

## シイタケ腐敗病の防除方法について\*1

有馬 忍\*2

有馬 忍：シイタケ腐敗病の防除方法について 九州森林研究 71：129－132, 2018 1994年以降、大分県内のシイタケ原木栽培現地で見られる褐変腐敗子実体からは、*Ewingella americana* が高頻度に分離された。シイタケ腐敗病菌 *Ew. americana* は、伏せ込み中に見られる褐変子実体、ほだ場で生育中の健全子実体、ほだ木の表面、原木林および林内ほだ場の土壌から分離され、多くの分離菌はシイタケに対する病原性を示した。したがって、*Ew. americana* はシイタケ原木栽培の環境下に広く生育し、伏せ込み中のほだ木に感染する可能性が高いと考えられた。これまでの知見を総合的に考察し、シイタケ腐敗病の防除は伏せ込み中にほだ木と土壌をできるだけ接触させない方法、伏せ込み場所の変更や期間の短縮で感染機会を減らす方法を提案する。また、発病子実体の早期除去および廃棄は、二次感染を防止するために重要な作業である。軽度の発病は多くのほだ場で見られることから、伏せ込み方法およびほだ場環境を改善することで、激害の発生を防ぐことは可能であると考えられた。

キーワード：シイタケ 腐敗病 防除

## I. はじめに

著者らは、1994年以降に大分県で発生を認めたほだ木上のシイタケ子実体が褐変腐敗する症状を、1996年イギリスでツクリタケ internal stipe necrosis (以下菌柄内部壊死病)の原因菌として報告 (Inglis *et al.*, 1996) された *Ewingella americana* に起因する細菌病であることを明らかにし、シイタケ腐敗病と命名した (有馬ほか, 2010)。*Ewingella* 属は、1983年に腸内細菌科の新属として初めて報告 (Grimont *et al.*, 1983) され、*Ew. americana* のみが属する。その後、菌柄内部壊死病の発生は、ニュージーランド、韓国およびエジプトで報告されたが、感染経路は明らかにされておらず、国内における発生報告もない。また、スペインでは *Ew. americana* が健全なツクリタケ、シイタケおよびヒラタケから分離され、きのこ栽培環境に広く生息していることが示唆されている。

一方、国内でシイタケ腐敗病と酷似する病徴を示す病害として、*Pseudomonas 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.*, 1995) が報告されている。しかし、これら病害の発生状況に関する情報は少ない。また、小松・後藤 (1974) は、*Ps. fluorescens* は土壌に生息することを示唆しているが、感染経路の特定は行っていない。

以上のように、細菌に起因する栽培きのこの病害の発生状況や感染経路は不明な点が多いため、シイタケ腐敗病菌の感染経路を解明し、防除法を確立するための研究を行った。

## II. 材料および方法

## 1. 発生調査

褐変腐敗症状の発生情報が寄せられたほだ場を中心に、所有者

からの聞き取り調査を行った。なお、品種名は調査当時の名称を使用した。

## 2. 原因菌の特定と感染経路の解明

1999年に大分県内4か所のほだ場で褐変腐敗したシイタケ子実体を採取し、滅菌水で磨砕した試料を *Ew. americana* の選択培地 A-D3 培地 (有馬ほか, 2012) および *Ps. tolaasii* の選択培地 T-PAF 培地 (陶山ほか, 2000) に画線した。また、2012年4月から2016年2月にかけて、伏せ込み場、ほだ場および自然林で採取した野生きのこの子実体は、A-D3 培地を用いて分離を行った。2016年2月にほだ木を伏せ込む前のクスギ林および林内ほだ場の土壌を採取し、A-D3 培地を用いた平板希釈法で分離を行った。さらに、2014年6月から2016年3月にかけて、試験場内 (豊後大野市三重町) でほだ木表面を滅菌水で湿らせた綿棒で擦り、A-D3 培地に塗布接種する方法で細菌の分離を行った。

接種3日目のA-D3培地上で周囲が白色で直径約1.0mmの黄色集落 (以下黄色集落) と T-PAF 培地上で青緑色集落 (以下青緑色集落) を釣菌し、純培養株を得た。青緑色集落菌は、T-PAF 培地上で *Pseudomonas* sp. (東京農大保存菌株, 818) と対峙培養を行い、white line の形成を確認した (陶山ほか, 2000)。分離菌の培養は Heart Infusion Agar (Difco 社製)、保存は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、-40℃で凍結保存した。

