



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモ塊茎腐敗の発生生態解明と新規防除法の検討
Author(s)	大澤, 央
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13924号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13924
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80685
Type	doctoral thesis
File Information	Hisashi_osawa.pdf



ジャガイモ塊茎腐敗の発生生態解明と 新規防除法の検討

北海道大学 大学院農学院
生物資源科学専攻 博士後期課程

大澤 央

目次

第1章	緒言	1
	1.1 ジャガイモ生産と塊茎腐敗	1
	1.2 ジャガイモ栽培におけるジャガイモ疫病の防除	2
	1.3 植物病理学と本研究の意義	2
	1.4 謝辞	2
第2章	研究史	4
	2.1 ジャガイモ疫病研究の歴史	4
	2.2 ジャガイモ疫病菌の分類・生態	5
	2.3 塊茎腐敗とジャガイモ疫病防除	7
	2.4 土壌微生物定量法の発展	12
第3章	簡便なジャガイモ疫病菌サンプリング法の開発	14
	3.1 背景	14
	3.2 目的	14
	3.3 材料・方法	14
	3.4 結果	15
	3.5 考察	17
第4章	塊茎受傷と貯蔵腐敗の関係	19
	4.1 背景	19
	4.2 目的	20
	4.3 材料・方法	20
	4.4 結果	22
	4.5 考察	25

第5章	土壌中のジャガイモ疫病菌密度の定量法	27
4.1	背景	27
4.2	目的	27
4.3	材料・方法	28
4.4	結果	31
4.5	考察	34
第6章	土壌中のジャガイモ疫病菌密度の推移 ならびに感染ポテンシャル	38
I	土壌への疫病菌遊走子のうの浸透	38
6.I.1	背景	38
6.I.2	目的	38
6.I.3	材料・方法	39
6.I.4	結果	40
6.I.5	考察	43
II	無防除圃場における土壌ジャガイモ疫病菌密度の推移	45
6.II.1	背景	45
6.II.2	目的	45
6.II.3	材料・方法	45
6.II.4	結果	46
6.II.5	考察	49
III	DNA 量と感染ポテンシャルの関係	51
6.III.1	背景	51
6.III.2	目的	51
6.III.3	材料・方法	51
6.III.4	結果	52
6.III.5	考察	53

第7章	殺菌剤処理による貯蔵腐敗軽減	55
	I 殺菌剤の処理に伴う土壌菌密度の変化	55
	7.I.1 背景	55
	7.I.2 目的	56
	7.I.3 材料・方法	56
	7.I.4 結果	57
	7.I.5 考察	60
	II 圃場における残渣への殺菌剤処理に伴う 土壌菌密度の変化と防除効果	61
	7.II.1 背景	61
	7.II.2 目的	61
	7.II.3 材料・方法	61
	7.II.4 結果	64
	7.II.5 考察	67
第8章	圃場において欠株症状を引き起こす病原糸状菌の同定	69
	8.1 背景	69
	8.2 目的	69
	8.3 材料・方法	70
	8.4 結果	72
	8.5 考察	80
第9章	総合考察	82
	9.1 塊茎腐敗の発生生態とその防除	82
	9.2 土壌菌密度定量法の今後の応用	82
	摘要	85
	Summary	87
	参考文献	90

第1章 緒言

1.1 ジャガイモ生産と塊茎腐敗

ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.)はコムギ・イネ・トウモロコシと並んで農業生産上重要な作物である。世界人口の増加が見込まれる昨今では、地中に可食部があることや栽培が比較的容易かつ多収であることからジャガイモ栽培が注目されている。日本では、北海道が主なジャガイモ産地であり、次いで長崎県・鹿児島県で収穫量・作付面積が多く栽培が盛んである(農林水産省生産流通消費統計課 2018)。北海道は広大な土地が利用できることに加え、冷涼な気候を好むジャガイモの生育適期を夏季に長く確保することができることが大規模な栽培を可能にしている。一方で長崎県をはじめとした暖地では北海道ほどの大規模栽培を行っている生産者は少ないものの春作・秋作の二期作を行うことができるため、北海道で栽培・収穫・出荷ができない時期にジャガイモを市場に流通させる上で重要かつ注目されている産地である。

ジャガイモの可食部である塊茎の腐敗は糸状菌・細菌・ウイルスによって引き起こされるが、ジャガイモ疫病による塊茎腐敗は貯蔵庫内で大規模に発生することがあるためとりわけ問題になっている。ジャガイモ疫病(以下、疫病)はジャガイモ疫病菌(以下、疫病菌)*Phytophthora infestans* (Mont.) de Baryによって引き起こされるジャガイモの重要病害の一つである。地上部が感染すると暗緑色水浸状の病斑を形成し、主に葉の裏には白色の遊走子のうを大量に形成する。塊茎が疫病菌に感染すると塊茎腐敗を引き起こす。また、疫病の他に塊茎腐敗を引き起こす病原の例として、乾腐病菌が挙げられる。ジャガイモ乾腐病(以下、乾腐病)はジャガイモ乾腐病菌(以下、乾腐病菌)である *Fusarium* 属菌の複数種によって引き起こされるジャガイモの代表的な貯蔵病害である。塊茎が感染すると塊茎表面には白色・紅色など菌種によって異なる菌糸の旺盛な生育が認められ、内部組織は黒変し、腐敗部に空隙を形成することが多い。しばしば空隙内部にも菌糸の旺盛な生育が認められる。病徴が進展すると塊茎がミイラ状に収縮・固化する。感染塊茎が種いもとして植え付けられると地中で腐敗し欠株となる。このような塊茎腐敗はジャガイモの安定的な生産・流通の妨げになっている。

1.2 ジャガイモ栽培におけるジャガイモ疫病の防除

ジャガイモを無防除で栽培すると 22–44 %の減収率になると報告されている(日本植物防疫協会 2008)。この数値は病害だけではなく虫害を含んでいるが、とりわけ疫病は甚大な被害をもたらす。したがって、栽培中に疫病を抑えることがジャガイモの安定的な栽培に必要である。疫病は冷涼・多湿の条件で多発し、罹病植物体から健全な植物体へ広まるスピードが早い特徴がある。したがって、疫病発生後に伝播を抑えることを目的とした防除法ではなく、そもそも圃場に疫病を発生させないような予防的な防除が肝要である。

疫病の防除に限らず、近年の植物の病害防除では総合的病虫害管理 (Integrated Pest Management: IPM)の考え方に基づいて防除体系を考えることが一般的になってきた。IPM とは病害を殺菌剤等で完全に抑える従来行われてきた農薬至上主義的な防除法とは異なり、経済的に損失が出ない範囲での病害発生は許容し、病害発生程度が経済的被害の見込まれる水準 (要防除水準)を超えてから農薬を適切に使用する病害防除の考え方である。この際に (1)耕種的防除, (2)物理的防除, (3)化学的防除, (4)生物的防除, といった様々な防除法を矛盾なく合理的に組み合わせ、農薬に頼りすぎない防除法を考える。疫病防除も例外ではなく、IPM の考え方に基づいて複数の防除方法を組み合わせて防除を行なっている生産者が多い。

1.3 植物病理学と本研究の意義

このように、疫病を始めとして塊茎腐敗の防除・予防は今後予想される世界人口増加を鑑みても産業上必要不可欠である。特に疫病は古くから認知され、研究されてきた病害であるにも関わらず、発生生態や効果的な防除法の研究は未だ不十分であり未知な点も多い。本研究では、ジャガイモ疫病を始めとしてジャガモ塊茎に発生する塊茎腐敗症状において植物病理学的に有意義な知見が得られたため報告する。

1.4 謝辞

本研究を遂行するにあたり、北海道大学大学院農学研究院植物病理学研究室講師の秋野聖之博士には実験全般をはじめとして論文執筆のご指導をいただいた。同大学北方生物圏フィールド科学センター教授、近藤則夫博士には論文発表にあたり的確なご指導・ご校閲の他、*Fusarium* 属菌に関する研究のご助言をい

いただいた。同大学大学院農学研究院植物病原学研究室教授の増田税博士には論文執筆・統計解析にあたり終始懇切なご指導を賜った。著者と同じ研究室に所属しジャガイモ研究を行った鹿島健太氏、鈴木宣之氏、大塚美幸氏、福江由佳氏、上堂陽葉氏、宮地将之氏、塩平真士氏、平山義規氏には実験計画や実験途中経過における適切なご助言ばかりか実験補助をしていただいた。加えて北海道大学農学院植物病理学研究室にはあらゆる形でご指導をいただいた。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター芽室研究拠点の田宮誠司氏、浅野賢治博士、赤井浩太郎氏には無防除圃場・サンプルの提供をしていただいた。長崎県農林技術開発センター馬鈴薯研究室の坂本悠氏、土幌町農業共同組合の田中政伸氏、小倉瑛矢氏、小林真有加氏、カルビーポテト株式会社の小泉恵美子氏、荒木宏通博士にはサンプル・写真の提供および実験施設を利用させていただいた。

さらに、岐阜大学流域圏科学研究センター教授の景山幸二博士、北海道立総合研究機構の三澤知央博士、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センターの串田篤彦博士にはDNAの扱い方に関して適切で建設的なアドバイスをいただいた。

本研究はJSPS 科研費 JP19J10787 (特別研究員奨励費)の助成を受けて遂行された。科研費の取り扱いに関して、北海道大学農学部第1分野事務室の高橋紀美氏には事務作業を一手に担っていただいた。

多くの方々のご厚意によって本研究は遂行できた。論文執筆にあたり、ここに深く感謝の意を表する。

令和元年 12 月
大澤 央

第2章 研究史

2.1 ジャガイモ疫病研究の歴史

疫病研究の歴史は古く、19世紀にまで遡る。1845年にアイルランドジャガイモ飢饉が発生し、多くのアイルランド人が飢餓に苦しんだ。この飢饉の原因となった病害がジャガイモ疫病である。植物病理学の父とも呼ばれる de Bary によってこの飢饉は菌によって引き起こされる伝染性の病害であると立証された (de Bary 1876)。疫病によってこれほど大きな被害が発生した原因として、当時のアイルランドの主な栽培品種が感受性であったためであると考えられている (Bourke 1964)。

疫病菌の起源は、その遺伝的多様性からメキシコ中央高原部トルカ付近であると考えられている (Goodwin et al. 1992; Grünwald et al. 2001)。また、疫病菌の世界規模の伝搬は2度起こったとされる。1度目はアメリカを経由してイギリス・ヨーロッパに移動したもので、1840年前半に起こったものである。2度目は、メキシコからヨーロッパへのジャガイモ輸出によって1976年から77年にかけて起こったと考えられている。この2度目の伝搬によってA1交配型のみならずA2交配型がヨーロッパにもたらされ、多様性を生む原因となった (Goodwin 1997)。疫病菌はヘテロタリックな菌であり、交配し卵胞子を形成するにはA1、A2交配型の存在が必要である。現在でもヨーロッパは日本に比べて複雑な集団構造であり、今後も新しい遺伝子型の出現に注意が必要である。

日本においては、1900年に北海道と長野県で疫病菌が発見された (出田 1901)。当時の遺伝子型は定かではないが、1980年代に各国で遺伝子型の調査が行われてきたことを受け、日本でも調査が行われた。加藤ら (1994)の報告では、1993年の北海道ではA2交配型がすでに97%を占めていたとの報告がある。著者が所属する北海道大学農学部植物病理学研究室では、1987年から疫病菌の遺伝子型を調査している。1987年にはUS-1、JP-1の2つの遺伝子型が確認されているが、その後1990年代後半にJP-2、2000年代前半にJP-3、JP-4が出現し、これまでに計5種類の遺伝子型が日本では発見されている。現在では主にJP-3、JP-4の2遺伝子型が北海道内では主に分離され、北海道外にも広がっている (Akino et al. 2014; 大澤ら, 2016a; 大澤 2018)。

2.2 ジャガイモ疫病菌の分類・生態

一般的に、*Phytophthora* 属菌が病原である植物の病害は「疫病」と呼称されることが多く、病徴は萎凋・立枯れ・黄化・根腐れ・腐敗などである。日本では、約 300 種以上の植物で 50 種以上の疫病が発生している (植松 2015)。疫病菌の分類学的位置は分子生物学の発展により目まぐるしい変遷を経ているが、未だに議論の余地がある。Dick (2001)は疫病菌が含まれるエキビョウキン属をストラミニピラ界 ヘテロコンタ門 ツユカビ亜門 ツユカビ綱 ツユカビ亜綱 フハイカビ目 フハイカビ科の 1 属であると論じている。Dick (2001)以降は疫病菌が属する卵菌類に対して分子系統学的な検討が重ねられ、現在ではクロミスタ界 偽菌門 卵菌綱 (Ruggiero et al. 2015)と分類することがある。また、近年では生物をクラスターに分類する新しい分類法も一般化しており、その分類では疫病菌は、真核生物ドメイン ディアフォレティケスクラスター Sar スーパーグループ ストラメノパイル類 ギリスタ門 ツユカビ綱 Peronosporalean lineage に属する (Adl et al. 2005; Adl et al. 2012; Adl et al. 2019)。今後もさらなる分子系統学的研究の発展に伴い、混乱・変更が予想される。

疫病に罹病した植物体の地上部の初期病斑は、暗緑色水浸状の病徴であることが多い。品種・状態によっては病斑の周囲に明緑色のハローを生じる場合もある。主に葉の裏面に白色の遊走子のうを大量に形成する (図 2.1a)。遊走子のうはレモン型から卵型であり、先端に乳頭突起を持つ。疫病菌の胞子は複数種存在し、無性生活環では遊走子のう・遊走子を形成する (図 2.2)。一方で有性生活環では卵胞子を形成する。卵胞子は厚い細胞壁を持ち、耐久体として生育に不適な環境下でも長期間生存することができる。遊走子のうには (1)直接発芽 (2)間接発芽 の 2 種類の発芽形式が存在する。(1)直接発芽は遊走子のうから直接菌糸を伸長させる発芽様式であり、比較的高温 (最適温度 約 20–25 °C)で多く観察される。一方で、(2)間接発芽は遊走子のうから遊走子を放出する発芽方式で、比較的低温 (最適温度 約 10–15 °C)で多く観察される。遊走子は遊泳能力のある胞子であり、細胞壁を欠く。遊走子の運動時間は 60 分以内と報告されており、その後は被のう胞子となる。罹病植物体上に到達できた被のう胞子は発芽管を伸ばして宿主植物に侵入する。感染の成立から 2 週間ほど病徴が見られない潜在感染期間が続く (Fry 2008)。その後は組織の壊死が起こり、生育に適した温度・湿度条件が整うと主に気孔から遊走子のう柄を伸ばし、先端に遊走子のうを形成する。疫病の病斑には大量の離脱性の遊走子のうが形成され、1 病斑

あたり最大で30万個の遊走子のうが形成されとの報告もある (Fry 2008). この性質により、疫病はたった数日間で圃場一面を一変させるほどの強力な伝染力を持つことが多く、現在まで恐れられてきた (図 2.1b).



図 2.1 ジャガイモ疫病による病斑と激発圃場

a 葉裏面に形成されたジャガイモ疫病の病斑. b 激発し枯死した感受性品種

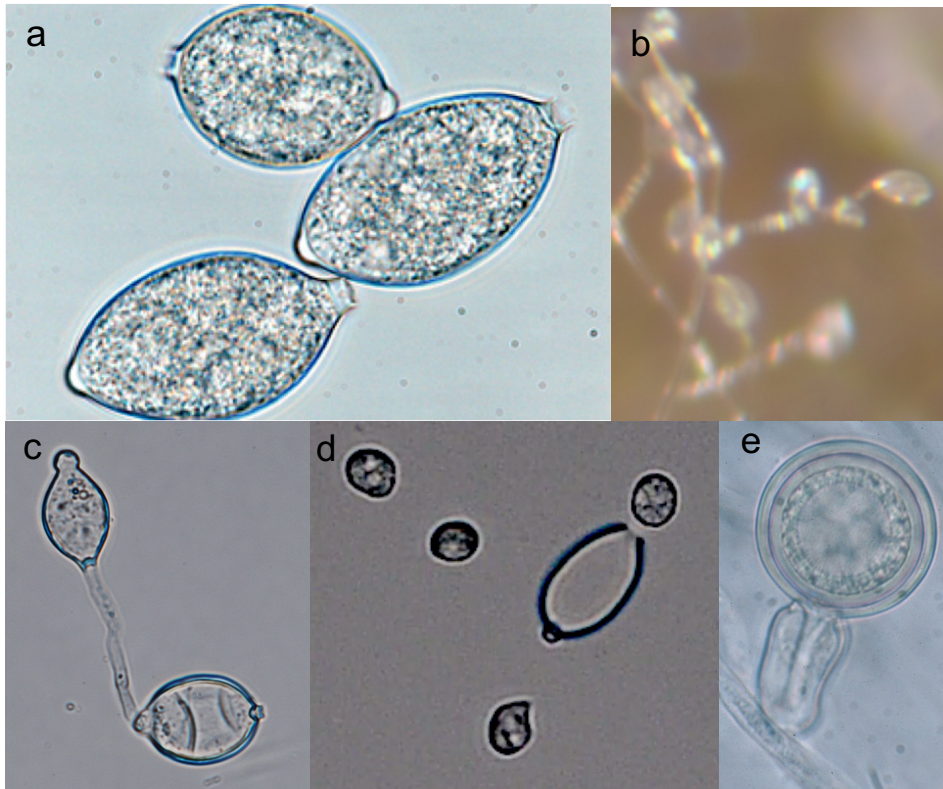


図 2.2 ジャガイモ疫病菌の構造物

a 遊走子のう (写真提供：秋野聖之博士). b 遊走子のう柄に着生する遊走子のう. c 遊走子のうの直接発芽. d 遊走子のうの間接発芽. e 卵胞子 (写真提供：秋野聖之博士).

2.3 塊茎腐敗とジャガイモ疫病防除

ジャガイモの塊茎腐敗は疫病のみならず、様々な糸状菌・細菌・ウイルスによって引き起こされる。細菌によって引き起こされる病害の代表例としては、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* による軟腐病が挙げられる。糸状菌による病害としては *Fusarium* spp.による乾腐病、*Phytophthora erythroseptica* による緋色腐敗病、*Pythium* spp.による褐色腐敗病がある。また、ウイルスでは塊茎にえそ病斑を伴うものもある他、黒色心腐病は塊茎の呼吸抑制に伴う生理病である。

塊茎が疫病に感染すると肉質部が赤褐色に腐敗する (図 2.3). 疫病のみに起因する塊茎腐敗は軟化を伴わない特徴がある。疫病菌により腐敗した塊茎は二次的な雑菌の繁殖により軟化腐敗することが多い。秋野ら (2018)は疫病菌に感染

した軟化腐敗塊茎から細菌の分離・同定を試み、複数の病原性 *Bacillus* 属菌が分離・同定されたと報告した。興味深いことに、すでにジャガイモに病原性が報告されているジャガイモ軟腐病菌は分離されなかった。このような二次的な雑菌の繁殖が進行した腐敗塊茎は疫病菌以外の糸状菌も多く観察される。

疫病菌の塊茎への侵入門戸は塊茎の目・皮目・傷・無傷の表皮・ストロン付着部 (Jones et al. 1912; Lacey 1967a; Darsow 2004)・塊茎肥大に伴う表皮の亀裂 (Lapwood 1977)と報告されている。一方で、塊茎が無傷であれば塊茎腐敗は稀であるとの報告 (大澤ら, 2016b)や、塊茎の抵抗性は成熟度合いによって変化するとの報告 (Zan 1962)もあるため、感染の成立は宿主・環境条件に大きく依存する。塊茎の感染は栽培中 (Lapwood 1977; Sato 1980)・収穫時 (Nærstad et al. 2010; Osawa et al. 2018)・その後の取り扱い (Dowley and O’Sullivan 1991)で起こると報告されている。栽培中の感染は地上部病斑から遊走子のう・遊走子が降雨等で地表に落下し、土壤中を浸透して起こるとされている。収穫時・その後の取り扱い時の感染は汚染土壌と塊茎が接触することで起こる。また、貯蔵庫における腐敗はしばしば大規模に発生する (図 2.4a)。しかし、時間の経過に伴い、疫病腐敗塊茎は二次的な他の微生物の生育によって軟化腐敗することが多い (図 2.4b)。

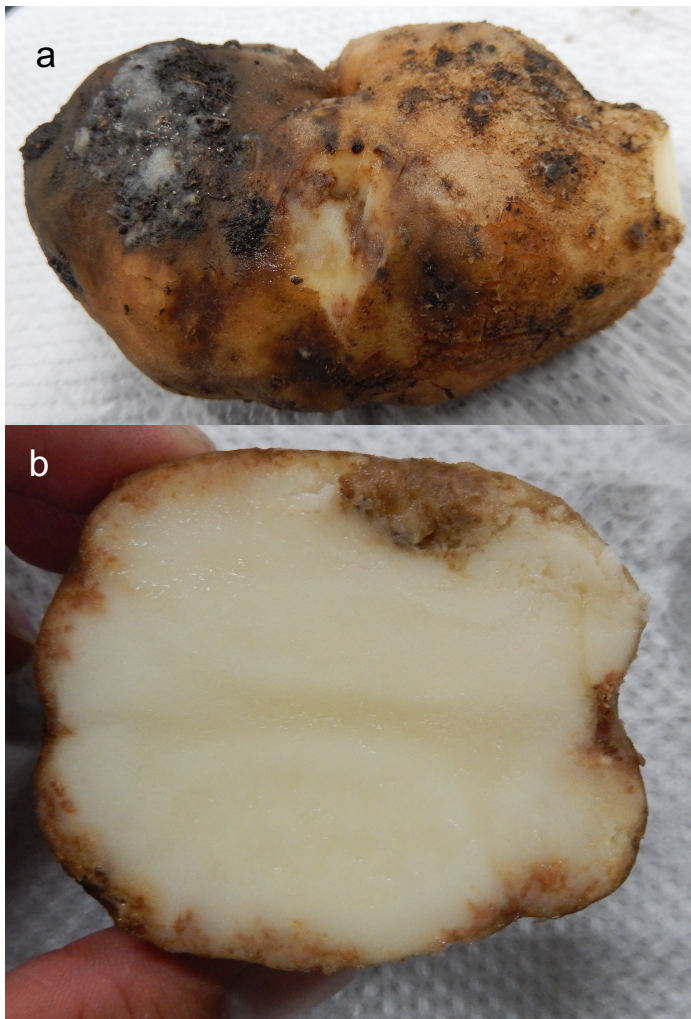


図 2.3 ジャガイモ疫病によって腐敗した塊茎

a 発病圃場で発見された疫病罹病塊茎. b 接種によって再現された疫病罹病塊茎の切断面

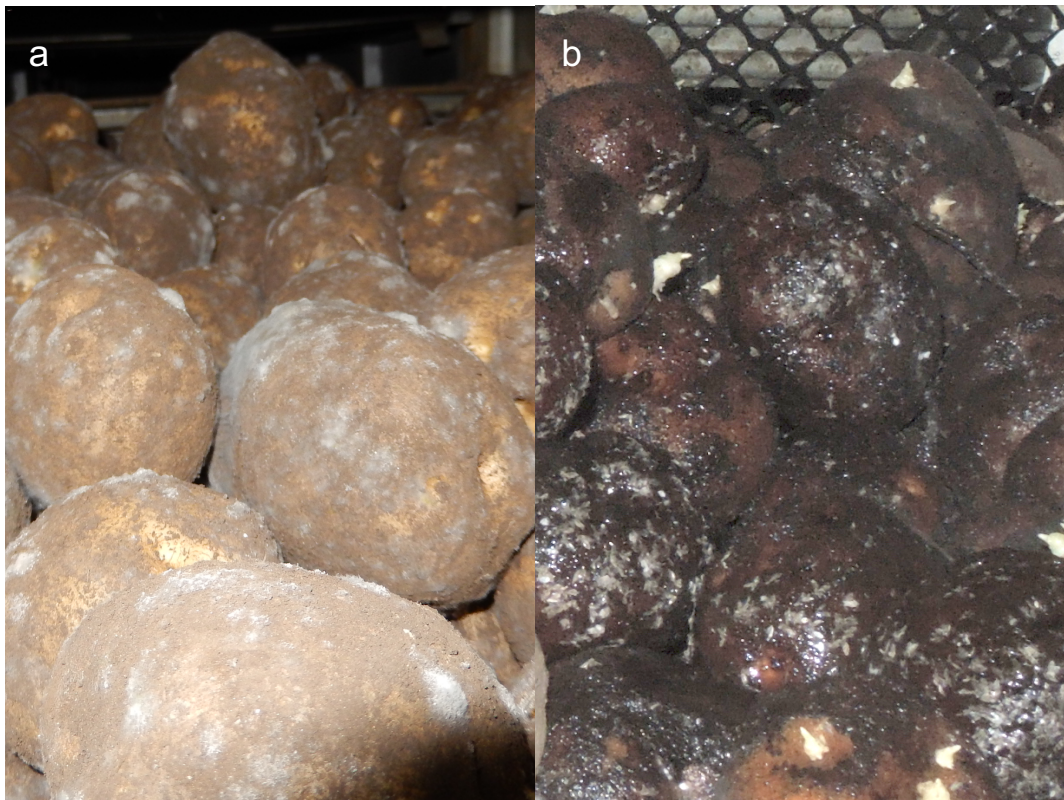


図 2.4 貯蔵庫内における腐敗塊茎

a 疫病罹病塊茎. b 二次的な腐敗が進行し，細菌性腐敗により軟化した塊茎.

