



Title	ジャガイモ塊茎の貯蔵腐敗に関わる細菌に関する研究
Author(s)	吉田, 竜斗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16769号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16769
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99614
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIDA_Ryuto.pdf, 全文



ジャガイモ塊茎の貯蔵腐敗に関わる細菌に 関する研究

北海道大学大学院農学院
生産フロンティアコース 博士後期課程

吉田竜斗

目次

第1章 緒言	1
1. 植物の病気.....	1
2. 植物病原細菌.....	1
3. 貯蔵中に発生する病害	2
4. 本研究の意義.....	3
5. 謝辞.....	3
第2章 研究史	5
ジャガイモに病気を引き起こす <i>Pectobacterium</i> 属細菌	5
日本におけるポストハーベスト病害	7
ポストハーベスト病害の防除.....	9
第3章 ジャガイモ疫病に起因する細菌性腐敗.....	11
1. 背景.....	11
2. 材料・方法.....	12
3. 結果.....	16
4. 考察.....	18
第4章 貯蔵中に塊茎腐敗を引き起こす細菌.....	28
1. 背景.....	28
2. 方法.....	29
3. 結果.....	31
4. 考察.....	33
第5章 ジャガイモ地上部の発病と塊茎腐敗との関係	61
1. 背景.....	61
2. 方法.....	61
3. 結果.....	66
4. 考察.....	67

第6章 総合考察.....	77
6.1 ジャガイモ塊茎腐敗に関与する細菌	77
6.2 栽培中の発病と貯蔵期間中の塊茎腐敗との関連について	78
摘要	80
Summary	82
参考文献.....	84

第1章 緒言

1. 植物の病気

植物病害は農作物に大きな被害を与え、私たちの生命を脅かすことがある。歴史的に見て有名な飢饉としては 1845 年頃に発生したアイルランドのジャガイモ大飢饉があげられる。これはジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary による病害で、1849 年まで続いたこの飢饉で 100~150 万人が死亡したと言われている。我が国においても 1993 年に冷害といもち病によるイネの不作により食糧の確保を危うくしうることが示された（大木，2019）。2019 年には約 6 億 9000 万人が栄養不足であると推定され（THE STATE OF FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD 2020.），今後ますます食料の安定供給が必要となると考えられる。農作物の損失の一因である病気の防除は食糧問題を解決する上で重要である（大木，2019）。温暖化などを原因とする気候の変化によって、栽培地域が拡大した農作物もある。その一方で、植物の病気の発生にも影響することが懸念されている。例えば、イネ紋枯病は高温性病害であるとされており、温暖化が進行することで、本病の被害が増大することが推測されている（井上ら，2020）。

2. 植物病原細菌

植物も人間や動物と同じように様々な病原体に感染して病気になる。植物に病気を引き起こす病原体の例として、菌類，細菌，ウイルス，ウイロイドや線虫があげられる。その中でも細菌による病気は約 1 割程度とされるが、*Pseudomonas syringae* や *Xanthomonas* 属細菌のように深刻な病気を引き起こすものもある（Chapman et al., 2012; Rodrigues Neto et al., 2011）。*Pectobacterium* 属細菌は、ジャガイモをはじめとするさまざまな農作物に軟腐病などの病気を引き起こすことが知られている。世界

的に見ても大きな被害をもたらしている病原菌であり、盛んに研究されている。植物病原細菌の多くは、Ⅲ型分泌機構による植物細胞へのエフェクタータンパク質の注入や、菌体外多糖、酵素、毒素や植物ホルモンの生産・分泌により病気を引き起こす。これに対し、強い病原力を持たない、弱病原力細菌は常在菌として植物に表生あるいは内生し、宿主植物の抵抗力が低下した時に病害を引き起こす。これを日和見感染と呼び、大きな被害をもたらすこともある。*Pantoea anantisi* は広い宿主範囲を持つ病原細菌であるが、本細菌による病気は日和見感染によって発生すると考えられている (Coutinho and Venter 2009)。本研究の研究対象である *Paenibacillus polymyxa* もジャガイモ塊茎の抵抗力が低下し、環境が菌の生育にとって好適なものとなった場合にのみ、腐敗を引き起こすことが予想される。

3. 貯蔵中に発生する病害

植物の病気は圃場においても発生し、被害をもたらす。しかし、収穫された農作物が貯蔵・輸送を経て、販売・消費されるようになった現在では、収穫後に発生する植物病害“ポストハーベスト病害”も問題となっている。収穫後に生じる損失は10-20%に達すると言われ、特に糸状菌によるものが多いとされている (眞山, 2020)。日本国内では、収穫後に農薬を使用することは認められておらず、農薬を使わない防除方法の確立が必要とされている。本研究で扱ったジャガイモ塊茎も収穫後に損失が生じる場合がある。加工用ジャガイモの一部は収穫後に貯蔵され、その一部は貯蔵中に腐敗する場合があり、大きな問題となっている (秋野, 2016)。その原因の究明と対策は今なおジャガイモ生産を行うために解決すべき課題である。

4. 本研究の意義

貯蔵中のジャガイモ塊茎に貯蔵病害を引き起こすとされている病原菌として、前述のジャガイモ疫病菌があげられる (Lastochkina et al., 2020). 疫病菌は単独で塊茎の腐敗を引き起こすのみならず、本菌に感染した塊茎では細菌や他の糸状菌による軟化腐敗が発生する場合があるとされている (Birch and Whisson, 2001). しかし、疫病菌感染後に発生する軟化腐敗を引き起こす病原は明らかではなかった. そこで、本研究では、疫病菌感染に起因する軟化腐敗に関する知見を得るべく、ジャガイモ疫病菌に感染したジャガイモ塊茎内からジャガイモに対して病原性を有する細菌の分離を行った. 分離した細菌はジャガイモ塊茎内に内生していることが予想されるため、塊茎内で増殖し、腐敗との関連を調べるために、塊茎内の細菌を検出した.

北海道各地で発生する塊茎腐敗を引き起こす病原菌のうち、糸状菌については過去の研究により *Fusarium oxysporum* などの *Fusarium* 属菌による乾腐病が原因の一つとなっていることが示唆された (川原ら, 2023). その一方で、大きな被害をもたらす細菌による塊茎腐敗の病原に関する調査は大規模には行われていなかった. 塊茎腐敗を防除する上で、病原菌の特定や分布は重要な知見であると考えられるためそれらの調査を行った.

塊茎腐敗を引き起こす細菌の中には、栽培中に発生する軟腐病などの病気の病原と同じ種やグループに分類されるものが含まれる. 栽培中の発病と塊茎腐敗との関連を調べることで、伝染経路の解明など防除に貢献する知見を得られることが期待される.

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、秋野聖之 准教授、大澤央 助教、近藤則夫 名誉教授には終始懇切ご丁寧なご指導・ご助言を賜った. そして北海道大学植物病理学研究室の学生諸氏にも実験を行うにあたり、様々な便宜を図っていただいた.

カルビーポテト株式会社の小泉恵美子氏には腐敗塊茎サンプルの提供をしていただいた。

本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2119 の支援を受けて遂行された。

この場を借りて、お世話になった全ての方々に深く感謝する。

第2章 研究史

ジャガイモに病気を引き起こす *Pectobacterium* 属細菌

複数の属の細菌が軟腐病を引き起こすことが報告されており，その中でも *Pectobacterium* 属と *Dickeya* 属が代表的な病原菌として挙げられ，研究されている (Charkowski, 2018). *Pectobacterium* 属は世界中に分布し，様々な植物に軟腐病を引き起こし，被害をもたらす (染谷ら, 2020). ジャガイモは，サトウキビ，トウモロコシ，コムギ及びイネに次いで 2022 年に世界で 5 番目に多く生産された作物である (FAO). 軟腐病はジャガイモにおいても発生し，栽培期間及び収穫後の両方でジャガイモ生産に打撃を与えている (Curland et al, 2021). 軟腐病による被害は収量の 15-30% に及ぶと推定されている (Osei et al. 2020). 日本国内においては，少なくとも 1930 年代にはその存在が認識されていた (中田, 1934). ジャガイモ軟腐病が発病すると，組織が軟化腐敗し，しばしば悪臭を放つ．病原菌は土壤中に生存し，小葉が土壤に触れると，そこから病原菌に感染し，主茎まで伝染すると考えられている (図 2-1). 現在，*Pectobacterium* 属細菌は 10 種以上が記載されているが，日本植物病名目録 (2023) では，*P. carotovorum* のほか，*P. brasiliense* と *P. wasabiae* の 3 種がジャガイモ軟腐病の病原として登録されている．そのうち，*P. carotovorum* は農業上特に重要な植物病原細菌に数えられている (Mansfield et al. 2012). 軟腐病細菌は初め *Erwinia carotovora* として分類されていた (Lelliott, 1974). その後，分類体系が見直され，軟腐病菌は *Pectobacterium* 属細菌に分類され，整理された (Hauben et al. 2005). 2000 年代から 2010 年頃にかけて，*P. carotovorum* を構成する 3 亜種が種に格上げされ (Garden et al. 2003)，同種に新亜種も提案された (Koh et al. 2012; Nabhan et al. 2012). さらに，*P. chrysanthemi* と *P. cypripedii* の 2 種がそれぞれ *Dickeya* 属と *Pantoea* 属に移された (Samson et al. 2005; Brady et al. 2010). その後，新種が提案され，2020 年には約 20 種の軟腐病菌

が提案されている (染谷ら, 2020). 前述の通り, 日本国内でこれまで発生したジャガイモ軟腐病は, 3 種 (*P. carotovorum* のほか, *P. brasiliense* と *P. wasabiae*) によって引き起こされる病気であるとされている. 発生当時と現在の分類基準が大きく変わっており, 当初 *P. carotovorum* とされた菌株の中に別種が含まれている可能性がある (染谷ら, 2020).

また, *Pectobacterium* 属細菌はジャガイモ黒あし病を引き起こす. 黒あし病は日本では *P. atrosepticum* により引き起こされる病気として登録された (谷井ら, 1973). その後, 谷井 (1984) の調査により, *P. atrosepticum* (formerly *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) のほか, *P. carotovorum* (formerly *E. carotovora* subsp. *carotovora*) と *Dickeya* sp. (formerly *E. chrysanthemi*) が北海道で発生するジャガイモ黒あし病の病原菌であると考えられてきた. 近年の調査では, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (= *P. brasiliense*), *P. wasabiae* (= *P. parmentieri*) および *D. dianthicola* がジャガイモ黒あし病の病原菌であることが示された (Nakayama et al. 2021). 病原菌は前述のジャガイモ軟腐病と重複するものもあるが, 病徴や感染経路などの違いから日本国内では異なる病気として登録され, *Pectobacterium* 属細菌により引き起こされる黒あし病はジャガイモ以外の植物での発生が報告されていない (日本植物病名目録, 2023). ジャガイモ黒あし病は種いも伝染により伝染する. 保菌した種いもを植え付けると, 生育した茎の地際部が腐敗する, あるいは発芽する前に種いもが腐敗して欠株となる. 罹病部は種いもにつながっているという点で軟腐病と異なる. また, 近年, ジャガイモ黒あし病菌の発生生態として *D. dianthicola* が圃場周辺のキク科雑草に潜伏感染していることが示唆され (農研機構, 2020), 種いも伝染だけでなく, 栽培中にも感染の可能性があることが考えられた.

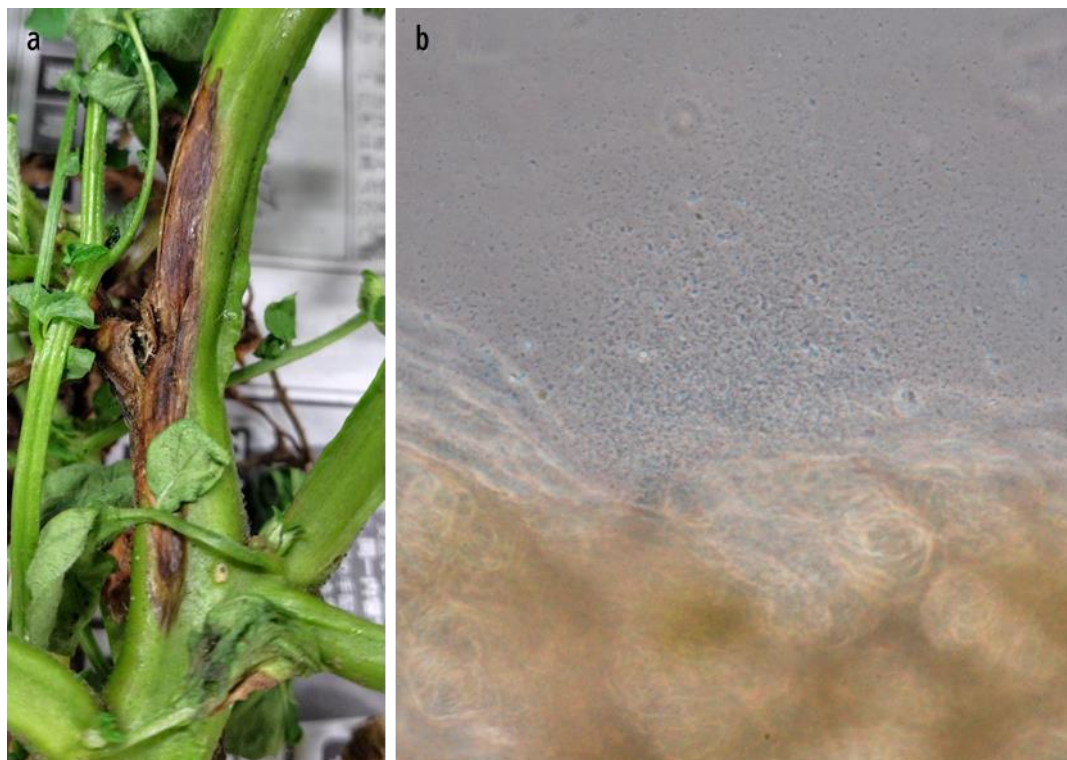


図 2-1 圃場で発生したジャガイモ茎の *Pectobacterium* 属細菌による病気

a 茎に発生した病斑 (病徴) . **b** 罹病組織の検鏡により観察された菌泥噴出 (標徴)

日本におけるポストハーベスト病害

ポストハーベスト病害とは、収穫後から食品として消費されるまでの間に農作物に発生する病害の総称である。発生するタイミングによって、市場病害、貯蔵病害や輸送病害などにさらに分類されることもある。ポストハーベスト病害を引き起こす病原微生物には、様々なものが存在するが、糸状菌か細菌かのいずれかであると考えられる（赤井・河野, 1952）。代表的なポストハーベスト病として *Penicillium* 属菌によるカンキツの青かび病と緑かび病や *Pec. carotovorum* による野菜類の軟腐病があげられる。また、糸状菌は、発病による品質低下のみならず、マイコトキシン の産生による食品の汚染と健康被害を引き起こす可能性があるため、その防除も重要である。

海外においては、収穫した農作物の長距離輸送が古くから一般的であったため、ポストハーベスト病害の発生も問題となり、重要な研究として位置づけられている。一方、日本ではポストハーベスト病害よりも、栽培中に発生する病気の防除が一般的であった。しかし、輸送・貯蔵技術の発展に伴い、海外からの輸入が増加し、日本でもポストハーベスト病害が問題となってきた。逸見（1935）は都市中央卸市場の発展に伴うポストハーベスト病害の重要性を指摘し、1930年代には調査を実施していた。その後、赤井・河野（1952）が調査を行い防除方法に関して考察しているが、この時点でのポストハーベスト病害に対する一般の関心が薄いことを指摘している。1990年代には、手塚（1992）がポストハーベスト病害の重要性が高まってきたことを述べている。

ジャガイモ塊茎の貯蔵腐敗を引き起こす病原菌として、前述の軟腐病細菌 *Pectobacterium* spp. のほか、ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* やジャガイモ乾腐病を引き起こす *Fusarium* spp. などが古くから知られている (Boyd, 1972)。引き起こされる症状は病原菌により異なり、様々である (図 2-2)。前述の通り *Pectobacterium carotovorum* は農業上重要な病原菌として考えられており、*Ph. infestans* は毎年数十億ドルの損失をもたらすとされる重要なジャガイモの病原菌であり、*Fusarium* 属菌のうち *F. oxysporum* は *Pectobacterium* spp. 同様に農業上重要な植物病原糸状菌として認識されている (Dean et al. 2012; Latijnhouwers et al. 2004; Mansfield et al. 2012)。これらの病気は日本国内においても発生し、被害をもたらしているため、ジャガイモ塊茎の貯蔵病害を引き起こす病原菌やその発病条件などの調査が行われてきた (秋野, 2016; 木村, 1977; 阪口, 1977)。



図 2-2 実際に発生した腐敗塊茎の例

a 組織が軟化腐敗した例（*Pectobacterium* 属細菌による腐敗） **b** 塊茎内部が褐変し、罹病部に菌糸の生育が見られた例（*Fusarium* 属菌による腐敗） **c** 塊茎腐敗が発生した貯蔵庫内の様子

ポストハーベスト病害の防除

海外ではポストハーベスト農薬の使用が一般的となっている地域もあり，強力な防除手段となっている．その一方で，化学農薬の残留とその健康への影響の懸念から，農薬を使用しない防除に関する研究も行われている．例えば，*Bacillus* 属細菌を利用した生物防除剤は広く認知され，今なお研究が盛んに行われている．ジャガイモ塊茎のポストハーベスト農薬としての研究例も報告されている (Gachango et al. 2012).

日本においては収穫後の農作物は食品とみなされ，農薬を使用することが認められていない．そのため，ポストハーベスト病害の防除を目的とした処理には食品添

加物に指定されているものが利用される．そのほか，温度や湿度などの貯蔵条件を調節し，病害が発生しづらい環境にする耕種的防除も用いられる．

ジャガイモ軟腐病については，抵抗性を示す品種が見つかっていない (McGrath et al. 2002)．ジャガイモ，すなわち *Solanum tuberosum* と同属の他の *Solanum* 属植物には軟腐病に抵抗性を示すものが見つまっているため，そのような植物から抵抗性遺伝子を導入する研究も行われてきた (Tek et al. 2004)．亜リン酸の葉面散布によりジャガイモ塊茎の抵抗性反応を向上させることが示唆されており，これを活用した防除方法の研究が行われている (Najdabbasi et al. 2022)．この方法は，収穫後の塊茎に直接処理しないため，栽培中から実施可能な防除方法として期待される．また，収穫後の塊茎は食品として扱われることから，食品添加物に分類される化合物を処理することはできる．例えば，シナムアルデヒドは抗菌活性をもつことが知られ，食品添加物としてシナムアルデヒドを処理することで塊茎腐敗の防除への応用可能性が検証されている (Zhang et al. 2023)．

第3章 ジャガイモ疫病に起因する細菌性腐敗

1. 背景

ジャガイモ塊茎は *Phytophthora infestans* に感染すると腐敗が生じる。塊茎組織の褐変が *Ph. infestans* による塊茎腐敗の病徴であるが、本菌に感染して発病した塊茎は、その後、細菌や他の糸状菌に二次的に感染して軟化腐敗を呈することがある (Birch and Whisson 2001)。軟化腐敗の原因はセルラーゼやペクチナーゼなどによる植物組織の細胞壁の分解であると考えられるが、*Ph. infestans* からはペクチナーゼ活性は検出されず (Cole 1970)、本菌単体で塊茎の軟化腐敗を引き起こさないとされている (西脇, 2017)。*Ph. infestans* に感染した後に生じる軟化腐敗の原因となる微生物や腐敗発生時の条件に関する知見は少ない。先行研究において、*Ph. infestans* に感染し軟化腐敗した塊茎から腐敗を引き起こす細菌が分離され、*Paenibacillus polymyxa* と同定された (吉田ら, 2023)。本研究では、*Ph. infestans* に感染した塊茎において、*Pa. polymyxa* が軟化腐敗を誘導することおよび本細菌が増殖することを調べることで、*Pa. polymyxa* と塊茎腐敗との関係を明らかにすることを目的として調査を実施した。*Ph. infestans* と *Pa. polymyxa* を共にジャガイモ塊茎に接種した場合に、*Pa. polymyxa* が腐敗の発生や進行に影響を与えるか調査を行った。加えて、*Ph. infestans* を人工接種した塊茎内の細菌をリアルタイム PCR 法により定量し、*Ph. infestans* への感染に伴う細菌増殖について調べた。

2. 材料・方法

3.2.1 供試菌株

本研究に供試した菌株の一覧を表 3-1 に示した．供試菌株はいずれも北海道で栽培されたジャガイモ（cv. スノーデン, Irish cobbler, トヨシロ）の罹病葉または腐敗塊茎から分離された．

3.2.2 使用した培地

ライ麦 B 寒天培地 (RyeB agar)