シイタケに対する病原性は、分離菌の一部を供試して菌床シイタケを用いる方法 (有馬ほか, 2016 a) で行った。発病度は、 $\{\sum (\text{発病程度別子実体数} \times \text{指数}) / (5 \times \text{接種数})\} \times 100$  で算出した。なお、指数は成長停止を5、菌柄内部の褐変程度から+++を3、++を2、+を1とした。対照菌として、シイタケ腐敗病菌 (LE 1001) および *Ps. tolaasii* (東京農業大学保存菌株, 814) を用い、1菌株あたり2菌床に接種した。また、分離菌の16S

\*1 Arima, S.: Control of brown rot disease of shiitake mushroom caused by *Ewingella americana*.

\*2 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 Oita Pref. Agr., For. and Fish. Res. Ctr., Forest Res. Div., Mushroom Group, Akamine, Mie, Oita 879-7111, Japan

rRNA 遺伝子の塩基配列は、既報（有馬ほか、2010）と同じ方法で調査した。

### 3. ほだ木の食酢処理

2015年3月に7-26系統（交配株）の種菌を植菌し、試験場内の人工ほだ場で育成したほだ木を用いた。食酢処理は2016年9-10月に行い、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、処理したほだ木は人工ほだ場で管理した。発生した子実体の一部は、滅菌綿棒で子実体表面を擦り、A-D3平板培地に塗抹接種した。

## Ⅲ. 結果

### 1. 発生調査

シイタケ腐敗病は1994年から2014年にかけて、大分県内11市2町の32箇所を確認され、市販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）に発生していた。激害の発生は、湿度が高い林内ほだ場において、気温が比較的高く、降雨の多い時期に見られた。しかし、乾燥気味のほだ場においても、軽～中度の発生が見られ、軽度の発生は発生情報の寄せられていないほだ場においても認められた（有馬・陶山、2009）。また、生産者からの聞き取り調査からは、発生はほだ木のほだ場における経過年数を問わず見られ、翌シーズンも同一ほだ木から発生すること、伏せ込み場所によって発生が異なること、伏せ込み中の子実体（走り子）にも発生すること、特定の品種のみに発生が見られること等の情報が寄せられた。

### 2. 原因菌の特定と感染経路の解明

#### 1) 子実体の分離試験

1999年3-4月に発病情報が寄せられた4箇所のほだ場から子実体を採取し、分離試験を行った結果を表1に示した。すべてのほだ場からA-D3培地上に黄色集落、T-PAF培地上に青緑色集落が分離された。黄色集落の分離頻度は3箇所のほだ場で90%以上を示したが、青緑色の分離頻度は3箇所のほだ場で50%以下であった。T-PAF培地上で青緑色集落と*Pseudomonas*

表-1 シイタケ腐敗病の発生状況と分離試験結果(1999年3-4月)

調査場所	ほだ場	品種	ほだ木齢 <sup>1)</sup>	発生の程度 <sup>2)</sup> (%)				集落の分離頻度 <sup>3)</sup> (%)	
				+++	++	+	-	青緑色 <sup>4)</sup>	黄色 <sup>5)</sup>
佐伯市	林内	明治908	2	43.8	24.8	23.3	9.1	18.2	95.5
豊後大野市 A	人工	森290	1	20.3	28.8	37.3	13.6	26.9	96.2
豊後大野市 B	林内	森121	2	60.7	24.7	12.3	2.3	53.8	92.3
九重町	林内	菌興115	1, 2	2.0	22.6	37.7	38.7	41.2	41.2

- ほだ場におけるほだ木の経過年数。
- ほだ場毎にシイタケ子実体の見られるほだ木を50-120本選び、ほだ木の発生割合を調査。  
+++：腐敗を伴った褐変、++：強く褐変、+：僅かに褐変、-：褐変なし
- ほだ場毎に16-26個のサンプルを採取し、T-PAF培地およびA-D3培地を用いて分離。72時間後に判定。
- T-PAF培地上で青緑色の集落が分離されたサンプル割合。
- A-D3培地上において、大きさ1.0mm前後で周囲が白色の黄色集落が分離されたサンプル割合。

sp. (818) を対峙培養させた結果、white line を形成した。

2012年4月-2016年2月に褐変腐敗したシイタケ子実体をA-D3培地を用いて分離した結果、すべてのサンプルから黄色集落の生育を確認した。分離菌14株の病原性検定を行った結果、子実体の成長停止割合と発病度は、LE1001および814と同程度であった（表2）。また、黄色集落の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。

