケに発生した褐変腐敗症状

1996-2014年にかけて、大分県内でほだ木から発生したシイタケ幼子実体が褐変または黒変して腐敗する症状を確認した。この症状は、*Ps. fluorescens*によるシイタケ褐変腐敗病（小松・後藤，1974）および*Ps. tolaasii*によるシイタケ黒腐細菌病（陶山・藤井，1993；Tsuneda et al., 1995b）と病徴が酷似することから細菌に起因する病害と判断したが、栽培地において病徴から識別することは困難であった。そのため、病原細菌の同定および選択培地の作製を行った。

第1節 原因菌の分離と同定

第1項 細菌の分離

1. 材料および方法

1994年12月から1996年11月にかけて、大分県玖珠郡玖珠町、杵築市大田、豊後大野市大野町および三重町のシイタケほだ場で確認された褐変腐敗子実体から病原菌を分離した。分離用培地は Heart Infusion Agar（以下 HIA, Difco 社製）を用いた。分離菌は、1.5%グルタミン酸ナトリウムを加えた 10%スキムミルクに混和し（西山ら，1991），-40℃で凍結保存した。

2. 結果

大分県の各地で採集したシイタケ子実体から分離した結果、いずれからも HIA 培地に白色、円形の集落を形成する細菌が優先的に分離された。孤立集落から純培養を行い、分離菌を得た（Fig.5）。

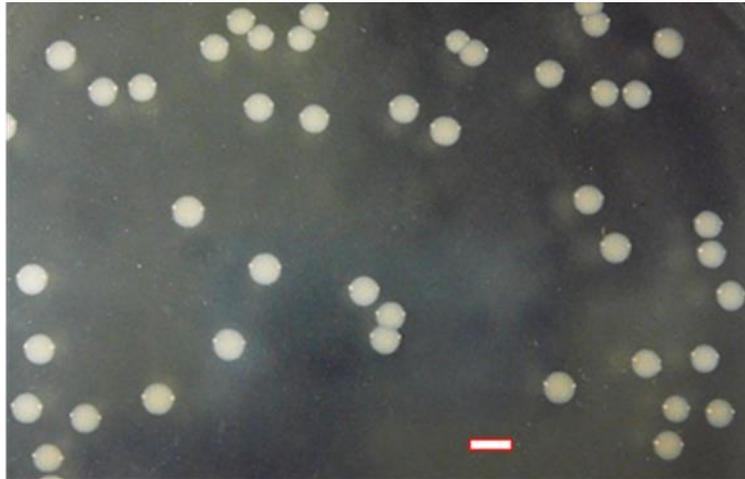


Fig.5 Colony morphology of strain LE1001 on heart infusion agar medium incubated at 28 °C for 48hr. Scale bars: 2.0 mm

第2項 分離菌の病原性

1. 材料および方法

1) 供試菌株

試験には LE1001 菌株（玖珠郡玖珠町分離菌）および LE1024 菌株（杵築市大田分離菌）を用いた。

2) 原木シイタケを用いた接種試験

LE1001 菌株および LE1024 を菌株は、HIA 培地で 28 °C、48 時間培養し、高濃度懸濁液および濁度計（BIOLOG 社製）で約 10^9 cfu/ml に調製した懸濁液を作製した。ほだ木上に発生して間もない健全な 10 個のシイタケ幼子実体（品種：森 290, Fig.6a）に対して、高濃度懸濁液 30 ml を毛筆で塗布または噴霧接種した。接種したほだ木は温度 15-20 °C、湿度 90% 以上の人工気象室で管理し、発病の有無を観察した。噴霧接種した幼子実体は、2 日間ビニール袋で被覆した (Fig.6c)。



Fig.6 Pathogenicity test performed with growing fruit bodies of *Lentinula edodes*. Result of inoculation test with LE1001 at 15-20°C in growing room.

- a-b. Brown rot symptoms appeared on the fruiting bodies of *L. edodes* cultivated with bed logs 7 days after painted inoculation. (a : before inoculation)
- c-b. Browning on the gill of fruiting bodies of *L. edodes* cultivated with bed logs 3 days after sprayed inoculation. Bed logs were covered with vinyl bags for 2 days after inoculation.

また、ほだ木上で生育中のシイタケ幼子実体（品種：森 290）に、約 10^9 cfu/ml 濃度の懸濁液（LE1001）を注入接種し、3日間ビニール袋で被覆した（Fig.7a）。注入接種にはガスタイトシリンジ（ITO MICRO SYRINGE MS-GAN025）を用い、61型鋭角針（外径 0.56 mm）を菌傘の上から下に向けて 5-15 mm 突き刺し、10個（菌傘の直径約 5-15 mm）の幼子実体に対して1個あたり懸濁液 0.1 ml を注入した。接種したほだ木は屋外の人工ほだ場で管理し、幼子実体は接種後2日間のみビニール袋で軽く覆った。外観上健全な子実体は、採取後に切断して菌柄内部の変性程度を観察した。



Fig.7 Pathogenicity test performed with growing fruiting bodies of *Lentinula edodes*. Result of injected inoculation test using gas-tight syringe with 10^9 cfu/ml suspension of LE1001.

- a. Bed logs were covered with vinyl bags for 3 days in artificial fruiting yard.
- b. Browning of internal tissue of the growing fruiting bodies of *L. edodes* cultivated using bed log 9 days after injected inoculation.
- c-d. Brown rot symptoms appeared on the fruiting bodies of *L. edodes* cultivated with bed logs 18 and 28 days after injected inoculation.

3) 菌床シイタケを用いた簡易病原性の検定

LE1001 菌株は HIA で 28 °C, 48-72 時間培養し, 菌体に滅菌水を加えて約 10^9 cfu/ml に調整した懸濁液を作製した。接種には試験場で製造, 培養したシイタケ菌床 (品種: 森 XR1) を用いた (有馬・宮本, 2015, 有馬, 2016)。培養室で 90-120 日間培養した菌床は除袋後, 12-22°C に変温 (6 時間毎のプログラム制御) 設定した生育室に移し, 子実体形成を誘導した。除袋から 4-5 日目の菌床に 1 時間散水を行い, 幼子実体に水分を含ませた。懸濁液の接種には, 菌傘の直径が 5-15 mm に成長したシイタケ幼子

実体を用いた (Fig.8a)。接種は、原木シイタケに対する方法と同様にガスタイトシリンジを用い、61型鋭角針を菌傘の上から下に向けて5-15 mm突き刺し、懸濁液0.1 mlを注入する方法で行った。対照区として、滅菌水を注入する菌床を設定した。接種区および対照区の菌床は、全体をビニール袋で被覆し、温度22℃、湿度80%に設定した培養室の棚に並べた (Fig.8b)。



Fig.8 Pathogenicity test performed with growing fruiting bodies of *Lentinula edodes* on sawdust medium. Result of injected inoculation test using gas-tight syringe with 10^9 cfu/ml suspension of LE1001.

- a-b. Sawdust mediums were covered with vinyl bags for 2 days at 22 °C in growing room.
- c-d. Brown rot symptoms appeared on the fruiting bodies of *L. edodes* cultivated using sawdust 5 and 15 days after injected inoculation at 12-22 °C in growing room.

接種3日目にビニール袋を取り除き, 温度を 12-22°C に設定した生育室で管理した。発病の判定は接種5日目に行った。接種5-6日目に成熟子実体は接種部に沿って切断し, 菌柄内部を調査した。菌柄内部は, 褐変しなかったもの“－”, 褐変したものを程度によって“+”, “++” および“+++”と評価した。褐変から黒変した幼子実体は, さらに2日以上継続観察した。接種試験は2回実施し, 2回目の接種には対照菌株として, 神奈川県産ヒラタケから分離した *Ps.tollasii* (東京農業大学保存菌株, 814) を用いた。接種試験は1菌株あたり2菌床を用いて2-3回反復した。

2. 結果

1) 原木シイタケを用いた接種試験

LE1001 菌株 の高濃度懸濁液を, ほだ木上のシイタケ幼子実体に塗抹接種した結果, 接種4日目に菌傘および菌柄の一部が変色するのを確認した。5日目には菌褶は褐変から黒変し, 7日目には子実体全体が異臭を放って腐敗した (**Fig.6b**)。しかし, LE1001 および LE1024 菌株の高濃度懸濁液を噴霧接種した結果, 菌褶の一部が激しく褐変する症状 (**Fig.6d**) を確認したが, シイタケ子実体の成長停止や腐敗は認められなかった。一方, 約 10^9 cfu/ml 濃度に調製した LE1001 菌株の懸濁液をシイタケ幼子実体に注入接種した結果, 9日目に子実体全体が褐変し, 17日目に異臭を放って腐敗した (**Fig.7c,d**)。しかし, 褐変腐敗した幼子実体の発生割合は10%程度であった。接種時の菌傘の直径が大きいと褐変や成長停止は起こらなかったが, 接種9日目に採取した子実体を切断したところ, 菌柄内部は激しく褐変していた (**Fig.7b**)。

2) 菌床シイタケを用いた簡易病原性の検定

LE1001 菌株を菌床上のシイタケ幼子実体に注入接種した結果, 接種5日目の子実体は褐変から黒変した幼子実体と外観上健全な成熟子実体に分かれた。褐変から黒変した幼子実体は2-3日間観察を継続したが, 変色の程度は強くなり, 開傘しなかった

ことから成長は停止したと判断された (**Fig.8c**)。さらに、接種 15 日目の幼子実体の一部は異臭を放って腐敗した (**Fig.8d**)。幼子実体の成長停止は 74.6%の割合で認められた (**Table 3**)。滅菌水接種区において、成長停止は 4.9-11.1%認められたが、異臭を放つことはなかった。また、滅菌水接種区の成熟子実体は外観上健全で、菌柄内部の変色もほとんど認められなかった。菌傘の直径が比較的大きい幼子実体に分離菌を接種すると、外観上健全な成熟子実体に成長する割合が高かった。しかし、接種 5 日目の成熟子実体を接種部に沿って切断し、菌柄内部の変色状況を調査した結果、菌柄内部の接種部周辺組織が褐変から黒変していた。

Table 3. Results of first inoculation test performed using *Lentinula edodes* on sawdust medium.

	Strain	Number of Samples ²⁾	Number of young fruiting bodies ³⁾	Number of old fruiting bodies ⁴⁾			
				+++	++	+	-
First trial	LE1001	67	50 (74.6%)	7	2	2	6
	Control (water)	54	6 (11.1%)	0	0	0	48
Second trial	LE1001	41	21 (51.2%)	2	6	10	2
	814 ¹⁾	43	18 (41.9%)	0	1	12	12
	Control (water)	41	2 (4.9%)	0	0	5	34

1) *Pseudomonas tolaasii* isolated from *Pleurotus osteratus*.

2) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* injected with 0.1 mL bacterial culture or sterilized water.

3) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms. The numbers in parentheses indicate frequency of occurrences of brown rot symptoms. (Rate (%) = (Number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms / number of inoculated young fruiting bodies) × 100)

4) The number of old fruiting bodies of *L. edodes*. Degree of browning at inner stipes in old fruiting bodies of *L. edodes*. +++: severe, ++: medium, +: slight, -: no browning

一方、*Ps.tollasii* (814) を接種したシイタケ幼子実体にも成長停止および菌柄内部の変性が認められた (**Table 3**)。しかし、*Ps.tollasii* (814) を接種した幼子実体と LE1001 菌株を接種した幼子実体とは、外観上識別できなかった。

第3項 分離菌の同定

1. 材料および方法

1) 供試菌株

1994年12月から1996年11月にかけて、大分県玖珠郡玖珠町、杵築市大田、豊後大野市大野町および三重町のシイタケほだ場で確認された褐変腐敗子実体から分離した20菌株を用いた。対照菌株は、農林水産大臣の許可を受け、1996年12月に American Type Culture Collection (アメリカ合衆国) より輸入した *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ATCC15713), *Er. chrysanthemi* (ATCC11663) および *Er. cypripedii* (ATCC29267) を供試した。供試菌株の保存は、第1項と同様な方法で行った。

2) 細菌学的性質の調査

供試菌の細菌学的性質は、Manual of microbiological methods (Conn et al., 1957) に準拠して調査した。

3) 16S rRNA 遺伝子の解析

試験には、LE1001 菌株 (玖珠郡玖珠町分離菌) および LE1024 菌株 (杵築市大田分離菌) を用いた。細菌の 16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅するユニバーサルプライマー (63f および 1387r, Marchesi et al, 1998) を用いて、PCR 法により分離菌の増幅産物を得た。これらの増幅産物を BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies 社製) を用いて PCR 法によりシーケンス反応後、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Life technologies 社製) を用いてダイレクトシーケンスにより約 650bp の塩基配列を決定した。これらの塩基配列をインターネット上の DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) の DNA データベースを利用して相同性を検索した。

2. 結果

分離菌 20 菌株の性質は整一で桿状，通性嫌気性，グラム陰性，グルコースを発酵的に分解，蛍光色素を産生せず，運動性を有したが，芽胞は形成しなかった。これらの性質から分離菌は腸内細菌科の種と判断し，植物病原細菌の *Erwinia* 属菌を対照菌株として細菌学的性質を調査した (Table 4)。

分離菌はカタラーゼ活性，硝酸塩の還元，硫化水素の産生，36-37°C 下での生育，5 % 食塩耐性は陽性であった。インドール産生，レシチナーゼ活性，オキシダーゼ活性，ペクチナーゼ活性，ジャガイモ腐敗能，ウレアーゼ活性は陰性であった。リボース，ガラクトース，グルコース，フルクトース，D-マンノース，D-ラクトース，マルトース，トレハロース，セロビオース，グリセロール，D-マニトール，サリシンを利用し，酸を産生した。イヌリンおよびマロン酸は利用しなかった。

供試菌 2 菌株 (LE1001 菌株および LE1024 菌株) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は，DDBJ の DNA データベースに登録されている複数の *Ewingella americana* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (ACCESSION No. JN175329 他) と 99% 以上の相同性を示した。

Table 4. Bacteriological characteristics of the present strains and comparison with strains of plant pathogenic, *Erwinia* sp.

Test	Strains			
	Present strains (n=20)	<i>E. chrysasemi</i> (ATCC11663)	<i>E. carotovola</i> subsp. <i>carotovola</i> (ATCC15713)	<i>E. cypripedii</i> (ATCC29267)
Gram stain	- 1)	-	-	-
O-F test	F 2)	F	F	F
Catalase reaction	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+
Indole production	-	-	-	-
H ₂ S production	+	+	+	+
Acetoin production	d	+	+	-
Methyl red	d	-	+	+
Growth at 36°C	+	+	+	+
Lecithinase	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-
Erythromycin tolerance	+	+	-	+
Gelatin liquefaction	(d)	-	+	-
Pectate degradation	-	+	+	-
Potato rot	-	+	+	-
Phosphatase	d	+	-	+
5%NaCl tolerance	+	-	+	+
Reduced substances from sucrose	-	-	-	-
Urea hydrolysis	-	-	-	-
Carbohydrate utilization				
L-Arabinose	d	+	+	+
D-Xylose	d	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
L-Rhamnose	d	(+)	+	+
Sucrose	d	+	+	+
D-Lactose	+	(+)	+	(+)
Maltose	+	-	-	+
Trehalose	+	-	(+)	+
Melibiose	d	+	+	(+)
Palatinose	d	-	-	-
Raffinose	d	+	+	-
Melezitose	d	(+)	(+)	-
Glycerol	+	(+)	(+)	+
Arabitol	d	-	-	(+)
Adonitol	d	(+)	(+)	+
<i>myo</i> -Inositol	d	+	+	+
Dulcitol	d	-	-	-
D-Sorbitol	d	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+
Inulin	-	+	-	-
α -Methyl-D-glucoside	d	-	-	-
Organic compound utilization				
Malonate	-	-	-	-
Galacturonate	d	+	+	+

1) + : positive reaction, - : negative reaction, (d) : delayed utilization, d : 11-89% of strains positive

2) F : Fermentative

第4項 選択培地の作製

1. 材料および方法

1) 供試菌株

供試菌の *Ew. americana* は、シイタケ腐敗病発病子実体より分離した菌株 (LE1001, LE1024), クロアワビタケ (*Pleurotus abalonus*) 菌柄の黄褐変部より分離した菌株 (PA1011), 褐変腐敗したヤナギマツタケ (*Agrocybe cylindracea*) より分離した菌株 (AC1017) を用いた。また、対照として *Er. chrysanthemi* (ATCC11663), *Er. carotovora* subsp. *carotovora* (ATCC15713), *Er. cypripedii* (ATCC29267), *Ps. tolaasii* (814) および *Pseudomonas* sp. (818) を用いた。

2) 炭素源, 窒素源および添加剤の検討

供試菌の炭素源の利用は, Dye の C 培地 (後藤・瀧川, 1984) [リン酸水素二アンモニウム:0.5 g, リン酸水素二カリウム:0.5 g, 硫酸マグネシウム七水和物:0.2 g, 塩化ナトリウム:0.5 g, 酵母エキス:1 g, ブロムクレゾール紫 (1.5%エタノール溶液):0.7 ml, 蒸留水:1,000 ml, pH 6.8] を基礎培地とし, D(+)アラビトール (Sigma 社製), トレハロース, マンニトールおよびグリセロール (ともに和光純薬工業株式会社製) をそれぞれ 10 g/l 添加した培地を用いて調査した。供試菌を各培地に接種後 28°C で 2 週間培養し, 酸の生成による培地の黄変の有無で炭素源の利用を判定した (後藤・瀧川, 1984)。窒素源の検討のための基礎培地は, D3 培地 (Kado and Heskett, 1970) [蒸留水:1,000 ml, スクロース:10 g, アラビノース:10 g, カゼイン加水物:5 g, 塩化リチウム:7 g, グリシン:3 g, 塩化ナトリウム:5 g, 硫酸マグネシウム七水和物:0.3 g, ドデシル硫酸ナトリウム:50 mg, ブロモチモールブルー:60 mg, フクシン酸:100 mg, 寒天:15 g, pH 8.2] のカゼイン加水物, グリシンおよびフクシン酸を除き, スクロースおよびアラビノースに換えて D(+)アラビトールを 10 g/l 添加した。基礎培地に対して, カザミノ酸, カザミノ酸ビタミンフリーおよびポリペプトン (ともに Difco 社製)

をそれぞれ 5 g/l 添加した窒素源検定用平板培地を作製した。さらに、炭素源として D(+)-アラビトール 10 g/l、窒素源としてカザミノ酸ビタミンフリー 5 g/l を添加した培地に、塩化リチウム 7 g/l、グリシン 3 g/l およびドデシル硫酸ナトリウム 50 mg/l を単独または同時に添加し、添加剤検定用平板培地を作製した。窒素源および添加剤検定用培地の pH は、オートクレーブ殺菌前に 7.2 に調整した。供試菌は検定用培地に画線接種し、28°C で培養して集落形状および色調の変化を観察した。

3) 集落の特徴と平板効率

供試菌 *Ew. americana* 4 菌株を HIA 培地で 28°C、48 時間培養し、菌体に滅菌水を加えて希釈液を調整した。それらを選択培地（平板培地）に塗抹移植し、28°C で 7 日間培養した。培養 3 日目に集落形成の有無および集落数を測定した。また、選択培地の平板効率は HIA を対照培地とし、キング B 培地（以下 King's B, 栄研化学株式会社製）、ジャガイモ半合成寒天培地（西山, 1978, 以下 PSA）、ポテト・ペプトン・グルコース寒天培地（西山, 1978, 以下 PPGA）および変法ドリガルスキー培地（津山, 1962）と比較した。

4) 選択培地によるシイタケ子実体からの分離

1996 年 11 月に大分県豊後高田市香々地および杵築市大田, 1997 年 1 月に熊本県菊池市旭志, 1997 年 4 月に大分県豊後大野市三重町のほだ場で、褐変腐敗した子実体を合計 12 個採取した。採取した子実体サンプルを冷蔵庫で保存し、1 週間以内に分離試験に用いた。サンプルを滅菌水で磨砕し、試料原液とした。原液の希釈液 0.1 ml を作製した選択培地（平板培地）に塗抹または画線移植し、28°C で培養中に生育した集落を観察した。培養 3 日目に選択培地上に生育した集落の中で、*Ew. americana* (LE1001, LE1024, PA1011 および AC1017) と同様の特徴を示す孤立集落から細菌を分離し、抗血清反応およびシイタケ変性能を調査した。

5) 選択培地で分離した細菌の抗血清反応と病原性

供試菌 *Ew. americana* (LE1001, LE1024, PA1011 および AC1017) の抗血清を作製し、試験管内凝集反応で各々の抗血清の凝集素価を求め、分離菌との寒天ゲル沈降反応を調査した (佐藤ら, 1983)。シイタケに対する病原性は、新鮮なシイタケ子実体を用いて調査した。子実体から切片を採取し、滅菌水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレ内の清浄なスライドガラス上に静置した。この切片に分離菌の懸濁液 (約 10^9 cfu/ml) 0.1 ml を滴下接種した。接種後はシャーレを 25°C のインキュベーターに置き、24-48 時間後に切片組織の変性程度を調査した (有馬ら, 2010)。

2. 結果

1) 選択培地に添加する炭素源、窒素源および添加剤の検討

炭素源は Dye の C 培地を基礎培地とし、きのこ子実体に広く含まれる炭水化物の利用について調査した。供試菌を接種した培地の色調および増殖を観察し、酸の生成による培地の黄変が確認された菌株は、添加した炭素源を利用したと判定した。その結果、マンニトールおよびグリセロールは、すべての供試菌が利用した。トレハロースは *Er. chrysanthemi* (ATCC11663) 以外が利用した。D(+)アラビトールは *Ew. americana* 4 菌株, *Ps. tolaasii* (814) および *Pseudomonas* sp. (818) が利用したが、その他の対照菌は *Er. cypripedii* (ATCC29267) が遅れて利用する以外は利用しなかった (Table 5)。以上のことから、*Ew. americana* の選択培地の炭素源は D(+)アラビトールが適当と判断した。

Table 5. Bacterial acid production from select carbohydrates in the C medium of Dye¹⁾.

Speices	Strain	D-Mannitol	Glycerol	Trehalose	D(+)-Arabitol
<i>Erwingella americana</i>	LE1001	+ ²⁾	+	+	+
	LE1024	+	+	+	+
	PA1011	+	+	+	+
	AC1017	+	+	+	+
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ATCC11663	+	(+)	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	ATCC15713	+	(+)	+	-
<i>Erwinia cypripedii</i>	ATCC29267	+	+	+	(+)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	814	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp.	818	+	+	+	+

1) Goto and Takigawa(1984)

2) + : Production ; (+) : Delayed production ; - : No production

D(+)-アラビトールを 10 g/l 添加した窒素源検定の D3 培地に、カザミノ酸、カザミノ酸ビタミンフリーおよびポリペプトンを各々単独で 5 g/l 添加した培地を作製し、培地上に生育する集落形状を観察した。その結果、*Ew. americana* はすべての培地で培養 2 日目以降に黄色集落を形成した。カザミノ酸を添加した培地上の集落の中には、培養 3 日目以降青緑色に変化する集落が観察された。ポリペプトンを添加した培地上の黄色集落は、培養日数の経過とともに淡黄色に変化する集落が見られた。一方、カザミノ酸ビタミンフリーを添加した培地の集落は、培養 3 日目以降の色調変化は小さく、培養 5 日目も安定した黄色集落を形成した。

D3 培地に塩化リチウム 7 g/l, グリシン 3 g/l およびドデシル硫酸ナトリウム 50 mg/l を単独または同時に添加した検定培地を用いて、集落形成に及ぼす添加剤の影響を検討した。その結果、添加剤の中でグリシンを添加した培地上の *Ew. americana* の集落数は、大きく減少することがわかった。塩化リチウムとドデシル硫酸ナトリウムを混合添加した培地上の *Ew. americana* は安定的に黄色集落を形成し、単独添加した培地と比較して色調の変化は小さかった。また、*Ps. tolaasii* および *Pseudomonas* sp. は、

本培地上で緑色集落を形成した。

以上の結果より，D3 培地の炭素源を D(+)アラビトール，窒素源をカザミノ酸ビタミンフリーに変更し，グリシンおよびフクシン酸を除いた培地 [蒸留水:1,000 ml, D(+)アラビトール:10 g, カザミノ酸ビタミンフリー:5 g, 塩化リチウム:7 g, 塩化ナトリウム:5 g, 硫酸マグネシウム七水和物:0.3 g, ドデシル硫酸ナトリウム:50 mg, 0.2%ブロモチモールブルー:15 ml, 寒天:15 g, pH 7.2 (Table 6)] は，*Ew. americana* の分離用選択培地（以下 A-D3 培地）として有効であることが考えられた。

Table 6. Composition of A-D3 medium.