ライ麦種子を計量し，付着している農薬を十分に洗い流した．このライ麦種子と適量の水をビーカーに入れ，24 時間浸漬した．このライ麦種子を取り出して，浸漬液はとっておいた．取り出したライ麦種子を適量の純水とともに火にかけ，沸騰させた．沸騰後，弱火で 30 分間煮沸した．煮沸した煎汁をガーゼで濾し，浸漬液と混合した後，表 3-2 に従ってスクロースを加えて，純水でメスアップし，2 または 4 倍濃度とした．ライ麦種子 125 g を先述の通り処理した場合，煮沸液と浸漬液の混合液を 1 L にメスアップするところを，500 mL または 250 mL にメスアップし，2 または 4 倍濃度とした．純水で希釈した煎汁と表 3-2 に記載した量の寒天を三角フラスコに入れ，アルミホイルで蓋をし，121℃で 20 分間，高圧蒸気滅菌した．組成を表 3-2 に示した．

Tryptic soy agar (TSA)

Tryptic Soy Broth (MP Biomedicals) を計量し，純水でメスアップし，寒天を加えた．121℃で 20 分間，高圧蒸気滅菌した．組成を表 3-3 に示した．また，本培地に寒天を加えないことで，液体培地 Tryptic Soy Broth (TSB) を調製した．

3.2.3 疫病菌と細菌の共接種試験

疫病菌に感染した塊茎で *Pa. polymyxa* が増殖した場合に腐敗の進行にどのような影響があるか調べるため、疫病菌を人工接種して疫病の発病後、細菌懸濁液を処理して腐敗の進行を調査した。疫病菌の培養には RyeB agar を用いた。保存用斜面培地または平板培地上で培養された疫病菌株の含菌寒天片を切り出し、RyeB agar に移植した。培養は 20℃で行った。13-15 日間培養した菌体を滅菌蒸留水で懸濁し、二重ガーゼでろ過して遊走子のう懸濁液を得た。懸濁液を希釈して 1.0×10^4 zoosporangia/ mL に調整した。ジャガイモ塊茎スライス (cv. Irish cobbler, 流水洗浄 15 分, 風乾 30 分) に調製した遊走子のう懸濁液 100 μ l を滴下して上面全体に塗り広げた。接種した塊茎スライスを密閉容器に濡らしたペーパータオルと共に入れて 5-6 日間 20℃で培養した。ネガティブコントロールとして滅菌水を同様に処理した。

細菌株を TSA に画線し、1-2 日間 27℃で培養した。生育したシングルコロニーを釣菌して TSB に移植し、24 時間 27℃で振とう培養した。培養液を $11,000 \times g$ で 1 分間遠心分離して集菌し、 1.0×10^8 CFU /mL となるように滅菌水で懸濁した。懸濁液 100 μ l を疫病菌を接種して培養した塊茎スライスの中央に滴下し、滅菌爪楊枝で軽く傷をつけた。密閉容器に濡らしたペーパータオルおよび化学カイロと共に入れて 3 日間 20℃で培養した。ネガティブコントロールとして滅菌水を同様に処理した。

3 日間培養した塊茎スライスの腐敗程度を評価するために、培養した塊茎スライスから漏出した液体をペーパータオルで吸水し、その質量を測定し、比較した。統計解析の前に液体の質量を対数変換し、Shapiro-Wilk 検定と F 検定を用いてそれぞれ正規性と等分散性を評価した。*Ph. infestans* + HuPp001 を接種した塊茎と HuPp001 のみを接種した塊茎の液体漏出の比較ではデータが正規分布し分散が等しかったため、Student の t 検定を適用した。HuPp002 単独接種塊茎のデータが正規分布しなかったため、*Ph. infestans* + HuPp002 接種塊茎と HuPp002 単独接種塊茎の比較には、

Wilcoxon の順位和検定を用いた。HuPp003 接種塊茎と *Ph. infestans* 単独接種塊茎の比較には、データが正規分布していたが分散が不等であったため、Welch の t 検定を用いた。統計解析は R ソフトウェアバージョン 4.2.1 およびその基本パッケージを用いた (R core team, 2022) 。

3.2.4 疫病菌を接種した塊茎内の細菌定量

疫病菌に感染した塊茎内で細菌が増殖することを確認するため、疫病菌を人工接種した塊茎組織を採取し、real-time PCR 法による細菌の検出・定量を行った。3-3-3. と同様の方法により調製した遊走子のう懸濁液を調製した (1.0×10^4 zoosporangia/mL)。表面を水洗して風乾したジャガイモ塊茎におろし金で傷をつけ、調製した遊走子のう懸濁液を噴霧接種した (塊茎 1 個当たり 0.5 ml 程度)。噴霧接種した塊茎を 12°C で培養した。ネガティブコントロールとして、水洗して風乾後におろし金で傷をつけた塊茎 (NC1) と、水洗後風乾しただけの塊茎 (NC2) も 12°C で保管した。疫病菌を接種した塊茎は、接種後 1 週間ごとに塊茎組織を採取した (4 週間後まで)。疫病菌を接種する前の塊茎、および 4 週間保管した NC1 と NC2 の塊茎からも同様に塊茎組織を採取した。採取した塊茎組織を -80°C で 30 分以上予備凍結させ、凍結乾燥体を作製した。2 mL チューブに 1.0 mm ガラスビーズ 0.2 g と 0.5 mm ガラスビーズ 0.1 g を入れて自作ビーズチューブを作製した。細かく砕いた凍結乾燥体約 20 mg を量り取って入れ、抽出バッファ (2M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8.0) 600 μ L を加えた。FastPrep 24 Instrument (MP-Biomedicals) で破碎し (1min on/30 sec off/1min on) , 5,000 G で 10 分間遠心した。100 μ L の上清を NucleoSpin Plant II (MACHEREY-NAGEL) の PL1 buffer 400 μ L と混合し、RNaseA 10 μ L を加えて、10 分間インキュベートした。その後、同キットの説明書に従って DNA を抽出・精製した。

塊茎組織から抽出した DNA をテンプレート DNA として、反応は StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、real-time PCR を行った。反応は、塊茎内の細菌全体の定量を目的として Bacteria (*tuf* gene) Quantitative PCR Kit (タカラバイオ株式会社) を使用した。反応液組成は、Bacteria (*tuf* gene) Quantitative PCR Kit 使用時は、TB Green Premix Ex Taq GC (2×conc.) 10 μL, TUF Primer Mix (5×conc.) 4.0 μL, ROX reference dye 0.4 μL, dH₂O 1.6 μL, テンプレート DNA 4.0 μL とし、反応条件は、95℃30 秒を 1 サイクル、95 °C5 秒、60℃30 秒を 35 サイクルで行った後、融解曲線分析を行った。*Paenibacillus* 属または *Pa. polymyxa* 特異的な定量を目的とした Probe qPCR Mix 使用時は、Probe qPCR Mix (2×) 10 μL, 10 μM プライマー各 0.4 μL, プローブ 0.8 μL, ROX reference dye 0.4 μL, テンプレート DNA 2 μL, 滅菌超純水 6 μL とした。反応条件は、95℃20 秒を 1 サイクル、95℃1 秒、60℃20 秒を 40 サイクルで行った。プローブを使用して行った定量の検量線作成用スタンダードには、本研究で分離した *Paenibacillus polymyxa* HuPp001 の gDNA を使用した。あらかじめ、Bacteria (*tuf* gene) Quantitative PCR Kit を用いて定量し、プローブを使用して得られた定量結果をもとに *tuf* copies / g⁻¹ dry tissue に換算した。

定量結果を対数変換した後、細菌全体の定量結果の解析は、定量結果が正規分布したため、一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、接種 4 週間後と NC 1 および NC2 の定量結果についてそれぞれダネット検定を行った。*Paenibacillus* 属または *Pa. polymyxa* 特異的な定量結果の解析は、定量結果が正規分布しなかったため、Kruskal-Wallis test を行った。

3. 結果

3.3.1 疫病菌と細菌の共接種試験

疫病菌 MR2304 と細菌株を共接種すると、塊茎組織が軟化腐敗し、液体の漏出が確認された (図 3-1). 供試した全ての *Pa. polymyxa* 株 (HuPp001, HuPp002 および HuPp003) について同様の結果が得られた. 腐敗部分は疫病菌の菌糸に覆われていなかった. 腐敗した部分の断面を観察したところ、組織の褐変は表層に留まっていた (図 3-2). *Pa. polymyxa* 株を接種した部分は水浸状の病斑を形成し、軟化腐敗していることが認められた. *Pa. polymyxa* 株のみを接種した場合、接種部位の褐変や陥没が見られ、共接種した場合とは異なる変化が見られた. MR2304 のみを処理した場合には、ジャガイモ疫病特有の塊茎組織の褐変症状が見られたが、軟化腐敗は発生しなかった. 塊茎スライス中央に処理した滅菌水は 3 日間培養すると、少なくとも目視では観測できない状態となっており、液体の残留は見られなかった. 塊茎スライスの内部も特に変化は観察されず、疫病の進行も表層の褐変に留まっていた. また、*Pa. polymyxa* 株の代わりに、塊茎に腐敗を引き起こす能力を持たない 1 菌株 (HMB-009) を接種した場合、疫病菌を接種した塊茎スライスにおいても軟化腐敗を引き起こさなかった (図 3-3).

腐敗程度を評価するために腐敗部位から漏出した液体の質量を定量した. MR2304 と *Paenibacillus* 属細菌株を共接種した場合と *Paenibacillus* 属細菌株のみを接種した場合とを比較した (図 3-4). 供試した 3 菌株全てについて、共接種した場合の方が、漏出した液体の量が有意に多かった ($p < 0.05$, Student の t 検定, Wilcoxon の順位和検定または Welch の t 検定). 一方、MR2304 のみを接種した場合と滅菌水のみを処理した場合とでは有意な差が認められなかった ($p > 0.05$, Wilcoxon の順位和検定).

3.3.2 疫病菌を接種した塊茎内の細菌定量

接種後 1 週間後において疫病菌の生育は認められなかったが、接種後 2-4 週間後は菌糸の生育が観察された。細菌性腐敗は接種後 3 週間以降において観察された。

tuf 遺伝子を標的とした細菌全体の定量においては、乾燥塊茎組織 1 g あたり 3.04×10^5 , 7.49×10^6 , 1.32×10^8 , 2.51×10^9 , and 2.30×10^9 *tuf* copies が接種前、接種後 1-4 週間後でそれぞれ検出された。NC1 と NC2 については、乾燥塊茎組織 1 g あたり 2.01×10^7 and 3.04×10^6 *tuf* copies がそれぞれ検出された。ANOVA による解析では接種前から接種 4 週間後の定量結果には有意な差が認められた ($p < 0.05$)。また、ダネット検定による接種 4 週間後と NC1 および NC2 との比較では、いずれも有意な差が認められた (いずれも $p < 0.05$)。

1 サンプルを除いて、*Paenibacillus* 属細菌の DNA は接種前の時点で検出されなかった。 3.54×10^5 , 1.47×10^6 , 8.07×10^6 , and 1.31×10^8 *tuf* copies が接種後 2-4 週間後でそれぞれ検出された。NC1 の 4 サンプルでのみ検出があったが、それ以外の 5 サンプルと NC2 の塊茎からは *Paenibacillus* 属細菌の DNA は検出されなかった。Kruskal-Wallis test による検定では接種前から接種 4 週間後の定量結果には有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

Pa. polymyxa の DNA は接種前および接種 1-2 週間後の時点で検出されなかった。その後、接種 3 週間後の時点では 4 サンプルで非検出だったが残り 5 サンプルでは検出され、全体の平均は 1.08×10^6 *tuf* copies が検出されるという結果となった。さらに接種 4 週間後の時点では全サンプルにおいて検出され 4.35×10^6 *tuf* copies が検出された。Kruskal-Wallis test による検定では接種前から接種 4 週間後の定量結果には有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

4. 考察

本研究では、疫病菌と *Pa. polymyxa* 株をジャガイモ塊茎スライスに共接種することで、*Pa. polymyxa* が塊茎腐敗に与える影響を調査した。疫病菌と *Pa. polymyxa* 株を共接種した場合、*Pa. polymyxa* 株を接種した部位に軟化腐敗の発生が認められた。一方、疫病菌のみを接種した場合、ジャガイモ疫病による塊茎腐敗の典型的な病徴である組織の褐変が発生したが、細菌性腐敗の発生は認められなかった。*Pa. polymyxa* 株のみを接種した場合には、軟化腐敗とは異なる変化が見られた。腐敗組織からの滲出液の定量結果を比較したところ、疫病菌を接種しなかった場合と比べて、共接種をした場合の方が滲出液が多いことが考えられた。これらの結果から、疫病菌に感染した塊茎において *Pa. polymyxa* が増殖すると、軟化腐敗を引き起こし、塊茎の腐敗を助長することが考えられる。また、Agrios (2005) は、軟化腐敗に伴う滲出液は二次伝染源として機能し他の塊茎への伝搬の役割を果たすことを指摘している。本調査で観測した滲出液も同様の役割を果たし、腐敗の被害拡大を招く可能性がある。疫病に罹病した塊茎に健全な塊茎が接触してもほとんど伝播しないこと (Sato, 1980) や塊茎表面に傷がなければ遊走子の懸濁液を接種しても発病しないこと (Osawa et al. 2018) が報告されている。そのため、本研究で観察された滲出液が疫病菌の伝播に寄与する可能性は低いと考えられる。したがって、*Pa. polymyxa* によって引き起こされる腐敗に伴う滲出液の発生が、一般的な病原性細菌による腐敗同様に伝播を引き起こすかはさらなる調査を要する。

Pa. polymyxa 株の代わりに、ジャガイモ塊茎に接種しても腐敗を引き起こさない腐生菌と考えられる 1 菌株 (HMB-009) を接種した場合には、塊茎組織の軟化腐敗は発生せず、ネガティブコントロールとして処理した滅菌水の場合と同様の結果となった。したがって、*Ph. infestans* と *Pa. polymyxa* の共接種による軟化腐敗は、ジャガイモ疫病菌によって弱ったもしくは死んだジャガイモ塊茎組織の腐生菌による

分解ではなく、疫病菌に感染した塊茎において *Pa. polymyxa* が引き起こす二次的な腐敗の進行であると考えられる。

疫病菌に感染した塊茎では、細菌の増殖が起こることが示唆された。*Pa. polymyxa* の検出され始めた時期は、疫病菌の接種 3-4 週間後からであり、細菌性腐敗の発生時期も同時期から観察された。疫病菌を接種しなかった塊茎では、疫病菌を接種した塊茎と比較して検出された細菌は少なく、また、*Pa. polymyxa* は検出されなかった。したがって、疫病に罹患した塊茎では *Pa. polymyxa* が増加することが考えられた。他の多くの細菌は腐敗の発生や進行に関係しない可能性があるが、*Pa. polymyxa* は、疫病菌感染に伴う塊茎の抵抗性反応の減少などの好適な条件下で増殖し、腐敗を引き起こすことが考えられる。

Pa. polymyxa の病原性について、ニンジン由来の分離株がペクチン分解活性を有することが報告されている (Thelma et al. 2025)。しかし、ジャガイモから分離された本細菌が、ジャガイモ塊茎の腐敗に関与することが示された報告はない。

塊茎組織の軟化腐敗を引き起こす植物病原微生物として、*Pectobacterium* 属細菌や *Dickeya* 属細菌が軟腐病菌としてよく研究されている (Charkowski, 2018)。しかし、ジャガイモ疫病菌に感染し、その後軟化腐敗した塊茎からは軟腐病菌は分離されなかった (吉田, 2023(修論))。

Pa. polymyxa の塊茎腐敗を引き起こす能力は、*Pectobacterium* 属細菌のような病原菌と比べると低いかもしれないが、二次被害を引き起こすという点で大きな損失をもたらす可能性がある。塊茎腐敗による損失を抑えるために、*Pa. polymyxa* のような細菌についても研究を行い、防除方法について検討する必要がある。本研究は、*Pa. polymyxa* が *Ph. infestans* による塊茎腐敗を助長する細菌として活動することを示した。本細菌が腐敗を引き起こすメカニズムや増殖するための詳細な条件については今後のさらなる調査を要する。日本ではポストハーベスト農薬の使用が認め

られていないため，効果的なポストハーベスト処理が求められる．貯蔵期間中に生じる腐敗を防除するために，*Pa. polymyxa* の生態の解明が必要である．

表 3-1 本研究で供試した菌株

分類	菌株名	分離年	分離源	分離ジャガイモ品種*
疫病菌				
<i>Phytophthora infestans</i>				
	MR2304	2023	北海道芽室町	スノーデン（茎葉）
細菌				
<i>Paenibacillus polymyxa</i>				
	HuPp001 (MAFF212607)	2022	北海道札幌市	男爵いも（Irish cobbler）
	HuPp002 (MAFF212608)	2021	北海道札幌市	男爵いも（Irish cobbler）
	HuPp003 (MAFF212609)	2021	北海道札幌市	男爵いも（Irish cobbler）
腐敗塊茎由来腐生細菌				
	HMB-009	2023	北海道芽室町	トヨシロ

* 分離部位の記載がないものについては，腐敗塊茎組織から分離された菌株である．

表 3-2 RyeB agar の組成

ライ麦種子	125 g
スクロース	20 g
寒天	15 g
純水	1 L

表 3-3 Tryptic soy agar (TSA) の組成

Tryptic Soy Broth (MP Biomedicals)	30 g
寒天	15 g
純水	1 L

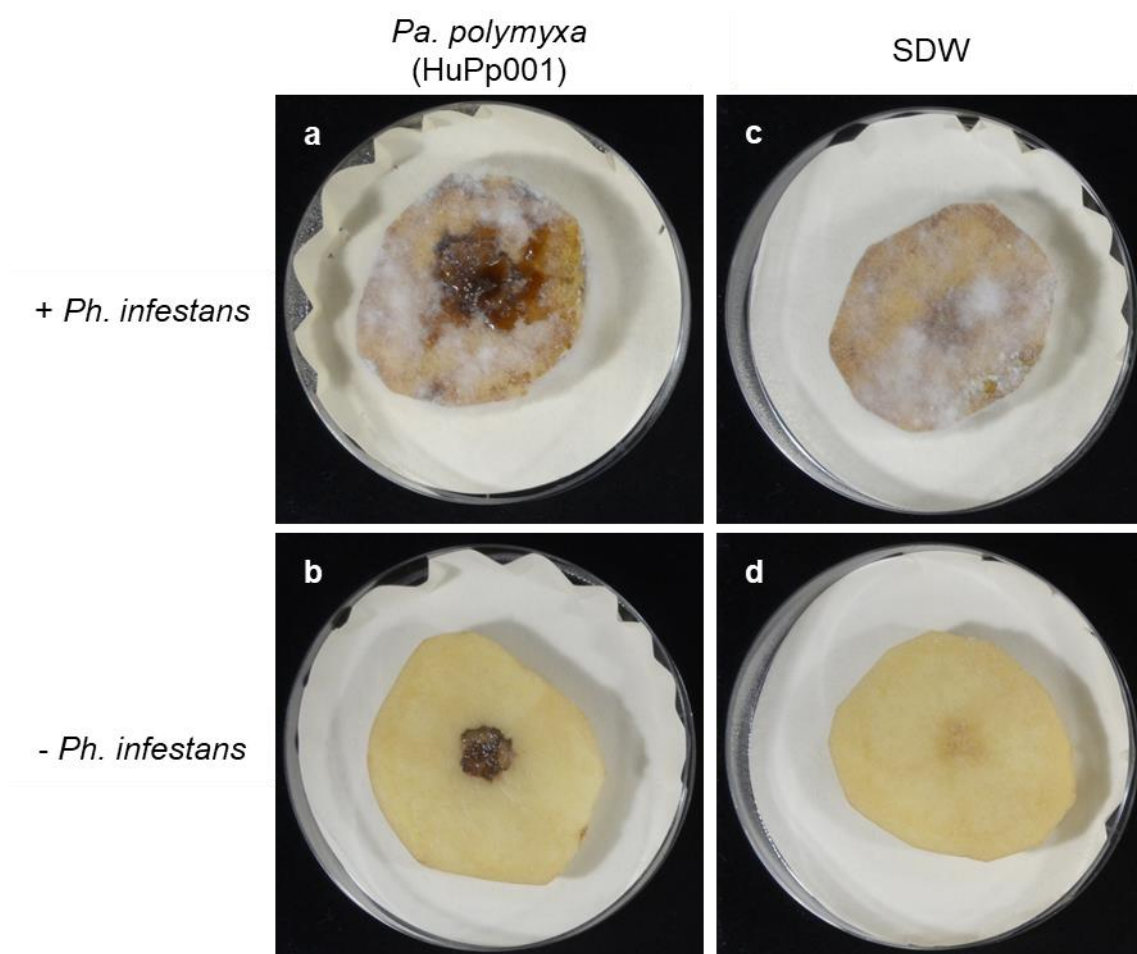


図 3-1 塊茎スライスへの接種試験の結果. 例として, HuPp001 を供試した結果を示した. 他 2 菌株 (HuPp002 と HuPp003) も同様の結果だった. 本結果は *Pa. polymyxa* 分離株を接種してから 3 日後 (*Ph. infestans* 分離株の接種から数えて 8 日後) に記録した. **a** *Ph. infestans* と HuPp001 の共接種した場合, **b** HuPp001 のみを接種した場合, **c** *Ph. infestans* のみを接種した場合, **d** ネガティブコントロールとして滅菌蒸留水を処理した場合

