

Real-time PCR を用いた土壌病害虫の診断法の開発と
くん蒸剤使用後の病害虫増加リスクの評価

2016. 9

東京農工大学大学院

生物システム応用科学府

生物システム応用科学専攻

兒山 裕貴

目次

第 I 章. 諸言.....	1
1. 食料増産の需要と減収の要因について	1
2. 土壌病害虫の化学的防除：農薬の種類について	2
3. 土壌病害虫の化学的防除：デメリットについて	4
4. 不必要な農薬の削減が進まない要因	6
5. 土壌伝染性病害虫の診断法	7
6. 土壌くん蒸剤が土壌微生物に与える影響の評価	8
7. 本論文の目的	9
第 II 章. キクに被害を及ぼす 3 種の植物寄生性線虫の検出法の開発	11
1. はじめに	11
2. 材料、方法、結果および考察	15
1) 4 種の植物寄生性線虫に特異的なプライマーの設計	15
1-1) プライマーの設計	15
1-2) プライマーの増幅性の確認 (クロスチェック)	23
1-3) Pkuma プライマーのリアルタイム PCR 条件の検討	26
2) 栽培前土壌中の採取および線虫密度の測定	27
2-1) 土壌の採取	27
2-2) 土壌からの DNA 抽出	28
2-3) 3 種の <i>Pratylenchus</i> の検量線の作成	32
2-4) 検出限界の決定	34

2-5) 土壌からの DNA 抽出法の検討.....	36
3) 栽培中の土壌線虫密度の測定、キクの生育調査および土壌物理・化学性の測定	37
4) 収穫前の土壌線虫密度の測定、キクの生育調査および土壌物理性の測定	42
5) 土壌からの DNA 抽出効率を表す内部標準の作成.....	45
6) くん蒸土壌における DNA 消失時期の特定	50
7) まとめ	53

第Ⅲ章 サツマイモネコブセンチュウの潜在的被害予測技術である幼苗検定の代替手法としての real-time PCR 法の開発

1. はじめに	55
2. 材料、方法、結果および考察	58
1) 供試圃場	58
2) 事前調査のための土壌採取	59
3) 土壌からの DNA 抽出	59
4) 植物寄生性線虫の同定	60
5) 供試圃場における土壌消毒の実施	62
6) 土壌消毒前後および栽培後の土壌採取.....	63
7) 土壌中の <i>M. incognita</i> の定量	63
7-1) <i>M. incognita</i> 定量のための検量線の作成；チューブ直接添加法	63
7-2) <i>M. incognita</i> 定量のための検量線の作成；土壌添加法	65

7-3) ベルマン法による <i>M. incognita</i> の抽出および計数 ...	68
8) キュウリ幼苗検定法	72
9) 圃場で栽培したトマト根のネコブ被害度の調査	78
10) まとめ	79

第IV章 2種の土壌くん蒸剤が土壌微生物群集と発病リスクに与える影響	81
1. はじめに	81
2. 材料、方法、結果および考察	82
1) 室内試験：室内くん蒸	82
1-1) 予備試験	82
1-2) くん蒸期間の検討	87
1-3) 処理濃度の検討 (2014TBC 土壌)	89
1-4) 処理濃度の検討 (2015THC 土壌)	94
1-5) くん蒸時の土壌水分の検討	96
1-6) 室内くん蒸が土壌微生物に与える影響の評価 (2016 土壌)	98
2) 室内試験： <i>Pythium aphanidermatum</i> の接種試験	106
2-1) 栽培期間中の水分条件の検討	106
2-2) 接種試験：プレ試験	108
2-3) 接種試験：くん蒸後の培養期間の検討	110
2-4) くん蒸直後の土壌を用いた接種試験 (2015年)	112
3) 室内試験：静菌作用の評価試験	114
4) MS25%処理土壌からの拮抗菌の単離	116

5) 圃場試験：年間を通した呼吸活性と ATP 含量および微生物バイオマスの推移	117
5-1) 2013 年	117
5-2) 2014 年	120
5-3) 2015 年	123
6) 圃場試験：硝化菌への影響 (2015 年)	129
7) 殺菌効果の比較 (<i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Pratylenchus penetrans</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i>)	132
8) くん蒸剤の殺菌効果に与える影響に関するまとめ	135
9) まとめ	136
第 V 章. 総合考察	138
第 VI 章. 摘要	147
謝辞	150
参考文献	152

第 I 章. 諸言

1. 食料増産の需要と減収の要因について

増え続ける地球の人口を支え続けていくためには、持続的な農業で安定して食料を生産していく必要がある。世界人口は 2014 年に 73 億人を超え、将来的には 2050 年には 97 億人を突破すると予測されている（図 I-1）（World Population Prospects, 2015）。この人口増加に伴って世界の食料需要量は 2000 年の 44.7 億トンから 2050 年には 69.3 億トンに増加すると言われている（図 I-2）（農林水産省、2016）。増え続ける食料需要量を賄っていくためには、農地の拡大が停滞気味である現在、より単位面積あたりの収量の高い農業生産を行っていく必要がある。単位収量を決める要因としては施肥量の増加、半矮性かつ耐肥性に優れた品種の改良、農作業の機械化といった収量を向上させるものと、その逆に収量を低下させる要因がある。本論文では後者の収量を低下させる要因に着目した。

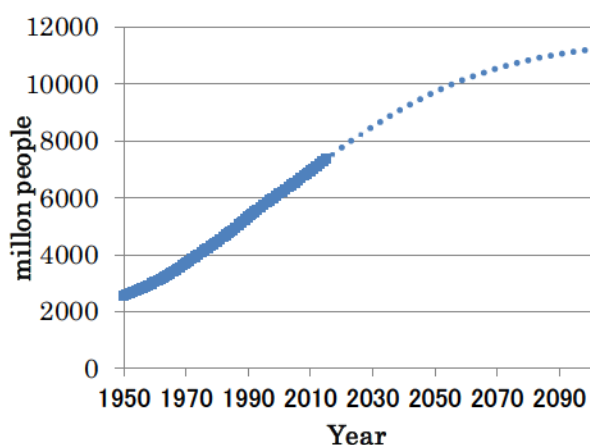


Fig. I -1. World population from 1950 to 2100. (World Population Prospects: 2015 Revision)

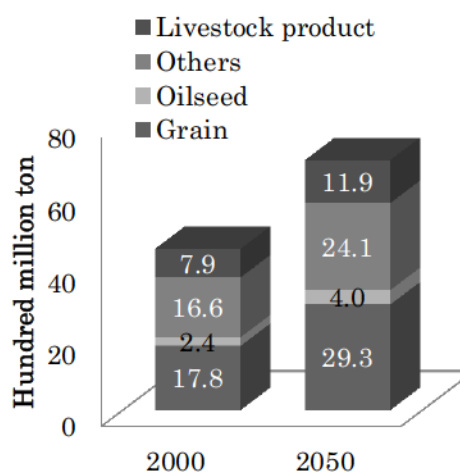


Fig. I -2. Change of food demand in the world (MAFF, 2016)

作物の収量が減少する主な要因は病虫害と雑草害である。Oerke et al. (1994)は世界の主要作物 8 品目（イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、綿花、コーヒー豆）について、病虫害と雑草害によってこれらの収量は世界平均で 42.1%減少していたと報

告している。また病害虫および雑草による経済的な損失については日本でも調査が行われている。水稻については1991年～1992年に調査が実施され、その結果、農薬を使用しなかった場合、20～30%の減収、出荷金額換算では20～40%の減収となった事例が多く見られ、同年に行われたダイズの調査でもおおむね30%以上の減収が見られた（日本植物防疫協会、1993）。

このように大きな損失をもたらす病害虫および雑草の防除には主に以下の4つの防除手段があげられる。一つ目は耕種的防除、すなわち品種や栽培時期の変更などの栽培管理技術による防除、二つ目は物理的防除、すなわち機械による雑草除去や太陽熱消毒などの土壌消毒法があげられる。三つ目は化学的防除、いわゆる農薬による防除である。農薬による防除は他の方法に比べて効果が高く、しかも省力的である。そして四つ目は天敵昆虫や微生物などを利用する生物的防除である（日本植物防疫協会、2008）。この中で最も普及している方法は化学的防除であり、本論文では特に土壌病害虫を防除するために使われる農薬について言及していく。

2. 土壌病害虫の化学的防除：農薬の種類について

土壌病害虫を防除する農薬には、土壌殺菌剤、殺線虫剤および土壌くん蒸剤などがある。

土壌殺菌剤について

殺菌剤は有害な菌（病原糸状菌、病原細菌）を防除する薬剤である。中でも土壌灌注や土壌混和によって土壌伝染性病原菌を防除するものが土壌殺菌剤である。日本では主に後述する土壌くん蒸や、有機リン系殺菌剤であるトルクロホスメチル（商品名：リゾレックス）、その他にフルスルファミド（商品名：ネビジン）、ヒドロキシイソキサゾール（商品名：タチガレン）、エクロメゾール（商品名：パンソイル）などが使われている。

殺線虫剤について

日本の畑作で主に使用される殺線虫剤は、接触型薬剤のホスチアゼ

ート（商品名：ネマトリン）、オキサミル（商品名：バイデート）、カズサホス（商品名：ラグビー）、イミシアホス（商品名：ネマキック）と、非接触剤（くん蒸剤）である 1,3-dichloropropene（商品名：D-D 剤）およびその混合剤がある。中でも接触型薬剤は線虫選択性が高く、作業性が簡便で残効性および速攻性があり、人畜および土壌微生物への影響が少ないとされている。接触型薬剤の作用機作は標的生物の神経伝達物質であるアセチルコリンを分解する酵素（アセチルコリンエステラーゼ）を阻害して死に至らしめる、あるいは線虫の植物根部内への侵入および摂食行動を低下させるとされている。

土壌くん蒸剤について

土壌くん蒸とは気体の薬剤を土壌に浸透させ、殺虫・殺菌を行うことである。殺菌作用の選択性は低く、細菌、糸状菌、線虫、土壌病害、雑草を適用範囲とする。日本で主に用いられている土壌くん蒸剤にはクロルピクリン（商品名：クロピク）、1,3-dichloropropene（商品名：D-D 剤）、メチルイソチオシアネート（以下 MITC、商品名：トラペックサイド）、ダゾメット（商品名：バスアミド）、メタムソディウム（またはカーバムナトリウム塩剤、商品名：キルパー）などがある。ダゾメットおよびメタムソディウムは土壌中で酸化分解して MITC となり気相や水相に拡散して効果を発揮する。クロルピクリンの作用機作は Insecticide Resistance Action Committee によればその他の非特異的（マルチサイト）阻害剤と分類されている。1,3-dichloropropene の作用機作は、標的（線虫）の酵素の求核反応の中心と化学結合することによって酵素活性を阻害するものと考えられている。MITC は生物体内で有効なガスが神経系を侵して殺菌力を発揮するか、循環器系ないし呼吸酵素系を破壊して効果が発現すると考えられている。

農薬出荷金額について、2014 年の農薬要覧（日本植物防疫協会，2015）では、殺線虫剤についてはホスチアゼートが 33.8 億円、オキサミルが 8.3 億円、イミシアホスが 9.3 億円、1,3-dichloropropene が 45.5 億円、その他の薬剤の混合剤が合計 7.1 億円であった。またくん蒸剤についてはクロルピクリンが 78 億円、ダゾメットが 38 億円、メタムソディウムが 2.6 億円であった（図 I-3）。また殺虫剤の合計出荷金額は 1214

億円、殺菌剤は 756 億円、農薬の総合計出荷金額は 3821 億円であった。よって殺線虫剤は農薬全体の約 2.7%、くん蒸剤は農薬全体の 4.5% の出荷金額を占めていることになる。

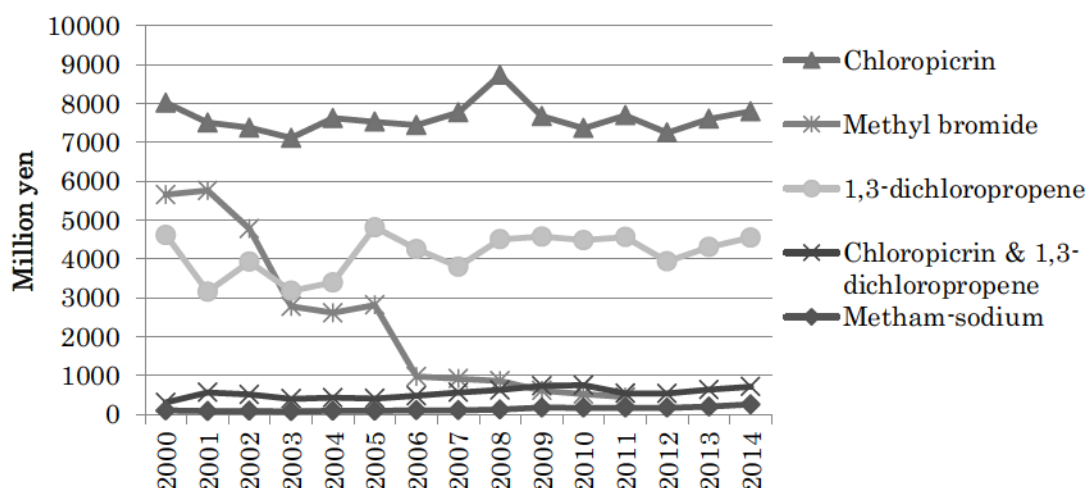


Fig. I -3. Change in the shipment value of fumigants in Japan (JPPA, 2015).