日本におけるジャガイモ疫病の防除は殺菌剤に大きく依存している．近年，IPM (Integrated Pest management: 総合的病虫害防除管理)の考え方が一般的になっており，疫病防除も例外ではない．しかし，日本では抵抗性品種が広まっていないうえ，現時点において日本で認可・販売されている生物防除資材も存在しない．したがって，圃場衛生・健全種いもの使用といった耕種的防除は当然のこととした上で，化学的防除である殺菌剤散布に大きく依存する他ない現状がある．通常，疫病は予防的に殺菌剤を散布する必要があることから，約 1 週間隔で殺菌剤散布が行われる．しかし，近年初発前に殺菌剤を散布することで 2 週間おきの防除であっても従来と同等の防除効果が見込まれる「ダブルインターバル散布」が一般化している．ダブルインターバル散布により，収量・品質は保ちながらも減農薬栽培が可能となった．

一方，疫病菌には殺菌剤耐性菌の存在が知られている．メトラキシル耐性はその最たる例である．メトラキシルはその卓効から広く利用されてきた殺菌剤

であり、耐性菌は発見以降分布域の拡大や分離頻度の上昇が確認されてきた。このことから現在では、メタラキシル使用を控えるように呼びかけられている。日本においては、JP-1, JP-2, JP-3 系統がメタラキシルに対して耐性である (Gotoh et al. 2005)。海外ではメタラキシルに耐性であり病原力が大きい 13_A2 系統 (Blue-13)の世界的拡散が問題となっている。この系統は 2005 年にイギリスで初発見されたが (Lees et al. 2009)、現在ではヨーロッパ全域で分布しており、日本付近ではすでに中国にまで分布域を広げている (Tian et al. 2016)。幸いにも日本では本系統は確認されていないが、今後の侵入に注意が必要である。

また、塊茎腐敗の防除に関して、現在の日本では栽培中の殺菌剤散布が行われている。平成 31 年度 北海道農作物病害虫・雑草防除ガイドによると、現在の北海道では 8 剤の殺菌剤が塊茎腐敗に対して効果が確認されたとしている (表 2.1) (北海道病害虫防除所 2019)。しかし、これらの殺菌剤の使用方法は全て茎葉散布である。

一方で収穫後の塊茎に散布可能な殺菌剤は日本では認可されていない。収穫以降の塊茎は食品として扱われるため、食品関連法令に則って防除が行われなければならない。食品衛生法第 4 条 2 項では、「この法律で添加物とは、食品の製造の過程において又は食品の加工若しくは保存の目的で、食品に添加、混和、浸潤その他の方法によつて使用する物をいう。」と食品添加物が定義されている。したがって、塊茎の保存を目的としている防除、すなわちポストハーベスト処理に利用可能であるのは食品添加物のみであるため、食品ではない殺菌剤は規制対象である。一方で、国際的な食品規格である Codex ではジャガイモにおいてポストハーベスト農薬に対する残留基準を定めており、イマザリル、アゾキシストロビンなどが記載されている (Codex Alimentarius 2019)。

表 2.1 北海道において塊茎腐敗に効果が認められている殺菌剤 (平成 31 年度北海道農作物病害虫・雑草防除ガイドを改変)

商品名	成分名	日本における製造元
エトフィンフロアブル	エタボキサム	日本曹達株式会社
プロポーズフロアブル	ベンチアバリカルブイソプロピル・TPN	クミアイ化学工業株式会社
レーバスフロアブル	マンジプロパミド	シンジェンタジャパン株式会社
ランマンフロアブル	シアゾファミド	石原バイオサイエンス株式会社
ライメイフロアブル	アミスルブロム	日産化学株式会社
フロンサイド水和剤	フルアジナム	石原バイオサイエンス株式会社
フロンサイド SC	フルアジナム	石原バイオサイエンス株式会社
リライアブルフロアブル	フルオピコリド・プロパモカルブ塩酸塩	バイエルクロップサイエンス株式会社

2.4 土壌微生物定量法の発展

土壌中には様々な微生物が生息しており、その数を正確に定量することは困難である。植物病理学分野に限らず、古典的かつ代表的な微生物定量方法は希釈平板法 (Dilution plate method) である。本法は、任意の倍率で希釈した試料を培地に塗布・培養し、出現コロニー数と希釈倍率から試料の微生物密度を推定するものである。とりわけ土壌中の微生物を定量する際には土壌希釈平板法と呼ばれる。本方法は当初土壌中の細菌を定量するために開発されたが (Waksman 1927), のちに糸状菌でも応用可能であると報告された (Warcup 1955)。しかし、本方法は (1) 培養期間が必要であるため迅速な定量ができない (2) 培養不可能な微生物は定量できない という短所がある。

したがって、土壌中の微生物 DNA に注目した方法が注目されている。このような微生物群集全体に注目した解析は土壌試料のみならず河川における生物個体数の推定といった手法にも用いられており、環境 DNA と呼ばれる。星野・長

谷部 (2005)によると、土壌からの DNA 抽出法は (1)直接抽出法 (2)間接抽出法に大別される。(1)は土壌試料そのものから直接 DNA 抽出する方法である。この方法は DNA 収量が多い長所がある反面、腐植酸などの反応阻害物質も多く抽出されてしまう短所もある。一方、(2)は土壌試料から遠心などで土壌画分を除いたのちに DNA 抽出する方法である。反応阻害物質は少ない長所がある一方で DNA 収量も少ない短所もある。(1) (2)の方法は一長一短であるため、目的に応じた DNA 抽出法の選択が大切である。

環境 DNA のような希薄な DNA 溶液を正確かつ迅速に定量する方法として、リアルタイム PCR が注目されている。リアルタイム PCR は 1993 年に考案され (Higuchi et al. 1993)、現在では DNA 量の定量のみならず mRNA に注目した RT-リアルタイム PCR による発現量解析、SNP 解析等にも活用されている。リアルタイム PCR は PCR による 1 サイクル毎の増幅量を蛍光色素によるシグナル強度として定量しており、反応方法によって大きく (1)インターカレーター法 (2)蛍光標識プローブを用いた方法 の 2 種類に大別される。特に、(2)の方法で代表的に用いられる方法が TaqMan プローブを用いた蛍光 5'ヌクレアーゼケミストリ (Holland et al. 1991)である (以下、TaqMan 法)。本法は Lee ら (1993)や Levak ら (1995)によって改良された。TaqMan 法は、5'末端に蛍光物質、3'末端にクエンチャー物質で修飾されたオリゴヌクレオチドプローブを使用する。PCR 反応の伸長反応時に、TaqDNA ポリメラーゼが持つ 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性により TaqMan プローブが分解され、クエンチャー物質が蛍光物質から離れることにより蛍光を発する。発した蛍光シグナルの強度の大小で PCR 反応産物の量を定量できる仕組みである。

また、近年ではリアルタイム PCR 以外の希薄な DNA 溶液の正確かつ迅速な定量方法として、リアルタイム LAMP、デジタル PCR が注目されつつある。リアルタイム LAMP 法はリアルタイム PCR と同様に LAMP 反応を蛍光強度によってリアルタイムに測定し、初期 DNA 量を定量する方法である。また、デジタル PCR は試料を多数の極小ウェルに分注し、ウェルごとの PCR 反応の有無の割合によって試料の濃度を推定する方法である。これらの定量法はリアルタイム PCR にはない長所から様々な研究対象で活発に研究がされており、疫病菌でも報告がある (Ristaino et al. 2019)。これらの定量法とリアルタイム PCR はそれぞれ長所・短所が存在するため目的に応じて適切な方法が選択されるべきであり、今後の研究の発展が望まれる。

第3章 簡便なジャガイモ疫病菌サンプリング法の開発

3.1 背景

植物病原微生物の分離は病害を問わず基本的な技術である。糸状菌では一般的に、罹病部位を表面殺菌・洗浄ののちに培地に置床し、組織から伸長した菌糸から純粋に培養する方法（以下、常法）が一般的である。ジャガイモ疫病の茎葉病斑の場合、本研究室では常法による分離は使用されないことが多い。常法で分離を試みた場合、菌糸伸長が全く認められずに分離に失敗することが多いためである。そのため、本研究室では疫病菌を罹病茎葉組織から分離する際は Newspaper bag method（以下、ペーパーバッグ法）(Sato et al. 1991)を採用してきた。ペーパーバッグ法は発病圃場で採取した罹病茎葉を新聞紙に挟んで実験室に輸送し、塊茎スライスで分離する方法である。現在本研究室では塊茎スライスの代わりに Sato and Kato (1993)の選択培地を改変し、Rye-B 寒天培地 (Caten and Jinks 1967)にリファンピシン、アンピシリンナトリウム、ナイスタチンをそれぞれ 25, 100, 50 ppm の濃度で添加した培地を用いている。

3.2 目的

各地からサンプルを集めるため、採集法にはさらなる省力化や簡便化が望まれた。また、遠方から罹病葉サンプルを搬送する場合、搬送期間があるため採取 1-3 日後の病斑から分離することとなり、サンプル状態の悪化によって分離成功頻度が下がる可能性があった。以上の点から、選択培地を圃場に直接持ち込む「遊走子のう直接採取法（以下、直接法）」を開発した。

3.3 材料・方法

圃場試験を 2016 年、2017 年の北海道十勝地方の疫病発生圃場で行った。直接法の詳細は以下の通りである。

1. 選択培地を作成した。滅菌した Rye-B 寒天培地をウォーターバスで 53 °C に調整し、リファンピシン、アンピシリンナトリウム、ナイスタチンをそれぞれ 25, 100, 50 ppm になるよう加えた。
2. 選択培地を 6 cm シャーレに分注し、保冷剤入の発泡スチロール箱に入れて圃場に持ち込んだ。
3. 圃場でシャーレを開け、白色の遊走子のうが形成されている病斑を培地表

面に指で軽く押し当てることで遊走子のうを付着させた (図 3.1a).

4. シャーレの蓋を閉じ、保冷剤と共に発砲スチロール箱に入れ、研究室に持ち帰った.
5. 研究室到着後は直ちに 15 °C 暗所で培養した.

直接法の実用性をペーパーバッグ法と比較する試験を行った. 同一品種で同程度進展している同植物体上もしくは近くの病斑を 5 つ採集し, うち 1 病斑は圃場で直接法にて遊走子のうを培地上に採取した. 残り 4 病斑は茶封筒に入れ, 保冷しながら研究室に持ち帰った (移動時間: 3-6 時間). 持ち帰った病斑は直ちに 4 °C に保冷し, それぞれ当日, 1 日後, 2 日後, 3 日後に病斑の遊走子のうを寒天片を用いて釣り上げて選択培地に採取した. これらの試験区をペーパーバッグ法とした. 全てのシャーレは顕微鏡で培地に遊走子のうが付着していることを確認したのちに 15 °C 暗所で約 10 日間培養した. 評価は疫病菌の菌そうが認められるものを「成功」と評価し, 菌の伸長が認められない, 他の雑菌の生育によって今後の分離作業が困難であるものを「失敗」と評価した. 若干の糸状菌, 細菌の混入があってもその後の分離作業に支障がなければこれも成功とした. 一連の試験は各 100 回ずつ行い, 分離の成否を記録した. 統計解析は当日, 1 日後, 2 日後, 3 日後のデータをそれぞれ直接採取法と比較し, カイ二乗検定で IBM SPSS バージョン 22 を用いて検定した.

3.4 結果

直接法によって遊走子のうをシャーレの培地表面に容易に採取できた. 付着した遊走子のうは培養後数日すると発芽し, 数日後に菌そうを形成した (図 3.1b-d). 分離成功数は経過日数, 分離方法に関わらず 100 例中 68-81 例と高かった (表 3.1). 直接法の分離失敗理由は, 糸状菌・細菌の混入が 22 例と少し高く, 菌そう形成のなかった例は 5 例と少なかった. 2016 年採取データの方が 2017 年採取データよりも直接法・ペーパーバッグ法ともに分離率が低かったが, カイ二乗検定で成功数の有意な差はなかった.

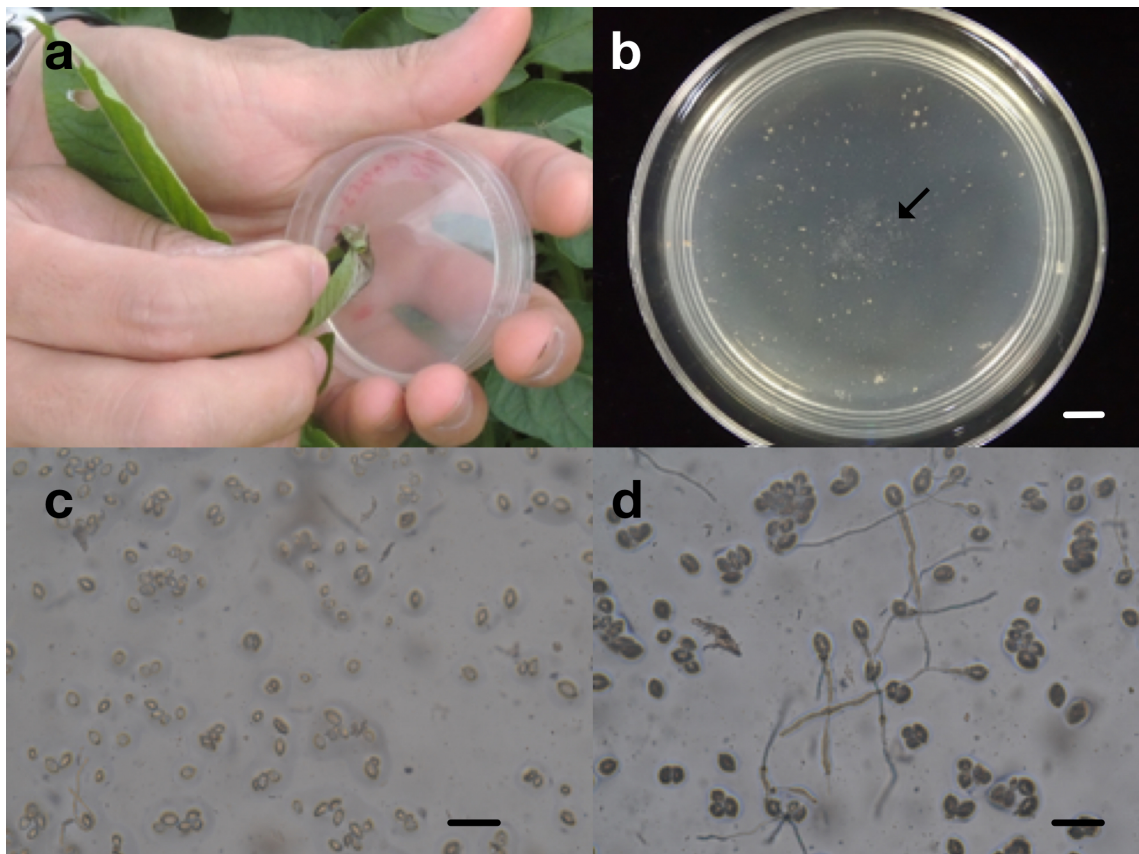


図 3.1 直接採取法によるサンプリングおよび遊走子のうの発芽 (Suzuki et al. 2019).

a 圃場における直接採取法によるサンプリング. b 選択培地上に付着した遊走子のう (矢印). バーは 1 cm. c 採取直後の遊走子のう. バーは 100 μm . d 選択培地上で発芽した遊走子のう. バーは 100 μm .

表 3.1 遊走子のう直接採取法 (直接法)・Newspaper bag method (ペーパーバッグ法)による分離成功数

		直接法	ペーパーバッグ法			
			0	1	2	3
2016 (n=39)	成功	26	25	25	20	18
	失敗	13	14	14	19	21
2017 (n=61)	成功	47	53	56	50	50
	失敗	14	8	5	11	11

2016 年, 2017 年, 両年合計の分離成功数はカイ 2 乗検定で 5 %水準で有意差なし. (Suzuki et al. 2019) を改変.

3.5 考察

本試験から, 直接法は簡便で新しい採取法として有用であることがわかった. 本研究室では直接法を使用したサンプリングを 2014 年から行っているが, ペーパーバッグ法と比較しても遜色なく分離できている. 遊走子のうは主に葉の裏面に多量に形成することから, たとえ雨天であっても葉の裏面は濡れていないことが多いため, 問題なく遊走子のうの採取作業ができる. 本研究で検討した選択培地を用いた圃場試験結果は分離成功数が 73 例と高く, 解析結果で直接法は従来法のいずれの区とも成功数に有意な差がなかった. このことから, 直接法とペーパーバッグ法の分離率の違いは少なく, 十分実用的であると考えられた. 直接法の成功数の多さの理由として, 新鮮な遊走子のうを採取できたことで疫病菌遊走子のうの活性が高かったためであると考えられる. また, 分離後 2, 3 日後のサンプルからペーパーバッグ法で分離した場合は疫病菌の生育が認められない例が多かった. 理由として, 冷蔵による疫病菌を含めた微生物の活性低下が一因の可能性もある. 冷蔵過程は疫病による病徴進展や植物体の劣化を妨げる役割があるのでペーパーバッグ法では輸送時に冷蔵すべきであるが, 冷蔵は分離率の低下も招くことがわかった. 一方, 雑菌の混入によって分離ができなくなる例はペーパーバッグ法よりも直接法の方が多かった. これは分離源の罹病葉病斑は疫病菌のみならず雑菌の活性も高かったためであると考えられる. 雑菌の混入は細菌または糸状菌の混入が高頻度で観察された. 選択培地の

構成から、細菌の生育はリファンピシン・アンピシリンナトリウムによって阻害されるが、*Pythium* 属などの疫病菌に近縁の微生物は生育を阻害されない。したがって、もし疫病菌に近縁の微生物が存在した場合には培地組成のみで選択分離できない。しかし、それら疫病菌以外の菌は肉眼による培養性状の違いや顕微鏡による分生子等の形態観察により容易に判別することができる。

直接法が利用できない状況として、遊走子のう採取が困難な状況が挙げられる。たとえば乾燥や病徴進展により病斑に遊走子のう形成が認められない場合や茎に病斑が形成されている場合である。前者の場合は遊走子のうを採取できないため直接法の適用ができず、後者の場合は病斑をシャーレに押し付けづらという問題点がある。これらの場合は従来のペーパーバッグ法が適当である。したがって、直接法は従来のペーパーバッグ法と比較しほぼ変わらない分離率である上に簡便な方法であるが、時としてはペーパーバッグ法が必要になる。

第4章 塊茎受傷と貯蔵腐敗の関係

4.1 背景

研究史で述べたように、塊茎の感染は栽培中、または収穫時に起こると報告されている。栽培中に感染した塊茎は土壌中で腐敗し、腐敗塊茎は収穫時の選別で廃棄されるため、貯蔵庫内には栽培中の腐敗塊茎は多くは存在しないと考えられる。しかし、貯蔵庫ではしばしば大規模な貯蔵腐敗が発生する。したがって、著者らの研究グループでは、貯蔵庫内で散見される大規模な貯蔵腐敗の原因は、収穫に伴って受傷した塊茎 (図 4.1) が汚染土壌と混和されることで起こる、と仮説を立てた。著者らは人工接種条件で本仮説を立証したが (Osawa et al. 2018)、自然発病圃場の汚染土壌程度の疫病菌密度でも同様の現象が起こるのかは不明である。



図 4.1 収穫時に受傷 (矢印部) した塊茎。

4.2 目的

貯蔵中の腐敗塊茎量を減少させるためには、貯蔵塊茎腐敗の発生生態を解明する必要がある。第 2 章で述べたように、塊茎の感染は栽培中・収穫時および取扱いによって引き起こされると報告がある。しかし、大規模な貯蔵腐敗の発生原因に限定して考えると、塊茎が収穫時に収穫関連機械・土壌・他の塊茎と接触したことによってできた受傷部位に汚染土壌が接触することで起きる塊茎腐敗が大きな要因ではないかと考えた。本研究では、収穫時の受傷と疫病菌の混和によって貯蔵腐敗が引き起こされることを日本産の菌株・汚染土壌を用いて検証することを目的とした。

4.3 材料・方法

本試験では、収穫およびその後の選別作業によって塊茎が擦傷・裂傷・打撲傷を受け、その受傷部分に汚染土壌が接触する事例を想定した。以上の条件を人工的に再現するため、受傷塊茎の再現および疫病菌遊走子のうの接種、ならびに無防除圃場土との混和を行った。

塊茎 (cv. スノーデン) は北海道芽室町の北海道農業研究センター芽室研究拠点 (以下、北農研芽室) で収穫したものを用いた。塊茎はなるべく傷をつけないように手掘りで丁寧に収穫し、その後の取り扱いも同様に丁寧に扱った。塊茎受傷と疫病菌の相互関係を確認するため、傷をつけないように収穫した塊茎を (1) 無傷無接種区 (2) 無傷接種区 (3) 無傷激発汚染土区 (4) 付傷無接種区 (5) 付傷接種区 (6) 付傷激発汚染土区の 6 区 (塊茎 30 個/区) に分けた。各試験区は 3 反復設定し、試験は 2017 年に行った。

うち、付傷区である (4) (5) (6) には付傷処理を施した。収穫した塊茎を 45 L ポリバケツに砂利 (ϕ 10–15 mm) とともに入れ、振幅 30 cm で 30 回人力で振とうした。この作業により、塊茎表面に砂利や塊茎同士による裂傷・擦傷・打撲傷ができた (図 4.2)。これらの傷を塊茎につけたことにより収穫時の塊茎受傷を再現した。



図 4.2 同じ条件の付傷処理により受傷した塊茎表面。

(2) (5)の接種区では、塊茎に遊走子のう懸濁液を接種した。使用した疫病菌遊走子のう懸濁液は同圃場の疫病罹病葉 (cv. 十勝こがね)の病斑から作成した。純水に採取した疫病病斑を入れ、絵筆で病斑を撫でるようにして遊走子のうを収集し懸濁液を作成した。遊走子のう密度を約 1.0×10^4 zoosporangia/mL に調整し、遊走子のう懸濁液をガラススプレーで塊茎 30 個あたり 15 mL 噴霧接種した。この接種により、塊茎表面の疫病菌遊走子のう密度は約 5000 個/塊茎となった。無接種区には同量の純水を噴霧した。噴霧後は 30 個ずつポリ袋に入れ、無発病圃場土 (非ジャガイモ圃場土) を塊茎全面に土壌が付着する程度振りかけて混和した。最後に純水を噴霧して土壌水分量約 35 %で土壌が塊茎に付着するように水分を揃えて軽く封をし、18 °C、暗所で培養した (以下、本バイオアッセイ法をバケツ法とする)。観察は 1 週間ごとに行い、腐敗塊茎の個数から腐敗割合を算出した。統計解析は IBM SPSS Statistics version 22 を用い、各週の腐敗率を逆正弦変換したのちに二元配置分散分析を行った。5 %水準で有意な場合、多重比較 (ボンフェローニ法)で各試験区を比較した。

塊茎は「健全」「疫病腐敗」「細菌性腐敗」の 3 項目で評価した。「健全」は腐敗が認められない塊茎、「疫病腐敗」は塊茎表面にレモン型遊走子のうが携帯顕

微鏡観察で認められるものの軟化していない塊茎、「細菌性腐敗」は軟化している塊茎、と定義した。また、「細菌性腐敗」と評価された塊茎は他の塊茎への影響を避けるために評価時に廃棄した。

4.4 結果

塊茎腐敗は培養後 1, 2 週間で認められた。疫病に侵された塊茎は表面に白色菌糸の旺盛な生育が認められ、受傷部・皮目等からドーム状に疫病菌糸が生育していた (図 4.3a)。菌体を観察すると、接種・汚染土壌混和を行なった区ではレモン型の遊走子のうが確認できたものが多数存在した。しかし、胞子の形態・菌糸幅の観点から疫病菌と異なる糸状菌の生育も多く認められた。

二元配置分散分析の結果、培養 1 周目以降は付傷の有無、接種・汚染土壌の混和といった処理の有無、交互作用が有意であり (表 4.1)、多重比較の結果、疫病菌が存在している付傷区である (5) (6)区は同様の無傷区である (2) (3)よりも有意に高い腐敗率であった。とりわけ (5)付傷接種区、(6)付傷激発汚染土区では塊茎腐敗が多く認められ、培養 4 週で約 90 %の塊茎が腐敗した。一方で、無傷区の腐敗率は低く、(2)無傷接種区は最大で 40 %ほどの腐敗率であった。接種・汚染土壌の混和がなかった (1)無傷無接種区 (4)付傷無接種区では腐敗率は極めて低かった。また、(5)付傷接種区 (6)付傷激発汚染土区の腐敗率推移はよく一致し、3 週目までは両試験区の間で有意な差は認められなかった (図 4.4)。

疫病腐敗は接種区・汚染土壌区の塊茎で散見され、培養 1, 2 週後に高頻度で観察された。しかし、その後は疫病腐敗が細菌性腐敗に移行していく様子が観察されたため (図 4.3b)、疫病腐敗・細菌性腐敗を合わせた合計腐敗率は 1-4 週の培養期間を通じて変化が少なかった (図 4.5)。

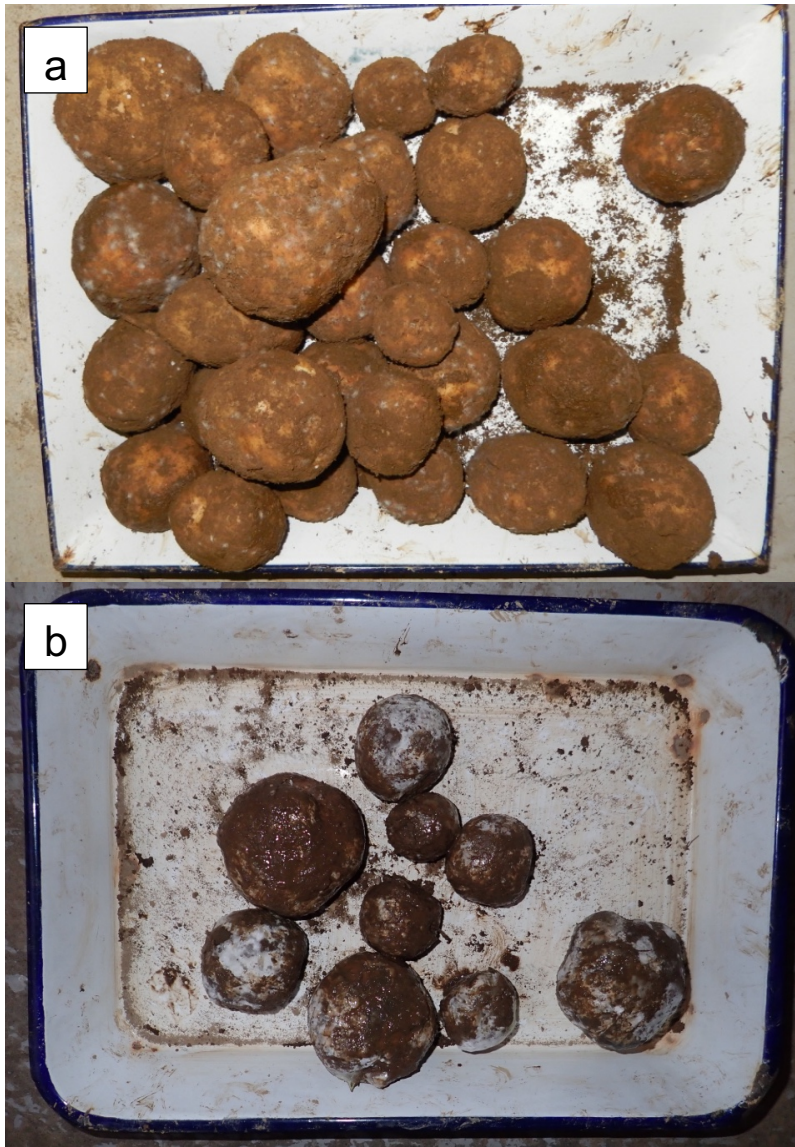


図 4.3 観察された腐敗塊茎.

a 疫病によって腐敗した塊茎. b 二次的な雑菌の生育が旺盛になり，複合的な症状へ移行した塊茎.

表 4.1 二元配置分散分析結果

	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目
付傷 ^a	**	**	**	**
接種 ^a	N.S.	**	**	**
付傷 × 接種 ^a	N.S.	**	**	**

a **, N.S.はそれぞれ高度に有意差あり ($P < 0.01$), 有意差なし ($P \geq 0.5$)を示す.

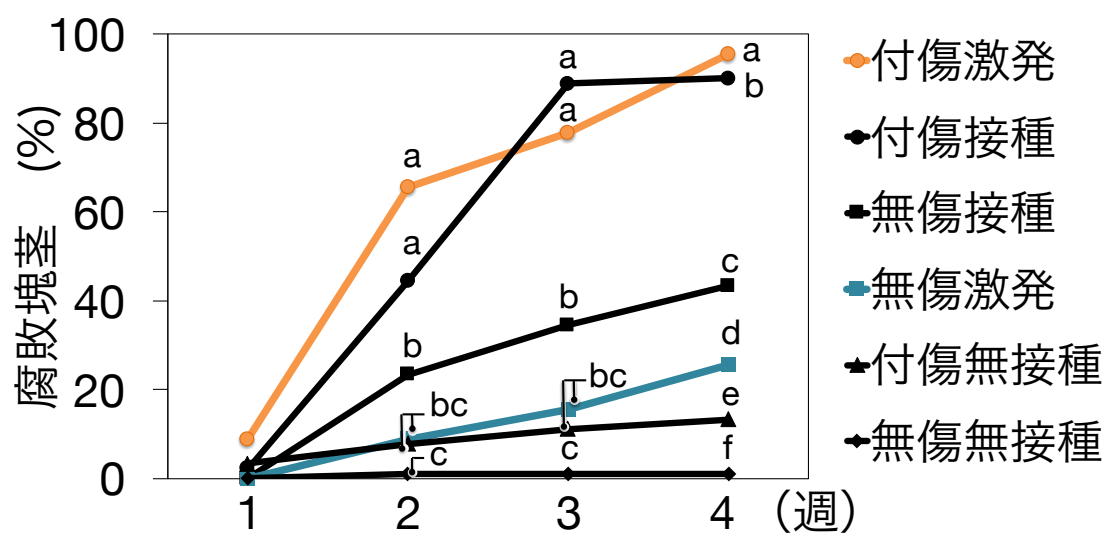


図 4.4 腐敗塊茎率の推移.