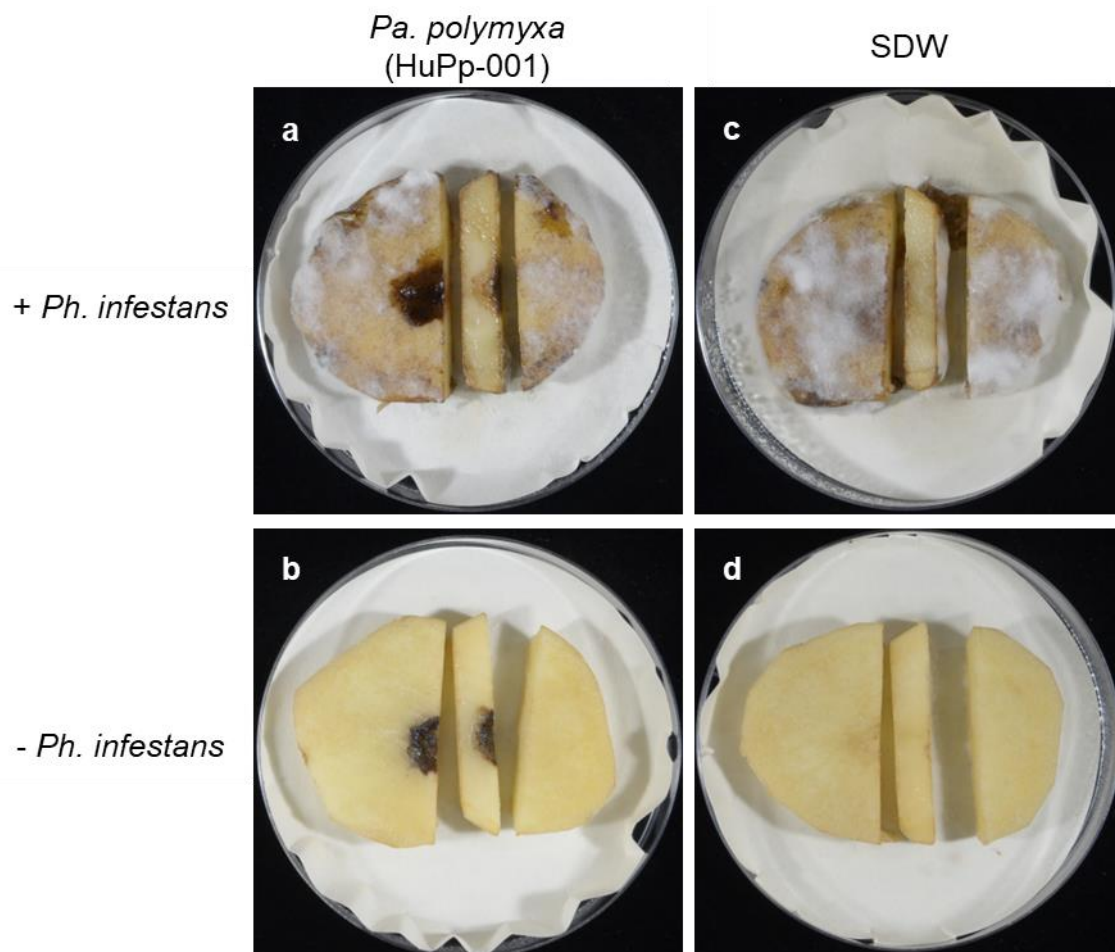
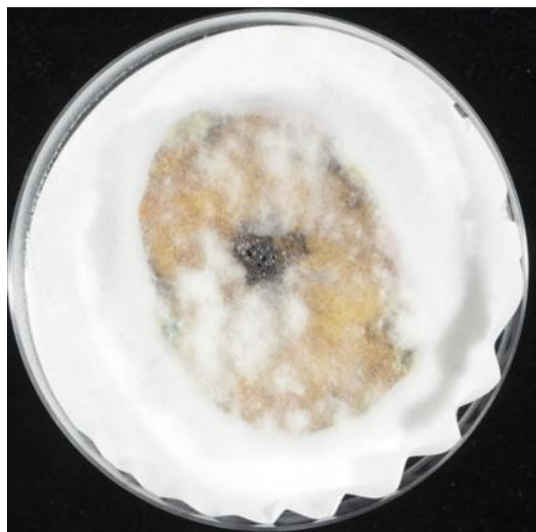


図 3-2 塊茎スライスへの接種試験の結果 (断面). 例として, HuPp001 を供試した結果を示した. 他 2 菌株 (HuPp002 と HuPp003) も同様の結果だった. 本結果は *Pa. polymyxa* 分離株を接種してから 3 日後 (*Ph. infestans* 分離株の接種から数えて 8 日後) に記録した. **a** *Ph. infestans* と HuPp001 の共接種した場合, **b** HuPp001 のみを接種した場合, **c** *Ph. infestans* 飲みを接種した場合, **d** ネガティブコントロールとして滅菌蒸留水を処理した場合

Pa. polymyxa
(HuPp001)



HMB-009

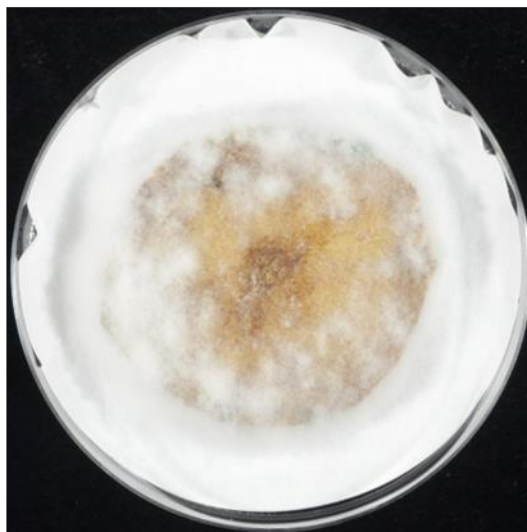


図 3-3 塊茎スライスへの接種試験の結果 (HuPp001 (左) と腐生菌株 (右)との比較)

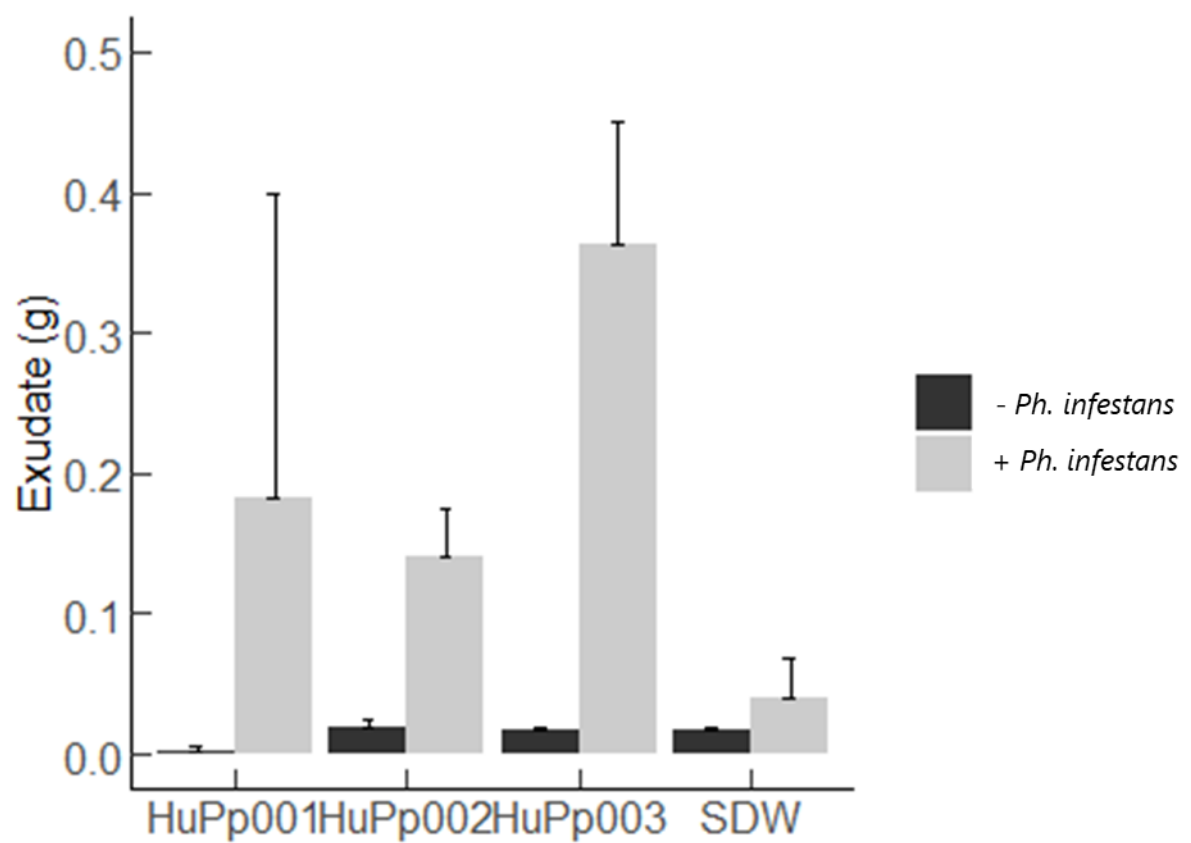


図 3-4 腐敗組織から漏出した滲出液重量の定量結果 (n = 6, mean + SD). 疫病菌を接種しなかった場合の定量結果 (各左のグラフ)と疫病菌を接種した場合の定量結果 (各右のグラフ). ネガティブコントロールとして滅菌蒸留水を処理した

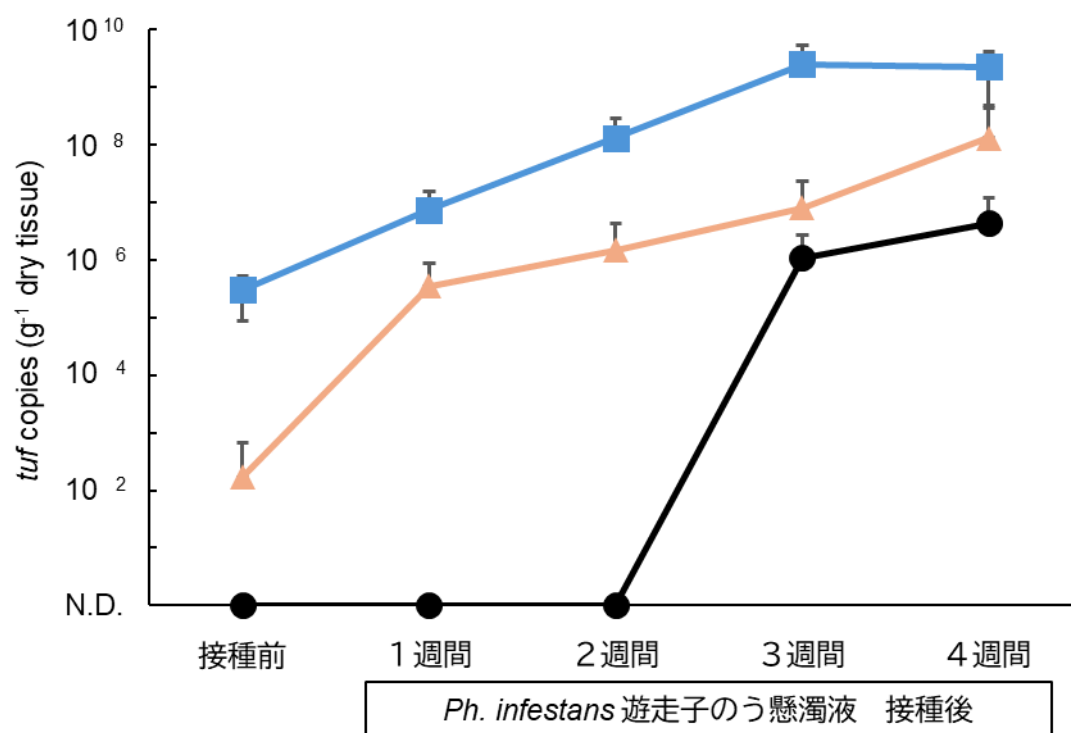


図 3-5 疫病菌に感染した塊茎内の細菌定量の結果 (n = 9, mean ± SD). *Pa. polymyxa* の定量結果 (●), *Paenibacillus* 属細菌の定量結果 (▲), 細菌全体の定量結果 (■) でそれぞれ示した

第4章 貯蔵中に塊茎腐敗を引き起こす細菌

1. 背景

加工用などのジャガイモ塊茎は収穫後すぐには出荷・消費されず，一定期間の貯蔵を経ることがある．貯蔵期間中に，様々な原因により塊茎腐敗が発生することがある．貯蔵庫内での腐敗の発生頻度は，貯蔵塊茎の 5 - 10% 程度と考えられている．現在の北海道で発生する貯蔵腐敗の原因の一つは *Fusarium oxysporum* や *F. avenaceum* による乾腐病あることが示唆された (川原ら, 2023; 塩平, 2021 (修論))．しかしながら，腐敗塊茎のうち，乾腐病とは明らかに病徴が異なる，細菌によるものと思われる腐敗も散見されていたが，これらの原因については知見が少ない．複数の *Pectobacterium* 属細菌によるジャガイモ軟腐病や *Clostridium* sp. によるジャガイモ粘性腐敗病が登録されているが，近年の塊茎腐敗，特に貯蔵期間中に発生する塊茎腐敗の原因を調査した報告はされていない．また，塊茎腐敗には *Pectobacterium* 属細菌のような既知の植物病原細菌のみならず，第3章で示したように *Paenibacillus polymyxa* などの細菌が関与することが近年の研究により示唆された．*Pa. polymyxa* のような細菌はこれまでに病原菌もしくは塊茎腐敗に関与する細菌とは認識されていなかったと思われる．第3章で実施した塊茎腐敗の再現実験による調査だけでなく，実際に貯蔵庫で発生した腐敗塊茎からも本細菌が分離されることや塊茎腐敗の発生への関与を調査することで塊茎腐敗の発生原因を特定する一助になると考えた．本研究では，日本国内におけるジャガイモの主要産地である北海道と九州で発生した腐敗塊茎を収集して細菌を分離し，塊茎腐敗を引き起こす細菌を調査した．

2. 方法

4.2.1 腐敗塊茎の収集

日本各地（北海道（オホーツク総合振興局，十勝振総合興局および日高振興局），鹿児島県）で生産され，貯蔵中に腐敗した塊茎を収集した．腐敗塊茎の収集は，カルビーポテト株式会社の協力のもと行われた．

4.2.2 腐敗塊茎からの細菌の分離

本調査では，腐敗塊茎のうち，軟化腐敗症状を呈していたものから細菌の分離を試みた．細菌の分離を試みた塊茎の例および貯蔵庫内の塊茎を図 4-1 に示した．腐敗塊茎の罹病部と健全部の境界の組織を切り出し，70%エタノールで表面殺菌した．300 μ l 程度の滅菌水中でペッスルを用いて破碎して懸濁させた．白金耳の先端を懸濁液に浸け，懸濁液を TSA に画線し，27°C で 24-48 時間培養した．また，懸濁液を 80°C で 10 分間加熱した後，懸濁液 100 μ l を TSA に塗布し，27°C で 24-48 時間培養した．加熱する操作は，*Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌を分離するために実施した．生育したシングルコロニーを釣菌して新しい TSA に移植した．さらに生育したシングルコロニーを斜面培地で培養した後，菌体をかき取って凍結保存用培地に懸濁して凍結保存した．

4.2.3 ジャガイモへの人工接種

TSA 上で培養した細菌株のシングルコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し，ジャガイモ塊茎スライスに穿刺接種した．ジャガイモは皮をむき，厚さ 5 mm 程度に切り出し，15 分間流水洗浄した後，30 分間風乾してから使用した．接種した塊茎スライスは，濡らしたペーパータオルと化学カイロと共に密閉容器に入れて 27°C で 24 時間培養した後に観察した．

4.2.4 塩基配列の解析と系統解析

分離菌株の DNA 抽出を NucleoSpin Microbial DNA を用いて行った. 抽出した DNA をテンプレート DNA として供試し, PCR による標的遺伝子の増幅を行った. PCR の反応液組成, 使用したプライマーおよび反応条件を表 4-1A, 4-2 および 4-3 にそれぞれ記載した. 反応条件は, 使用したプライマーの引用元に記載された条件をもとに, 修正し, 最終的に適用した条件を記載した. PCR 産物を TAE 1.0%アガロースゲルにアプライして電気泳動し, UV を照射して単一のバンドが検出されることを確認した. PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて精製し, 適当な濃度に希釈してプライマーと混合し, 塩基配列の解析に供試した. 得られた配列と NCBI より取得した塩基配列を用いて系統樹を作成した. 系統樹の作成には MEGAX を用いて, Jukes–Cantor model により maximum likelihood 法により作成した (Kumar et al. 2018).

4.2.5. 特異的 PCR による簡易同定

dnaX の配列に基づく系統解析により, *P. brasiliense* と *P. parmentieri* が優占グループであることが示唆されたため, 2024 年の調査ではこれらの 2 種を標的とした特異的 PCR による簡易同定を実施した. 4.2.4. と同様に分離菌株の DNA 抽出を行った. PCR の反応液組成, 使用したプライマーおよび反応サイクルを表 4-2A, 4-3 および 4-4 にそれぞれ記載した. PCR 産物を TAE 1.0%アガロースゲルにアプライして電気泳動し, UV を照射して単一のバンドが検出されるか確認した.