3. 土壌病害虫の化学的防除：デメリットについて

前述したように農薬による化学的防除は広く農業現場に普及しているが、その反面、使用には問題点もある。

消費者の動向

一つ目は消費者が農薬を使った慣行農産物より有機農産物を求める傾向にあるということである。農林水産省（2016b）の調査によれば、消費者の 18.0% が現在、有機農産物を購入しており、64.6% が購入したいと考えている。その理由には、有機農産物が安全であると思うから、環境に配慮した農業を行って欲しいから、などが挙げられている。農薬はその多くが生理活性を有する化学物質であり、その使用によって防除対象とする病害虫や雑草以外の作物、ヒトおよび環境に何らかの悪影響を及ぼす可能性がある。具体的には農薬を作物に散布する際の散布者および近隣住民への健康被害や、収穫物に残留した農薬による健康影響が考えられる。これらのリスクを避けるため、農薬の登録には科学的な評価が行われている。しかしその一方で、特に気化して

周辺に拡散する土壌くん蒸剤による悪臭被害や健康被害が報告されている（永美ら, 2015）。また、農薬の環境への影響評価は土壌微生物を対象としていない。

農薬分解菌の発生

殺線虫剤を含む化学農薬の問題点に、分解菌の集積による薬剤の不効化が挙げられる。すなわち、同じ薬剤を繰り返し使用した場合、その薬剤の分解菌が集積してしまうという現象（Enhanced Biodegradation）が起こりうる（Racke & Coats, 1988）。分解菌が集積してしまった圃場では、翌年同じ薬剤を使用することが出来ず、使える薬剤の幅が狭まっていく。殺線虫剤の分解菌発生の報告は、オキサミル（Read, 1987; Suett & Jukes, 1988）、カズサホス（Karpouzas et al., 2004）、ホスチアゼート（日野ら, 2010）についてなされている。

土壌微生物への影響

農薬の環境への影響は水生生物や鳥などへの毒性試験やラット、マウスへの残留農薬の毒性評価が行われているが、前述したように、農薬の登録は土壌微生物への影響評価を必要としない。その一方で、一般的にくん蒸剤、殺線虫剤、殺菌剤は土壌中の微生物群集に対して、標的、非標的生物に関わらず広範囲の生物に影響を及ぼすことが知られている（Killham, 1994）。

土壌微生物は土壌の肥沃度の維持、物質循環において不可欠である。土壌微生物は分解者として物質代謝に寄与しており、土壌の団粒化促進なども行う。また特異微生物（有用微生物群）は窒素固定、硝化、脱窒、リン溶解、鉄溶解、植物生育促進など様々な機能を持っている（和田ら, 2005）。さらに、土壌微生物が関与していると考えられている土壌機能の中に、土壌の発病抑止能および静菌作用（soil fungistasis）がある（de Boer et al., 2003）。静菌作用とは、大部分の土壌が糸状菌の胞子の発芽や菌糸の伸長をある程度阻害する現象の事であり、Dobbs&Hinson（1953）によって定義された。土壌の静菌作用には土壌の物理・化学的特性も関わっているが、それ以外にも土壌微生物の抗菌物質生産（Romine & Baker, 1973）や栄養・住み場所の競合（Lockwood, 1977）が原因とされている。すなわち、強力な薬剤や加

圧滅菌処理による消毒を行った土壌では微生物由来の土壌の拮菌作用が失われてしまう。そのような処理を行った土壌に病原菌を接種すると、消毒前の土壌と比べて病原菌が爆発的に増加する現象がモデル実験 (Toyota et al., 1996; Itoh et al., 2000) によって報告されている。この現象は農業現場でも確認されており、サラダナ生産地でくん蒸剤による土壌消毒を行っても栽培中に病原菌密度が 1000 倍に急増した報告がある (Nishimura, 2004)。また経験談として、くん蒸処理を慣例的に行っている地域では土壌病害が酷くなるが、くん蒸を行わない地域では大きな問題とならない、といった現象が知られている。このような、天敵やその他の競合種をも殺してしまう非選択性農薬を使用したことで、対象病害虫が農薬を使用しなかった場合より増えてしまう現象のことをリサージェンス (Pest Resurgence) という。多種、あるいは多量の微生物を含む土壌の方が病原菌の増殖を抑えられると一般的に考えられているため、リサージェンスを起こさせないためには、土壌中の生物群集を種類、量ともに健全に保つことが重要である。

以上のように人体・環境へ影響を与えることが懸念され、その影響は土壌病虫害被害を助長する可能性もあるため、農薬の使用量を減らすことが求められている。しかし、実際の生産現場では農薬が多用されている現実がある。

4. 不必要な農薬の削減が進まない要因

多くの生産者は保険的に農薬を使用している。すなわち、作物栽培中に病虫害が発生しては困るので、事前に農薬を使用するのである。しかし、豊田 (2012) の調査によって、生産者が例年農薬を使用しているダイコン圃場の中には、植物寄生性線虫が要防除水準以下 (5 頭/20 g 乾土以下) しか存在しない圃場が半数ほど存在することが明らかになった。農薬は農業を行う上で必要不可欠であるが、防除対象が被害をもたらすほどは存在しない圃場への不必要な農薬の使用は控えるべきである。ところが、このような不必要な農薬の削減はあまり現場では進んでいない。

不必要な農薬の削減が進まない原因には、土壌中に病害虫が存在す

るか診断することが容易でない点が挙げられる。また、生産者の意識の問題として、農薬が土壌微生物に与える影響のリスクを十分に理解していないこともあると考えられる。

土壌伝染性病害虫を防除するための農薬が本当に必要かどうかを判断するためには、各作付け体系において農薬を使用する前に土壌中に病害虫が存在するかどうか診断することが必要となる。しかし、後述する希釈平板法やベルマン法などの従来法による病害虫の診断は診断結果が出るまでに時間がかかってしまう。

よって、本論文では土壌伝染性病害虫の迅速診断法の開発を行うとともに、土壌くん蒸剤が土壌微生物に与える影響の評価を行った。

5. 土壌伝染性病害虫の診断法

土壌伝染性病害虫を検出する従来法としては、細菌、糸状菌に対する希釈平板法、植物寄生性線虫に対するベルマン法がある。また実際に検査対象土壌を用いて植物を栽培して被害度を調査する幼苗検定も行われている。しかし、希釈平板法は培地上で培養できない微生物を過小評価してしまうという欠点がある。ベルマン法については運動性のない、休眠体や卵の状態の線虫を集めることが出来ない点や、線虫顕微鏡を用いた形態学的観察は難しいという点が問題である。土壌から検出される線虫には植物寄生性線虫と、それ以外の糸状菌などを食べて生きる自活性線虫がおり、その違いは口針や口球の有無、活動性の違いといったわずかな差でしかない。特に *Meloidogyne* spp. のベルマン法を用いた線虫の計数はとても結果が変動しやすく、それ故、密度測定の目的には適さないとされている (Den Nijs & Van Den Berg, 2013)。また *Pratylenchus neglectus* についても、4つの研究施設間で物理的な線虫抽出後の計数結果が大きくことなった (Yan et al., 2013)。幼苗検定は植物に被害が起こるかどうかを知ることの出来る重要な診断法であるが、その一方で栽培に多量の土壌と長い時間を必要とすることが問題となっている (中田ら, 2015)。

近年、土壌微生物学の分野では分子生物学的な分析が盛んに行われている。土壌中の全生物の DNA (土壌 DNA) を抽出し、これを特定のプライマーによって PCR で増幅させ、その PCR 産物を用いて特定

のバンドの有無を調べる、バンドパターンを比較する (PCR-DGGE)、特定の生物の DNA を定量する (real-time PCR) ことなどが行われている。これらの手法は時間がかからず、また微生物の同定に熟練の技を必要としないなどの利点がある。一方で、定量といっても線虫については生育ステージによって DNA 量が異なるために正確な密度を求められない (Katsuta et al., 2015)、土性によって土壌 DNA の抽出効率が異なる (Zhou et al., 1996) ために異なる土性を持つサンプルを容易には比較できない、死んだ生物の DNA までも検出してしまう (Toyota et al., 1999; Kowalchuk et al., 2003; 星野ら, 2004) などの問題がある。よって、これらの問題を解決した手法の開発が必要である。このうち、本論文は土性間の抽出効率の違いおよび死んだ生物由来の DNA 誤検出について、問題の解決を試みた。

6. 土壌くん蒸剤が土壌微生物に与える影響の評価

土壌中の微生物群集がどのような構造を形成し、どのように機能し、さらにはそれらが様々なインパクトによりどう影響を受けるのかは、注目を集めている研究分野である。中でも選択性の低い土壌くん蒸剤によって土壌微生物が受ける影響は大きいと推察されるため、特に近年普及し始めた新たな土壌くん蒸剤の影響評価は必要不可欠である。2005 年にそれまで主要土壌くん蒸剤として使われてきた臭化メチルがオゾン層破壊物質として位置づけられたために廃止され、それによって他のくん蒸剤の使用が増加している。近年、これらのくん蒸剤が土壌微生物群集に与える影響についての研究が行われてきている (Klose et al., 2006; Xie et al., 2015; Mocali et al., 2015)。

土壌中の微生物を調査する最も一般的な手法は培養法によるものであるが、微生物の大部分が培養法では培養できないという問題を抱えている。培養法によらない解析方法として、バイオログ法、キノンプロファイル法、リン脂質脂肪酸分析 (PLFA)、および土壌抽出 DNA を用いた分析法がある。本論文ではこのうち、土壌抽出 DNA を用いた分析法を用いた。

第IV章で取り上げる土壌くん蒸剤は、クロルピクリン (商品名クロピク、以下 CP) とメタムソディウム (またはカーバムナトリウム塩、

商品名キルパー、以下 MS) の 2 種である。CP は土壤中の細菌、糸状菌、線虫、土壌害虫を防除でき、かつ浸透性が高いため、適用作物の多い土壌くん蒸剤として日本で広く使われている。一方で殺菌効果が高く、無害・有益な微生物まで皆殺しにしてしまうのではないかとといった土壌環境に与える影響が懸念されている。また刺激臭が極めて強く、生産者が取り扱いにくいという問題点もある (渡邊ら, 2002)。そこで、CP の代替薬剤として刺激臭の少ない MS が検討されている。CP の病害虫に対する殺菌効果と MS の有効成分である MITC の殺菌効果は同等であるという報告がなされているが (Harris, 1990; Gilreath et al., 1994; Csinos et al., 1997)、微生物群集構造への影響を直接比較した研究例はない。

また、CP と MS についてリサーチエンスを報告した例は、渡邊ら (2002) の一例だけである。渡邊ら (2002) は CP と MS を使用した圃場の 1~2 年後のハクサイ黄化病の発生を調査したところ、MS 使用圃場での黄化病の発生は CP 使用圃場と比較して少なくなったことを報告している。しかしこの研究は現場で起きた現象の報告のみであり、その明確な要因までは調査されていない。

リサーチエンスが起こる要因は、前述したように強力な薬剤や加圧滅菌処理による消毒を行うと微生物由来の土壌の静菌作用が失われてしまうためと考えられている (Toyota et al., 1996; Itoh et al., 2000)。しかし、これまでの研究は病原菌の菌密度の増加にのみ着目しており、この爆発的増加が果たして本当に植物に病虫害を引き起こすのかまでは研究されていない。

7. 本論文の目的

本論文の目的は大きくわけて 2 つある。すなわち、不必要な農薬の使用を削減するため、土壌病害虫の迅速診断法を開発することと、くん蒸剤使用後の病害虫増加リスクを評価することであった。このうち迅速診断法の開発については、1) キクを加害する植物寄生性線虫の real-time PCR を用いた定量法の開発、2) サツマイモネコブセンチュウの潜在的被害予測技術である幼苗検定の代替手法としての real-time PCR 法を開発を行った。また病害虫増加リスクの評価につ

いては、2種のくん蒸剤（CPおよびMS）が土壌の本来持っている病害抑止性や静菌作用に与える影響を調べた。

第Ⅱ章. キクに被害を及ぼす 3 種の植物寄生性線虫の検出法の開発

1. はじめに

キク (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat) はキク科キク属の多年草である。日本で観賞用多年草植物として発展した品種群を和菊、西ヨーロッパで育種されて生まれた品種群を洋菊と呼ぶ。本論文では特に断りのない場合、キクとは和菊のことを指す。キクは秋に咲く花であるが、短日性植物で、電照などを用いた作型の分化により周年供給されている。日本で生産されているキクは、花の直径、花のつき方によって分類される。すなわち、花の直径が 20 cm 前後で一つの枝に対して一輪だけ咲かせる「大菊（輪菊）」、花の直径が 1～3 cm 程度の「小菊」、花の直径が 3～6 cm 程度で小枝の先に多数の花を付ける「スプレー菊（スプレーマム）」がある。

日本の主なキクの生産地は愛知県、沖縄県、福岡県、鹿児島県、長崎県である。特に愛知県（総作付面積 128 ha、年間出荷量 5 億本）および沖縄県（総作付面積 83 ha、年間出荷量 3 億本）で全国の約 50% の生産量を担っている（農林水産省, 2015）（図Ⅱ-1）。

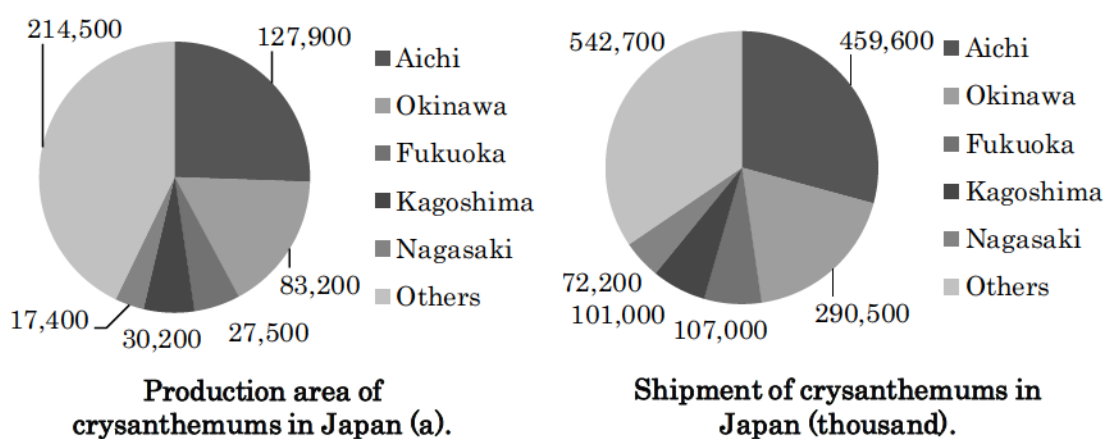


Fig. II -1. Production area and shipment of chrysanthemums in Japan in 2014 (MAFF, 2015).

