

(様式11)

論文審査の要旨（課程博士）

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主査 豊田 剛己 印

副査 橋本 洋平 印

副査 佐藤 令一 印

副査 安藤 哲 印

副査 片山 葉子 印

学位申請者	循環生産システム学 専修 平成20年度入学 学籍番号 08701391 氏名 須賀 有子
申請学位	博士（農学）
論文題目	DGGE法の土壤微生物生態研究への応用 Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method in soil microbial ecology

論文審査要旨（2,000字程度）

安全で高品質な農作物の持続的生産を行うためには、安定した地力の確保や連作障害等の克服が重要である。そのためには、土壤の性質、つまり化学性、物理性、生物性を把握し、適切な土壤管理を行う必要がある。土壤の生物性は、バイオマス、活性、群集構造（フロラ）から構成されるが、それぞれ関連し合っているため、この3つの観点から評価することが望ましい。しかし、バイオマス、活性に関する知見に比べて、群集構造に関する知見は少なく、特に農地土壤において、微生物がどのような群集構造を形成しているのか、その群集構造が栽培管理によってどのように変動するのか十分に明らかになっていない。そこで本研究は、微生物の群集構造解析法としてDGGE法を用いて、連作や施肥、土壤消毒、拮抗菌接種、前作栽培といった栽培管理が、農地土壤や栽培用培地の細菌および糸状菌の群集構造に及ぼす影響を評価することを目的として行った。

近畿中国四国農業研究センター（京都府綾部市）の雨よけハウスにおいて、ハウレンソウ萎凋病発病試験を行い、カラシナを用いた土壤還元消毒および消毒後のハウレンソウ連作が、萎凋病発病、土壤の糸状菌群集や化学性に及ぼす影響を調査した。カラシナを用いた土壤還元消毒は、夏季のハウレンソウ栽培で高い萎凋病発病抑制効果が見られたが、その効果は翌年の夏作まで持続せず、萎凋病が多発する夏作前には再度消毒処理を行う必要があると考えられた。土壤糸状菌群集は土壤還元消毒処理によって変動し、フスマ、カラ

シナ、エンバクといった用いる有機物の種類が、萎凋病菌接種量やハウレンソウ栽培回数よりも糸状菌群集の変動に影響することがわかった。カラシナを用いた土壌還元消毒処理によって、処理後土壌の交換性カリウム含量の増加が認められ、カラシナを用いる場合は、カリウム減肥について考慮する必要があると考えられた。

土壌の生物性は土壌病害の発生や抑制に大きく影響していると考えられる。そこで、土壌生物性を考慮した有機質資材施用法開発のための基礎的な知見を得るために、堆肥とワラ類の組み合わせ施用が生物性に及ぼす影響を評価した。生物性のうち、群集の多様性は、細菌、糸状菌ともに化成肥料単用に比べて、堆肥とワラの併用によって高まることがわかった。そこで、微生物群集の多様性の異なる土壌を用いたハウレンソウ萎凋病および株腐病菌発病試験を行い、微生物群集の多様性が発病におよぼす影響を評価した。その結果、萎凋病発病試験では、多様性が高かった堆肥、ワラ、化成肥料併用区では、多様性の低かった堆肥、化成肥料併用区に比べて、有意に発病率が低かった。また、株腐病発病試験においても同様の傾向が見られ、微生物群集の多様性がハウレンソウの土壌病害発病抑制効果に影響したことが示された。

土壌以外の栽培用培地として軽石培地を対象とし、トマトの養液栽培試験において、拮抗細菌接種や前作栽培が軽石培地やトマト根の細菌および糸状菌の群集構造に及ぼす影響を評価した。トマト根の微生物群集構造解析のための迅速・簡便な DNA 抽出法として、ビーズ法を用いた抽出法を開発した。また、トマト青枯病を対象とし、青枯病の拮抗細菌やリジン、シュクロースの添加が、トマト根の微生物群集構造および発病抑制効果におよぼす影響を評価した。青枯病発病率が最も低かった拮抗細菌 K20 株およびリジン添加区に特徴的な DGGE バンドが見られ、これらのバンドに相当する細菌種が発病抑制に関与したことが推察された。また、トマト以外の作物を前作として栽培した軽石培地を用いて青枯病発病試験を行い、前作物の種類が軽石培地の細菌群集構造および発病抑制効果に及ぼす影響を評価した。その結果、前作物がネギ、ニラ区では青枯病発病株率が低く、発病程度によって群集構造が異なる傾向が見られたことから、群集構造の違いが発病抑制に影響した可能性が示された。

他の栽培用培地としてスギ皮培地を対象とし、ユリのボックス栽培試験において、培地の種類や連作回数が糸状菌の群集構造におよぼす影響を評価した。培地の種類が群集構造の違いに最も影響し、同じ種類の培地ではユリの栽培回数の影響も見られ、ユリ栽培に伴う培地の化学性の違いが群集構造に影響したと考えられた。また、ユリ病原糸状菌の DGGE マーカーを作製し、スギ皮培地の潜在的な病害発生リスクの評価を試みたところ、どちらの培地もこれらの DGGE バンドはほとんど見られず、また栽培期間を通して病害は発生しなかったことから、3 連作行ってもスギ皮培地の病害発生リスクは小さいと考えられた。

以上のように、DGGE 法を用いて農地土壌や栽培用培地の微生物群集構造解析を行い、栽培管理が細菌や糸状菌の群集構造の変動に影響すること、また、その多様性が土壌病害発病抑制効果に影響することを明らかにした。今後、土壌の化学性、物理性だけでなく、生物性も考慮した土壌管理技術の開発に取り組んでいくことが必要だと考えられた。