4.2.6 rep-PCR

4.2.4. と同様に分離菌株の DNA 抽出を行った. 抽出した DNA を 20 ng/μl となるように希釈してテンプレート DNA として供試し, rep-PCR を行った. rep-PCR の反応液組成, 使用したプライマーおよび反応条件を表 4-1B, 4-2 および 4-3 にそれぞれ

記載した．反応液の調製，使用したプライマーおよび反応条件は，Versalovic et al. (1991; 1994) および Rademaker (2004) に記載されたものに従った．rep-PCR 産物を TAE 2.0% アガロースゲルにアプライして，50V で 70 分間電気泳動した．その後，エチジウムブロマイドによる染色を行い，UV を照射して DNA を検出し，バンドパターンを確認した．

3. 結果

4.3.1 分離された菌株の分類

本調査で分離し，ジャガイモ塊茎に腐敗を引き起こした菌株を表 4-4 に示した．*Pectobacterium* 属細菌が 46 菌株，*Bacillus* 属細菌が 8 菌株，*Paenibacillus* 属細菌が 4 菌株であった．本研究で分離した菌株はジャガイモ塊茎スライスに穿刺接種され，ジャガイモ塊茎に対する病原性ないし腐敗を引き起こす能力があることが示された (図 4-2)．

16SrRNA 遺伝子や *dnaX* の塩基配列を基にした系統解析の結果，分離された菌株の大部分は，*Pectobacterium* 属細菌に分類された (図 4-3)．その中でも，*Pe. brasiliense* と *Pe. parmentieri* のいずれかを近縁種とする菌株が優占した．そのほか，分離頻度は比較的低かった (1-3 菌株) が，*Pe. carotovorum*，*Pe. odoriferum*，*Pe. punjabense* および *Pe. versatile* をそれぞれ近縁種とする菌株も分離された．また，一部の菌株について，*acnA*，*gapA*，*icdA* および *mdh* の 4 つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列を解析し，multilocus sequence analysis (MLSA) を行った．MLSA に基づき作成した系統樹 (図 4-4) は，*dnaX* の塩基配列を基にした系統解析の結果と概ね一致した．2023 年に分離された細菌株の数に比べて，2024 年に分離された細菌株の数が少なく，調査した細菌株すべてが特異的 PCR を用いた簡易同定により *P. brasiliense* に

分類された．PCR 産物の電気泳動結果を図 4-5 に示した．供試した 4 菌株から *Pe. brasiliense* に特異的なバンドが検出された．

分離した菌株には 16SrRNA 遺伝子の塩基配列を基にした系統解析の結果，*Bacillus* 属細菌と *Paenibacillus* 属細菌に分類される菌株が含まれていた．さらに *rpoB* の塩基配列を基にした系統解析により，*Bacillus* 属細菌株は，*B. altitudinis* または *B. safensis* が近縁種であること，*Paenibacillus* 属細菌は，*Pa. xylanexedens* を近縁種とする菌株であることが示された (図 4-6, 4-7)．

4.3.2 分離された *Pectobacterium* 属細菌株の遺伝的多様性

rep-PCR 産物を電気泳動し，そのバンドパターン（フィンガープリント）を確認した．その結果の例を図 4-8，図 4-9，図 4-10 および図 4-11 として示した．ERIC，BOX とともに異なるバンドパターンを示した．*P. parmentieri* においては ERIC について，600 bp 付近，1,000-1,500 bp の間の領域と 1,500 bp よりも大きい領域にそれぞれ供試菌株に共通するバンドが見られた (図 4-7)．一方で，1,000 bp 付近には一部の菌株にしか検出されないバンドが確認された．BOX について，ERIC に比べると類似したフィンガープリントが得られたが，1,500 bp 付近にバンドが検出された菌株とされなかった菌株とが混在し，一様なフィンガープリントではなかった (図 4-8)．*P. brasiliense* についても同様で，ERIC について共通するバンドが見られた一方で，1,500 bp 付近の領域にバンドが検出された菌株とされなかった菌株とが混在した (図 4-9)．供試菌株 11 のうち，9 菌株は 700 bp と 500 bp 付近にそれぞれ一本ずつ共通のバンドが検出されたが，残り 2 菌株 (HMB-003 と HTB-004) においてはこれらのバンドが検出されなかった．BOX についても，*P. parmentieri* と同様に，ERIC に比べると類似したフィンガープリントが得られた．ERIC 同様に HMB-003 と HTB-004 について，他の菌株からは検出された 1,000 bp と 800 bp 付近のそれぞれ一本ずつのバンドが検出されなかった．HMB-003 については 600 bp 付近に他の菌株から

は検出されなかったバンドが検出され、他のどの菌株とも異なるフィンガープリントが得られた。*P. odoriferum* は上記 2 種に近縁な菌株に比べて、菌株数が少なかったが、フィンガープリントに違いが見られた。ERIC について HMB-011 は他 2 菌株から検出された 1,000-1,500 bp の間の領域にある 2 本のバンド、200 bp と 300 bp 付近のバンドが検出されなかった。BOX について、HMB-011 は他の 2 菌株で検出された 1,500 bp よりも大きい領域のバンド 1 本が検出されなかった。本調査で分離された *P. carotovorum* は 1 菌株のみだったため、種内の比較はできないが、同時に泳動した *P. brasiliense* および *P. odoriferum* とは異なるバンドパターンを示した。REP についても前述の 2 配列と同様に、種内で共通するバンドが複数認められたが、バンドパターンは一樣ではなかった。具体的には、*Pe. parmentieri* については 1,000 bp および 1,000 – 1,500 bp の間にそれぞれバンドが検出される菌株とされない菌株が存在した。一部の菌株においては 700 – 800 bp 付近にバンドが検出された。*Pe. brasiliense* については ERIC および BOX と同様に全体的に類似するバンドパターンが得られたが、HMB-003 と HTB-004 が他とは異なるバンドパターンをそれぞれ示した。一方、*Pe. odoriferum* は ERIC および BOX を標的とした rep-PCR においては類似するバンドパターンを示したが、REP を標的とした rep-PCR においては 3 菌株とも異なるバンドパターンを示した。

4. 考察

ジャガイモ塊茎腐敗の原因を特定することを目的として、腐敗塊茎を収集し、病原菌の分離を行った。その結果、分離された細菌の多くが *Pectobacterium* 属細菌であった。その中でも、*Pe. parmentieri* と *Pe. brasiliense* が優占し、塊茎腐敗の主な原因であることが考えられた。Nakayama et al. (2021) は 2000 年以降に日本で収集されたジャガイモ黒あし病菌は、*Pe. wasabiae* (= *Pe. parmentieri*), *Pe. brasiliense* お

よび *Dickeya dianthicola* によって構成されることを明らかにした．本調査では *D. dianthicola* は分離されなかったが，*Pe. parmentieri* と *Pe. brasiliense* が優占しているという結果は一致したことから，この2種がジャガイモ生産における病害発生の一因になっていることが考えられる．2023年に分離された細菌株の数に比べて，2024年に分離された細菌株の数が少なかった．調査した塊茎の個数が極端に少なかったということではなく，単純な調査規模による違いではないと考えられる．本調査では細菌を標的として分離を行ったため，他の病原菌による腐敗の発生があり，それらを見逃していたことも考えられる．例えば，海外では *Globisporangium* 属菌 (= *Pythium* 属菌) が leak (rot) もしくは watery wound rot と呼ばれる塊茎の腐敗とそれによる被害が発生している (Ammar et al. 2017)．これは日本植物病名目録には登録されていない病気である．病徴として，軟化腐敗があげられている (Jones 1935; Blodgett and Ray 1945)．調査した腐敗塊茎に，これによるものが混ざっていたため，細菌培養用の培地では生育せず，検出できていなかったことが考えられる．実際に *Globisporangium* 属菌やその近縁属菌による塊茎腐敗が国内でも発生しているか，現時点では不明であり今後の調査を要する．調査した細菌株すべてが *P. brasiliense* に分類されたことは，2023年の調査結果と異なる点の一つである．しかし，優占グループの一つであることを踏まえると大きな矛盾はない．分離源となった塊茎の産地がいずれも鹿児島県であり，北海道を産地とする塊茎サンプルを多く含んだ2023年の調査との差として現れた可能性がある．すなわち，北海道と鹿児島県をはじめとする九州とでは塊茎腐敗を引き起こす病原細菌が異なる可能性が考えられる．本調査では分離することができた細菌株の数が北海道産塊茎に由来するものの方が多いため，一概に比較はできないため，今後の調査を要する．一方で塊茎腐敗の発生と，栽培中の病気の発生との因果関係ははっきりしておらず，今後調査を行う必要がある．分離源となった塊茎の産地や品種が同じ場合でも異なるフィンガープリン트가得られる菌株が分離されることがあった．そのため，塊茎腐敗を引き起こす

Pectobacterium 属細菌は地理的分布や品種とはあまり相関がなく、生産地や品種に関わりなく、多様な本属細菌による被害を受けうるということが考えられる。また、MLSA による系統解析では、*P. parmentieri* に近縁な菌株は、解析した塩基配列において 2-3 塩基の違いのみであり、type strain と比較しても、ほとんど同様であると考えられた。しかし、他の種に近縁な菌株は、type strain とより大きな差が認められた。そのため、ゲノム解析などを用いたより詳細な解析を行うなどにより、我が国で発生するジャガイモ塊茎腐敗を引き起こす *Pectobacterium* 属細菌の分類についての調査を要する。また、*dnaX* に基づく系統解析と MLSA による系統解析との結果が概ね一致した。このことから、今後の調査においては *dnaX* を用いた系統解析によりある程度正確な分類群の決定ができることが考えられる。Ma et al. (2018) の報告でも同様の結果が得られており、これを結果を支持する。

また、第 3 章に記載した *Paenibacillus polymyxa* と同属の細菌および近縁な属である *Bacillus* 属細菌も分離された。実際の貯蔵施設においても、何らかの原因によって、*Paenibacillus* 属や *Bacillus* 属細菌が塊茎内で増殖し、腐敗を助長することが可能な条件が形成されていることが考えられた。本調査においては疫病菌の検出はされなかったため、これらの細菌が増殖するための一次的な要因は他にあることも考えられる。本調査では、*Fusarium* 属菌と思われる糸状菌も分離されており、本菌と他の細菌株が同じ塊茎から分離された例もあった。そのため、*Fusarium* 属菌による腐敗が *Paenibacillus* 属や *Bacillus* 属細菌の増殖や腐敗につながるか検証することで、貯蔵腐敗の発生生態の解明につながる可能性がある。

本研究により、日本国内で発生する塊茎腐敗には *Pectobacterium* 属細菌を主として多様な細菌が関与することが示唆された。日本国内でジャガイモの病原菌として知られている *Pe. brasiliense*, *Pe. carotovorum* や *Pe. parmentieri* が分離されたことに加えて、*Pe. odoriferum*, *Pe. punjabense*, *Pe. versatile*, *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌が分離されたことから考えると、現在認識されているよりも多様な微生物が

塊茎腐敗に関与することも想定される．本調査では2年間の調査に留まったが，継続した調査が必要である．*Pectobacterium* 属細菌が重要な病原菌であることは勿論，第3章で述べた通り，*Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属細菌も塊茎腐敗を助長する存在として重要な役割を担っていることが考えられる．これらの微生物とそれらによる塊茎腐敗の発生生態を解明することが必要である．

表 4-1

A. 1 サンプルあたりの PCR の反応液組成 (単位: μl)

10× <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg^{2+} free)	2.0
MgCl_2 (25 mM)	1.6
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.6
Primer1 (5 μM)	1.0
Primer2 (5 μM)	1.0
<i>Takara Ex Taq</i> (5U/ μl)	0.1
滅菌水	11.7
テンプレート DNA	1.0
合計	20.0

B. rep-PCR の反応液組成 (単位: μl) (Rademaker et al. 2004)

5×Gitschier buffer ^a	4.00
20 mg/ml BSA	0.16
DMSO	2.00
Primer1	0.40
Primer2	0.40
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.00
<i>Takara Ex Taq</i> (5U/ μl)	0.20
滅菌水	11.04
テンプレート DNA	0.80
合計	20.0

^a 5×Gitschier buffer は, 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 830 μl , 1M Tris-HCl (pH8.0) 3.35 ml, 1M MgCl_2 335 μl , 0.005M EDTA (pH8.0) 67 μl , メルカプトエタノール 107 μl および滅菌水 5.311 ml を混合して調製した.

表 4-2 本章で使したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	標的	引用
s8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16SrRNA	Turner et al. (1999)
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA		
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
800R	TACCAGGGTATCTAATCC		Fukuda et al. (2017)
dnaX-F	TATCAGGTYCTTGCCCGTAAGTGG	dnaX	Sławiak et al. (2009)
dnaX-R	TCGACATCCARCGCYTTGAGATG		
acnA3F	CMAGRGTRTTRATGCARGAYTTTAC	acnA	
acnA3R	GATCATGGTGGTGTGSGARTCVGT		
gapA326F	ATCTTCCTGACCGACGAAACTGC	gapA	Ma et al. (2007)
gapA845R	ACGTCATCTTCGGTGTAAACCCAG		
icdA400F	GGTGGTATCCGTTCTCTGAACG	icdA	
icdA977R	TAGTCGCCGTTTCAGGTTCATACA		
mdh2	GCGCGTAAGCCGGGTATGGA	mdh	Moleleki et al. (2013)
mdh4	CGCGGCAGCCTGGCCCATAG		
rpoB-F	ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACAT	rpoB	Mohkam et al. (2016)
rpoB-R	ACACCCTTGTTACCGTGACGACC		
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	BOX	Versalovic et al. (1994)
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	ERIC	
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
REP1R	IIICGICGICATCIGGC	REP	Versalovic et al. (1991)
REP2L	ICGICTTATCIGGCCTAC		

プライマー名	配列 (5'-3')	標的	引用
BR1f	GCGTGCCGGGTTTATGCACT	<i>Pe. brasiliense</i>	Duarte et al. (2004)
L1r	CAAGGCATCCACCGT		
PW7011F	CTATGACGCTCGCGGGTTGCTGTT	<i>Pe. wasabiae</i> (= <i>Pe parmentieri</i>)	Kim et al. (2011)
PW7011R	CGGCGGCGTAGTGGAAGTC		

表 4-3 PCR 反応条件

プライマーセット	反応条件
s8F	
800R	
515F	94°C 10 分, (94°C 30 秒, 54°C 45 秒, 72°C 1 分) × 25 cycles, 72°C 10 分, 4°C ∞
1492R	
dnaX-F	
dnaX-R	94°C 3 分, (94°C 1 分, 59°C 1 分, 72°C 1 分) × 30 cycles, 72°C 5 分, 4°C ∞
acnA3F	
acnA3R	
gapA326F	
gapA845R	
icdA400F	94°C 30 秒, (94°C 30 秒, 52°C 30 秒, 72°C 1 分) × 30 cycles, 72°C 7 分, 4°C ∞
icdA977R	
mdh2	
mdh4	
rpoB-F	
rpoB-R	95°C 3 分, (95°C 20 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1.5 分) × 35 cycles, 72°C 5 分, 4°C ∞
BOXA1R	94°C 4 分, (94°C 3 秒, 92°C 30 秒, 55°C 1 分, 65°C 8 分) × 30 cycles, 65°C 8 分, 4°C ∞
ERIC1R	
ERIC2	94°C 4 分, (94°C 3 秒, 92°C 30 秒, 55°C 1 分, 65°C 8 分) × 30 cycles, 65°C 8 分, 4°C ∞
REP1R	
REP2L	94°C 4 分, (94°C 3 秒, 92°C 30 秒, 40°C 1 分, 69°C 8 分) × 35 cycles, 69°C 8 分, 4°C ∞

プライマーセット	反応条件
BR1f L1r	94℃2 分, (94℃45 秒, 62℃45 秒, 72℃1.5 分) ×25 cycles, 72℃10 分, 4℃∞
PW7011F PW7011R	94℃5 分, (94℃1 分, 67℃30 秒, 72℃1 分) ×35 cycles, 72℃7 分, 4℃∞

表 4-4 本研究で分離した細菌株

分類 ^a	菌株名	分離年	採取地	分離ジャガイモ品種
<i>Pe. parmentieri</i> (= <i>Pe. wasabiae</i>)	HHB-001	2023	北海道平取町	キタヒメ
	HHB-002	2023	北海道平取町	キタヒメ
	HHB-003	2023	北海道平取町	キタヒメ
	HHB-005	2023	北海道平取町	キタヒメ
	HIB-003	2023	北海道池田町	トヨシロ
	HKB-001	2023	北海道小清水町	ポロシリ
	HMB-002	2023	北海道芽室町	トヨシロ
	HMmB-001	2023	北海道大空町	ポロシリ
	HMmB-003	2023	北海道大空町	ポロシリ
	HOB-007	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HOB-008	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HOB-011	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HObB-001	2023	北海道帯広町	トヨシロ
	HObB-004	2023	北海道帯広町	トヨシロ
	HTB-001	2023	北海道北見市	オホーツクチップ
	HTB-003	2023	北海道北見市	オホーツクチップ
	HTsB-005	2023	北海道津別町	スノーデン
	HTsB-006	2023	北海道津別町	ポロシリ
	HTsB-007	2023	北海道津別町	ポロシリ

分類 ^a	菌株名	分離年	採取地	分離ジャガイモ品種
<i>Pe. brasiliense</i>				
(= <i>Pe. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>)				
	HHB-004	2023	北海道平取町	キタヒメ
	HIB-001	2023	北海道池田町	トヨシロ
	HIB-002	2023	北海道池田町	トヨシロ
	HIB-005	2023	北海道池田町	トヨシロ
	HMB-003	2023	北海道芽室町	トヨシロ
	HMB-005	2023	北海道芽室町	トヨシロ
	HTB-004	2023	北海道北見市	トヨシロ
	HTB-005	2023	北海道北見市	トヨシロ
	HOB-001	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HOB-003	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HOB-010	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HHB-24001	2024	北海道平取町	キタヒメ
	KKB-24001	2024	鹿児島県	トヨシロ
	KKB-24002	2024	鹿児島県	トヨシロ
	KKB-24003	2024	鹿児島県	オホーツクチップ
<i>Pe. odoriferum</i>				
(= <i>Pe. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>)				
	HMB-011	2023	北海道芽室町	トヨシロ
	HTsB-001	2023	北海道津別町	スノーデン
	HTsB-002	2023	北海道津別町	スノーデン

分類 ^a	菌株名	分離年	採取地	分離ジャガイモ品種
<i>Pe. carotovorum</i> (= <i>Pe. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>)				
	HMB-012	2023	北海道芽室町	トヨシロ
	KKB-007	2023	鹿児島県	ポロシリ
<i>Pe. punjabense</i>				
	HTsB-003	2023	北海道津別町	スノーデン
<i>Pe. versatile</i>				
	HTsB-004	2023	北海道津別町	スノーデン
	KKB-008	2023	鹿児島県	ポロシリ
<i>Bacillus</i> spp.				
	HOB-002	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HOB-009	2023	北海道大空町	トヨシロ
	KKB-001	2023	鹿児島県	トヨシロ
	KKB-002	2023	鹿児島県	トヨシロ
	KKB-003	2023	鹿児島県	トヨシロ
	KKB-004	2023	鹿児島県	オホーツクチップ
	KKB-005	2023	鹿児島県	オホーツクチップ
	KKB-006	2023	鹿児島県	不明
<i>Paenibacillus</i> spp.				
	HHB-007	2023	北海道平取町	キタヒメ
	HOB-004	2023	北海道大空町	トヨシロ
	HOB-005	2023	北海道大空町	トヨシロ

分類 ^a	菌株名	分離年	採取地	分離ジャガイモ品種
<i>Paenibacillus</i> spp. (続き)				
	HOB-006	2023	北海道大空町	トヨシロ

a 分離菌株の分類は，16S rRNA 遺伝子または *dnaX* 配列に基づく系統解析または種特異的プライマーを用いた PCR による検定により行った．

表 4-5 系統樹の作成に用いた塩基配列のアクセッションナンバー (*Pectobacterium* spp. および *Dickeya chrysanthemi*)

菌株名	<i>dnaX</i>	<i>acnA</i>	<i>gapA</i>	<i>icdA</i>	<i>mdh</i>
<i>Pe. actinidiae</i> KKH3	NZ_JRMH010000 01.1	JRMH01000001	JRMH01000001	JRMH01000001	JRMH01000001
<i>Pe. atrosepticum</i> CFBP 1526	MK516904.1	JN600333.1	JN600336	JN600339	JN600342
<i>Pe. betavascularum</i> CFBP 2122	MT683936.1	JN600334	JN600337	JN600340	JN600343
<i>Pe. brasiliense</i> CFBP 6617	MK516956.1	NZ_JACGFN0000 00000	NZ_JACGFN0000 00000	NZ_JACGFN0000 00000	NZ_JACGFN0000 00000
<i>Pe. carotovorum</i> DSM 30168	NZ_FQWI010000 03.1				
<i>Pe. carotovorum</i> ATCC 15713		FJ895848.1	FJ895849	FJ895850.2	FJ895851
<i>Pe. odoriferum</i> NCPPB 3839	NZ_JQOG010000 02.1				
<i>Pe. odoriferum</i> CFBP 1878		JF926763	JF926773	JF926783	JF926793
<i>Pe. punjabense</i> CFBP 8604	MK516877.1				
<i>Pe. parmentieri</i> CFBP 8475	MK516972.1				
<i>Pe. parmentieri</i> RNS 08-42-1A		NZ_CP015749	NZ_CP015749	NZ_CP015749	NZ_CP015749
<i>Pe. versatile</i> CFBP 6051	NZ_RMBU010000 18.1				
<i>Pe. wasabiae</i> CFBP 3304	MK516922.1	JN600335	CP015750.1	CP015750.1	CP015750.1
<i>Dickeya chrysanthemi</i> NCPPB 402	NZ_CM001974	NZ_CM001974	NZ_CM001974	NZ_CM001974	NZ_CM001974

本表に記載した菌株はいずれも各種の **type strain** として登録されている菌株である. *Pe. carotovorum* および *Pe. parmentieri* については, 1 菌株のみで必要な配列を得ることができなかったため 2 菌株を用いたがいずれも **type strain** として登録されている菌株である

表 4-6 系統樹の作成に用いた塩基配列のアクセッションナンバー (*Bacillus* spp. および *Paenibacillus* spp.)