キクは種子ではなく挿し芽によって繁殖する。多くの植物は発芽した種子の幼根に由来する根系以外に茎などの他の部分から不定根を形成する能力を有する。この性質を利用して均一な形質を有する植物個体を再生させ、増殖する技術を挿し芽（挿木）繁殖という。人間にとって有用な形質をもつ個体から、若い分枝の先端を採取して挿穂にして不定根の発生を誘導し、繁殖させるのである（萩原, 2006）。

キクの栽培体系は、まず初めに親株を定植して挿穂を採取できるように生育させる。その後、収穫時期に合わせて挿穂を定植し、数ヶ月栽培する。特に沖縄県では正月および3月の彼岸に向けた出荷が盛んであり、秋定植・冬収穫のパターンが多くみられる。そして、収穫から次の定植の間までにくん蒸剤や殺線虫剤による土壌消毒が多くの圃場で行われている。

キクの品質は草丈、花の大きさ、花の数および葉の色で決まり、病害虫被害および生理障害がこれを低下させる要因となる。キクの病害虫には、植物寄生性線虫、アザミウマやハダニ類などの害虫、白さび病を引き起こす糸状菌 *Puccinia horiana* Hennings、半身萎凋病を引き起こす糸状菌 *Verticillium dahliae* Klebahn、わい化病を引き起こすウイルス *Chrysanthemum stunt viroid* などが知られている（高知県農業振興部）。

ネグサレセンチュウ属 (*Pratylenchus* spp.) のいくつかの種がキクを加害するものとして世界中で報告されている (Hasan, 1988; Kim & Minagawa, 1996; Choi et al., 2006; Han et al., 2006; Uesugi et al., 2009; Deimi et al., 2009)。 *P. penetrans* (Cobb) はキクを含む多くの花きを加害することで知られている (Bridge & Starr, 2007)。また *P. pseudocoffeae* Mizukubo と *P. kumamotoensis* Mizukubo et al. は日本のキク圃場で初めて同定された線虫であり (Mizukubo, 1992; Mizukubo et al., 2007)、前者はその後イランのキクの温室および露地圃場でも見つかっている (Deimi et al., 2009)。

キクの線虫害の症状は根腐れを伴う生育阻害および地上部の黄化である (Mizukubo et al., 2007)。日本では、これらの症状がみられる圃場に対して様々な防除法、すなわち土壌くん蒸剤によるくん蒸、ホスチアゼート（商品名：ネマトリン）など殺線虫剤の使用およびあるいはマリーゴールドなどの対抗植物の栽培などが行われている。しかし、

植物体の生育阻害および黄化現象は水はけの悪さなどの土壌物理性の悪化によって引き起こされる場合もある。よって、適切な対策を行うためには、防除を行う前に土壌中に線虫が存在するのかどうかを診断する手法が必要となる。特に土壌抽出 DNA を用いた線虫の土壌診断技術は、ダイコンを加害する *Pratylenchus penetrans* (Sato et al., 2011)、ナスを加害する *Meloidogyne incognita* (Watanabe et al., 2013)、レンコンを加害する *Hirschmanniella diversa* (Koyama et al., 2013) において報告されているが、本章の研究を始める時点では、まだキクを加害する *Pratylenchus* 属を検出するプライマーの設計や、キクを栽培している沖縄の粘土質の土壌における定量法の開発は行われていなかった。

Pratylenchus 属に侵された圃場にはしばしば 1 種以上の *Pratylenchus* 属が存在する (Uesugi et al., 2009)。3 種の *Pratylenchus* 属 (*P. penetrans*, *P. pseudocoffeae*, *P. kumamotoensis*) の増殖効率は種間で異なる。Uesugi et al. (2011, 2012) は、*P. kumamotoensis* の増殖率は *P. penetrans* の増殖率の 193 倍であり、また *P. pseudocoffeae* の増殖率も、*P. penetrans* の増殖率より高いと報告している。これらの結果は、単純に植物寄生性線虫の頭数を測定するだけでは起こりうる被害を過大あるいは過小評価してしまうことを示唆している。それゆえ、植物寄生性線虫のキクに対する適切な防除を行うには、これらの 3 種の *Pratylenchus* 属を区別して定量することが重要である。

Pratylenchus 属の種の同定は形態学的手法 (Mizukubo et al., 2007) だけでなく、分子生物学的手法、例えば PCR-RFLP 法 (Uesugi et al., 2009) によっても行われている。PCR-RFLP 法は土壌からベルマン法などによって抽出した線虫を同定するうえで信頼性が高く、迅速に行える手法であるが、一方で土壌中に存在する *Pratylenchus* 属の密度を直接定量することは出来ない。土壌中密度の直接定量法については、real-time PCR を用いて *P. penetrans* を灰色低地土 (Sato et al., 2010) や黒ボク土 (Sato et al., 2011) において定量していたが、*P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* についての報告例は本論文の実験を開始する時点では存在しなかった。

分子生物学的手法にはメリットとデメリットがある (Min et al.,

2012)。メリットには、例えば線虫の同定において実験者の技術や形態学的知識は要求されないという点や、休眠体やシストのような運動性のない状態の線虫も検出出来る点がある。一方で、デメリットには線虫の生育ステージを区別することが出来ないという点や、生きている生物だけでなく、死んだ生物も検出してしまうという点がある (Toyota et al., 1999; Kowalchuk et al., 2003)。特に土壌くん蒸剤などを用いて消毒した土壌から得られた DNA が、死んだ微生物由来のものなのか判断できないという問題がある (星野ら, 2004)。星野ら (2004) の研究では、消毒土壌から DNA および RNA を抽出して PCR-DGGE を行った結果、消毒直後の土壌では DNA と RNA を用いた場合でバンドパターンが大きく異なった。このことは、DNA による PCR-DGGE では消毒直後において死滅した菌の DNA を評価していたことを示唆した。土壌くん蒸剤による消毒は日本のキク圃場でしばしば行われている。よって、死んだ線虫の DNA がどの程度の期間、土壌中に残存するのかどうかは、土壌消毒を行う圃場で DNA 分析による密度定量を行う場合に重要な問題である。死んだ線虫由来の DNA の土壌残存期間については、死んだ *Meloidogyne incognita* (二期幼虫) の DNA は添加後 10 日間で 92% 減少したこと (Min et al., 2011) や、*Phasmarhabditis hermaphrodita* の DNA は線虫の死後 8 日後以降は検出されなくなったこと (MacMillan et al., 2006) が報告されているが、これらは土壌消毒処理を行わなかった土壌についての結果である。消毒後の土壌中は微生物が大幅に減少するため、死んだ線虫由来の DNA の分解挙動は非消毒土壌中の挙動とは異なる可能性が考えられる。

また、沖縄県では理化学性が大きく異なる 4 タイプの土壌が分布している (久場, 1993)。土壌からの DNA 抽出は土壌の性質や抽出方法によって抽出効率が異なる (Li et al., 2015) ため、異なるタイプの土壌から検出された real-time PCR の値には抽出効率の補正をかける必要があると考えられた。しかし、本論文の実験を始める前には DNA 抽出効率を求めるための手法は確立されていなかった。

本章の目的は、キクを加害する植物寄生性線虫の定量法を開発することであった。具体的には、1) *P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* の種特異的プライマーを設計し、2) キク圃場における *P. penetrans* を含めた 3 種の *Pratylenchus* 属の定量法を確立した。

また、3) 死んだ線虫の DNA がくん蒸土壌および非くん蒸土壌でどのように残存するのかを調査するとともに、4) DNA 抽出を行う際の内部標準の作成を試みた。

2. 材料、方法、結果および考察

1) 4 種の植物寄生性線虫に特異的なプライマーの設計

1-1) プライマーの設計

沖縄のキク圃場に存在する可能性がある植物寄生性線虫として、*P. penetrans*、*P. pseudocoffeae*、*P. kumamotoensis*、*P. coffeae*、*P. vulnus*、*P. neglectus*、*P. brachyurus*、*P. zae* および *Helicotylenchus dihystra* (ナミラセンセンチュウ：中園ら、1984) を対象に研究を行った。このうち、*P. penetrans* (Sato et al., 2007)、*P. neglectus* (Yan et al., 2008)、*P. brachyurus* (Machado et al., 2007)、*P. zae* および *H. dihystra* (Kawanobe et al., 2015) については既存の real-time PCR 用種特異的プライマーの報告があるため (表 II-1)、3 種の *Pratylenchus* (*P. pseudocoffeae*、*P. kumamotoensis*、*P. coffeae*) について種特異的プライマーを作成した。なお、*P. vulnus* については種特異的プライマーを作成することが出来なかった。

Table II -1. List of primer sets using in this chapter.

Target nematode	Primer set	Forward primer (5'→3')	Revers primer (5'→3')	Reference
<i>Pratylenchus penetrans</i>	NEG	ATTCCGTCGGTGG TTGCTATG	GCCGAGTGATCC ACCGATAAG	Sato et al. (2007)
<i>P. neglectus</i>	PNEG-F 1 & D3B5	CGCAATGAAAGT GAACAATGTC	AGTTCACCATCTT TCGGGTC	Yan et al. (2008)
<i>P. brachyurus</i>	18S & ACM7R	TTGATTACGTCCC TGCCCTTT	GCWCCATCCAAA CAAYGAG	Machado et al. (2007)
<i>P. zaeae</i>	Pzeae	TCTCGGTGTAAGA GCTGGTCATC	CCACTTGCGTGG CACTTCA	Kawanobe et al., 2015
<i>Helicotylenchus dihystera</i>	Hdihy	TTTAAGCGTTGCT CGGCTGTC	AGTTCAGCGGGT GTTACGTC	Kawanobe et al., 2015
<i>P. pseudocoffeae</i>	Ppcof	TTCCGACCCGTCT TGAAACA	CACATCAGCTCCG GATGGATA	Koyama et al., (2016)
<i>P. kumamotoensis</i>	Pkuma	CGTGAAACCGAT GAGATGGAAAC	CAATGGGAGTGC GGATGAATAC	Koyama et al., (2016)
<i>P. coffeae</i>	Pcoffae	TTTCCGACCCGTC TTGAAAC	ATCGCACGTTGGC TCCTAAC	This study

<方法>

3種の *Pratylenchus* 属のプライマーはデータベース GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) から得られた 28S rRNA 中の D2/D3 領域の塩基配列情報を基に作成した。まず初めにデータベース上に D2/D3 領域の塩基配列情報が登録されている *Pratylenchus* 属

の線虫 28 種について系統樹を作成した (図 II-2)。そこから 3 種の *Pratylenchus* 属の最近縁種を決定して、これらの最近縁種および沖縄のキク圃場に存在する可能性がある *Pratylenchus* (*P. coffeae*, *P. zaeae*) を対象にして、ターゲット線虫の塩基配列のみを特異的に増幅するプライマーを設計した (表 II-2, 3, 4)。プライマーの設計は、*P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* については Perfect Real Time Primer 設計サービス (Takara) を用いて、*P. coffeae* については Primer3plus (<http://primer3plus.com/>) を用いて行った。以下に *P. coffeae* のプライマーの設計方法を記す。