各週の異なるアルファベットはボンフェローニ法による多重比較で 5 %水準で有意であったことを示す.

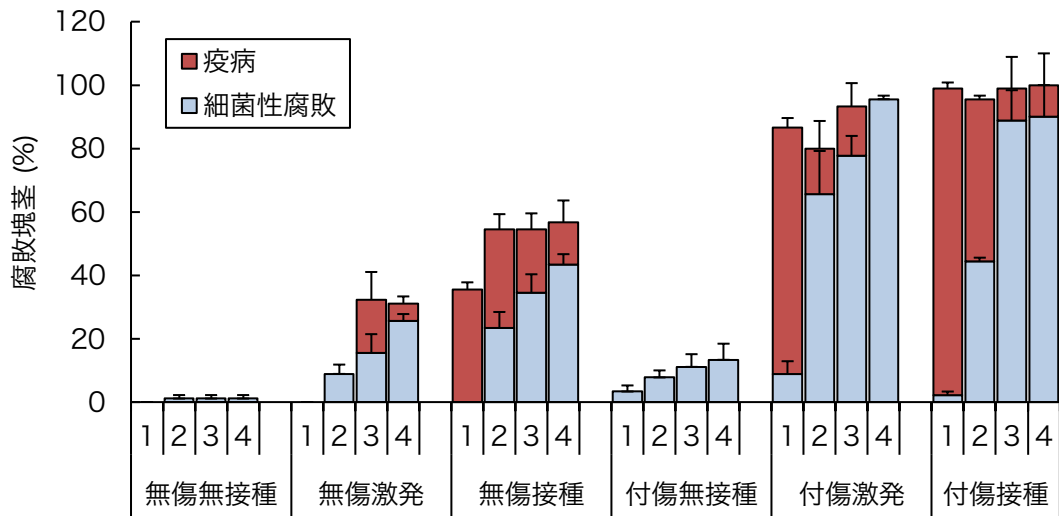


図 4.5 疫病腐敗塊茎および細菌性腐敗塊茎の推移。
バーは+標準誤差。

4.5 考察

付傷区の腐敗率が無傷区よりも高かったことから、収穫時の塊茎受傷が貯蔵腐敗の大きな要因であり、塊茎受傷量を減らすことができれば貯蔵塊茎腐敗の被害は軽減できる可能性があると考えられた。この結果は著者らが 2015–2016 年に行なった試験と一致しており (Osawa et al. 2018), 日本における貯蔵塊茎腐敗の要因が収穫時感染にあることを強く裏付けた。

また、汚染土壌を用いた区の腐敗率は接種区の腐敗率とよく似た腐敗率の推移を示した。このことから、実際の自然発病圃場程度の土壌疫病菌密度であっても、塊茎受傷等の腐敗に好適な条件が揃えば塊茎腐敗が再現されることがわかった。本試験の接種区では 1 塊茎あたり 5000 個もの遊走子のうを接種してあった。この密度は人工接種試験のため高く設定したものであり、実際にこのような高密度の汚染土壌が存在しているか不明であった。また、本試験では塊茎表面に遊走子のう懸濁液を噴霧接種している。しかし、実際の収穫では遊走子のうを含む汚染土壌が塊茎に接触することで感染が成立する。したがって、収穫時感染が貯蔵庫内で実際に起こっているか立証するためには汚染土区が接種区と同じ挙動を示す必要があった。本試験により、汚染土壌を混和した試験区であっても接種を行なった試験区と同様に塊茎腐敗が発生したことから、本仮

説は立証された。

疫病腐敗は二次的な雑菌の生育・増殖によって複合的症状に移行する。培養 1・2 週目ではレモン型遊走子のうが観察できる塊茎は多数存在したが、時間の経過とともに観察が困難となった。その理由として、他の糸状菌の旺盛な生育によって疫病菌遊走子のうが発見されづらくなってしまったこと、細菌性腐敗に伴って塊茎表面が液体で覆われ、顕微鏡観察ができなくなってしまったこと、細菌性腐敗の進行によって塊茎が原型をとどめない状態にまで腐敗してしまったことが挙げられた。したがって、疫病による腐敗のみを評価するためには最長でも培養 2 週間までが適切であり、それ以上の培養は細菌性腐敗により評価が難しくなるため不要である。細菌性腐敗を含めて腐敗塊茎を評価する際は 3, 4 週の培養が必要である。

疫病から細菌性腐敗に移行した塊茎の腐敗症状は様々であった。腐敗組織が糸を引くような粘性を持ったクリーム状に変性するもの、組織の分解に伴って軟化しているもののクリーム状にまで至らないが触ると容易に組織が崩れるものなどが観察された。これらの塊茎腐敗の病原細菌として、塊茎に潜在感染している *Bacillus* 属菌が関与しているとの報告があることから (秋野ら, 2018), 本試験でもそのような細菌類が関与していた可能性がある。細菌性腐敗塊茎が健全塊茎と接触していたり、腐敗による液体が健全塊茎に付着したりしていても健全塊茎が腐敗することは稀であった。このことから、二次的に感染した雑菌の多くは非病原性であり、あくまで腐生菌であると考えられた。土壌中では罹病塊茎に隣接している健全塊茎に感染が広まることは稀であるとの報告もあることから (Sato 1980), 貯蔵庫内で感染が広まる可能性は低いのではないかと考えられるが土壌中と貯蔵庫内では条件が異なるので今後さらなる検証が必要である。

以上から、収穫時の塊茎受傷量、または土壌疫病菌密度を減らすことで貯蔵腐敗被害を軽減させることが可能であると考えられる。収穫時の塊茎受傷については、塊茎表面の受傷量を定量する技術がすでに開発されている (上堂ら, 2019)。本技術を用いて収穫時の塊茎受傷量を把握することで貯蔵塊茎腐敗の被害を予測できる可能性がある。しかし、収穫時の受傷を完全に防ぐことは不可能である。したがって、実際に貯蔵腐敗を減らすためには土壌疫病菌密度を低く保つことに注力しながらジャガイモを栽培・収穫する必要がある。

第 5 章 土壌中のジャガイモ疫病菌密度の定量法

5.1 背景

第 4 章の結果から、収穫時に汚染土壌と塊茎が接触することが貯蔵腐敗の大きな要因であることが明らかになった。貯蔵中の塊茎腐敗を減少させるためには、収穫時に塊茎受傷を減らす、または土壌中の疫病菌密度を減少させる必要がある。しかし、実際には塊茎受傷を完全に無くすことは不可能である。すでにジャガイモ収穫機械には塊茎を傷つけないような様々な工夫に加えて、収穫機械を操作する生産者も運転スピード・掘り上げる深さなど細心の注意を払っている。したがって、収穫機械・技術のさらなる改良を期待するよりも土壌疫病菌密度を低減させるように対策した方が効率的かつ現実的である。

土壌疫病菌密度を低減させるためには、適切な殺菌剤散布などで地上部に疫病を発生させないことが前提である。福江ら (2015) は土壌および疫病菌遊走子のうを付傷塊茎に接種・混和する試験を行ったところ、疫病菌密度が高いほど塊茎腐敗が早期に観察され、疫病菌が存在しなければ腐敗しないことを報告した。したがって、万が一疫病が発生してしまった場合であっても、収穫時の土壌疫病菌密度を正確に把握することができるのであれば収穫した塊茎が腐敗するか予想できる可能性がある。

これまで土壌から疫病菌密度を定量するためには健全塊茎・健全葉を用いたバイオアッセイが利用されてきた (Lacey 1965; Sato 1980; Drenth et al. 1995)。しかし、バイオアッセイには複数の短所が存在する。そのうち、最も致命的な短所は培養期間を要することである。バイオアッセイは通常数日から 3 週間ほどの培養ののちに試験結果を評価する。しかし、貯蔵庫内の腐敗も収穫後 2 週ほどで始まる。したがって、収穫時の土壌の感染ポテンシャルを評価し、結果をもとに対策を講じるためにはバイオアッセイよりも早い分析手法が必要である。

5.2 目的

迅速かつ正確な土壌中の疫病菌密度を定量するために、本研究ではリアルタイム PCR に注目した。しかし、一般的にリアルタイム PCR による土壌試料の定量は困難であることが多く、日本の土壌、とりわけ黒ボク土は DNA の吸着が起りやすいため DNA 抽出・PCR が困難である (星野・長谷部 2005)。本技術の将来的な塊茎腐敗被害軽減技術への導入を考えるにあたって、定量技術のみな

らず黒ボク土を含む様々な土壌に対する汎用性も確認する必要がある。本試験では、日本の主な畑作土壌を供試しながらリアルタイム PCR による土壌中の疫病菌 DNA の抽出・定量方法を開発することを目的とした。

5.3 材料・方法

接種土壌からの DNA 抽出法

まず、使用するガラスビーズをワシントン大学 Young Lab が公開しているプロトコルを参考に酸洗浄した (Young Lab online). 直径 0.5 mm ガラスビーズ (井内盛栄堂), 0.1 mm ガラスビーズ (Sigma-Aldrich) を純水ですすいだ後, 0.1 N 塩酸で 4 回洗浄した。次に 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で 2 回洗浄し, さらに純水で 5 回すすいだ。洗浄後は乾熱滅菌 (180 °C, 2 時間) して試験に用いた。2 mL スクリューキャップチューブに直径 0.5 mm・0.1 mm ガラスビーズをそれぞれ 0.2, 0.1 g 加えて自作ビーズチューブを作成した。土壌は北海道内 9 地点で採取, または購入した 8 種類および海砂の計 11 種類を用い (表 5.1), ビーズチューブに 0.4 g 加えた。なお, 海砂・真砂土を除く供試土壌は全てジャガイモ栽培歴のある畑作圃場であるが, 採取時において疫病の発生がない健全圃場であった。Rye-B 寒天培地 (Caten and Jinks 1967) で約 2 週間培養したジャガイモ疫病菌 (MR1799, 北海道で分離されたもの) を培養し, 純水を加えて遊走子の懸濁液を作成した。作成した遊走子の懸濁液を 2.3×10^3 , 10^2 , 10^1 zoosporangia/mL の濃度に調整した上で土壌が入ったビーズチューブに 100 μ L 加えることで, ビーズチューブに 0.5 g wet soil (それぞれ約 400, 40, 4 zoosporangia/ g soil) の汚染土壌を作成した。対照区では遊走子の懸濁液の代わりに純水を加えた。それぞれの試験区は 3 反復設定し, 作成した汚染土壌が入ったビーズチューブは -20 °C で保存した。

DNA 抽出は NucleoSpin Plant II (マッハライ・ナーゲル) を使用した。NucleoSpin Plant II プロトコル, Sato ら (2010) を参考に一部改変した抽出バッファー (2 M NaCl, 20 mM EDTA-2Na, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 % 臭化セシルトリメチルアンモニウム (CTAB), 2 % ポリビニルピロリドン K-30 (PVP), 12.5 % スキムミルク, 7 mg/L サケ精子 DNA) 800 μ L をチューブに加え, 電子レンジで 200 W, 10 秒の条件で 3 回繰り返し, 計 30 秒間加熱した。その後は FastPrep 24 Instrument (MP Biomedicals) で 4.0 m/s, 20 秒の破碎を 2 回繰り返した。破碎後は 5000 g で 10 分間遠心分離し, 上澄みの全量をキットのプロトコルに則って精製した。精

製した 50 μ L の DNA 抽出液は-20 $^{\circ}$ C で保存した.

表 5.1 供試した土壌

ID	土壌種	採取地点
1	泥炭土	十勝地方, 北海道
2	多湿黒ボク土	十勝地方, 北海道
3	アロフェン質黒ボク土 A	十勝地方, 北海道
4	アロフェン質黒ボク土 B	北海道農業研究センター芽室研究拠点, 芽室町, 北海道
5	灰色低地土	十勝地方, 北海道
6	褐色低地土 A	十勝地方, 北海道
7	褐色低地土 B	北海道大学, 札幌市, 北海道
8	粘土集積赤黄色土	上川地方, 北海道
9	褐色森林土	上川地方, 北海道
10	真砂土 ^a	淡路島, 兵庫県
11	海砂 (850-1400 μm) ^b	-

^a 株式会社 ダイセイ. ^b 和光純薬工業株式会社.

リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。10 μ L の Probe qPCR Mix (タカラバイオ), 0.3, 0.1 μ M の種特異的両プライマー, プローブ (Lees et al. 2012), 0.2 μ M の ROX Reference Dye, 2 μ L の抽出液を加えて最終量 20 μ L の反応液を作成し, 製品・プライマー・プローブに適切な温度で反応させた (95 $^{\circ}$ C, 30 秒, (95 $^{\circ}$ C, 5 秒・61 $^{\circ}$ C, 30 秒) $\times$ 45 サイクル)。スタンダードサンプルとして, すでに抽出済みの疫病菌ゲノム DNA 溶液の濃度を BioSpec Nano (島津製作所) で測り, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 pg/ μ L に TE で調整して用いた。陰性対照としてはテンプレート DNA の代わりに超純水を用いた。閾値線の設定は StepOne software v2.1 で自動設定した。

5.4 結果

陰性対照区を除く全ての土壌から疫病菌 DNA が検出・定量可能であり, リアルタイム PCR の増幅プロットは理想的な増幅曲線を描いた (図 5.1, 図 5.2)。一方で, 陰性対照区では全ての土壌で非検出であった。土壌 1 g あたり遊走子のう 4 個を含む試験区, すなわちビーズチューブ 1 本あたり遊走子のう 2 個しか含まないごく微量の疫病菌のみを含む試験区であっても接種密度に応じた定量値が得られ, 概ね 1 pg/g soil (抽出液濃度は概ね 10 fg/ μ L) であった。しかし, 褐色低地土 B, 粘土集積赤黄色土はやや低い定量値であった。また, 土壌中の疫病菌密度が 10 倍変化すると定量値も約 10 倍大きな値であり, 定量された DNA 量と土壌中の菌密度の多寡は一致した (図 5.3)。

真砂土・海砂の定量値は他の畑作土壌と定量値のそれぞれ 10 分の 1, 100 分の 1 ほどの低い定量値であった。

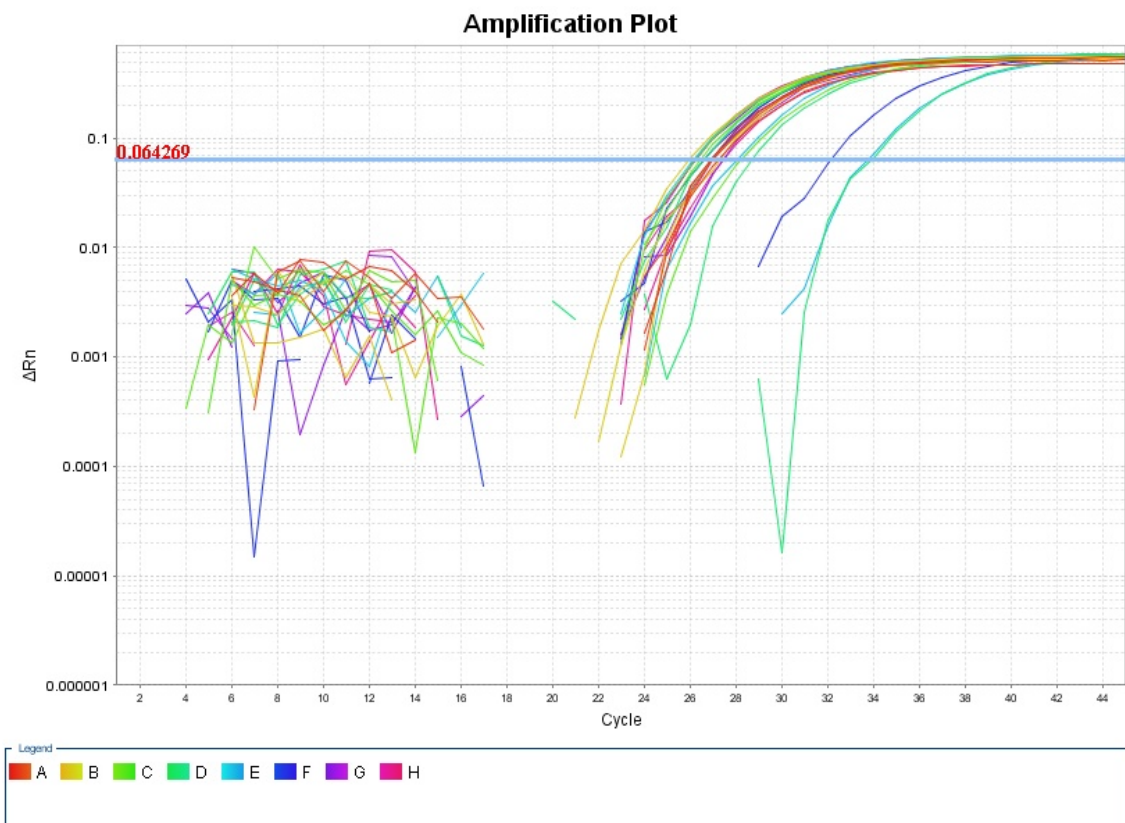


図 5.1 リアルタイム PCR による DNA 増幅の例

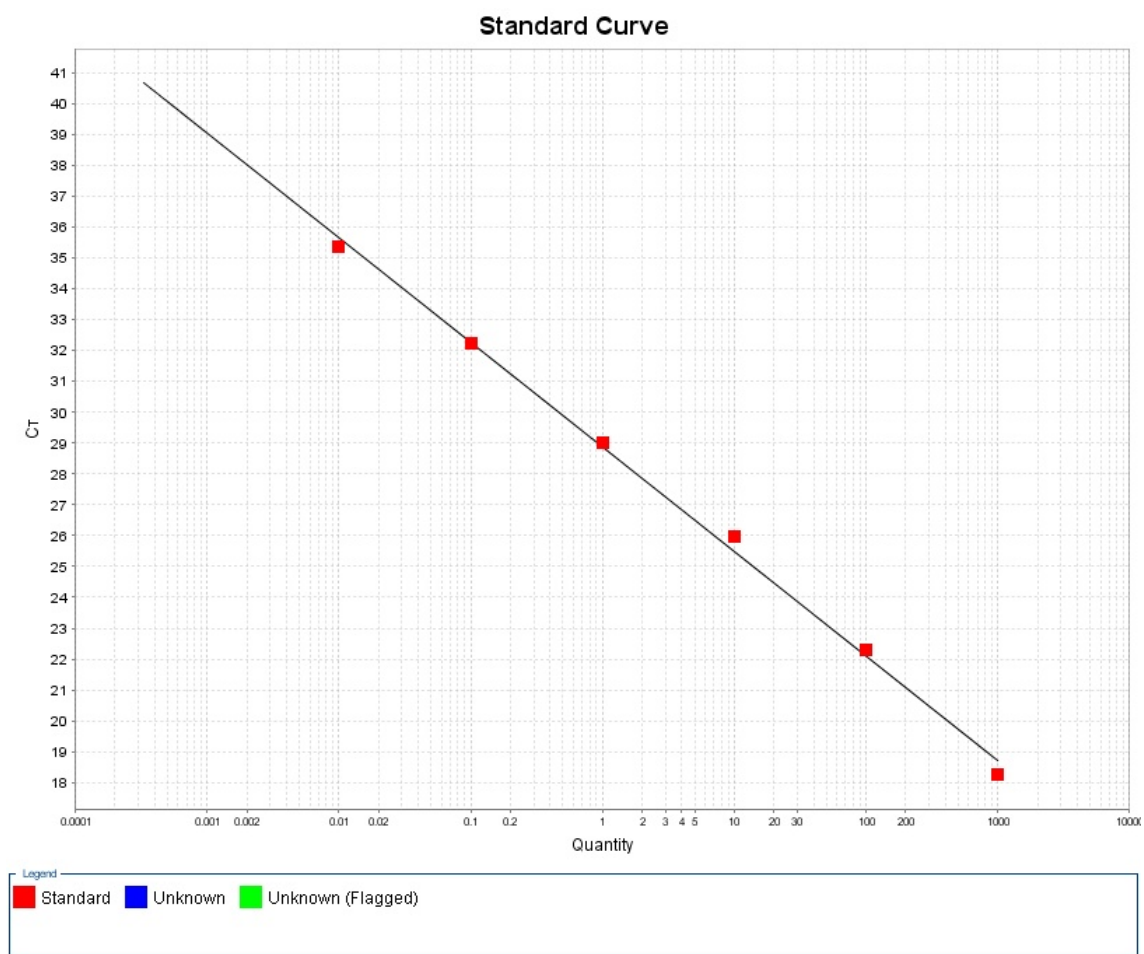


図 5.2 同条件で行なったリアルタイム PCR によるスタンダード DNA の検量線。増幅効率_は 97.48 %，決定係数 R^2 は 0.997。

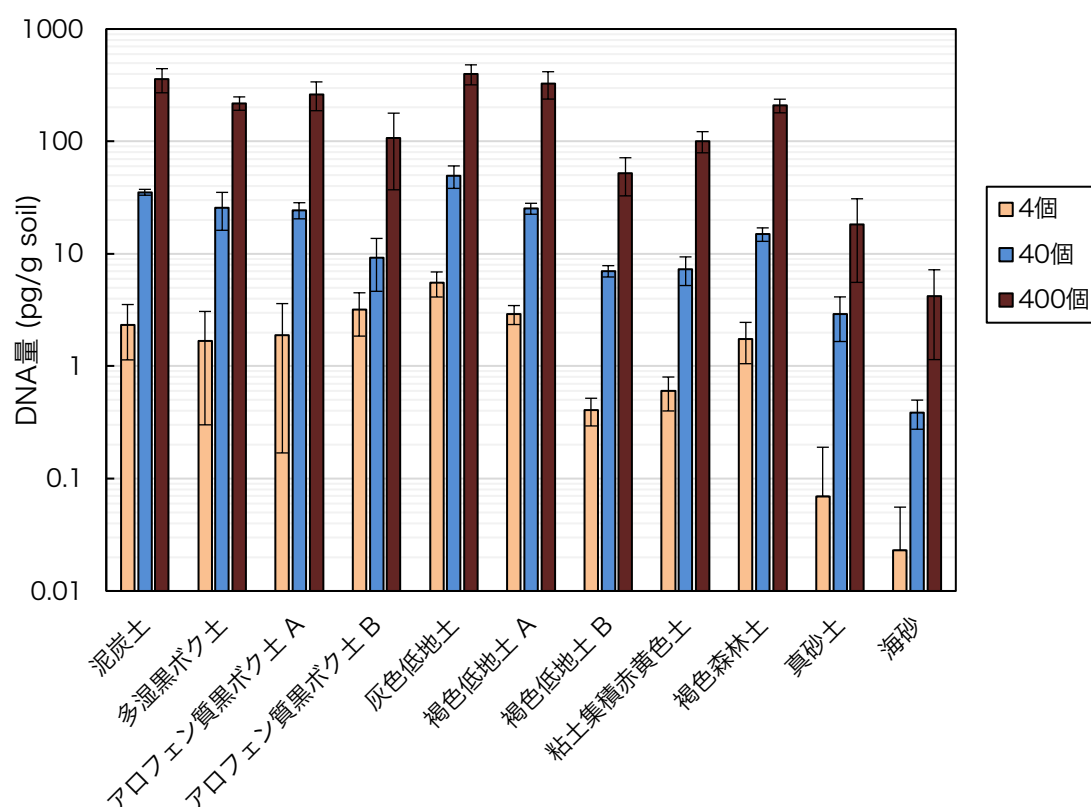


図 5.3 ジャガイモ疫病菌接種土壌の DNA 量. 陰性対照として純水を添加した区は全て非検出であった. バーは $\pm$ 標準誤差.

5.5 考察

本研究で用いた DNA 抽出法は CTAB 法 (Murray and Thompson 1980), ビーズ破碎法 (Ogram et al. 1987)を組み合わせた上で抽出バッファーにスキムミルク, サケ精子 DNA 等を添加して改変し, 市販キットを用いて精製した方法である. 以下, 本方法を改変 CTAB-Bead-beating 法 (Modified CTAB-Bead-beating method, 以下, 本法)とする.