Distilled water	1,000 ml
D(+)-arabitol	10 g
Casamino acid (vitamin free)	5 g
Lithium chloride	7 g
Sodium chloride	5 g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.3 g
Sodium dodecyl sulfate	50 mg
0.2% bromothymol blue	15 ml
Agar	15 g
pH ¹⁾	7.2

1) The pH of the medium was adjusted with HCl to 7.2 before autoclaving.

2) 選択培地における *Ew. americana* の集落形成の特徴と平板効率

供試菌 *Ew. americana* (LE1001) を A-D3 培地に移植し，28℃で培養すると，培養3日目の平板培地上の集落は直径 0.8-1.2 mm，円形，全縁，丘状，表面平滑で中心部が淡黄色から黄色，周囲が乳白色になった (Fig.9)。4日目以降周囲の乳白色は徐々に明瞭でなくなり，集落全体が黄緑色から緑色に変化した。対照菌の中では *Er.*

chrysanthemi (ATCC11663), *Er. carotovora* subsp. *carotovora* (ATCC15713) および *Er. cypripedii* (ATCC29267) は本培地上で生育しなかった。また, *Ps. tolaasii* (814) および *Pseudomonas* sp. (818) は淡緑色の集落を形成し, *Ew. americana* (LE1001) との識別は容易であった。*Ew. americana* 4 菌株を A-D3 培地および HIA, King'sB, PSA, PPGA, 変法ドリガルスキーの各培地で培養し, 3 日目に集落数を測定したところ, A-D3 培地の平板効率は 60-76%であった (Table 7)。

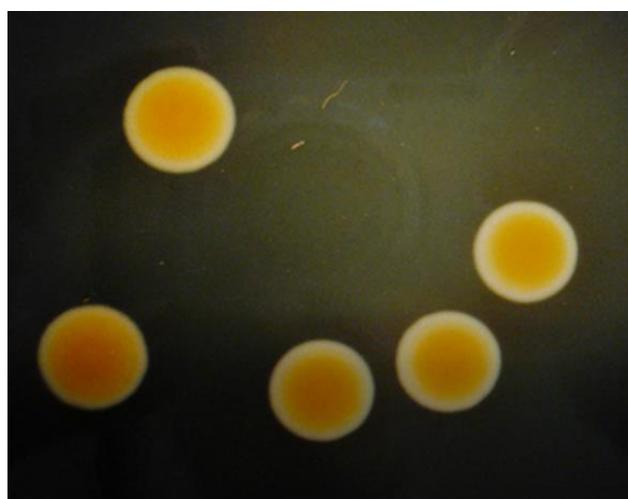


Fig.9 Yellow colonies (0.8 – 1.2 mm in diameter) of *Ewingella americana* strain LE1001 with white margins, grown on A-D3 medium 72 h. Scale bars: 1.0 mm

Table 7. Plating efficiency of *Ewingella americana* on various media.

Strain	Efficiency (%) ¹⁾					
	HIA ²⁾	King'B ²⁾	PSA ²⁾	PPGA ²⁾	Modified Drigalski ³⁾	A-D3
LE1001	100	100	107	100	110	66
LE1024	100	94	111	79	90	76
PA1011	100	80	101	100	87	60
AC1017	100	112	120	120	117	62
Average	100	97	110	100	101	66

1) Efficiency (%) : (Number of colonies on each medium tested)/(Number of colonies on HIA medium) × 100

2) Nishiyama(1978). HIA : heart infusion agar, PSA : potato sucrose agar, PPGA : potato peptone glucose agar.

3) Tuyama(1962).

3) 選択培地を用いたシイタケ子実体からの分離

1996年11月に大分県豊後高田市香々地で4サンプルおよび杵築市大田で1サンプル, 1997年1月に熊本県菊池市旭志で5サンプル, 1997年4月に大分県豊後大野市三重町で2サンプル, 合計12サンプルの褐変腐敗したシイタケ子実体を採取し, A-D3培地を用いた分離試験に供試した。褐変腐敗した子実体の磨砕液をA-D3培地に塗抹または画線移植したところ, すべてのサンプルから培養2日目以降に黄色集落が認められた。培養3日目に選択培地上で生育した黄色集落を調査した結果, 選択培地で生育した黄色集落は3つの型に大別された。A型は集落の直径が0.8-1.0 mm, 周囲は乳白色を呈する *Ew. americana* (LE1001) と同一の特徴を有する集落で, 接種2日後に出現した。B型は集落の直径が2.0-3.0 mm, 周囲の乳白色部分も大きい集落で, 接種1日後に出現した。C型は集落の直径が0.5-1.0 mm, 周囲の乳白色がない集落で, 接種2日後に出現した (Fig.10)。接種3日後には, 同一シャーレにはA型集落, B型およびC型の黄色集落が混在することもあったが, 識別は容易であった。しかし, 4日目以降では集落の色調が徐々に変化する場合が多く, 識別は困難になった。

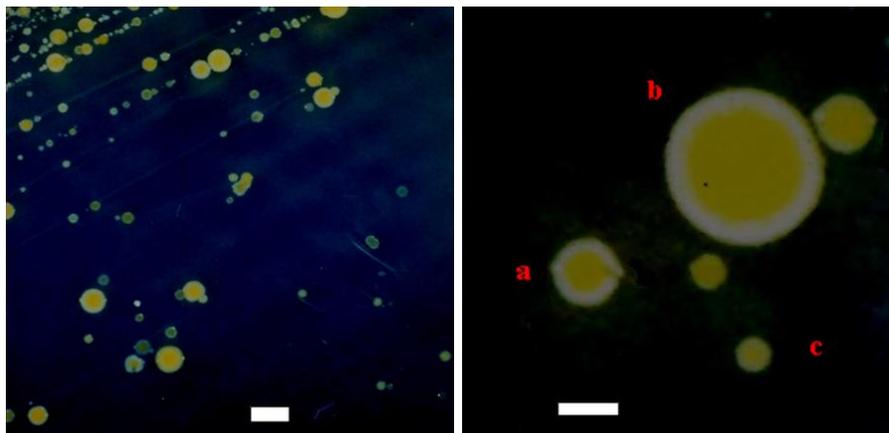


Fig.10 Colonies formed after incubation for 72 h on A-D3 medium plated with a homogenate of the fruiting bodies of *Lentinul edodes* that exhibited brown rot symptoms.(Left)
Scale bars: 1.0 mm

- a: Yellow colonies (0.8-1.2 mm in diameter) with whit marginal area similar to the colony morphology of *Ewingella americana*.(Right)
- b: Large yellow colonies (2.0-3.0 mm in diameter) with white marginal area. (Right)
- c: Small yellow colonies (0.5-1.0 mm in diameter) without marginal area. (Right)

4) 選択培地で分離した細菌の抗血清反応と病原性

供試菌 *Ew. americana* 4 菌株の加熱菌体を抗原として作製した血清の凝集素価は、1,280-2,560 倍であった。そこで、A 型集落の分離菌 58 菌株と *Ew. americana* 4 菌株の沈降反応を調査した結果、58 菌株中 54 菌株はいずれかの血清と沈降帯を形成した (Table 8)。また、分離菌のシイタケ切片に対する病原性を調査した結果、抗血清反応が陽性を示した 54 菌株は、48 時間以内に弱い陥没を伴って、黄色から茶褐色に変性させたが、その程度は菌株間で異なった。

Table 8. Reaction of *Ewingella americana* isolated on A-D3 medium to antisera.

Place of sampling	Number of samples ¹⁾	Number of isolates		Rate(%) ⁴⁾
		Selected ²⁾	Reaction to antisera ³⁾	
Kakaji, Bungotakada city, Oita	4	16	15	94
Oota, Kituki city, Oita	1	1	1	100
Kyokushi, Kikuchi city, Kumamoto	2	13	12	92
Mie-machi, Bungoono city, Oita	5	28	26	93
Total	12	58	54	93

1) The number of fruit bodies of *Lentinula edodes* exhibiting brown rot symptoms.

2) The number of isolates selected by A-D3 medium from *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms.

3) The number of isolates that reacted to the antisera of *Ewingella americana* strains LE1001, LE1024, PA1011 and AC1017.

4) Rate(%): (Number of isolates that reacted to the antisera)/(Number of selected isolates)×100

第5項 考察

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腐敗した (有馬・陶山, 1997a; 有馬ら, 2010)。しかし、噴霧接種では菌褶の褐変は確認されたが、幼子実体の成長停止や腐敗することはなかった。一方、注入接種では子実体全体が褐変腐敗する現病徴が再現された。接種時の菌傘直径が小さい幼子実体に現病

徴が見られたことから、子実体の生育ステージと感染濃度、気温や水分条件によって接種試験の結果は影響を受けると考えられた。また、ほだ木を用いた接種試験の実施時期は限定され、条件を統一して繰り返し実施することは困難であった。

そこで、分離菌の病原性を効率的かつ迅速に確認する方法として、菌床シイタケを用いた実験系の確立を目的に試験を行った。予備試験を行ったところ、接種直前の幼子実体に水分を多く含ませ、接種後 3 日間は 22℃で管理すると褐変症状や成長停止が認められることがわかった。また、接種に注射器を用いると、菌液が漏れることが多かった。そこで、ネジ込み式で針の交換が可能なガスタイトシリンジを使用することで、シイタケ幼子実体に確実に菌液を注入できた。この方法で、約 10^9 cfu/ml に調整した分離菌 (LE1001) 懸濁液 0.1 ml を、菌床上のシイタケ幼子実体に注入接種した結果、シイタケの成長停止および菌柄内部の褐変症状が高率に認められ、再現性も高かった。以上のことから、菌床シイタケを用いた接種試験は年間を通して実施可能であることから、分離菌の簡易病原性検定方法として有効であると考えられた(有馬ら, 2016)。

分離菌の培養的特徴は、*Pseudomonas* 属菌とは異なり、作物に軟腐症状を起こす *Erwinia* 属菌に類似すると判断されたので、*Er. carotovora* subsp.*carotovora*, *Er. chrysanthemi* および *Er. cypripedii* の Type strain を入手して細菌学的性質を直接比較した。その結果、*Er. carotovora* subsp.*carotovora* および *Er. chrysanthemi* とはペクチナーゼ活性、ジャガイモ塊茎腐敗、マルトースの利用で異なった。*Er. cypripedii* は比較的類似したが、炭素源の利用で大きく異なった(有馬・陶山, 1997a)。以上のことから、分離菌は *Erwinia* 属菌とは異なると判断した。

国内ではシイタケ以外の栽培きのこの病害として、これまでに *Er. carotovora* subsp.*carotovora* によるエノキタケおよびヒラタケ軟腐病 (Okamoto et al., 1999), *Erwinia* sp.によるエノキタケ褐色腐敗病 (土屋ら, 1985) が報告されている。また、近年、腸内細菌科の一種である *Ewingella americana* によるツクリタケ internal stipe

necrosis（以下菌柄内部壊死病）の発生がイギリス（Inglis et al., 1996a,b）、ニュージーランド（Chowdhury et al., 2007）、韓国（Lee et al., 2009）およびエジプト（Madbouly et al., 2014）で報告された。さらに、本細菌はスペインでは健全なツクリタケ、シイタケおよびヒラタケから分離されている（Reyes et al., 2004）。そこで、分離菌とこれらの細菌の細菌学的性質を比較した。

分離菌は Okamoto らの報告した *Er. carotovora* subsp. *carotovora* とはペクチン分解能など主要な性質で大きく異なった。土屋らの *Erwinia* sp. とは L-アラビノースの利用以外で一致したことから、分離菌とは同一種の可能性が高いと考えられた。一方、イギリス、スペインおよびニュージーランドで報告された *Ew. americana* は、分離地および分離源でそれぞれ少しずつ異なる系統を含んでいた。分離菌と臨床由来の Type strain（Brenner et al., 2005）とは硫化水素の産生、メチルレッド反応、マルトース、セロビオースおよび D-ソルビトールの利用で異なった。イギリスのツクリタケ由来菌とは、硫化水素の産生およびメチルレッド反応で異なった。スペインの分離菌とは、硫化水素の産生および D-ソルビトールの利用で異なった以外は、ヒラタケ由来菌と D-ラクトースの利用が異なるのみであった（Table 9）。以上のことから、大分県のシイタケ子実体分離細菌は *Ewingella* 属菌と判断した。さらに、分離菌の 16S rRNA を解析した結果、*Ew. americana* と高い相同性を示した。*Ewingella* 属は、1983 年に腸内細菌科の新属として報告され、*Ew. americana* のみが属する（Grimont et al., 1983）。ツクリタケ菌柄内部壊死病は、収穫後のツクリタケ菌柄内部が褐変し、最終的には陥没を伴って腐敗するもので、比較的新しい病害（Fletcher and Gaze, 2008）として知られるようになったが、国内での発生は未確認である。

Table 9. Bacteriological characteristics of the present strains in comparison with reference strains.

Test	Strains isolated from cultivated mushrooms						Type strain ⁴⁾
	Present strain	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Ewingella americana</i>				<i>Ewingella americana</i>
			LE1001	FV ¹⁾	AB1 ²⁾	AB2 ³⁾	
Gram stain	- ⁵⁾	-	-	-	-	-	-
O-F test	F ⁶⁾	F	F	F	F	F	F
Catalase reaction	+						+
Nitrate reduction	+	+	+				
Indole Production	-		-	-	-	-	-
H ₂ S Production	+	+					
Acetoin production	+			+	+	+	
Methyl red	-		+				+
Growth at 36°C	+	+	+	+	+	d	+
Lecithinase	-	-					
Oxidase	-		-	-	-	-	-
Gelatin liqefaction	(+)	-	-	-	-	-	(-)
Pectate degradation	-	-					
Potato rot	-	-			+	+	-
5%NaCl tolerance	+	+					
Urea hydrolysis	-		-	-	-	-	-
Carbohydrate utilization							
L-Arabinose	-	+	d	-	-	-	-
D-Xylose	-		d				
Ribose	+	+					
Galactose	+	+					+
D-Glucose	+		+	+	+	+	+
Fructose	+		+				
D-Mannose	+		+				+
L-Rhamnose	-		-	-	-	-	-
Sucrose	-		-	-	-	-	-
D-Lactose	+	+	d	+	-		
Maltose	+	+	+				-
Trehalose	+	+	+				+
Cellobiose	+		+				-
Melibiose	-		-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-				-
Melezitose	-		-				
Glycerol	+	+	+				+
Arabitol	+		+				+
Adonitol	-		-				-
<i>myo</i> -Inositol	-		-	-	-	-	-
Dulcitol	-		-				-
D-Sorbitol	+		+	-	-	-	-
D-Mannitol	+		+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-				
Salicin	+		+				+
α -Methyl-D-glucoside	-		-				-
Organic compound utilization							
Malonate	-	-					-

1) Tsuchiya et al. (1985), isolated bacterium from *Flammulina velutipes* (FV)

2) Peter W Inglis and John F. Peberdy (1996), isolated bacterium from *Agaricus bisporus* (AB1)

3) J.E. Reyes et al. (2004), isolated bacterium from *Agaricus bisporus* (AB2), *Lentinula edodes* (LE) and *Pleurotus ostreatus* (PO)

4) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edn (2005)

5) + : positive reaction, - : negative reaction, (+) : delayed utilization, d : 11-89% of strains positive

6) F : Fermentative 7) (-) : test at 22°C

以上のことから、原木シイタケの褐変腐敗症状を引き起こす分離菌は、*Ewingellamericana* Grimont, Farmer, Grimont, Asbury, Brenner and Deval 1984 と同定し、病名を「シイタケ腐敗病（英名：Brown rot）」とすることを提案した（有馬ら，2010）。

ほだ木から発生したシイタケが成長中に褐変腐敗する病害は、*Ew. americana* によるシイタケ腐敗病以外に、*Ps. fluorescens* による褐変腐敗病（小松・後藤，1974）および *Ps. tolaasii* による黒腐細菌病（陶山・藤井，1993；Tsuneda et al., 1995b）が報告されている。しかし、これらの病徴は類似しており、外部病徴から病原細菌を特定することは困難であった。さらに、これら病害の発生状況に関する情報は少なく、防除策はほとんど検討されていない。また、*Ew. americana* と細菌学的性質が酷似するエノキタケ褐色腐敗病菌 *Erwinia* sp.（土屋ら，1985）の発生状況も不明である。

Ps. tolaasii は、国内で菌床栽培によって生産されたヒラタケ（陶山・藤井，1993；白田ら，1995）、エノキタケ（陶山・藤井，1993；矢沢ら，1987；白田ら，1995）およびツクリタケ（陶山・藤井，1993；白田ら，1995）の病原細菌として知られている。陶山（1994）は、ヒラタケ腐敗病の発生が認められた生産地において、菌掻き機の刃、棚および床面の水滴、収穫用の器具から *Ps. tolaasii* を検出し、各種資材上での生存期間を調査した。さらに、陶山ら（2000）は、*Ps. tolaasii* の発生生態を研究する目的で選択培地（T-PAF）を開発した。T-PAF 培地は、発病子実体および栽培環境から *Ps. tolaasii* を効率的に検出することを容易にし、発生生態の解明に利用されてきた（陶山，1995；有馬ら，1995；陶山，1999；角田・陶山，2002）。

シイタケ腐敗病菌 *Ew. americana* の感染経路を解明する目的で、選択培地の開発を行った。基礎培地には、植物病原性細菌 *Erwinia* 属菌の選択培地である D3 培地を用いた。まず、炭素源を検討したところ、栽培きのこに広く含まれる糖アルコールであるアラビトールの選択性が高いことがわかった。したがって、D3 培地の炭素源として添加されているスクロースおよびアラビノースに換えて、D(+)アラビトールを添加した培地で、窒素源および添加剤を検討した。次に、窒素源について調査したところ、

カザミノ酸ビタミンフリーを添加すると、*Ew. americana* の色調変化が小さいことがわかった。添加剤を検討したところ、塩化リチウムとドデシル硫酸ナトリウムを添加した培地での *Ew. americana* の集落は安定し、*Ps. tolaasii* および *Pseudomonas* sp.との識別も容易であった（有馬・陶山，1997b）。選択培地 A-D3 培地での *Ew. americana* の集落形状は、培養3日目で明瞭になり、集落の直径0.8-1.2 mm、円形、全縁、丘状、表面平滑で中心部が淡黄色から黄色、周囲が乳白色になった。4日目以降は集落周囲の乳白色が徐々に明瞭でなくなり、5-7日後には集落全体が黄色になった。さらに培養期間が長くなると黄緑色から緑色に変化した。しかし、本培地の平板効率は60-76%と高率であった。

褐変腐敗したシイタケ子実体の磨砕液を用いて A-D3 培地で細菌を分離したところ、分離2日目以降に他の集落と混在して、黄色集落が出現した。3日目には集落の周囲が乳白色を呈する黄色集落が見られ、同一シャーレの類似黄色集落との識別は比較的容易であった。菌株によっては、2日目で特徴ある集落を形成するものがあったが、3日目で判定すると誤識別は少なくなった。しかし、培養が経過すると集落の特徴が徐々に失われ、識別は困難であった。また、A-D3培地上で *Ew. americana* の特徴を示す菌株は、*Ew. americana* の抗血清を用いて確認したところ、93%の菌株は *Ew. americana* であることがわかった。これらの分離菌株の成長中のシイタケ幼子実体への接種試験は実施していないが、シイタケ切片に対する接種試験からシイタケ子実体を変性させることを確認した。したがって、A-D3培地を用いた分離は、類似する黄色集落に注意して培養3日目に行うことが適当であると考えられた（有馬ら，2012）。

以上のことから、作製した A-D3 培地は、発病した子実体からシイタケ腐敗病菌 *Ew. americana* を選択的に分離可能で、実用的にも使用できると判断した。

第IV章 シイタケ腐敗病菌の栽培きのこからの分離と病原性

採取前の栽培きのこが変色や腐敗する症状は、原木シイタケ以外にも散見される。本項では、異なる栽培きのこから分離した *Ew. americana* の栽培きのこに対する病原性を確認するために試験を行った。

第1節 シイタケ腐敗病菌の各種栽培きのこに対する病原性

第1項 採取後の子実体および培養菌糸に及ぼす影響

1. 材料および方法

シイタケ分離菌株 (LE1001) は、シイタケ、ヒラタケ、エノキタケ、エリンギ、ツクリタケ、クロアワビタケ、ブナシメジ、ヤナギマツタケおよびマイタケ (*Grifola frondosa*) の子実体切片、菌褶および培養菌糸に接種し、病原性を調査した。供試した切片は新鮮な子実体から採取し、滅菌水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレ内の清浄なスライドガラス上に静置した。この切片に LE1001 菌株の懸濁液 (約 10^9 cfu/ml) 0.1 ml を滴下接種した。接種後はシャーレを 25°C のインキュベーターに置き、24-48 時間後に切片組織の変性程度を調査した。子実体の菌褶に対しては、懸濁液 0.1-1.0 ml を滴下接種し、子実体切片と同様な方法で調査した。また、ポテトデキストロース寒天平板培地 (以下 PDA, Difco 社製) で 7-14 日間、25°C で培養した菌糸の先端部にコルクポーターで付傷後懸濁液 0.1 ml を滴下接種し、継続培養して変性の有無を確認した。また、シイタケ種菌に対する分離菌の影響を明らかにするため、購入した種駒 (木片駒, 品種: 森 290) を用いて試験を行った。表面のシイタケ菌糸を除去した種駒 10 個をシャーレに入れ、送風状態のクリーンベンチで 8 時間放置する方法で、含水率約 22% の乾燥種駒を作製した (有馬, 1999)。分離菌の懸濁液 (約 10^9 cfu/ml) 10 ml をシャーレに添加し、25°C のインキュベーターに置き、シイタケ菌糸の生育状況

を観察した。対照区には滅菌水を添加した。子実体切片，菌褶および培養菌糸に対する接種試験には，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保存菌株（以下研究所保存菌株）の子実体および培養菌糸を用いたが，ツクリタケ子実体は店頭で購入して使用した。試験は3回反復した。

2. 結果

分離菌 LE1001 菌株を各種きのこに接種した結果，ヒラタケ，エノキタケおよびエリンギの子実体切片および菌褶，ツクリタケおよびクロアワビタケの子実体切片，ブナシメジの菌褶を変色させた。また，ヒラタケ，エノキタケ，エリンギ，クロアワビタケ，ブナシメジおよびヤナギマツタケの培養菌糸を変色させた。これら菌糸の変性程度はシイタケよりも大きかった。しかし，マイタケは LE1001 菌株を接種しても子実体組織の変性は認められなかった（Table 10）。また，乾燥させた種駒に LE1001 菌株の懸濁液を接種した結果，シイタケ菌糸の生育はやや不均一であったが，接種7日以降の生育状況は滅菌水を添加した対照区と差はなかった。

Table 10. Results of inoculation test performed with pars mushroom

Mushrooms	Slice of fruit body	Gill	Mycelium
<i>Lentinula edodes</i>	+++ ¹⁾	+++	+
<i>Pleurotus ostreatus</i>	++	++	++
<i>Flammulina velutipes</i>	++	+	++
<i>Pleurotus eryngii</i>	++	++	++
<i>Agaricus bisporus</i>	++	nt	nt
<i>Pleurotus abalones</i>	+	nt	++
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	-	++	++
<i>Grifola frondosa</i>	-	-	-
<i>Agrocybe cylindracea</i>	nt ²⁾	nt	++

1) +~+++ : degree of discoloration and mycelium growth inhibition at 48 hours after inoculation by LE1001.