菌株名	<i>rpoB</i>
<i>B. altitudinis</i> 41KF2b	NZ ASJC01000012.1
<i>B. pumilus</i> ATCC7061	NZ VKPY01000009.1
<i>B. safensis</i> FO-36b	NZ CP010405.1
<i>B. sonorensis</i> NBRC 101234	NZ_BCVZ01000020.1
<i>B. subtilis</i> DSM 10	NZ_CP120681.1
<i>B. xiamenensis</i> HYC-10	NZ_AMSH01000009.1
<i>Pa. amylolyticus</i> NBRC 15957	NZ BIMJ01000042.1
<i>Pa. brasilensis</i> DSM 14914	NZ JAUSWA010000033.1
<i>Pa. graminis</i> DSM 15220	NZ CP009287.1
<i>Pa. illinoisensis</i> NBRC 15959	NZ BIME01000018.1
<i>Pa. pabuli</i> NBRC 13638	NZ BCNM01000033.1
<i>Pa. peoriae</i> KCTC 3763	HE972656.1
<i>Pa. polymyxa</i> DSM 36	NZ CP049783.1

本表に記載した菌株はいずれも各種の type strain として登録されている菌株である

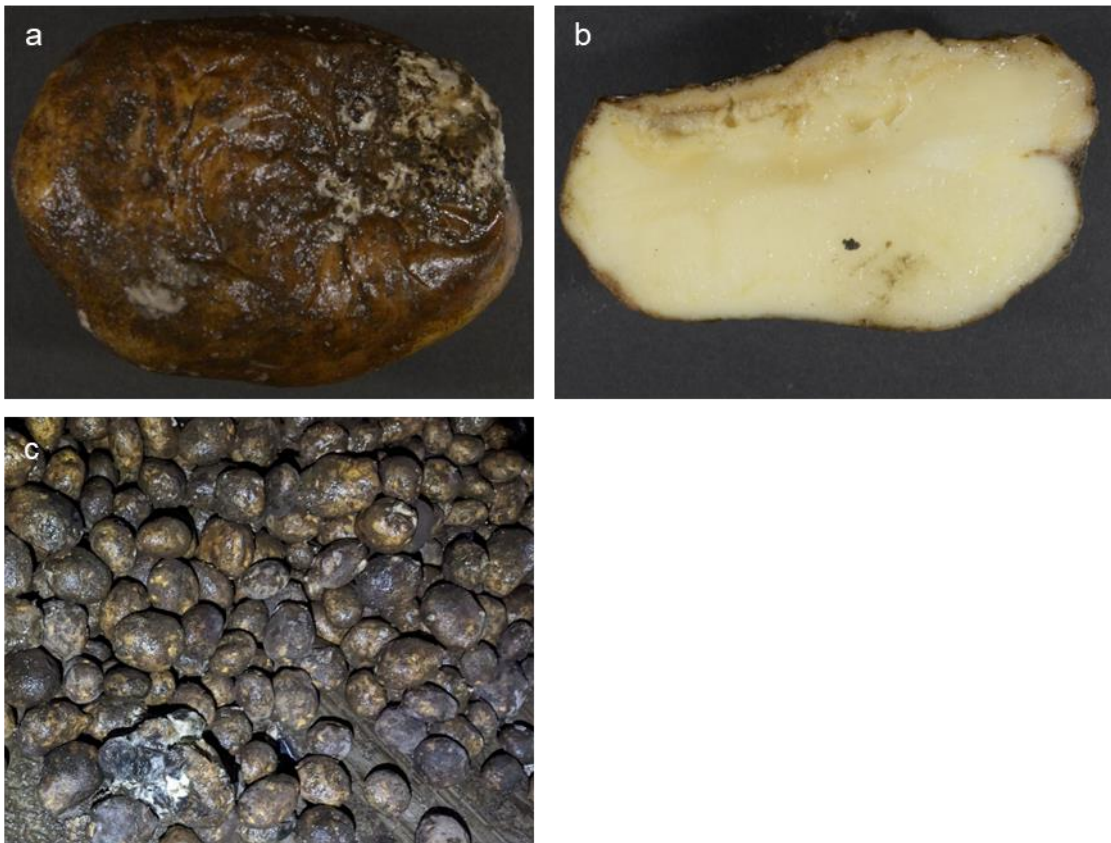


図 4-1 細菌を分離するために使用した腐敗塊茎の例. **a** 腐敗塊茎の表面, **b** 腐敗塊茎の断面, **c** 貯蔵庫内の塊茎

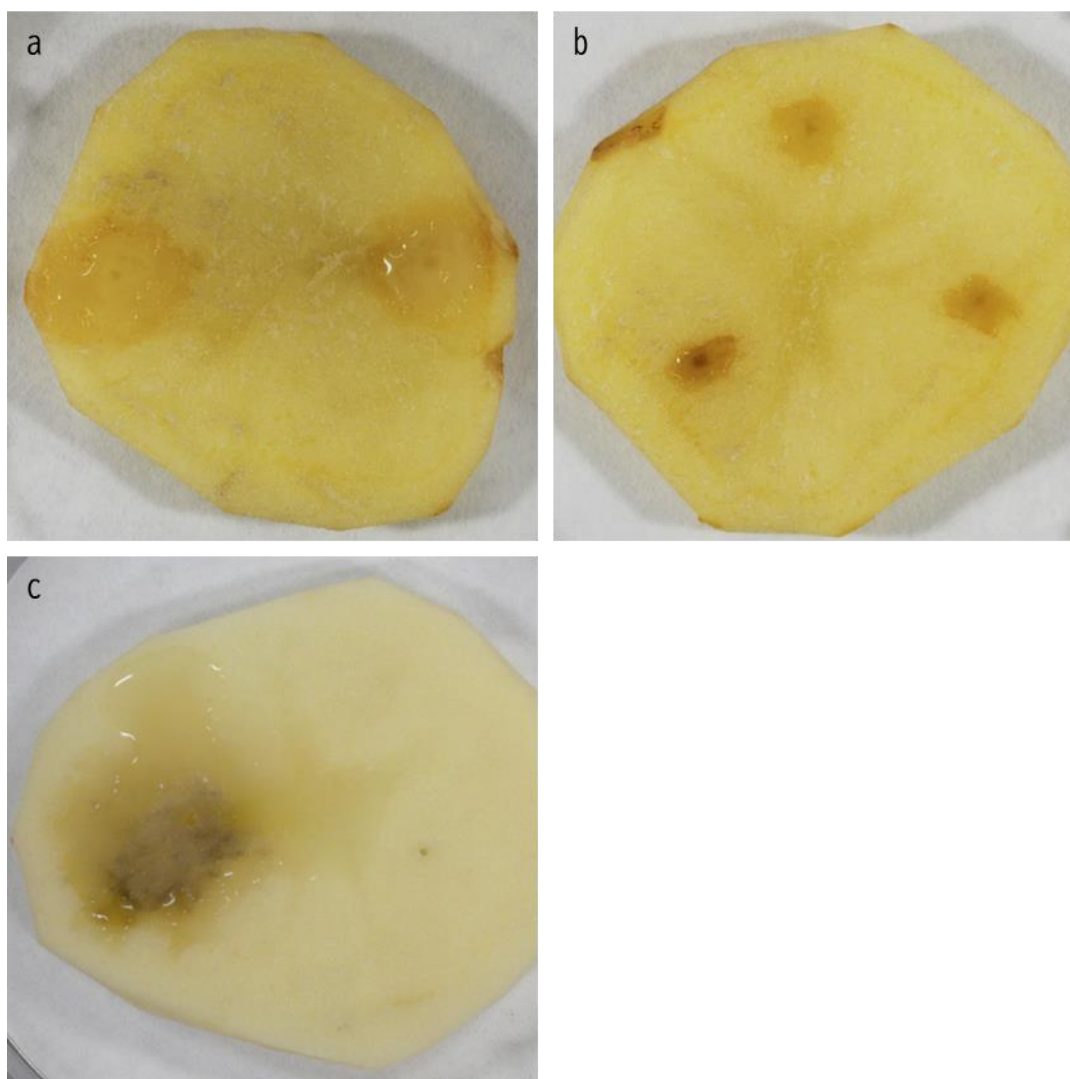


図 4-2 分離細菌株の接種結果の例. **a** *Pectobacterium* 属細菌を接種した時の例, **b** *Paenibacillus* 属細菌を接種した時の例, **c** *Bacillus* 属細菌を接種した時の例

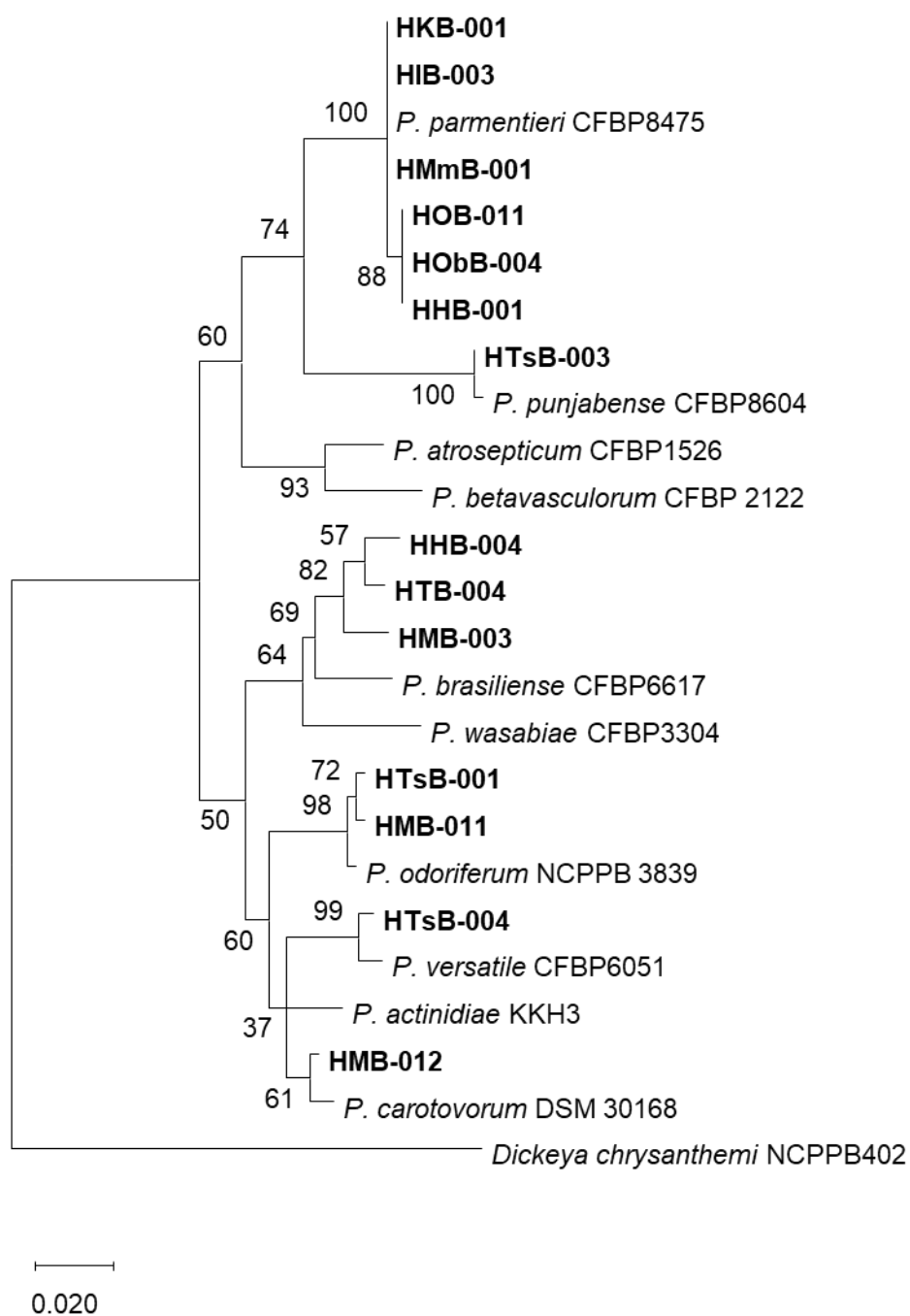


図 4-3 *dnaX* の塩基配列に基づく *Pectobacterium* 属細菌の系統樹 (492 bp). 本研究で分離した菌株を太字で示した. 本研究で分離した菌株以外は全て各種の type strain の配列データを NCBI から取得して系統樹の作成に用いた. 系統樹の作成に用いた塩基配列のアクセッションナンバーを表 4-5 に示した. 外群として *Dickeya chrysanthemi* NCPPB 402 の塩基配列を用いた

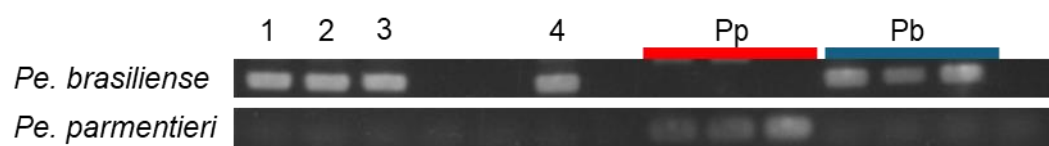


図 4-5 種特異的な PCR の PCR 産物の電気泳動結果. **1** KKB-24001, **2** KKB-24002, **3** KKB-24003, **4** HHB-24001, **Pp** *Pe. parmentieri*, **Pb** *Pe. brasiliense*

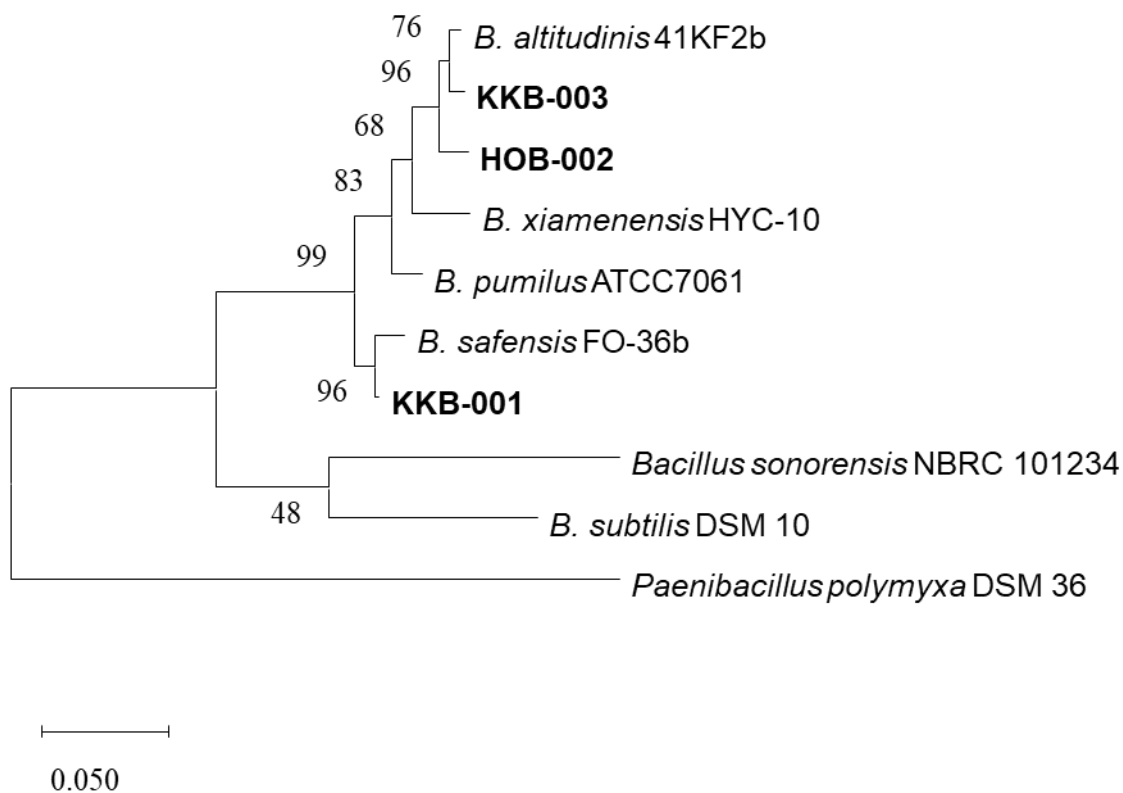


図 4-6 *rpoB* の塩基配列 (1137 bp) に基づく系統樹 (*Bacillus* spp.). 本研究で分離した菌株を太字で示した. 本研究で分離した菌株以外は全て各種の type strain の配列データを NCBI から取得して系統樹の作成に用いた. 系統樹の作成に用いた塩基配列のアクセッションナンバーを表 4-6 に示した. 外群として *Paenibacillus polymyxa* DSM 36 の塩基配列を用いた

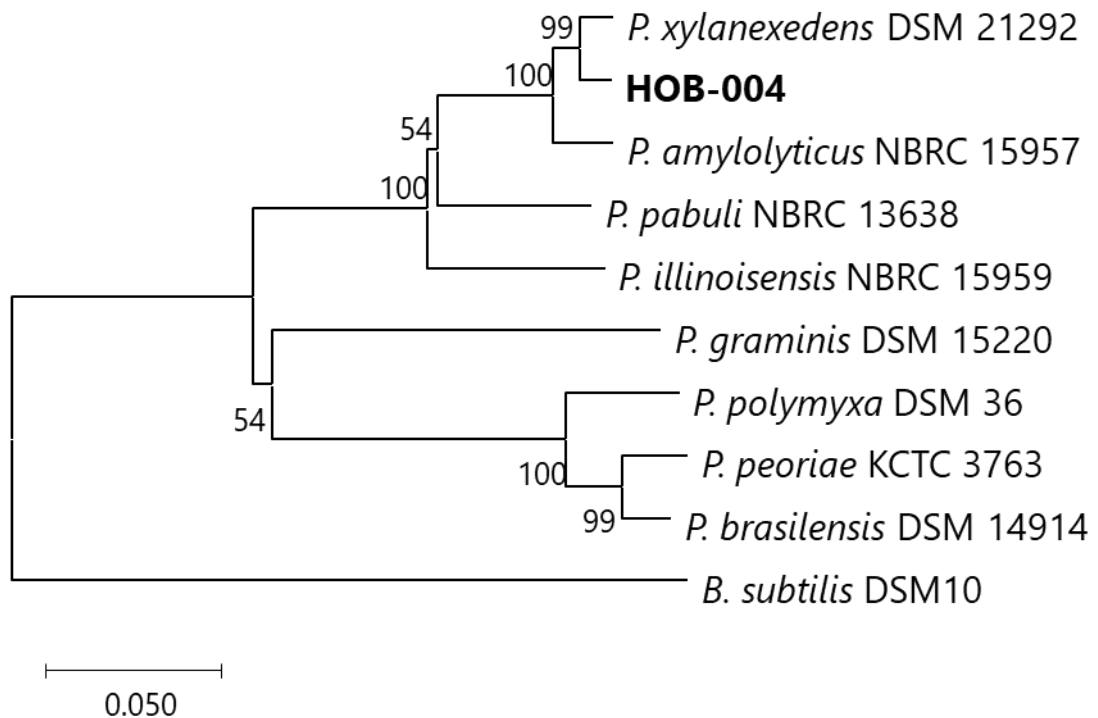


図 4-7 *rpoB* の塩基配列 (1065 bp) に基づく系統樹 (*Paenibacillus* spp.). 本研究で分離した菌株を太字で示した. 本研究で分離した菌株以外は全て各種の type strain の配列データを NCBI から取得して系統樹の作成に用いた. 系統樹の作成に用いた塩基配列のアクセッションナンバーを表 4-6 に示した. 外群として *B. subtilis* DSM 10 の塩基配列を用いた

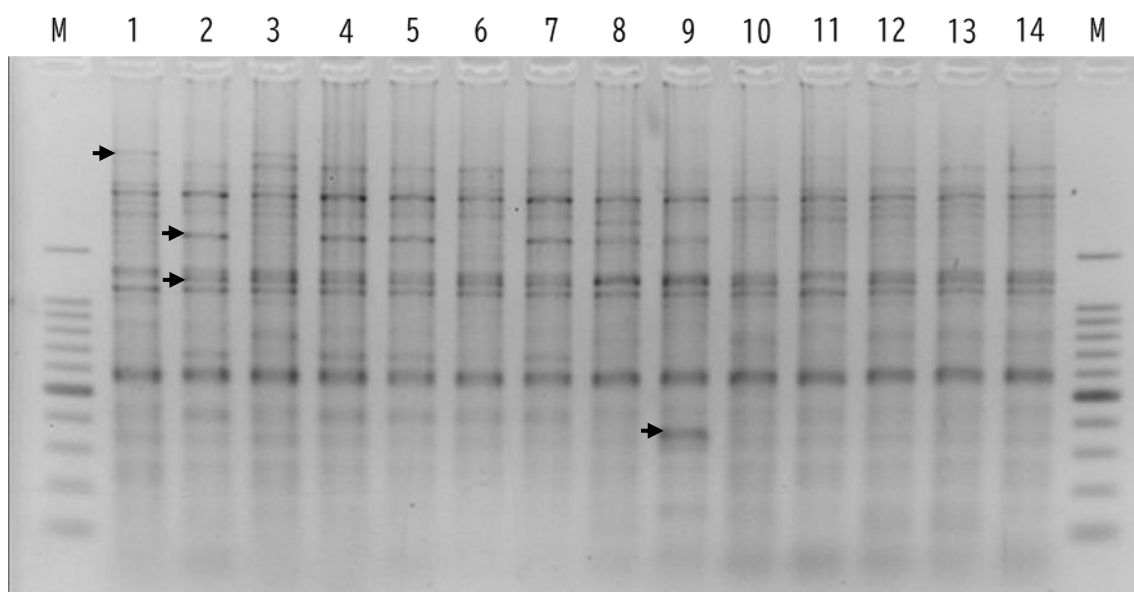


図 4-8 rep-PCR (ERIC) の産物の電気泳動結果. **M** 100 bp DNA ladder, **1** HMB-002, **2** HobB-001, **3** HobB-004, **4** HIB-003, **5** HTB-003, **6** HHB-001, **7** HHB-005, **8** HKB-001, **9** HOB-007, **10** HOB-011, **11** HMmB-003, **12** HTsB-005, **13** HTsB-007, **14** HTB-001. 供試菌株はいずれも *P. parmentieri* に分類された菌株. 一部の菌株からのみ検出された代表的なバンドを矢印で示した