複数の土壌種から DNA を抽出・定量できたことから, 本法は少なくとも日本における幅広い種類の土壌において疫病菌 DNA を定量できることが示唆された. 畑作土壌においては, 褐色低地土 B, 粘土集積赤黄色土がやや低い定量値を示した. しかし, 他の土壌の同密度区と比較して定量値の違いは概ね 10 倍以内に収まっていることから, 実用上は大きな問題はないと考えた. Zhou ら (1996)は, 全ての土壌に最適な抽出法は存在しないと論じている. どのような土

壤種であっても菌密度が同じであれば同じ定量値であることが理想であるが、土壌の組成は非常に複雑かつバリエーションに富む。したがって、土壌種によらず完全に同じ定量値を得る方法を開発することは現実的ではない。それ以上に重要であるのは同じ供試土壌で異なる菌密度を正確に定量できるかである。本法は供試した全ての接種土壌で定量に成功し、土壌菌密度の高低を正確に反映した DNA 量が定量された。したがって、本法は土壌中の疫病菌 DNA の定量法として十分な有用性を持っていると考えられる。

真砂土・海砂は畑作土壌と比較して低い定量値であった。これは、DNA が土壌中のシリカに吸着されたためであると考えられる。疫病菌 DNA 吸着を相対的に抑える目的でサケ精子 DNA を添加したが真砂土・海砂では十分な効果が得られなかった。しかし、真砂土・海砂は未熟土壌であり、ジャガイモ栽培に適さない。したがって実用上はさほど問題ないと考えられる。

本法はチューブ 1 本あたり遊走子のう 2 個程度しか含まないごく低密度土壌であっても定量することができた。懸濁液中には遊離疫病菌 DNA も含まれていることが予想されるが、それを考慮したとしても収穫時の疫病菌 DNA を定量するためには十分な検出力であると考えられる。経験的にではあるが、4 zoosporangia/g soil ほどの低密度土壌を付傷塊茎に混和・培養したとしても発病はまれである。これを支持するように、Sato (1980) の塊茎スライスを用いた検出感度が高いバイオアッセイでは、同程度の菌密度である 50 sporangia/10g soil の土壌では発病割合はごくわずかと結果から読み取ることができる。本研究で設定した最低密度である 4 zoosporangia/g soil の土壌であっても DNA は検出がされていることから検出限界は 4 zoosporangia/g soil 以下の可能性がある。しかし、以上の理由からこれ以下の菌密度で検証する必要がない。

本法はすでに十分な実用性・検出限界を有している。もし全ての土壌に対して最適な抽出・定量法を改良するのであれば、抽出法を改良するのではなく、土壌種に応じた補正法を検討するべきだろう。具体的には内在性コントロールを用いて定量値を補正することが考えられる。本法では疫病菌 DNA のみを定量しているが、同時に自然界に存在しない DNA を試料に一定量添加し、マルチプレックス-リアルタイム PCR で同時に定量し補正する方法が考えられる。Shishido ら (2013) は内在性コントロールとして GFP 遺伝子断片を導入したプラスミド DNA を使用した。このような方法を用いることで多種の土壌で普遍的な定量法に改良できる。しかし、収穫時の土壌中の疫病菌密度を貯蔵塊茎腐敗の

被害低減のため定量するという目的に立ち返った際に、これ以上のコスト・労力をかけて改良する必要はないと考える。また、本法ではガラスビーズを用いたが、ジルコニア、鉄などのガラス以外のビーズを用いたり、磁性ビーズを用いたりすることでさらに高 DNA 収量になる可能性はあるが、現状でも十分検出感度が高いため、安価なガラスビーズで十分である。

植物試料から化学的に DNA を抽出する際に、CTAB の他にも SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)法 (Edwards et al. 1991)も頻繁に使用される。CTAB と PVP のポリマーであるポリビニルポリピロリドン (PVPP)は部分的に腐植物質を取り除くとの報告があり (Zhou et al. 1996), 植物組織から同様の方法で抽出に成功したとの報告もある (Kasajima et al. 2013)。また、PVP は水溶性であり使用しやすいことに加え、PCR 阻害物質であるフェノールを吸着する (Loomis and Battaile 1966)。したがって、植物残渣に富むため腐植酸も多いと予想される収穫時の土壌を定量するためには CTAB, PVP を用いる方法が適切であろうと考える。

また、本方法では DNA の土壌粒子への吸着を阻害する目的でスキムミルクを添加した。日本に広く存在する火山灰土壌、とりわけ黒ボク土はリン酸を強く吸着する性質があり、土壌からの DNA 抽出は一般に困難である。しかし、スキムミルクを実験系に加えることで火山灰土壌からも高収量で DNA 分離が可能であることはすでに複数の報告がある (Kageyama et al. 2003; Hoshino and Matsumoto 2004)。本法においても火山灰土壌からの抽出を想定してスキムミルクを添加した。その結果、3 種の黒ボク土から安定して定量することができた。

また今回、ビーズ破碎法によって疫病菌細胞を物理的に破壊し DNA を抽出した。ビーズ破碎法は非常に強力な抽出法である一方、その物理的方法によって DNA 塩基長にしばしば影響する (Bürgmann et al. 2001)。本方法はリアルタイム PCR での定量であり、今回用いた種特異的プライマーによる増幅産物長は 167 bp である。したがって、たとえ DNA の細断が起こったとしても影響はごくわずかであるため、問題はない。

本研究で使用した種特異的プライマー・プローブを設計した Lees らは、卵胞子を接種した土壌を用いて試験を行ったが、失敗に終わっている (Lees et al. 2012)。すでにジャガイモの土壌伝染性病害である炭疽病菌・黒あざ病菌・粉状そうか病菌では CTAB 法・ビーズ破碎法を組み合わせた方法で定量に成功している (Brierley et al. 2009)。Lees らはビーズ破碎法を論文で利用してはいないが、著者らは報告書中で、他のジャガイモ病原菌に幅広く使用できる抽出法で

あっても疫病菌卵胞子では成功しなかったと報告している (Cooke et al. 2014). 先行研究が疫病菌の定量に失敗した中、接種源が遊走子のうではあるが本研究では成功した理由として、抽出阻害物質を抑える工夫を行なっていることや抽出阻害物質の影響を受けづらい PCR 反応液を利用したことが挙げられる. しかし、本研究では卵胞子を接種源として供試できなかったため、今後は卵胞子接種土壌で検証が必要である. しかし、CTAB による抽出と Beads-beating 法を組み合わせた卵胞子を含む土壌からの DNA 抽出は *Pythium* 属菌ではあるがすでに報告があるため (Wang and Chang 2003), 技術的には可能であると考えられる.

第 6 章 土壌中のジャガイモ疫病菌密度の推移ならびに感染ポテンシャル

背景

第 5 章の結果から、土壌中の疫病菌の密度をリアルタイム PCR で迅速かつ正確に定量することが可能となった。定量技術が開発されたことによって、これまでバイオアッセイで定量されてきた土壌中の疫病菌密度がより高感度・高精度で定量できることが期待される。

リアルタイム PCR で定量できるものはあくまで疫病菌 DNA 量である。定量された DNA 量は活性がある疫病菌・非病原性の疫病菌・土壌中に遊離した疫病菌 DNA が混在しており、区別することはできない。したがって、定量された疫病菌 DNA 量は疫病菌密度を直接示していない。植物病理学・発生生態学上意味があるものは活性のある疫病菌密度、すなわち土壌の感染ポテンシャルであるので、定量された DNA 量と感染ポテンシャルを比較し、相関を確認する試験が必要である。

I 土壌への疫病菌遊走子のうの浸透

6.1.1 背景

栽培中の塊茎の感染は地上部の病斑由来の遊走子のうが降雨によって落下、土壌中に浸透し塊茎に到達することでおこると報告されている (Sato 1980)。しかし、本報告は約 40 年前のものであるため、現代の環境条件や疫病菌優占系統に即して再検証が必要である。大塚ら (2015) による土壌カラムを用いた試験によると、たとえ 500 mm の降雨であったとしても遊走子のうは土壌中に浸透せず、地表部にとどまると報告された。カラムではなく実際の圃場条件に近い状態での検討が望まれる。

6.1.2 目的

本試験では、近年の北海道に優占している系統 JP-4 を用いて試験を行った。圃場でのジャガイモ栽培を大型のポリポット上で再現し、降雨によって疫病菌がどの程度土壌中に浸透しているのか人工接種試験で確認した。

6.1.3 材料・方法

植物体の準備・接種

北海道大学ガラス温室内でジャガイモ植物体 (cv. 男爵薯) を直径 40 cm のポリポットで栽培した。播種は 2017 年 6 月 7 日に行い、土壌は北海道大学植物病理学研究室圃場 (褐色低地土) から採取した。必要に応じて追肥・害虫防除を行いながら 3 か月間栽培した。

ポリポット表土への接種は植物体がやや黄化した茎葉黄変期である 2017 年 9 月 7 日に行なった。グリーンピース煎汁寒天培地 (Andrivon et al. 1994) で約 2 週間培養した疫病菌 (MR1799, 2017 年に北海道十勝地方で分離された JP-4 系統) から遊走子の懸濁液を作成した。なお、本菌株が塊茎への病原性を有していることは確認済みである。遊走子の懸濁液を 4.3×10^5 zoosporangia/ポットに調整し、ガラススプレーを用いて表土に灌注接種した。土壌への遊走子の浸透を促すため、接種後直ちに水道水を用いて灌水した。灌水は 30 mm/h 相当の量で 2 時間行った。灌水終了後は 1 か月温室内で静置し、塊茎腐敗を促した。試験区は、無接種区 (灌水のみ)、接種区 (灌水・接種) の 2 区設定し、8 ポットずつ供試した。また、土壌中の疫病菌密度の増減をリアルタイム PCR でモニタリングする目的で、同様の接種を行ったポットを用意した (n=3)。

塊茎腐敗の評価

1 か月間の静置後に塊茎を回収し、目視で塊茎腐敗の有無を観察した。塊茎腐敗は起こっていないものの表面に活性のある疫病菌が存在している場合がある。当該事例を想定し、塊茎腐敗を促進させるため接種区の塊茎表面におろし金を押し付けて付傷した。付傷後はポリ袋で包んで保湿し、2 週間培養した。培養後は再び塊茎腐敗の有無を目視で観察した。

観察終了後に塊茎表皮を一部採取し、表皮から DNA を抽出し種特異的 PCR によって疫病菌の有無を判定した。採取した表皮は自作ビーズチューブ (2 mL スクリューキャップチューブに直径 5 mm セラミックビーズ 2 個, 0.1 mm ガラスビーズ約 0.1 g を入れたもの) に入れ、800 μ L の 0.05 N NaOH を加えた。その後はスピード 6.0 m/s, 40 秒間でホモジェナイズ (FastPrep 24 Instrument, MP biomedical) して DNA を抽出した。破碎後は 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm で 5 分間遠心分離した後 10 μ L の上清をとり、90 μ L の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) で中和した。抽出した DNA 溶液は -20 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。種特異的 PCR は Hussain ら (2005) の方法で行い、アガロースゲル電気泳動で種特異的なバンドを検出した。

リアルタイム PCR

土壌疫病菌密度モニタリング用接種ポットから土壌を採取した。採取は接種 0, 3, 7, 14 日後に行い、土壌採取器を垂直に土壌に押し込んだ後に静かに引き抜くことで深さ 0, 5, 10 cm の土壌を採取した。採取した土壌は-20 °C で保存した。土壌からの DNA 抽出・リアルタイム PCR による定量は第 5 章の通りに行い、反復は 3 反復設定した。非検出であったサンプルの定量値は 0 として扱い、平均値を算出した。

乾土あたりの DNA 量を求めるため、土壌水分量も同時に計測した。秤量後の土壌を 105 °C で 24 時間乾燥させた後に再度秤量し、その差から土壌水分量を算出した。

6.1.4 結果

収穫された塊茎数は接種区で 68 個、無接種区で 66 個であった。接種区の 68 塊茎は全て健全であった (図 6.1)。また、付傷によって塊茎腐敗を促したにも関わらず塊茎腐敗は確認されなかった。接種区 68 塊茎のうち、塊茎表皮の採取が可能な 66 塊茎を対象に種特異的 PCR を行ったが、疫病菌に特異的な 613 bp のバンドは全ての塊茎で確認されなかった (図 6.2)。土壌疫病菌密度は接種 0 日後・深さ 0 cm で約 740 pg/g dry soil であったが、その後の 7 日間で約 10 分の 1 に減少した。また、接種 0 日後・深さ 10 cm の土壌では約 1 pg/g dry soil であり、表土の約 1000 分の 1 と極めて低密度であった (図 6.3)。



図 6.1 収穫塊茎の一部.
a 接種区. b 無接種区

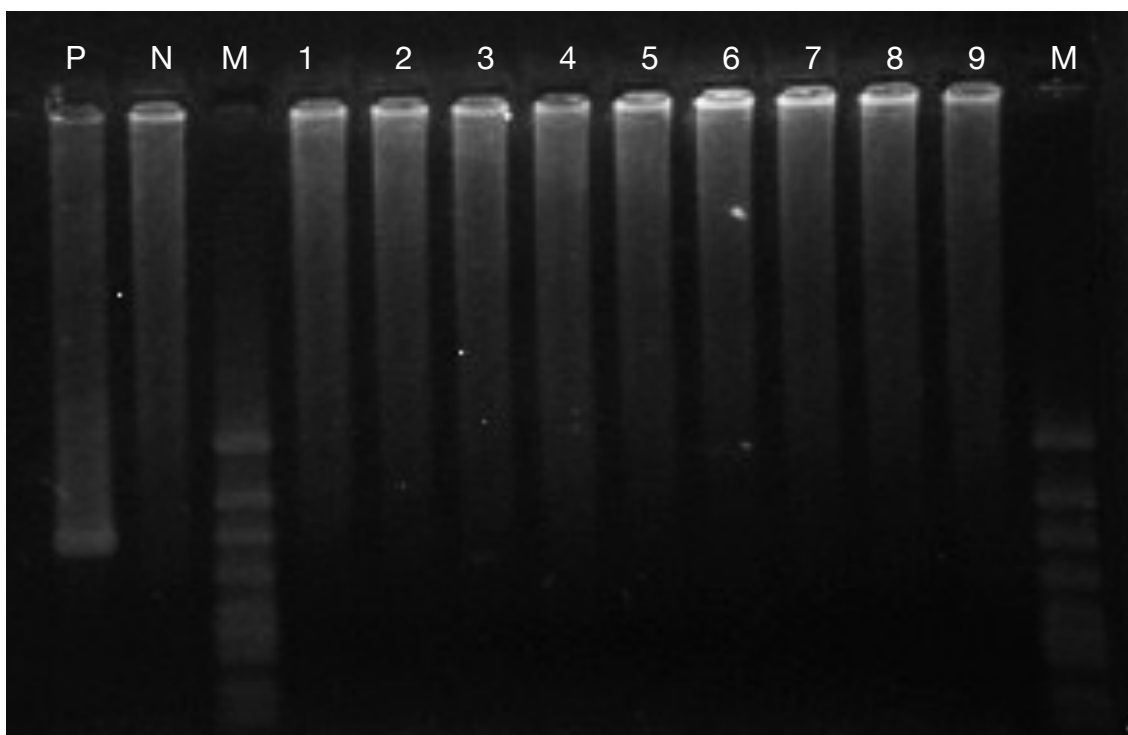


図 6.2 種特異的 PCR によるジャガイモ疫病菌 DNA の検出 (一部).
P 陽性対照. N 陰性対照. M サイズマーカー (ϕ X174-Hinc II digest). 上から 1057, 770, 612, 495 bp. 1-9 接種区から採取された塊茎表皮.

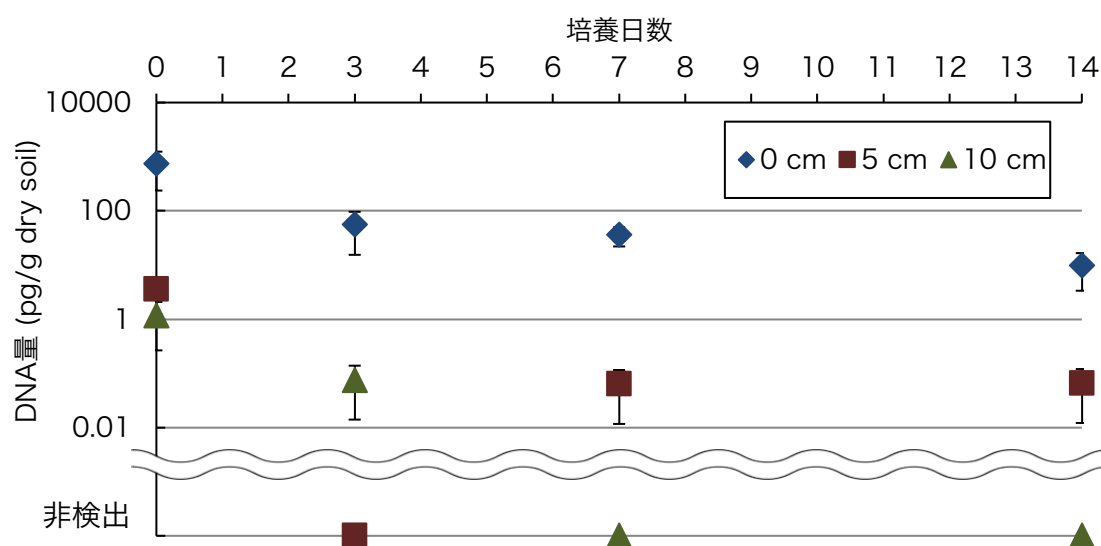


図 6.3 リアルタイム PCR によるジャガイモ疫病菌 DNA の定量値.
バーは $\pm$ 標準誤差.

6.1.5 考察

接種区であっても塊茎腐敗が全く確認されず、表皮から疫病菌 DNA も検出されなかったことから、緊密な土壌であれば疫病菌遊走子のうの土壌浸透は稀であると考えられた。したがって、栽培中に疫病菌遊走子のうが塊茎腐敗に関与するには土壌に乾燥による亀裂といった塊茎の露出が必要であると考えられる。しかし、土壌に完全に覆われながらも栽培中に疫病に感染したと考えられる塊茎は実際の圃場でもしばしば確認される (図 6.4)。本試験の結果から、栽培中に感染した腐敗塊茎は遊走子のうが原因である可能性は低く、遊走子のうと比較して大きさも小さく遊泳能力のある遊走子が原因であると考えられる。遊走子のうは比較的低温 (最適温度 14 °C) で遊走子を放出する間接発芽を行う (Sato 1994)。温室内は比較的高温であったために間接発芽が起こらず、土壌への浸透は少なかったと推察された。

実際の圃場でも同様の現象が起こっていると考えられ、夏季の比較的高温の時期は遊走子の土壌浸透は起こりにくく、栽培中の塊茎腐敗は起こりにくいのではないかと考えられる。遊走子のうの間接発芽がおこる時間帯・時期として、朝晩の気温が低い時間帯・9 月下旬ごろの収穫直前時期、が考えられる。また、遊走子のうの間接発芽は成熟が必要であると過去に報告されている (Sato 1994)。一方で、近年の日本に優占している系統 JP-4 は遊走子のうの成熟期間を必要としない特徴がある (秋野 2013)。したがって、近年の日本では低温・水分条件が揃えば直ちに間接発芽が起こる状況にあり、栽培中の塊茎腐敗を起こさないために地上部の適切な防除が必要である。

本試験では、接種源として遊走子のうを用いた。今後は遊走子を用いて栽培中の塊茎腐敗を総合的に調査する必要がある。



図 6.4 一般圃場から採取された疫病罹病塊茎.
表皮を除くと赤褐色に腐敗した組織が観察された (矢印部).

II 無防除圃場における土壤ジャガイモ疫病菌密度の推移

6.II.1 背景

これまでもリアルタイム PCR を用いた土壤からの疫病菌密度定量法は報告されているものの (Lees et al. 2012; Hussain et al. 2014), いずれも人工的に接種した土壤を定量しており, 自然発病土での定量に成功した報告はない. したがって, 圃場においてどのように疫病菌が増減しているか詳細に把握した例はバイオアッセイでの事例 (Sato 1980)を除いては存在しない.

6.II.2 目的

第 II 節では, リアルタイム PCR による土壤疫病菌密度定量法を用いて, 無防除圃場における土壤疫病菌密度の推移を調査した. 調査によって得た知見から圃場における疫病菌の生態を定量的に理解し, 生態に基づいた防除法を考案した上で第 7 章で実証した.

6.II.3 材料・方法

北農研芽室の無防除ジャガイモ圃場 (cv. スノーデン)から土壤をサンプリングした. 無作為に選んだ 3 植物体直下の畝表面土壤, および塊茎周辺土壤 (畝頂上から深さ約 15 cm)を採取した. 採取した土壤は直ちに -20 °C で冷凍保存した. その後は第 5 章の方法で DNA を抽出し, リアルタイム PCR で土壤中の疫病菌 DNA を絶対定量した. 供試した土壤の一部は 105 °C, 24 時間で乾熱し, 土壤水分量を計測した. 試験は 2017 年, 2018 年の 2 か年で行い, 2018 年は畝表面土壤の感染ポテンシャルをおろし金を用いたバイオアッセイ (以下, おろし金法)で測定した. 健全な塊茎 (cv. 男爵薯) (n=6)をおろし金に押し当てるようにして付傷し, 塊茎表面に細かな傷をつけた. この付傷処理で塊茎表面に直径約 1 mm 深さ約 0.5 mm の小さな傷が付いた. 付傷した塊茎表面に純水を吹きかけた後に検定土壤と混和し, ポリ袋に入れ, 軽く封をして室温で 2 週間培養した. 検定土壤は先述した圃場で無作為に選定された 3 地点の畝表面土を均等量ずつ混和したものを使用した. 培養後は腐敗塊茎の有無・個数を観察し, 顕微鏡観察により塊茎表面に疫病菌が確認されたものを「疫病腐敗」と評価した. 3 反復の疫病腐敗個数の平均が 0 の場合は-, 0<腐敗塊茎数<1 の場合は±, 1≤腐敗塊茎数<2 の場合は+, 2 以上の場合は++と評価した. リアルタイム PCR による定量, バイオアッセイともに 3 反復設定した.

6.II.4 結果

2017 年の北農研芽室無防除圃場では 7 月 7 日に圃場で疫病が初発し、7 月 28 日に採取地点直上の植物体に疫病の病斑を認めた。その後は 8 月 5 日に激発状態となり、14 日に枯死し、その後は乾燥した (図 6.5)。一方で、2018 年では 7 月 6 日に疫病が圃場で初発し、20 日に採取植物体が発病した。27 日には 1 植物体あたり平均して約 21.7 個の病斑が認められたが、その後は暑さによって疫病の病斑数は減少し、8 月 5 日の時点で 6 個/植物体であった。その後しばらくは猛暑が続き病斑の個数も最大で 10 個であったが、8 月 18 日に再び疫病が大規模に発生し、病斑数の平均は 47 個/植物体であった。その後は 8 月 31 日に全ての植物体が枯死し、その後は乾燥した (図 6.6)。

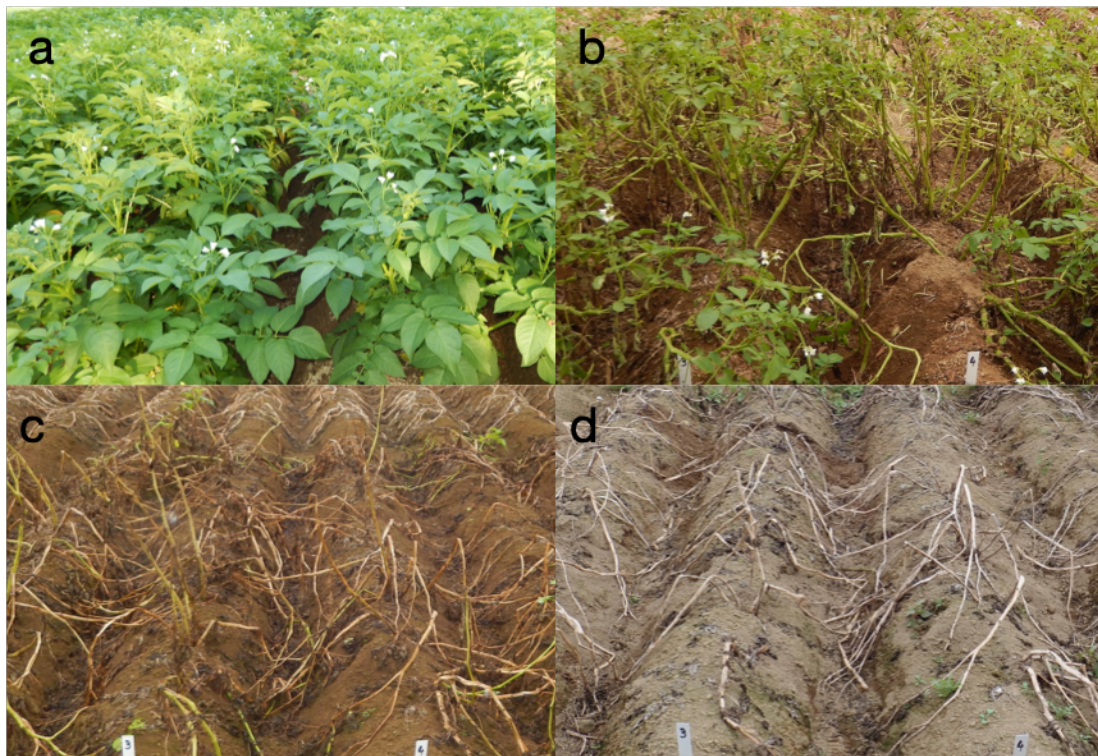


図 6.5 無防除圃場における地上部の病徴進展 (2017 年).

a 圃場の初発時 (7 月 7 日). b 地上部激発 (8 月 5 日). c 疫病によって地上部が枯凋 (8 月 18 日). d 地上部乾燥 (8 月 25 日).



図 6.6 無防除圃場における地上部の病徴進展 (2018 年).

a 圃場の初発前 (6 月 15 日). b サンプルング株に病斑を認めた (7 月 20 日). c 地上部病斑数が増加した (7 月 27 日). d 高気温により疫病が広まらず，罹病葉の多くが枯れて落ちた (8 月 25 日). e 疫病が再び広まった (8 月 18 日). f 乾燥 (9 月 14 日).

2 か年を通して土壌疫病菌密度は初発前または初発時に低く，その後は地上部の病徴進展に伴って増加した．その後は病斑数の減少や植物体の枯死・乾燥によって減少した．わずかな量ではあるが乾燥後約 1 か月経過しても疫病菌 DNA が定量された．また，畝表面の土壌は塊茎周辺よりも高い定量値であったことが多く，特に 2017 年は全ての調査日で畝表面土の方が塊茎周辺土よりも高い定量値であった (図 6.7a)．また，塊茎周辺土を採取する際に塊茎も観察しているが，明らかな腐敗塊茎はなかった．

2018 年における畝表面土の感染ポテンシャルは，8 月 3 日に初めて疫病による塊茎腐敗が観察された．その後もわずかではあるが塊茎腐敗は観察され続け，8 月 18 日に塊茎腐敗数は最大となり平均 2 個であった．その後 24 日まで塊茎腐敗は観察されたが，8 月 24 日以降に塊茎腐敗は観察されなかった (図 6.7b)．

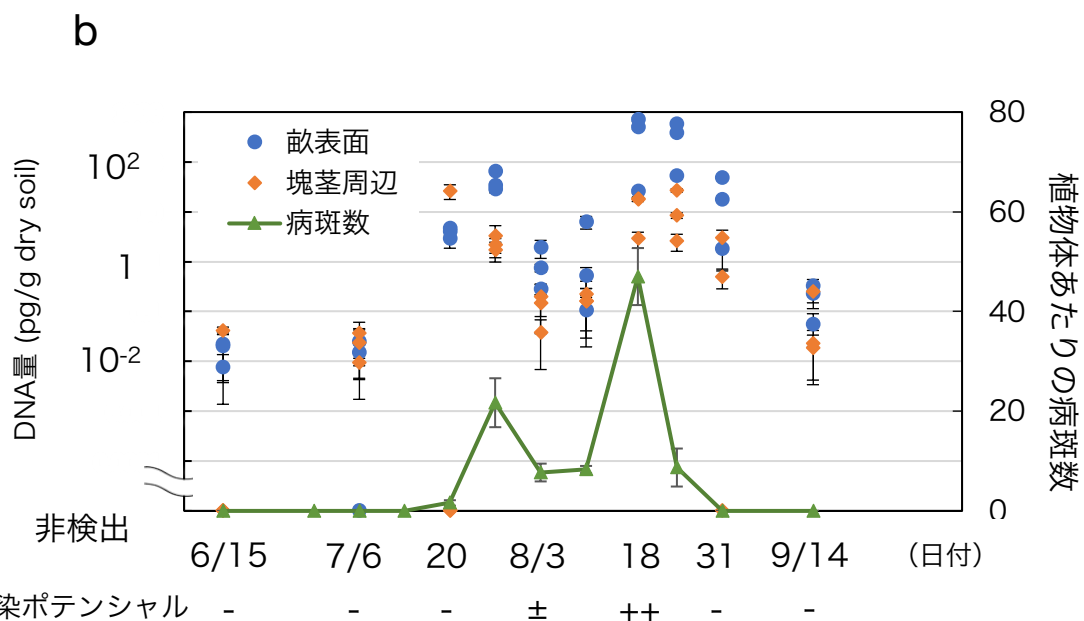
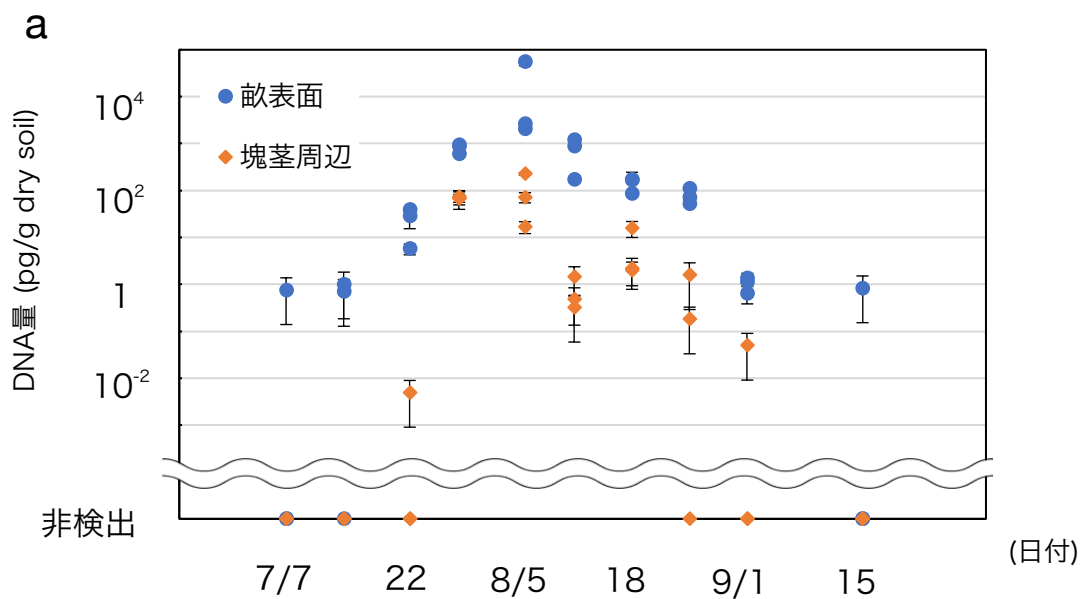