2) nt : not tested

第2項 考察

シイタケ切片および菌褶に *Ew. americana* (LE1001) を接種したところ、切片は弱い陥没を伴って黄褐変し、菌褶を黒褐変させた。また、*Ew. americana* はヒラタケ、エノキタケおよびエリンギの切片と菌褶、ツクリタケおよびクロアワビタケの切片、ブナシメジの菌褶を変色させた。さらに、ヒラタケ、エノキタケ、エリンギ、クロアワビタケ、ブナシメジおよびヤナギマツタケの培養菌糸を変色させ、その変色程度はシイタケと比較し大きい傾向が認められた。また、乾燥したシイタケ木片種菌に LE1001 の懸濁液を接種したところ、シイタケ菌糸は死滅しなかった。したがって、シイタケ腐敗病の発生は、シイタケ種菌の *Ew. americana* による汚染が原因ではないと判断した。

第2節 シイタケ腐敗病菌の栽培きのこからの分離

第1項 病原細菌の分離

1. 材料および方法

大分県内の空調施設で栽培中に褐変腐敗したエノキタケおよびヤナギマツタケ、秋田県内の空調栽培施設において黄変腐敗したヒラタケ (**Fig.11a**)、褐変腐敗したエリンギおよび腐敗したヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*)、沖縄県内の空調施設で栽培中に菌柄の一部が黄変したクロアワビタケを滅菌水で磨砕し、A-D3 培地 (平板培地) に塗抹した。また、大分県内の自然林で採取したミネシメジ (*Tricholoma saponaceum*) およびヌメリスギタケ (*Pholiota adiposa*) から細菌の分離を行った。分離菌は、細菌学的性質の調査および 16S rRNA の遺伝子解析を実施した。試験は第III章第3項と同様に行った。



Fig.11 Symptoms appeared on fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*.

- Symptoms on the natural growing fruiting bodies of *P. ostreatus* in Happou-cho, Yamamoto-gun, Akita.
- Symptoms on the growing fruiting bodies of *P. ostreatus* 11 days after inoculation with *Ewingella americana* (PO1003). The inoculated bottles were kept at 15 °C.
- Brown spots (arrows) on the pileus of growing fruiting bodies of *P. ostreatus* in 7 days after inoculation with *Pseudomonas tolaasii* (814). The inoculated bottles were kept at 15 °C.
- Yellow-brown rotting symptoms on fruiting bodies of *P. ostreatus* in 7 days after inoculation with *Ew. americana* (LE1001). The culture bottles were kept at 20°C for 3 days after spray inoculation.

2. 結果

A-D3 培地上に生育した集落の中から，*Ew. americana* (LE1001) と同じ集落性状を示した孤立集落から細菌を釣菌し，エノキタケ分離菌 (FV1309)，ヤナギマツタケ分離菌 (AC1017)，ヒラタケ分離菌 (PO1003)，エリンギ分離菌 (PE1002)，ヤマブシタケ分離菌 (HE1001) およびクロアワビタケ分離菌 (PA1011) を得た。分離菌 6 菌株の細菌学的性質は整一で，16S rRNA 遺伝子の塩基配列は，DDBJ の DNA データベースに

登録されている複数の *Ew. americana* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と 99%以上の相同性を示した。また、野生きのこから分離した 2 菌株 (28-20, 28-21) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、DDBJ の DNA データベースに登録されている複数の *Ew. americana* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と 99%以上の相同性を示した。

第 2 項 シイタケに対する病原性

1. 材料および方法

1) 供試菌株

エノキタケ分離菌 (FV1309), ヤナギマツタケ分離菌 (AC1017), ヒラタケ分離菌 (PO1003), エリンギ分離菌 (PE1002), ヤマブシタケ分離菌 (HE1001) およびクロアワビタケ分離菌 (PA1011), 野生きのこから分離したミネシメジ分離菌 (28-20) およびヌメリスギタケ分離菌 (28-21) を用いた。対照菌株として, シイタケ分離菌株 (LE1001) を用いた。

2) 菌床シイタケを用いた簡易病原性の検定

接種試験は, 第 III 章第 1 節第 2 項と同様な方法で行った。

2. 結果

分離菌 8 菌株は菌床上で生育中のシイタケ幼子実体を褐変から黒変させ, 一部の子実体は成長停止し, 異臭を放って腐敗した (**Table 11**)。病原性は菌株によって大きな違いはなかった。

Table 11. Results of inoculation test performed using *Lentinula edodes* on sawdust medium.

Strain	Number of samples ¹⁾	Number of young fruiting bodies ²⁾	Number of old fruiting bodies ³⁾			
			+++ ⁴⁾	++	+	-
<i>Ewingella americana</i> LE1001	41	21 (51.2%)	2	6	10	2
PO1003	43	29 (67.4%)	3	4	6	1
PE1002	43	26 (60.3%)	5	7	3	2
HE1001	49	31 (63.3%)	5	8	4	1
FV1309	45	19 (42.2%)	6	9	10	1
28-20	20	15 (75.0%)	0	3	2	0
28-21	20	13 (65.0%)	0	1	4	2
Control (water)	41	2 (4.9%)	0	0	5	34
Control (uninjected)	36	0 (0.0%)	nt ⁵⁾	nt	nt	nt

1) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* injected with 0.1 mL bacterial culture or sterilized water.

2) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms. The numbers in parentheses indicate frequency of occurrences of brown rot symptoms. (Rate (%) = (Number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms / number of inoculated young fruiting bodies) × 100)

3) The number of old fruiting bodies of *L. edodes*.

4) Degree of browning at inner stipes in old fruiting bodies of *L. edodes*. +++: severe, ++: medium, +: slight, -: no browning

5) nt: not tested

第3項 ヒラタケに対する病原性

1. 材料および方法

1) 供試菌株

試験には、エノキタケ分離菌株 (FV1309)、ヒラタケ分離菌株 (PO1003)、エリンギ分離菌株 (PE1002)、およびヤマブシタケ分離菌株 (HE1001) を用いた。対照菌株として、褐変腐敗したシイタケ子実体から分離した *Ew. americana* (LE1001) およびヒラタケ子実体から分離した *Ps. tolaasii* (814) を用いた。

2) ヒラタケのビン栽培

培地は6ヶ月以上野外で加水堆積したスギおが粉(4-16メッシュ)、米ぬか、ふすま、きのこの素(太田油脂株式会社製)を容積比で12:2:1.5:0.5の割合に混合し、含水率を65%に調整した。800ccのポリプロピレン製の栽培ビンに500gの培地に充填し、120℃、30分間高圧殺菌した。一昼夜放置した培地に予め培養したヒラタケ種菌(OMC4019)を接種した。培養は温度 22 ± 1 ℃、相対湿度75-80%に設定した培養室で24-27日間行った。栽培ビンは平掻き法で菌掻きを行った後、培地上面まで滅菌水を入れて4時間放置した。栽培ビンは一旦逆さまにして排水し、温度 15 ± 1 ℃、相対湿度95%以上に設定した生育室に移動した。栽培ビンは16個入りのコンテナに入れ、18度の勾配をつけた栽培棚に並べ、培養の際に使用した専用キャップ(S-800)をビン口に軽く被せて子実体形成を誘導した。子実体の採取は、菌傘の直径が15-20mmを目安に行った。

3) ヒラタケの芽出し工程における接種試験

接種試験には、*Ew. americana* 5菌株および*Ps. tolaasii* 1菌株を用いた。接種菌はHIAで28℃、48-72時間培養し、菌体に滅菌水を加えて約 10^9 cfu/mlに調整した懸濁液を作製した。細菌懸濁液の接種は、菌掻き日および4日目の栽培ビンに対して、1ビンあたり1mlを噴霧する方法で行った。菌掻き日の接種は、菌掻き後の栽培ビンを生育室に搬入して行った。接種した栽培ビン口はキャップを軽く被せ、キャップは接種6日目に除去した。菌掻き4日目の接種はキャップを除去して行い、接種後の栽培ビンの上部は再びキャップを軽く被せた。栽培ビンに被せたキャップは、菌掻き6日目に除去した。菌掻きから子実体採取までは、栽培ビンは温度 15 ± 1 ℃、相対湿度95%に設定した生育室で管理したが、菌掻き4日目に接種した栽培ビンの一部は、接種後3日間のみ温度 20 ± 1 ℃、相対湿度95%で管理する試験区を設定した。1試験区あたりの接種ビン数は7-16本とし、対照区の栽培ビンには滅菌水を接種した。発病

調査は菌掻き 11 日目以降の子実体採取時に行った。発病の程度は栽培ビン毎に調査し、菌傘の一部が黄色から褐色に変色した子実体の発生は“+”，変色の程度の強い子実体の発生は“++”，腐敗子実体の発生は“+++”と判定した。発病調査後、変色または腐敗した子実体の一部は滅菌水で磨砕し、A-D3 培地および *Ps. tolaasii* の選択培地 T-PAF 培地（陶山ら，2000）[蒸留水：1000 ml，Pseudomonas Agar F（Difco 社製）：38 g，グリセリン：10 g，酒石酸塩：2 g，0.1%クリスタルバイオレット：5 ml，0.2%プロモチモールブルー：15 ml] に画線し、培地上に生育した集落の色調を観察した。

2. 結果

菌掻き後に注水および排水を行った栽培ビンに *Ew. americana* の懸濁液を噴霧接種した結果、ビン口の下部に淡黄褐色の水滴が認められ、ヒラタケの原基形成は遅れる傾向が認められた。子実体の採取は、対照区はすべて菌掻き 11 日後に行ったが、細菌接種区は 1-4 日遅れた。採取した子実体を調査した結果、*Ew. americana* の懸濁液を接種した栽培ビンからは、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た（**Fig.11b**）。黄褐色の菌傘は一部の子実体に発生し、栽培ビンの中央部や周縁部で生育した菌傘の直径が小さい子実体に多く認められた。本症状は 5 菌株の *Ew. americana* を接種した栽培ビンで確認され、発生率は 57.1-87.5%であった（**Table 12**）。生育が遅延したために対照区と比較して採取が 1-3 日遅れた栽培ビンからは、変色の程度が激しい子実体が発生する傾向が見られたが、異臭を放って腐敗する子実体は少なかった。変色した子実体の一部を A-D3 培地および T-PAF 培地に画線したところ、A-D3 培地上で中心部が淡黄色から黄色、周囲が乳白色の集落は生育したが、T-PAF 培地上に青緑色を呈する集落は認められなかった。

Table 12. Results of inoculation test performed with culture bottle of *Pleurotus ostreatus* after removal of surface mycelia (called the Kinkaki treatment) in the sawdust medium.

Strain	Number of total bottle ¹⁾	Degree of severity ²⁾			Incidence rate (%) ³⁾	
		+++	++	+		
<i>Ewingella americana</i>	LE1001	16	0	9	2	68.8
	PO1003	16	1	8	2	68.8
	PE1002	16	0	11	3	87.5
	HE1001	8	1	3	2	75.0
	FV1309	7	2	1	1	57.1
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	814	16	2	14	0	100.0
Control (water)	16	0	0	0	0.0	

1) The number of bottle of *P. ostreatus* sprayed with 1 mL bacterial culture or sterilized water.

2) Degree of yellow-brown rotting symptoms on pileus of *P. ostreatus*. +++:severe with rot, ++:medium, +:slight

3) Parentheses indicate frequency of occurrences of brown rot symptoms. (Rate (%) = (Number of bottle of *P. ostreatus* exhibiting yellow-brown rot symptoms / number of sprayed bottles) × 100)

一方、*Ps. tolaasii* を接種した栽培ビンには黄褐色の水滴が生じ、その色調は *Ew. americana* を接種した栽培ビンに見られた水滴と比較して濃い傾向が認められた。また、生育中のヒラタケの菌傘には褐色の斑点が生じ、日数の経過とともに融合して菌傘全体が黄褐変する子実体に成長した。子実体採取時はすべての接種ビンから黄褐色に変色した子実体が発生し、菌傘上に褐色の斑点が認められた (Fig.11c)。採取した対照区のヒラタケ子実体は健全であったが、*Ps. tolaasii* を接種したすべての栽培ビンで菌傘の変色が認められ、*Ew. americana* を接種した試験区の発病率と比較して高かった (Table 12)。変色した子実体の一部を T-PAF 培地および A-D3 培地に画線したところ、T-PAF 培地上に青緑色を呈する集落の生育は認められたが、A-D3 培地上に黄色集落は生育しなかった。

菌掻き 4 日目に *Ew. americana* の懸濁液を噴霧接種した栽培ビンには、菌掻き直後に注水および排水を行った栽培ビンに *Ew. americana* の懸濁液を噴霧接種し 15 °C で管理した結果と同様にヒラタケの生育遅延が認められた。しかし、発病率は 37.5%

で、変色の程度は菌掻き日に接種した栽培ビンから発生した子実体と比較して低かった (Table 13)。一方, *Ew. americana* の懸濁液を噴霧接種後 3 日間, 20°C で管理した栽培ビンの発病率は 87.5% と高く, 腐敗を伴って激しく黄変した子実体の発生を確認した (Fig.11d)。黄変または腐敗した子実体の一部を A-D3 培地および T-PAF 培地に画線したところ, A-D3 培地上で *Ew. americana* (LE1001) の集落性状と一致する黄色集落の生育は見られたが, T-PAF 培地上に *Ps. tolaasii* (814) の集落性状と一致する青緑色集落は見られなかった。

Table 13. Results of inoculation test performed with culture bottle of *Pleurotus ostreatus* at 4 days after removal of surface mycelia (called the Kinkaki treatment) in the sawdust medium.

Strain	Temperature ¹⁾	Number of total bottle ²⁾	Degree of severity ³⁾			Incidence rate (%) ⁴⁾
			+++	++	+	
<i>Ewingella americana</i> LE1001	15	16	0	2	4	37.5
	20	16	8	2	4	87.5
<i>Pseudomonas tolaasii</i> 814	15	16	0	4	11	93.8
	20	16	2	10	3	93.8
Control(water)	15	16	0	0	0	0.0
	20	16	0	0	0	0.0

1) Temperature at which inoculated bottles were kept for 3 days.

2) The number of bottle of *P. ostreatus* sprayed with 1 mL bacterial culture or sterilized water.

3) Degree of yellow-brown rotting symptoms on pileus at fruiting bodies of *P. ostreatus*. +++:severe with rot, ++:medium, +:slight

4) Parentheses indicate frequency of occurrences of brown rot symptoms. (Rate (%)) = (Number of bottle of *P. ostreatus* exhibiting yellow-brown rot symptoms / number of sprayed bottles) × 100)

一方, *Ps. tolaasii* を接種した栽培ビンの発病率は, 接種後の温度条件で差は見られなかったが, 褐変腐敗した子実体の発生および変色の程度は, 接種後 3 日間 20°C で管理した栽培ビンの方が高かった (Table 13)。また, 褐変または腐敗した子実体の一部を T-PAF 培地および A-D3 培地に画線したところ, T-PAF 培地上に *Ps. tolaasii*

(814) の集落性状と一致する青緑色集落の生育が認められたが、A-D3 培地上に *Ew. americana* (LE1001) の集落性状と一致する黄色集落は生育しなかった。

第 4 項 考察

シイタケ腐敗病菌 *Ew. americana* の選択培地 A-D3 培地を用いて、秋田県内で採取したヒラタケ、エリンギおよびヤマブシタケ、大分県内で採取したエノキタケおよびヤナギマツタケ、沖縄県産クロアワビタケから分離した 6 菌株の細菌学的性質は整一で、16S rRNA 遺伝子の塩基配列は *Ew. americana* と 99%以上の相同性を示した。また、大分県内の自然林で採取したミネシメジおよびヌメリスギタケから分離した菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、*Ew. americana* と 99%以上の相同性を示した。さらに、菌床シイタケを用いた接種試験の結果、分離菌 8 菌株はシイタケに対する病原性を持つと判断された。以上のことから、ヒラタケ、エリンギ、ヤマブシタケ、エノキタケ、ヤナギマツタケ、クロアワビタケ、ミネシメジおよびヌメリスギタケから分離した 8 菌株を *Ew. americana* と同定した。

ヒラタケに対する病原性の確認は、分離菌の懸濁液をヒラタケ原基形成以前の栽培ビンに噴霧接種する方法で行った。予備試験を行ったところ、接種後の栽培ビンを角度のついた棚に並べるとビン口の下側に懸濁液が溜まりやすく、栽培ビンを立てて置いた場合と比較して変色したヒラタケ子実体の発生割合が高いことがわかった。

分離菌の懸濁液を菌掻き日および 4 日目にヒラタケの栽培ビンに噴霧接種した結果、菌傘の一部または全部が黄変する子実体の発生が認められた。また、シイタケ腐敗病菌 (LE1001) を接種したヒラタケの栽培ビンにも同じ症状が認められ、接種した菌株間で発病の程度に差はなかった。今回供試したヒラタケ分離菌株 (PO1003) は、1996 年に秋田県の栽培地で生育中に黄変して腐敗したヒラタケから分離した菌株である。栽培地で発生状況を調査したところ、本症状は *Ps. tolaasii* によるヒラタケ腐敗病とは病徴が異なり、山中・柿本 (1991) が報告した細菌による黄変症状に類似す

ると考えられた。接種試験の結果から、シイタケ病原細菌 *Ew. americana* はヒラタケ子実体の菌傘を黄褐変させ、腐敗させることを確認できたことから、ヒラタケに対して病原性を有することがわかった。また、*Ew. americana* を噴霧接種した栽培ビンで 20℃ で 3 日間管理すると、15℃ と比較して発病率は高く、腐敗を伴った変色子実体の発生が多いことが判明した。ヒラタケの芽出しや生育工程の温度条件は、15℃ を目安に行われるのが一般的である（西井，2010）。しかし、栽培現場では空調機器の設置場所や能力不足、老朽化等の原因で、季節によっては同じ発生室内においても栽培ビンの周辺温度は設定値より高くなることが予測されることから、ヒラタケ菌傘の変色や腐敗の症状が確認される栽培施設では菌掻き以降の衛生管理に加えて、芽出しや生育工程の温度管理を見直す必要があると考えられた。

以上の試験結果から、菌床栽培のヒラタケ、エリンギ、ヤマブシタケおよびエノキタケから分離した *Ew. americana* は、シイタケに対して病原性を有することが判明し、ヒラタケ子実体を黄褐変、腐敗させることも確認した（有馬ら，2016b）。また、原木栽培のシイタケから分離した *Ew. americana* は、ヒラタケ子実体を黄褐変、腐敗させることも確認され、病徴や発病率はヒラタケ、エリンギ、ヤマブシタケおよびエノキタケから分離した *Ew. americana* と差は認められなかった。以上のことから、*Ew. americana* は、国内のきのこ栽培環境下で生育し、様々な子実体の変色や腐敗を引き起こす多犯性のきのこ病原細菌であることが示唆された。

また、*Ps. tolaasii* の懸濁液を、菌掻き日および 4 日目にヒラタケの栽培ビンに接種したところ、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、菌傘全体が黄褐色することを確認した（**Fig.11c**）。本症状は *Ps. tolaasii* によるヒラタケ腐敗病の病徴（陶山・藤井，1993）とよく一致した。一方、*Ew. americana* の懸濁液を接種したヒラタケには、菌傘上に斑点を形成する症状は認められず、*Ps. tolaasii* を接種した病徴とは識別可能であった（有馬ら，2016b）。

変色したヒラタケ子実体を T-PAF 培地および A-D3 培地に画線したところ、*Ew.*

americana 接種区は A-D3 培地上に中心部が淡黄色から黄色，周囲が乳白色の集落，
Ps. tolaasii 接種区は T-PAF 培地上に青緑色を呈する集落の生育のみが認められたこと
から，コッホの原則を満たすことが確認できた。以上のことから，シイタケ腐敗病
菌 *Ew. americana* は，シイタケ以外にクロアワビタケ，ヤナギマツタケ，エノキタケ，
ヒラタケ，エリンギおよびヤマブシタケから分離され，ヒラタケに対して病原性を有
することが明らかになったことから，空調施設で栽培される菌床きのこの生育阻害要
因になると考えられた。また，これまで *Ew. americana* が野生きのこから分離された
報告はないが，我が国の自然界に広く生息している可能性が示唆された。

第V章 シイタケ腐敗病菌の感染経路の解明

大分県の乾シイタケ栽培は原木伐採地で植菌した後、その場所で伏せ込みを行い、ほだ木は2夏経過後にスギ等のほだ場へ移動して子実体の採取が行われている。ほだ場で褐変腐敗した子実体から分離されるシイタケ腐敗病菌の感染場所を明らかにすることは、本病の防除方法を検討する上で極めて重要である。本項では選択培地を用いて、シイタケ原木栽培栽培環境からのシイタケ腐敗病菌の分離を行い、シイタケに対する病原性を調査した。

第1節 シイタケ栽培環境からの分離

第1項 ほだ木からの分離

1. 材料および方法

ほだ木からの細菌分離は、第6回の発生調査の際に持ち帰った玖珠調査地ほだ木および耶馬溪調査地ほだ木を用いて行った。2013年12月に玖珠調査地ほだ木から7箇所、2015年4月に耶馬溪調査地から5箇所、発病子実体の発生した周辺の内樹皮を滅菌水中で磨砕し、磨砕液を平板培地に塗抹した。分離にはA-D3培地およびHIA培地を用いた。また、発病ほだ木の外樹皮表面からの細菌分離は、2015年5月に玖珠調査地から4箇所および耶馬溪調査地から16箇所を選び、滅菌水で湿らせた綿棒で拭き取り、A-D3平板培地に塗抹した。また、2014年6月に試験場内のクヌギ林内に伏せ込み中のほだ木（2013年3月および2014年3月に市販品種を植菌）の外樹皮表面から同様な方法で分離を行った。また、2016年3月に新たにシイタケ腐敗病の発生を確認した玖珠郡玖珠町戸畑（以下戸畑調査地）から持ち帰ったほだ木（品種：森290）表面からも細菌の分離を行った。

2. 結果

2013年12月、玖珠調査地から持ち帰ったほだ木から発生した発病子実体の周辺の内樹皮は、明らかに褐変している箇所が認められた。2015年4月、耶馬溪調査地から持ち帰ったほだ木から発生した発病子実体の周辺の内樹皮は、健全な内樹皮と同様な色調を呈していた。玖珠調査地および耶馬溪調査地のほだ木の発病子実体周辺の内樹皮から分離した結果、いずれのサンプルからもA-D3培地上で黄色集落を形成する細菌は分離されなかった。耶馬溪調査地のサンプルからはHIA培地上に白色集落の生育を認めたので、A-D3培地で培養したが、黄色集落の生育は見られなかった。しかし、2015年5月にほだ木の表面から同様な方法で分離した結果、A-D3平板培地上で*Ew. americana*の集落性状と一致する集落の生育が認められ、耶馬溪調査地のほだ木からWA359、玖珠調査地のほだ木からWD71およびWD73を得た。

2014年6月、試験場内に伏せ込み中のほだ木（2014年3月植菌）外樹皮表面をA-D3平板培地に塗抹したが、*Ew. americana*の集落性状と一致する集落は出現しなかった。しかし、2013年3月にシイタケ種菌を植菌したほだ木の外樹皮表面からは、A-D3平板培地上で*Ew. americana*の集落性状と一致する集落が出現し、分離菌（RB250）を得た。

2016年3月、戸畑調査地から持ち帰ったほだ木の表面から同様な方法で分離した結果、A-D3培地上で黄色集落の生育を認め、GB636およびGB641を得た。

第2項 伏せ込み地およびほだ場の土壌からの分離

1. 材料および方法

2016年2月にほだ木を伏せ込む前のクヌギ林およびシイタケを採取中の林内ほだ場の土壌を、それぞれ県内数箇所から持ち帰った。細菌の分離は平板希釈法で行い、分離にはA-D3培地を用いた。

2. 結果

竹田市のクヌギ林土壌, 国東市武蔵町および国東町の林内ほだ場の土壌を分離した結果, A-D3 培地上に黄色集落の生育が認められた。HIA 平板培地で純培養を行い, F-1 (竹田市クヌギ林土壌), A-2 (国東市武蔵町ほだ場土壌) および B-2 (国東市国東町ほだ場土壌) を得た。

第3項 分離菌のシイタケに対する病原性と 16S rRNA の遺伝子解析

1. 材料および方法

シイタケに対する病原性は, ほだ木の表面から分離した 6 菌株, クヌギ林およびほだ場の土壌から分離した 3 菌株を用いて, 簡易病原性検定方法 (第III章第2項) で行い, 接種試験は 2 回反復した。対照菌株として, 2013 年 12 月から 2015 年 12 月にかけて, 栽培地のシイタケ子実体から A-D3 培地を用いて分離した黄色集落 (11 菌株) を供試した。また, 分離菌 20 菌株の 16S rRNA の遺伝子解析は, 第III章第3項の方法と同様に行った。

2. 結果

分離菌を菌床シイタケに接種した結果, ほだ木表面から分離された 6 菌株は, 56.9-86.4%の割合で子実体の成長停止が認められた (Table 14)。一方, 土壌から分離された 3 菌株の成長停止割合は低い傾向を示し, クヌギ林土壌由来の菌株は 25.0%であった。また, シイタケ子実体から分離された菌株の多くは, 66%以上の割合で子実体の成長停止が認められ, LE1001 を接種した結果 (Table 3) と同程度であった (Table 15)。分離菌 20 菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は, DDBJ の DNA データベースに登録されている複数の *Ew. americana* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (ACCESSION No. JN175329 他) と 99%以上の相同性を示した。

Table 14. Results of inoculation test performed using *Lentinula edodes* on sawdust medium.

