



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	青野, 桂之
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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	https://hdl.handle.net/2115/85185
Type	doctoral thesis
File Information	Aono_Yoshiyuki_summary.pdf



博士論文の要約

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

1. 背景

ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) は栄養繁殖で増殖されるため、種（種いも）を通じて病害虫がまん延しやすい。そのため、国内においては植物防疫法に基づいた採種体系による健全種いもの生産が行われている。すなわち、新品種を農業・食品産業技術総合研究機構種苗管理センター（以下、種苗管理センター）が受け入れ、生長点培養により無病の培養苗を作出後、培養苗から隔離温室内でミニチューバー（10 g 程度の小塊茎）を生産し、ミニチューバーをほ場に植えて2-3年増殖することで原原種を生産している（Kawakami et al., 2015）。種苗管理センターが配布した原原種から、道県が管轄する原種は、採種団体が管轄する採種ほと段階を踏んだ増殖が行われ、一般栽培に使用する種いもが生産される。

ジャガイモ黒あし病は世界各地のジャガイモ生産ほ場で発生している種いも伝染性の病害であり、国内の病原細菌は *Pectobacterium wasabiae* (Pw) , *P. atrosepticum* (Pa) , *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb) , *Dickeya dianthicola* (Ddi) および *D. chrysanthemi* と同定されている（Fujimoto et al., 2020）。本病害は植物防疫法上の指定病害ではないものの、罹病した場合に次代塊茎が腐敗を起こし極端な減収を引き起こすことから、重要病害の一つと見なされている（上田, 2010）。2014年、種苗管理センターの原原種ほ場の一部において黒あし病の発生が確認され、一部の品種で原原種の配布が中止される事態となった（大堀, 2015）。そのため、本病害に対する対応策を早急に講じる必要性が生じた。

本研究ではまず、種苗管理センターおよび農業団体が黒あし病のモニタリングのために実施している保菌検定と、黒あし病菌の生態調査に必要な黒あし病菌の検出法の効率化と高感度化を図った。次に、種いも生産における対策構築のために、これまで明らかになっていなかったほ場における黒あし病菌の感染源・感染経路の探索を行った。

2. 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

黒あし病菌の検出に用いられる、液体培地で対象試料を培養後に増菌液から DNA を抽出し、PCR に供試する BIO-PCR (biological amplification and PCR; Schaad et al., 1995) の改良を行った。黒あし病をおこす菌種は複数存在するため、検出にはこれまで4種のプライマーペアを用いた PCR を別々に4回行っており、効率化が必要であった。効率的な検出にはマルチプレックス PCR が適するが、既報の Diallo et al. (2009) の手法は検出対象が Pa と *Dickeya* sp.のみと狭く、Potrykus et al. (2014) の手法は Pw と軟腐病菌である *P. carotovorum* とを識別できなかった。そのため、新たに既報のプライマー (De Boer and Ward, 1995; De Haan et al., 2008; Duarte et al., 2004; 堀田ら, 2009; 2008; Nassar et al., 1996) の組み合わせを検討し、反応条件の統一とプライマー濃度比の最適化を行うことで、Pw, Pa および *Dickeya* sp. を検出するトリプレックス PCR と Pw, Pa, Pcb および *Dickeya* sp. を検出するテトラプレックス PCR を開発した。各菌種のゲノム DNA に対する PCR の検出感度を比較したところ、Pw に対する検出感度がトリプレックス PCR では 0.01 ng/μl であったのに対して、テトラプレックス PCR では 10 ng/μl と低かった。そのため、以降の検出にはトリプレックス PCR と Pcb 特異的なプライマーペアを単独で使用する PCR を組み合わせて利用することとした。トリプレックス PCR の利用により、黒あし病菌の検出に必要な PCR の回数を2回に減らすことができた。

次に BIO-PCR における培養工程の最適化を行った。ペクチンを炭素源とする半選択性液体培地である Pectin Dipecta, AG366 を用いた Liquid Enrichment Medium (LEM; Hélias et al.,