図6.7 各土壌のジャガイモ疫病菌DNA量の推移ならびに畝表面土壌の感染ポテンシャル。

バーは±標準誤差。a 2017年の結果、b 2018年の結果。感染ポテンシャルは供試6塊茎中の疫菌腐敗個数が0の場合は-, $0 < \text{腐敗塊茎数} < 1$ の場合は±, $1 \leq \text{腐敗塊茎数} < 2$ の場合は+, 2以上の場合は++。

6.II.5 考察

リアルタイム PCR の結果、地上部の疫病消長とよく一致した土壌疫病菌密度の推移が確認されたことから、第 5 章で開発した土壌疫病菌密度定量法は圃場土の菌密度モニタリングに適していると考えられた。2018 年の圃場での疫病消長は、高気温によって疫病の病徴進展が一時止まる現象が 7 月下旬から 8 月上旬にかけて観察された。リアルタイム PCR による定量結果もそれを反映するように当該期間は定量値が低かったことから、本法は疫病菌密度の大まかな季節的な変動のみならず週単位での詳細な菌密度推移まで定量することができ、非常に精度が高い。

感染ポテンシャルに関しては、わずかではあるが疫病激発時期かつ疫病菌 DNA 定量値が大きかった 8 月に疫病腐敗が確認された。塊茎腐敗数が最大 2 個と多くなかった原因として、高温によって疫病菌の活性が落ちていたことや疫病菌密度自体が 2017 年と比較して低く、感染ポテンシャルが十分高い条件に至らなかったためであると考えられる。したがって、より感度が高いバイオアッセイ方法を用いて再度同様の試験を行う必要がある。

DNA 量が地上部の病徴進展とよく対応し、DNA 量は地上部の消失後は 1 週間で約 10 分の 1 に減少した。このことから、疫病菌は土壌では生育せずに比較的速度やかに活性を失い、DNA も分解されると考えられた。疫病菌の菌糸は未滅菌土壌では生育・増殖できないため (Lacey 1965)、土壌に落下した遊走子のうが土壌そのものを栄養源として増殖することはないと考えられる。疫病菌の場合、遊走子のう・遊走子は耐久体ではないため長期間の生存に適さない。したがって、土壌中では比較的容易に死滅すると考えられる。死滅後の疫病菌は分解が進み、DNA の多くが分解されると考えられた。しかし、今後日本に A2 交配型の疫病菌が定着し、卵胞子が土壌から発見されるようになった際には長期間にわたって疫病菌 DNA は定量され続ける可能性が高い。また、地上部の消失から 1 か月経過してもわずかであるが疫病菌 DNA が定量された。第 I 節の結果でもあるように、疫病菌 DNA は地上部の消失後は 1 週間につき約 10 分の 1 に減少している。単純計算では枯凋 1 か月後の土壌菌密度は枯凋時の約 10^4 分の 1 であるため、検出限界を下回り非検出であるはずである。それにもかかわらず微量の DNA が定量された原因は、(1)無防除圃場内にわずかに残存する他品種の病斑由来の疫病菌が飛来し土壌に落下したため、または (2)土壌中の DNA は DNase で直ちに分解が進むものの、分解が行われにくい土壌粒子 (粘土鉱物)への DNA

の吸着 (Lorenz and Wackernagel 1994; Levy-Booth et al. 2007) が起こっていたためであると考えた。仮に土壌粒子への吸着が真の原因であった場合は、どの程度の期間まで疫病菌 DNA が検出されるかは不明であるため別途試験が必要である。

また、塊茎周辺土壌は畝表面土壌よりも土壌中の DNA 量が低い結果が多く得られ、この傾向は 2017 年で顕著であった。この結果から、疫病菌の多くは土壌を浸透せず、地上部に留まっていることが示唆された。土壌を採取する際には明らかな残渣は極力除くようにサンプリングしているため、定量された DNA の多くは遊走子のう・遊走子・菌糸・遊離 DNA として畝表面に偏在していると考えられる。また、塊茎周辺土壌の DNA 量は畝表面の 10 分の 1 程度であることが多かった。第 I 節のポリポットを用いた試験では深さ 10 cm 地点の DNA 量は深さ 0 cm 地点の土壌と比較して 1000 分の 1 程度の定量値であった。この違いは、無防除圃場は夜間など気温が低い条件で遊走子のうが間接発芽し遊走子となって土壌を浸透したことや、ポリポット条件と比較して圃場条件は土壌が緊密ではなかったことが考えられる。しかし、明らかな腐敗塊茎が圃場においても観察されなかったことから、塊茎付近まで疫病菌が到達したとしても発病に十分量の活性のある疫病菌が存在しなかったのではなかったのではないかと推察される。先行研究においても栽培中の塊茎腐敗の大半は深さ 5.1 cm 以内で観察されており (Lacey 1966), 先行研究の結果を DNA 量で裏付けることができた。2018 年の結果では 7 月 20 日のみではあるが全ての畝表面土壌サンプルよりも塊茎周辺土壌の方が高い定量値であった。この原因は土壌の亀裂によって畝内部に高密度に疫病菌が溜まっている箇所が存在した、人為的なサンプルの取り違いといった理由が考えられるが定かではない。

III DNA 量と感染ポテンシャルの関係

6.III.1 背景

第 I, II 節の結果より, 疫病菌 DNA を正確に定量でき, 圃場における疫病菌の生態を DNA 量, すなわち菌密度の側面から明らかにすることができた. しかし, リアルタイム PCR はあくまで DNA 量を定量する技術であり, 真の疫病菌密度ではない. 定量された DNA には活性のある疫病菌以外にも, すでに死滅している疫病菌や細胞外に遊離した DNA も含まれているため, 定量値が疫病菌そのものをどの程度反映しているかは不明である.

6.III.2 目的

リアルタイム PCR による定量値が感染ポテンシャルを反映しているか確かめることは, 本定量技術を効果的な塊茎腐敗防除体系の一技術として検討していく上で不可欠である. 第 II 節で付傷塊茎を用いたバイオアッセイを行なった結果, 定量値が高い土壌で塊茎腐敗が認められたが, 検出精度・感度は不十分であった. 本節では, より高感度な Sato (1980) のバイオアッセイを利用して DNA 量と感染ポテンシャルの関係性を明らかにすることを目的とする.

また, これまで供試した土壌は無防除圃場土であり, 激発時期の土壌には高密度に疫病菌が存在していると予想された. しかし, 一般圃場では圃場一面に疫病が発生するほどの状況になることは稀であり, 無防除圃場よりも菌密度が低いことが予想される. 本節では, 疫病が発生した一般圃場の土壌を供試し, 一般圃場程度の条件であっても開発した定量方法が利用可能か確認する.

6.III.3 材料・方法

2018 年 8 月 20 日に疫病が発生した北海道十勝地方の A, B, C の 3 圃場で土壌のサンプリングを実施した. 圃場で疫病が発生した範囲内でほぼ均等に 5 地点選定し, 無防除圃場のサンプリングと同様に畝表面土壌ならびに塊茎周辺土壌を採取した. 採取した 5 地点の土壌を均等量ずつよく混和し, 検定土壌とした. また, 圃場 A, 圃場 C では畝間の表土も採取した. サンプリング後は速やかに土壌を 2 つに分け, 片方をリアルタイム PCR による菌密度定量のために -20°C で冷凍保存した. もう片方は Sato の方法でバイオアッセイし, 土壌の感染ポテンシャルを評価した (Sato 1980). バイオアッセイ試験は 8 月 22 日に実施し, 観察した 100 ピースの塊茎スライスのうち疫病菌の遊走子のうが双眼実体

顕微鏡で確認されたものの個数を数えた。なお、本試験では感染ポテンシャルは $\text{感染ポテンシャル (\%)} = (\text{疫病腐敗した塊茎スライス数}) / (\text{全塊茎スライス数}) \times 100$ と定義した。リアルタイム PCR は第 II 節の方法と同様に実施した。反復はバイオアッセイは 2 反復、リアルタイム PCR は 3 反復設定した。相関係数の決定・解析は解析ソフトウェア EZR (Kanda 2013) を使用し、感染ポテンシャルの割合を逆正弦変換した値と DNA 量を用いて求めた。

6.III.4 結果

リアルタイム PCR の結果得られた疫病菌 DNA 量は A 圃場で多く、特に畝間で大量の DNA が定量された。他の圃場でも同様に畝間の土壌は比較的高密度の DNA が定量された。一方で、感染ポテンシャルも A 圃場で高い結果が得られた (図 6.8)。感染ポテンシャルと DNA 量の相関係数は $r = 0.76$ ($p < 0.05$) であり、正の相関が認められた。一方で、B, C 圃場は全体的に低い定量値であり、それを反映するように感染ポテンシャルも低い結果になった。

一方で、第 II 節の結果と異なり、塊茎周辺土壌の方が畝表面土壌よりも高い DNA 密度であった。しかし、感染ポテンシャルは全ての圃場で塊茎周辺土の方が畝表面土よりも低い結果となった。また、塊茎に腐敗は観察されなかった。

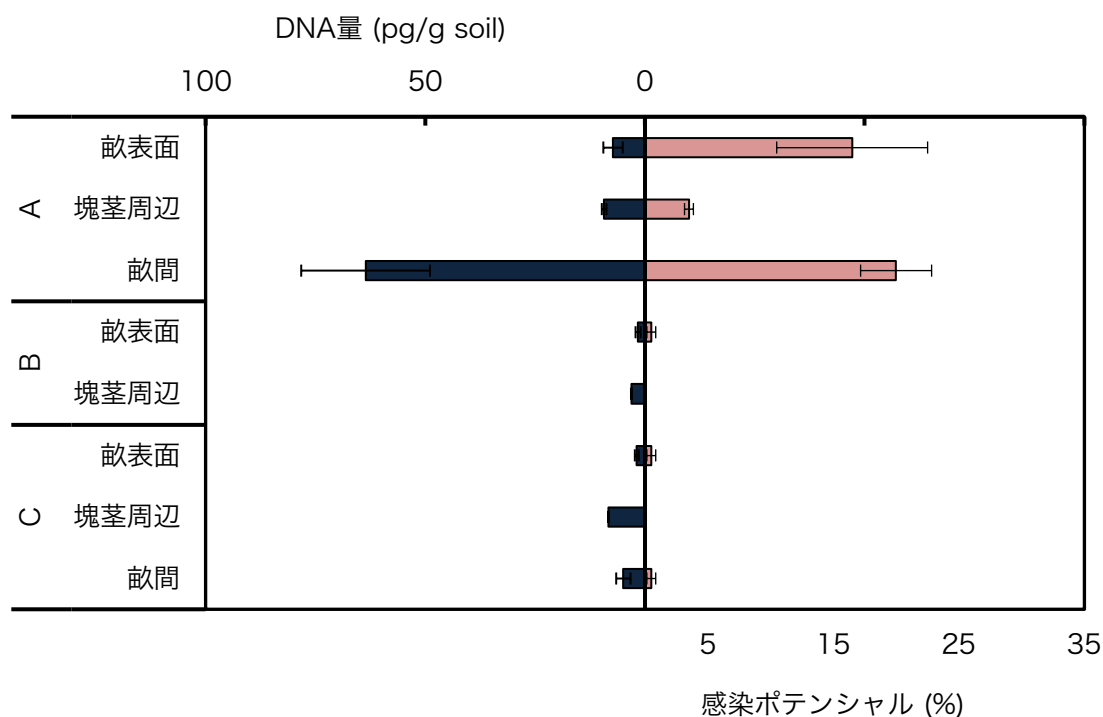


図 6.8 リアルタイム PCR により定量されたジャガイモ疫病菌 DNA 量と感染ポテンシャル。
バーは±標準誤差。

6.III.5 考察

定量された DNA 量と感染ポテンシャルに正の相関があったことから、リアルタイム PCR によって感染ポテンシャルを間接的に定量できることがわかった。これまで感染ポテンシャルを定量するためにはバイオアッセイが利用されてきた。バイオアッセイは培養期間が必要であり、その期間は通常 1 週間以上である。一方でリアルタイム PCR は数時間程度で DNA を抽出・定量ができるため、これまで以上に迅速な定量が可能である。また、バイオアッセイでは腐敗が疫病に起因するものかを判断するためには顕微鏡観察を行うため、疫病菌に関する知識や顕微鏡の使用に関して技術が必要である。リアルタイム PCR は分子生物学的手法を用いた試験の経験があれば誰でも実験可能であることから、本技術によって感染ポテンシャル評価が簡便になる。

今回の試験では、A 圃場で高い定量値が得られた一方で、B、C 圃場では低い定量値であった。以上のことから、本定量法によって圃場ごとの疫病菌密度を正確に定量することができたと考えられる。A、B、C 圃場はそれぞれ悪天候のために疫病防除が予定通り行われずに疫病が発生した圃場、自然農法のため無防除栽培を行なっている圃場、防除の際に畝の数え間違いによって薬剤未散布箇所が発生してしまった圃場である。なぜ A 圃場が B、C 圃場に比べて高い定量値・感染ポテンシャルであったかは不明であるが、B 圃場の自然農法は耕種的・物理的な防除は行うことが一般的であり、C 圃場も薬剤が散布されていない箇所はあるもの薬剤散布は行われているため圃場全体の疫病菌密度は低いと推察される。A 圃場は圃場全体として疫病菌密度が高く、疫病が激発したのではないかと考えられる。

本節の定量結果では、全ての圃場で塊茎周辺土壌の方が畝表面土よりも DNA 量が多かったものの、感染ポテンシャルは低かった。これは、土壌中に疫病菌が浸透したものの活性を失い、死滅した疫病菌が多く存在していたためであると考えられる。気象庁ホームページより 2018 年 8 月 14–18 日の気象情報を参照すると、最低気温は連日 13 °C 前後であり、降雨があったことがわかる (気象庁 online)。この寒冷で降雨のあった時期に遊走子のうが間接発芽し、土壌中に浸透したために土壌中の菌密度が高かったのではないかと考えられる。しかし、疫病菌遊走子が運動性を保てられる時間は通常 60 分足らずであり (Fry 2008)、直ちに活性を失ったと考えられた。畝表面の土壌は地上部の病斑由来の疫病菌が落下したものであると考えられるため、塊茎周辺土壌と比較して新鮮かつ活性の高い疫病菌が多く、その結果感染ポテンシャルが高かったと考察された。

また、今回の試験では畝間の土壌が DNA 量・感染ポテンシャルともに他の土壌よりも大きい結果が得られた。先行研究でも激発圃場の畝間には多くの水が滞留し、疫病罹病植物体の表面を流れた雨水 1 mL は遊走子のう 500 個未満を含むと報告されており (Lacey 1967b)、本試験は先行研究を分子生物学的手法で裏付けた。圃場内で最も菌密度が高い土壌は畝間の表土であるとわかったことから、今後土壌を用いて圃場全体の感染ポテンシャルを評価する際は畝間土壌を利用することで効率的に評価できる可能性がある。

第 7 章 殺菌剤処理による貯蔵腐敗軽減

背景

第 6 章までの結果から、土壌中の疫病菌 DNA はリアルタイム PCR で定量可能であり、その定量値は病原性がある疫病菌の密度を間接的に示していることがわかった。これまでの一連の研究成果は将来的に貯蔵塊茎腐敗の被害予測のために利用できる可能性がある。第 7 章では具体的な塊茎腐敗防除法を検討する。

現在の日本では、塊茎腐敗の防除法として栽培中の殺菌剤茎葉散布のみが認められている。したがって、生産者は圃場で地上部の疫病を発生させないように対策を行った上で、収穫が近づくと塊茎腐敗の被害を抑えるためにさらに化学防除を行う。塊茎腐敗に効果がある殺菌剤は複数あるが、とりわけシアゾファミド剤 (商品名：ランマンフロアブル、石原バイオサイエンス株式会社) を散布している例が多い (荒木私信)。収穫前にシアゾファミド剤を散布することは塊茎腐敗に対して極めて高い効果があると生産者の間で評判となっており、実施する生産者は多い。栽培中の殺菌剤散布が塊茎腐敗に効果はあると研究機関の試験で立証されているが (大島ら, 2004; 藤根 2012)、収穫前に散布する方法でどの程度疫病菌の土壌密度・塊茎腐敗が減少するか、を確かめた例はない。

ジャガイモ栽培では、収穫前に枯凋剤・チョッパーなどで茎葉を処理することが一般的である。これらの処理を行なっても地上部は直ちに枯死せず、数日間生存する。この時期の疫病発生を抑える目的で枯凋剤散布時から殺菌剤を茎葉散布することがある。しかし、実際には地上部はすでに少なくなっているため、殺菌剤が多く土壌表面に直接付着している。第 6 章のリアルタイム PCR による無防除圃場土の定量結果より、疫病菌は畝表面に偏在していることが多いことが分かっている。したがって、この散布によって畝表面の疫病菌が薬剤のドリフトによって殺菌されていたと予想される。

I 殺菌剤の処理に伴う土壌菌密度の変化

7.1.1 背景

ここまでの研究によって、塊茎腐敗の原因となる疫病菌の多くは土壌の表層に存在し、収穫時に汚染土壌と塊茎が混和されることで大規模な貯蔵腐敗が発生するとわかった。したがって、畝表面に偏在している活性のある疫病菌を殺

菌することで貯蔵腐敗を容易に防除できる可能性がある。また、第 6 章で土壌の感染ポテンシャルをリアルタイム PCR で間接的に定量できることを示したが、殺菌剤の使用による感染ポテンシャルの低下も同様に定量できるかは不明である。

7.1.2 目的

表土付近に存在する疫病菌を効率的に殺菌するため、残渣への殺菌剤処理による防除法 (以下、表土殺菌剤処理法) を考案した。表土殺菌剤処理法によってどの程度疫病菌密度が低下するのか、塊茎腐敗の発生はどの程度減少するのかを明らかにすることを目的として、実験室内で小規模な試験で検証した。また、殺菌剤の使用によって土壌の感染ポテンシャルは低下することが予想されるが、殺菌剤による疫病菌活性低下に伴う菌密度低下もリアルタイム PCR で間接的に定量できるか確認した。

7.1.3 材料・方法

汚染土壌の準備・殺菌剤散布

バットに健全土壌 (北農研芽室) を厚さ 2.5 cm ほど敷き、健全ジャガイモ葉 (cv. 男爵薯) を細かく切断し生重 6 g/バットの密度で土壌の上に撒いた。その上に疫病菌遊走子の懸濁液 (菌株名: MR1799) を 280 zoosporangia/cm² で噴霧接種した。無接種区では純水を同量噴霧した。

その後、塊茎腐敗に効果があり一般に広く用いられている 2 種の殺菌剤 (シアゾファミド水和剤、アメトクトラジン・ジメトモルフ水和剤) を噴霧接種した。シアゾファミド水和剤 (商品名ランマンフロアブル, 石原バイオサイエンス株式会社)、アメトクトラジン・ジメトモルフ水和剤 (商品名ザンプロ DM フロアブル, BASF アグロ株式会社) はそれぞれジャガイモ疫病の登録最大濃度 (1000 倍希釈・300 L/10a) でバットの残渣・土壌に向けて噴霧した。薬剤無処理区・無接種区では殺菌剤の代わりに同量の純水を噴霧した。殺菌剤処理後はラップフィルムをバットにかけて保湿し、室温で培養した。培養 0, 1, 3, 7 日後に土壌を一部採取し、バイオアッセイで感染ポテンシャルを推定し、リアルタイム PCR で DNA 量を定量した。

バイオアッセイ・リアルタイム PCR

バイオアッセイは第 7 章のおろし金法 (n=8, 3 反復, cv. 男爵薯) を採用し、

培養開始から 2 週間後の腐敗塊茎数で評価した。リアルタイム PCR は第 6 章の方法を使用した。リアルタイム PCR もバイオアッセイと同様に 3 反復設定した。また、乾土 1 g あたりの DNA 量を算出するため、第 6 章の方法で土壌水分量も測定した。

罹病塊茎数・DNA 量の培養日数ごとのデータは、統計ソフトウェア R (R Core Team 2019) で一元配置分散分析を行なった。一元配置分散分析が 5 % 水準で有意であった場合、ボンフェローニ法で多重比較を行なった。

7.1.4 結果

培養中の接種土壌は薬剤無処理区でのみ残渣上に疫病菌の白色菌糸の生育が観察され、その他の試験区では疫病菌の生育は観察されなかった (図 7.1)。感染ポテンシャルは薬剤無処理区・培養 3 日目で最大となり、全ての塊茎が腐敗した。一方で、いずれの殺菌剤を散布した区も塊茎腐敗は非常に低く抑えられ、最大でも 0.7 個であった。また、無接種区でもわずかながら塊茎腐敗が確認されたが、疫病菌の遊走子のうは確認されず、雑菌による腐敗であった (図 7.2)。

DNA 量は培養 0 日目では 1 g 乾土あたり約 10 pg であった。その後の培養で薬剤無処理区では増加し、7 日後には約 50 倍に増加した。一方でいずれの殺菌剤区でも培養日数を経るごとに定量値は減少し、7 日後には 0 日目のおよそ 10 分の 1 になった。また、全ての無接種区では疫病菌 DNA は検出されなかった (図 7.3)。感染ポテンシャルが高かった培養 3, 7 日後の薬剤無処理土壌は DNA 量も多く、それぞれ 50.3, 203.9 pg/g dry soil であった。これらの定量値は同じ培養日数の両殺菌剤区と比較して有意に大きな定量値であった。

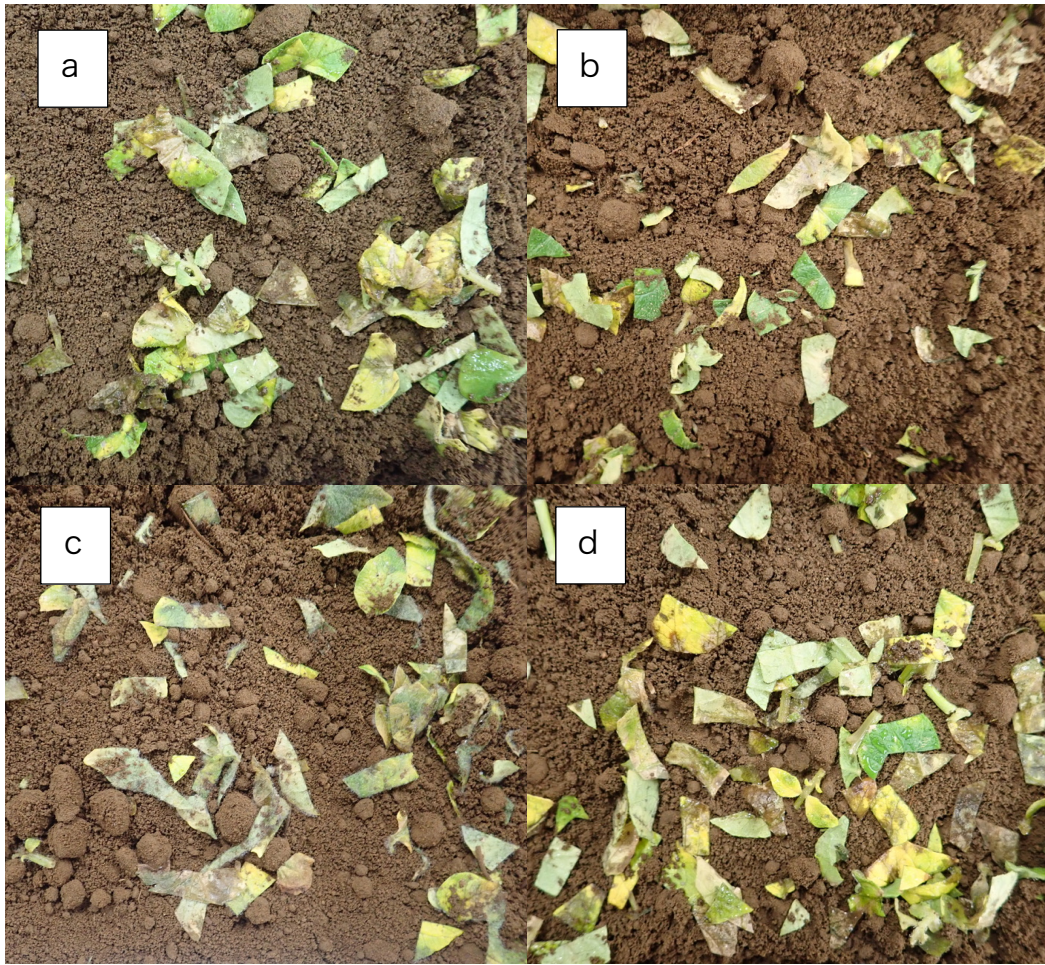


図 7.1 殺菌剤の散布による罹病残渣の変化. 写真は全て培養 3 日目. a シアゾファミド水和剤散布区. b アメトクトラジン・ジメトモルフ水和剤散布区. c 薬剤無処理区. ジャガイモ疫病菌の旺盛な生育が認められる. d 無接種区.

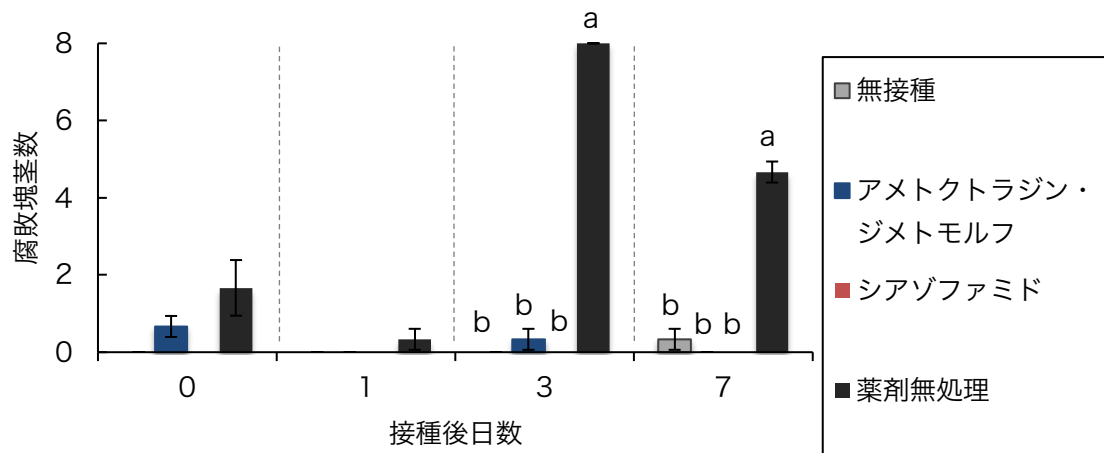


図 7.2 供試土壌の感染ポテンシャル.

バーは±標準誤差. 異なるアルファベットは一元配置分散分析後の多重比較 (ボンフェローニ法)で 5%水準で有意であったことを示す.