Strain	Number of samples ¹⁾	Number of young fruiting bodies ²⁾	Number of old fruiting bodies ³⁾				
			+++ ⁴⁾	++	+	-	
Bed logs	RB250	40	29 (72.5%)	2	2	6	1
	WA359	44	38 (86.4%)	3	1	2	0
	WD71	48	36 (75.0%)	5	5	4	1
	WD73	51	29 (56.9%)	3	7	8	4
	GB636	19	14 (73.7%)	3	1	1	0
	GB641	19	12 (63.2%)	4	3	0	0
Soils	F-1	20	5 (25.0%)	1	2	4	0
	A-2	20	10 (50.0%)	2	6	2	0
	B-2	20	11 (55.0%)	3	3	3	0
Control (water)	47	0 (0.0%)	0	0	4	43	

1) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* injected with 0.1 ml bacterial culture or sterilized water.

2) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms. The numbers in parentheses indicate frequency of occurrences of brown rot symptoms. (Rate (%)) = (Number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms / number of inoculated young fruiting bodies) × 100

3) The number of old fruiting bodies of *L. edodes*.

4) Degree of browning at inner stipes in old fruiting bodies of *L. edodes*. +++: severe, ++: medium, +: slight, -: no browning

Table 15. Results of inoculation test performed using *Lentinula edodes* on sawdust medium.

Strain	Number of samples ¹⁾	Number of young fruiting bodies ²⁾	Number of old fruiting bodies ³⁾				
			+++ ⁴⁾	++	+	-	
Fruiting bodies	72-2	61	50 (82.0%)	1	0	3	7
	12-7-26-2	57	45 (78.9%)	4	5	1	2
	RB253	44	33 (75.0%)	3	6	2	0
	KS-111	38	25 (65.8%)	4	4	5	0
	BT-10-3	47	31 (66.0%)	2	1	9	4
	398	47	34 (72.3%)	6	3	3	1
	319-1	60	28 (46.7%)	5	10	5	12
	28-12	19	7 (36.8%)	4	2	6	0
	28-14	19	16 (84.2%)	2	1	0	0
	28-16	20	19 (95.0%)	0	1	0	0
	28-17	20	14 (70.0%)	3	0	2	1
	Control (water)	54	6 (11.1%)	0	0	0	48

1) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* injected with 0.1 ml bacterial culture or sterilized water.

2) The number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms. The numbers in parentheses indicate frequency of occurrences of brown rot symptoms. (Rate (%)) = (Number of young fruiting bodies of *L. edodes* exhibiting brown rot symptoms / number of inoculated young fruiting bodies) × 100

3) The number of old fruiting bodies of *L. edodes*.

4) Degree of browning at inner stipes in old fruiting bodies of *L. edodes*. +++: severe, ++: medium, +: slight, -: no browning

第4項 考察

A-D3 平板培地を用いて、伏せ込み中のシイタケほだ木の樹皮表面や土壌を分離した結果、*Ew. americana* (LE1001) と集落性状の一致する細菌を分離することができた。菌床シイタケを用いた接種試験の結果、分離菌のシイタケに対する病原性を確認できた。さらに、分離菌の 16S rRNA 遺伝子解析の結果、*Ew. americana* と 99%以上の相同性を示すことがわかった。以上のことから、伏せ込み中のシイタケほだ木の樹皮表面や土壌から分離された細菌を *Ew. americana* と同定した。また、A-D3 培地は、シイタケ子実体以外に生息する *Ew. americana* を分離可能であったことから、きのこ栽培環境における *Ew. americana* の生態的調査が効率的に行うことが可能になった。

Ew. americana は、伏せ込み場所の土壌からも分離されたことから、*Ew. americana* は伏せ込み中のほだ木に土壌伝染すると考えられた。小松・後藤 (1974) は、シイタケ褐変腐敗病の原因菌 *Ps. fluorescens* は、土壌に生息している可能性を示唆している。シイタケほだ木の伏せ込み期間は、乾シイタケの場合は 20 ヶ月以上と長期に及ぶことから、*Ew. americana* のほだ木への感染機会は多く、土壌中の生育密度や伏せ込み環境の違いによって、感染の程度は大きく異なると予測された。シイタケ原木栽培は全国各地で様々な方法で行われており、植菌後のほだ木に対する細菌の感染と褐変腐敗症状の発生との関連性を研究する上で、本研究結果は参考になると考えられる。

また、*Ew. americana* は、ナメクジやカタツムリから分離された報告 (Müller et al, 1995) があることから、シイタケ栽培環境やほだ木に生息する小動物が媒介している可能性も考えられるので、今後検討する必要がある。

第VI章 シイタケ腐敗病の防除

きのこ栽培で使用可能な登録農薬はあるが、きのこ産業界では生態的な防除が強く求められている（古川，2008；宮崎，2010）。本項では、ほだ木上のシイタケ腐敗病菌の生育密度を低下させる方法で、本病を防除することを目的に試験を行った。

第1節 薬剤を用いた防除

第1項 ほだ木の殺菌剤処理

1. 材料および方法

1) 供試ほだ木

2014年10月に研究所内の人工ほだ場において、シイタケ腐敗病を自然発症したほだ木（系統：7-26，2013年3月植菌）5本を，2015年10月に切断して用いた。

2) 供試薬剤および処理方法

切断したほだ木の片方は，ストレプトマイシン液剤（ヤシマストマイ液剤 20，協友アグリ株式会社製）の1,000倍液に6時間浸漬した。残りのほだ木は対照区として，水道水に浸漬した。浸漬したほだ木は，人工気象室に搬入し，温度 12-22℃，湿度 85-95%の条件で管理した。採取した子実体は滅菌水で磨砕し，A-D3 平板培地に塗沫接種した。

2. 結果

水道水に浸漬した対照区のほだ木上には，15日目に異臭を伴って褐変腐敗したシイタケ子実体の生育が認められた（Fig.12a）。褐変腐敗した子実体を磨砕し，A-D3 平板培地に塗沫接種したところ，*Ew. americana* (LE1001) の集落性状と一致する黄

色集落が多数見られた。一方、ストレプトマイシン液剤に浸漬したほだ木からは、菌柄の一部が褐変したシイタケ子実体の生育を認めた (Fig.12b)。しかし、採取した 9 サンプルの中で異臭を放ったのは 3 サンプルで、褐変の程度は対照区と比較して軽度であった。また、9 サンプルの磨砕液を A-D3 平板培地に塗沫接種したが、*Ew. americana* (LE1001) の集落性状と一致する黄色集落の生育は見られなかった。



Fig.12 Effect of chemical treatment on bed logs of *Lentinula edodes*(7-26).

- Symptoms on the growing fruiting bodies of *L. edodes* 15 days after bed logs were soaked in water. These bed logs were kept at 12-22 °C.
- Browning stipes (arrows) on fruiting bodies of *L. edodes* 15 days after bed logs were soaked in streptomycin 1000 times liquid. These bed logs were kept at 12-22 °C.
- Symptoms on the growing fruiting bodies of *L. edodes* 10 days after bed logs were washed with water. These bed logs were managed at artificial fruiting yard.
- Normal fruiting bodies of *L. edodes* 14 days after bed logs were washed in vinegar 40 times liquid. These bed logs were managed at artificial fruiting yard.

第2項 ほだ木の食酢処理

1. 材料および方法

1) 供試ほだ木

2015年3月に7-26系統（交配株）の種菌を植菌し、研究所内の人工ほだ場で育成したほだ木を用いた。また、2016年3月に戸畑調査地において、シイタケ腐敗病の発生を確認したほだ木（品種：森290，2014年春植菌）を用いた。

2) 供試薬剤および処理方法

食酢処理は、穀物酢（株式会社ミツカン製）の40倍液（pH 3.9）に浸したブラシで、ほだ木樹皮表面を約2分間強く擦った。対照区のほだ木の処理には、水道水を用いた。食酢処理は2016年9-10月に行い、処理後のほだ木は人工ほだ場で管理した。滅菌綿棒で子実体表面を擦り、A-D3平板培地に塗沫接種した。

2. 結果

2016年9月に水道水を用いて強く擦ったほだ木（系統：7-26）からは、処理7日目のほだ木上に菌柄の下部を中心に褐変した子実体の発生が認められ、10日目には異臭を放って激しく腐敗した（Fig.12c）。褐変腐敗子実体は処理した4本のすべてのほだ木に発生した。褐変子実体10個をA-D3平板培地に塗沫接種した結果、8個から*Ew. americana*（LE1001）の集落性状と一致する黄色集落が見られた。

一方、2016年10月に穀物酢40倍液に浸したブラシで強く擦ったほだ木（系統：7-26）からは、処理10日目に褐変子実体の発生は認めず、外観上健全な子実体のみが生育した。10個の褐変子実体をA-D3平板培地に塗沫接種した結果、3個から*Ew. americana*（LE1001）の集落性状と一致する黄色集落が見られた。ほだ木上の子実体を採取せずに継続観察したところ、子実体菌柄が徐々に褐変し、処理14日目に子実体の一部は異臭を放って激しく腐敗した。しかし、同一ほだ木上には、ほとんど褐変

腐敗しない健全子実体も見られた (Fig.12d)。

第3項 考察

きのこ栽培において、ストレプトマイシン液剤を使用することはできない。本項では、ほだ木に *Ew. americana* の生息することを明確に証明し、農薬以外の防除法の可能性を検討する目的で、シイタケ腐敗病の発生を認めたほだ木をストレプトマイシン液剤で浸漬処理を行った。

ストレプトマイシン液剤の 1,000 倍液にほだ木 (系統: 7-26) を浸漬すると、褐変腐敗症状は認められるが、対照区と比較して発生割合は低く、褐変の程度も弱かった。また、これらの子実体を A-D3 培地を用いて分離したが、*Ew. americana* (LE1001) と集落性状が一致する黄色集落の生育は見られなかった。したがって、ほだ木に生息する *Ew. americana* は、ストレプトマイシン液剤浸漬処理によって生育密度が低下したと考えられた。また、採取後のシイタケ子実体の褐変に、ラッカーゼやチロシナーゼ酵素が関与することが知られており (坂本, 2011)、交配株 7-26 は成長中の子実体が褐変しやすい系統であると推察された。

きのこ栽培現地において、病害防除を目的に使用可能な農薬は、きのこ用ベンレートのみであるが、農薬に頼らない防除や被害軽減策が実施されてきた。一方、激害の発生した栽培現地では、速攻性のある効果な方法が求められていることから、近年特定防除資材の使用が検討されている。宮崎ら (2016) は、食酢が *Hypocrea lactea* の子実体の発芽阻害および培養菌糸の伸長阻害効果が高いことを報告した。また、円谷・川村 (1994) は、食酢の抗菌活性は糸状菌より細菌に対して強く、静菌作用があることを報告している。自然発病するほだ木 (系統: 7-26) を、食酢 40 倍液に浸したブラシで強く擦ると、褐変腐敗症状の発生は減少した。これら子実体を A-D3 培地を用いて分離したところ、*Ew. americana* (LE1001) と集落性状が一致する黄色集落の生育は見られたが、発生割合は低かった。以上のことから、シイタケ腐敗病の発生

したほだ木を食酢 40 倍液で処理する方法は，翌シーズンの発病を抑える効果が期待できると考えられた。今後処理濃度や時間，時期やシイタケに及ぼす影響について検討し，きのこ生産地で実施可能な総合的な防除方法の確立が求められる。

第Ⅶ章 菌床栽培エリンギに発生した軟化腐敗症状

1997年夏大分県内において、エリンギ子実体が白色糸状菌に覆われ、軟化腐敗する症状の発生情報が寄せられた。当時エリンギの栽培歴は浅く、これまでに病害発生の記録がないことから、本症状は今後エリンギ栽培上重要な病害になると考えられた。そこで、病原菌の同定、感染経路の解明および防除方法の確立するための研究を行った。

第1節 エリンギから分離される白色糸状菌の同定

第1項 糸状菌の分離

1. 材料および方法

発生調査の際に持ち帰ったエリンギ子実体から、直接菌糸を掻き取り、PDA平板培地に置床し、25℃で3-5日間培養して生じた菌叢先端を分離した。分離菌株はPDA斜面培地で培養し、5℃で保存した。

2. 結果

大分市佐賀関および杵築市山香のエリンギ栽培施設で採取した子実体からは、PDA培地上に白色の菌叢を形成する糸状菌のみが分離された。分離菌はPDA培地、オートミールアガー培地（Difco社製）および麦芽エキス寒天培地（グルコース2.0%、麦芽エキス2.0%、ポリペプトン0.1%）で良く生育し、多量の分生子を形成した（Fig.13a）。また、分離菌を14日間培養したPDA培地の裏面は、クリーム色であった（Fig.13b）。培養期間が長くなると、培地の裏面は徐々に黄色味を帯びた。

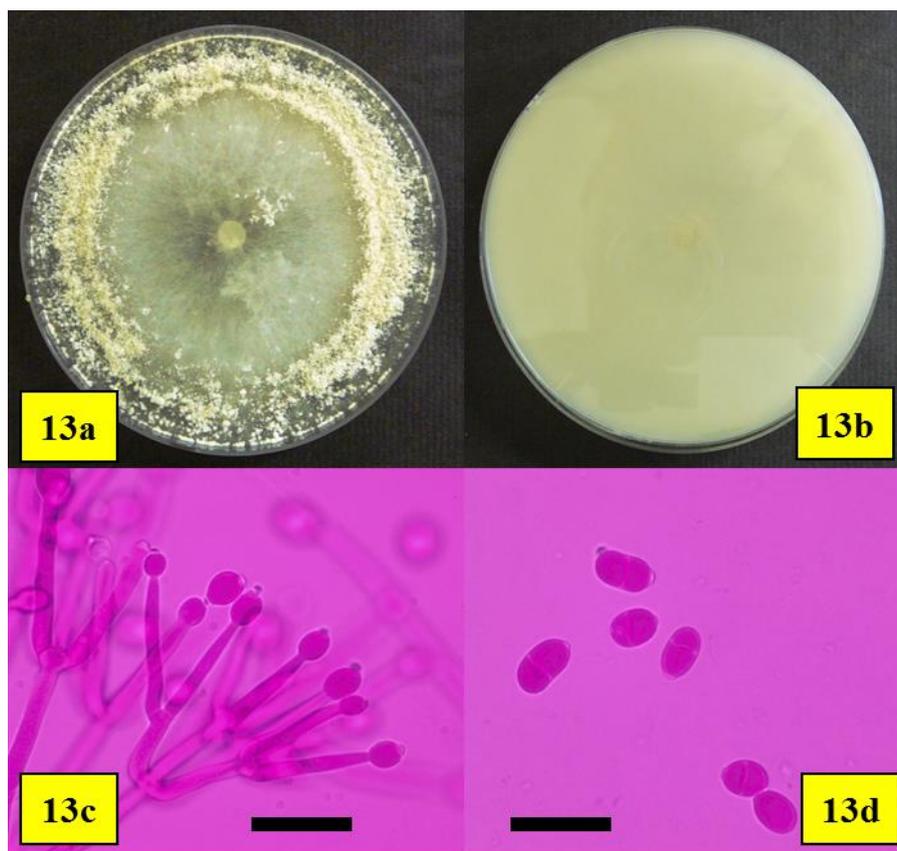


Fig.13 Morphological characters of the *Cladobotryum varium* pathogen of *Pleurotus eryngii*.

a-b. Colony morphology of *C. varium*. grown on potato dextrose agar at 25°C for 14 days (surface side: a, reverse side: b).

c. Conidiophore and conidial head stained with phloxine.
Scale bars: 20 μm

d. Conidia stained with phloxine. Scale bars: 20 μm

第2項 分離菌の形態

1. 材料および方法

大分市佐賀関エリンギ分離菌 (OMI9801) および杵築市山香エリンギ分離菌 (OMI9802) を供試した。対照菌株として長野県野菜花き試験場保存のブナシメジわたかび病菌 (N698), エノキタケわたかび病菌 (N729), エリンギ分離菌 (N715), IFO 保存の *Cladobotryum variospermum* (IFO9143), *C. varium* (IFO9438) および *C. apiculatum* (IFO7795) を用いた。供試菌の形態は, PDA 平板培地, オートミールア

ガー培地および麦芽エキス寒天培地に接種し、20-25℃で10-14日培養した菌叢を光学顕微鏡で観察した。

2. 結果

大分産エリンギ分離菌2菌株は形態的特徴に差は認められず、OMI9801の分生子柄は幅3.8-7.5 μmの気中菌糸からほぼ直立に立ち上がり、長さ180-350 μm、幅2.5-5.0 μmであった。分生子形成細胞は分生子柄の先端に形成され、大きさ20.0-45.0×2.5-5.0 μmであった。分生子は分生子形成細胞の先端に形成され、初期は球状、徐々に楕円から広楕円に成長した (Fig.13c)。成熟した分生子はやがて分生子形成細胞から離脱するが、接続部分に円盤状の突起物が付着し、それ以降に形成された成長中の分生子の先端にも痕跡が見られた (Fig.13d)。分生子形成細胞から離脱した分生子は2細胞、楕円から広楕円形、大きさ12.5-16.8×7.8-10.0 μm、基部に円盤状の突起物を有していた。このような特徴は、長野県で分離された既知のブナシメジおよびエノキタケわかび病菌と良く一致した (Table 16)。

Table 16. Characteristics of conidia of *Cladobotryum* sp. isolated from cultivated mushrooms.

Strain	Number of septa	Shape	Size (μm)	Protuberance
OMI 9801 ¹⁾	1	ovoid- ellipsoid	13-17×8-10	disc-shaped
N 698 ²⁾	1	ellipsoid	13-20×6-10	disc-shaped
N 715 ³⁾	1	ellipsoid	11-19×6-9	disc-shaped
N 729 ⁴⁾	1	ovoid- ellipsoid	13-18×7-9	disc-shaped
<i>C. apiculatum</i> (IFO7795)	absent	cylindric	20-28×5-8	butt-shaped
<i>C. variospermum</i> (IFO9143)	1	ellipsoid	14-20×6-8	disc-shaped
<i>C. varium</i> (IFO9438)	1	ellipsoid	14-20×6-8	absent

1) Isolated fungus from *Pleurotus eryngii* at Oita prefecture.

2) Isolated fungus from *Hypsizygus marmoreus* at Nagano prefecture.

3) Isolated fungus from *Pleurotus eryngii* at Nagano prefecture.

4) Isolated fungus from *Flammulina velutipes* at Nagano prefecture.