2012) またはポリガラクトuron酸ナトリウム塩 (P3850) を用いた Menelay and Stanghellini 培地 (Menelay and Stanghellini, 1976) に黒あし病菌 5 菌種の各菌液を加えて初期菌密度を $10^1 - 10^3$ cfu (colony forming unit)/10 ml とし, 25 °C, 48 - 120 時間静置培養し, 増菌液から DNA を抽出して PCR に供試したところ, LEM でのみ Pa が安定的に検出されたため, 培養には LEM を用いることとした. 黒あし病菌を穿刺接種して得た罹病茎を入れた LEM, あるいは塊茎組織または土壌と菌液を添加した LEM を用いて試料別の培養時間を検討し, 罹病茎では 24 - 48 時間, 塊茎では 48 - 72 時間, 土壌では 108 - 120 時間とした. 検出試料の培養ではこれまで流動パラフィンの重層による嫌気条件の作出が慣行的に行われてきたが, 土壌試料からの黒あし病菌の検出感度に与える影響を評価したところ, 本処理は省略しても検出感度に影響を与えない結果が得られ, 作業工程を簡略化できた.

LEM に塊茎組織と菌液を加えた培養液を用いて評価した 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 であり, 種苗管理センターがこれまで利用してきた King's B 液体培地を用いた BIO-PCR (堀田ら, 2009) よりも高感度であった. 土壌試料 (10 g) を入れた LEM 100 ml からの検出感度は, 2×10^1 (Ddi) - 3×10^3 (Pa) cfu であった. BIO-PCR の有効性を検証するために, 黒あし病菌 5 菌種をそれぞれ浸漬接種した種いも (品種: トヨシロ) をポットに植え温室内で栽培後, BIO-PCR を適用したところ, Pw, Pcb および Ddi を接種し発病に至ったすべての株の罹病茎, 株元土壌および次代塊茎から接種菌種が検出された. また, 発病しなかった無病徴株の株元土壌または次代塊茎の一部から, 接種菌がそれぞれ検出された. 以上から, 発病株および収穫塊茎の検定, あるいはほ場で採取した環境試料からの黒あし病菌検出に活用できる効率的かつ高感度な BIO-PCR を開発した.

3. 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

黒あし病は種いも伝染性病害であるものの, 隔離環境で行われる培養苗の増殖およびミ

ミニチューバー生産での感染の可能性は低く、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と推測される (Charkowski et al., 2018; Toth et al., 2011) . このことは、種いも以外にもほ場環境に黒あし病菌の感染源があることを示唆している。一方、一般に *Pectobacterium* sp.および *Dickeya* sp.の土壌での生存期間は短く、ジャガイモ栽培後に3-8年の輪作期間をあければほ場で生存できないと考えられており (Czajkowski et al., 2011; Toth et al., 2011) , 具体的な感染源と感染経路は不明であった。

2018年に北海道の種いも生産ほ場で発生したDdiによる黒あし病発病事例は、ほ場内の発病株の分布が著しく偏っていたため、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事例と推測された。本事例における感染源と感染経路を、BIO-PCR, rep-PCR (repetitive sequence based PCR) およびジャガイモへの接種試験により調べた。Ddiはキク科栽培植物から分離報告があること (Samson et al., 2005; Suharjo et al., 2014) から、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計210株の根茎または根圏土壌をBIO-PCRに供試し、検出のあった増菌液から希釈平板法により菌の分離を試みた。その結果、無病徴のヒメジョオン (*Erigeron annuus* L.) から2菌株、アキタブキ [*Petasites japonicus* subsp. *giganteus* (Sieb. et Zucc.) Maxim.] から3菌株、オオアワダチソウ (*Solidago gigantea* var. *leiophylla* Fern.) から2菌株、オオヨモギ [*Artemisia montana* (Nakai) Pampan.] から1菌株を分離した。また、大雨後に雑草が自生していた畔の窪みに溜まった滞留水15試料から、計4菌株を分離した。Ddi特異的なプライマー (Fujimoto et al., 2018) を用いたPCR, および一部菌株のハウスキーピング遺伝子 (*recA* および *dnaX*) 塩基配列のダイレクトシーケンス解析から、分離菌はすべてDdiと同定された。rep-PCRによるフィンガープリンティング解析 (Nakayama et al., 2021; Versalovic et al., 1994) の結果から、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Ddi菌株を種いも (品種: マチルダ) に接種して栽培すると、ジャガイモに黒あし病が