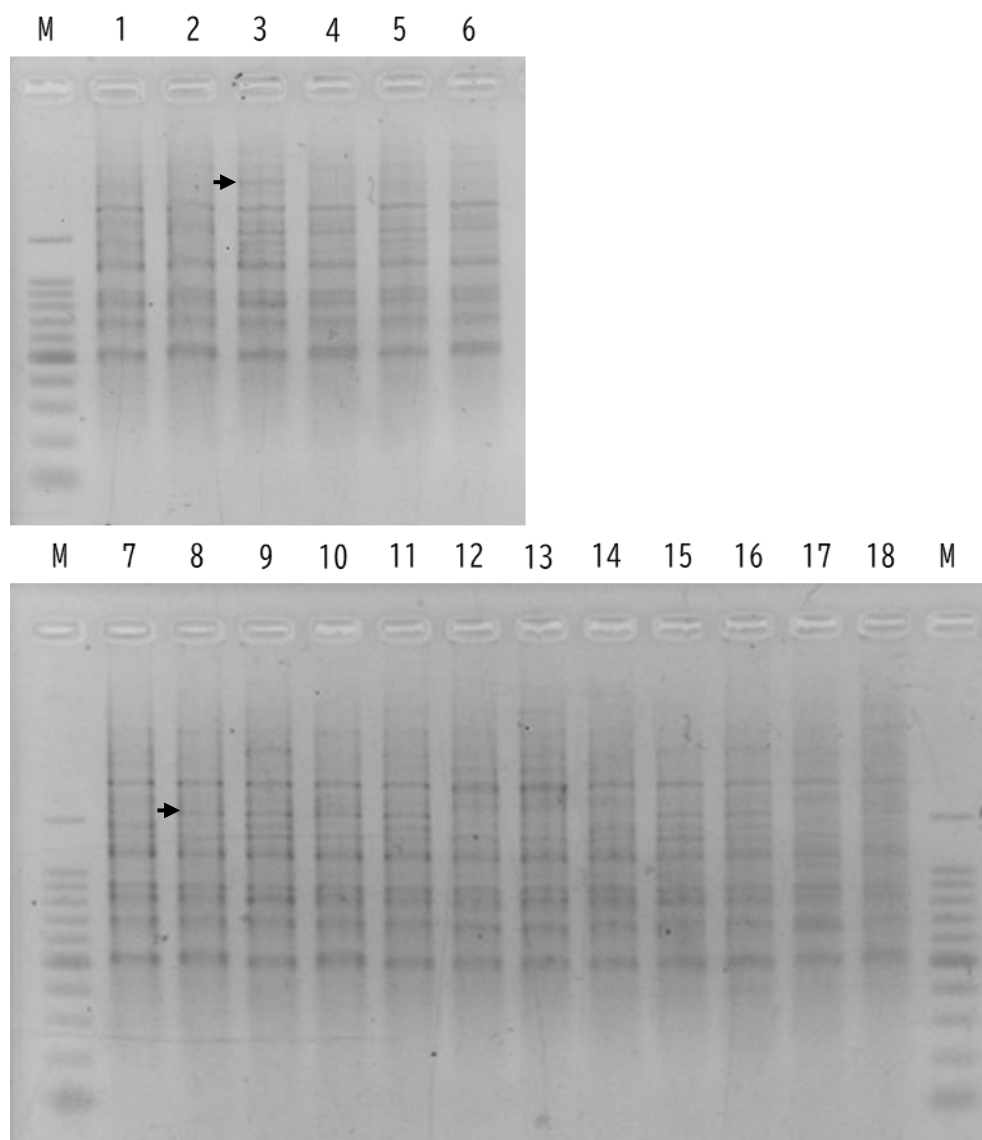


図 4-9 rep-PCR (BOX) の産物の電気泳動結果. **M** 100 bp DNA ladder, **1** HMB-002, **2** HIB-003, **3** HobB-004, **4** HobB-001, **5** HTB-001, **6** HTB-003, **7** HOB-007, **8** HMmB-001 **9** HOB-011, **10** HMmB-003, **11** HTsB-005, **12** HTsB-006, **13** HTsB-007, **14** HKB-001, **15** HHB-001, **16** HHB-002, **17** HHB-003, **18** HHB-005. 供試菌株はいずれも *P. parmentieri* に分類された菌株. 一部の菌株からのみ検出された代表的なバンドを矢印で示した

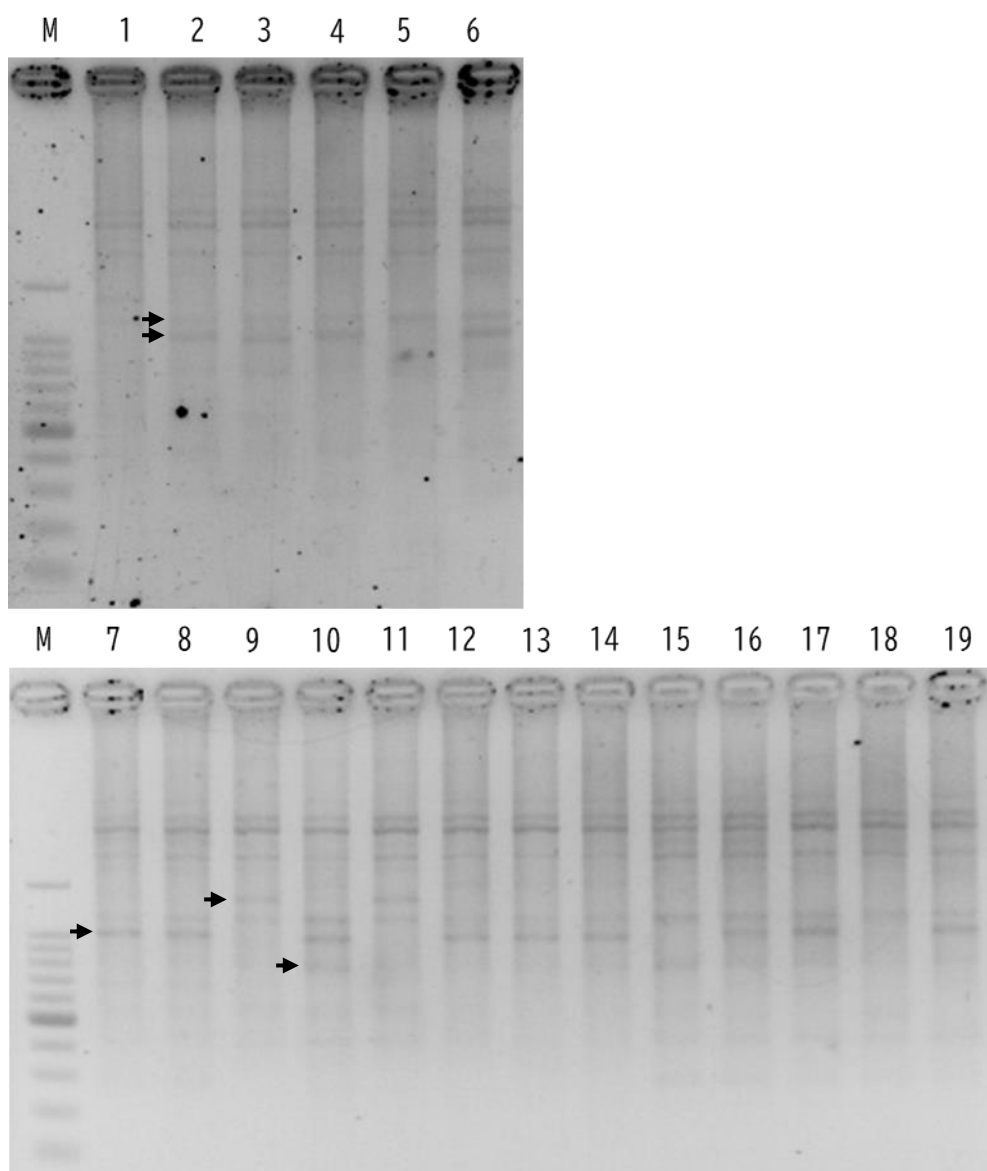
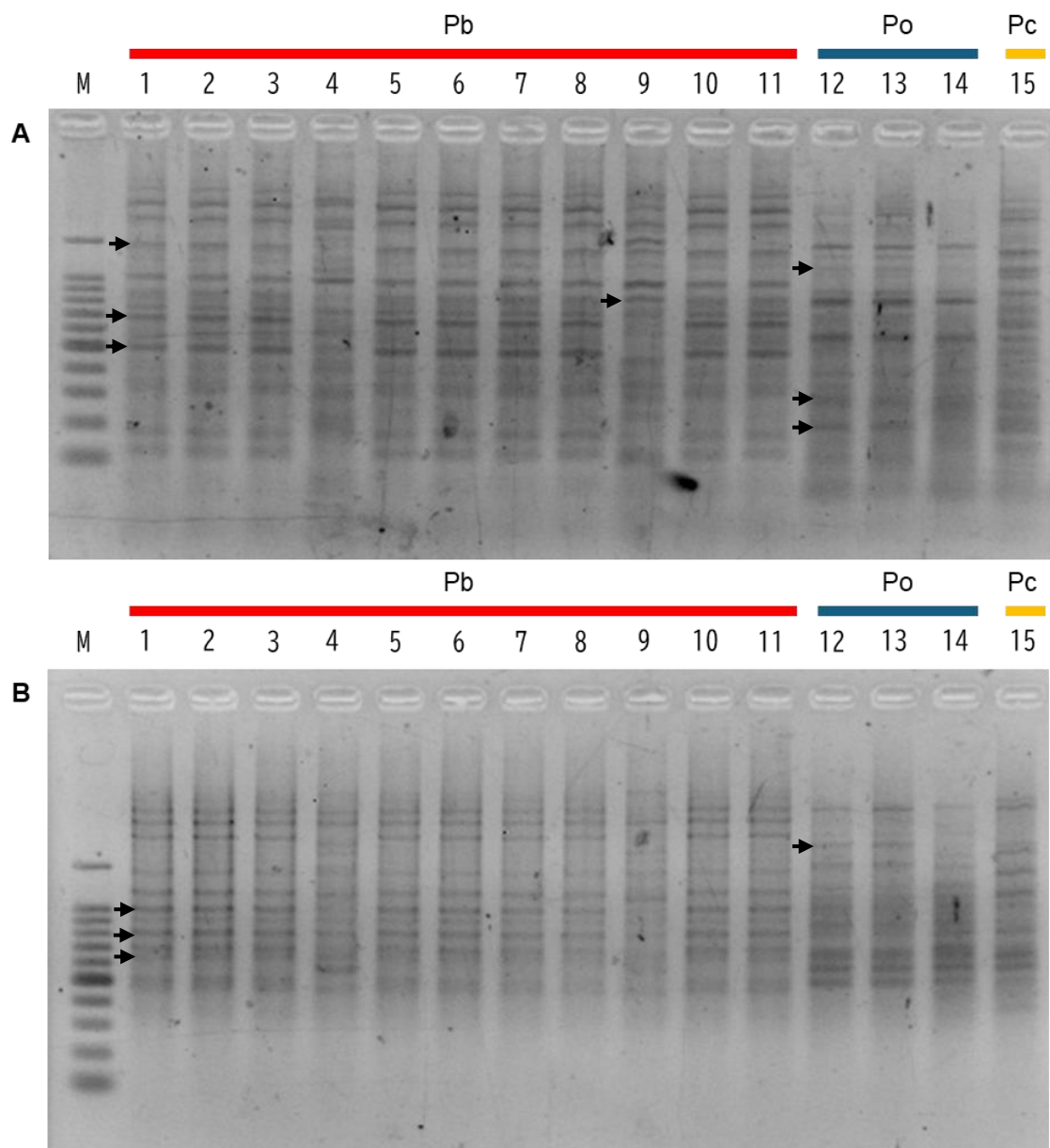


図 4-10 rep-PCR (REP) の産物の電気泳動結果. **M** 100 bp DNA ladder, **1** HMB-002, **2** HIB-003, **3** HobB-004, **4** HobB-001, **5** HTB-001, **6** HTB-003, **7** HOB-007, **8** HOB-008 **9** HMmB-001 **10** HOB-011, **11** HMmB-003, **12** HTsB-005, **13** HTsB-006, **14** HTsB-007, **15** HKB-001, **16** HHB-001, **17** HHB-002, **18** HHB-003, **19** HHB-005. 供試菌株はいずれも *P. parmenrtieri* に分類された菌株. 一部の菌株からのみ検出された代表的なバンドを矢印で示した



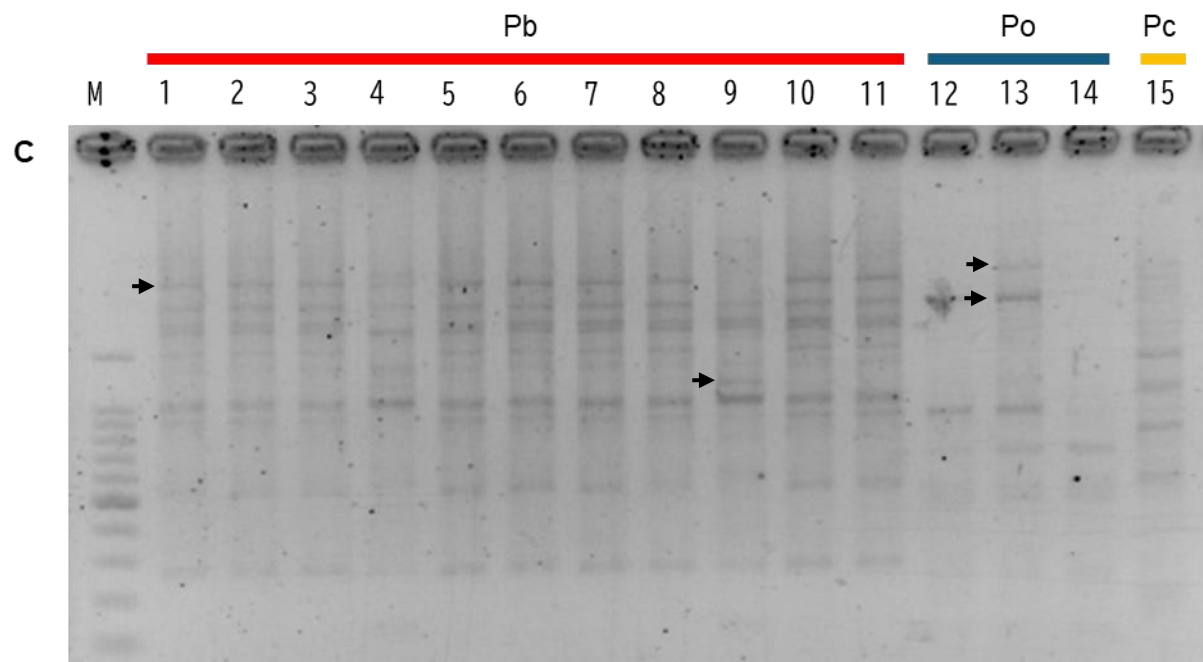


図 4-11 rep-PCR の産物の電気泳動結果. **A** ERIC のフィンガープリント, **B** BOX, **C** REP のフィンガープリント. **M** 100 bp DNA ladder, **1** HIB-001, **2** HIB-002, **3** HIB-005, **4** HMB-003, **5** HMB-005, **6** HOB-001, **7** HOB-003, **8** HOB-010, **9** HTB-004, **10** HTB-005, **11** HHB-004, **12** HTsB-001, **13** HTsB-002, **14** HMB-011, **15** HMB-012. **Pb** *Pe. brasiliense*, **Po** *Pe. odoriferum*, **Pc** *Pe. carotovorum*. 一部の菌株からのみ検出された代表的なバンドを矢印で示した

第5章 ジャガイモ地上部の発病と塊茎腐敗との関係

1. 背景

ジャガイモは栽培中と収穫後の両方において、病害の影響を受けうる。*Pectobacterium* 属細菌によるジャガイモ軟腐病は茎葉での発病に加えて、塊茎の腐敗を引き起こす。ジャガイモ黒あし病は種いも伝染性の病気で茎の腐敗を引き起こす。ジャガイモ軟腐病細菌と同様に、ジャガイモ黒あし病細菌も塊茎腐敗を引き起こす能力を有する。地上部における発病の後、病原細菌が塊茎に伝染する可能性が考えられている (van der Wolf et al. 2022)。その後感染が成立することで塊茎腐敗が生じることが考えられる。ジャガイモ黒あし病を引き起こす病原細菌 *Dickeya* sp. について、ジャガイモ茎に接種して栽培すると娘塊茎から接種菌株が検出されることが報告された (Czajkowski et al. 2010)。一方で、地上部への接種や地上部での発病による収穫後の塊茎腐敗の発生については言及されておらず、栽培中の発病と塊茎腐敗との因果関係ははっきりしていない。本現象を証明することができれば、栽培中の農薬処理が塊茎腐敗の防除に貢献しうるため、解明の意義があると考えた。栽培中に発病したジャガイモ植物体から収穫された塊茎は腐敗が発生しやすくなるという仮説を立て、これを検証するための調査を行った。

2. 方法

5.2.1 病原細菌の培養

北海道平取町で生産された塊茎から分離した HHB-002 (第4章で *P. parmentieri* に分類された菌株) および HMB-003 (第4章で *P. brasiliense* に分類された菌株) を供試した。どちらの菌株も 27°C で 48 時間 TSA 上で培養した。

5.2.2 ジャガイモの栽培と病原細菌の接種

ガラス温室内でポット（直径 30cm）に種いも（cv. Irish cobbler）を植え付けて栽培した。各ポット 3 つ種いもを植え付け、14 ポットで栽培を実施した。水やりは底面給水により実施した。5.2.1 に記載した方法で培養した HHB-002 のシングルコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、植え付け後 4 週間経過したジャガイモの地際部から 5 cm ほどの位置に突き刺して接種した。突き刺した爪楊枝は刺したままの状態を維持し、パラフィルムを巻いて固定した（図 5-1）。これは病斑とそれに由来する傷から病原菌の漏出を可能な限り減らすために行った。ネガティブコントロールとして滅菌爪楊枝を突き刺す処理を行った。14 ポット中、7 ポットのジャガイモに接種し、残り 7 ポットはネガティブコントロールとして処理を行った。栽培は植え付け後 16 週間後に地上部が枯凋したことを確認して収穫した。収穫した塊茎は室温で表面を風乾し（一晚）、その後の試験に供試した。ジャガイモの栽培は 2024 年と 2025 年にそれぞれ実施した。また、2025 年に実施した試験では塊茎収穫時に塊茎周辺の土壌を採取し、同様にその後の試験に供試した。

5.2.3 収穫したジャガイモと栽培土壌からの接種菌株の検出

収穫後風乾した塊茎を水洗し、軽く水分をふき取った後、ストロン基部（直径 9 mm, 深さ 1 cm）をコルクボーラーで打ち抜き採取した。採取したストロン基部を 70%エタノールに瞬間浸漬、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬、滅菌水に 5 分間浸漬して表面殺菌した。表面殺菌したストロン基部をチャック付きラミ袋（ラミジップ, LZ-10, 株式会社セイニチ）に 5 個ずつ入れて、たたいて破碎した。LEMAG366 を 50 ml 加えて 24℃で 2 日間培養した。LEMAG366 の組成を表 5-1 に記載した。各ポットから収穫した塊茎のストロン 5 個を一つのグループとして、14 ポット全てについて調査した。

塊茎収穫時に採取した塊茎周辺土壌 10 g をチャック付きラミ袋（ラミジップ，LZ-10，株式会社セイニチ）に 10 g ずつ入れて，LEM AG366 を 100 ml 加えて 24℃ で 5 日間培養した．14 ポット全てについて調査した．

A. 選択培地を用いた検出

A-1 塊茎組織からの培養

5 日間培養した培養液 100 μ l を段階希釈により 1000 倍まで希釈し，希釈系列を作製した．10 倍，100 倍，1000 倍の希釈液 50 μ l を変法ドリガルスキー培地（津山，1962）に塗布し，27℃で 3 日間培養した．変法ドリガルスキー培地の組成を表 5-2 に記載した．生育したコロニーを滅菌爪楊枝釣菌し，新しい変法ドリガルスキー培地に移植し，27℃で 3 日間培養した．黄色のコロニーを接種した菌株であるか検証するために，DNA を抽出した．シングルコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し，TE バッファー 20 μ l に懸濁した．沸騰させた水にチューブごと浮かべて 1 分間加温した．加温後の溶液に TE バッファー 80 μ l を加えて DNA 溶液として供試した．

