

氏 名 (本国籍)	李 明 珠 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 5 7 3 号
学位授与年月日	平成 2 4 年 3 月 1 3 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Quantitative and Qualitative Detection of <i>Pythium</i> and <i>Phytophthora</i> Species Based on PCR Techniques (PCR 技術を利用した <i>Pythium</i> 属菌および <i>Phytophthora</i> 属菌の定量および定性的検出)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 須 賀 晴 久 副査 岐阜大学 教 授 景 山 幸 二 副査 静岡大学 教 授 森 田 明 雄

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は、森林における微生物由来の土壌呼吸量の評価に指標微生物として利用可能とされている *Pythium intermedium* の迅速・簡易な定量を可能にするための技術の開発およびイチゴ栽培で重要な病原菌である *Phytophthora cactorum* および *Ph. nicotianae* の定性・定量法の開発および PCR による検出における対象生物の生死判別を目的とした。

*Py. intermedium* の検出法にはリアルタイム PCR 技術を用い、rDNA の internal transcribed spacer regions (ITS) から特異性の高いプライマーを設計した。増幅過程の検出は SYBR グリーン II 蛍光染料を使用することで、高感度に検出できた。さらに、土壌からの DNA 抽出法を改良することにより、本検出法により森林土壌中の *Py. intermedium* の高感度な定量分析が可能となった。2 か所の冷温帯森林土壌中での本菌の分布を調べたところ、菌量は著しく不均一であることが明らかとなった。

*Ph. nicotianae* および *Ph. cactorum* については、最初に 2 種の病原菌を同時に検出するためのマルチプレクス PCR 法の開発を試みた。マルチプレクス PCR では、異なるプライマーを組み合わせる必要がある。そこで、*Ph. nicotianae* 種特異プライマーを ITS 領域、*Ph. cactorum* 種特異プライマーを ras 関連のタンパク質遺伝子 *Ypt1* の塩基配列にそれぞれ焦点を当てて設計した。設計したプライマーの特異性を確認し、マルチプレクス PCR を行うことにより、菌体の純粋培養由来 DNA、土壌 DNA 両方からの検出と 2 種の識別ができた。さらに、本検出技術を使ってこの 2 種の病原菌の分布調査をイチゴの主要産地のある 8 つの道・県(岐阜、佐賀、奈良、栃木、千葉、静岡、山梨、北

海道)の 89 のイチゴ畑について行ったところ、*Ph. nicotianae* が 2 県 4 圃場、*Ph. cactorum* が 2 県 2 圃場、両菌同時が 1 県 1 圃場で検出された。

*Ph. nicotianae* と *Ph. cactorum* の定量検出については、新たにプライマーを設計して TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を開発した。*Ph. nicotianae* と *Ph. cactorum* からの純粋培養 DNA の検出限界は、それぞれ 10 fg および 1 pg と高感度であった。

PCR 検出において生きている細胞と死んでいる細胞の区別は、多くの微生物学の研究にとって、非常に重要な課題になっている。すなわち、細胞が死んでも DNA が分解されずに残っていることにより、DNA に基づいた検出法では誤評価になっている可能性がある。本研究では、Propidium 単アジ化物(PMA)およびエチジウム単アジ化物(EMA)を使用して、*Py. intermedium* の生細胞および死細胞を区別できる方法を検討した。PMA に基づいた処理では、死んだ細胞の DNA と PMA を十分反応し、残った PMA を不活性化するために、光処理装置は青い波長発光ダイオード(LED)を採用し、処理時間及び濃度を調整することにより、純粋培養サンプルで生死判別が可能になった。また、EMA 市販キットでも処理時間及び濃度を調整することにより、純粋培養サンプルから生死判別が可能になった。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、森林における微生物由来の土壌呼吸量の評価に指標微生物として利用可能とされている *Pythium intermedium* の迅速・簡易な定量を可能にするための技術の開発およびイチゴ栽培で重要な病原菌である *Phytophthora cactorum* および *Ph. nicotianae* の定性・定量法の開発および PCR による検出における対象生物の生死判別を目的としている。

*Py. intermedium* の検出法にはリアルタイム PCR 技術を用い、rDNA の internal transcribed spacer regions (ITS)から特異性の高いプライマーを設計した。増幅過程の検出は SYBR グリーン II 蛍光染料を使用することで、高感度に検出できた。さらに、土壌からの DNA 抽出法を改良することにより、本検出法により森林土壌中の *Py. intermedium* の高感度な定量分析が可能となった。2 か所の冷温帯森林土壌中での本菌の分布を調べたところ、菌量は著しく不均一であることが明らかとなった。

*Ph. nicotianae* および *Ph. cactorum* については、最初に 2 種の病原菌を同時に検出するためのマルチプレクス PCR 法を開発を試みた。マルチプレクス PCR では、異なるプライマーを組み合わせる必要がある。そこで、*Ph. nicotianae* 種特異プライマーを ITS 領域、*Ph. cactorum* 種特異プライマーを ras 関連のタンパク質遺伝子 *Ypr1* の塩基配列にそれぞれ焦点を当てて設計した。設計したプライマーの特異性を確認し、マルチプレクス PCR を行うことにより、菌体の純粋培養由来 DNA、土壌 DNA 両方からの検出と 2 種の識別ができた。さらに、本検出技術を使ってこの 2 種の病原菌の分布調査をイチゴの主要産地のある 8 つの道・県(岐阜、佐賀、奈良、栃木、千葉、静岡、山梨、北海道)の 89 のイチゴ畑について行ったところ、*Ph. nicotianae* が 2 県 4 圃場、*Ph. cactorum* が 2 県 2 圃場、両菌同時が 1 県 1 圃場で検出された。

*Ph. nicotianae* と *Ph. cactorum* の定量検出については、新たにプライマーを設計し

て TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を開発した。*Ph. nicotianae* と *Ph. cactorum* からの純粋培養 DNA の検出限界は、それぞれ 10 fg および 1 pg と高感度であった。

PCR 検出において生きている細胞と死んでいる細胞の区別は、多くの微生物学の研究にとって、非常に重要な課題になっている。すなわち、細胞が死んでも DNA が分解されずに残っていることにより、DNA に基づいた検出法では過評価になっている可能性がある。本研究では、Propidium 単アジ化物(PMA)およびエチジウム単アジ化物(EMA)を使用して、*Py. intermedium* の生細胞および死細胞を区別できる方法を検討した。PMA に基づいた処理では、死んだ細胞の DNA と PMA を十分反応し、残った PMA を不活性化するために、光処理装置は青い波長発光ダイオード(LED)を採用し、処理時間及び濃度を調整することにより、純粋培養サンプルで生死判別が可能になった。また、EMA 市販キットでも処理時間及び濃度を調整することにより、純粋培養サンプルから生死判別が可能になった。

本研究において、*Py. intermedium* では選択培地を使った定量法では労力、時間、熟練が必要であった定量が簡易、迅速にできるようにし、実用性まで評価した。また、*Ph. nicotianae* および *Ph. cactorum* でも定性・定量とも極めて困難であったが、それらが容易に可能となる技術を開発した。また、その検出法を使って日本における分布も調べている。このように本研究は新規性と応用性を包括した内容となっている。これらのことから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものとして認めた。

#### 基礎となる学術論文

1. Li, M., Senda, M., Komatsu, T., Suga, H. and Kageyama, K.: Development of real-time PCR technique for estimation of population density of *Pythium intermedium* in forest soils. Microbiol. Res. 165 : 695-705, 2010.
2. Li, M., Asano, T., Suga, H. and Kageyama, K.: A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum* and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan. Plant Dis. 95:1270-1278, 2011.