表-2 シイタケ子実体から分離した細菌の病原性検定<sup>1)</sup>

分離場所	菌株番号	症状	分離年月	幼子 <sup>2)</sup> 実体 割合 (%)	成熟子実体割合 <sup>3)</sup> (%)				発病度 <sup>4)</sup>
					+++	++	+	-	
豊後高田市	BT-103	褐変腐敗	2012年4月	66.0	4.3	2.1	19.1	8.5	72.3
玖珠町	KS-111	褐変腐敗	2013年11月	82.0	1.6	0.0	4.9	11.5	83.9
玖珠町	72-2	褐変腐敗	2013年12月	65.8	10.5	10.5	13.2	0.0	78.9
豊後大野市	304	褐変	2014年6月	75.0	6.8	13.6	4.6	0.0	85.5
豊後大野市	12-7-26	褐変腐敗	2014年10月	78.9	7.0	8.8	1.8	3.5	87.4
中津市	398	褐変腐敗	2014年11月	72.3	12.8	6.4	6.4	2.1	83.8
玖珠町	319-1	褐変腐敗	2015年4月	46.7	8.3	16.7	8.3	20.0	60.0
竹田市	28-16	褐変	2015年12月	95.0	0.0	5.0	0.0	0.0	97.0
豊後大野市	28-17	褐変	2015年11月	70.0	15.0	0.0	10.0	5.0	81.0
玖珠町	28-28	褐変腐敗	2016年3月	44.0	4.0	20.0	24.0	8.0	59.2
玖珠町	28-30	褐変腐敗	2016年3月	95.5	4.5	0.0	0.0	0.0	98.2
玖珠町	28-32	褐変腐敗	2016年3月	91.0	4.5	4.5	0.0	0.0	95.5
国東市	28-12	健全	2015年12月	36.8	21.1	10.5	31.6	0.0	60.0
国東市	28-14	健全	2015年12月	84.2	10.5	5.3	0.0	0.0	92.6
玖珠町	LE1001 <sup>5)</sup>	褐変腐敗	1994年12月	74.6	10.4	3.0	3.0	9.0	82.7
				51.2	9.5	14.6	24.4	4.9	64.9
神奈川県	814 <sup>6)</sup>		1979年11月	41.9	0.0	2.3	27.9	27.9	48.4

- 約10<sup>6</sup>cfu/mlに調整した細菌懸濁液を菌床シイタケに注入接種。
- 褐変して成長停止した幼子実体の割合。
- 接種5日目の成熟子実体の菌柄を切断し、内部の褐変程度を調査。  
+++：激しく黒～褐変、++：褐変、+：僅かに褐変、-：褐変なし
- 発病度 =  $\frac{\sum(\text{発病程度別子実体数} \times \text{指数})}{(\sum \text{接種数})} \times 100$ 。  
指数は 5：成長停止、3：+++、2：++、1：+、0：-とした。
- LE1001は接種試験を2回実施。
- ヒラタケ子実体から分離した*Pseudomonas tolaasii*

#### 2) 栽培環境からの分離

2016年2月にクヌギ原林木および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を確認した。また、2014年6月に伏せ込み中のほだ木の樹皮表面から分離した結果、A-D3培地上の黄色集落は植菌後約14ヶ月経過したほだ木から分離されたが、植菌2ヶ月後のほだ木には生育を認めなかった。発病現地から持ち帰ったほだ木を人工ほだ場で管理し、樹皮表面からの分離を行った結果、A-D3培地上に黄色集落の生育を認めた。

これら黄色集落12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。また、ほだ木表面、ほだ場土壌および野生きのこから分離された黄色集落の成長停止割合や発病度は、シイタケ子実体分離菌や対照菌と差はなかったが、原土壌から分離された黄色集落の発病度は低かった（表3）。