P. coffeae の近縁種である *P. speijeri*、*P. gutierrezii*、*P. pseudocoffeae*、*P. scribneri*、*P. agilis*、*P. araucensis*、*P. parafloridensis*、*P. floridensis* および *P. hippeastri* の塩基配列を Clustal W (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) にかけて、塩基配列が異なる箇所を選び出した。*P. coffeae* の塩基配列を Primer3plus に入力して、塩基配列が異なる箇所が forward あるいは reverse プライマーになるように増幅箇所を指定してプライマー設計を行った。Primer3plus は Server setting を qPCR にして、その他の設定はデフォルトのまま行った。選定されたプライマー配列候補を前述した Clustal W の結果を照らし合わせて forward あるいは reverse プライマーの 3'末端から 10 塩基以内に 2 塩基以上の違いがあるかどうか確認した。プライマー配列候補を GenBank から得た *P. coffeae* の塩基配列 (日本由来 9 件、中国由来 34 件、アメリカ由来 28 件) と照らし合わせて塩基配列に違いがないか確認した。

また Sato et al. (2007) は ITS 領域を元に作成した *P. penetrans* のプライマーの特異性を *P. coffeae* のみと比較していたため、前述した沖縄のキク圃場に存在する可能性がある *Pratylenchus* 属の ITS 領域との比較も行った。この塩基配列情報は前述したジーンバンクを用いて収集した。

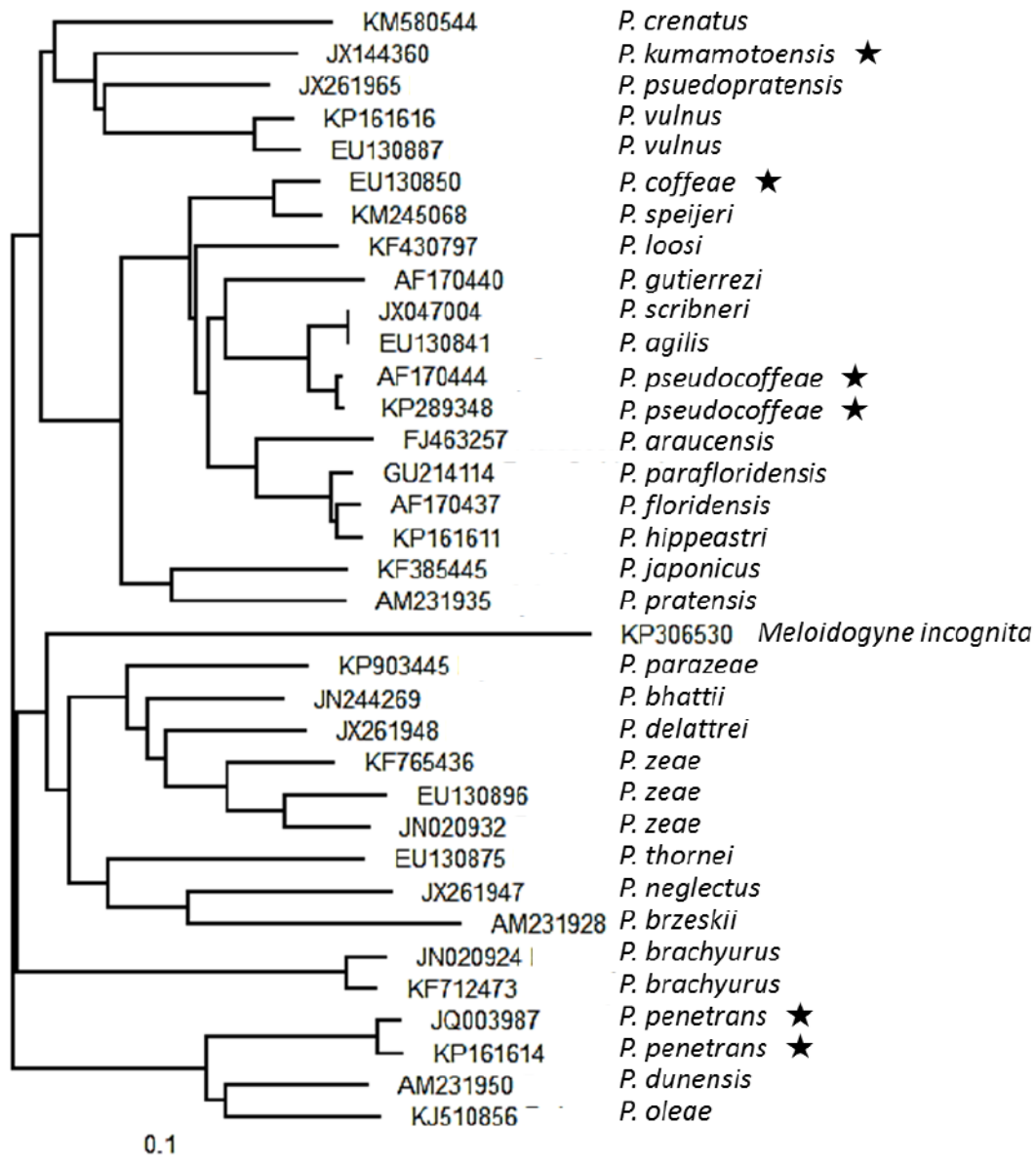


図 II -2. Phylogenetic tree of *Pratylenchus* 28 species (nuclear 28S rDNA gene sequences). ★ means target nematodes to design the primer sets which specificity was confirmed.

Table II-2. Comparison of the sequences in the positions of specific primers for *Pratylenchus pseudocoffeae* used in this study.

Target nematode	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
	PpcofF (TTCCGACCCGTCTTGAAACA)	PpcofR (CACATCAGCTCCGGATGGATA)
<i>P. pseudocoffeae</i> (AF170444)	TTCCGACCCGTCTTGAAACA	CACATCAGCTCCG-GATGGATA
<i>P. scribneri</i> (JX047004)T.....AGC.....
<i>P. agilis</i> (EU130841)T.....AGC.....
<i>P. kumamotoensis</i> (JX144360)	A.....	...G...T.....T-TGC.....
<i>P. penetrans</i> (JQ003987)	A.....	...G...GTA...T-TGC...TT
<i>P. thornei</i> (EU130875)	A.....	...G...G.....C-AG...TG
<i>P. neglectus</i> (JX261947)	A.....	...G...T...CT-TT...C-AGG...
<i>P. vulnus</i> (KP161616)	A.....	...G.....TT...C...TG
<i>P. brachyurus</i> (JN020924)	A.....A.....TT...C...GG
<i>P. zaeae</i> (JN020932)	C.....CA-TT...C-TGGC
<i>P. coffeae</i> (EU130850)G-TG.....TA...C...A

Numbers in parentheses after the species names indicate the accession number, hyphens indicate deletion of the corresponding base and dots indicate the same base as the target species.

Table II -3. Comparison of the sequences in the positions of specific primers for *Pratylenchus kumamotoensis* used in this study.

Target nematode	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
	PkumaF (CGTGAAACCGATGAGATGGAAAC)	PkumaR (CAATGGGAGTGCGGATGAATAC)
<i>P. kumamotoensis</i> (JX144360)	CGTGAAACCGATGAGATGGAAAC	CAATGGGAGTGC-GGATGAATAC
<i>P. pseudopratis</i> (JX261965)	·G····TCAGAT···C·····
<i>P. vulnus</i> (EU130887)C.....	TG·CAATT·GAT···C·····
<i>P. pseudocoffeae</i> (AF170444)	··GC·ACC·CATAA·C·····G·
<i>P. penetrans</i> (JQ003987)G.....	TC·CAAC·A····A·T·····
<i>P. neglectus</i> (JX261947)G.....	·GCC·ACCTC···A·····G·
<i>P. brachyurus</i> (KF712473)G.....	GTTACACCAC···A·C·····
<i>P. zae</i> (EU130896)	ACT·CCCGC·AGCG·T·····
<i>P. zae</i> (JN020932)G.....	GCT·CCCGGAGCG·T·····
<i>P. coffeae</i> (EU130850)	AGCGACCGCACA-A·C·····G·

Numbers in parentheses after the species names indicate the accession number, hyphens indicate deletion of the corresponding base and dots indicate the same base as the target species.

Table II-4. Comparison of the sequences in the positions of specific primers for *Pratylenchus coffeae* used in this study.

Target nematode	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
	PcoffaeF (TTTCCGACCCGTCTTGAAAC)	PcoffaeR (ATCGCACGTTGGCTCCTAAC)
<i>P. coffeae</i>		
<i>P. coffeae</i> (EU130851)	TTTCCGACCCGTCTTGAAAC	ATCGCACGTTGGCTCCTA-AC
<i>P. speijeri</i> (KM245068)
<i>P. gutierrezii</i> (AF170440)C.....G·A·T
<i>P. pseudocoffeae</i> (AF170444)C.....G·A·T
<i>P. scribneri</i> (KT873859)C.....C.....G·A·T
<i>P. agilis</i> (EU130841)G·A·T
<i>P. araucensis</i> (FJ463258)	G.....A·CA·T...G·-G·
<i>P. parafloridensis</i> (GU214114)	G.....A·CA·T...G·-G·
<i>P. floridensis</i> (AF170437)	G.....A·CA.....GG-AT
<i>P. hippeastri</i> (KP161611)	G.....A·G·CGA

Numbers in parentheses after the species names indicate the accession number, hyphens indicate deletion of the corresponding base and dots indicate the same base as the target species.

< 結果および考察 >

プライマーの特異性は 3'末端にミスマッチがあるかどうか重要であると議論されており (Bru et al., 2008; Isenbarger et al., 2008; Lee et al., 2008)、Kawanobe et al. (2015) は 3'末端から 10 塩基以内に 2 塩基以上のミスマッチがあることで増幅効率は 1%以下になると結論付けている。本論文で作成したプライマーの特異性は、Ppcof プライマーおよび Pcoffae プライマーについては 3'末端から 10 塩基以内に 2 塩基以上のミスマッチがあったため (表 II-2、4)、近縁種を増幅しないと考えられた。一方、Pkuma プライマーについては、リバープライマーの 3'末端から 10 塩基以内に *P. pseudopratensis* および *P. vulnus* との塩基配列の違いが 1 塩基しかなかったため (表 II-3)、タ

ーゲットである *P. kumamotoensis* の増幅効率に対して、1%以上の効率で誤検出が起こってしまう可能性が考えられた。すなわち、100 頭の *P. pseudopratis* あるいは *P. vulnus* が乾土 20 g 中に存在すると、Pkuma プライマーは *P. kumamotoensis* が 1 頭/20 g 乾土以上存在すると誤検出してしまう可能性がある。*P. pseudopratis* はソビエト連邦のイチゴ (Bezerova & Pokhodenko, 1978)、韓国のツバキ (Kim & Minagawa, 1996)、南アフリカのキビヤアカシア (Villenave & Cadet, 1998)、トルコのジャガイモ (Akgul et al., 2010)、イランの雑穀 (Taheri et al., 2013) から検出された報告があるが、日本での報告はまだない。一方、*P. vulnus* は韓国のキク圃場から検出された報告があり (Han et al., 2006)、日本でも千葉県 of イチゴ圃場 (植松ら, 1982)、佐賀県のイチゴ圃場 (阿部 & 百武, 1981)、北海道 (山田 & 高倉, 1995)、九州地方 (岩堀, 2010) で報告されている。よって、Pkuma プライマーが *P. vulnus* を誤検出してしまう確率の検討は非常に重要な課題であると考え、後述するクロスチェックを行った。

P. coffeae の ITS 領域の塩基配列情報はデータベースに多数登録されている。そのうち日本由来 9 件、中国由来 34 件、アメリカ由来 28 件と照らし合わせて塩基配列に違いがないか確認したところ、フォワードプライマーあるいはリバースプライマーにミスマッチがある塩基配列が、日本由来のもので 5 件、中国由来のもので 3 件、アメリカ由来のもので 5 件あった。しかし、塩基配列の違いは 3'末端から 10 塩基以上離れた部位であり、あるいは 10 塩基以内であっても違いは 3'末端から 3 番目の 1 塩基のみ、または 10 番目の 1 塩基のみであったため、これらのミスマッチのある系統も Pcoffeae プライマーは検出されると考えられる。

また Sato et al. (2007) が作成した *P. penetrans* のプライマーの特異性を検討した (表 II -5)。NEG プライマーの特異性は、*P. zea* (JN020933) に対してフォワードプライマーの 3'末端から 10 塩基以内 1 塩基しかミスマッチがなかったため、この線虫を誤検出してしまう可能性があった。しかし、*P. zea* の ITS 領域についてのジーンバンクへの報告はあわせて 14 件あるが、該当箇所にミスマッチが 1 塩基しかない報告はこの JN020933 のみであり、他の 13 件はすべて 2 塩基のミスマッチがあった。JN020933 は日本での報告ではなく USA のサ

イパンで採取された *P. zaeae* についての報告であったことから、日本において NEG プライマーが *P. zaeae* を誤検出する可能性は 1% 以下と判断した。

Table II-5. Comparison of the sequences in the positions of specific primers for *Pratylenchus penetrans* used in this study.