第3項 考察

大分産エリンギ分離菌の分生子は、分生子形成細胞の先端に形成された。分生子は肥大成長し、成熟すると基部が仕切られ、分生子形成細胞から離脱した。その際、分生子形成細胞の先端はすでに肥大成長していることから、増殖様式は逆行的である。これらの特徴から分離菌は、内生出芽型の分生子形成様式を示す *Cladobotryum* 属菌である (Hoog, 1978 ; 椿, 1984)。

我が国の野生きのこの寄生菌として *C. varium*, *C. dendroides* および *C. mycophilum* が分離されている (Tubaki, 1955 ; Matsushima, 1975)。また、*Cladobotryum* 属菌による栽培きのこの病害として、*C. varium* によるエノキタケわたかび病 (有田, 1985 ; 山中・柿本, 1991 ; 農林水産省農林水産技術会議事務局林野庁森林総研, 1995) およびブナシメジわたかび病 (山中, 1995) が知られている。また、韓国では *C. varium* によるエノキタケ (Kim,H.K. et al, 1999; Back,C.G. et al, 2012a), ブナシメジ (Back,C.G. et al, 2012a,b) および *C. mycophilum* によるツクリタケ (Back,C.G. et al, 2012a) およびエリンギ (Back,C.G. et al, 2012a ; Kim,M.K. et al, 2014) の病害が報告されている。さらに、イギリスでは *C. varium* および *C. dendroides* によるツクリタケ Cobweb 病 (Grogan and Gaze, 2000), スペインでは *C. mycophilum* によるツクリタケおよびエリンギの Cobweb 病 (Gea,FJ. et al, 2014) が報告されている。

これら既知の *Cladobotryum* 属菌と大分産エリンギ分離菌 (OMI9801 および 9802) の形態的特徴を検討した結果、大分産エリンギ分離菌は長野産ブナシメジわたかび病菌 (N698), 長野産エノキタケわたかび病菌 (N729), 長野産エリンギ分離菌 (N715), *C. variospermum* (IFO9143) および Matsushima (1975) の報告した *Cladobotryum* sp. (MFC-1816) と特徴が良く一致した。*C. varium* (IFO9438) と比較すると、分生子突起物の存在のみが異なっていた。Hoog (1978) の報告によると、*C. variospermum* および *Cladobotryum* sp. は *C. varium* の同物異名としているから、大分産エリンギ分離菌は *C. varium* の分生子突起を有する菌株に類似すると判断した。一方、韓国および

スペイン産のツクリタケとエリンギから分離された *C. mycophilum* は、分生子の大きさや PDA 培地を赤変させる点で大分産エリンギ分離菌と異なった。また、イギリス産ツクリタケの Cobweb 病菌および野生きのこ寄生菌の *C. dendroides* は、多出芽性で、1-4 胞の分生子を形成することから大分産エリンギ分離菌とは明らかに別種である。

以上のことから、Hoog (1978) および Gams and Hoozemans (1970) の分類体系に従い、大分産エリンギ分離菌を *C. varium* Ness ex Steud. と同定した(有馬・陶山, 2000)。

第 2 節 エリンギわたかび病菌の栽培きのこに対する病原性

第 1 項 エリンギに対する病原性

1. 材料および方法

1) 供試菌株

試験には大分市佐賀関エリンギわたかび病菌(OMI9801)を用いた。また、一部の試験には、長野県野菜花き試験場保存のブナシメジわたかび病菌(N698)、エノキタケわたかび病菌(N729)、エリンギわたかび病菌(N715)、IFO 保存の *C. variospermum* (IFO9143) および *C. varium* (IFO9438) を用いた。なお、エリンギは ATCC36047 を供試した。

2) 接種試験

エリンギ栽培用の培地はスギおが粉、米糠、ふすま、きのこの素(太田油脂株式会社製)を容積比で 12:2:1.5:0.5 の割合に混合し、含水率を 63-65% に調整した。800 cc のポリプロピレン製の栽培ビンに 500 g の培地を充填し、120℃、30 分間高圧殺菌した。一昼夜放置した栽培ビンに、予め方法で培養したエリンギ種菌を接種した。培養は 22℃、相対湿度 70% で 6 週間行い、菌掻き後 15℃、相対湿度 90% の生育室内で原基形成を促した。菌掻きは菌床面の中央部を円形に残し、周囲を取り除く方法で行

った。菌掻き後、菌床面の乾燥を防止するために培養ビン専用のキャップ（S-800）で、ビンの上部を約 10 日間軽く覆った。

エリンギわたかび病菌は、PDA 平板培地で 20℃、10-14 日間培養して分生子を形成させた。培地に滅菌水を約 10 ml 加え、毛筆で培地表面を軽くなで、分生子を懸濁させた。ガーゼ 2 枚で濾過した分生子懸濁液に滅菌水を加え、濁度計（BIOLOG 社製）で約 10^6 個/ml の濃度に調製した。この分生子懸濁液を健全なエリンギ幼子実体に 3-4 ml 噴霧接種した。接種したエリンギは 15℃、相対湿度 90-95% に制御した室内に静置して発病の有無を観察した。また、エリンギわたかび病菌の分生子懸濁液は、菌掻き時の菌床面に 1 ビン当たり 1 ml ずつ注入接種した。発病の有無は子実体上での接種菌の生育状況を調査し、子実体の約 25% 以上を覆う栽培ビンを (+++), 約 25% 以下の栽培ビンを (++)、僅かに生育が認められた栽培ビンを (+) と判別した。さらに、子実体から接種菌の再分離を行った。

また、エリンギわたかび病菌 (OMI9801) とエリンギ (ATCC36047) を対峙培養し、菌糸の伸長に及ぼす影響を調査した。エリンギわたかび病菌はエリンギを 25℃、5 日間前培養した PDA 平板培地に対して、エリンギ接種源から約 40 mm の位置に接種し、20℃、14 日間培養した。

2. 結果

約 10^6 個/ml に調整したエリンギわたかび病菌 (OMI9801) の分生子懸濁液を、健全なエリンギ幼子実体に噴霧接種した。その結果、エリンギわたかび病菌は接種 3 日目に菌傘が重なる部分に僅かに生育し、7 日目には子実体のほとんどを覆い尽くした (**Fig.14a**)。また、長野県産ブナシメジわたかび病菌 (N698)、エノキタケわたかび病菌 (N729)、エリンギわたかび病菌 (N715) および *C. variospermum* (IFO9143) は、エリンギわたかび病菌 (OMI9801) と同様な病徴を再現し、発病率はすべて 100% であった。さらに、発病子実体から再分離された糸状菌の培養および形態的特徴は、

接種菌と一致した。一方，*C. varium* (IFO9438) を接種すると，発病率は 22% と低く，発生の程度も *C. varium* と比較して小さかった (Table 17)。



Fig.14 Inoculation test for fruiting bodies and mycelium of *Pleurotus eryngii*.

- a. Symptoms appeared on the fruiting bodies of *P. eryngii* (ATCC36047) 7 days after sprayed with *Cladobotryum varium*(OMI9801).
- b. Mycelial pairing test on potato dextrose agar. When ATCC36047 colonies inoculated 5 days, a mycelial plug of OMC9801 was placed on the plate, which was then incubated at 20°C for 14 days.

Table 17. Pathogenicity of *Cladobotryum varium* (OMI 9801) isolates from cultivated mushroom for *Pleurotus eryngii* at young fruiting bodies growth stage¹⁾.

Strain	Infection rate ⁴⁾ (%)	Degree of infecton ⁵⁾		
		+++	++	+
OMI 9801 ²⁾	100.0	77.7	22.3	0.0
N 698 ³⁾	100.0	33.3	44.4	22.3
N 715 ³⁾	100.0	11.1	77.8	11.1
N 729 ³⁾	100.0	55.6	44.4	0.0
IFO 9143	100.0	37.5	37.5	25.0
IFO 9438	22.0	0.0	11.1	11.1

1) Young fruiting bodies of *P. eryngii* were sprayed 3-4 ml with conidia suspension (1×10^6 /ml) per bottle.

2) Isolated from *P. eryngii* at Oita prefecture.

3) Isolated from *Hypsizygus marmoreus* (N 698), *P. eryngii* (N 715) and *Flammulina velutipes* (N 729) at Nagano prefecture.

4) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of inoculated bottles)×100.

5) Degree of white mold on the fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.

菌掻き直後のエリンギ栽培ビンに、約 10^6 個/ml に調整した分生子懸濁液を菌床面に注入接種すると、エリンギわたかび病菌 (OMI9801)、ブナシメジわたかび病菌 (N698)、エノキタケわたかび病菌 (N715) およびエリンギわたかび病菌 (N729) の発病率は 87.5% 以上で、*C. varium* の生育が約 25% 以上見られる子実体 (以下重症子実体) のみが認められた。さらに、発病子実体からは接種菌が再分離されることを確認した。一方、*C. variospermum* (IFO9143) および *C. varium* (IFO9438) の発病率は 81.5% 以上であったが、重傷子実体の発生割合は 37.5% 以下であった (Table 18)。

Table 18. Pathogenicity of *Cladobotryum varium* (OMI 9801) isolates from cultivated mushroom for *Pleurotus eryngii* at primordia formation stage¹⁾.

Strain	Infection rate ⁴⁾ (%)	Degree of infection ⁵⁾		
		+++	++	+
OMI 9801 ²⁾	100.0	100.0	0.0	0.0
N 698 ³⁾	87.5	87.5	0.0	0.0
N 715 ³⁾	100.0	100.0	0.0	0.0
N 729 ³⁾	100.0	100.0	0.0	0.0
IFO 9143	100.0	37.5	12.5	50.0
IFO 9438	81.3	0.0	25.0	56.3

1) Scraped off sawdust medium of bottles of *P. eryngii* were injected 1 ml with conidia suspension (1×10^6 /ml) per bottle.

2) Isolated from *P. eryngii* at Oita prefecture.

3) Isolated from *Hypsizygus marmoreus* (N 698), *P. eryngii* (N 715) and *Flammulina velutipes* (N 729) at Nagano prefecture.

4) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of inoculated bottles)×100.

5) Degree of white mold on the fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.

また、エリンギ菌 (ATCC36047) とエリンギわたかび病菌 (OMI9801) を PDA 培地上で対峙培養したところ、2 日後に両菌が接触し、その部分に茶褐色の明瞭な拮抗線が形成された。しかし、培養を継続してもエリンギわたかび病菌がエリンギの伸長部に侵入することはなかった (Fig. 14b)。

第2項 各種栽培きのこに対する病原性

1. 材料および方法

1) 供試菌株

試験には、大分市佐賀関エリンギわたかび病菌（OMI9801）を用いた。

2) 接種試験

エリンギわたかび病菌（OMI9801）の接種は、基質上で生育中のエノキタケ、ブナシメジ、ヒラタケおよびシイタケ（原木栽培）の幼子実体に対して、第1項と同様な方法で行った。なお、接種した子実体は、研究所保存菌株を用いて一般的な方法で栽培したものである。

2. 結果

エリンギわたかび病菌（OMI9801）の分生子を約 10^6 個/ml に調製し、栽培ビン上で生育するエノキタケ子実体に噴霧接種すると、接種 4-7 日目に子実体の基部に白色糸状菌が生育するのを確認した（**Fig. 15a**）。その後白色糸状菌は、子実体全体を覆うように伸長した。栽培ビン上で生育するヒラタケに噴霧接種すると、採取時に菌褶および菌傘上に白色糸状菌の生育を僅かに認めた（**Fig. 15b**）。ほだ木上のシイタケに噴霧接種すると、採取時に白色糸状菌の生育は認めなかったが、数日後採取せず放置した子実体の菌柄と菌傘の間に白色糸状菌の生育を認めた（**Fig. 15c**）。一方、ブナシメジ幼子実体に噴霧接種すると、子実体採取時には白色糸状菌の生育は認められなかった。しかし、菌掻き直後の菌床面に注入接種すると、採取時の子実体に白色糸状菌の生育を確認した（**Fig. 15d**）。これら白色糸状菌を再分離した結果、エリンギわたかび病菌（OMI9801）の培養および形態的特徴と一致した。

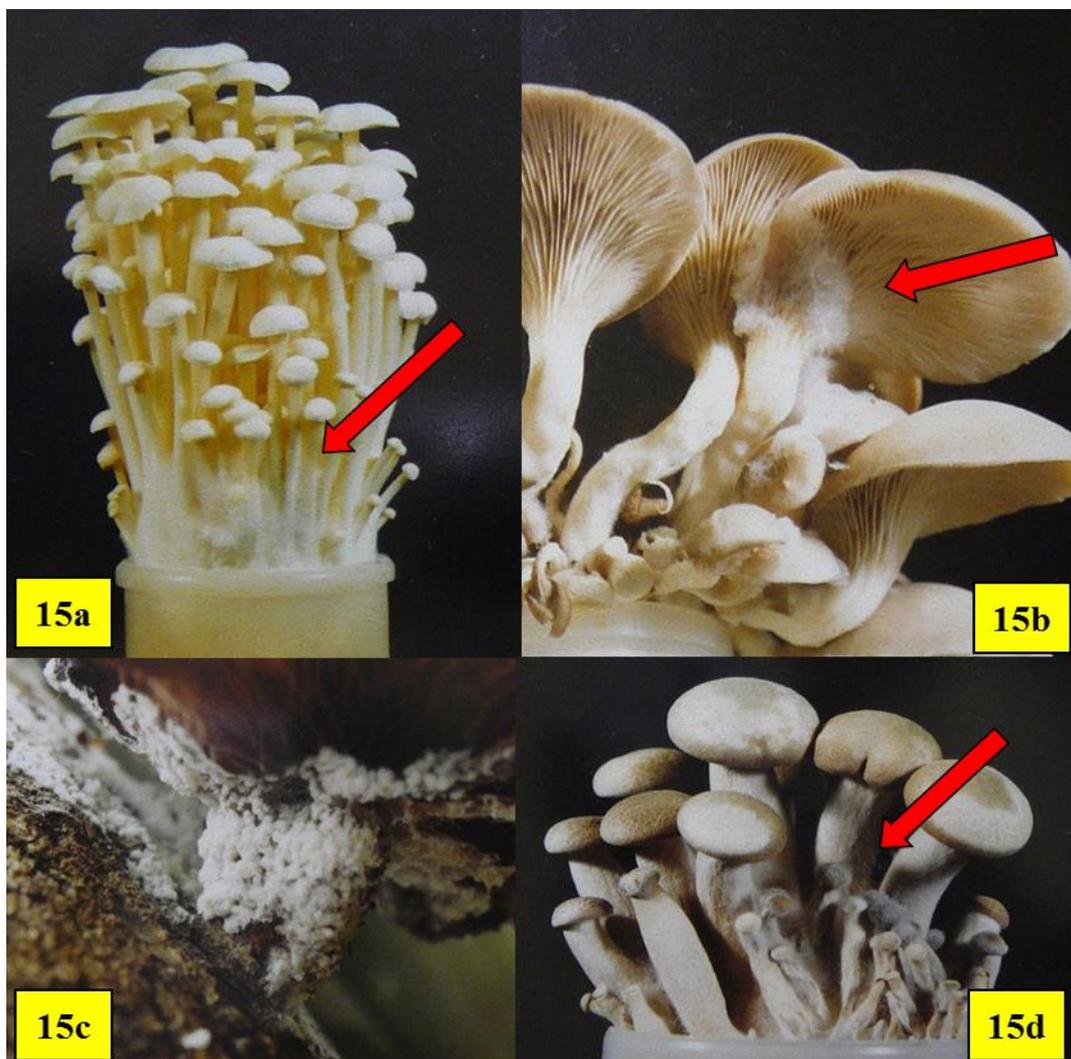


Fig.15 Symptoms appeared on the growing fruiting bodies of mushrooms inoculated with conidia of *Cladobotryum varium* (OMI9801).

- a. White mold (arrow) appeared on the fruiting bodies of *Flammulina velutipes* 4 days after inoculation.
- b. White mold (arrow) appeared on the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* 7 days after inoculation.
- c. White mold appeared on the fruiting bodies of *Lentinula edodes* 14 days after inoculation.
- d. White mold (arrow) appeared on the fruiting bodies of *Hypsizygos marmoreus* 21 days after inoculation.

第3項 考察

大分産エリンギわたかび病菌 (OMI9801) をエリンギ幼子実体に噴霧接種した結果、発生調査で観察された病徴を再現し、発病子実体から接種菌を再分離できたことから、コッホの原則を満たすことを確認できた (有馬・陶山, 1998)。また、長野県の栽培きのこからの分離菌をエリンギ幼子実体に接種すると、同様な病徴を示すことが判明した。これらの菌株の分生子を菌掻き時のエリンギ菌床に接種すると、接種菌に覆われた幼子実体の発生が認められた。さらに、大分産エリンギ分離菌をエノキタケ幼子実体に噴霧接種したところ、エノキタケわたかび病の病徴が認められた。しかし、ブナシメジ幼子実体に対する噴霧接種では、ブナシメジわたかび病の発病は認められなかったが、菌掻き直後の菌床に注入接種すると発病が認められた。また、ヒラタケ幼子実体に噴霧接種すると、*C. varium* の生育を認めたが、発生割合は低かった。

1997年に発生調査を行った2箇所の栽培地では、ヒラタケおよびブナシメジの生育室内でエリンギを栽培していた。接種試験の結果、*C. varium* は、ヒラタケおよびブナシメジの子実体上で生育することを確認した。以上のことから、*C. varium* は先行して栽培されていたヒラタケおよびブナシメジの生育室内に潜在的に生育し、同じ生育室内で栽培を始めたエリンギに感染し、発病するようになったと推測した。

Backら (2012a) は、韓国産エノキタケから分離した *C. varium* が、エリンギに対して病原性を示すことを接種試験によって確認したが、エリンギから分離した *C. mycophilum* と比較して病原性は弱いことを報告した。したがって、韓国ではエリンギに対する *Cladobotryum* 属菌による生育阻害は、*C. mycophilum* に起因すると考えられ、防除対策が検討されている (Kim, M.K. et al, 2014)。

大分県産エリンギからの分離した *C. varium* を接種試験の結果、明瞭に原病徴を再現したことから、*C. varium* によるエリンギの病害を初めて明らかにすることかできた。以上ことから、本病を *C. varium* Ness ex Steud. による「エリンギわたかび病」と呼称することを提案する (有馬・陶山, 2000)。

第3節 エリンギわたかび病菌の感染経路

第1項 栽培工程と発病

1. 材料および方法

1) 供試菌株

試験には、大分市佐賀関エリンギわたかび病菌 *C. varium* (OMI 9801) およびエリンギ (ATCCC36047) を用いた。

2) 接種試験

エリンギ栽培は、第2節第1項と同様に行った。エリンギわたかび病菌の分生子懸濁液は、 10^{1-6} 個/ml の6段階となるよう濃度を調製した。エリンギわたかび病菌の接種はエリンギ培養期、菌掻きから原基形成期および幼子実体生育期の工程毎に行った。エリンギ培養期は、エリンギ種菌接種直後から7, 14, 21, 28日後に、6段階の濃度の分生子懸濁液を1ビンあたり1 ml ずつ注入接種した。菌掻きから原基形成期は、菌掻き直後から4, 7, 10日後に、 10^2 , 10^4 , 10^6 個/ml の3段階の濃度の分生子懸濁液を菌床面全面に1 ml ずつ注入接種した。また、エリンギを5, 6, 7, 8週間培養し、菌掻き直後の菌床面に 10^2 および 10^3 個/ml に調整した分離菌の分生子懸濁液を、1ビンあたり1 ml ずつ注入接種した。菌掻き後14日経過した幼子実体生育期には、6段階の濃度の分生子懸濁液を1ビンあたり3-4 ml 噴霧接種した。対照区は各々の時期に分生子懸濁液に替えて滅菌水を注入あるいは噴霧した。エリンギ菌床は1処理区当たり8-16ビン用いた。これらの接種試験結果の判定は、対照区の子実体採取日に実施した。

2. 結果

エリンギ培養期にエリンギわたかび病菌（OMI 9801）の分生子濃度と培養時期を変えて接種した。分生子濃度が 10^2 個/ml 以上では，接種時期にかかわらず発病が認められ， 10^5 個/ml 以上の接種区は 50%以上の発病率を示した（Table 19）。エリンギ接種直後に接種すると，接種濃度と比例して発病率は高くなり， 10^6 個/ml を接種した培養ビン内の菌床側面では，両菌が拮抗する症状が観察された（Fig. 16a）。これらの栽培ビンを菌掻き処理した結果，子実体を採取するまでの期間は長期化し，子実体形成率は対照区と比較して明らかに低く，採取した子実体の多くは変形していた（Fig. 16b）。しかし，その他の処理区では，菌掻き時点のビン内菌床側面における拮抗現象は確認できなかった。

Table 19. Infection rate to number of conidia of *Cladobotryum varium* (OMI 9801) for *Pleurotus eryngii* at incubation stage.

Inoculation day ¹⁾	Infection rate (%) ²⁾						
	Number of conidia ³⁾ (spores/ml)						
	0	1×10^1	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6
0	0	0	25	25* ⁴⁾	38*	75*	88*
7	0	0	75	63*	25*	50*	75*
14	0	0	13	13	38	63	75*
21	0	0	25	25	63	63	63
28	0	0	50	14	38	50	63

1) Inoculation days after inoculation of *P. eryngii* to cultivated bottles.

2) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of inoculated bottles)×100

3) Bottles of *P. eryngii* were injected with 1mL conidia of *C. varium*.

4) White mold appeared on the fruiting bodies of *P. eryngii* more than 25%.



Fig.16 Inoculation test of *Cladobotryum varium* (OMI9801) performed with cultivation bottles of *Pleurotus eryngii* (ATCC36047) at incubation stage. These bottles of *P. eryngii* were injected 1 ml with conidia suspension ($1 \times 10^6/\text{ml}$) per bottle.

- a. Dark brown lines (arrows) appeared on the bottles of *P. eryngii* at 28 days after inoculation with conidia suspension of *C. varium*.
- b. Occurrence on abnormal flashing of *P. eryngii* at 28 days after removal of surface mycelia (called the Kinkaki treatment) in the sawdust medium.

菌掻きから原基形成期にエリンギわたかび病菌（OMI 9801）の分生子濃度を変えて接種した。菌掻き直後に接種した場合，分生子接種濃度が高いほど子実体形成率は低下し，発病率は 10^2 個/ml 濃度区で 53.3%， 10^4 および 10^6 個/ml 濃度区は 100%であった。菌掻き 4 日後に接種した場合は， 10^6 個/ml 濃度区以外では子実体形成率は 100%を示した。 10^4 個/ml 濃度区が発病率および重症子実体の発生割合は，菌掻き直後の接種区と比較して低かった。菌掻き 7 日後に接種した場合， 10^6 個/ml 濃度区の子実体形成率および発病率は 100%で，重症子実体は 10^6 個/ml 区のみで認められた。菌掻き 10 日後の 10^6 個/ml 接種区も発病率は 100%であったが，重症子実体の割合は大きく減少した（Table 20）。

Table 20. Degree of infection to number of conidia of *Cladobotryum varium* (OMI 9801) for *Pleurotus eryngii* at primordia formation stage.

Inoculation day ¹⁾	Number of conidia ²⁾ (spores/ml)	Flash rate ³⁾ (%)	Infection rate ⁴⁾ (%)	Degree of infection ⁵⁾		
				+++	++	+
0	0	100.0	0	-	-	-
	1×10 ²	93.8	53.3	62.5	0	37.5
	1×10 ⁴	62.5	100.0	70.0	20.0	10.0
	1×10 ⁶	6.3	100.0	100.0	0	0
4	0	100.0	0	-	-	-
	1×10 ²	100.0	50.0	0	0	100.0
	1×10 ⁴	100.0	50.0	12.5	0	87.5
	1×10 ⁶	93.8	100.0	73.3	6.7	20.0
7	0	100.0	0	-	-	-
	1×10 ²	100.0	31.3	0	0	100.0
	1×10 ⁴	100.0	50.0	0	22.5	87.5
	1×10 ⁶	100.0	100.0	43.8	22.4	43.8
10	0	100.0	0	-	-	-
	1×10 ²	100.0	6.3	0	0	100.0
	1×10 ⁴	100.0	50.0	0	50.0	50.0
	1×10 ⁶	100.0	100.0	18.7	31.3	50.0

1) Inoculation days after flat scraping off sawdust medium of *P. eryngii*.

2) Bottles of *P. eryngii* were injected with 1 mL conidia of *C. varium*.

3) Flash rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* / number of inoculated bottles)×100.

4) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of inoculated bottles)×100.

5) Degree of white mold on fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.

また、期間を変えて培養したエリンギ栽培ビンに対して、エリンギわたかび病菌の分生子を菌掻き直後に注入接種した結果、すべての接種区で、エリンギの培養期間にかかわらず発病が認められた。培養期間が7-8週の接種区では、原基形成が遅延する傾向が見られ、10³個/接種区の発病率は100%であった（Table 21）。以上のことから、菌掻き以降の早い時期に接種した処理区では、発病および重症子実体の割合が高く、加えて発病の程度はエリンギの培養期間に影響を受けることが明らかとなった。

Table 21. Effect of number of conidia of *Cladobotryum varium* (OMI 9801) and incubation period of *Pleurotus eryngii*¹⁾.

Number of conidia (spores/ml)	Incubation period (weeks) ²⁾	Infection rate ³⁾ (%)	Degree of infection(%) ⁴⁾		
			+++	++	+
1×10 ²	5	25.0	12.5	12.5	0.0
	6	31.3	25.0	0.0	12.5
	7	50.0	31.3	6.3	6.3
	8	87.5	62.5	6.3	6.3
1×10 ³	5	93.8	87.5	6.3	0.0
	6	87.5	56.3	6.3	12.5
	7	100.0	78.0	6.3	18.8
	8	100.0	93.8	6.3	0.0

1) Scraped off sawdust medium of *P. eryngii* bottles were injected 1 ml with conidia suspension per bottle.