表-3 シイタケ実体以外から分離した細菌の病原性検定<sup>1)</sup>

分離箇所	菌株番号	分離年月	幼子 <sup>2)</sup> 実体 割合 (%)	成熟子実体割合 <sup>3)</sup> (%)				発病度 <sup>4)</sup>
				+++	++	+	-	
ほだ木表面	RB250	2014年6月	72.5	5.0	5.0	15.0	2.5	80.5
	WA359	2015年5月	86.4	6.8	2.3	4.5	0.0	92.3
	WD71	2015年5月	75.0	4.2	10.4	8.3	2.1	83.3
	WD73	2015年5月	56.9	5.9	13.7	15.7	7.8	73.3
	28-29	2016年3月	60.9	17.4	13.1	4.3	4.3	77.4
	28-31	2016年3月	73.7	15.7	5.3	5.3	0.0	86.3
	28-33	2016年3月	63.2	21.1	15.7	0.0	0.0	82.1
原木林土壌	F-1	2016年2月	25.0	5.0	10.0	20.0	40.0	36.0
ほだ場土壌	A-2	2016年2月	50.0	10.0	30.0	10.0	0.0	70.0
	B-2	2016年2月	55.0	15.0	15.0	15.0	0.0	73.0
野生きのこ	28-30	2015年10月	75.0	0.0	15.0	10.0	0.0	82.0
	28-21	2015年10月	65.0	0.0	5.0	20.0	10.0	71.0

- 1) 約 $10^8$ cfu/mlに調整した細菌懸濁液を菌床シイタケに注入接種。  
 2) 褐変して成長停止した幼子実体の割合。  
 3) 接種5日目の成熟子実体の菌柄を切断し、内部の褐変程度を調査。  
 +++: 激しく黒~褐変, ++: 褐変, +: 僅かに褐変, -: 褐変なし  
 4) 発病度 =  $|\sum(\text{発病程度別子実体数} \times \text{指数}) / (5 \times \text{接種数})| \times 100$ 。  
 指数は 5: 成長停止, 3: +++, 2: ++, 1: +, 0: -とした。

### 3. ほだ木の食酢処理

9月23日に水道水で処理したほだ木からは、7日後に褐変腐敗したシイタケ子実体のみが見られた。一方、10月7日に40倍の食酢で処理したほだ木からは、14日後に成熟子実体の生育が見られ、水道水処理区と比較して、褐変程度の軽い子実体も確認された。しかし、これらのほだ木上の子実体は、処理17日後にすべて異臭を放って激しく褐~黒変した。また、褐変腐敗した子実体からは、A-D3培地上に黄色集落の生育が認められた。

## IV. 考察

ほだ木上で生育途中のシイタケ子実体が成長停止し、褐変腐敗する症状は以前から知られていた。著者らは、1999年春に激害の発生した3カ所のほだ場から持ち帰った褐変腐敗子実体を分離した結果、*Ew. americana*の分離頻度が90%以上であったことから、本県で発生している本症状の原因菌は、*Ew. americana*と判断した。しかし、本症状を呈するシイタケ子実体からは、栽培きのこに広く病原性を示す*Ps. tolaasii*も同時に分離された。Munsch *et al.* (2002)は、ツクリタケ褐変病を発病した子実体から分離した細菌の病原性を確認し、原因菌を*Ps. costantinii*と同定した。本細菌は*Ps. tolaasii*と同様に、*Ps. reactans*と対峙培養するとwhite lineを形成する。したがって、white line形成能で*Ps. tolaasii*と簡易同定したきのこ由来の分離菌は、病原性の確認と16S rRNA遺伝子の塩基配列を調査する必要がある。

選択培地A-D3培地を用いた分離試験の結果、原木林の土壌、伏せ込み中のシイタケ子実体から*Ew. americana*が分離された。また、有馬(1999)は伏せ込み地の土壌や笠木から、シイタケ腐敗病菌を分離している。したがって、*Ew. americana*は伏せ込み中のほだ木に感染し、ほだ場で発病すると推察された。シイタケほだ木の伏せ込み期間は長期に及ぶため、土壌に生育していた細菌が伏せ込み中のほだ木に感染する機会が多いと考えられる。また、*Ew. americana*は、野生きのこ分離されたことから、広く自然界に生息していることが示唆された。しかし、ほだ木に見

られる木材腐朽菌や昆虫と細菌の関連性は調査しておらず、シイタケ腐敗病の発生メカニズムは不明な点が多い。また、原木林土壌からの*Ew. americana*の分離頻度は、ほだ場と比較して低く、分離菌のシイタケに対する病原性は低いと判断された。本細菌は土壌からの分離された報告はなく、病原性が低い理由は不明であるが、今後分離菌を増やして病原性の確認を行う必要がある。また、分離時期の検討やクスギ原木自体からの分離試験は実施しておらず、今後調査が必要である。*Ew. americana*はナメクジやカタツムリから分離(Müller *et al.*, 1995)されており、媒介する生物が存在する可能性も考えられる。