Target nematode	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
	NEGf	NEGr
<i>P. penetrans</i>	(ATTCCGTC CGTGGTTGCTATG)	(GCCGAGTGATCCACCGATAAG)
<i>P. penetrans</i> (JX046955)	ATTCCGTC CGTGGTTGCTATG	GCCGAGTGATCCACCGATAAG
<i>P. zaeae</i> (JN020933)	TC·T··········G···	····················
<i>P. zaeae</i> (JN020935)	TC·T··········TG···	····················
<i>P. vulnus</i> (JX046962)	TCGT··········C···A···	····················
<i>P. pseudocoffeae</i> (LC030337)	TC·T··········C··TG···	····················
<i>P. kumamotoensis</i> (LC030319)	TC·T··········C··TG···	····················
<i>P. coffeae</i> (LC030409)	TA·T··········C··TG···	····················
<i>P. neglectus</i> (LC030328)	T··T··········C··TG···	····················
<i>P. brachyurus</i> (JN020928)	····················TG···	····················

Numbers in parentheses after the species names indicate the accession number and dots indicate the same base as the target species.

1-2) プライマーの増幅性の確認 (クロスチェック)

<材料および方法>

プライマーの特異性を線虫の DNA を用いて確認した。*P. penetrans* (MAFF: 108086) および *P. coffeae* (MAFF: 108146) は農業生物資源ジーンバンク NIAS より購入し、*P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* はこれらの線虫に汚染された土壌を上杉氏 (国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構) より、*P. vulnus* は線虫に汚染された土壌を武藤氏 (アグロカネショウ) より分譲して頂いた。

線虫に汚染された土壌 5~10 g からベルマン法 (Ingham, 1994) (2 日間室温) で各線虫を抽出した。線虫懸濁液として購入した *P. penetrans*、*P. coffeae* と合わせて、これらの線虫の一頭釣りを行った (4 連)。一頭釣りは岩堀ら (2000) の方法をわずかに変えて行った (Koyama et al., 2013)。変更点はろ紙で押しつぶした線虫を緩衝液 4 μL (10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1% Nonidet P-40) とプロテネース K 1 μL に添加するのではなく、10 μL のプロテネース K (100 mg/L プロテネース K、Lysis solution (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA(pH 8.0), 1% IGEPAL CA-630)) に添加した点である。具体的な手法を以下に記す。

少量の線虫懸濁液 (10~100 μL) をピペットでガラススライド上に取り出し、そこから対象の線虫を一頭だけ縫い針で溶液外に引っ張り出した。線虫の体の周辺についている水分が乾くのを待ってから、オートクレーブ滅菌した No.5C ろ紙片 (約 1×1 mm) を線虫の上に乗せて押しつぶした。線虫のついたろ紙片を滅菌済み 200 μL チューブに入れて、そこに 10 μL プロテネース K を加えた。プロテネース K は 20 mL のオートクレーブ済み Lysis solution (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630) に 2 mg のプロテネース K を加えて作成した。線虫を入れた 200 μL チューブを -25°C のフリーザーで 15 分以上冷凍させた後にサーマルサイクラー (TaKaRa, TP-600) にかけた。条件は (65°C 1 時間、98°C 10 分) とした。

得られた線虫懸濁液を滅菌蒸留水で 10 倍希釈して real-time PCR にかけた。real-time PCR の条件は NEG 条件 (95°C 20 秒、(95°C 3 秒、62°C 30 秒 (0.2°C/秒)) × 40 サイクル) とした。なお、サンプルの組成等のプロトコールは表 II-6 に記す。この条件は第 II 章~第 IV 章の real-time PCR 分析を行う際、常に同じものとした。

・ real-time PCR のプロトコール

機械名： StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies Japan)

Table II-6. Composition of mixture for real-time PCR

Fast SYBR® Green Mster Mix (Life Technologies Japan)	5 µL
Forward primer (10 µM)	4 pmol/ 0.4 µL
Reverse primer (10 µM)	4 pmol/ 0.4 µL
Sterilized distilled water	2.2 µL
Template DNA	2 µL
Total	10 µL

< 結果と考察 >

線虫の一頭釣り DNA を用いたプライマーのクロスチェックの結果を表 II-7 に示す。

供試した 5 種の *Pratylenchus* 属に対して、NEG プライマー、Ppcof プライマーと Pcoffaeae プライマーはターゲット線虫の DNA のみを増幅した。しかし、Pkuma プライマーは前項目で指摘した通り対象外の線虫である *P. vulnus* の DNA を *P. kumamotoensis* の増幅効率に対して 4.7% の効率で増幅した。すなわち、土壌中に 100 頭/20 g 乾土の密度で *P. vulnus* が存在した場合に Pkuma プライマーは 4.7 頭/20 g 乾土の *P. kumamotoensis* が存在すると誤検出することになる可能性があった。

Table II-7. Ct values of *Pratylenchus penetrans*, *P. pseudocoffeae*, *P. kumamotoensis*, *P. vulnus* and *P. coffeae* using four kinds of specific primer sets.

Primer	<i>P. penetrans</i>		<i>P. pseudocoffeae</i>		<i>P. kumamotoensis</i>		<i>P. vulnus</i>		<i>P. coffeae</i>	
	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
NEG	23.4±0.5	77.2	ND		ND		ND		ND	
Ppcof	ND		22.9±0.3	77.4	ND		ND		ND	
Pkuma	ND		ND		24.9±0.3 (100%)	74.5	31.1±0.5 (4.7%)	73.9	ND	
Pcoffae	ND		ND		ND		ND		24.4±0.9	79.2

ND, not detected.

1-3) Pkuma プライマーのリアルタイム PCR 条件の検討

前述した real-time PCR の条件で *P. kumamotoensis* の一頭釣り DNA を検出した所、他の線虫より Ct 値が 1.5~2.0 高くなったため、real-time PCR の条件が Pkuma プライマーに適していない可能性が考えられた。そこで条件を変更するべきか検討した。またキクの線虫に対するプライマーはすべて同じ real-time PCR の条件で行うことが作業上望ましいため、*P. pseudocoffeae* についても同時に条件を検討した。

<材料および方法>

P. pseudocoffeae および *P. kumamotoensis* の一頭釣り DNA を用いて、アニーリング温度を 2℃ 下げて伸長時間を延ばした条件 (RKN 条件: 95℃ 10 秒、(95℃ 5 秒、60℃ 20 秒 (0.2℃/秒)) × 45 サイクル) で real-time PCR を行った。

<結果>

P. kumamotoensis の Ct 値は NEG 条件と RKN 条件で差がなかった (表 II-8)。また *P. pseudocoffeae* の Ct 値は RKN 条件の方が 0.8 高

くなったため、Pkuma プライマーの real-time PCR 条件は前述の NEG 条件のまま変更しないこととした。

Table II-8. Comparison of Ct values of DNA extracted from individuals between two real-time PCR conditions.

Condition	Ct Value	
	<i>P. pseudocoffeae</i>	<i>P. kumamotoensis</i>
NEG	22.9	24.9
RKN	23.7	24.7
Δ Ct	0.8	-0.2

2) 栽培前土壌中の採取および線虫密度の測定

2-1) 土壌の採取

沖縄県のキクの栽培は9~11月に始まり、翌年の4~5月まで続く。この一連の栽培が終了した5月に、沖縄県沖縄市の裸地となったキク連作圃場の土壌を用いて線虫密度測定法の開発を行った。

<材料>

2015年5月に沖縄県沖縄市の9つのキク圃場から土壌を採取した。圃場の情報を表II-9に示す。1圃場あたり5地点から土壌を採取して混合し、ひとつの土壌サンプルとした。土壌はオーガー（直径3cm）を用いて表層0-30cmから採取した。土壌サンプルを5mmの篩にかけてから土壌サンプルのうち約200gを60℃の恒温乾燥機で2日間乾燥させた。約20gの乾土をボールミル（Retsch, MM400）（毎秒20回転、2分）してから後述する手法でDNAを用いた線虫密度測定を行い、残りの土壌は常温で保存した。

Table II-9. Information of field s where soil samples were collected in May 2015.

No. of sample	Field's name	Variety	Nematode damage	Soil disinfection
1	HH	大菊（太陽の響）	No	year before last
2			suspected	year before last
3	ZM-1	小菊（つばさ）	suspected	February
4	ZM-2	小菊（つばさ）	suspected	February
5	EK	小菊（琉のあやか）	No	Every year
6	TK	小菊（つばさ）	No	Every year
7	SH	小菊（つばさ）	suspected	No
8	YS	小菊（つばさ）	very little	Did
9	IN	小菊（太陽の金華）	No	No
10	YK	小菊（太陽のかりゆし）	very little	No
11	YA	小菊（太陽の南奈）	very little	No

2-2) 土壌からの DNA 抽出

沖縄本島および離島の土壌は4土壌型に分類されるが(久場、1993)、いずれも粘土質の土壌である。土壌からの DNA 抽出法 (Sato et al., 2010) は黒ボク土に対する抽出法であり、Kawanobe et al. (2015) は沖縄土壌に適するよう、上記の抽出法を改良した。本論文で用いた土壌は Kawanobe et al. (2015) が用いた土壌より粘土質が少ないように感じられたため、Kawanobe et al. (2015) の手法をさらに改良した抽出法で DNA 分析を行った (2 連)。なお、これらの DNA 抽出法の違いが Ct 値に与える影響については、後述する「II-7) 土壌からの DNA 抽出法の検討」の節で述べる。

初めに、黒ボク土抽出法 (Sato et al., 2010) を記す。その上で、改変沖縄法の改変点を記す (表 II-10)。

<材料および方法>

土壌試料は前述した沖縄県沖縄市のキク圃場から採取した 11 サンプルを用いた。

・黒ボク土抽出法 (Sato et al., 2010)

スクリーチューブにビーズ (ジルコニアビーズ 0.1 mm 径 0.75 g およびガラスビーズ 0.5 mm 径 0.25 g) を充填してからオートクレーブ (121°C 15 分) で滅菌した。ボールミルした土壌 0.5 g をスクリーチューブに入れて 20% スキムミルク溶液 (20% スキムミルク、10mM Tris-HCl (pH8.0)、50mM EDTA (pH8.0)、0.5% SDS) 500 μ L を添加して遠心分離 (12000xg、15 秒、25°C) にかけた。その上に Lysis buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0)、50mM EDTA (pH8.0)、0.5% SDS) 600 μ L を添加してビードビーター (5000rpm、60 秒×2 回、WAKENYAKU、BS-12) にかけた。攪拌したチューブを遠心分離 (13000xg、5 分、25°C) にかけて、5 M NaCl 377 μ L を添加した 2 mL チューブに上清 600 μ L を添加した。同じチューブに 10% CTAB 270 μ L を添加してボルテックスで十分に攪拌した後、フローターにチューブをセットして 60°C のウォーターバスに浮かべた。2 分、5 分、8 分後にウォーターバスから取り出してよくチューブを振り、10 分後に湯銭を終了した。フローターにセットしたままチューブを冷蔵庫に入れて 10 分間冷却した。常温程度に冷えたチューブをひっくり返してフローターごと机に叩き付けて、溶液の上部に固まった物質を粉碎した。チューブに冷凍庫で保存しておいたクロロホルム 500 μ L を添加してボルテックスにかけ、遠心分離 (15000xg、15 分、18°C) にかけた。クロロホルム 500 μ L を添加した新しい 2 mL チューブに上清 1.1 mL を、1000 μ L と 100 μ L にかけて添加してボルテックスにかけ、遠心分離 (15000xg、15 分、18°C) にかけた。冷蔵庫で保存しておいた 20% PEG (20% PEG、1.6M NaCl) 600 μ L を添加した新しい 2 mL チューブに上清 1 mL を添加してボルテックスにかけ、遠心分離 (15000rpm、20 分、4°C) にかけた。遠心分離後に上清を全て取り除き、冷凍庫で保存していた 70% エタノール 1000 μ L を添加して遠心分離 (15000rpm、5 分、4°C) にかけた。エ

タノールを 200 μ L チップを用いて完全に取り除き、暖機しておいた遠心式濃縮機（タイテック、VC-15SP）で 10 分間乾燥させた。チューブの底に白い DNA が乾燥していることを確認してから TE buffer 100 μ L を添加して指でチューブを弾いて混合し、常温で 30 分～1 時間放置した。得られた DNA 抽出液を滅菌蒸留水で 10 倍希釈して Real-time PCR にかけた。

・ 改変沖縄法

スクリーチューブをビードビーティング後に行う遠心分離の条件を、（13,000xg、5 分、25 $^{\circ}$ C）から（13,000xg、10 分、25 $^{\circ}$ C）に変更した。

改変沖縄法で抽出した土壌 DNA を、滅菌蒸留水を用いて 10 倍希釈して real-time PCR にかけた。

Table II-10. Differences of DNA extraction methods.

