



Title	ジャガイモ黒あし病菌の検出法および生態に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	青野, 桂之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14796号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85179">https://hdl.handle.net/2115/85179</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Aono_Yoshiyuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 青野 桂之

## 学位論文題名

### ジャガイモ黒あし病菌の検出法および生態に関する研究

ジャガイモ黒あし病は、世界中のジャガイモ生産ほ場で問題となっている細菌病であり、日本における病原菌は *Pectobacterium wasabiae* (Pw), *P. atrosepticum* (Pa), *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb), *Dickeya dianthicola* (Ddi) および *D. chrysanthemi* の5種と同定されている。病原細菌の主な感染源は保菌塊茎であるため、健全な種いもを生産し、種いもを通じた蔓延を防止することが重要である。北米、ヨーロッパおよび日本における種いも生産は、無病の培養苗からのミニチューバー（小粒塊茎）生産を起点に始まっており、日本を含む一部の国では、生産された種いもについて黒あし病菌の保菌検定が行われている。黒あし病菌のジャガイモへの感染は、ミニチューバーのほ場への植付以降におきていると推測されるが、ほ場における感染源・感染経路は未解明である。本研究では、黒あし病検定の高感度化と効率化を目的として、マルチプレックス PCR (polymerase chain reaction) と増菌法を組み合わせた BIO-PCR (biological-amplification and PCR) を開発した。また、開発した検出法を環境試料（ジャガイモ以外の輪作植物、雑草、水）に適用して感染源・感染経路を探索した。

#### 1. BIO-PCR 法によるジャガイモおよび土壌からの黒あし病菌の検出

黒あし病菌を効率的に検出するために、まず既報のプライマーの組み合わせ、反応温度およびプライマー濃度を調整することで Pw, Pa, および *Dickeya* sp. を検出するトリプレックス PCR を開発した。トリプレックス PCR を、Pcb を検出するシンプレックス PCR と組み合わせることで、従来は黒あし病菌の検出・判別のために、1 試料につき 4 回（反応）行う必要があった PCR を 2 回（反応）に減らすことができた。ペクチンを炭素源とする液体培地 LEM (Liquid Enrichment Medium) 中でジャガイモの植物体（罹病茎または塊茎組織）、および土壌試料を 25 °C, 24 – 120 時間培養し、増菌液から抽出した DNA を PCR に供試することで黒あし病菌が検出可能であった。開発した BIO-PCR の検出感度は、塊茎組織 (0.6 g) を入れた培地 10 ml あたり 2 (Pcb) - 8 (Pa) cfu (colony forming unit) であり、土壌試料 (10 g) を入れた培地 100 ml あたり  $2 \times 10^1$  (Ddi) -  $3 \times 10^3$  (Pa) cfu であった。各菌種の菌液に浸漬接種した種いもを栽培したジャガイモに BIO-PCR を適用したところ、発病株の罹病茎、株元土壌、次代塊茎、ならびに無病徴株の株元土壌、次代塊茎から接種菌が検出された。以上、開発した BIO-PCR による検出法は、種いも生産での検定と環境試料からの黒あし病検出に適用可能と考えられた。

#### 2. ほ場での感染が疑われる黒あし病発生事例における感染源・感染経路の特定

2018 年に北海道の種いも生産ほ場で発生した Ddi による黒あし病は、同一の種いもを植えたにも関わらず、発病株の分布がほ場のごく一部に偏っていたため、種いも由来ではなくほ場に存在する感染源から菌が感染した可能性が疑われた。発病株が見つかった場所に隣接した畔に自生していたキク科雑草（ヒメジョオン、アキタブキ、オオアワダチソウ、オオヨモギおよびセイヨウタンポポ）計 210 株の根茎および根圏土壌を BIO-PCR で検定し、最終的に増菌液から計 9 菌株の Ddi を分離した。また、大雨後に雑草が自生していた畦の窪みに溜まった滞留水 15 試料から、計 4 菌株の Ddi を分離した。rep PCR (repetitive sequence based PCR) によるフィンガープリンティング解析結果から、ジャガイモの発病茎から分離した Ddi 菌株は、ヒメジョオン、アキタブキまたは滞留水から分離した Ddi 菌株の一部と遺伝的に同一と判定された。ヒメジョオンまたはアキタブキから分離した菌株を種いもに浸漬接種して栽培すると、ジャガイモに黒あし病が再現された。これらの結果と発生ほ場の地形から、本発生事例は、キク科雑草に保菌されていた

Ddi が、大雨時に発生した水と共に畔からほ場内へ流入し、ジャガイモに感染したことによるものと推測された。

### 3. ジャガイモ黒あし病をおこす *Pectobacterium* sp. および *Dickeya* sp. の宿主の探索

ほ場における感染源を探索するために、2018–2021年に北海道内の6つのほ場において8科19種の輪作植物または雑草計1,018株を採取し、黒あし病菌の保菌検定を行った。その結果、ジャガイモ非栽培ほ場から採取したエンバク野生種、エゾノギシギシおよびノラニンジンの地下部(根または根茎)または根圏土壌から計6菌株のPcbが分離され、アキタブキ、オオアワダチソウ、オオヨモギ、セイヨウタンポポの根茎または根圏土壌から計6菌株のDdiが分離された。エンバク野生種またはエゾノギシギシから分離したPcb、およびアキタブキから分離したDdiを種いもに浸漬接種して栽培すると、いずれもジャガイモに黒あし病の発病が認められた。エンバク野生種、エゾノギシギシおよびノラニンジンの健全株にPcbの菌液を、アキタブキおよびオオアワダチソウの健全株にDdiの菌液をそれぞれ灌注接種して3週間栽培すると、表面殺菌した地下部からBIO-PCRにより接種菌種が検出された。以上の結果から、エンバク野生種、エゾノギシギシおよびノラニンジンはPcbの、アキタブキ、オオアワダチソウ、オオヨモギおよびセイヨウタンポポはDdiの宿主であることが明らかとなった。

### 4. Pcb および Ddi の保菌雑草からジャガイモへの水を介した感染

保菌雑草からジャガイモへの水を介した感染の可能性を検証するために、接種試験を行った。温室で栽培したエゾノギシギシにPcbの菌液を、アキタブキまたはオオアワダチソウにDdiの菌液を灌注接種し、8日後に地下部を洗浄後新しい土壌に移植した。移植2週間後、灌水時にポット下部からの流出水を採取しBIO-PCRに供試したところ、PcbまたはDdiが検出された。流出水からPcbまたはDdiが検出された雑草のポットと健全なジャガイモのポットを、湛水状態で同一トレイに置き5日間栽培し、その後トレイから取り出して1週間–2ヵ月栽培した。栽培期間中に雑草とジャガイモに萎れなどの病徴は認められなかったが、エゾノギシギシの根茎、アキタブキの葉柄・根茎、オオアワダチソウの根茎からPcbまたはDdiが検出され、ジャガイモの次代塊茎からも雑草への接種菌株と同じ菌種が検出された。各雑草、流出水、ジャガイモの次代塊茎の増菌液から分離された菌株は、rep-PCRの結果からそれぞれ接種菌株と同一と確認された。以上の結果から、PcbとDdiは保菌雑草から水を介してジャガイモに感染することが示された。

以上、高感度かつ効率的な黒あし病菌検出法を開発した。また、開発した検出法を用いてPcbまたはDdiのジャガイモ以外の宿主植物と水を介した感染を解明し、黒あし病菌のほ場における生態の一端を明らかにした。