A-2 土壌からの培養

5 日間培養した培養液 1 ml を採取して 1.5 ml チューブに移し，100×g で 5 分間遠心分離した．上清 100 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移した．段階希釈により 10^4 倍まで希釈し，希釈系列を作製した．100 倍，1000 倍， 10^4 倍の希釈液 50 μ l を変法ドリガルスキー培地（津山，1962）に塗布し，27℃で 3 日間培養した．生育したコロニーを滅菌爪楊枝釣菌し，新しい変法ドリガルスキー培地に移植し 27℃で 3 日間培養した．黄色のコロニーを接種した菌株であるか検証するために，DNA を抽出した．シングルコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し，TE バッファー 20 μ l に懸濁した．沸騰させた水にチューブごと浮かべて 1 分間加温した．加温後の溶液に TE バッファー 80 μ l を加えて DNA 溶液として供試した．

B. DNA の検出

本試験で行った DNA 溶液の調製は Aono et al. (2021) に記載された方法を参照した。

B-1 塊茎組織からの DNA 抽出

2 日間培養した培養液 1 ml を採取して 1.5 ml チューブに移し、 $9,000\times g$ で 5 分間遠心分離した。上清を除去した後、滅菌超純水 1 ml で懸濁して同条件で遠心分離して上清を除去した。TE バッファー 100 μ l を加えて懸濁した。チューブごと沸騰水に浮かべて 10 分間加温した。 $9,000\times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移して DNA 溶液として使用した。

B-2 土壌からの DNA 抽出

5 日間培養した培養液 1 ml を採取して 1.5 ml チューブに移し、 $100\times g$ で 5 分間遠心分離した。上清 800 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移した。 $9,000\times g$ で 5 分間遠心分離した。上清を除去した後、滅菌超純水 1 ml で懸濁して同条件で遠心分離して上清を除去した。TE バッファー 100 μ l を加えて懸濁した。チューブごと沸騰水に浮かべて 10 分間加温した。 $9,000\times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移して DNA 溶液として使用した。

調製した DNA 溶液をテンプレート DNA として供試し、接種菌株の DNA を検出するための PCR を行った。PCR の反応液組成、使用したプライマーおよび反応条件を表 5-3、表 5-4 および表 5-5 にそれぞれ記載した。PCR 産物を TAE 1.0% アガロースゲルにアプライして 100V で電気泳動した。その後、エチジウムブロマイドによる染色を行い、UV を照射して DNA を検出し、バンドの有無を確認した。

5.2.4 収穫塊茎への接種試験

収穫後風乾した塊茎におろし金で傷をつけた後、HMB-003 (*P. brasiliense*) 滅菌水懸濁液（約 1.0×10^8 CFU/ml）を噴霧接種した。HMB-003 滅菌水懸濁液を調製するために、TSA 上で培養して生育したシングルコロニーを TSB に移植して 27 °C で 24 時間振とう培養した。培養液を $11,000 \times G$ で 1 分間遠心して集菌し、上清を除いた。集菌した菌体を滅菌水で再懸濁して密度を調製した。ネガティブコントロールとして、同様に傷付した塊茎に滅菌水を噴霧した。接種後の塊茎を 15°C で 1 週間培養した。本試験ではそれぞれ 5 個ずつの塊茎に接種した。

5.2.5 収穫塊茎の貯蔵試験

本試験は 2024 年と 2025 年にそれぞれ実施した。

2024 年に実施した試験では、収穫後風乾した塊茎をビニール袋に入れて 24°C で 10 日間保存した。10 日後に腐敗塊茎が軟化腐敗していたため、腐敗組織と健全組織の境界部分を切り出し、70%エタノールで表面殺菌した。300 μ l 程度の滅菌水中でペッスルを用いて破碎して懸濁させた。白金耳の先端を懸濁液に浸け、懸濁液を TSA に画線し、27°C で 24-48 時間培養した。生育したシングルコロニーを釣菌して新しい TSA に移植した。培養した細菌の塊茎腐敗能を確認するために、シングルコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌してジャガイモ塊茎スライスに接種した。接種した塊茎スライスを 27°C で 24 時間以上培養した。培養後、塊茎の腐敗を引き起こしたものについては、第 4 章に記載した rep-PCR に供試してフィンガープリントが接種菌株 HHB-002 のものと一致するか確認した。

2025 年に実施した試験では、収穫後風乾した塊茎をビニール袋に入れて 15°C で 8 週間保存した。8 週間後に塊茎の表面および内部を観察し、腐敗の有無やその病徴を観察した。栽培中に接種したジャガイモ由来塊茎と接種しなかったジャガイモ由

来塊茎とを 10 個×3 反復として供試した．栽培中の HHB-002 接種の有無による腐敗塊茎の個数を比較するために，ウィルコクソンの順位和検定を行った．

3. 結果

5.3.1 栽培中の発病

HHB-002 を接種したジャガイモは，接種 1 週間後までに発病が確認された (図 5-1)．接種 10 日後から一部の株において，接種していない茎の葉において黄化が見られた．接種しなかったジャガイモにおいては，茎，葉ともにこれらの変化は認められなかった．

5.3.2 接種菌株の検出

HHB-002 を接種したジャガイモを栽培した 1 つのポット由来の土壌から培養したコロニーには変法ドリガルスキー培地上で黄色のコロニーの生育が確認されたが，DNA を抽出し，PCR による検定を行ったところ，*P. parmentieri* に特異的なバンドは検出されなかった．接種の有無によらず，他のポット由来の塊茎および土壌からは黄色のコロニーは分離・培養されなかった．

LEM AG366 の培養液から DNA を抽出し，PCR による検定を行うことで接種菌株の DNA の検出を試みた．その結果，2 つのポット由来の土壌と 1 つのポット由来の塊茎から *P. wasabiae* (= *P. parmentieri*) の DNA が検出されたことを示す結果が得られた (図 5-2)．

5.3.3 収穫塊茎への接種試験

栽培中に HHB-002 を接種したジャガイモ由来の塊茎では，接種 1 週間後の時点では腐敗の発生は認められなかった．一方で，栽培中に HHB-002 を接種しなかった

ジャガイモ由来の塊茎では接種 2 日後から腐敗の発生が観察され、接種 1 週間後には供試した塊茎 5 個の内 4 個で腐敗していることが確認された (図 5-3).

5.3.4 収穫塊茎の貯蔵試験

A. 2024 年実施の試験

収穫した塊茎を 10 日間貯蔵して腐敗の有無を確認したところ、栽培中に病原細菌を接種したジャガイモ由来の塊茎のみが軟化腐敗した。腐敗塊茎から分離した細菌の内、塊茎腐敗能を有していたものは 1 菌株 (UR-1) のみであった。UR-1 から gDNA を抽出して rep-PCR に供試し、PCR 産物を電気泳動したところ、そのフィンガープリントは HHB-002 のものと異なっていた。

B. 2025 年実施の試験

収穫した塊茎を 8 週間貯蔵して腐敗の有無を確認したところ、栽培中の病原細菌接種の有無によらず、表面の変色や内部の褐変が認められた (図 5-4)。一方、*Pectobacterium* 属細菌が引き起こす典型的な病徴である塊茎の軟腐症状は見られなかった。栽培中の HHB-002 接種の有無による腐敗塊茎の個数を比較するために、ウィルコクソンの順位和検定を行ったところ、 $p=0.07652$ となり、有意な差は認められなかった。

4. 考察

2024 年の試験では、栽培中に病原細菌を接種したジャガイモ由来の塊茎を貯蔵すると、軟化腐敗が発生した。しかし、腐敗塊茎からは塊茎腐敗能を有する細菌がほとんど分離されず、唯一分離された 1 菌株も接種菌株とは異なると考えられた。そのため、栽培中に病原細菌を接種しても、接種菌株は塊茎に伝染せず、接種菌株を

原因とする塊茎腐敗は発生しないことが考えられた。2024 年の試験では、単純な培養法に基づき接種菌株の検出を試みた。より高い精度で接種菌株を検出するために、変法ドリガルスキー培地, LEM AG366 や特異的 PCR を用いた検出を翌年実施して、さらなる検証を行うにいった。

2025 年の試験では、栽培中の病原細菌の接種の有無によらず、塊茎の軟化腐敗が発生しなかったため、*Pectobacterium* 属細菌による腐敗は発生しなかったと考えられる。また、分離した細菌は、PCR 法と選択培地上による検出ではともに陰性であった。塊茎や土壌から抽出した DNA を PCR 法による検出に供した結果、一部のサンプルでは陽性だったが、全体の傾向としては非検出であった。したがって、栽培中に発病したジャガイモ植物体から収穫された塊茎は腐敗が発生しやすくなるという仮説に関して、少なくとも *Pectobacterium* 属細菌については必ずしも当てはまらないことが考えられる。本調査においては、HHB-002 を 1 株あたり 1 本の茎に接種した。接種茎は接種後に腐敗・枯死したため、健全に生育した茎（各株 3-4 本）由来の塊茎を調査に使用したことになる。接種菌株が他の茎に移行するためには種にも移行し、他の茎に移行する必要がある。今回の方法では、接種の収穫塊茎への影響が少なく見積もられている可能性があるため、さらなる調査を要する。本調査では、他菌株、他の細菌種や糸状菌による病害の場合の影響は依然不明であるため、さらなる検証が必要である。2024 年に実施した試験とは、接種菌株が検出されないという点を除き、異なる結果となったが、培養条件（温度や期間）が異なるため、単純な比較はできない。

Pectobacterium 属細菌による腐敗の発生は認められなかったが、2025 年実施の試験では塊茎表面の変色や内部が褐変する腐敗が観察された。一部の塊茎を調査したところ、*Fusarium* 属菌と思われる糸状菌が分離されたことから、本菌に関わる腐敗である可能性が示唆された。接種ジャガイモ由来の塊茎と、非接種ジャガイモ由来の塊茎における腐敗の発生頻度に有意な差はなかった ($p = 0.07652$) が、 $p < 0.10$ だ

ったため有意な傾向があるとみなし、接種ジャガイモ由来の塊茎の方が腐敗の発生頻度が少ない傾向にあることが考えられた。HHB-002 を接種し茎葉の発病を誘導しても HHB-002 による塊茎腐敗が発生しないのみならず、腐敗の発生頻度が低い傾向にある、という当初の予想を外れる結果となった。このような結果が得られた理由として、栽培中の病原細菌の接種が塊茎の抵抗性を誘導したことが考えられた。これに類似する現象として全身獲得抵抗性 (SAR) や誘導全身抵抗性 (ISR) があげられる。実際の収穫した塊茎に HMB-003 を接種したところ、栽培中に HHB-002 を接種したジャガイモ由来塊茎の方が、非接種ジャガイモ由来塊茎よりも、腐敗頻度が低かったことが考えられた。しかし、一般的に、これらの微生物による植物の抵抗性は根から地上部のように、下から上へ誘導されると考えられている。そのため、現状、本研究で見られた腐敗の発生頻度の違いを SAR や ISR では説明しきれない。Kubota and Abiko (2000) はキュウリ葉にキュウリ炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium* を接種すると胚軸における抵抗性反応が誘導されることを報告した。その後、キュウリ葉に *C. lagenarium* を接種すると、根のサリチル酸蓄積量が増加したことが報告された (Kubota and Nishi 2006)。サリチル酸は、SAR が誘導されたことを確認するためのマーカーとしてみなされている。宿主、病原菌、使用されたキュウリは播種 6-14 日後のものであることや塊茎とは異なり子孫器官における現象の観察ではないことなど、本研究とは様々な条件が異なる。今回観察された現象に再現性があることやジャガイモ塊茎におけるサリチル酸の定量などによる抵抗性誘導の有無の調査を今後行う必要がある。

表 5-1 LEM AG366 の組成 (Hélias et al. 2012)

5N NaOH	300 μ l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.563 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
Pectin (AG366)	2.55 g

表 5-2 変法ドリガルスキー培地の組成

アキュディア TM ドリガルスキー改良培地 ^a	40.0 g
NaCl	5.0 g
0.1%クリスタルバイオレット水溶液	5.0 ml
純水	1 L

a アキュディア TM ドリガルスキー改良培地 40.0 g の組成：肉エキス 5.0 g，ペプトン 10 g，乳糖 10 g，BTB 0.08 g，寒天 15 g.

表 5-3 1 サンプルあたりの PCR の反応液組成 (単位: μ l)

10× <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ free)	2.0
MgCl ₂ (25 mM)	1.6
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.6
Primer1 (5 μ M)	1.0
Primer2 (5 μ M)	1.0
<i>Takara Ex Taq</i> (5U/ μ l)	0.1
滅菌水	11.7
テンプレート DNA	1.0
合計	20.0

表 5-4 本章で使したプライマー

プライマー	配列 (5'-3')	標的	引用
DHT1	TGTAGACTCATGCTGACGCGA	<i>P. wasabiae</i>	Horita et al. (2009)
DHT2	GGTCATCGTGTTTTGTCAGCC	(= <i>P. parmentieri</i>) ^a	

a *P. wasabiae* 検出用として設計されたプライマーであるが、分類の見直しにより *P. wasabiae* の一部は *P. parmentieri* に再分類された．本研究で使した HHB-002 は本プライマーセットで検出可能なことを確認し、使した．

表 5-5 PCR 反応条件

プライマーセット	反応条件
DHT1	94℃10 分，(94℃30 秒，62℃45 秒，72℃30 秒)×35cycles，72℃7 分，4℃∞
DHT2	



図 5-1 HHB-002 を接種した部位と接種 1 週間後の発病の様子为例. 矢印：罹病して褐変した部位.

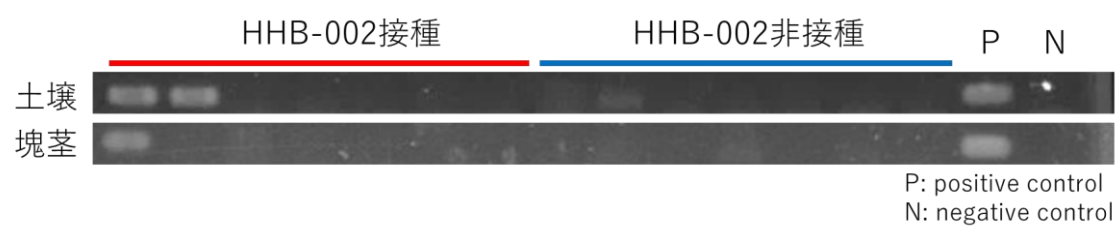


図 5-2 LEM AG366 培養液から抽出した DNA 溶液を PCR に供試し産物を電気泳動した結果. positive control として HHB-002 の gDNA を, negative control として滅菌超純水をそれぞれ供試した

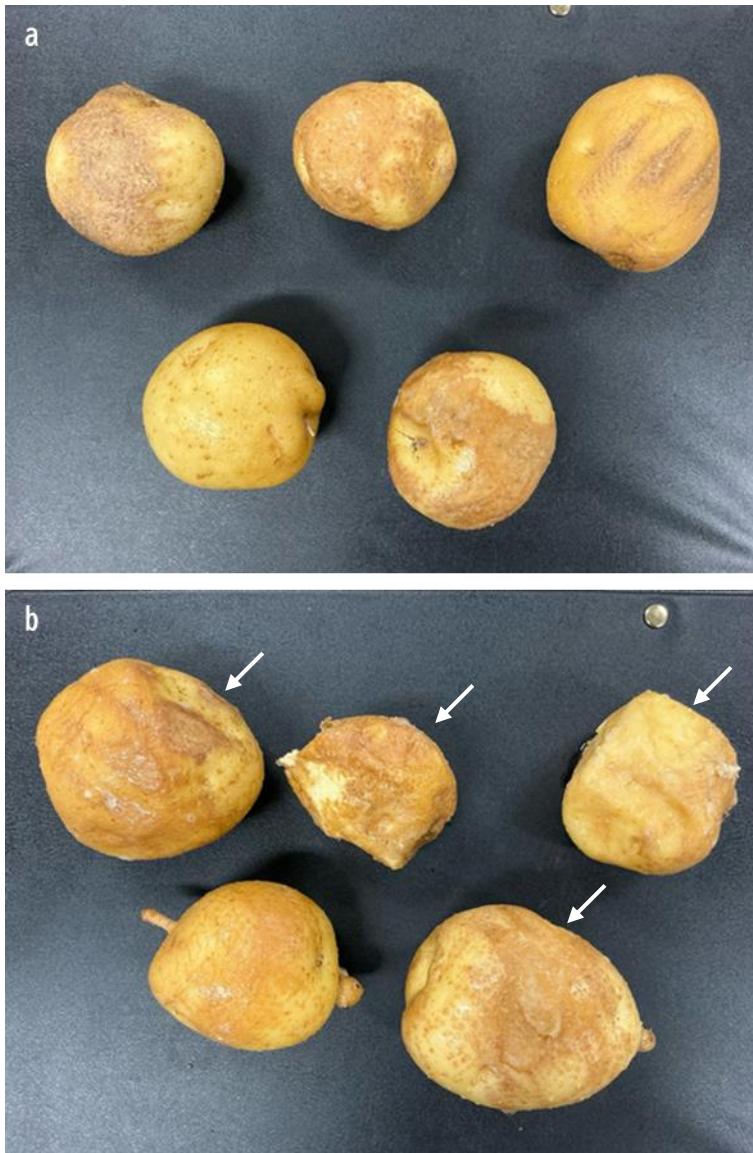


図 5-3 栽培中の HHB-002 の接種の有無による HMB-003 を接種した結果の違い. **a** 栽培中に HHB-002 を接種したジャガイモ由来塊茎に HMB-003 を接種して 1 週間培養した結果. **b** 栽培中に HHB-002 を接種しなかったジャガイモ由来塊茎に HMB-003 を接種して 1 週間培養した結果. 腐敗塊茎を矢印で示した



図 5-4 栽培中の HHB-002 の接種の有無による 8 週間培養した後の結果の違い. **a** 栽培中に HHB-002 を接種したジャガイモ由来塊茎を 8 週間培養した結果. **b** 栽培中に HHB-002 を接種しなかったジャガイモ由来を 8 週間培養した結果

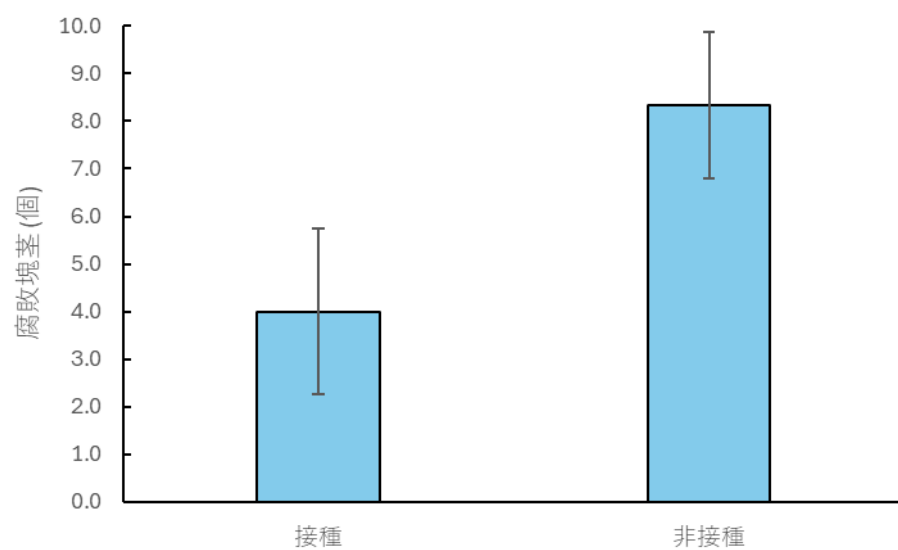


図 5-5 栽培中の HHB-002 の接種の有無による 8 週間培養した後の腐敗塊茎の計測結果. ウィルコクソンの順位和検定において, 有意な差は認められなかった ($p = 0.07652$) が $p < 0.10$ だったため, 有意な傾向があるとみなした

第6章 総合考察

6.1 ジャガイモ塊茎腐敗に関与する細菌

第1章や第2章で記述した通り、ジャガイモ塊茎は細菌や糸状菌など様々な病原菌に感染することが知られている。日本国内でも疫病、乾腐病や軟腐病の発生が報告されており、これまでも研究が行われてきた。

上記のような病原菌とは異なり強い病原力を持たないが、病原菌による腐敗に伴って塊茎内で増殖し、腐敗を助長する微生物が存在することが示唆されていた。本研究では、ジャガイモ疫病菌 *Ph. infestans* に感染した塊茎が軟化腐敗する現象をモデルとして調査を実施した。内生細菌 *Pa. polymyxa* が疫病菌に感染した塊茎において増殖し、軟化腐敗を引き起こすことを明らかにした。*Pa. polymyxa* により引き起こされる軟化腐敗によって滲出液が発生し、これが貯蔵庫内で伝染源になる可能性も考えられる。実際の貯蔵環境で *Pa. polymyxa* が単独で腐敗を引き起こすか、*Pectobacterium* 属細菌が引き起こす軟腐病のように生じた滲出液が腐敗を伝搬するかなど、貯蔵庫内で生じる塊茎腐敗の発生生態に関する研究が今後の課題である。