黒ボク土抽出法 (Sato et al., 2010)	改変沖縄法	河野辺法 (Kawanobe et al., 2015)
ボールミルした土壌 0.5 g をスクリーチューブに入れて 20% スキムミルク溶液 500 μ L を添加	土壌 0.5 g	土壌 0.25 g
遠心分離 (12,000xg、15 秒、25 $^{\circ}$ C)		
Lysis buffer 600 μ L を添加してビードビーティング (5,000rpm、60 秒 \times 2 回)	(5,000rpm、60 秒 \times 2 回)	(5,500rpm、90 秒 \times 1 回)
遠心分離 (13,000xg、5 分、25 $^{\circ}$ C)	(13,000xg、10 分、25 $^{\circ}$ C)	(13,000xg、20 分、25 $^{\circ}$ C)
5 M NaCl 377 μ L を添加した 2 mL チューブに上清 600 μ L を添加した。同じチューブに 10%CTAB 270 μ L を添加してボルテックスで十分に攪拌		
10 分間 60 $^{\circ}$ C のウォーターバスで湯銭		
冷蔵庫で 10 分間冷却		
クロロホルム 500 μ L を添加してボルテックス		
遠心分離 (15,000xg、15 分、18 $^{\circ}$ C)		
クロロホルム 500 μ L を添加した新しい 2 mL チューブに上清 1.1 mL を添加してボルテックス		
遠心分離 (15,000xg、15 分、18 $^{\circ}$ C)		
20%PEG 600 μ L を添加した新しい 2 mL チューブに上清 1 mL を添加してボルテックス		
遠心分離 (15,000rpm、20 分、4 $^{\circ}$ C)		
上清を全て取り除き、70%エタノール 1000 μ L を添加		
遠心分離 (15,000rpm、5 分、4 $^{\circ}$ C)		
エタノールを 200 μ L チップを用いて完全に取り除く		
10 分間乾燥		
TE buffer 100 μ L を添加して溶解		

<結果>

11ヶ所中3ヶ所から *P. penetrans* が、1ヶ所から *P. kumamotoensis* が検出された(表Ⅱ-11)。得られた Ct 値を後述する検量線を用いて密度に換算すると、*P. penetrans* は 13~436 頭/20 g 乾土、*P. kumamotoensis* は 53 頭/20 g 乾土存在した。*P. pseudocoffeae*、*P. neglectus*、*P. brachyurus* および *P. coffeae* は検出されなかった。1ヶ所に複数の *Pratylenchus* 属が混在しているサンプルはなかった。

Table Ⅱ-11. The number of *Pratylenchus* spp. estimated by real-time PCR in different chrysanthemum fields before cultivation.

Sample No.	Field's name	No. of <i>Pratylenchus</i> spp. (individuals/20 g dry soil)		
		<i>P. penetrans</i>	<i>P. pseudocoffeae</i>	<i>P. kumamotoensis</i>
1	HH	ND	ND	ND
2		ND	ND	ND
3	ZM-1	13	ND	ND
4	ZM-2	436	ND	ND
5	EK	ND	ND	53
6	TK	ND	ND	ND
7	SH	39	ND	ND
8	YS	ND	ND	ND
9	IN	ND	ND	ND
10	YK	ND	ND	ND
11	YA	ND	ND	ND

ND means not detected.

2-3) 3種の *Pratylenchus* 属の検量線の作成

<材料および方法>

栽培前土壌の real-time PCR の結果、*P. penetrans*、*P. pseudocoffeae*、*P. kumamotoensis* および *P. coffeae* の Ct 値が Undertermined になった 2 圃場の土壌を、これらの植物寄生性線虫が存在しない土壌と考え

て検量線の作成に用いた。

2 圃場の土壌を混合して検量線土壌とした。生土 10 g (60℃乾土 8.2 g 相当) をボールミルの容器に入れて、土壌の上から植物寄生性線虫を添加した。添加方法を以下に記す。*P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* は汚染土壌からベルマン法で得られた線虫懸濁液を、*P. penetrans* は購入した線虫懸濁液を用いて実験を行った。線虫懸濁液 10 μL 程度をスライドグラスに出して線虫数を計測後、2 つの方法で土壌に添加した。1 つ目はスライドグラスに水道水をピペットで垂らして、線虫を土壌に流し込む方法であり、2 つ目はスライドグラス上で計測した線虫を一旦ピペットで回収して土壌に直接添加する方法である。いずれも添加後に 2~3 回、水道水をピペットで吸ってスライドグラス上から土壌に流し込む、あるいはピペットの中で出し入れしてから、スライドグラスおよびピペット上に線虫が残っていないか確認した。線虫添加土壌の入ったボールミル容器を 60℃の恒温乾燥機で乾燥したのちにボールミルして、得られた土壌を用いて DNA 抽出ならびに real-time PCR を行った。線虫添加量は、*P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* は 2、10、50 頭/10 g 生土 (5、24、122 頭/20 g 乾土)、*P. penetrans* は 2、10、52、257 頭/10 g 生土 (5、24、127、627 頭/20 g 乾土) とした。

<結果>

3 種の *Pratylenchus* 属すべてで、Ct 値と log に換算した添加線虫密度の間に 95% 有意で負の相関が見られた (図 II-3)。Ct 値を y、線虫密度 (Log₁₀ No./20 g 乾土) を x とすると、*P. penetrans* は $y = -0.9502x + 35.035$, $R^2 = 0.9502$ (P<0.05)、*P. pseudocoffeae* は $y = -1.2379x + 34.156$, $R^2 = 0.9792$ (P<0.05)、*P. kumamotoensis* は $y = -0.9613x + 35.541$, $R^2 = 0.9774$ (P<0.05) となった。

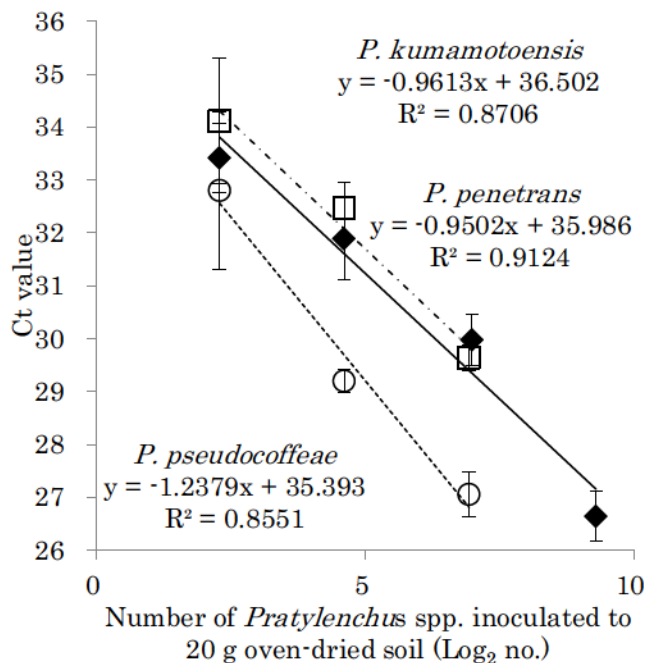


Fig. II-3. Relationship between the number of each target nematode added to 20 g oven-dried soil and the cycle threshold (Ct) values using each specific primer. ◆, *Pratylenchus penetrans*; ○, *P. pseudocoffeae*; □, *P. kumamotoensis*. Mean ± SD (n=4).

2-4) 検出限界の決定

<材料および方法>

一頭釣りした *P. penetrans*、*P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* の DNA を、滅菌蒸留水を用いて 5×10^{-5} ~ 5×10^{-2} に希釈して real-time PCR にかけた。初めに 2 つあるいは 3 つの一頭釣りサンプルを混合して約 4 μ L の一頭釣り混合溶液を得てから、溶液と滅菌蒸留水を 1:20、1:100、1:200、1:500、1:1,000、1:2,000、1:2,500、1:5,000、1:10,000 および 1:20,000 の割合で段階希釈した。混合溶液からの希釈は 3 連で行った。

得られた段階希釈溶液を real-time PCR にかけて、Ct 値と希釈濃度の直線性を確認した。

<結果と考察>

P. penetrans と *P. suedcoffae* は 10,000 倍希釈まで、*P. kumamotoensis* は 5,000 倍希釈まで Ct 値と希釈倍率の直線性が確認された (図 II-4)。DNA の検出限界となる Ct 値は、*P. penetrans* が 34.1、*P. suedcoffae* が 33.4、*P. kumamotoensis* が 33.7 であり、これは前述した検量線に当てはめると、それぞれ 4.0、3.1、7.5 頭/20 g 乾土であった。この値は検量線を作成する際の最小密度 (4 頭/20 g 乾土) と同等あるいはそれより高密度であったが、検量線は高い相関 ($R^2=0.9502\sim0.9792$) を示していたため、検量線は最小密度を検出できていると考えて、検出限界は 3 つのプライマーとも、4 頭/20 g 乾土であると決定した。

本論文の検出限界と過去の報告を比較すると、Sato et al. (2011) は *P. penetrans* の検出限界を 4 頭/20 g 乾土であったと、また Yan et al. (2012) は *P. thornei* の検出限界を 20 頭/20 g 土であったと報告している。本論文の検出限界はこれらの研究と同等の結果を示したと考えられる。

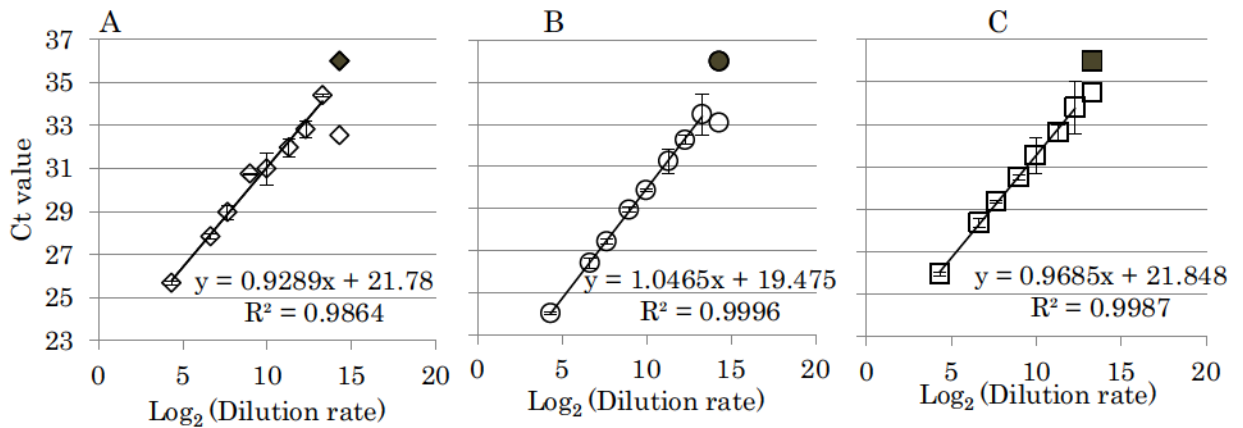


Fig. II-4. The relationship between the cycle threshold (Ct) values and dilution rates of *Pratylenchus* spp. DNA. A, *Pratylenchus penetrans*; B, *P. pseudocoffae*; C, *P. kumamotoensis*. Bars represent SD (n=3), except for the highest dilutions, in which each value is shown (undetermined samples are shown as 36 in gray color).

2-5) 土壌からの DNA 抽出法の検討

前述したように沖縄の土壌は黒ボク土とは違った土性を持っている。そこで DNA 抽出の手法について改変沖縄法と河野辺法 (Kawanobe et al., 2015) のどちらが本論文の土壌にふさわしいのか検討した。

<材料および方法>

「2-2) 土壌からの DNA 抽出」で使用したサンプル (No.4 および No.5) と検量線用に作成した各線虫を 2 頭/10 g 土壌接種した土壌を用いた。表 II-10 の河野辺法 (Kawanobe et al., 2015) を参考に、土壌の量を 0.25 g および 0.4 g/スクリーチューブにして DNA を抽出した (2 連)。また、ビードビーティングの回転数および時間も 5,000rpm, 120 秒から 5,500rpm, 90 秒へ変更した。得られた土壌 DNA を 10 倍希釈して real-time PCR にかき、Ct 値を土壌 0.5 g 使用した場合と比較した。

<結果>

NEG プライマーでは No.4 サンプルで、Pkuma プライマーでは No.5 サンプルおよび検量線用土壌の 1 連で土壌量を 0.4 g (改変沖縄法 B=Modified Kawanobe-B) または 0.25 g (河野辺法=Kawanobe) に少なくした方が Ct 値は 0.5 g (改変沖縄法 A=Modified Kawanobe-A) より低かったが、全体的にみると 0.5 g を用いた改変沖縄法 A の方が Ct 値は低かった (表 II-12)。よって、前述した改変沖縄法 A を本論文の土壌サンプルには使用することとした。

Table II-12. Comparison of Ct values among different extraction methods.