2) *P. eryngii* bottles were incubated for 5-8 weeks at 23 degree.

3) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of inoculated bottles)×100.

4) Degree of white mold on fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.

幼子実体生育期に噴霧接種した結果、発病は濃度 10² 個/ml 以上の接種区で見られ、10⁵ および 10⁶ 個/ml 濃度接種区の発病率は 100% を示した。重症子実体は濃度 10³ 個/ml 以上の接種区で認められた (Table 22)。

Table 22. Degree of infection to number of conidia of *Cladobotryum varium* (OMI9801) for *Pleurotus eryngii* at growth stage of fruiting bodies¹⁾.

Number of conidia ²⁾ (spores/ml)	Infection rate ³⁾ (%)	Degree of infection(%) ⁴⁾		
		+++	++	+
0	0	-	-	-
1×10 ¹	0	-	-	-
1×10 ²	61.5	0	0	100.0
1×10 ³	76.9	30.0	30.0	40.0
1×10 ⁴	80.0	16.7	33.3	50.0
1×10 ⁵	100.0	53.8	30.8	15.4
1×10 ⁶	100.0	60.0	33.3	0.7

1) Inoculated bottles 14days after flat scraping off sawdust medium of *P. eryngii*.

2) Bottles of *P. eryngii* were sprayed with 3-4 ml conidia of *C. varium*.

3) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of inoculated bottles)×100.

4) Degree of white mold on fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.

第2項 考察

エリンギのビン栽培工程において、*C. varium* が培地に侵入する可能性は、種菌接種のため開栓した時および菌掻き作業以降が高いと推察される。種菌接種時に *C. varium* の分生子懸濁液を接種すると、 10^2 個/ml 以上の濃度で発病が認められた。接種濃度が 10^6 個/ml の場合、栽培ビン内の菌床側面に拮抗線が認められ、目視から感染の有無を判断することができた。しかし、分生子濃度が低い (10^2 - 10^5 個/ml) と拮抗線は出現せず、拮抗線の有無は低濃度感染ビンの診断指標にはならなかった (有馬・陶山, 2000)。しかし、生産現地のなかにはきのこ培養ビンを種菌として使用する事例もあり、エリンギわたかび病の発生の拡大要因になることが示唆された。

菌掻き作業時の接種試験においても、発病は分生子濃度 10^2 個/ml 以上の接種条件下で起こり、重症子実体の発生も認められた (有馬・陶山, 1999, 2000)。したがって、菌掻き作業時は、栽培ビン内部に分生子が侵入しないように細心の注意を払う必要があることがわかった。また、その際の発病率および重症子実体の割合は、エリンギ培養期間によって異なった (有馬ら, 2001b)。一般的にきのこ菌床栽培における培養期間は、生産サイクルを考慮するとより短期に設定される。しかし、エリンギ栽培の場合、培養期間がエリンギわたかび病の発生に影響を及ぼすことが明らかになったことから、培養期間を設定するうえで重要な要因になると考えられた。

菌掻き以降の接種試験では、早い時期に接種した処理区において、発病および重症子実体の発生割合は高かった (有馬・陶山, 1999, 2000)。発生調査で認められたビンの口部分の菌床面が *C. varium* で覆われる症状は、菌掻き機や菌掻き後のビン口の被覆に用いた資材からの高濃度汚染によるものと推測された。エノキタケわたかび病は種菌接種から菌掻きまでの期間に感染して発病することが知られており (長野県野菜掻き試験場菌茸部, 1999)、エリンギでも培養期の感染が重要で、感染ビンの菌掻き操作は *C. varium* の二次伝染を助長するものと考えられた。

第4節 エリンギわたかび病の防除

第1項 被覆資材の薬剤処理

1. 材料および方法

1) 供試菌株および薬剤

試験にはエリンギわたかび病菌 *C. varium* (OMI9801), シイタケほだ木から分離した *Trichoderma harzianum* (E755-4) およびエリンギ (ATCC36047) を用いた。供試菌の培養は PDA 培地を用い 20-25°C で行い, 菌株の保存温度は 5°C とした。

薬剤はきのこ栽培用の登録農薬であるきのこ用ベンレート水和剤 (以下 BE, 北興産業株式会社製), パンマッシュ (以下 PA, ローヌ・プラーン油化アグロ株式会社製), 環境用防菌・防かび剤のマイクロトル H (以下 MH, 北興産業株式会社製), 医療施設で消毒剤として常用されているヒビテン (以下 HB, 住友製薬株式会社製), オスバン (以下 OS, 日本製薬株式会社製) および消毒用エタノール (以下 ET, 株式会社ワコーケミカル製) の 6 種類を用いた。

2) 分生子の発芽阻害試験

供試菌 *C. varium* は 20°C, *T. harzianum* は 25°C で 10-14 日間培養し, 分生子を形成させた。発芽試験には第 2 節第 1 項の方法で調製した分生子懸濁液を用いた。MH および ET を除く 4 種類の薬剤は, 分生子懸濁液添加後の最終濃度が, 5000, 500, 50, 5, 0.5 µg/ml になるように調製した。BE および PA の薬液は十分攪拌後, 濾紙 (定性濾紙 No.1, 東洋濾紙株式会社製) で濾過して用いた。分生子懸濁液 (約 10⁶ 個/ml) 0.1 ml を薬液に添加した後, 清浄なスライドグラスに数滴ずつ滴下し, 湿室に保ったシャーレに入れ, 25°C のインキュベーターに静置した。24 時間後, 1 処理区毎に 300 個の分生子を検鏡し, 発芽の状況を観察した。分生子の発芽は発芽管が分生子の短径の半分を超えるものを以て発芽と判定し, 発芽率を求めた (佐藤ら, 1983)。

また、*C. varium* 分生子の発芽に及ぼす薬剤濃度と処理時間の影響は、ET を除く 5 種類の薬液を所定濃度（5000, 500, 50, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ）に調整し、その液に *C. varium* 分生子懸濁液を添加した。MH は塩酸クロルヘキシジンの濃度を基準として調整した。薬剤処理時間は 1, 5, 10, 30, 60 分とし、処理後分生子懸濁液を希釈（ 10^4 倍）し、ポテトデキストロースブロス培地（Difco 社製）で培養（ 20°C ）した後、7 および 14 日後に菌糸生育の有無を判定した。試験は 1 処理区に試験管 5 本を供試し、2 回反復した。

3) 菌糸の伸長阻害試験

菌糸伸長に及ぼす薬剤の影響は、所定濃度の薬剤を添加した PDA 平板培地を用いて検討した。薬剤の最終濃度は 5000, 500, 50, 5, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の 5 段階に調製した。接種源の菌糸は PDA 平板培地で 7-10 日間前培養した後、直径 6 mm のコルクボーラーで同心円上に打ち抜き、各添加培地の中央に接種した。供試菌 *C. varium* および *T. harzianum* は、 20°C で 3 または 6 日間培養し、エリンギは 25°C で 7 日間培養し、1 日あたりの菌糸伸長速度を求め、対照区（薬剤無添加区）と比較した。試験は 1 処理区に 5 枚のシャーレを用い、2 回反復した。

4) 被覆資材へのわたかび病菌接種による汚染試験

エリンギの栽培は第 2 節第 1 項と同様に行い、菌掻き後の原基形成期に栽培ビン口の被覆に使用する芽出しキャップ（S-800）に、わたかび病菌を接種した。すなわち、所定濃度の *C. varium* 分生子懸濁液 1 ml をキャップに滴下し、24 時間放置した後、分生子懸濁液を取り除き、わたかび病菌汚染キャップとした。この汚染キャップを各種薬剤で処理した後、菌掻き直後のエリンギ培養ビン口を 10 日間被覆し、発病の有無によって薬剤の効果を判定した。

5) 汚染キャップの薬剤処理と持続性試験

C. varium の分生子懸濁液 (10^6 個/ml) で汚染させたキャップに、有効成分濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ に調整した BE, PA, MH, HB および OS の薬液または ET を 30 ml 添加し、1 時間処理した。処理後キャップの薬液を除去し、24 時間放置後、菌掻き直後のエリンギ培養ビン口を被覆した。薬剤効果の持続性はキャップを消毒した後わたかび病菌で汚染させ、発病の有無によって調べた。すなわち、予めキャップを薬液で 24 時間処理し、薬液除去後 3 日間清潔な室内に放置し、*C. varium* 分生子懸濁液 (10^6 個/ml) を 1 ml 滴下した。1 時間後に懸濁液を除去し、そのキャップを室内に 24 時間放置後、菌掻き直後のエリンギ栽培ビン口の被覆に用いた。薬剤処理試験の対照区には薬剤の代わりに水道水を使用した。1 処理区にエリンギの栽培ビン を 16 個用い、汚染キャップを用いたビン口の被覆は 10 日とし、発病の判定は子実体の採取時に実施した。

2. 結果

1) 分生子の発芽阻害試験

HB および OS は、5 $\mu\text{g/ml}$ で *C. varium* と *T. harzianum* の分生子発芽を 100% 阻害した。BE は *T. harzianum* の分生子発芽を阻害したが、*C. varium* に対しては 5000 $\mu\text{g/ml}$ でも 89.3% の発芽率を示し、効果は認められなかった。しかし、発芽管長は短くなり、奇形や湾曲した分生子が多く観察された。PA の *C. varium* 分生子に対する発芽阻害効果はほとんど認められなかった。一方、*T. harzianum* に対しては、500 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で 28.0-43.0% の分生子が発芽したが、5000 $\mu\text{g/ml}$ では発芽率が 1.9% に低下した (Table 23)。

Table 23. Effect of chemical treatments on conidial germination of *Cladobotryum varium* (OMI 9801) and *Trichoderma harzianum* (E755-4).

Chemical	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Germination rate (%) ¹⁾	
		<i>C. varium</i>	<i>T. harzianum</i>
Benlate	0.5	>99	17.5
	5	>99	7.1
	50	>99	6.0
	500	97.6	2.6
	5000	89.3	2.6
Panmashu	0.5	89.9	43.0
	5	91.0	36.0
	50	89.5	32.0
	500	91.6	28.0
	5000	87.2	1.9
Hibiten	0.5	17.0	8.6
	5	0.0	0.0
	50	0.0	0.0
	500	0.0	0.0
	5000	0.0	0.0
Osuban	0.5	91.1	6.4
	5	0.0	0.0
	50	0.0	0.0
	500	0.0	0.0
	5000	0.0	0.0

1) Germination rate(%)=(Number of germinated conidia / number of observed conidia) \times 100.

薬剤の処理時間を変え、*C. varium* の分生子発芽に及ぼす影響を調査した。供試した薬剤の中では HB の効果が高く、5 $\mu\text{g/ml}$ で 30 分以上、50 $\mu\text{g/ml}$ で 10 分以上、500 $\mu\text{g/ml}$ で 5 分以上、5000 $\mu\text{g/ml}$ で 1 分以上処理すると、分生子の発芽が阻害され、菌糸の再生は認められなかった。OS および MH は 500 $\mu\text{g/ml}$ で 5 分、5000 $\mu\text{g/ml}$ で 1 分処理すると、菌糸の再生が完全に阻害された。一方、BE および PA は、500 と 5000 $\mu\text{g/ml}$ で 60 分間処理しても分生子の発芽は認められた (Table 24)。

Table 24. Effect of chemical concentration and treatment time to conidial germination of *Cladobotryum varium* (OMI 9801).

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Treatment time (min)	Chemical ¹⁾				
		BE	PA	MH	HB	OS
0.5	1	+ ²⁾	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+
	60	+	+	+	+	+
5	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	-	+
	60	+	+	+	-	+
50	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	+
	30	+	+	+	-	+
	60	+	+	+	-	+
500	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	-	-	-
	10	+	+	-	-	-
	30	+	+	-	-	-
	60	+	+	-	-	-
5000	1	+	+	-	-	-
	5	+	+	-	-	-
	10	+	+	-	-	-
	30	+	+	-	-	-
	60	+	+	-	-	-

1) BE : Benlate, PA : Panmashu, MH : Mikurotoru H, HB : Hibiten, OS : Osuban 2) + : growth, - : not growth

2) 菌糸の生育阻害試験

C. varium 菌糸の生育に及ぼす薬剤の影響を調査した。供試薬剤の中で、BE, PA および MH を添加した寒天培地では、5 $\mu\text{g/ml}$ で *C. varium* および *T. harzianum* の生育が完全に阻害された。一方、エリンギでは若干生育が抑制されたが、感受性に 100-1,000 倍の差が認められた。HB と OS は BE, PA, MH とは異なり、エリンギの生育を阻害する濃度で *C. varium* および *T. harzianum* の生育阻害は認められなかった (Table 25)。

Table 25. Effect of chemical concentration to mycelial growth of *Cladobotryum varium* (OMI 9801), *Trichoderma harzianum*(E755-4) and *Pleurotus eryngii*(ATCC36047) .

Chemical	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Growth of mycelium ¹⁾		
		<i>C. varium</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>P. eryngii</i>
Benlate	0.5	56.9	31.1	81.0
	5	0.0	0.0	76.2
	50	0.0	0.0	50.0
	500	0.0	0.0	35.7
	5000	0.0	0.0	0.0
Panmashu	0.5	88.9	41.0	100.0
	5	0.0	0.0	92.9
	50	0.0	0.0	66.7
	500	0.0	0.0	40.5
	5000	0.0	0.0	29.8
Mikurotoru H	0.5	56.9	4.1	58.3
	5	0.0	0.0	43.8
	50	0.0	0.0	25.0
	500	0.0	0.0	0.0
	5000	0.0	0.0	0.0
Hibiten	0.5	100.0	94.3	78.6
	5	94.4	54.9	50.0
	50	80.5	35.2	21.4
	500	59.7	9.8	0.0
	5000	0.0	0.0	0.0
Osuban	0.5	98.6	100.0	81.0
	5	84.7	67.2	31.0
	50	70.8	35.2	0.0
	500	50.0	12.3	0.0
	5000	5.6	0.0	0.0

1) The numerical value assumed the mycelium growth of the PDA medium 100.

3) 汚染キャップの薬剤による防除試験

C. varium の分生子で汚染した芽出しキャップで菌掻き後の栽培ビンを被覆し、わたかび病発生の有無を調査した。汚染キャップで被覆すると、すべての処理区でエリ

ンギわたかび病が発生し、汚染濃度が高いほど発病率は高かった。重症子実体は 10^5 個/ml 以上の分生子懸濁液で汚染させた処理区に認められた (Table 26)。

Table 26. Result of inoculation test performed with caps of treated conidia of *Cladobotryum varium* (OMI 9801).

Number of conidia ¹⁾ (spores/ml)	Flash rate ²⁾ (%)	Infection rate ³⁾ (%)	Degree of infection ⁴⁾		
			+++	++	+
1×10^6	87.5	87.5	86	7	7
1×10^5	100.0	75.0	42	16	42
1×10^4	100.0	50.0	0	12	88
1×10^3	100.0	25.0	0	50	50
1×10^2	100.0	12.5	0	50	50
1×10^1	100.0	6.3	0	0	100
0	100.0	0.0	-	-	-

1) Caps were treated conidia with 1 mL for 24 hours. Treated caps were covered on bottles of *P. eryngii* after flat scraping off sawdust medium for 10 days.

2) Flash rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* / number of treated bottles) \times 100.

3) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of treated bottles) \times 100.

4) Degree of white mold on the fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.

わたかび病菌汚染キャップを薬剤処理し、それで被覆した場合の発病率を調査した。供試した 6 薬剤は発病を抑制し、対照区に比べて発病率が低下した。なかでも HB と OS は発病防止効果が高く、その発病率はともに 6.3%であった。また、他の薬剤処理の発病率は、BE 処理が 12.5%、MH と ET 処理が 18.8%、PA 処理が 31.3%であった (Table 27)。さらに、子実体の発病程度はいずれも低く、対照区 (水道水処理) で見られた重症子実体の発生は認められなかった (Fig.17a,b)。

Table 27. Effect of chemical treatments test performed with caps of infected conidia of *Cladobotryum varium* (OMI 9801)¹⁾.

Chemical	Flash rate ²⁾ (%)	Infection rate ³⁾ (%)	Degree of infection ⁴⁾		
			+++	++	+
Benlate	100.0	12.5	0	0	100
Panmashu	100.0	31.3	0	0	100
Mikurotoru H	100.0	18.8	0	0	100
Hibiten	100.0	6.3	0	0	100
Osuban	100.0	6.3	0	0	100
70% Ethanol	100.0	18.8	0	0	100
Water	100.0	75.0	50	25	25

1) Chemical treatments test were performed using caps after infected with conidia of *C. varium* suspension

(1×10^6) for 24 hour. Chemical except for 70% ethanol was prepared for active ingredient density 500 $\mu\text{g/ml}$.

2) Flash rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* / number of treated bottles) $\times 100$.

3) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of treated bottles) $\times 100$.

4) Degree of white mold on fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.



Fig. 17 Effect of control for white mould on fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*(ATCC36047) caused by *Cladobotryum varium*(OMI9801). Inoculation test of *C. varium* performed with cultivation bottles of *P. eryngii* at primordia formation stage. These bottles of *P. eryngii* were putted the capes (S-800) after removal of surface mycelia (called the Kinkaki treatment) in the sawdust medium for 10 days.

- These cultivation bottles were putted on the caps with conidia of *C. varium* suspension ($1 \times 10^6/\text{ml}$) per bottle for 10 days. White mould (arrows) appeared on the fruiting bodies of *P. eryngii* 28 days after removal of surface mycelia in the sawdust medium.
- These cultivation bottles were putted on the caps, treated with Mikurotoru H (in 500 $\mu\text{g/ml}$ benzimidazole) for 1 hr after inoculated conidia of *C. varium* suspension ($1 \times 10^6/\text{ml}$) per bottle for 24hr. Occurrence on normal fruiting bodies of *P. eryngii* at 28 days after removal of surface mycelia in the sawdust medium.

薬剤効果の持続性を調査した結果、PA 処理区では発病せず、高い持続効果のあることが認められた。BE, HB および OS 処理区では 6.3%, MH 処理区では 18.8%の発病率であった。しかし、ET 処理区は対照区（水道水区）より高い発病率を示し、持続効果は認められなかった（Table 28）。

Table 28. Effect of chemical treatments test performed with caps of treated conidia of *Cladobotryum varium* (OMI 9801).

Chemical	Flash rate ¹⁾ (%)	Infection rate ²⁾ (%)	Degree of infection ³⁾		
			+++	++	+
Benlate	100.0	6.3	0	0	100
Panmashu	100.0	0.0	-	-	-
Mikurotoru H	100.0	18.8	0	0	100
Hibiten	100.0	6.3	0	0	100
Osuban	100.0	6.3	0	0	100
70% Ethanol	100.0	93.8	80	7	13
Water	100.0	81.3	70	15	15

1) Flash rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* / number of treated bottles)×100.

2) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of treated bottles)×100.

3) Degree of white mold on the fruiting bodies of *P. eryngii*. +++:severe (more than 25%), ++:medium (less than 25%), +:slight.

第 2 項 エリンギ系統のわたかび病菌に対する感受性

1. 材料および方法

エリンギは ATCC36047, 大分県産栽培子実体分離菌 (OMC4087), 森林総合研究所九州支所保存のチェコ産分離菌 (OMC4083) およびドイツ産分離菌 (OMC4084) を用いた。*C. varium* は OMI9801 を用いた。エリンギ 4 系統をそれぞれ 6 週間培養し、菌掻きを行ったエリンギ栽培ビンの菌床面に 10^1 および 10^2 個/ml 濃度に調整した *C. varium* 分生子懸濁液を 1 ビンあたり 1 ml ずつ注入接種した。エリンギ栽培ビンは 1 処理区あたり 20 個用いた。

2. 結果

菌掻き直後のエリンギ栽培ビンに、*C. varium* (OMI9801) 分生子を接種した結果、OMC4087 は 10^1 個/ml 濃度で 30% の発病率を示したが、OMC4084 は 10^2 個/ml 濃度でも発病は認められなかった。一方、ATCC36047 および OMC4083 は 10^2 個/ml 濃度で発病は認められ、エリンギ菌株間で発病率は異なった (Table 29)。

Table 29. Pathogenicity of *Cladobotryum varium* (OMI 9801) for *Pleurotus eryngii* at primordia formation stage¹⁾.

Strain	Source	Infection rate ²⁾ (%)	
		1×10^1 (spores/ml)	1×10^2 (spores/ml)
ATCC 36047		0.0	46.4
OMC 4083	Oita prefecture	0.0	100.0
OMC 4084	Czech Republic	0.0	0.0
OMC 4087	Germany	30.0	30.0

1) Scraped off sawdust medium of *P. eryngii* bottles were injected 1 mL with conidia suspension.

2) Infection rate(%)=(Number of bottles of *P. eryngii* with white mold symptoms / number of inoculated bottles) ×100.