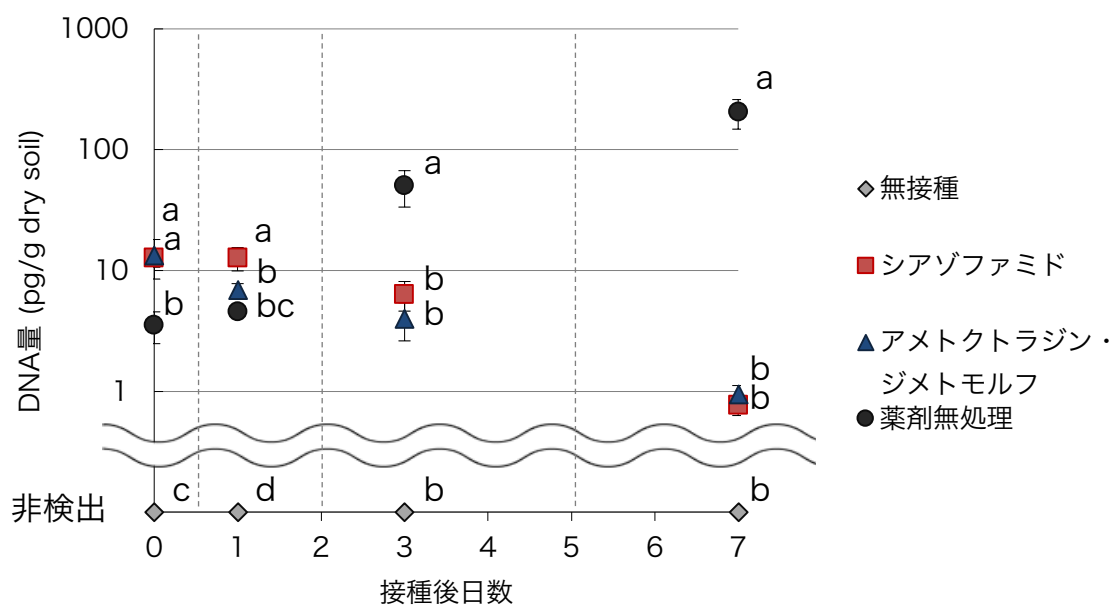


図 7.3 リアルタイム PCR による供試土壌のジャガイモ疫病菌 DNA 量.

バーは±標準誤差. 異なるアルファベットは一元配置分散分析後の多重比較 (ボンフェローニ法)で 5%水準で有意であったことを示す.

7.1.5 考察

感染ポテンシャルが大きい土壌からは疫病菌 DNA も大量に定量された。一方で殺菌剤の使用によって感染ポテンシャルが低かった土壌の DNA 量は少なかった。第 6 章で土壌の感染ポテンシャルをリアルタイム PCR で間接的に定量できることを示したが、殺菌剤の使用による感染ポテンシャルの低下も同様に定量できるかは不明であった。本試験では培養 0 日目以降の DNA 量は減少を続けたため、土壌疫病菌密度をリアルタイム PCR による疫病菌 DNA 量で間接的に定量できるとわかった。しかし、殺菌剤散布 0 日後、1 日後といった散布直後は DNA 量の減少がわずかであったためリアルタイム PCR で感染ポテンシャルを定量できない可能性がある。細胞外 DNA の半減期は淡水で 5 時間前後、土壌では 9.1-28.2 時間であるとの報告から (Lorenz and Wackernagel 1994)、菌体が分解されて DNA 量が減少し、リアルタイム PCR での定量結果に減少が反映されるまでは最低でも 1 日以上を要すると考えられる。

また、殺菌剤散布区の DNA 量は 1 週間で約 10 分の 1 に減少した。第 6 章のポリポット土壌・無防除圃場での菌密度推移も 1 週間経過後、土壌疫病菌 DNA 量は約 10 分の 1 に減少した。したがって土壌中での疫病菌密度は 1 週間で約 10 分の 1 に減少することは一般的な事象である可能性がある。

本試験で、土壌上の残渣へ殺菌剤散布によって感染ポテンシャルが減少することが小規模試験ではあるものの明らかになった。また、2 種類の殺菌剤を供試したところ、効果の程度ならびに DNA の減少程度はほぼ同様であった。したがって、表土殺菌剤処理法は塊茎腐敗に効果がある殺菌剤であれば同様の効果が期待できると考えられる。今回は室内試験であったが、今後は圃場でも同様に塊茎腐敗被害を抑えることが可能か確かめる必要がある。

II 圃場における残渣への殺菌剤処理に伴う土壌菌密度の変化と防除効果

7.II.1 背景

前節の結果から、塊茎腐敗に登録されている殺菌剤を表土の残渣に対して散布すれば感染ポテンシャル・DNA 量が減少し、貯蔵腐敗の減少に寄与できる可能性があることがわかった。したがって、圃場においても表土殺菌剤処理法が同様の効果がある可能性がある。圃場において疫病菌は畝表面土に多かったものの、塊茎周辺からも一定量の DNA が定量された。したがって、畝表面残渣に対して殺菌剤を散布する目的は変えず、ある程度土壌へ殺菌剤が浸透するような散布法を考える必要がある。土壌に浸透させる殺菌剤散布法は灌注として農薬登録され、現在のところジャガイモ疫病に対して灌注処理は全ての殺菌剤で登録されていない。しかし、シアゾファミド水和剤 (商品名：ランマンフロアブル) はハクサイ根こぶ病に対してセルトレイ灌注が認められ、効果があることが報告されている (Mitani et al. 2003)。

7.II.2 目的

ジャガイモ塊茎腐敗の予防的防除に広く用いられ、なおかつ他の病害ではあるが土壌灌注に登録があるシアゾファミド水和剤を用いて同様の試験を複数圃場・複数年次で行い、表土殺菌剤処理法の新しい塊茎腐敗防除法としての有用性を確認する目的で試験を行った。

7.II.3 材料・方法

試験区・試験圃場

試験は 2018 年に 1 回 (芽室 8 月試験)、2019 年に 3 回 (札幌 7 月試験・芽室 8 月試験・札幌 9 月試験)、疫病菌の生育至適温度である 20 °C 前後の気温の時期に行なった。芽室試験では北農研芽室の無防除圃場を、札幌試験では北海道大学植物病理学研究室無防除圃場を使用した。なお、2019 年札幌 7 月試験を除く全ての試験時で地上部には疫病の病斑が存在していた。試験区として、(1)殺菌剤通常濃度区 (2)殺菌剤高濃度区 (3)殺菌剤不使用区 の 3 区設定した。

疫病菌の接種・殺菌剤散布

地上部処理を想定して 5 株分の地上部を刈り取り、残渣として畝上に置いた。その後は畝状の残渣・土壌に向けてグリーンピース寒天培地で 15 °C、2 週間培養した疫病菌から作成した遊走子の懸濁液を 9.0×10^4 zoosporangia/5 株で噴霧し

た。接種後はシアゾファミド水和剤 (商品名：ランマンフロアブル)を濃度を変えて5 Lにメスアップし、残渣上にジョウロで散布した。殺菌剤の散布密度は (1) (2)の試験区でそれぞれ 2.3 mg ai/株, 17.5 mg ai/株であり、それぞれジャガイモ疫病、ハクサイ根こぶ病適用濃度の最大値である。また、展着剤 (アプローチ BI, 丸和バイオケミカル株式会社)もジャガイモ散布に適切な濃度 (2.5 mL/5L) で添加した。殺菌剤不使用区は展着剤のみを含み殺菌剤を含まない水を同量散布した。残渣量・接種菌株等の試験の詳細は表 7.1 に記した。使用したシアゾファミド剤は収穫 7 日前までの散布が認められているので、散布 7 日後の畝表面の土壌をバイオアッセイ、リアルタイム PCR に供した。

バイオアッセイ・リアルタイム PCR・統計解析

塊茎付傷・土壌混和は第 4 章のバケツ法で行ない、培養は室温で行なった。1 週間おきに腐敗塊茎の有無を観察し、細菌性腐敗を起こした塊茎は取り除いた。腐敗塊茎の増加が落ち着いた培養 3 週後の腐敗塊茎数を評価対象とした。試験区は 30 塊茎/区, 3 反復設定した。リアルタイム PCR は第 6 章の方法で行ない、3 反復設定した。

2 つの殺菌剤処理区それぞれと殺菌剤不使用区の感染ポテンシャルを解析ソフトウェア EZR (Kanda 2013)を使用しメタ解析した。3 反復の平均腐敗塊茎数を用いたリスク比をランダム効果モデルで解析した。リアルタイム PCR によって定量された DNA 量は試験ごとに一元配置分散分析で解析し、5 %水準で有意であった場合には Tukey 法で各試験区を多重比較した。

表 7.1 試験条件の詳細

実施年	試験名	試験圃場	市町村	品種	菌株名	5 畝あたりの 残渣量 (kg 生重)
2018 年	芽室 8 月試験	北海道農業研究センター芽室研究拠点 無防除圃場 A	北海道 芽室町	スノーデーン	MR1801	1.9
2019 年	札幌 7 月試験	北海道大学植物病理学研究室 無防除圃場	北海道 札幌市	男爵薯	HU1801	2.0
2019 年	芽室 8 月試験	北海道農業研究センター芽室研究拠点 無防除圃場 B	北海道 芽室町	スノーデーン	MR1901	1.5
2019 年	札幌 9 月試験	北海道大学植物病理学研究室 無防除圃場	北海道 札幌市	スノーデーン	HU1901	1.0

7.II.4 結果

塊茎腐敗は薬剤無処理区で多く認められ、殺菌剤処理区ではいずれの濃度であつても腐敗塊茎数の減少が認められた。両年ともに北農研芽室で行われた試験では薬剤無処理区での塊茎腐敗が激発したが、札幌で行われた試験では塊茎腐敗数は30塊茎中9個程度と北農研芽室の腐敗率よりも低かった。札幌の試験ではたとえば薬剤無処理区であつても腐敗塊茎に疫病菌が観察できないものが多数存在していた。北農研芽室での試験では薬剤無処理区では多くの疫病による塊茎腐敗が観察された。

リアルタイム PCR で定量した疫病菌 DNA 量は、各試験で定量値が大きく異なったが殺菌剤の処理によって DNA 量が低下した事例が4試験中3試験あつた(図 7.4)。疫病菌 DNA が十分量含まれていた 2018 年芽室 8 月試験、2019 年芽室 8 月試験では殺菌剤濃度によらず殺菌剤の処理で DNA 量の有意な減少が認められた。疫病菌 DNA 量が薬剤無処理区でさえ特に少なかった 2019 年札幌 7 月試験では一元配置分散分析による解析で有意差が認められなかった。

感染ポテンシャルをメタ解析した結果、殺菌剤通常濃度処理区・殺菌剤高濃度処理区ともに有意に発病の抑制効果が認められ、無処理に対する殺菌剤通常濃度処理・高濃度処理の統合リスク比はそれぞれ 0.11, 0.08 であつた。この結果から、殺菌剤無処理と比較して表土殺菌剤処理法の発病割合は 10 %程度になる可能性が高いことがわかつた。しかし、4 試験間のばらつきを表す統計学的異質性の尺度である I^2 が両試験区ともに 50 %を超え、異質性が認められた (図 7.5)。

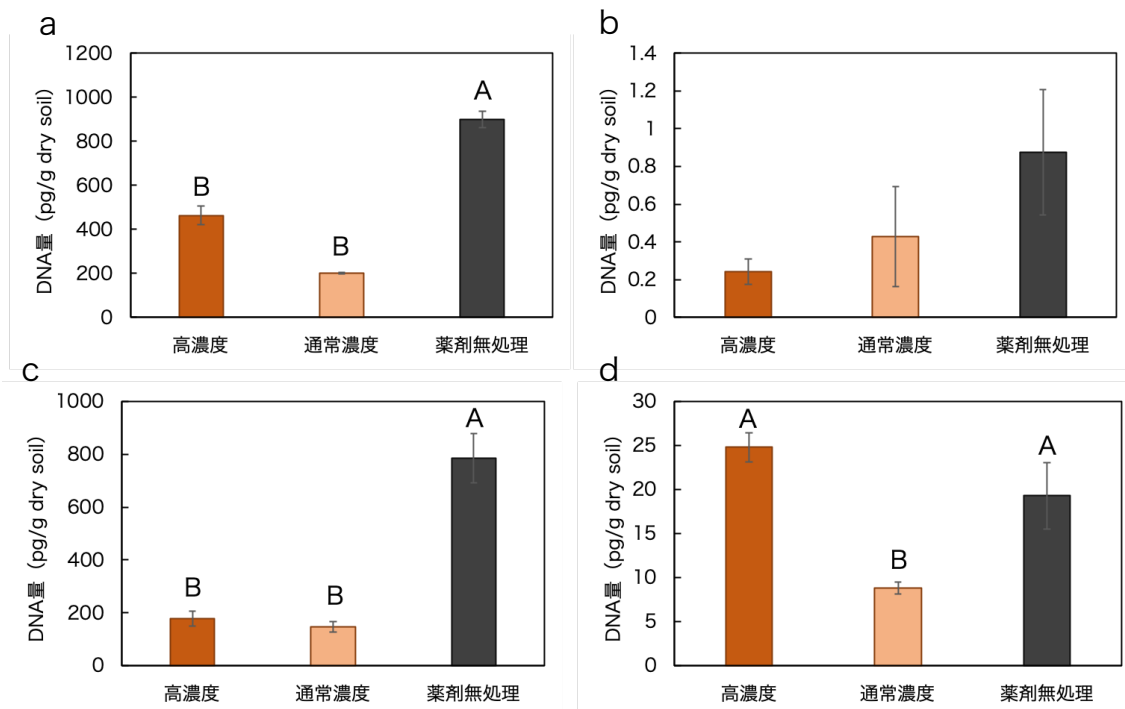


図 7.4 リアルタイム PCR による土壌中のジャガイモ疫病菌 DNA 量の定量値。バーは±標準誤差。各グラフ内の異なる大文字アルファベットは多重比較 (Tukey 法) で 5%水準で有意であることを表す。 a 2018 年芽室 8 月試験。 b 2019 年札幌 7 月試験。 c 2019 年芽室 8 月試験。 d 2019 年札幌 9 月試験。

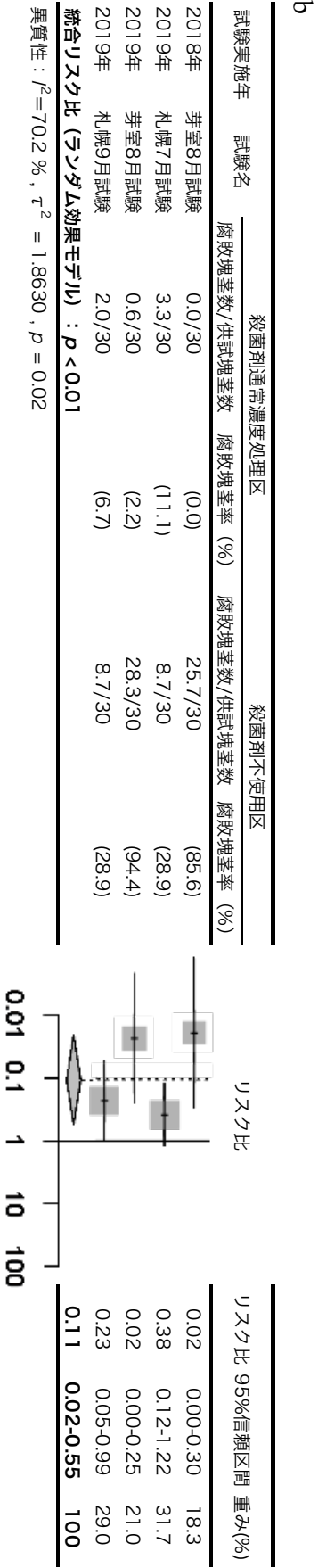
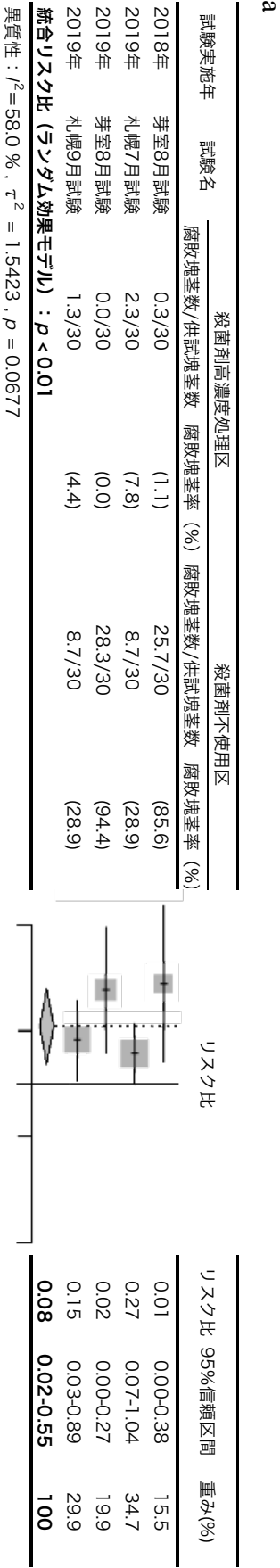


図 7.5 殺菌剤不使用土壌に対する表土殺菌剤処理土壌の感染ポテンシャルのメタ解析による総合リスク比. 解析モデルはランダム効果モデルを採用した. a 殺菌剤高濃度処理の結果, b 殺菌剤通常濃度処理の結果.

7.II.5 考察

DNA 量に関しては、試験ごとにばらつきが大きかったものの、複数の試験で殺菌剤処理による DNA 量の減少が確認された。第 5 章での人工接種土壌の定量結果をもとに今回の定量値を遊走子のうの個数に換算すると、芽室試験の薬剤無処理土壌は約 6000 zoosporangia/g dry soil に換算される菌密度であった。一方で、札幌試験では 2019 年 9 月の試験で 100 個程度、2019 年 7 月試験に至っては数個しか含まれていなかった可能性がある。札幌試験のようなごく低菌密度条件では殺菌剤散布による DNA 量の有意な減少結果は得られなかったが、実際には土壌 1 g あたり数個の遊走子のうしか含まれない土壌は塊茎腐敗を大規模に引き起こすポテンシャルはないと考えられる。本試験での感染ポテンシャルの評価は、実際の収穫機械と比較しても高密度付傷した塊茎を用いている。それに関わらず、札幌試験・薬剤無処理区の腐敗塊茎は 30 個中 9 個程度であった上、疫病以外の雑菌による腐敗も多く観察された。したがって、塊茎腐敗が起りえるような高密度に疫病菌が存在する土壌に殺菌剤を散布することで疫病菌密度が減ると考えて差し支えないと考える。

殺菌剤処理濃度と DNA 量の減少程度に関しては、一元配置分散分析で有意差があった 3 試験のうち、2 試験で殺菌剤濃度間の有意差はなかった。残りの 1 試験では通常濃度の方が高濃度よりも有意に低い DNA 量が定量された。これは殺菌剤の散布が均一でなかった、近くの病斑から疫病菌が偶然サンプリング箇所に落下した、などが原因であると考えられる。いずれにしてもジャガイモ疫病茎葉散布に登録のある通常濃度で DNA 減少効果が認められたので、土壌疫病菌密度を減少させる目的を達するためには通常濃度で十分効果があると結論づけられる。

殺菌剤シアゾファミドは遊走子のう発芽・遊走子遊泳・菌糸伸長・被のう胞子発芽・卵胞子形成の各生育ステージを極めて低濃度で阻害するほか、強い遊走子のう形成阻害を持つ (大島ら, 2004)。したがって、圃場において疫病菌を殺菌するだけでなく、罹病残渣からの遊走子のうの新たな形成を阻害することで二重に圃場疫病菌密度の低下に寄与していたと考えられる。また、本殺菌剤は環境負荷が低く土壌中に蓄積しない。したがって、土壌に殺菌剤が浸透した際も環境負荷が少ないと考えられるが、今後検証が必要である。

感染ポテンシャルのメタ解析の結果、殺菌剤表土処理によって腐敗塊茎数が有意に減少し、どちらの殺菌剤濃度で散布した結果であつてもリスク比は約 0.1

程度になった。したがって、表土殺菌剤処理は高い効果があると考えられる。しかし、異質性の尺度である I^2 が両濃度とも 50 % を超えた。Higgins et al. (2003) は、 I^2 が 50 % を超えると中程度の異質性があると報告している。本解析では両方の殺菌剤散布区で中程度ではあるが統計的異質性が確認されたこととなった。メタ解析は複数の試験を統合し 1 つの結論を導く解析手法である。統合する試験は同じ研究デザイン・目的である必要があり、異質性の指標は適切な試験事例を解析しているかを判断する一つの指標となる。統計的異質性が認められた場合は概念的異質性の有無を吟味し、異質性が両方認められる場合はメタ解析が適切な解析手法ではない (野口 2009)。本試験では実験方法は可能な限り揃えたことから概念的異質性の程度は低いと考えられる。したがって、本解析では強固なエビデンスがメタ解析で得られたとまでは言い切れないものの、十分意味のある結果が得られたと結論づけたい。統計的異質性の原因であるが、札幌で行なった試験のリスク比が芽室の試験と比較して大きいことが考えられる。そもそも札幌を含む道央地方はジャガイモの栽培が盛んではなく、夏の高温等で疫病の発生も年次によって変動が大きい。DNA 量の定量結果も札幌の 2 試験は非常に低く、薬剤無処理区であっても疫病菌の量が少なかったことがわかっている。本論文では様々な試験地でデータを採取し普遍的な結果を求める目的で疫病菌の生育にやや不適な札幌でも試験を行なったが、この 2 試験が異質性を招く原因であったと考察される。しかし、札幌の試験でもリスク比は 0.3 程度であり有意な傾向が認められているので、本防除方法の有用性を否定することにはなり得ない。今後は疫病菌の生育に指摘であり塊茎腐敗が常発している地域 (十勝地域・オホーツク地域など) で試験を重ねる必要がある。

第 8 章 圃場において欠株症状を引き起こす病原糸状菌の同定

8.1 背景

長崎県をはじめとする九州地方のジャガイモ栽培は、春作・秋作の 2 期間で行う栽培が一般的である。近年、長崎県では品種「アイユタカ (中尾ら, 2004)」 「さんじゅう丸 (向島ら, 2012)」を中心に秋作種いもの土中腐敗による欠株が問題となっている。腐敗塊茎を掘り起こし観察すると、切断面を中心に菌糸に覆われ、萌芽障害が認められた (図 8.1)。腐敗のひどいものは軟化腐敗が認められたものもあった。本症状は主要生産地で広く認められ、収量の減少を引き起こしている。これまでに、本症状を緩和するために均一な休眠あけを促すことに加え、種いも切断面を乾燥させること、植え付け後に灌水して地温を下げることで、が行われている (坂本ら, 2016a; 坂本ら, 2016b; 坂本ら, 2016c)。このように、腐敗を防ぐための方法が提案・普及されているものの病原そのものの同定には至っていない。

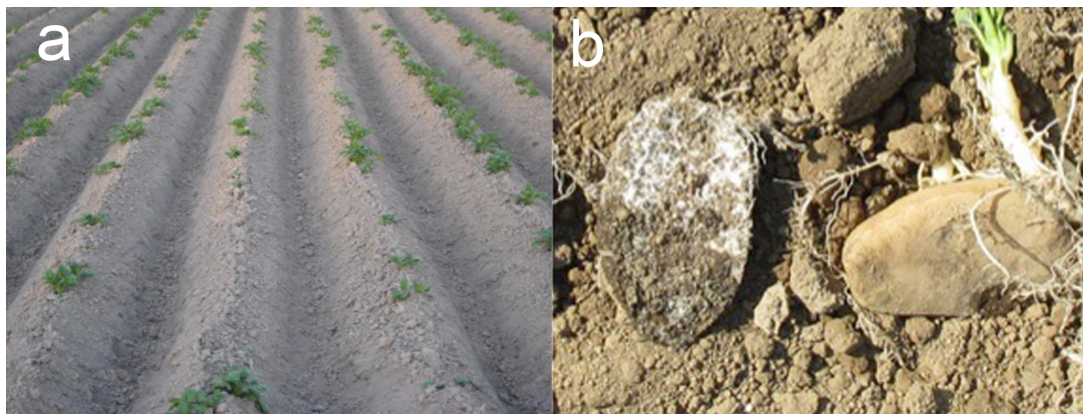


図 8.1 長崎県内で散見される欠株症状 (坂本ら, 2016a).

a 圃場における欠株. b 欠株地点を掘り起こして得た腐敗塊茎 (左)および健全塊茎 (右) (写真提供：坂本悠氏).

8.2 目的

予備試験では腐敗塊茎の顕微鏡観察を行うと *Fusarium* 属菌様の大型分生子が高率で観察されたものの、病原微生物の同定や分布調査は未だにされていない。

本研究では、秋作栽培において欠株を引き起こす病原微生物を同定し、長崎県内の圃場土で分布調査を行うことで今後の防除・育種に役立てることを目的とした。

8.3 材料・方法

病原菌の分離と病原性の確認

腐敗塊茎は長崎県農林技術開発センター馬鈴薯研究所 (長崎県雲仙市)において、2015 年の秋作栽培ジャガイモの欠株部分を掘り起こして得た。湿らせた紙を入れた容器に腐敗塊茎を 2-7 日間入れ、腐敗塊茎上で観察された菌糸を純粋培養し、単孢子分離した。得られた菌株は塊茎スライス上での培養の成否により病原性を簡易的に確認した。病原性があり、かつ Potato Dextrose Agar 培地 (Difco) 上での培養性状ならびに分離源品種に偏りが無い様に試験菌株を選定し、詳細な病原性試験を行った。約 2.0×10^5 conidia/mL に調整した分生子懸濁液に 6 個の半分に切断した塊茎 (cv. 男爵薯) の切断面を浸漬し、軽く風乾した。その後切断塊茎をポリ袋に入れ、塊茎が埋まる程度の量の園芸用培土を入れて 25 °C で培養した。培養 8 日後に切断面に菌糸を伴って腐敗した塊茎を「腐敗」と評価し、接種菌株を病原性ありと判断した。対照区では純水を用いて同様に培養した。

系統解析

Potato Sucrose broth 培地で 2 週間室温で培養して得た菌体から FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) を用いて DNA を抽出した。得た DNA 抽出液はミトコンドリア DNA のリボソーム小サブユニット遺伝子領域 (mtSSU) (White et al. 1990) および Translation elongation factor 1- α (TEF) 領域を増幅するプライマー (O'Donnell et al. 1998) を用いた PCR により当該遺伝子の DNA を増幅させた (表 8.1)。増幅産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (マッハライ・ナーゲル) を用いて精製し、北海道システムサイエンス株式会社のキャピラリーシーケンスサービスに外注することで塩基配列を決定した。決定した塩基配列は ClustalW (Thompson et al. 1994) を用いてアライメントした。近縁種のシーケンスデータは GenBank, または NARO Genebank からダウンロードした。系統樹は MEGA7 (Kumar et al. 2016) を用いて Kimura-2 パラメーター法 (Kimura 1980) による近隣結合法で作成した。配列のギャップ部分は解析から除いた。

表 8.1 使用したプライマー

ID	配列	引用文献
EF-1	5'-ATGGGTAAGGA (A/G)GACAAGAC-3'	O'Donnell et al. 1998
EF-2	5'-GGA (G/A)GTACCAGT (G/C)ATCATGTT-3'	O'Donnell et al. 1998
MS1	5'-CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG-3'	White et al. 1990
MS2	5'-GCGGATTATCGAATTAAATAAC-3'	White et al. 1990

形態の観察

病原性試験において病原性があると判断された菌株を PDA (Difco)培地上で暗所, 25 °C で培養し, 菌そうの性状を観察した. 生育至適温度を調べるため, PDB 培地 (Difco)に 1.5 %濃度で寒天を加えた培地に含菌ディスクを置床し, 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C 暗所で 4 日間培養した. 培養後は菌そう半径を 4 か所測り, 平均値を求めた. 胞子等の構造物の観察には SNA 培地 (Nirenberg and O'Donnell 1998)を用い, こちらも暗所, 25 °C で培養した. 大型分生子・小型分生子の観察には BLB ライトを照射し, 形成された同一構造の胞子 1 つにつき 50 個の大きさを計測した.