Method	Amount of soil (g)	NEG primer			Pkuma primer		
		No.4 soil sample	Soil for calibration		No.5 soil sample	Soil for	
			carve (2 individuals/10 g soil)			calibration carve	
						1	2
Modified Kawanobe-A (II-4))	0.5 g	27.7	33.5	32.3	31.0	34.6	32.4
Modified Kawanobe -B	0.4 g	27.2	35.1	33.5	33.2	32.4	39.1
Kawanobe (Kawanobe et al., 2015)	0.25 g	27.8	36.5	37.5	30.4	34.6	34.3

3) 栽培中の土壌線虫密度の測定、キクの生育調査および土壌物理・化学性の測定

上記の実験によって土壌中の線虫密度を測定することが出来るようになったため、キク 1 作目を栽培中の圃場のうち、生育不良な地点が線虫害によるものか調査した。

<材料および方法>

2015 年 11 月に沖縄県沖縄市のキク圃場 3 圃場から合計 8 プロットの土壌を採取した。土壌は圃場の平均的な草丈を示している所(良好)と、草丈が低くなっている所(不良)から採取した。ひとつのプロットを 0.5 m×1.5 m としてプロット内から 3 地点の表層 0-30 cm の土壌をオーガーで採取して混合し、土壌サンプルとした。

土壌の物理・化学性として、土壌の水分率 (DIK-311A、Daiki)、EC (土壌用導電率計、HI98331、HANNA)、土壌硬度 (デジタル貫入

式土壌硬度計、DIK-5531、大起理化工業)を測定した。ひとつのプロットあたり、水分率は5~10ヶ所、ECは6~9ヶ所、土壌硬度は6~9ヶ所測定して平均を求めた。

キクの生育調査はSPAD値(葉緑素形、SPAD-502、コミカミノルタセンシング)と草丈を測定した。ひとつのプロットあたり、SPAD値は9~10本、草丈は9~12本を測定して平均を求めた。

採取した土壌は栽培前の採取時と同じく篩にかけてから約200gを60℃で乾燥し、DNAを抽出してreal-time PCRにかけた。残りの土壌は常温で保存した。

またZM-2圃場の生育不良プロットからは、各プロットあたり2本のキクの根を採取した。なおこの圃場は前述した栽培前土壌調査のZM-2圃場と同一の圃場である。生育不良のキクの根圏土壌(約4.6~15.5g)および土壌をつけたまま約2cmにハサミで切断したキクの根(約2g)はベルマン法にかけて線虫懸濁液を採取した。線虫懸濁液は実体顕微鏡下で観察・計測した後、土壌から抽出した懸濁液の半量から線虫DNAを抽出してreal-time PCRにかけた。線虫懸濁液からのDNA抽出法(Toyota et al., 2008)の詳細を以下に記す。

・線虫懸濁液からのDNA抽出法

初めに線虫懸濁液から原生動物を分離した。線虫懸濁液100 μ Lを1.5 mLチューブに入れ、そこに滅菌蒸留水900 μ Lを添加して1 mLとした。1.5 mLチューブを遠心分離(8,000 rpm、5分)にかけた。上澄みを除去して残りの500 μ Lに20%パーコール溶液(パーコール(GEヘルスケア)を蒸留水で5倍希釈したものを0.2 μ mフィルターを用いて減圧ろ過滅菌したもの)を同量添加して、再度遠心分離(15,000 rpm、10分)にかけた。上澄み800 μ Lを除去して残りの200 μ LをDNA抽出操作に用いた。線虫懸濁液200 μ Lと10 \times TEバッファ-20 μ Lをスクリーチューブ(直径0.1 mm ビーズ0.2 gを入れてオートクレーブにかけたもの)に入れてビードビーティング(5,500 rpm、1.5分を2回)にかけた。20%スキムミルク溶液50 μ L、Extraction buffer(250 mM NaCl、0.2 M Tris-HCl(pH8.0)、25 mM EDTA、0.5% SDS)200 μ L、3 M 酢酸ナトリウム40 μ Lを加えてボルテックスし、

その後クロロホルム 500 μL を加えて再度ボルテックスした。スクリーチューブを遠心分離 (15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分) にかけて上澄み 400 μL を新しい 1.5 mL チューブに移した。スクリーチューブに滅菌蒸留水 400 μL を添加してボルテックスし、再度遠心分離 (15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分) にかけて。上澄み 400 μL を既に 400 μL が入っているエッペンドルフチューブに移して、グリコーゲン溶液 (5 mg/mL) 8 μL 、5 M 酢酸アンモニウム 80 μL 、イソプロパノール 600 μL を加えてボルテックスした。チューブを室温で 5 分静置後、遠心分離 (15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分) にかけて上澄みを全て除去した。チューブに滅菌蒸留水 500 μL 、20% PEG (20% PEG、1.6M NaCl) 300 μL を添加してボルテックスし、冷蔵庫で 15 分間静置した。遠心分離 (15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分) にかけて上澄みを全て除去し、70% エタノール 500 μL を加えて遠心分離 (15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 分) にかけて。上澄みを全て除去して遠心式濃縮機 (タイテック、VC-15SP) に 20 分かけて乾燥後、TE バッファー 100 μL に DNA を溶かした。抽出した DNA は希釈せずに real-time PCR にかけて。プライマーは表 II-1 に示したものを使用した。

< 結果および考察 >

各圃場のプロット 1 を良好 (生育が平均的な) プロットとして、2 および 3 を不良プロットとしてサンプリングを行った (表 II-13)。草丈は 3 圃場とも同一圃場内では良好プロットの方が不良プロットより有意に草丈が高かった ($P < 0.05$)。SPAD 値と土壌 EC は良好・不良プロットの間には差はみられなかった。土壌水分は TA-2 圃場と ZM-2 圃場で良好・不良プロットの間には有意差 ($P < 0.05$) がみられたが、草丈や土壌 EC とのなんらかの相関関係はみられなかった。

Table II-13. Plant vigor and soil property during cultivation in different chrysanthemum fields.

Field's name	Plot No.	Period of cultivation	Plant height (cm)	SPAD	Soil	
					moisture content (%)	EC
TA-1	1	3 months	39±4 a	36.5±2.2	12.6±1.3	-
	2		22±3 b	39.8±4.1	14.2±1.5	-
TA-2	1	2 months	81±2 a	47.2±4.1	17.6±1.6 a	0.11±0.07
	2		65±6 b	44.0±6.5	13.5±0.6 b	0.10±0.07
	3		66±4 b	45.2±5.4	15.6±1.6 b	0.09±0.02
ZM-2	1	1 month	28±3 a	36.8±3.5	9.1±1.3 b	0.04±0.01
	2		22±4 b	40.6±3.6	10.9±0.9 a	0.08±0.03
	3		20±3 b	40.3±5.7	11.0±0.8 a	0.06±0.01

土壌 DNA の分析の結果、TA-1 圃場の不良プロット、TA-2 圃場の不良プロット 1 つおよび ZM-2 圃場のすべてのプロットから *P. penetrans* が検出された (表 II-14)。 *P. penetrans* の密度範囲は 9~596 頭/20 g 乾土であった。

TA-1 の生育不良および TA-2 圃場の 1 プロットの生育不良は *P. penetrans* の影響があることが示唆された。不良・良好すべてのプロットから *P. penetrans* が検出された M-2 圃場は栽培開始から 1 ヶ月と日が浅く、草丈の伸長も十分でなかったことから、サンプリング時点で良好としたプロットも生育不良が発生する可能性が示唆された。

3 圃場の分析の結果、生育不良を起こしている地点でも植物寄生性線虫がいるとは限らなかった。このような生育不良のキクは植物寄生性線虫以外の要因によって草丈が低くなった可能性が示唆されたが、今回分析した土壌水分と EC の数値からは、何が生育不良の要因となっているのかは特定することが出来なかった。

Table II-14. The number of *Pratylenchus* spp. estimated by real-time PCR methods and plant vigor during cultivation in different chrysanthemum fields.

Field's name	Plot No.	Plant height (cm)	The density of <i>Pratylenchus</i> spp. (individuals/20 g dry soil)		
			<i>P. penetrans</i>	<i>P. pseudocoffeae</i>	<i>P. kumamotoensis</i>
TA-1	1	39±4 a	ND	ND	ND
	2	22±3 b	18	ND	ND
TA-2	1	81±2 a	ND	ND	ND
	2	65±6 b	9	ND	ND
	3	66±4 b	ND	ND	ND
ZM-2	1	28±3 a	596	ND	ND
	2	22±4 b	178	ND	ND
	3	20±3 b	232	ND	ND

Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ among plots of a field. ND means not detected.

ZM-2 圃場の土壌からベルマン法で抽出した線虫懸濁液内の植物寄生性線虫の同定を real-time PCR を用いて試みた (表 II-15)。その結果、*P. penetrans* が最も多く検出され、ついで *H. dihystra* (ナミラセンセンチュウ) が検出された。*P. pseudocoffeae*、*P. neglectus*、*P. brachyurus* および *P. coffeae* は検出されなかった。*P. zae* についてはこれまで検出限界の検討がされてない。他の *Pratylenchus* 属についての DNA の検出限界となる Ct 値は、*P. penetrans* が 34.1、*P. pseudocoffeae* が 33.4、*P. kumamotoensis* が 33.7 であり (図 II-4)、今回の Ct 値 32 という結果はこれらより 1 低かった。前述した 3 種の *Pratylenchus* の検出限界密度が 4 頭/20 g 乾土であったことから、*P. zae* は 8 頭/20 g 乾土程度の密度で存在したか、あるいは存在しなかったと考えられる。

H. dihystra のキクに対する寄生性は報告されていない。一方で岩堀ら (2008) は沖縄本島および離島において *Helicotylenchus* 属が 41.5% の割合で土壌サンプルから検出されたと報告している。*Helicotylenchus* 属は雑草の根から検出された報告例 (Patrick et al.,

1995) があることから、沖縄県において *Helicotylenchus* 属は雑草を媒介にして普遍的に存在している可能性が考えられる。

Table II-15. Ct values of DNA extracted from suspensions of nematode in ZM-2 field.

Plot	<i>P. penetra</i> <i>ns</i>	<i>P. pseudocoffeae</i>	<i>P. kumamotoensis</i>	<i>P. coffeae</i>	<i>P. zaeae</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. brachyurus</i>	<i>Helicotylenchus dihystrera</i>
ZM-2-2	19.6	37.7	35.9	ND	32.5	34.6	36.1	24.7
ZM-2-3	18.1	ND	35.4	ND	32.1	34.8	35.7	28.1

ND means not detected.

4) 収穫前の土壌線虫密度の測定、キクの生育調査および土壌物理性の測定

「3) 栽培中の土壌線虫密度の測定、キクの生育調査および土壌物理・化学性の測定」でキク栽培中の線虫密度を測定した圃場のうち、*P. penetrans* が高密度で検出された ZM-2 圃場の追跡調査を行った。

<材料および方法>

2016年2月に ZM-2 圃場から草丈の伸びが良い所（良好）と草丈が低くなっている所（不良）、合計 14 プロットから土壌を採取した。ひとつのプロットを 0.5 m × 1.5 m としてプロット内から 3 地点の表層 0-30 cm の土壌をオーガーで採取して混合し、土壌サンプルとした。

土壌の物理性として、土壌の水分率（DIK-311A、Daiki）を測定した。ひとつのプロットあたり 5ヶ所測定して平均を求めた。

キクの生育調査は草丈を測定した。ひとつのプロットあたり 10 株の草丈を測定して平均を求めた。また出荷可能な草丈が 60 cm と決まっているため、不良品化率（草丈 60 cm 以下の株の割合）を求めた。

採取した土壌は風乾後、篩にかけてから約 200 g を 60℃で乾燥し、DNA を抽出してリアルタイム PCR にかけた。

<結果>

14 地点中 11 地点から *P. penetrans* が 4~1553 頭/20 g 乾土の範囲で検出された (表 II-16)。 *P. kumamotoensis*、 *P. pseudocoffeae*、 *P. neglectus*、 *P. brachyurus* および *P. coffeae* は検出されなかった。 *P. penetrans* の密度とキクの草丈の間に関係性はみられなかった (図 II-5)。そこで、市場規格が草丈 60 cm 以上とされているため、草丈 60 cm 以下の株の割合 (不良品化率) を求めた。 *P. penetrans* の密度が高密度な 2 プロットを除いて、密度が 500 頭/20 g 乾土以上の 2 プロットでは不良品化率が 40% 以上になった。収穫時の *P. penetrans* の密度が約 1400 頭/20 g 乾土と高密度であった 2 つのプロットの生育が良好だった原因は不明であるが、収穫時の密度が 500 頭/20 g 乾土以上であれば商品化率が下がる可能性が示された。 *P. penetrans* の増殖率は品種によって異なり (Uesugi et al., 2011)、今回栽培されていた「つばさ」の増殖率は不明であるし、また上記の報告は栽培日数 90 日間で求めたものであるため、10 月から 4 ヶ月間栽培していた ZM-2 圃場のキクには厳密には当てはまらない。しかし、「つばさ」と同じ小菊の「きさらぎ」の増殖率 (23 倍) を参考にすると、 *P. penetrans* の初期密度が 22 頭/20 g 乾土以上であれば収穫時に商品化率の減少が起こると仮定できた。

Table II -16. Density of *Pratylenchus penetrans*, plant height and soil moisture content in soils collected from ZM-2 field at harvesting.

Plot No.	Density of <i>P. penetrans</i> (individuals/20 g dry soil)	Plant height(cm)	Marketable ratio (%) ^a	Soil moisture content (%)
1	1052	59	52	28.7
2	1553	61	57	26.0
3	282	65	90	29.2
4	0	67	90	26.3
5	67	68	96	30.2
6	0	68	87	29.0
7	0	68	92	25.6
8	15	71	96	25.0
9	436	85	100	25.2
10	367	87	100	26.7
11	1489	87	100	26.7
12	120	87	100	27.4
13	4	88	100	26.0
14	1412	91	100	27.9

^a Marketable chrysanthemum is defined as one whose plant height is more than 60 cm. Marketable ratio = (No. of marketable plants)/(No. of total plant)×100.