第3項 考察

エリンギわたかび病菌 *C. varium* は、発病子実体上で多量の分生子を形成することから、発病の認められる生産地では分生子によって本病が伝染する可能性が高い。きのこ栽培室内において病原菌の蔓延を防止するには、生育室から発病ビンを直ちに除去し、栽培環境の徹底した清浄化が必要である。したがって、栽培室における *C. varium* の伝染、蔓延を防止するため、病原菌の発芽、生育を阻害する薬剤の効力を検定し、エリンギわたかび病発病施設の清浄化法を確立する必要がある。

供試した 6 種類の薬剤の中で、ヒビテン、オスバンおよびマイクロトル H は、*C. varium* および *T. harzianum* の分生子発芽を阻害する効果の高いことがわかった。また、

エリンギの原基形成期に使用する芽出しキャップを 500 µg/ml のヒビテンおよびオスバン液で処理することによって、汚染資材が消毒され、エリンギわたかび病の発病が抑制されることを確認した。さらに、これら薬剤で芽出しキャップを前処理することによってその効果が持続することがわかった（有馬ら，2001a）。

ヒビテンはクロルヘキシジンを主成分とするビグアナイト系の消毒剤で、細胞膜の障害と細胞質の漏洩を起こすので、医療施設では手指、皮膚の消毒、医療用具および病室の消毒に広く使用されている。本剤はベンゾイミダゾール系薬剤に耐性を示す *Penicillium crustosum* に対して生育阻害効果の高いことを報告している（富樫ら，1996；富樫，1999）。オスバンは塩化ベンザルコニウムを主成分とする陽イオン界面活性剤であり、細胞膜および細胞質内の酵素蛋白に変性を起こし、これまでこの栽培施設における消毒剤として使用されてきた（山中・柿本，1991；中村ら，1996）。しかし、ヒビテンおよびオスバンはエリンギ菌糸の伸長を阻害するので、使用については注意を要することがわかった。

マイクロール H は環境用防菌・防かび剤であり、主成分はヒビテンと同じであるが、パンマッシュの成分である 2-(4-チアゾリル) ベンゾイミダゾールを含んでいる。本剤は *C. varium* の分生子発芽および菌糸伸長に対する阻害効果の高いことが判明したが、ヒビテンと同程度のエリンギ菌糸伸長阻害も認められるので、栽培室や資材の消毒にのみ使用し、エリンギ種菌接種以降の使用を避けなければならない。

ベンレートおよびパンマッシュは *T. harzianum* の分生子発芽をある程度阻害するが、*C. varium* の分生子発芽は 5000 µg/ml でも阻害されなかった。しかし、ベンレートおよびパンマッシュは、*C. varium* 分生子で汚染した芽出しキャップの消毒効果が高く、消毒したキャップを *C. varium* で再汚染しても効果が持続した。さらに、ベンレートおよびパンマッシュは *C. varium* および *T. harzianum* の菌糸伸長を阻害したので、両剤は所定濃度で培地に混和する方法（富樫ら，1996；関谷，1999）で使用するのが妥当と考える。しかし、パンマッシュは 2004 年 11 月 25 日に失効しているため、

現在使用することはできない（独立行政法人農林水産消費安全技術センター，2017）。また，ベンレート多用は，耐性菌の出現を招くことが危惧されている（富樫ら，1996，1998；富樫，1999）ので，細心の注意が必要である。

きのこ栽培地における薬剤による施設内の消毒は，低濃度で必要最小限度に行われることが求められる。ヒビテン，オスバンおよびマイクロトル H の 500 µg/ml で，被覆資材を 5 分以上処理することによって資材に付着した *C. varium* の分生子発芽が阻害され，発病防止効果が認められた（有馬ら，2001a）。したがって，この処理濃度および時間はエリンギわたかび病の発病施設における使用濃度の基準になると考えられた。また，施設内の壁，床，棚の摩擦を伴う薬剤処理により，効果はさらに向上すると考えられる。これらの薬剤はいずれも金属腐食性がなく，比較的安価で安全性も高いことから，一般のきのこ栽培施設の環境消毒剤として有効であると考えられる。

入手したエリンギ菌株を用いて，*C. varium* 分生子の接種試験を行ったところ，大分県産栽培子実体からの分離株（OMC4087）は，他系統と比較して耐病性が低いことがわかった（有馬ら，2001b）。国内で急速に生産が拡大したエリンギは，遺伝的な変異は小さかったと考えられる。国内でエリンギの安定生産を行うには，子実体の形質および発生量を向上させるために栽培方法の改善を行うとともに，交配育種による耐病性品種の作出も対策の一つと考えられた。本項で実施した接種試験は，耐病性の検定に応用可能な手法であると考えられた。

第Ⅷ章 総合考察

きのこ生産上重要な生育阻害要因であるシイタケ腐敗病およびエリンギわたかび病について、生産地における発生状況調査、原因菌の特定および同定、感染経路の推定、防除方法の検討を行った。

ほだ木上のシイタケ子実体が褐変または黒変して腐敗する症状は、1970年代から見られるようになり、時に甚大な経済的被害を引き起こしてきた。小松・後藤(1974)は、1972年から1973年にかけて、愛媛県、福岡県、熊本県および大分県で認められた子実体の成長停止、菌褶および菌傘組織の褐変腐敗症状の原因菌を *Ps. fluorescens* と同定し、病名はのちにシイタケ褐変腐敗病と命名された(日本植物病理学会, 2000)。*Ps. fluorescens* の病原性は、懸濁液をほだ木上のシイタケ幼子実体の菌柄に注入接種する方法で確認したが、成長停止は極めて少ないことを報告している。また、陶山・藤井(1993)および Tsuneda ら(1995b)は、シイタケ子実体から *Ps. tolaasii* を分離し、病名はシイタケ黒腐細菌病と命名した(日本植物病理学会, 2000)。陶山・藤井(1993)は、群馬県産シイタケから分離した *Ps. tolaasii* の懸濁液を、ほだ木上のシイタケ子実体に接種し、菌傘および菌褶が褐変または黒変して腐敗することを確認したが、詳細な接種方法は記述しておらず、再現性が低いことを報告している。また、小松らの分離した *Ps. fluorescens* の細菌学的性質は、*Ps. tolaasii* とほぼ一致するとはしたが、white line 形成能が不明なので、別種とされた。一方、Tsuneda ら(1995b)は、三重県および岩手県において原木シイタケの子実体から *Ps. tolaasii* を分離しているが、ほだ木上で生育中のシイタケ子実体に対する接種試験は報告していない。

1996年から2014年にかけて、大分県で発生した原木シイタケの褐変腐敗症状は、分離菌を用いた接種試験、細菌学的性質および16S rRNA 遺伝子を解析した結果、腸内細菌科の一種である *Ewingella americana* に起因する細菌性の病害であることが判明した。しかし、発生調査で確認した病徴は、小松・後藤(1974)および陶山・藤井

(1993) の報告と酷似していた。菌床シイタケを用いた接種試験の結果、*Ps. tolaasii* の懸濁液を注入接種したシイタケ幼子実体は、成長停止や菌柄内部の褐変症状が認められ、病徴や発生率は *Ew. americana* を接種した場合と差はなかった。したがって、原木シイタケの褐変腐敗症状を引き起こす細菌は、*Ps. fluorescens* および *Ps. tolaasii* に加えて、*Ew. americana* が追加されるが、これらの病徴は酷似することから、今後病名の整理が必要である。

Inglis (1996a) らは、イギリスで栽培されたツクリタケの菌柄内部が変色して腐敗する部位から分離された細菌を、pin stage のツクリタケに噴霧または注入接種する方法で原病徴の発生を確認し、*Ew. americana* によるツクリタケ菌柄内部壊死病として初めて報告した。本病の発生は、その後ニュージーランド (Chowdhury et al., 2007)、韓国 (Lee et al., 2009) およびエジプト (Madbouly et al., 2014) において確認されている。Grimont (1983) らは、*Ew. americana* を腸内細菌科の一種と報告している。Inglis (1996a) らは、ツクリタケ菌柄内部壊死病の感染経路を作業員による栽培施設への持ち込みと推察しているが、十分な検証は行っていない。また、Reyes (2004) らは、スペインにおいて健全なツクリタケ、シイタケおよびヒラタケから *Ew. americana* を分離し、きのこ栽培施設に広く生育していることを示唆している。本研究で *Ew. americana* は、国内において空調施設で栽培されたヒラタケ、エリンギ、ヤマブシタケおよびエノキタケから分離され、シイタケおよびヒラタケに対して病原性を持つことが明らかになった。したがって、*Ew. americana* は多犯性のきのこ病原性菌であることが示唆された。

また、*Ew. americana* は、野外の原木林の土壌や伏せ込み中のほだ木に発生したシイタケ子実体から分離され、シイタケに対して病原性を有することを明らかにした。したがって、シイタケ腐敗病の発生を以下に推察した。まず、土壌に生息している *Ew. americana* は、ほだ木育成段階のほだ木外樹皮に感染し、雨水によって内樹皮に生育範囲が広がり、生育密度が徐々に高くなる。シイタケ菌糸の生理的活性の低下し

たほだ木の内樹皮付近に形成されたシイタケ原基または外樹皮に出現した幼子実体に、*Ew. americana* が感染することで軽度の子実体褐変が起こる。採取されずほだ木上に放置された発病子実体は二次感染源となり、以降周辺に生育した子実体に子実体褐変や腐敗が起こると、生産者の多くは異状を認識する。さらに、気温や湿度が高いほだ場では、異臭を伴った重度の腐敗が起こり、ほだ木上の *Ew. americana* の生育密度はさらに高くなり、翌シーズンのシイタケ採取時期に再びシイタケ腐敗病が発生する可能性が高まる。

したがって、シイタケ腐敗病の防除や被害軽減策を以下に提案する。第一は、ほだ木育成段階において、*Ew. americana* のほだ木への感染を防ぐことである。本県の原木シイタケ栽培は原木伐採跡地でほだ木の育成を行うのが一般的である。植菌後のほだ木は、2 夏経過（約 20 ヶ月）するまで同じ場所に置かれることから、土壌中に生育する *Ew. americana* のほだ木へ感染する期間が長く、生育密度の増加を招く可能性が高い。したがって、本研究では検証できなかったが、1 夏経過後に伏せ込み中のほだ木を移動させる方法は、現地実証で効果を検討する価値は十分あると考えている。また、同じ場所でほだ木を伏せ込む場合は、過去に本病の発生を認めたほだ木を育成した場所を避けることも実行可能な対策である。また、栽培環境によっては、防草シートの上でほだ木育成を行うことも実施可能な方策である。第二は、ほだ木を伏せ込み場所からほだ場に移動させる際に細心の注意を払い、異状の疑われるほだ木は隔離することである。伏せ込み中のほだ木にシイタケ子実体が見られることは珍しくなく、ほだ起し作業中に褐変腐敗症状を認める事例も少なくない。既にシイタケ腐敗病の兆候が見られるほだ木をほだ場に移動することで、新たな感染源になる可能性がある。第三は、ほだ場で子実体褐変症状を認めたら、早急にほだ木から取り除くことである（有馬，2013）。子実体を除去する際は直接手で触らず、ほだ場やその周辺に廃棄しない。第四は、ほだ場の通風を図り、異状が見られる場合は、散水は控えることである（有馬，2013）。シイタケ腐敗病は、乾燥傾向のほだ場においても発生するこ

とを確認しているが、その程度は高湿度ほだ場よりは小さい。第五は、シイタケ品種の特性を把握し、自身の栽培環境にあった品種を選択することである。これらの方法を総合的に実施することで、シイタケ腐敗病の発生による経済的な被害を少なくすることは、十分可能と考えられる。

ビン栽培で生育中のエリンギ子実体が白色糸状菌に覆われ、軟化腐敗する症状は、既知のエノキタケおよびブナシメジわたかび病菌 *Cladobotryum varium* に起因すること初めて明らかにし、病名をエリンギわたかび病とすることを提案した。しかし、エノキタケおよびブナシメジわたかび病の生産地における発生実態は不明な点が多く、エリンギわたかび病の防除方法として参考になる知見も少なかった。エリンギわたかび病の発生地では、調査時には既に対策が講じられており、詳細な発生実態を明らかにすることは困難であった。したがって、本研究は、エリンギ栽培工程毎にわたかび病菌の接種試験を行うことで発生状況や発病の程度を明らかにし、感染機会が疑われる芽出し工程における薬剤防除法の確立を目的に行った。

生産地で白色糸状菌に覆われたエリンギ子実体を採取すると、多量の分生子が周囲に飛散する。*C. varium* は培地上においても分生子を多量に形成することから、生産地では主に分生子によって感染すると推察した。エリンギ栽培工程において、*C. varium* の分生子濃度を替えて接種試験を行った結果、発病は 10^2 個/ml の接種濃度で認められ、菌掻き直後の栽培ビンに接種すると子実体の 25% 以上が *C. varium* で覆われる重症子実体が発生し、栽培地で見られた病徴が再現された。また、*C. varium* の分生子発芽や菌糸伸長に及ぼす薬剤の影響を調査し、接種試験の結果と総合的に考察し、以下の防除方法を提案する。

エリンギわたかび病の防除法の第一は、種類の異なるきのこを同じ生育室内で栽培しないことである。*C. varium* はエノキタケおよびブナシメジに加えて、低率ではあるがヒラタケで生育することを確認している。エリンギを栽培方法の類似するブナシメジやヒラタケと同じ生育室で発生管理すると、潜在的に生息していた *C. varium* が、

感受性の高いエリンギ子実体に寄生したと考えらる。第二は、*C. varium* 菌糸が侵入した種菌を用いないことである。健全な種菌を用いることは、きのこ栽培の基本であるので、信頼おける種菌製造会社から購入することは、発病を未然に防ぐことにつながる。第三は、種菌接種時に *C. varium* の分生子の侵入を防ぐことである。培養中の栽培ビンに *C. varium* の分生子を低濃度接種すると、菌掻き時点のビン側面に拮抗線は見られなかったが、発病子実体の発生が認められたことから、作業室内の衛生管理と作業者の正確な知識と技術の実践が求められる。第四は、菌掻き後に栽培ビン口を被覆する資材の清浄度を向上させることである。特に、資材の再利用には十分注意し、状況によっては薬剤を用いた消毒の実施を検討する。*C. varium* の分生子を有効成分濃度 500 µg/ml のヒビテン、オスバンおよびマイクロトール H で 5 分間処理すると、分生子発芽は完全に阻害されたことから、使用場面に応じて適切かつ効果的な使用を推奨する。第五は、発病した栽培ビンの隔離である。*C. varium* は多量の分生子を形成することから、栽培施設の異状に注意を払い、常に早期発見を心がけるべきである。

最後に、本研究の宿主であるシイタケおよびエリンギの栽培方法は、大幅に改善されてきた。他のきのこも事情は同様であるが、細菌や糸状菌による病害の発生情報は少なくない。生産状況を調査すると、きのこの栽培特性に合った管理が行われていないことも散見された。品種特性の正確な把握と適切な栽培管理を行うことで、きのこ病害の発生を未然に防ぐことや経済的な被害を軽減することは可能と考える。

本論文は、2 例のきのこ子実体に発生した病害に関する研究をまとめたものである。しかし、シイタケ腐敗病の防除は十分な実証の実施に至っておらず、今後の研究に期待したい。また、本研究を実施する中で、古川（2008）が提唱するきのこ病理学の学問的体系を確立するためには、栽培地における発生調査と接種試験による病原性の確認が重要であることを痛感した。本研究が国、県、大学および種菌製造会社等関係者のさらなる連携深化に寄与し、きのこ生産者およびきのこ産業の発展に役立つことを願っている。

引用文献

- 阿部恭久(2003) シイタケ原木栽培の害菌クロコブタケの生理・生態と防除 (1). 森林防疫 52:92-100.
- 安藤正武・他 12名(1980) シイタケほだ木の黒腐病に関する試験研究. 九州地区シイタケ原木病虫害対策協議会 193p.
- 有田郁夫(1971) シイタケほだ木の害菌としての *Hypocrea* 属菌 I. *Hypocrea* 属菌による被害の実態と発生環境. 菌蕈研報 9:36-56.
- 有田郁夫(1985) きのこと栽培における害菌問題. 86年版きのこ年鑑. 農村文化社 東京 pp98-105.
- 有馬 忍(1994) シイタケほだ木の黒腐病. きのこと技術集談会第6回年会および第10回シンポジウム講演要旨集 4-7. (講要)
- 有馬 忍(1999) シイタケほだ木の育成段階における水分条件の影響. 大分県きのこ研報 1:1-28.
- 有馬 忍(2013) 大分県で発生したシイタケ腐敗病. きのこと研だより 36:29-36.
- 有馬 忍(2016) 除袋後および休養中の水分管理条件が菌床シイタケの発生に及ぼす影響. 九州森林研究 69:81-84.
- 有馬 忍・児玉秀市・陶山一雄(1997) シイタケ黒腐症状の発生について. 日林九支研報 50:171-172.
- 有馬 忍・宮本亮平(2015) 除袋後の管理方法の違いおよび培地含水率が菌床シイタケの発生に及ぼす影響. 九州森林研究 68:95-97.
- 有馬 忍・七海隆之・篠原弘亮・根岸寛光(2010) *Ewingella americana* によるシイタケ腐敗病の発生. 日本きのこ学会誌 18:139-144.

- 有馬 忍・野上友美・古川久彦・陶山一雄(1995) 選択培地を利用した栽培きのこからの *Pseudomonas tolaasii* の検出. 日本菌学会第 39 回大会講演要旨集 113. (講要)
- 有馬 忍・篠原弘亮・キム オッキョン・根岸寛光(2016a) シイタケ腐敗病菌 *Ewingella americana* の菌床シイタケを用いた簡易病原性検定方法の開発. 日本きのこ学会誌 23:166-172.
- 有馬 忍・篠原弘亮・キム オッキョン・根岸寛光(2016b) 異なる栽培きのこから分離した *Ewingella americana* のシイタケおよびヒラタケに対する病原性. 日本きのこ学会誌 24:136-141.
- 有馬 忍・篠原弘亮・根岸寛光(2012) シイタケ腐敗病菌 *Ewingella americana* の分離用選択培地. 日本きのこ学会誌 19:181-186.
- 有馬 忍・陶山一雄(1997a) シイタケ腐敗症状から分離された *Erwinia* 属菌の細菌学的性質. 日植病報 63:198. (講要)
- 有馬 忍・陶山一雄(1997b) シイタケ腐敗症状から分離される *Erwinia* 属菌の選択培地. 日本菌学会第 41 回大会講演要旨集 15. (講要)
- 有馬 忍・陶山一雄(1998) *Pleurotus eryngii* に発生した白色かび病(新称)について. 日植病報 64:430. (講要)
- 有馬 忍・陶山一雄(1999) エリンギわたかび病の感染時期と発病. 日植病報 65:401. (講要)
- 有馬 忍・陶山一雄(2000) *Cladobotryum varium* によるエリンギわたかび病(新称). 日本きのこ応用学会誌 8:13-20.
- 有馬 忍・陶山一雄(2004) 大分県におけるシイタケ腐敗病の発生状況について. 九州森林研究 57:275-276.
- 有馬 忍・陶山一雄(2009) 大分県における原木栽培シイタケの子実体に発生した褐変腐敗症とその被害. 大分県きのこ研報 7:1-12.

- 有馬 忍・安野智江・陶山一雄(2001a) エリンギわたかび病菌 *Cladobotryum varium* に及ぼす薬剤の影響. 日本きのこ応用学会誌 9:13-19.
- 有馬 忍・安野智江・陶山一雄(2001b) エリンギわたかび病の発病要因. 日林九支研報 54:181-182.
- Back,C.G., Lee,C.Y., Seo,G.S. and Jung,H.Y.(2012a) Characterization of species of *Cladobotryum* which cause cobweb disease in edible mushrooms grown in Korea. Mycobiology 40:189-194.
- Back,C.G., Lee,C.Y., Seo,G.S., Jung,H.Y. and Ohga,S. (2012b) First occurrence of cobweb disease on *Hypsizigus marmoreus* caused by *Cladobotryum varium* in Korea. J.FAC.Agr.,Kyushu Univ. 57:373-377.
- Brenner,D.J., Krieg,N.R. and Staley,J.T.(2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2ed edn. Springer. New York pp679-681.
- Caillex,R.and Diop,A.(1974) Recherches experimentales sur les conditions d'ambiance requises pour la fructification du *Pleurotus eryngii* et de *Agaricus aegerita*. Mushroom Sci.IV(Part 1) Tokyo. 607-619.
- Chowdhury,P.R., Pay,J. and Braitwaite,M. (2007) Isolation,identification and ecology of *Ewingella americana*(the causal agent of internal stipe necrosis) from cultivated mushrooms in New Zealand. Australasian Plant Pathology 36:424-428.
- Conn, H J,Jennison, M W and Weeks, O B.(1957) Routine tests for the identification of bacteria, In: Society of American Bacteriologists Committee on Bacteriological Technique (eds). Manual of microbiological methods. McGraw-Hill Book Co. New York. USA. pp140-168.
- 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(2017) 登録・失効農薬情報. www.acis.famic.go.jp.

- 円谷悦造・川村吉也(1994) 最近の非食品分野への食酢利用. 日本醸造協会誌 89:601-606.
- Fletcher,J.T. and Gaze,R.H.(2008) Mushroom Pest and Disease Control A Colour Handbook. MANSON PUBLISHING 192p.
- 藤本幸夫(1975) シイタケほた木害虫としてのハラアカコブカミキリとその防除に関する研究. 長崎県農試研報 9:12-35.
- Fukumasa,Y. and Matsumoto,T.(1999) Fruiting body dwarf disease of Shiitake, *Lentinula edodes*, caused by a rickettsia-like organism. Rept.Tottori Mycol.Inst 37:21-35.
- 古川久彦(2008) きのこと病理学(Mushroom pathology) 日本きのこ学会誌 16:13-29.
- 古川久彦・野淵 輝 (1996) 増補改訂版栽培きのこ害菌・害虫ハンドブック. (社) 全国林業改良普及協会 東京 282p.
- Gams,W. and Hoozemans A.C.M.(1970) Cladobotryum-Konidienformen Von Hypomyces-Arten. Persoonia 6:95-110.
- Gea FJ, Carrasco J, Santos M, Dianez F and Navarro MJ.(2014) *Cladobotryum mycophilum*, causalagent of cobweb disease on commercial *Agaricus bisporus* and *Pleurotus eryngii*. Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 523-529.
- Grimont,P.A., Farmer,J.J., Grimont III,F., Asbury,M.A., Brenner, D.J and Deval,C.(1983) *Ewingella americana* gen.nov.,sp.nov., a new Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Ann.Microbiol.(Paris) 134a:39-52.
- 後藤正夫・瀧川雄一(1984) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (3). 植物防疫 38(9):38-43.
- 後藤忠男・伊藤雅道(1995) 菌床栽培における主要害虫の簡易同定法とクロバネキノコバエ類の防除法. 農林水産省農林水産技術会議事務局林野庁森林総研 41-54.

- Grogan,H.M, and Gaze, R.H.(2000) Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bispourus*. *Mycol. Res* 140:357-364.
- 原田幸雄(1977) おがくず栽培ナメコに発生した 1 変形菌 *Badhamia vtricularis* の生物学的諸性質. 弘大農報 28:32-42.
- Hoog, G.S.de.(1978) Notes on some fungicolous and their relativesn. *Persoonia* 10:33-81.
- 堀田 隆・高橋和博(1981) ハラアカコブカミキリの生態に関する研究 I , II , III. 大分県林試研究時報 2:1-17.
- Inglis,P.W.,Burden,J.L. and Peberdy,J.F.(1996a) Evidence for the association of the enteric bacterium *Ewingella americana* with internal stipe necrosis of *Agaricus bispours*. *Microbiology* 142:3253-3260.
- Inglis,P.W. and Peberdy,J.F.(1996b) Isolation of *Ewingella americana* from the Cultivated Mushroom with *Agaricus bispours*. *Current Microbiology* 33:334-337.
- 石井秀之・有馬 忍(2003) 暖冬下の乾シイタケ安定生産技術の開発 (I) —温度条件の影響と水分管理について—. 大分県きのこ研報 3:1-22.
- 伊藤將視(2010) 施設空調型エリンギ栽培の最新技術. 「2010 年度版きのこ年鑑別冊 最新きのこ栽培技術」. プランツワールド 東京 pp181-187.
- Kado,C.I. and Heskett,M.G.(1970) Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 969-976.
- 加藤龍一(1986) シイタケオオヒロズコガの生態と防除—第 1 報—. 森林防疫 35:8-12.
- 河野又四・寺下隆夫(1984) 食用キノコ栽培における汚染微生物について (第 2 報). 近畿大農紀要 17:101-112.

- Kim, H.K., Seok, S.J., Kim, G.P., Moon, B.J. and Terashita T.(1999) Occurrence of Disease Caused by *Cladobotryum varium* on *Flammulina velutipes* in Korea. Korean Journal of Mycology 27:415-419(in korea) .
- Kim, M.K., Seuk, S.W., Lee, Y.H., Kim, H.R. and Cho,K.M.(2014) Fungicide sensitivity and characterization of cobweb disease on a *Pleurotus eryngii* mushroom crop caused by *Cladobotryum mycophilum*. Plant Pathol.J 30:82-89.
- 木村榮一(1999) 図説基礎からのエリンギ栽培. 農村文化社 東京 261p.
- 衣川堅二郎(1982) キノコの事典 (中村克哉編). 朝倉書店 東京 pp366-367.
- 北島 博(2012) 日本におけるきのこ害虫の生態と防除方法. 日本きのこ学会誌, 20:116-118.
- 北本豊・尾崎規子・柴田瑞代・白鳥保・柿本陽一・内山虎歳夫・市川吉夫(1987)エノキタケの栽培時に混入する細菌による「ストップ症状」の発生機作. 鳥大農研報 40:7-13.
- 小松光雄(1976) シイタケに拮抗性の *Hypocrea*, *Trichoderma* および類縁菌類の研究. 菌蕈研報 13:113.
- 小松光雄・後藤正夫(1974) シイタケの細菌病について. 菌蕈研報 11:69-82.
- Lee,C J, Jhune,C S, Cheong,J C,Yun,H S and Cho,W D.(2009) Occurrence of internal stipe necrosis of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) caused by *Ewingella americana* in Korea. Mycobiology 37:62-66.
- Madbouly,K A, El-shatoury,H E and Abouzeid,A M.(2014) Etiology of stipe necrosis of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) in Egypt. Phytopathologia Mediterranea 53:124-129.
- Magae,Y. and Hayashi,N.(1999) Double-staranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes*(Enokitake). FEMS Microbiology letters 180:331-335.