また、国内における塊茎のポストハーベスト病害、特に細菌による被害についての調査例はあまりなく、本研究では、国内のジャガイモ産地から腐敗塊茎を収集して腐敗の原因を調査した。ここでは、細菌によるものと思われる症状である軟化腐敗を呈した塊茎を主な調査対象とした。本調査では *Pectobacterium* 属細菌のような主要な病原菌だけでなく、先述の *Pa. polymyxa* と同属の *Paenibacillus* 属細菌やその近縁グループである *Bacillus* 属細菌などが関与する可能性も想定し、調査を実施した。その結果、*Pe. brasiliense* と *Pe. parmentieri* が優占する細菌株群が分離された。一般にジャガイモをはじめとする軟腐病の病原菌として記述されることが多い、*Pe. carotovorum* は1菌株しか分離されなかった。一方で、日本国内でジャガイモの

病原菌として登録されていない *Pe. odoriferum* (3 菌株), *Pe. punjabense* (1 菌株), *Pe. versatile* (1 菌株) が分離された。加えて, rep-PCR を用いて遺伝的多様性を調査したところ, 分離菌株のフィンガープリントは一樣ではなく, 複数の系統が混在していることが示唆された。さらに, *Pectobacterium* 属細菌だけでなく, *Pa. polymyxa* は分離されなかったが, その近縁グループである *Bacillus* 属細菌と *Paenibacillus* 属細菌も分離され, 実際の貯蔵施設で発生する塊茎腐敗からもこれらの細菌が検出されることが示された。このように, 実際の貯蔵施設で生じる塊茎腐敗に関与する細菌は多様な細菌が関わることが考えられた。本調査は 2023 年と 2024 年の 2 年間の調査結果をまとめたものである。未登録の病原細菌の病害の発生することや当該細菌種が今後も検出されることについては引き続き調査を行う必要がある。

以上の通り, ジャガイモ塊茎腐敗には多様な細菌が関与する。その中には *Ph. infestans* による腐敗に起因して増殖し, 腐敗を助長する細菌が存在することも示唆された。植物病害を引き起こす病原微生物の特定と発生生態の解明は, 生産現場での防除技術の開発に寄与することは勿論, 防除において重要であると考えられる迅速な検出についても重要な意義を持つと考えられる。本研究が示した塊茎腐敗に関与する細菌に関する提案はこれらの技術開発に向けて貢献することができたと考えられる。

6.2 栽培中の発病と貯蔵期間中の塊茎腐敗との関連について

第 2 章でも記述した通り, 日本国内では収穫された農作物は食品として扱われ, 農薬を処理することができない。そのため, ジャガイモ塊茎のポストハーベスト病害に対する有効な防除手段が確立されていない。耕種的防除による防除が行われているほか, 栽培中の処理による塊茎腐敗の防除や食品添加物に分類される化学物質を用いた防除技術の開発も検討されている。先行研究では地上部における発病の後,

病原細菌が塊茎に伝染する可能性が考えられていた。栽培中に実施される防除による塊茎腐敗の防除の効果を最適化するためにも、栽培中の発病と貯蔵中の塊茎腐敗との関連を解明する意義があると考えた。

温室で栽培したジャガイモ植物体に *P. parmentieri* 菌株を人工接種して地上部の発病を再現した。その後も栽培を継続し、塊茎を収穫した。収穫した塊茎から接種菌株の検出を試み、また、貯蔵後に接種菌株による腐敗が生じるか検証した。その結果、約 2 か月間の貯蔵を経ても接種菌株による塊茎腐敗は発生しなかった。腐敗自体は発生したが、その症状から他の要素が原因となっていることが考えられた。収穫した塊茎からの検出においても、全体的には非検出の傾向が見られた。これらの結果から、栽培中の発病ないしその病原菌は貯蔵中の塊茎腐敗の発生に寄与しないことも考えられた。本研究は特定の 1 種 1 菌株のみ供試した試験であるため、他の菌株や糸状菌を含む他の病原菌では異なる結果となる可能性も考えられる。今後更なる研究を要する。

当初、栽培中に発病したジャガイモ植物体から収穫された塊茎は腐敗が発生しやすくなると仮説・予想したが、先述の通り、これに反する結果となった。その一方で、興味深い現象が観測された。栽培中に *P. parmentieri* 菌株を接種したジャガイモから収穫した塊茎の方が、接種しなかったジャガイモから収穫した塊茎よりも、腐敗の発生頻度が低いことが示唆された。接種菌株による腐敗が発生しないのみならず、腐敗の発生しやすさについても予想に反する結果となった。微生物との相互作用の結果、植物の抵抗性反応が誘導される例は全身獲得抵抗性や誘導全身抵抗性があるが、一般的にこれらの抵抗性は下から上へ誘導されると考えられる。そのため、本研究で観察された現象を説明しきれない。本研究は 2025 年に実施されたのみであり、供試菌株も 1 菌株であり、加えて本現象を説明する先行研究も不足していることから、今後の慎重な検証を要する。

摘要

1. ジャガイモ疫病に起因する塊茎腐敗への内生細菌 *Paenibacillus polymyxa* の関与を調べるために、*Phytophthora infestans* と *Pa. polymyxa* の共接種試験および *Ph. infestans* を接種した塊茎内の細菌定量試験を実施した。その結果、*Ph. infestans* と *Pa. polymyxa* を共接種すると、塊茎が軟化腐敗し、腐敗が助長された。また、*Ph. infestans* を接種した塊茎内では *Pa. polymyxa* を含む細菌が増殖することが示された。以上の結果から、*Ph. infestans* に感染した塊茎では *Pa. polymyxa* が増殖し、疫病による腐敗をさらに助長し、軟化腐敗を引き起こすことが示唆された。
2. 日本国内の貯蔵施設で発生する塊茎腐敗に関与する細菌を調査するために、腐敗塊茎を収集し、それらの細菌の分離を試みた。その結果、*Pectobacterium brasiliense* と *Pe. parmentieri* を優占種とする細菌株群が分離された。この菌株群には、日本国内ではジャガイモの病原菌として未登録の病原細菌も含まれた。また、*Bacillus* 属細菌と *Paenibacillus* 属細菌も分離され、実際の貯蔵施設においてもこれらの細菌が検出されることが示された。また、rep-PCR 法により *Pectobacterium* 属細菌は遺伝的に多様であることが示唆された。これらの結果から、日本国内で発生する塊茎腐敗には多様な細菌が関与することが示唆された。
3. 栽培中の発病と貯蔵中に生じる塊茎腐敗との関連を調べるために、栽培中の発病を再現した後、塊茎を収穫して病原菌の検出や腐敗発生の有無を調査した。接種菌株による腐敗の発生は認められず、病原菌は非検出の傾向であった。少

なくとも，接種した菌株については栽培中に発病を誘導しても，塊茎腐敗を発生させないことが考えられた．

Summary

1. To investigate the involvement of the endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* in potato tuber decay caused by late blight, we conducted co-inoculation experiments with *Phytophthora infestans* and *Pa. polymyxa*, and quantification of bacteria in tubers inoculated with *Ph. infestans*. Co-inoculation of *Ph. infestans* and *Pa. polymyxa* resulted in bacterial decay of tubers, promoting the decay. Furthermore, it was shown that bacteria, including *Pa. polymyxa*, proliferated in tubers inoculated with *Ph. infestans*. These results suggest that *Pa. polymyxa* proliferates in tubers infected with *Ph. infestans*, further promoting the decay caused by late blight and causing bacterial decay.
2. To investigate bacteria involved in potato tuber decay caused in storage facilities in Japan, decayed tubers were collected, and bacteria were isolated from them. Bacterial strains, dominated by *Pectobacterium brasiliense* and *Pe. parmentieri*, were isolated. The bacterial strains included pathogenic bacteria unregistered as pathogens of potato in Japan. *Bacillus* species and *Paenibacillus* species were isolated, indicating that these bacteria were detected from actual storage facilities. By rep-PCR test, it showed *Pectobacterium* spp. were genetically diverse. These results imply that diverse bacteria are involved in tuber decay caused in Japan.
3. To investigate relationship between disease caused in cultivation period and tuber decay caused in storage period, disease in cultivation was reproduced, and then detection test of inoculated strain from and the occurrence of tuber decay was investigated in harvested tuber. The occurrence of tuber decay by inoculated strain was not shown, and

the pathogen intended to be not detected. At least, even though inoculated strain induces disease in cultivation period, then it does not cause tuber decay.

参考文献

- Agrios GN (2005) Plant diseases caused by prokaryotes: Bacteria and mollicutes. Bacterial Soft Rots. In: (5th ed) Plant Pathology; Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 615–703.
- 赤井重恭, 河野又四 (1952) 京都卸賣市場に於ける青果腐敗の調査と対策に就ての考察. 植物防疫 6: 403-407.
- 秋野聖之 (2016) ジャガイモ塊茎腐敗の発生条件を調べる —土壌混和接種法とその利用—. いも類振興情報 127: 40-46
- Aono Y, Nakayama T, Ozawa T, Ushio Y, Yasuoka S, Fujimoto T, Ohki T, Oka N, Maoka T (2021) Simple and sensitive BIO-PCR detection of potato blackleg pathogens from stem, tuber, and soil samples. Journal of General Plant Pathology 87:209-218
- Ammar N, Khiareddine HJ, Trabelsi BM, Nefzi A, Mahjoub MA, Remadi MD (2017) Pythium leak control in potato using aqueous and organic extracts from the brown alga *Sargassum vulgare* (C. Agardh, 1820). Postharvest Biol Technol 130: 81-93
- Birch PRJ & Whisson SC (2001) *Phytophthora infestans* enters the genomics era. Mol Plant Pathol 2: 257–263.
- Blodgett EC and Ray WW (1945) Leak caused by *Pythium debaryanum* Hesse, produces typical shell rot of potatoes in Idaho. Am Potato J 22:250-253
- Boyd AEW (1972) Potato storage diseases. Rev Pl Path. 51: 297-321
- Brady CL, Cleenwerck I, Venter SN, Engelbeen K, De Vos P, Coutinho TA (2010) Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical

- samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 60: 2430–2440
- Chapman JR, Taylor RK, Weir BS, Romberg MK, Vanneste JL, Luck J., et al. (2012) Phylogenetic Relationships Among Global Populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Phytopathology 102: 1034–1044
- Charkowski AO (2018) The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. Annual Review of Phytopathology, 56, 269–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906>.
- Coutinho TA, Venter SN (2009) *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. Mol Plant Pathol 10: 325-335
- Curland RD, Mainello A, Perry KL, Hao, Charkowski AO, Bull CT (2021) Species of *Dickeya* and *Pectobacterium* Isolated during an Outbreak of Blackleg and Soft Rot of Potato in Northeastern and North Central United States. Microorganisms 9: 1733
- Czajkowski R, de Boer WJ, van Veen JA, van der Wolf JM (2010) Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. (biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. Phytopathology 100: 1128-1137
- Dean R, van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond KKE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M., Kahmann R., Ellis J, Foster GD (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol 13 :414–430
- Duarte V, Boer SHD, Ward LJ, de Oliveira AMR (2004) Characterization of atypical *Erwinia*

- carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. J Appl Microbiol 96: 535-545
- FAO. FAOSTAT Statistical Database; Food and Agricultural Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. 2024/01/17 閱覽.
- Fukuda T, Takahashi M, Nagai K, Harunari E, Imada C, Tomoda H (2017) Isomethoxyneihumicin, a new cytotoxic agent produced by marine *Nocardiopsis alba* KM6-1. J Antibiot 70: 590-594
- Gachango E, Kirk W, Schafer R, Wharton P (2012) Evaluation and comparison of biocontrol and conventional fungicides for control of postharvest potato tuber diseases. Biological control 63: 115-120
- Garden L, Gouy C, Christen R, Samson R (2003) Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53: 381–391
- Hauben L, van Gijsegem F, Swings J (2005) Genus XXIV. *Pectobacterium* Waldee 1945, 469AL emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Margaert, Verdonck and Swings 1999a, 1. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria, (Eds.) DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley, GM Garrity, pp. 721–730, Springer, New York
- Hélias V, Hamon P, Huchet E, Wolf JVD, Andrivon D (2012) Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. Plant Pathol 61: 339-345

- 逸見武雄 (1935) 青果市場に於ける病害研究の重要性. 農業及園芸, 10, 297-317
- 堀田光生, 田中文夫, 不破秀明 (2009) ジャガイモ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
- 井上博喜, 宮坂篤, 園田亮一 (2020) 温暖化による気温上昇がイネ紋枯病の発生程度および被害度に及ぼす影響. 九病中研会報 66 : 1-5.
- Jones W (1935) Soft rot of potatoes caused by *Pythium ultimum* Trow. Sci Agric 15:402-410
- 川原三奈, 秋野聖之, 近藤則夫 (2023) ジャガイモ 乾腐病菌の分離・同定とその防除に関する研究. 日植病報 89: 167-168 (Abstract in Japanese)
- Kim MH, Cho SM, Kim BK, Choi HJ, Hahn JH, Kim CK, Kang MJ (2012) Quantitative real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pectobacterium wasabiae* using YD repeat protein gene-based primers. Plant Dis 96: 253-257
- Koh YJ, Kim GH, Lee YS, Sohn SH, Koh HS, Kwon S, Heu S, Jung JS (2012) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. New Zealand J. Crop Hort Sci 40: 269–279
- Kubota M and Nishi K (2006) Salicylic acid accumulates in the roots and hypocotyl after inoculation of cucumber leaves with *Colletotrichum lagenarium*. J Plant Physiol 163: 1111-1117
- Kubota M, Abiko K (2000) Induced Resistance in Hypocotyl of Cucumber by Infection with *Colletotrichum lagenarium* in Leaves. J Gen Plant Pathol 66: 128–131
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547-1549

- 木村貞夫 (1977), 収穫後のジャガイモ塊茎腐敗防止について 第1報 軟腐病感染条件の検討. 九州病害虫研究会報, 23: 57-59
- Lastochkina O, Baymiev A, Shayahmetova A, Garshina D, Koryakov I., Shpirnaya I (2020) Effects of Endophytic *Bacillus Subtilis* and Salicylic Acid on Postharvest Diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) Development in Stored Potato Tubers. Plants 9: 76
- Latijnhouwers M, Ligterink W, Vleeshouwers, VGAA, van West P, Govers F. (2004), A Gα subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. Mol. Microbiol. 51: 925-936
- Lelliott RA (1974) Genus XII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, 209. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eight Edition, (Eds.) RE Buchanan RE, NE Gibbons, pp. 332–340, The Williams & Wilkins Company, Baltimore
- Ma B, Hibbing ME, Kim HS, Reedy RM, Yedidia I, Breuer J, BreuerJ, Glasner JD, Perna NT, Kelman A, Charkowski AO (2007) Host Range and Molecular Phylogenies of the Soft Rot Enterobacterial Genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. Bacteriology 97: 1150-1163
- Ma X, Schloop A, Swingle B, Perry KL (2018) *Pectobacterium* and *Dickeya* Responsible for Potato Blackleg Disease in New York State in 2016. Plant Dis 102:1834-1840
- Mansfield J., Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M., Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol 13: 614–629
- 眞山眞理(2020) 3. ポストハーベスト病害 in 植物病理学第2版 pp.123-129
- McGrath JM, Williams CE, Haberlach GT, Wielgus SM, Uchtyl TF, Helgeson JP (2002)

- Introgression and stabilization of *Erwinia* tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. Amer J Potato Res 79: 19-24
- Mohkam M, Nezafat N, Berenjian A, Mobasher MA, Ghasemi Y (2016) Identification of *Bacillus* Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA, *recA*, *rpoB* Gene Sequencing and RAPD-PCR. Probiotics & Antimicro Prot 8: 8–18
- Moleleki LN, Onkendi EM, Mongae A, Kubheka GC (2013) Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. Eur J Plant Pathol 135: 279–288
- 中田覺五郎 (1934) 作物病害圖編. 養賢堂 pp. 526-527
- Nakayama T, Yasuoka S, Ozawa T, Aono Y, Ushio Y, Fujimoto T, Ohki T, Maoka T (2021) Genetic diversity of potato blackleg pathogens, *Pectobacterium wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Dickeya dianthicola* in Japan by rep-PCR fingerprinting. Eur. J. Plant. Pathol. 159: 917-939
- Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K (2012) Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. J Appl Microbiol 113: 904–913
- Najdabbasi N, Mirmajlessi SM, Dewitte K, Mänd M, Landschoot S, Haesaert G (2022) Combination of potassium phosphite and reduced doses of fungicides encourages protection against *Phytophthora infestans* in potatoes. Agriculture 12:189

日本植物病理学会 (2023) 日本植物病名目録 (2023 年 8 月版). pp. 1478.

<https://www.ppsj.org/mokuroku.html>. 2024/01/18 閲覧.

西脇由恵 (2017) ばれいしょの疫病による塊茎腐敗の発生生態と防除について. 農業時代 198: 1-5

農研機構 研究成果 (2020) 日本産ジャガイモ黒あし病菌の遺伝的多様性と個体識別による感染経路の推定.

https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/harc/2020/harc20_s15.html

(2025 年 10 月 20 日閲覧)

大木理 (2019) 植物病理学 第2版. 東京化学同人 pp. 7-11.

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*. Eur J Plant Pathol 152: 561-565

Osei R, Yang C, Cui L, Wei L, Jin M, Wei X. Antagonistic bioagent mechanisms of controlling potato soft rot. Plant Protect. Sci. 2022;58(1):18-30

Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic J, and de Bruijn FJ (2004) Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuk, G.A.; de Bruijn, F.J.; Head, I.M.; Akkermans, A.D.; van Elsas, J.D. (Eds.) Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Chapter 5.3.2: 1-33

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Rodrigues NJ, Destéfano SAL, Rodrigues LMR, Peloso DS, Oliveira JL da C. (2011)

Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. *Tropical Plant Pathol* 36: 42–44

坂口 荘一 (1977) 貯蔵ジャガイモの病害に関する知見,特に乾腐病について,九州病害虫研究会報 23: 60-64

Samson R, Legendre JB, Christen R, Saux MFL, Achouak W, Gaedan L (2010) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 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. *J Syst Evol Microbiol* 55: 1415–1427

Sato N (1980). Sources of inoculum and sites of infection of potato tubers by *Phytophthora infestans* in soil. *Jpn J Phytopathol* 46: 231-240

塩平真士 (2021) *Fusarium* 属菌によるジャガイモ塊茎腐敗の発生生態と防除に関する研究 (修士論文)

染谷信孝, 澤田宏之, 濱本宏, 諸星知広 (2020) 軟腐病菌についての研究動向. 土と微生物, 74, 66-76. https://doi.org/10.18946/jssm.74.2_66.

Sławiak M, van Beckhoven JRCM, Speksnijder AGCL, Czajkowski R, Grabe G, van der Wolf JM (2009) Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur J Plant Pathol* 125: 245–261

谷井昭夫, 尾崎政春, 馬場徹代 (1973) ジャガイモの黒脚病. 日植病報 39: 351-360

谷井昭夫 (1984) 北海道のジャガイモ黒あし病に関する研究. 北海道立農試報 45: 1-94

手塚信夫 (1992) 野菜の市場病害. 農業技術 pp. 76-79

Tek AL, Steveson WR, Helgeson JP, Jiang J (2004) Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato. Theor Appl Genet 109:249-254

THE STATE OF FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD 2020

Thelma JPA, María JYM, Alejandra AS, Alfonsina JH, Sergio AO (2025) *Gluconobacter* spp. y *Paenibacillus polymyxa* causan pudrición en zanahorias comerciales aparentemente sanas, Revista Argentina de Microbiología 57: 192-201 (Spanish with English abstract)

津山博之 (1962) 白菜軟腐病に関する研究. 東北大学農学研究所彙報, 13: 221-345

Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. J Eukaryot Microbiol 46: 327-338.

van der Wolf J, Krijger M, Mendes O, Kurm V, Gros J (2022) Natural Infections of Potato Plants Grown from Minitubers with Blackleg-Causing Soft Rot Pectobacteriaceae. Microorganisms 10: 2504.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. Nucleic Acids Research 19: 6823-6831

Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Meth Cell Mol Biol 5: 25-40

吉田竜斗 秋野聖之 近藤則夫 (2023) *Paenibacillus polymyxa* はジャガイモ疫病に起因する塊茎貯蔵腐敗に関与する. 日植病報 89: 182 (Abstract in Japanese)

Zhang C, Liu H, Wang X, Long X, Huang A, Zhang J, Geng J, Yang L, Haung Z, Dong P, Shi L (2023) Inhibitory effects and mechanisms of cinnamaldehyde against *Fusarium oxysporum*, a serious pathogen in potatoes. Pest Management Sci 80: 3540-3552