ほだ木を用いた接種試験では、病徴は幼子実体に注入接種する方法で再現された。したがって、*Ew. americana*は、内樹皮に形成されたシイタケ原基に感染し、発病する可能性が高いと推察したが、分離試験で明らかにすることはできなかった。また、*Ew. americana*はキチナーゼ活性を持つことから、細胞壁の溶解、子実体の変色や腐敗に至ると考えられるが、生化学的な観点からの検討も必要である。

シイタケ原木栽培中に発生する病虫害対策として、農薬を使用することは推奨されておらず、生産現場では耕種的な方法による防除が行われている。近年、特定防除資材を使用した防除が目立され、食酢を用いた*Hypocrea*属菌の防除が検討されている(宮崎ほか, 2016, 2017)。今回、イネもみ枯細菌病の種子消毒に効果の認められた濃度(円谷・川村, 1997)を参考に希釈した食酢で、シイタケ腐敗病の防除を検討したが、その効果は限定的であった。今後実用的な防除法を確立するには、処理時期や食酢濃度など、詳細な検討が必要である。

## V. 防除法の提案

シイタケ原木栽培は、伏せ込みに約1年半を要し、ほだ場で3-5年の長い期間に渡って行われる。昨今の異常気象や様々な病虫害の発生リスクを低減するには、ほだ木の効率的な管理や気象条件に応じたこまめな環境整備が必要である。シイタケ腐敗病の解明には課題が残されているが、生産者が実行可能な防除策を示すべきと考え、現時点において以下の方法を提案したい。

第一は、ほだ木育成段階で、*Ew. americana*のほだ木への感染を防ぐことである。同じ場所で繰り返し伏せ込みを行う栽培方法で発病が見られる場合は、伏せ込み場所の変更を検討する。その際、防草シート等を利用することで、土壌とほだ木の接触をできるだけ少なくする(写真1)。また、効果の検証は行っていないが、1夏経過後に伏せ込み中のほだ木を移動させる方法は、実施する価値はあると考えている。

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も考えられる。

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。子実体を除去する際はビニール袋を使って直接触らず(写真2)、発病子実体はほだ場やその周辺に廃棄



写真1 防草シートを用いた伏せ込みの実施



写真2 ビニール袋を使用した子実体の除去

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、散水を控えることである。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、その程度は湿度の高いほだ場と比較して明らかに軽い。

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。シイタケ菌の生理的な活性を落とさないほど木管理や発生操作を実施することである。

これらの方法を栽培現場の実情に応じ、複合的に実施することで、シイタケ腐敗病による経済的な被害を少なくすることは、可能と考えられる。

## VI. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご協力頂いた東京農業大学農学部植物病理学研究室に対し、厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

有馬 忍(1999)大分県きのこ研究指導センター業務報告 11:42-

47

有馬 忍・陶山一雄 (2009) 大分県きのこ研報 7:1-12  
 有馬 忍ほか (2010) 日本きのこ学会誌 18:139-144  
 有馬 忍ほか (2012) 日本きのこ学会誌 19:181-186  
 有馬 忍ほか (2016 a) 日本きのこ学会 23:166-172  
 有馬 忍ほか (2016 b) 日本きのこ学会 24:136-141  
 円谷悦造・川村吉也 (1994) 日本醸造協会 89:601-606  
 Grimont PAD *et al.* (1983) Ann Microbiol (Inst.Pasteur) 134 a:39-52  
 Inglis PW *et al.* (1996) Microbiology 142:3253-3260  
 小松光雄・後藤正夫 (1974) 菌蕈研報 11:69-82  
 宮崎和弘ほか (2016) 九州森林研究 69:149-151  
 宮崎和弘ほか (2017) 九州森林研究 70:117-120  
 Munsch P *et al.* (2002) Int J Syst Evol Microbiol 52:1973-1983  
 Müller HE *et al.* (1995) Curr Microbiol 31:287-290  
 陶山一雄・藤井 溥 (1993) 東京農業大学農学集報 38:35-50  
 陶山一雄ほか (2000) 東京農業大学農学集報 44:295-301  
 Tsuneda A *et al.* (1995) Mycoscience 36:283-28  
 (2017年11月8日受付;2018年1月24日受理)