病原微生物の土壌菌密度測定

2016 年に長崎県内各地 (雲仙市 2 圃場, 諫早市 1 圃場, 南島原市 3 圃場), 北海道 (札幌市 1 圃場: 北海道大学圃場)のジャガイモ栽培圃場表土をサンプリングした. うち雲仙 1 圃場は過去に発病を確認した圃場である. そのほかの圃場は発病の有無に関するデータはない.

サンプリングした土壌は土壌希釈平板法で土壌中の *Fusarium* 属菌の密度を算出した. 段階希釈した土壌懸濁液 100 μ L を駒田培地 (Komada 1975)にそれぞれ塗布 (n=5)し, 室温で 5 日間培養した. 生育した菌そうのうち目視で *Fusarium* 属菌様の菌そうの個数を数え, 5 枚のシャーレを平均して *Fusarium* 属菌の土壌菌密度を算出した. さらに, 駒田培地に生育した全ての *Fusarium* 属菌様コロニーを塊茎スライス (cv. 男爵薯)に置床し, 7 日間室温で培養後, 腐敗の有無によって病原性を判定することで土壌中の病原性 *Fusarium* 属菌密度も算出した.

8.4 結果

菌の分離と病原性の確認

5つの腐敗塊茎から18菌株の *Fusarium* 属菌が分離され、塊茎スライスを用いた簡易的な病原性チェックにより15菌株の病原性が認められた。分離された *Fusarium* 属菌のうち、病原性があり培養性状・分離源品種が代表的な5菌株 (F1501, F1503, F1510, F1516, F1514) を選抜して切断塊茎を用いた病原性試験・形態観察・系統解析に用いた (表 8.2)。切断塊茎を用いた病原性試験において、供試5菌株は腐敗塊茎から同様の菌が再分離され、コッホの原則を満たした。接種塊茎の腐敗部は、旺盛な菌糸の生育・軟化腐敗ならびに腐敗部に空隙を認め、空隙内部には菌糸を伴うものもあった。腐敗部は F1514 のみ黒褐色に変色した。その他の菌株では変色は認められなかった。選定した5菌株: F1501, F1503, F1510, F1516, F1514 は農研機構遺伝資源ジーンバンクにそれぞれ MAFF246882–246886 として菌株を寄託した。

系統解析

TEF, mtSSU の塩基配列を結合し解析したところ、F1501 は *F. commune*, F1503, F1510, F1516 は *F. oxysporum*, F1514 は *F. acuminatum* と同一クレードに属した (図 8.2)。F.1514 は、TEF のみで系統解析した結果は TEF・mtSSU を結合した解析結果と概ね一致したが、mtSSU のデータのみでは全ての分枝で10%未満の低いブートストラップ値を示した。これは mtSSU が *F. acuminatum* が含まれる *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tritinctum* 種複合体に対する系統解析に不適である (Harrow et al. 2010) ためであると考えられる。その他の菌株については TEF, mtSSU それぞれのデータのみで描いた系統関係と変わらない結果となった。決定した塩基配列は DDBJ/EMBL/Genbank に Accession numbers LC469781–LC469790 として登録した (表 8.2)。

表 8.2 分離菌株の形態

菌株	F1501	F1503	F1510	F1516	F1514
種名	<i>F. commune</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. acuminatum</i>
MAFF 番号	246882	246883	246884	246885	246886
宿主品種	さんじゅう丸	西海 40 号	さんじゅう丸	アイユタカ	ながざき黄金
分離年	2015	2015	2015	2015	2015
サンプリング場所	長崎県	長崎県	長崎県	長崎県	長崎県
気中菌糸	フェルト状 白色	フェルト状 白色	フェルト状 白色	フェルト状 白色	フェルト状 紫色～褐色
着色	なし	なし	なし	なし	なし
厚膜胞子 (μm)	単生・2 連 5.5–13.5 (9.9) ^a	単生・2 連 5.9–12.5 (8.9) ^a	単生・2 連 6.3–13.5 (9.7) ^a	単生・2 連 6.3–11.3 (9.0) ^a	単生・2 連・鎖状 4.4–9.5 (7.4) ^a
大分生子 (3 隔壁) (μm)	25.9–52.8 × 2.7–5.5 (36.1 × 4.0) ^a	23.5–56.9 × 2.6–6.4 (35.6 × 4.6) ^a	25.4–47.4 × 3.2–6.1 (38.0 × 4.6) ^a	26.1–48.3 × 3.4–6.5 (39.8 × 4.7) ^a	34.1–50.7 × 2.7–5.8 (42.2 × 4.1) ^a
大分生子 (4 隔壁) (μm)	37.6–58.4 × 2.8–6.0 (44.9 × 4.1) ^a	no data (no data) ^a	38.3–56.5 × 3.4–5.9 (46.6 × 4.8) ^a	39.8–57.5 × 3.1–6.8 (48.4 × 4.6) ^a	39.8–52.9 × 3.1–5.8 (46.7 × 4.4) ^a

表 8.2 (続き)分離菌株の形態

小分生子	8.1-17.1×2.7-4.4	6.0-12.6 × 2.3-5.4	6.7-13.8 × 2.1-5.6	6.4-15.7 × 2.1-5.3	8.5-17.2 × 1.9-4.7	
(0 隔壁) (μm)	(11.0 × 3.6) ^a	(9.4 × 3.9) ^a	(9.7 × 3.7) ^a	(10.1 × 3.7) ^a	(13.0 × 3.3) ^a	
小分生子	10.9-20.9 × 3.0-6.1	10.4-18.9 × 3.4-6.3	10.2-20.0 × 2.8-6.1	11.0-24.7 × 0.9-6.2	14.8-25.4 × 2.7-5.8	
(1 隔壁) (μm)	(16.3 × 4.4) ^a	(14.3 × 4.6) ^a	(13.9 × 4.1) ^a	(14.8 × 4.0) ^a	(19.4 × 3.9) ^a	
アクセッション	TEF	LC469781	LC469782	LC469783	LC469784	LC469785
番号	mtSSU	LC469786	LC469787	LC469788	LC469789	LC469790

^a 計測した分生子 50 個の平均値

表 8.3 先行研究における各菌株の形態

種名	<i>F. commune</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. acuminatum</i>
気中菌糸	felt-like white to orange white	felt-like whitish, purple	felt-like whitish, pink, pale ochraceous, carmine
厚膜胞子	singly or in pair 8-12	single, in pair 7-11	single, in pair 8-15
大分生子 (3 隔壁) (μm)	32-50 × 3.8-4.2 ^a	18-54 × 2.7-6.0	16-51 × 2.5-4.8
大分生子 (4 隔壁) (μm)	no data	25-56 × 2.7-6.0	27-62 × 3.0-5.5 ^b
小分生子 (0 隔壁) (μm)	4.0-8.0×2.0-4.0	4-13 × 2.0-3.5	4-17 × 2.0-5.0
小分生子 (1 隔壁) (μm)	no data	8-24 × 2.2-4.6	11-22 × 2.0-4.2
引用文献	Skovgaard et al. 2003	Gerlach and Nirenberg 1982	Gerlach and Nirenberg 1982

^a ズラックライト照射下での結果

^b 5 隔壁の大型分生子を含む

形態の観察

F1514 とそれ以外の菌株で大型分生子, 菌そうの性状が大きく異なった. F1514 は他の菌株と比較して菌糸伸長がやや緩慢であり, 特徴的な carmine 色の着色が認められた. それ以外の菌株は, 菌糸伸長は非常に速く, 着色は無色～紫色であった. 光学顕微鏡による観察では, 全ての菌株で小分生子は 0 または 1 隔壁, 形態は oval または reniform であり, 分生子柄から擬頭状に分生子が着生した. F1514 では主に大型分生子が観察され, equilaterally curved, slender で, elongated apical cell ならびに distinctly pedicellate basal cell が認められた. 隔壁数も 4, 5 壁のものが多かった. 一方, それ以外の菌株は小分生子も多く観察され, 大分生子は鎌形, moderately curved, であり隔壁数も 3 がもっとも多く 4 までが主であり, 5 以上は稀であった. 全ての菌株で有性世代は観察されなかった (表 8.2, 図 8.3). 形態観察データを先行研究と比較すると, F1514 は *F. acuminatum*, それ以外は *F. oxysporum* と概ね一致した (Gerlach and Nirenberg 1982). 系統解析で *F. commune* と同一クレードに入った F1501 菌株は *F. commune* の特徴 (Skovgaard et al. 2003) と概ね一致した (表 8.3). また, 全ての菌株で生育至適温度は 25–30 °C であり, 4 °C では生育しなかった (図 8.4).

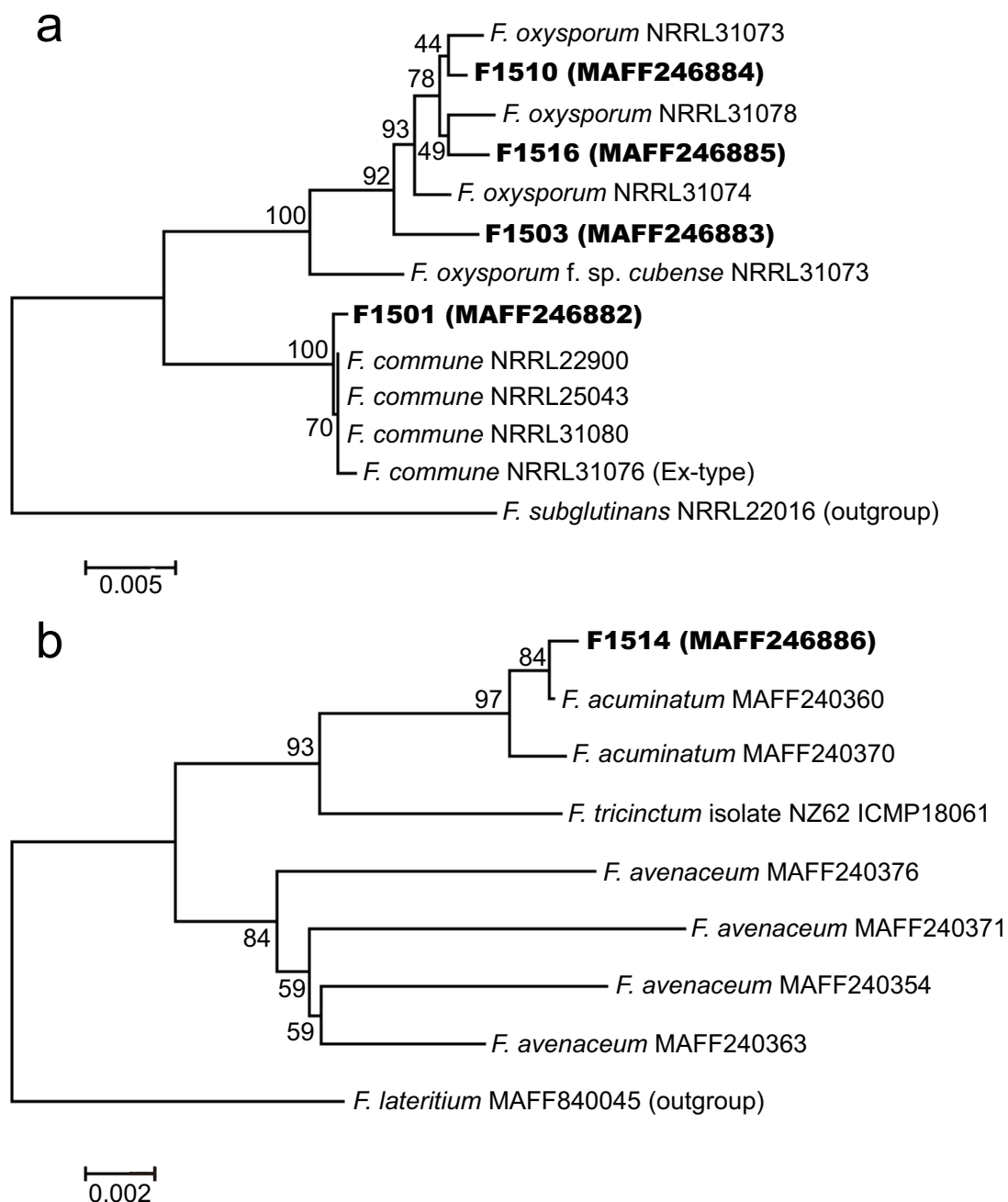


図 8.2 決定した Translation elongation factor 1- α 領域, mitochondrial small subunit ribosomal DNA 塩基配列に基づく近隣結合法による系統樹. 分枝部の数値はブートストラップ値の百分率 (1000 反復). a F1501, F1503, F1510, F1516 および *Fusarium oxysporum* 種複合体の一部 b F1514 および *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* 種複合体の一部. バーはサイトあたりの塩基置換数.

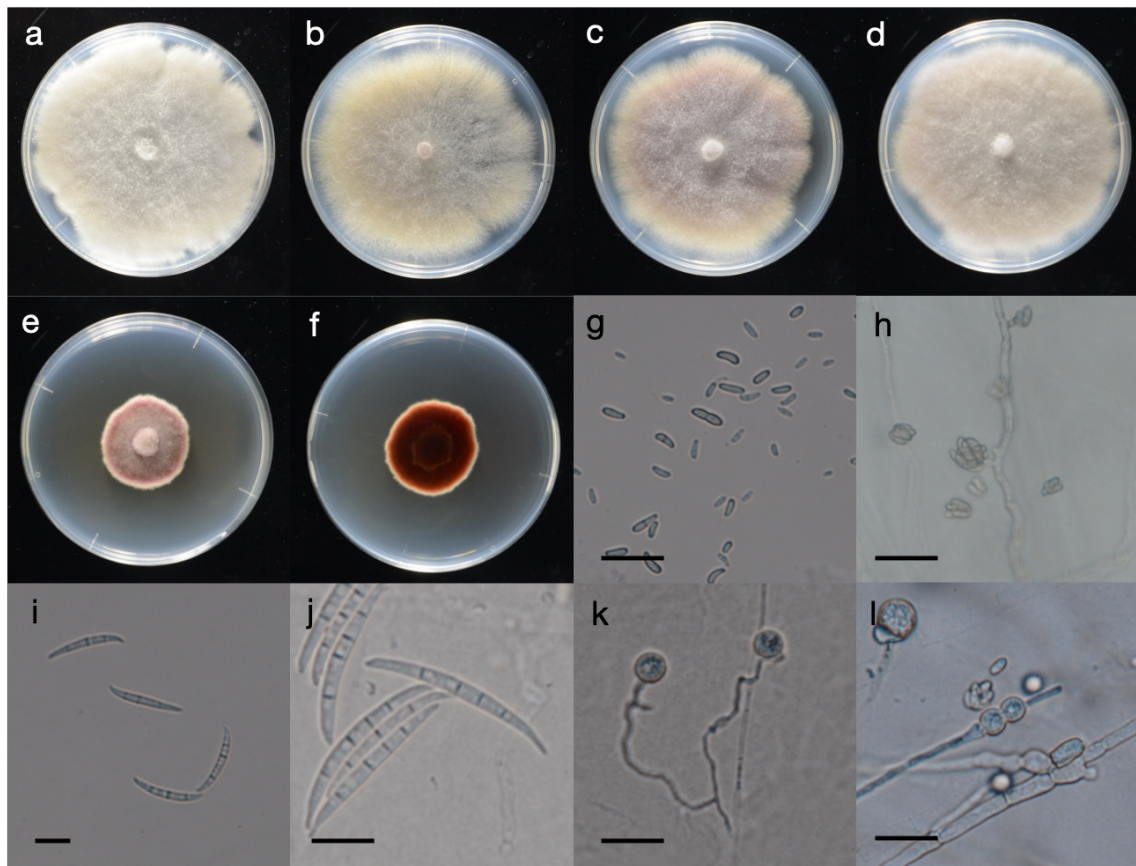


図 8.3 分離菌株の形態. バーは全て 20 μm . a–f Potato Dextrose Agar 培地で 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗所 2 週間培養した際の菌そうの性状. a–d はそれぞれ F1501 (*Fusarium commune*), F1503, F1510, F1516 (*F. oxysporum*) の菌そう表面. e, f はそれぞれ F1514 (*F. acuminatum*) の菌そう表面・裏面. g obal または reniform な F1503 (*F. oxysporum*) 小分生子. h 短いモノフィアライドの分生子柄から擬頭状に着生した F1516 (*F. oxysporum*) の小型分生子. i–j 大型分生子の形態. それぞれ F1501 (*F. commune*), F1514 (*F. acuminatum*). k–l 表面が平滑な厚膜胞子. k–l はそれぞれ F1501 (*F. commune*) の単生の厚膜胞子, F1510 (*F. oxysporum*) の 2 連に着生した厚膜胞子.

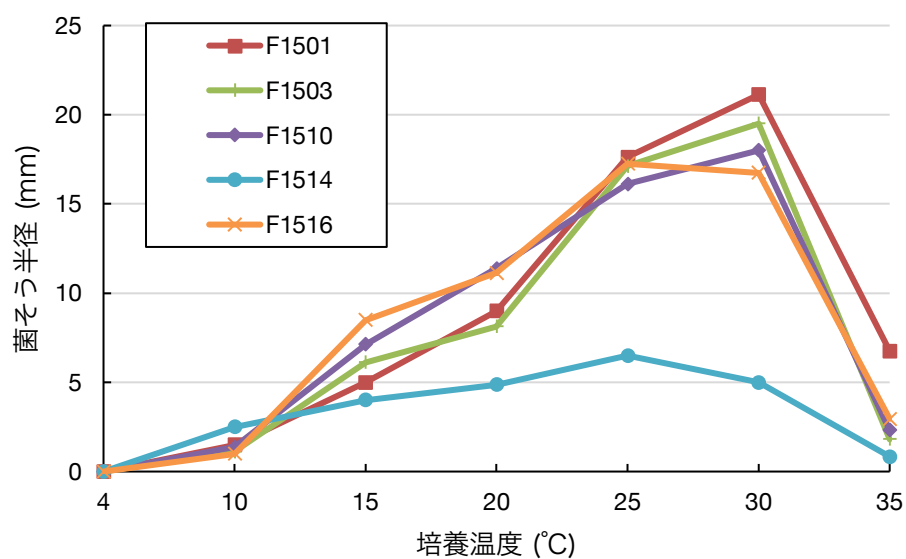


図 8.4 Potato dextrose broth (Difco)に 1.5 %寒天を加えた平板培地で 25 °C，暗所で 4 日間培養した際の菌そう半径

表 8.4 土壌中の *Fusarium* 属菌密度およびその病原性

圃場	土壌中の <i>Fusarium</i> 属菌密度 (CFU/g dry soil) ^a		供試コロニー数 病原性/合計
	合計	病原性	
雲仙 1 ^b	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^4$	$(4.2 \pm 1.2) \times 10^3$	20/61
雲仙 2	$(5.1 \pm 0.9) \times 10^4$	$(6.7 \pm 0.4) \times 10^3$	3/23
諫早	$(5.6 \pm 1.3) \times 10^5$	$(6.2 \pm 0.4) \times 10^4$	3/27
南島原 1	$(5.7 \pm 1.0) \times 10^5$	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^4$	1/27
南島原 2	$(6.1 \pm 0.7) \times 10^4$	$(1.0 \pm 0) \times 10^4$	5/29
南島原 3	$(4.2 \pm 0.8) \times 10^4$	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^3$	1/20
札幌	$(6.0 \pm 1.2) \times 10^4$	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^3$	1/29

a 計測した分生子 50 個の平均値

b 自然発病圃場

病原微生物の土壌菌密度測定

病原性・非病原性を含めた *Fusarium* 属菌全体の土壌菌密度は 10^4 – 10^5 CFU/g dry soil であった. 1 土壌区あたり合計 20–61 個のコロニーが生育した. それらコロニーすべての病原性を塊茎スライスで確認したところ, 病原性 *Fusarium* 属菌は 10^3 – 10^4 CFU/g dry soil 存在していた. 発病が確認された圃場では全 *Fusarium* 属菌のうち約 33 %は病原性, その他圃場でも圃場ごとのばらつきはあるものの約 3–21 %は病原性であった (表 8.4).

8.5 考察

試験結果から, 分離された *Fusarium* 属菌は秋作ジャガイモ腐敗の病原菌であったことが明らかになり, 病徴から長崎県に発生した欠株症状は *Fusarium* 属菌による乾腐病であったことがわかった. 長崎県をはじめ日本ではこれまでに *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. solani* f. sp. *eumartii*, *F. solani* f. sp. *radicicola*, *F. caeruleum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. ventricosum*, *F. sambucinum* による乾腐病は報告があるが (児玉 2004), *F. acuminatum* は本邦初報告であり, *F. commune* はジャガイモ乾腐病菌として世界で初報告である. これまでに *F. commune* は森林苗畑においてベイマツをはじめとして針葉樹の根腐れ・立枯れ (Stewart et al. 2006; Kim et al. 2012), ダイズに立枯・種子の腐敗・根腐れ (Ellis et al. 2013), トマトの根部ならびに冠部の腐敗 (Hamini-Kadar et al. 2010)といった症状の報告があるが, ジャガイモでの報告はこれまでにない. 新報告の菌種の由来であるが, 腐敗塊茎を採取した圃場は海外から種いも, 土壌を移入したことがないこと, *F. commune* は *F. oxysporum* から系統的差異から分けられた比較的新しい種であり, *F. acuminatum* はすでに日本国内で報告がある *F. avenaceum* と近縁な種であること, を考えると, これら初報告の菌は以前から長崎県に土着していたものを本研究で発見したと考えるのが妥当である.

また, Lombard ら (2019)は *F. oxysporum* 種複合体を再分類し, 種名の変更を提案している. この研究は分化型に代表される *F. oxysporum* 種複合体の複雑な分類体系を進化系統学的に整理したものである. Lombard らの分類体系に則り本研究で *F. oxysporum* と同定された F1503, F1510, F1516 を TEF 配列をもとに同様の方法で分類すると, F1503, F1516 はそれぞれ *F. nirenbergiae*, *F. cugenangense* と同一クレードに入った. 一方, F1510 は論文中の *Fusarium* sp.を含む複数種が含まれたクレードに分類された (データ未発表). Lombard が提案

した種名のいずれに分類されるかを確定させるためには TEF 以外の DNA 配列を解析する必要があるであろう。 *F. oxysporum* 種複合体のみならず *Fusarium* 属菌の分類体系は非常に複雑であり、分子生物学的な研究が盛んになった現代の状況を鑑みると、今後もさらなる混乱が予想される。また、今なお *Fusarium* 属菌では分化型の分類基準は使用され続けている。したがって、本論文では Lombard の分類は採用せず、従来の分類に従って分類したい。

土壌定量の結果より、本病原菌は長崎県内の圃場および北海道に普遍的に存在する可能性がある。しかし、本試験による *Fusarium* 属菌の生育至適温度は 25–30 °C であることから、地温がそれほど高くない北海道、暖地の春作では欠株被害は今後も限定的であると予想される。長崎県においては秋作の植え付け時に地温が 26–30 °C 前後であり (片山・木村 1986)、*Fusarium* 属菌の至適温度になる。このことからこれが秋作での欠株被害を助長しているものと考えられる。被害低減のために、クロルピクリン剤による土壌燻蒸等により菌密度を下げるのが主因を断つ解決方法であり効果があると考えられるが、効果の程度を検討する必要がある。種いも切断面の乾燥スピードや塊茎の乾腐病抵抗性の検討が今後の日本九州地方に代表される暖地での新品種育種には必要である。本試験で欠株が報告された圃場では全 *Fusarium* 属菌中の病原性 *Fusarium* 属菌の占める割合が 20 %前後とやや大きい、という興味深い傾向が見られたが、結論づけるためには発病圃場の土壌サンプルを増やす必要がある。

以上から、本症状を *Fusarium* 属菌によるジャガイモ乾腐病と診断し、*F. acuminatum* を本邦初、*F. commune* を世界初として乾腐病菌に病原追加することを提案する。

第9章 総合考察

9.1 塊茎腐敗の発生生態とその防除

研究史で述べたように、ジャガイモ塊茎腐敗は栽培中・収穫時および収穫後の取り扱いによって起こると複数の先行研究が報告している。本研究では貯蔵庫内での大規模な塊茎腐敗の発生生態をテーマとして研究を行い、収穫時に汚染土壌と塊茎が接触することが貯蔵腐敗の大きな要因であることを実証した。しかし、栽培中に感染した塊茎が貯蔵庫内で腐敗を引き起こす可能性も充分に残っており、どちらか一方のみが貯蔵腐敗に関与する訳ではない。栽培中に地上部の疫病の発生を抑えることが収穫時の土壌疫病菌密度を減少させることにつながる。したがって、疫病の防除は栽培中から収穫まで絶え間無く行われるべきである。

疫病菌の地上部での消長は目視で観察できるために非常に観察されやすいが、土壌中の疫病菌の発生生態は調査の難しさによって報告事例が多くなかった。これまでも複数の先行研究が土壌中の疫病菌や塊茎腐敗に関して研究をおこなったが、本研究で疫病菌密度の評価技術が開発されたことからさらなる研究の発展が期待される。

9.2 土壌菌密度定量法の今後の応用

本研究で、リアルタイム PCR により疫病菌の土壌菌密度・感染ポテンシャルが間接的に定量できるようになった。これまでも土壌菌密度を土壌から定量した例は数多くあるが、いずれもバイオアッセイでの試験であったため再現性や技術的な難度が問題であった。本方法は分子生物学の知識がある研究者であれば利用可能であるため、疫病・ジャガイモの知識の有無に関係なく多くの研究者が土壌菌密度を定量できるようになる。これにより、将来的には本方法を商業的に応用できる可能性がある。例えば、十勝農業協同組合連合会では、土壌診断事業をすでに行っており、畑作病害では *Verticillium* 属菌による病害・ジャガイモそうか病の土壌診断が可能である (十勝農業協同組合連合会 online)。疫病菌も耐久体として卵胞子を形成するため、土壌診断の潜在的なニーズはあると考える。しかし、現在の日本では A1 交配型が優占しているため畑作土壌中に疫病菌卵胞子はほぼ含まれないと予想される。世界的に疫病菌卵胞子は次の作付け時の一次伝染源として重要視されており、日本でも A2 交配型が海外から

移入してくる可能性はある。もし日本においても A2 交配型が定着し、有性生殖が活発に行われる状況になった際は本法を用いて土壌診断が可能であると考えられる。

また、本技術は貯蔵庫内における塊茎腐敗発生の有無・程度を予測する意思決定支援システム (Decision Support System, 以下 DSS) の根幹技術として用いることができる可能性がある。ジャガイモ塊茎腐敗は様々な要因が複雑に関与しあって大発生を招くと考えられる。疫病菌を塊茎表面に接種したとしても表皮に傷がなければ腐敗塊茎は少ないという報告があるように (大澤ら, 2016b), 塊茎腐敗に対する DSS を構築する際には疫病菌の生態だけではなく素因・誘因など多角的な視点で塊茎腐敗にどの要因がどの程度関与しているのかを調べる必要がある。その際に必要となるものが大量のデータである。疫病菌の菌密度データをはじめとして、作付け品種・土壌水分量・塊茎受傷程度・微生物相・前作といった情報に加えて気象データなどジャガイモ栽培環境を総合的に観察しデータを収集しておき、適切な方法でデータ解析することで最適なシステムが構築されることが考えられる。近年、人工知能の研究・技術革新が話題となっているが、研究者の想像を超える塊茎腐敗の発生要因を人工知能が見出す可能性もあり、適切なデータ収集ののちにこれらの技術を用いて DSS に対する最適モデルを構築・検証する必要がある。

また、DSS によって塊茎腐敗の発生が予見される収穫塊茎に対する対応策も同時に考えていく必要がある。現状では収穫後に殺菌剤を使用することは認められていないため、塊茎腐敗が起る可能性がある塊茎は腐敗前に出荷・加工してしまうことが最も簡単かつ合理的であろう。しかし、出荷量の上限を超える量の塊茎腐敗が予想された時のため、可能な範囲でのポストハーベスト処理を検討していく必要がある。また、腐敗を防ぎつつ品質も保たれるような最適な保存条件も研究すべきである。

本技術を用いて土壌疫病菌密度を定量し、結果を DSS に利用する際に最も問題となる事柄は試料サンプリング法の検討である。基本的に疫病は圃場で発生させないように予防的に防除している。万が一疫病が発生してしまったとしても生産者は殺菌剤の緊急散布や抜き取りといった方法で疫病の蔓延を防ぐ。したがって、一般圃場で圃場全面の疫病発生は稀であり、発生したとしても圃場の一部にスポット状に発生する (図 9.1)。一般に土壌診断等で用いられる土壌サンプリング法は 9 点法・8 歩法など様々であり、規定された方法はないものの圃

場を代表するような採取法でなければならない (田辺・鈴木 1966). これらのサンプリング法は圃場全体を均一にサンプリングする方法であるため、疫病が発生していない箇所の健全土壌を多く含むことで実際の発病リスクを低く見積もってしまう可能性がある. 厳しい基準での発病リスク判断が必要であることから、塊茎腐敗 DSS に特化したサンプリング法の考案と検討が必要である. また、圃場で土壌をサンプリングする場合にそのサンプリング土壌は畝間の土壌がその菌密度の高さから適当であろうと考えられる.