- 馬替由美・砂川政英(2005) シイタケのウイルス病. 日植病報 71:31-32. (講要)
- Marchesi, J R, Sato, T, Weightman, A J, Martin, T A, Fry, J C, Hiom, S J and Wade, W G. (1998)
Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes
coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 64:795-799.
- 松尾芳徳(1980) シイタケほた木の黒腐病に関する研究. 大分県林試研報 9:1-212.
- Matsushima, T. (1975) Icones Microfungorum A Matsushima Lectorum. Published by the
author Kobe Japan 32-33.
- 宮内信之助・昆 喜知郎・山内 健・下村雅人(1998) *Pleurotus eryngii* 菌糸体の培養
特性. 日菌報 39:83-87.
- 宮崎和弘(2010) きのこと栽培のための病虫害対策について. 「2010 年度版きのこ年鑑
別冊最新きのこ栽培技術」. プランツワールド 東京 pp58-68.
- 宮崎和弘・新田 剛・中武千秋(2016) 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. 九州森林研究 69:149-151.
- Müller, H.E., Fanning, G.R. and Brenner, D.J. (1995) Isolation of *Ewingella*
americana from mollusks. Curr. Microbiol. 31:287-290.
- 村上康明(2015) ほた木を食害するオオヒロズコガ類の防除法. 大分県きのこ研報
9:1-19.
- 村上康明・宿利角丸(2006) 大分県におけるシイタケオオヒロズコガの被害につい
て. 九州森林研究 59:281-283.
- Nakai, Y., Ushiyama, R. and Komatsu, M. (1982) Presence of a rod-shaped bacterium in
Lentinus edodes fruit-bodies with a brownish symptom. Rept. Tottori Mycol. Inst
20:47-53.
- 長野県野菜花き試験場菌茸部(1999) エノキタケわたかび病及び桃色かび立枯病の
特性. 平成 10 年度試験成績書 69-70.

- 中村公義・前川二太郎・山本秀樹(1996) エノキタケの新病害：桃色かび立枯病．長野県野菜花き試験場報告 9:55-62.
- 日本植物病理学会(2000) 日本植物病名目録．日本植物防疫協会 東京 pp272-276.
- 西井孝文(2010) 施設空調型ヒラタケ栽培の最新技術．「2010 年度版きのこ年鑑別冊 最新きのこ栽培技術」プランツワールド 東京 pp162-166.
- 西山幸司(1978) 植物病原細菌簡易同定法の試案．植物防疫 32:283-288.
- 西山幸司・久保村安衛・三木信雄(1991) 遺伝資源事業における微生物株の保存方法
1. 細菌の保存法．農業生物資源研究所研究資料 2: 1-12.
- 農林水産省農林水産技術会議事務局林野庁森林総研(1995) きのこ菌床栽培の病原菌と害虫．63p.
- Okada G., Takematsu A., Sugita T., Seifert K., A and Yamanaka K.(1998) *Spicellum roseum* : A hypocrealean hyphomycete as a causative agent of the pink mold damping-off disease affecting *Flammulina velutipes*. 6th Internatl.Symp.Mycol.Jap 66 (Abstr.).
- Okamoto,H., Sato,M. and Isaka M.(1999) Bacterial soft rot of winter mushroom and oyster mushroom caused by *Erwinia carotovora* subsp.*carotovora*. 日植病報 65 : 460-464.
- 大平郁夫(1974) シトネタケとシイタケの競合について．菌蕈研報 11:42-49.
- 大長光純・金子周平(1988) ハラアカコブカミキリ (きのこ害虫Ⅱ)．林業と薬剤 106:1-12.
- 坂本裕一(2011) シイタケ収穫後の子実体老化に関与する酵素の研究．日本きのこ学会誌 19:73-78.
- 佐藤昭二・後藤正夫・土井養二(1983) 植物病理学実験法．講談社 東京 230p.
- 澤 章三(1994) 外国産きのこ「*Pleurotus eryngii*」の栽培方法について．第42回日林中部支部論 227-280.
- 総務省統計局(2014) 特用林産物生産統計調査．www.e-stat.go.jp.

- 関谷 敦(1999) シイタケ菌床栽培における殺菌剤チアベンダゾールの添加効果. 日本応用きのこ学会誌 7:3-11.
- 白田 昭・菅谷和寿・高杉光雄・門出健次(1995) 栽培ヒラタケに腐敗病を起こす日本産 *Pseudomonas tolaasii* の産生する毒素とその生物活性. 日植病報 61:493-502.
- 陶山一雄(1994) きのこの細菌病. きのこ技術集談会第 6 回年会および第 10 回シンポジウム講演要旨集 12-15. (講要)
- 陶山一雄(1995) *Pseudomonas tolaasii* の簡易同定法. 「きのこ菌床栽培の病原菌と害虫」(農林水産省農林水産技術会議事務局・森林総合研究所編) アサヒビジネス茨城 24-29.
- 陶山一雄(1999) White line 形成を利用した *Pseudomonas tolaasii* 感染きのこの簡易直接診断法の開発. 日本きのこ応用学会誌 7:101-107.
- 陶山一雄・藤井 溥(1993) 栽培キノコに発生した細菌病. 東京農業大学農学集報 38:35-50.
- 陶山一雄・根岸寛光・脇本 哲(2000) 栽培きのこ類に腐敗症状を起こす *Pseudomonas tolaasii* の選択培地. 東京農業大学農学集報 44:295-301.
- Tubaki, K. (1955) Studies on the Japanese Hyphomycetes (II) Fungicolous Group. Nagaoa 5:11-40.
- 椿 啓介(1984) 改訂版微生物の分類と同定<上> (長谷川武治編). 学会出版センター pp40-71.
- 土屋健一・Phawichit,S.・脇本 哲(1985) *Erwinia* sp.によるエノキタケ (*Flammulina velutipes*(Fr.)Sing.) の褐色腐敗病 (Bacterial brown rot: 新称). 日植病報 51:344-345. (講要)
- 時本景亮(1985) ほだ木内におけるシイタケ菌とトリコデルマ菌との競合に関する生理学的研究. 菌蕈研報 23:1-54.

- 時本景亮(1991) 食用きのこの病理学 シイタケとトリコデルマの拮抗現象を中心にして. 「きのこ基礎科学と最新技術」(きのこ技術開集談会編集委員会編). 農村文化社 pp168-176.
- 富樫 巖(1999) 北海道のキノコ栽培施設で分離されたベンズイミダゾール系薬剤耐性 *Penicillium crustosum*. 日菌報 40:11-13.
- 富樫 巖・伊藤 清・宣寿次盛生・原田 陽(1996) 北海道における菌床シイタケ発生施設の糸状菌汚染状況と *Trichoderma* spp.分離菌株に対するベノミル水和剤の影響. 木材学会誌 42:1258-1263.
- Tsuneda,A., Maekawa,N. and Sigler,L.(1995a) Evidence of the *Hyphozyma* synanamorph of *Eleutheromyces* sp. Occurring on diseased fruiting bodies of *Lentinula edodes*. Rept.Tottori Mycol.Inst 33:14-20.
- Tsuneda,A., Murakami,S., Gill,W M and Maekawa,N(1997) Black spot disease of *Lentinula edodes* caused by the *Hyphozuma* synanamorph of *Eleuthermyces subulatus*. Mycologia 89:867-875.
- Tsuneda,A., Suyama,K., Murakamami,S. and Ohira,I.(1995b) Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on *Quercus* logs. Mycoscience 36:283-288.
- Tsunoda, M. (2003) Effect of Temperature and Moisture Content on Competition between *Graphostroma platystoma* and *Lentinula edodes* on Branch Segment in Container. Mushroom Science and Biotechnology 11:5-16.
- 角田光利・安藤正武(1981) シイタケほだ木の害菌シトネタケとニマイガワについて. 林試九支年報 24:82-85.
- 角田光利・日高忠利・谷口 實(1996) しいたけほだ木におけるニマイガワキン (*Graphostroma platystoma*)の発育過程とその被害の測定法. 日菌報 37:81-89.

- 角田茂幸・陶山一雄(2002) きのか腐敗病原菌 *Pseudomonas tolaasii* の選択培地 T-PAF 培地の改良. 日本応用きのこ学会第 6 回大会講要旨集 67.
- 津山博之(1962) 白菜軟腐病に関する研究. 東北大農研集報 13(4):221-345.
- Reyes,J.E., Venturini,M.E., Oria,R. and Blanco,D.(2004) Prevalence of *Ewingella americana* in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*) in Zaragoza(Spain). FEMS Microbiol. Ecol 47:291-296.
- 渡邊莉菜・有馬二郎・尾谷 浩・前川二太郎・岡 久美子(2014) シイタケ黒色斑点病菌による宿主特異的褐変誘導物質の生産. 日本きのこ学会誌 22:121-127.
- 山下和久・石井秀之・有馬 忍(2006) 暖冬下の乾シイタケ安定生産技術の開発(Ⅱ) —温度条件の影響と水分管理について—. 大分県きのこ研報 5:1-22.
- 山中勝次(1995) きのか生産における微生物汚染の現状と問題点. きのか技術集談会第 7 回年会および第 12 回シンポジウム講演要旨集 17-19.
- 山中勝次・柿本陽一(1991) きのか生育診断. 農村文化社 東京 107p.
- 山中勝次・鈴木久恵(1994) *Pleurotus erungii*(DC:Fr.) Qué1.の栽培. きのか技術集談会第 6 回年会および第 10 回シンポジウム講演要旨集 38.
- 矢沢敏美・後藤正夫・武田和男・中村公義(1987) *Pseudomonas tolaasii* の一系統によるエノキタケの細菌病について. 日植病報 53:72 (講要)
- Zadrazil,F.(1974) The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus erungii*. Mushroom Sci.IV(Part 1) Tokyo 621-652.
- Zadrazil,F.(1978) Cultivation of *Pleurotus*. Acad. Pr. New York 521-557.

要旨

本研究はきのこを栽培する上で重要な生育阻害要因である微生物に注目する趣旨に、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生態を調査し、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た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、激害発生地で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。しかし、以降はこれらのほだ木から本症状および健全子実体の発生は見られなかった。一方、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事例が認められた。以上のことから、本症状の発生には、シイタケ菌の生理的活性および感受性の違いが重要な因子であることが示唆された。

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 および LE1024）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を高率に認めた。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できた。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、年間を通して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. flurescens* 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が褐変腐敗する症状は、*Ew. americana* に起因する細菌性のきのこ病害であることが明らかになったことから、本病害の病名をシイタケ腐敗病（Brown rot）と命名することを提案した。

シイタケ腐敗病の発生生態を解明するには、*Erw. americana* を効率的に分離する必要があるため、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、ビタミンフリーのカザミノ酸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:1,000 ml, D(+)-アラビトール:10 g, カザミノ酸ビタミンフリー:5 g, 塩化リチウム:7 g, 塩化ナトリウム:5 g, 硫酸マグネシウム七水和物:0.3 g, ドデシル硫酸ナトリウム:50 mg, プロモチモールブルー:60 mg, 寒天:15 g, pH 7.2】を開発した。A-D3 培地上で *Erw. americana* を 28℃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すると 93%の黄色集落は、*Erw. americana* (LE1001) であったことから、生態的調査に使用できると判断した。

シイタケ腐敗病菌 *Erw. 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 *Erw. americana* が分離された。また、発病ほだ木をストマイ剤 1,000 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、*Erw. americana* の分離頻度は低率であった。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 *Erw. americana* は、伏せ込み期間中にほだ木の樹皮表面付近に感染し、シイタケ発生時の幼子実体に感染することでシイタケ腐敗病が発生することが推察された。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 *Erw. 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。

空調施設で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示唆された。

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ヶ所の栽培地では、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こと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、エリンギの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

ノキタケやブナシメジのわたかび病菌と同種である *Cladobotryum varium* と同定されたことから、本病をエリンギわたかび病 (White mold) 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において噴霧接種すると、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 以上の接種を行った栽培ビンからは発病子実体が認められた。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、比較的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噴霧接種すると、それぞれの子実体上において *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前に、採取前の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、同一発生舎で栽培したエリンギに対して、生育阻害を起こすようになったと推察された。

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。病害対策としては、発病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で、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に使用し、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がわかったことから、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、栽培地で発病を防止または軽減させる対策を講じるために参考となる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と考えている。

Studies on Etiology, Epidemiology and Control of the Disease Occurring on Cultivated Mushrooms

Shinobu Arima

Summary

Many inhibiting factors of mushroom production have been known as long with the increasing of mushroom production recently. Among them, the fungal and bacterial diseases that caused severe fruiting bodies growth inhibition were investigated on their occurrence and studied about their etiology and epidemiology to develop the control methods.

Brown rot symptom was seen on *Lentinula edodes* cultivated on bed logs in Oita Prefecture during the period of 1994-2014. The symptom had been found at 32 laying yards in natural forests, artificial yards and greenhouses through 11 cities and 2 towns of Oita Prefecture. The questionnaire survey also revealed that about 60% of producers had sporadically observed the symptoms. The symptom was seen on 9 types of commercial cultivars, both on young and old fruiting bodies and caused tremendous economic damages in severely occurring areas. The environment and climate conditions of these areas revealed that the severe brown rot symptoms were mostly observed in laying yards with high humidity in rainy seasons such as fall and spring, although mild to moderate symptoms were also observed in laying yards which were relatively dry. The infected bed logs derived from a laying yards in November 2013 had been found to produce severely diseased fruiting bodies only during October 2014 and April 2015 at artificial laying yard of the Research Center. The occurrence of the damaged fruiting bodies was also observed during February and April, 2015 on the bed logs that were originated from another laying yard in December, 2014. Then, the damaged fruiting bodies could not be seen thereafter on the observed bed logs. On the other hand, it was shown that the differences among the spawn inoculation period affected the disease occurrence and the diseased fruiting bodies could be seen in case of only one mating strain at artificial laying yard of the Research Center. These findings suggest that the difference in physiological activity and sensitivity of *L. edodes* is a crucial factor of disease occurrence.

The above mentioned symptom was thought to be caused by some bacteria because the symptom was very similar to some known diseases such as the one caused by *Pseudomonas fluorescens* and brown blotch disease caused by *Ps. tolaasii*. The isolation of bacterial pathogen was tried on the samples brought back from the affected area. The white and rounded bacterial colonies were predominantly isolated from the samples on heart infusion agar medium plate. The one of the isolate derived from such colonies (LE1001) inoculated on the healthy and young fruiting bodies of *L. edodes* on the bed logs by injection with 0.1 ml of bacterial suspension (ca. 10^9 cfu/ml) into the fruiting bodies cultivated on sawdust medium caused growth prohibition and browning of some parts of the pileus and stipe of fruiting bodies and rot with odor at 4 and 10 days after inoculation, respectively. The same bacterium was re-isolated from the inoculated and discolored fruiting bodies indicating that LE1001 was the pathogen of the disease. The almost the same disease was occurred by the same artificial inoculation of *Ps. tolaasii*, the pathogen of brown rot of *L. edodes*. The injection of bacterial suspension using the fruiting bodies cultivated on the sawdust medium

was shown to be the simple and effective method for the pathogenicity test that was available all the year over.

The bacteriological characteristics of 20 isolates derived from rotten fruiting bodies of *L. edodes* were very similar to *Erwinia* sp., the pathogen of bacterial brown soft rot on *Flammulina velutipes*, rather than other known mushroom pathogenic bacteria such as *Ps. fluorescens* and *Ps. tolaasii*. Further studies including the sequence analysis of 16S rRNA showed that the causal bacterium was identified as *Ewingella americana*, the pathogen of internal stipe necrosis on *Agaricus bisporus*, previously reported in the U.K, New Zealand, South Korea and Egypt. Consequently, the brown rot disease on *L. edodes* cultivated with bed log was caused by *Ew. americana*. This is the first report of the disease on *L. edodes* caused by *Ew. americana* and “brown rot” was proposed as a new disease name on *L. edodes*.

The selective medium was developed to investigate the epidemiology of the pathogen of brown rot of *L. edodes*, *Ew. americana* by using D3 medium, a selective medium for the bacterium of genus *Erwinia*, as a basal one. As a carbon source, D(+) arabinol, a kind of sugar alcohol generally contained in mushrooms enhanced the selectivity and as a nitrogen source, vitamin free casamino acid stabilized the color of colony. Finally, A-D3 medium containing 10 g of D(+) arabinol, 5 g of vitamin free casamino acid, 7 g of lithium chloride, 5 g of sodium chloride, 0.3 g of magnesium sulfate heptahydrate, 50 mg of sodium dodecyl sulfate, 60 mg of bromothymol blue and 15 g of agar in 1,000 ml was developed. The pH value was adjusted 7.2 by diluted hydrogen chloride before autoclaving. After 72 hours incubation on A-D3 medium at 28°C, *Ew. americana* showed small yellow colony surrounded by white marginal area (0.8-1.0mm in diameter). The plating efficiency of *Ew. americana* on A-D3 medium was 66-93% of nutrient agar medium. Among the yellow colonies isolated from rotten fruiting bodies of *L. edodes* and incubated on A-D3 medium, 93% was identified as *Ew. americana* by bacteriological characteristics and 16S rRNA analysis considering that the selective medium could be used for epidemiological studies of *Ew. americana*.

When *Ew. americana* from laying yards was tried to detect by using A-D3 medium, the bacterium could be isolated from soils of forestry and laying yard, surface of the laying bed logs and the fruiting bodies of *L. edodes*. Immersed in 1,000 ppm of streptomycin suspended fluid, *Ew. americana* infected bed logs could be disinfected to produce healthy fruiting bodies of *L. edodes* and appear low *Ew. americana* isolation ratio. From these results, *Ew. americana*, the pathogen of brown rot of *L. edodes*, inhabiting in soil suspected to infect into the bark of laying bed logs and then young fruiting bodies of *L. edodes* to occur the disease. Thereafter, the control of brown rot will be effectively succeeded by lessened the density of *Ew. americana* on the surface of laying bed logs without declining the physiological activity of *L. edodes*.

The yellow colonies closely similar to the one of *Ew. americana* had been isolated from yellowish brown and/or rotten fruiting bodies grown on sawdust medium including *Pleurotus abalonus*, *Pl. osteretus*, *Pl. eryngii*, *Agrocybe cylindracea*, *F. velutipes* and *Hericum erinaceus* and their 16S rRNA sequences were 99% homologous to the one of *Ew. americana*. All the isolates from such mushrooms were pathogenic to *L. edodes* fruiting bodies to occur brown rot. The isolates also showed pathogenicity on *Pl. osteretus* to generate the yellowing fruiting bodies along with high temperature by artificial inoculation on the culture bottle just after the removal of surface mycelia (“kinkaki” in Japanese). On the other hand, *Ps. tolaasii* occurred distinguish brown spots on the fruiting bodies that fused each other to change whole fruiting bodies color yellowish brown by artificial inoculation. Then, above mentioned results suggested that *Ew. americana* could be a growth inhibition factor not only in the open fields but also in growing room for sawdust cultivation.

The fruiting bodies of *Pl. eryngii* in the bottle fully covered with white mold followed by softening and rotting were seen in Oita Prefecture in summer, 1997. Survey of two farms where the disease occurred revealed that *Pl. ostreatus* and/or *Hypsizygus marmoreus* had been produced up to now and the cultivation of *Pl. eryngii* was started recently hoping consumers demand. Then, the full scale production of *Pl. eryngii* had been introduced because the producing process in *Pl. ostreatus* and/or *H. marmoreus* could be applied to the case in *Pl. eryngii* easily, although there were few experiences of *Pl. eryngii* cultivation in Japan. Along with the appearance of white mycelium on fruiting bodies and cultivation bottles, the damages by the disease increased rapidly.

The white fungus inhabiting on the fruiting bodies of *Pl. eryngii* could be easily isolated and incubated on potato dextrose agar medium (PDA) and formed much amount of conidia that were used as an inoculum to the healthy *Pl. eryngii* fruiting bodies. The surface of the young fruiting bodies sprayed by the conidial suspension (10^6 spores/ml) of the fungus (OMI9801) showed white mycelium growing 3 days after inoculation followed by full covering of the fruiting bodies 7 days after inoculation and softening and rotting to reproduce the original symptoms. As the cultural and morphological characteristics of the re-isolated fungus were the same to OMI9801, the original isolate, the fungus was specified as the pathogen of white mold of *Pl. eryngii*. The fungus was identified as *Cladobotryum varium*, the pathogen of white mold on *F. velutipes* and *H. marmoreus*, according to the cultural and morphological characteristics and the disease was named as white mold (“watakabi-byo” in Japanese).

C. varium could cause the degeneration of fruiting bodies by the inoculation with 10^2 spores/ml conidia suspension at least during the incubation period of *Pl. eryngii*. It was also known that the infection at the primordia formation period caused severe symptoms especially by inoculation test. Inoculation of the pathogen during the bottle cultivation period made an antagonistic line between the mycelia of pathogen and *Pl. eryngii* at the side of bottle wall and inhibited the fruiting bodies formation. Inoculated with below 10^6 spores/ml conidia suspension, normal mycelia could grow in the bottle apparently even at the removal of surface mycelia (“kinkaki”) and diseased fruiting bodies were seen in case of more than 10^2 spores/ml conidia suspension treatment. Therefore, it must be suggested that the spawn mycelia derived from slightly infected and apparently clean bottle should develop the disease seriously in relatively short period.

Inoculated with conidia suspension of *C. varium*, the mycelia could grow on the fruiting bodies of *F. velutipes*, *H. marmoreus* and *Pl. ostreatus*. The farmer had sometimes seen the white mold on the young fruiting bodies of *Pl. ostreatus* and *H. marmoreus* before the start of *Pl. eryngii* production in the mushroom growing room where the three kinds of mushrooms were then grown simultaneously. So, *C. varium* must be suggested to inhabit in the mushroom growing room before the start of *Pl. eryngii* production and cause a growth inhibition on *Pl. eryngii*.

It is known that once the disease is occurred it develops dramatically and causes severe damages because the sawdust medium cultivation house is usually closed and highly humid. To prevent from the disease, removal of the diseased fruiting bodies and mal incubated bottles are carried out to keep incubation environment clean usually. Furthermore, the effective washing agents for the facilities were detected. Hibitene (chlorhexidine gluconate), Osvan (benzalconium chloride) and Microtol H (thiabendazol + chlorhexidinehydrochloride) completely inhibited conidia germination and mycelial growth of *C. varium* by 5 minutes immersion of 500 ppm solution but also hindered the mycelium growth of *Pl. eryngii*. Benlate (benomyl) and Panmash (thiabendazol) could highly inhibit

mycelial growth of *C. varium* and they protected white mold on *Pl. eryngii* by the treatment of covering materials that were used during premordia forming period and affected continuously. So it was thought that above mentioned chemicals were effective to prevent from the infection of white mold on *Pl. eryngii* by disinfection of the facilities correctly. It was also known that the occurrence of white mold was affected by the incubating duration of *Pl. eryngii* and there were some differences among the isolates of *Pl. eryngii* in their resistances. So, it must be available for disease protection to breed the resistant varieties.

As mentioned above, I investigated the diseases of *L. edodes* on bed log and *Pl. eryngii* on sawdust medium caused by a bacterium and a fungus, respectively, to identify the pathogens, make clear the epidemiology and develop the control methods. Those results contain useful basic and applied information about disease control and economic damage reduction in the practical fields to contribute the stable mushroom production greatly.