再現され、発病茎から Ddi が再分離された。本ほ場には強い傾斜があり、雑草を採取した畔はジャガイモを栽培していたほ場内よりも高く、大雨時には畔からほ場内に水が流入する状況であった。そのため、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。

4. 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

黒あし病菌の感染源をさらに探索するために、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、地下部(根または根茎)および根圏土壌をBIO-PCRに供試し、検出のあった増菌液から菌の分離を試みた。分離菌株の同定は特異的なプライマーを用いたPCRを用いて行うとともに、一部菌株についてはハウスキーピング遺伝子(*gapA*, または *recA* および *dnaX*)塩基配列のダイレクトシーケンス解析を行った。その結果、エンバク野生種(*Avena strigosa* Schreb.)から2菌株、エゾノギシギシ(*Rumex obtusifolius* L.)から3菌株、ノラニンジン(*Daucus carota* subsp. *carota* L.)から1菌株のPcbが分離された。また、アキタブキ、オオヨモギから各1菌株、オオアワダチソウ、セイヨウタンポポ(*Taraxacum officinale* Weber)から各2菌株のDdiが分離された。PcbまたはDdiの分離源となった植物体を採取したほ場は、ジャガイモ栽培から1–6年経過しており、ジャガイモ非栽培下においても、PcbやDdiが生存することが明らかになった。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をそれぞれ種いも(品種:とうや, またはマチルダ)に浸漬接種してほ場で栽培すると、いずれもジャガイモに黒あし病の発病が認められ、発病茎から接種菌が分離された。また、温室で栽培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、いずれも無病徴であったものの、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示唆された。

5. 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の健全株に Pcb の菌液を、アキタブキまたはオオアワダチソウの健全株に 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て接種株を作成した。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 (品種：トヨシロ) のポットを、湛水状態の同一トレイに配置して 5 日間栽培し、その後トレイから取り出して 1 週間 - 2 ヶ月栽培した。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を BIO-PCR に供試したところ、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種と同じ菌種が検出された。検出のあった各雑草、流出水、ジャガイモの増菌液から分離した菌株は、rep-PCR の結果からそれぞれ接種菌株と遺伝的に同一と確認された。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。

6. 総合考察

黒あし病菌の効率的かつ高感度な検出法は、種いも生産における検定および病原菌の生態調査に必要不可欠である。本研究で開発した BIO-PCR はマルチプレックス PCR と最適化した培養法の導入により、既報の BIO-PCR (Hélias et al., 1998; 堀田ら, 2009) と比較して、より様々な試料 (植物体, 土壌および水) から幅広い対象菌種 (Pw, Pa, Pcb, Ddi お

よび Dch) を、短時間で高感度に検出できる。種苗管理センターは、開発した BIO-PCR を黒あし病検定に 2019 年から導入した。

次に BIO-PCR を用いて、ほ場における黒あし病菌の感染源・感染経路の探索を行った。その結果、ほ場周囲に自生するエゾノギシギシ、ノラニンジン、キク科雑草が Pcb または Ddi を保菌していることを世界で初めて明らかにした。これらの雑草は、地下部で越冬して輪作期間も生存するため、Pcb または Ddi の宿主植物となっていると推測される。さらに、本研究では保菌雑草を感染源として水が感染経路となりジャガイモへ菌が感染することを明らかにした。一方、緑肥植物として輪作期間中に栽培されるエンバク野生種での Pcb の保菌を確認したが、土壌にすき込み後の植物残渣で菌が生き残り、次作の感染源になりうるのかどうかについては不明で、今後の研究が必要である。本研究で得られた知見により、黒あし病菌のほ場での生態の一端が明らかになるとともに、種いも生産における黒あし病対策の立案が可能となった。本研究成果を受けて、種苗管理センターは黒あし病対策としてほ場雑草の駆除、前作植物の適期すき込みによる腐熟化促進、ほ場外からの水の流入防止およびほ場の透排水性向上等に取り組んでいる。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 (27005C) およびイノベーション創出強化推進事業 (30037C および 01022C) の支援を受けて実施した。

引用文献

Charkowski, A.O. (2018) The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annual Review of Phytopathology* 56: 269–288.

Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M. (2011) Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. *Plant Pathology* 60: 999–1013.

De Boer, S.H., and Ward, L.J. (1995) PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*

associated with potato tissue. *Phytopathology* 85: 854–858.

De Haan, E.G., Dekker-Nooren, T.C.E.M., van den Bovenkamp, G.W., Speksnijder, A.G.C.L., van der Zouwen, P.S., and van der Wolf, J.M. (2008) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology* 122: 561–569.

Diallo, S., Latour, X., Groboillot, A., Smadja, B., Copin, P., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., and Chevalier, S. (2009) Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *European Journal of Plant Pathology* 125: 349–354.

Duarte, V., de Boer, S.H., Ward, L.J., and de Oliveira, A.M.R. (2004) Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96: 535–545.

Fujimoto, T., Yasuoka, S., Aono, Y., Nakayama, T., Ohki, T., Sayama, M., and Maoka, T. (2018) Biochemical, physiological, and molecular characterization of *Dickeya dianthicola* (formerly named *Erwinia chrysanthemi*) causing potato blackleg disease in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 84: 124–136.

Fujimoto, T., Yasuoka, S., Aono, Y., Nakayama, T., Ohki, T., and Maoka, T. (2020). First report of potato blackleg caused by *Dickeya chrysanthemi* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 86: 423–427.

Hélias, V., Le Roux, A.C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J. P., and Jouan, B. (1998) Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology* 104: 685–699.

Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., van der Wolf, J.M., and Andrivon, D. (2012) Two new effective

- semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology* 61: 339–345.
- 堀田光生・田中文夫・不破秀明 (2009) ジャガイモの種いも伝染性細菌病の特徴と簡易保菌検定法. *植物防疫* 63: 98–103.
- Kawakami, T., Oohori, H., and Tajima, K. (2015) Seed potato production system in Japan, starting from foundation seed of potato. *Breeding Science* 65:17–25.
- Meneley, J.C., Stanghellini, M.E. (1976) Isolation of soft-rot *Erwinia* spp. from agricultural soils using an enrichment technique. *Phytopathology* 66: 367–370.
- Nakayama, T., Yasuoka, S., Ozawa, T., Aono, Y., Ushio, Y., Fujimoto, T., Ohki, T., and Maoka, T. (2021) Genetic diversity of potato blackleg pathogens, *Pectobacterium wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Dickeya dianthicola* in Japan by rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology* 159: 917–939.
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., and Bertheau, Y. (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Applied and environmental microbiology* 62: 2228–2235.
- 大堀英幹 (2015) 種苗管理センターにおけるジャガイモ黒あし病の発生状況と対応. いも類振興情報 125: 26–32.
- Potrykus, M., Sledz, W., Golanowska, M., Slawiak, M., Binek, A., Motyka, A., Zoledowska, S., Czajkowski, R., and Lojkowska, E. (2014) Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology* 165: 474–487
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., and Gardan, L. (2005) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al., 1953) Brenner I. 1973 and *Brenneria*

paradisiaca to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1415–1427.

Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., and Panopoulos, N.J. (1995) A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology 85: 243–246.

Suharjo, R., Sawada, H., and Takikawa, Y. (2014) Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR-RFLP. Journal of General Plant Pathology 80: 237–254.

Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsrör, L., and Elphinstone, J.G. (2011) *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology 60: 385–399.

上田裕之 (2010) 北海道十勝地区における種馬鈴しょ生産の取り組み. 特産種苗 7: 38–41.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.P., and Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cell Biology 5: 25–40.