塊茎腐敗 DSS の開発に向け、様々な困難と課題が予想される. 本論文は土壌菌密度定量技術開発ならびに殺菌剤を用いた塊茎腐敗防除法の提案として塊茎腐敗 DSS の基礎技術として貢献できたと考えられる. 塊茎腐敗被害軽減に向け、今後も絶え間ない研究が不可欠である.



図 9.1 一般圃場で発生したジャガイモ疫病.

写真下部に褐変した罹病葉 (矢印部) を含む植物体が確認されるものの、多くの植物体は健全である.

摘要

1. ジャガイモ疫病菌 (以下 疫病菌)の簡便なサンプリング法を開発するため、遊走子のう直接採取法 (以下 直接法) を考案し、直接法の分離成功数を確認する試験を行った。直接法とは、*Phytophthora infestans* 選択培地 (Rye-B 寒天培地にアンピシリンナトリウム 100 ppm, ナイスタチン 50 ppm, リファンピシン 25 ppm) を分注したシャーレを圃場に持ち込み、葉裏面の遊走子のうを直接培地に付けることにより疫病菌を採取し、保冷して輸送した後に適切な温度で培養する方法である。直接法と従来法の分離成功率を比較した結果、従来法の分離成功数は 100 例中 68-81 例であった一方、直接法は 78 例であった。以上より、直接法は従来法と同等の分離成功率であり有用なサンプリング法であるとわかった。
2. 収穫時の塊茎受傷と塊茎腐敗の関係を調べるため、収穫時の塊茎受傷を人工的に再現し、汚染土壌と混和・培養する試験を行った。塊茎腐敗率は表面に傷がありかつ接種を行なった試験区・付傷がありかつ疫病激発圃場土を混和した区で大きかった。一方で、塊茎表面に傷がなければ高密度に疫病菌が存在しても腐敗率は小さかった。以上から、貯蔵塊茎腐敗の大きな要因は収穫時に塊茎表面に付いた傷と汚染土壌が接触することで起こると考えられた。
3. 土壌中の疫病菌密度を正確かつ迅速に定量するため、リアルタイム PCR による定量法を開発した。改変 CTAB-Bead-beating 法で 11 種類の人工接種土壌中の DNA を抽出し、既報の種特異的プライマー・TaqMan プローブで絶対定量した。畑作土壌であれば接種菌密度に応じた安定した定量結果を得ることができたことから、本方法で日本の畑作土壌中の疫病菌密度を正確・迅速・簡便に定量することができる。
4. 圃場における疫病菌の生態解明のため、3.で開発されたリアルタイム PCR を利用して疫病菌の土壌菌密度推移をモニタリングした。無防除圃場では畝表面土壌の方が塊茎周辺土壌よりも高い菌密度であることが多く、土壌疫病菌密度の推移は地上部の疫病消長と一致した。また、一般圃場で行なった試験では畝間の土壌で特に高い定量値を得た。したがって、圃場において疫病

菌は畝間または畝表面に多く存在していることがわかった。また、リアルタイム PCR で定量した土壌中の DNA 量と感染ポテンシャルに関係性が認められたことから、土壌中の疫病菌 DNA を定量することで間接的に感染ポテンシャルを定量することができる。

5. 貯蔵庫内での塊茎腐敗被害軽減のため、収穫直前に圃場に残存する罹病茎葉残渣に殺菌剤を散布する新規防除法（表土殺菌剤処理法）を考案し、効果を確認する試験を行った。室内試験・圃場試験ともに殺菌剤の処理により感染ポテンシャル・疫病菌 DNA 量がともに減少した試験事例が多かった。圃場での感染ポテンシャルをメタ解析したところ、殺菌剤処理によって塊茎腐敗発生数は殺菌剤無処理の約 10 %に抑えることができる可能性があることがわかった。したがって、圃場において残渣に殺菌剤を処理する新規防除法は貯蔵塊茎腐敗被害軽減に有効であることが示された。
6. 品種「さんじゅう丸」による秋作ジャガイモの種いも腐敗による欠株症状が長崎県で問題になっている。2015 年に採取された腐敗種いもから高率で *Fusarium* 属菌が分離され、培養性状・分生子等の構造物の形態・Translation elongation factor 1- α , mitochondrial small subunit ribosomal DNA 塩基配列から、病原性のあった代表 5 菌株を *Fusarium commune*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* と同定した。また、長崎県・北海道のジャガイモ圃場土からは病原性 *Fusarium* 属菌が 10^3 – 10^4 CFU/g dry soil の菌密度で定量されたため、本症状を引き起こす *Fusarium* 属菌は長崎県内の圃場に広く存在する可能性がある。これらの結果から、本症状を *Fusarium* 属菌によるジャガイモ乾腐病によるものと診断し、*F. commune* を世界初報告、*F. acuminatum* を本邦初報告として乾腐病菌に病原追加することを提案する。

Summary

1. To collect *Phytophthora infestans* isolates with ease, a novel sampling method (direct zoosporangia sampling (DZS)) was developed, and its availability was tested. In this method, a selective medium (rye B agar with ampicillin sodium (100 ppm), nystatin (50 ppm), and rifampicin (25 ppm)) was directly touched to the zoosporangia of a lesion on the lower side of leaves in the field. After zoosporangia sampling, the selective medium was transported at 4 °C to a laboratory and incubated at the appropriate temperature. According to the comparison data between the number of successes using the DZS method and the previous method, the number of successes using the previous method was 68-81 out of 100 cases; in contrast, that using the DZS method was 78. These results imply that the DZS method is available to collect *P. infestans* isolates.
2. The effects of surface injury during harvesting on potato storage rot with *P. infestans* were investigated to confirm the ecology of potato tuber rot in storage facilities. Injured tubers were mixed with blighted soil from a noncontrolled field and incubated for 4 weeks. The percentages of rotten tubers were high in the injured/inoculated and injured/blighted soil groups. On the other hand, the percentages of rotten tubers in the uninjured groups were low even though the tubers were inoculated or mixed with blighted soil. These results suggest that the existence of surface injury during harvesting and blighted soil promote potato tuber rot in storage facilities.
3. I developed a real-time PCR assay to estimate the *P. infestans* population densities in soil rapidly and accurately. DNA templates were extracted from 11 types of artificially inoculated soil with a modified CTAB bead-beating method and quantified using reported species-specific primers and TaqMan probes. Nine types of upland soils were well quantified, and the DNA quantities reflected the population densities. From these results, this assay is available to rapidly, accurately and easily estimate *P. infestans* population densities in upland soils in Japan.

4. I investigated the changes in *P. infestans* population densities in noncontrolled field soils using the proposed real-time PCR assay. Larger amounts of *P. infestans* DNA were quantified from most soil samples from the top of a ridge than from those around a tuber, and the changes in the amounts of DNA were compatible with symptom development in the noncontrolled field. Moreover, soils from the surface of the bottom of a ridge contained more DNA than did those from any other location in commercial fields. According to these results, soils from the bottom or top of a ridge contain a large amount of *P. infestans* DNA in blighted potato fields. Additionally, the proposed real-time PCR assay is suitable for an indirect estimation of the inoculum potential of *P. infestans* because there is a positive correlation between the quantity of *P. infestans* DNA and the inoculum potential.
5. To prevent potato storage rot, I developed a novel control method (fungicide spraying on foliar residue (FFR)): spraying a fungicide on foliar residue in blighted potato fields. Most experiments *in vitro* and on-farm showed that both the inoculum potentials and quantities of *P. infestans* DNA were decreased by fungicide application. The inoculum potentials obtained from on-farm studies were meta-analyzed; thus, the number of blighted tubers may decrease to approximately 10 % of the number on noncontrolled plots using the FFR method. These results imply that the proposed FFR method might be useful to prevent potato storage rot.
6. Missing plants on autumn seedlings of potato with seed tuber rot have been serious problems in Nagasaki prefecture, Japan. I tried to identify the pathogens of seed tuber rot in Nagasaki and to quantify the propagules of pathogens in soil. Pathogenic *Fusarium* spp. were isolated from rotten seed tubers sampled in 2015, and I identified 5 typical strains, such as *Fusarium acuminatum*, *F. commune* and *F. oxysporum*, as causal agents of potato dry rot based on their morphological characteristics and their DNA sequences of the translation elongation factor 1- α gene and mitochondrial small subunit ribosomal DNA. These pathogenic *Fusarium* spp. have already widely spread, at least in Nagasaki and Hokkaido, because 10^3 - 10^4 cfu/g dry soil of pathogenic *Fusarium* spp. were quantified from some field soils. From these results, the symptom was potato dry rot and was caused by *Fusarium* spp. I propose that *F. commune* and *F. acuminatum* should be added as

causal agents of potato dry rot globally and in Japan, respectively.

参考文献

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF (2005) The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J Eukaryot Microbiol* 52:399–451
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The Revised Classification of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59:429–514
- Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, Agatha S, Berney C, Brown MW, Burki F, Cárdenas P, Čepička I, Chistyakova L, Campo J, Dunthorn M, Edvardsen B, Eglit Y, Guillou L, Hampl V, Heiss AA, Hoppenrath M, James TY, Karnkowska A, Karpov S, Kim E, Kolisko M, Kudryavtsev A, Lahr DJ, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, Mann DG, Massana R, Mitchell EA, Morrow C, Park JS, Pawlowski JW, Powell MJ, Richter DJ, Rueckert S, Shadwick L, Shimano S, Spiegel FW, Torruella G, Youssef N, Zlatogursky V, Zhang Q (2019) Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 66:4–119
- 秋野聖之 (2013) 日本におけるジャガイモ疫病菌の系統の変化 (特集 疫病). *植物防疫* 67:553–557
- Akino S, Takemoto D, Hosaka K (2014) *Phytophthora infestans*: A review of past and current studies on potato late blight. *J Gen Plant Pathol* 80:24–37

秋野聖之, 鈴木宣之, 大澤央, 荒木宏通, 近藤則夫 (2018) ジャガイモ疫病菌感染塊茎の細菌性腐敗に関与する *Bacillus* 属細菌. 日植病報 84:255 (講要)

Andrivon D, Béasse C, Laurent C (1994) Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* collected in north-western France from 1988 to 1992. Plant Pathol 43:471–478

Bourke PMA (1964) Emergence of Potato Blight, 1843-46. Nature 201:805–203.

Brierley JL, Stewart JA, Lees AK (2009) Quantifying potato pathogen DNA in soil. Appl Soil Ecol 41:234–238

Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, Zeyer J (2001) A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. J Microbiol Methods 45:7–20

Caten CE, Jinks JL (1968) Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. Can J Bot 46:329–348

CodexAlimentarius (2019) Pesticide Database

http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/commodities-detail/en/?lang=en&c_id=347

2019 年 10 月 30 日閲覧

Cooke D, Lees A, Chapman A, Cooke L, Bain R (2014) Final Report GB Late Blight Populations: Monitoring and Implications of Population Changes. Reporting Period 2009-2012. Ref: R423. The Potato Council is a division of the Agriculture and Horticulture Development Board.

<https://potatoes.ahdb.org.uk/publications/r423-blight-population-changes>

2019 年 11 月 11 日閲覧

de Bary A (1876) Researches into the nature of the potato fungus—*Phytophthora infestans*. J R Agr Soc 2:239–269

- Darsow U (2004) Sites of entry of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary into potato tubers in assessment of tuber blight resistance. *Potato Res* 47:175–186
- Dick (2001) The Peronosporomycetes. In: *The Mycota, Vol. 7A, Systematics and Evolution*, (eds. McLaughlin DJ, McLaughlin E, Lemke P), Springer-Verlag, Berlin, pp.39–72
- Dowley LJ, O’Sullivan E (1991) Sporulation of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary on the surface of diseased potatoes and tuber to tuber spread of infection during handling. *Potato Res* 34:295–296
- Drenth A, Janssen EM, Govers F (1995) Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathol* 44:86–94
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349
- Ellis ML, Arias MD, Jimenez DC, Munkvold GP, Leandro LF (2013) First report of *Fusarium commune* causing damping-off, seed rot, and seedling root rot on soybean (*Glycine max*) in the United States. *Plant Dis* 97:284–284
- Fry W (2008) *Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol* 9:385–402
- 藤根統 (2012) ジャガイモ疫病による塊茎腐敗に対する薬剤の効果試験条件の検討. *北日本病虫研報* 63:37–41
- 福江由佳, 大塚美幸, 秋野聖之, 浅野賢治, 近藤則夫 (2015) ジャガイモ疫病菌の土壌混和接種による塊茎腐敗の発病条件. *日植病報* 81:222 (講要)
- Gerlach W, Nirenberg H (1982) *The Genus Fusarium—a Pictorial Atlas*. Mitt Biol Bundesanst Land-u Forstw, Berlin-Dahlem

- Goodwin SB, Drenth A, Fry WE (1992) Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr Genet* 22:107–115
- Goodwin SB (1997) Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens: The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87:462–473
- Gotoh K, Akino S, Maeda A, Kondo N, Naito S, Kato M, Ogoshi A (2005) Characterization of some Asian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol* 54:733–739
- Grünwald NJ, Flier WG, Sturbaum AK, Garay-Serrano E, van den Bosch TBM, Smart CD, Matuszak JM, Lozoya-Saldaña H, Turkensteen LJ, Fry WE (2001) Population Structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of Central Mexico. *Phytopathology* 91:882–890
- Hamini-Kadar N, Edel-Hermann V, Gautheron N, Steinberg C (2010) First report of *Fusarium commune* and *Fusarium redolens* causing crown and root rot on tomato in Algeria. *New Dis Rep* 22:3
- Harrow SA, Farrokhi-Nejad R, Pitman AR, Scott IA, Bentley A, Hide C, Cromey MG (2010) Characterisation of New Zealand *Fusarium* populations using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems. *Fungal Biology* 114:293–311
- 北海道病害虫防除所 (2019) (7) ばれいしょ. In:平成 31 年度 北海道農作物病害虫・雑草防除ガイド. 北海道, 北海道, pp 106–122
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product By Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276–7280

- Hoshino YT, Matsumoto N (2004) An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes and Environments* 19:13–19
- 星野 (高田) 裕子, 長谷部亮 (2005) 土壌からの DNA 抽出法. *J Environ Biotechnol* 5:43–53.
- Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG (2003) Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327:557–560
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Biotechnol* 11:1026–1030
- Hussain S, Lees AK, Duncan JM, Cooke DEL (2005) Development of a species-specific and sensitive detection assay for *Phytophthora infestans* and its application for monitoring of inoculum in tubers and soil. *Plant Pathol* 54:373–382
- Hussain T, Singh BP, Anwar F (2014) A quantitative Real Time PCR based method for the detection of *Phytophthora infestans* causing Late blight of potato, in infested soil. *Saudi journal of biological sciences* 21:380–386
- 出田新 (1901) 馬鈴薯疫病. In: 実用植物病理学. 裳華房, 東京, pp 58–63
- Jones LR, Lutman BF, Giddings NJ (1912) Investigations of the potato fungus, *Phytophthora infestans* (No. 168). US Government Printing Office.
- Kageyama K, Komatsu T, Suga H (2003) Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *J Gen Plant Pathol* 69:153–160
- Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone marrow transplantation* 48:452–458

Kasajima I, Sasaki K, Tanaka Y, Terakawa T, Ohtsubo N (2013) Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *Sci Hortic* 164:65–72

片山克己, 木村貞夫 (1986) ジャガイモ青枯病の発生生態と防除に関する研究. 長崎総農林試研報告 (農業部門) 14:1–30

加藤雅康, 佐藤章夫, 生越明, 島貫忠幸, 高橋賢司 (1994) 日本におけるジャガイモ疫病菌の交配型, メタラキシル耐性, 病原性の推移. *日植病報* 60:358 (講要)

Kim MS, Stewart JE, Dumroese RK, Klopfenstein NB (2012) Occurrence of the Root Rot Pathogen, *Fusarium commune*, in Forest Nurseries of the Midwestern and Western United States. *J Phytopathol* 160:112–114

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16:111–120

気象庁. 過去の気象データ検索 帯広 2018 年 8 月 (日ごとの値)

https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/daily_s1.php?prec_no=20&block_no=47417&year=2018&month=08&day=&view=p1

2019 年 11 月 5 日閲覧

児玉不二雄 (2004) 北海道病虫害防除提要 (児玉不二雄ら編). pp. 231–248. 北海道植物防疫協会, 札幌

Komada H (1975) Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of plant protection research* 8: 114–124

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874

- Lacey J (1965) The infectivity of soils containing *Phytophthora infestans*. Ann Appl Biol 56:363–380
- Lacey J (1966) The distribution of healthy and blighted tubers in potato ridges. Eur Potato J 9:86–98
- Lacey J (1967a) Susceptibility of potato tubers to infection by *Phytophthora infestans*. Ann Appl Biol 59:257–264
- Lacey J (1967b) The role of water in the spread of *Phytophthora infestans* in the potato crop. Ann Appl Biol 59:245–255
- Lapwood DH (1977) Factors affecting the field infection of potato tubers of different cultivars by blight (*Phytophthora infestans*). Ann Appl Biol 85:23–42
- Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res 21:3761–3766
- Lees AK, Cooke DEL, Stewart JA, Sullivan L, Williams NA, Carnegie SF (2009) *Phytophthora infestans* population changes: implications. PPO Special Report 13:55-60
- Lees AK, Sullivan L, Lynott JS, Cullen DW (2012) Development of a quantitative real-time PCR assay for *Phytophthora infestans* and its applicability to leaf, tuber and soil samples. Plant Pathol 61:867–876
- Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH, Hart MM, Powell JR, Klironomos JN, Pauls KP, Swanton CJ, Trevors JT, Dunfield KE (2007) Cycling of extracellular DNA in the soil environment. Soil Biol Biochem 39:2977–2991

- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *Genome Res* 4:357–362
- Lombard L, Sandoval-Denis M, Lamprecht SC, Crous PW (2019) Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. *Persoonia* 43:1–47
- Loomis WD, Battaile J (1966) Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5:423–438
- Lorenz MG, Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 58:563–602
- Mitani S, Sugimoto K, Hayashi H, Takii Y, Ohshima T, Matsuo N (2003) Effects of cyazofamid against *Plasmodiophora brassicae* Woronin on Chinese cabbage. *Pest Manage Sci* 59:287–293
- 向島信洋, 森一幸, 坂本悠, 田宮誠司, 草原典夫, 石橋祐二, 中尾敬 (2012) バレイショ新品種「さんじゅう丸」. 長崎県農林技術開発センター研究報告 3:27–51
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4326
- 中尾敬, 向島信洋, 森一幸 (2004) バレイショ新品種「アイユタカ」. 長崎県総合農林試験場研究報告 農業部門 30:1–28
- Nærstad R, Le VH, Hermansen A (2010) Reduced fungicide input in late blight control (REDUCE 2007–2011) – Preliminary results from 2007 to 2009. *PPO-Special Report* 14:193–198

Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:434–458

日本植物防疫協会 (2008) 病害虫と雑草による農作物の損失.

http://www.jppa.or.jp/tecinfo/data/sonsitsu_2008.pdf

2019 年 9 月 21 日閲覧

野口善令 (2009) はじめてのメタアナリシス . NPO 法人 健康医療評価研究機構. 東京

農林水産省生産流通消費統計課 (2018) 作物統計調査 作況調査(野菜) 確報 平成 29 年産野菜生産出荷統計.

<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/index.html>

2019 年 9 月 19 日閲覧

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2044–2049

Ogram A, Sayler GS, Barkay T (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7:57–66

大島武, 光明寺輝正, 三谷滋, 松尾憲総, 中島俊雄 (2004) 殺菌剤シアゾフアミドの開発. *日本農薬学会誌* 29:147–152

大塚美幸, 秋野聖之, 小泉恵美子, 小野豪朗, 近藤則夫 (2015) 栽培後期の圃場におけるジャガイモ疫病菌の存在場所. *日植病報* 81:90 (講要)

大澤央, 福江由佳, 鈴木宣之, 浅野賢治, 平田明靖, 秋野聖之, 近藤則夫 (2016a) 2012–2014 年の北海道で発生したジャガイモ疫病菌の遺伝子型構成. *日植病報* 82:70 (講要)

大澤央, 福江由佳, 鈴木宣之, 荒木宏通, 浅野賢治, 秋野聖之, 近藤則夫 (2016b) ジャガイモ塊茎表面の傷が疫病菌による塊茎の感染に与える影響. 日植病報 82:194–195 (講要)

Osawa H, Akino S, Araki H, Asano K, Kondo N (2018) Effects of harvest injuries on storage rot of potato tubers infected with *Phytophthora infestans*. European Journal of Plant Pathology 152:561–565

大澤央 (2018) ジャガイモ疫病菌による塊茎腐敗発生と土壌中の疫病菌密度との関係. 土壌伝染病談話会レポート 29: 21–30

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

<https://www.R-project.org/>.

2019 年 11 月 6 日閲覧

Ristaino JB, Saville A, Paul R, Cooper D, Wei Q (2019) Detection of *Phytophthora infestans* by LAMP, real-time LAMP and droplet digital PCR. Plant Dis doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1186-RE>

坂本悠, 森一幸, 渡邊亘, 松尾祐輝, 尾崎哲郎, 中尾敬 (2016a) バレイショ「さんじゅう丸」の秋作普通栽培における出芽安定技術 (第 1 報: 種いも貯蔵条件による休眠明け促進対策) . 日作九支報 82:19–22

坂本悠, 森一幸, 渡邊亘, 松尾祐輝, 尾崎哲郎, 中尾敬 (2016b) バレイショ「さんじゅう丸」の秋作普通栽培における出芽安定技術 (第 2 報: 種いもの切断面の乾燥処理による腐敗軽減対策) . 日作九支報 82:23–26

坂本悠, 森一幸, 渡邊亘, 松尾祐輝, 尾崎哲郎, 中尾敬 (2016c) バレイショ「さんじゅう丸」の秋作普通栽培における出芽安定技術 (第 3 報: 植付け後の灌水による種いも腐敗軽減対策) . 日作九支報 82:27–29

- Sato E, Goto K, Min YY, Toyota K, Suzuki C (2010) Quantitative detection of *Pratylenchus penetrans* from soil by using soil compaction and real-time PCR. *Nematological Research* 40:1–6
- Sato N (1980) Sources of inoculum and sites of infection of potato tubers by *Phytophthora infestans* in soil. *Japanese Journal of Phytopathology* 46:231–240
- Sato N, Kato M, Ahmed AM, Kobayashi K, Ogoshi A (1991) A newspaper bag method for sample collection of blighted potato leaflets for isolation of *Phytophthora infestans*. *Ann Phytopath Soc Japan* 57:573–576
- Sato N, Kato M (1993) Improvement of the Selective Medium and Method for the Isolation of *Phytophthora infestans*. *Ann Phytopathol Soc Japan* 59:568–571
- Sato N (1994) Maturation of Sporangia of *Phytophthora infestans* Affecting the Rapidity of Indirect Germination. *Ann Phytopathol Soc Japan* 60: 53–59
- Shishido M, Kubota I, Ohashi T, Usami T (2013) Comparison of PCR assays for detection and quantification of *Phomopsis sclerotiioides* in plant and soil. *J Gen Plant Pathol* 79:18–27
- Skovgaard K, Rosendahl S, O'Donnell K, Nirenberg HI (2003) *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Mycologia* 95:630–636
- Stewart JE, Kim MS, James RL, Dumroese RK, Klopfenstein NB (2006) Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* isolates from a conifer nursery. *Phytopathology* 96:1124–1133
- Suzuki N, Osawa H, Akino S, Uedo A, Miyachi M, Kondo N (2019) An Easy Direct Zoosporangia Sampling Method for Collecting *Phytophthora infestans* Isolates. *Journal of the Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 74:1–5

田辺市郎 鈴木達彦 (1966) 微生物に関する分析法: その 1. 土壤微生物の測定法.
日本土壤肥料学雑誌 37:34-45

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680

Tian YE, Yin JL, Sun JP, Ma YF, Wang QH, Quan JL, Shan WX (2016) Population genetic analysis of *Phytophthora infestans* in northwestern China. *Plant Pathol* 65:17-25

十勝農業共同組合連合会 (2019) 土壤分析.
<https://www.nokyoren.or.jp/assay/assay-soil/>
2019 年 11 月 8 日閲覧

上堂陽葉, 秋野聖之, 荒木宏通, 近藤則夫 (2019) 収穫時のジャガイモ塊茎受傷程度と貯蔵腐敗発生の関係. *日植病報* 85:82 (講要)

植松清次 (2015) 疫病菌類同定のための簡易な分離・培養・形態形成法 Ver.3.
In: 植物防疫 特別増刊号 No.17 疫病 (築尾嘉章ほか編). pp.13-22., 一般社団法人日本植物防疫協会, 東京

Waksman SA (1927) *Principles of soil microbiology*. Baillière, Tindall and Cox., London

Wang PH, Chang CW (2003) Detection of the low-germination-rate resting oospores of *Pythium myriotylum* from soil by PCR. *Lett Appl Microbiol* 36:157-161

Warcup JH (1955) On the origin of colonies of fungi developing on soil dilution plates. *Trans Br Mycol Soc* 38:298-301

White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Michael A. Innis, Gelfand DH, Snisky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., pp 315–322

Young Lab. Protocols for washing glass beads. In: University of Washington. Young Lab. Protocols and recipes.

[http://depts.washington.edu/younglab/MediaSolutions%28htm%29/glass beads.htm](http://depts.washington.edu/younglab/MediaSolutions%28htm%29/glass%20beads.htm)

2019 年 12 月 2 日閲覧

Zan K (1962) Activity of *Phytophthora infestans* in soil in relation to tuber infection. Transactions of the British Mycological Society 45:205–221

Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol 62:316–322