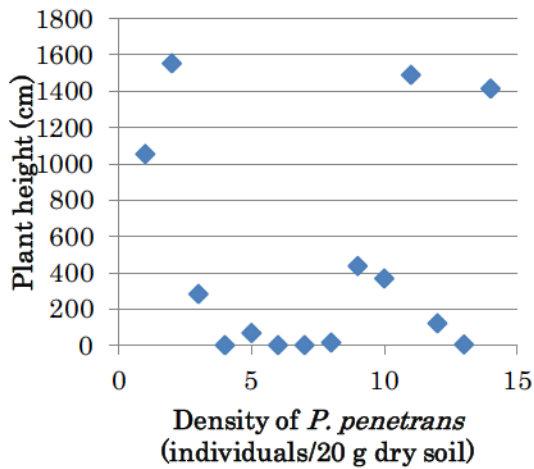


Fig. II-5. Relationship between plant height of chrysanthemum and density of *Pratylenchus penetrans* in soil collected from ZM-2 field at harvesting.

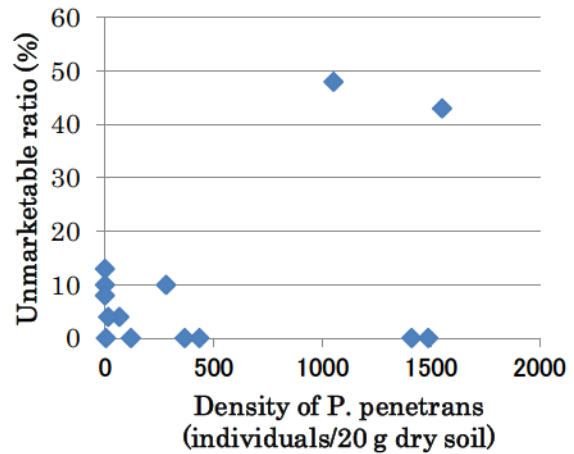


Fig. II-6. Relationship between unmarketable ratio of chrysanthemum and density of *Pratylenchus penetrans* in soil collected from ZM-2 field at harvesting.

5) 土壌からの DNA 抽出効率を表す内部標準の作成

土壌からの DNA 抽出は土壌の性質や抽出方法によって抽出効率が異なる (Li et al., 2015) ため、抽出効率を表す内部標準の作成を試みた。

<材料および方法>

徳島県のレンコン圃場からレンコン収穫時に採取したレンコン根を、表面の泥を流水で落としてから約 1~2 cm に細断して 2 g ずつベルマン法 (室温、2 日間) にかけた。得られた線虫懸濁液から約 300 頭のレンコンネモグリセンチュウ (*Hirschmanniella diversa*) を 1 サンプルとして、前述した線虫懸濁液からの DNA 抽出法 (Toyota et al., 2008) で抽出した。抽出した DNA を Ferris ITS1 プライマー (5'-CGT AAC AAG GTA GCT GTA G-3') (Ferris et al., 1993) と D3B プライマー (5'-TCC TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3') (De ley et al., 1999) を用いて PCR にかけた (断片長 ca. 1500bp)。使用したポリメラーゼは MightyAmp Ver.2 (Takara Bio) (Buffer 25 μ L、ポリメラーゼ 0.5 μ L、Primer 各 1.5 pmol/チューブ) であり、この混合液 47 μ L と滅菌蒸留

水 18.5 μL と抽出 DNA 3 μL を 200 μL チューブに入れて 1 サンプルとした。PCR の条件は、98°C 2 分、(98°C 10 秒、53°C 30 秒、68°C 1 分) \times 45 サイクル、68°C 7 分で行った。以下、この PCR 産物を Div と呼ぶ。

Div を滅菌蒸留水で段階希釈 (10^{-2} ~ 10^{-7}) して、Real-time PCR にかけた。プライマーは divF(5'-CGT GTC AAT TAC TAG CGC AAA TGT C-3')、divR(5'-GAG CCG GTT GAA TAA ACA ACG AA-3')

(Koyama et al., 2013) を用いて real-time PCR にかけた。Real-time PCR の条件は RKN 条件(95°C 10 秒、(95°C 5 秒、60°C 20 秒) \times 45 サイクル)とした。得られた Ct 値を基に、DIV 溶液を Ct 値 18 になるように滅菌蒸留水で希釈した。

Ct 値を調節した DIV 溶液 10 μL および、イモグサレセンチュウ (*Ditylenchus destructor*) 懸濁液 (青森の線虫汚染ニンニクよりベルマン法で取りだしたもの) 2260 頭/132 μL を、表 II-15 に記す土壤に添加して DNA を抽出した。土壤からの DNA 抽出法について以下に記す。

・砂土法 (Min et al. (2011) をもとに新たに作成した方法)

スクリーチューブにビーズ (ジルコニアビーズ 0.1 mm 径 0.75 g およびガラスビーズ 0.5 mm 径 0.25 g) を充填してからオートクレーブ (121°C 15 分) で滅菌した。ボールミルした土壤 0.75 g をスクリーチューブに入れてスキムミルク 20 mg を添加して遠心分離 (12000xg、15 秒、25°C) にかけた。その上に Lysis buffer (120 mM リン酸バッファー (pH7.0)、1.5 M NaCl、2% CTAB) 1000 μL を添加してビードビーター (5000rpm、60 秒 \times 1 回、WAKENYAKU、BS-12) にかけた。攪拌したチューブを遠心分離 (2,500xg、5 分、25°C) にかけて、上清 500 μL を新しい 2 mL チューブに移した。遠心後のチューブを再度遠心分離 (2,500xg、2 分、25°C) にかけて、上清 100 μL を先ほどの 2 mL チューブに移した。合計 600 μL の上清に冷凍庫で保存しておいたクロロホルム 600 μL を添加してボルテックスにかけ、遠心分離 (18,000xg、5 分、18°C) にかけた。上清 450 μL を新しい 2 mL チューブに移し、残りに Lysis buffer 500 μL を添加してボルテックスにかけ、再度遠心分離 (18,000xg、2 分、18°C) にかけた。遠心後、

上清 450 μL を先ほどの 2 mL チューブに移し、クロロホルム 900 μL を添加してボルテックスにかけ、遠心分離 (15,000 $\times\text{g}$ 、2 分、18 $^{\circ}\text{C}$) にかけた。上清 750 μL を新しい 2 mL チューブに移して 3M NaOAc(pH5.2)75 μL 、冷凍庫で保存しておいたイソプロパノール 750 μL を添加してボルテックスにかけ、10 分間室温に置いた。静置後に遠心分離 (18,000 $\times\text{g}$ 、5 分、18 $^{\circ}\text{C}$) にかかけ、上清を除去した。冷凍庫で保存していた 70%エタノール 500 μL を添加して遠心分離(18,000 $\times\text{g}$ 、2 分、18 $^{\circ}\text{C}$) にかけた。エタノールを 200 μL チップを用いて完全に除去し、暖機しておいた遠心式濃縮機 (タイテック、VC-15SP) で 10 分間乾燥させた。チューブの底に白い DNA が乾燥していることを確認してから TE buffer 100 μL を添加して指でチューブを弾いて混合し、常温で 30 分~1 時間放置した。

・黒ボク土抽出法・群馬

群馬県の黒ボク土は DNA 抽出中に不純物が液面に浮遊するため黒ボク土抽出法 (Sato et al., 2010) をわずかに変更した。すなわち、1 回目クロロホルムを添加したあとの遠心分離 (15,000 $\times\text{g}$ 、15 分、18 $^{\circ}\text{C}$) を、遠心分離 (15,000 $\times\text{g}$ 、5 分、18 $^{\circ}\text{C}$) かけたのちに遠心分離機から出してボルテックスし、再度遠心分離 (15,000 $\times\text{g}$ 、15 分、18 $^{\circ}\text{C}$) かける方法に変更した。

また、土壌に添加せずに線虫 DNA を抽出したサンプルも用意した。Ct 値を調節した DIV 溶液 10 μL および、イモグサレセンチュウ (*Ditylenchus destructor*) 懸濁液 (青森の線虫汚染ニンニクよりベルマン法で取りだしたもの) 175 頭/5 μL を、スクリーチューブ (直径 0.1 mm ビーズ 0.2 g を入れてオートクレーブにかけたもの) に入れて線虫懸濁液からの DNA 抽出法 (「II-3」栽培中の土壌線虫密度の測定、キクの生育調査および土壌物理・化学性の測定) に記した) を用いて DNA を抽出した。

抽出した DNA を滅菌蒸留水で 10 倍希釈したサンプルを、前述した Div プライマーおよび Ddf(5'-CAC GTC TGA TTC AGG GTC GTA

AAT A -3'), Ddr(5'- AGA AAC ACG TGC TAG GCC AAA G-3')プライマー (Cheng et al., 2015) を用いて real-time PCR にかけた。Dd プライマーの real-time PCR 条件は Div プライマーと同じく RKN 条件 (95°C 10 秒、(95°C 5 秒、60°C 20 秒) ×45 サイクル)とした。

<結果>

Dd プライマーの Ct 値および Div プライマーの Ct 値は使用した土壌によって異なった(表 II-17)。Dd プライマーの Ct 値は 19.7~21.1、Div プライマーの Ct 値は 26.6~29.0 の幅があった。線虫懸濁液から抽出した DNA の結果も合わせた場合の Dd プライマーの Ct 値 (x) と Div プライマーの Ct 値 (y) の相関図を図 II-7 に示す。相関関係は $y = 1.1587x + 3.7826$, $R^2 = 0.88$ となり、強い相関を示した ($P < 0.01$)。これによって、Div は DNA 抽出の内部標準になりうることが示された。

Table II-17. Comparison of Ct values of *Ditylenchus destructor* and DIV among different soil types.

Sample No.	Soil type	Field	Extraction method	Amount of soil (g)	Ct	
					Dd primer	Div primer
1	Sandy soil	Lotus in Tokushima	Sandy soil	0.5 g	20.4±0.2	27.5±0.3
2	Clay soil	Sweet potato in Okinawa	Kawanobe (Kawanobe et al., 2015)	0.25 g	20.7±0.1	28.4±0.2
3					21.1±0.1	29.0±0.3
4					20.7±0.1	28.1±0.2
5					19.7±0.02	27.0±0.2
6	Andosol	Chrysanthemums in Okinawa	Modified Kawanobe (II - 4))	0.5 g	19.8±0.04	26.6±0.2
7		Konjak in Gunma	Modified andosol for Gunma		20.4±0.01	26.7±0.2
8		Soybean in Chiba		0.5 g	20.6±0.01	26.6±0.2
9	Gray lowland soil	Rice in Tokyo	Andosol (Sato et al., 2010)		20.9±0.05	27.8±0.3
DNA of <i>Ditylenchus destructor</i>					16.2±0.3	22.6±0.2
Div						17.9

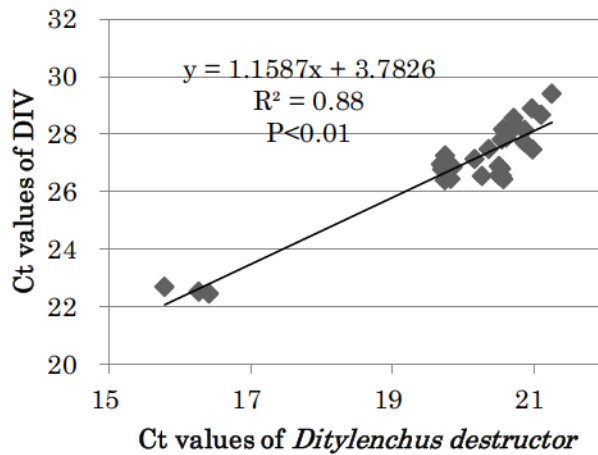


Fig. II-7. Relationship between Ct values of DIV and *Ditylenchus destructor*.

6) くん蒸土壌における DNA 消失時期の特定

土壌微生物が死ぬと死細胞から DNA が放出される。この細胞外 DNA は通常、他の微生物に分解されるか土壌粒子に吸着される (Ogram et al., 1988) ため、死んだ微生物由来の DNA はやがて検出されなくなる。しかし、くん蒸剤を使用した場合は土壌中のほとんどの微生物が死滅するため、死んだ微生物由来の DNA が長期にわたって検出される可能性がある (星野ら, 2004)。沖縄のキク圃場ではメチルイソチオシアネート・D-D 油剤 (商品名: ディ・トラペックス) を用いた土壌くん蒸が普及しつつあるため、くん蒸後何日目まで死んだ線虫由来の DNA が検出されるのか調査した。

<材料および方法>

栽培中の線虫密度測定に用いた、*P. penetrans* の存在しない土壌 (TA-2 圃場・プロット 2) の最大容水量をヒルガード (大起理化工業、DIK-1830) を用いて測定した。No. 2C のろ紙をヒルガードの外径に切って底に詰めてから重量 (W1) を測定し、そこに土壌を充てんしてから重量 (W2) を測定した。重量測定後にヒルガードを水道水に 10~20 分間浸し、その後硬く絞ったぬれぞうきんの上で 10 分間静置した。静置後に重量 (W3) を測定して、105℃の恒温乾燥機内で一晩乾

乾燥させ、乾燥重量 (W4) を測定した。この時、ろ紙だけを入れたヒルガードの W1 (W1c)、W3 (W3c) および W4 (W4c) も測定した。以下の式を用いて、土壌の水分量と最大容水量を求めた。

生土 (g) : $W2 - W1$

乾土 (g) : $W4 - W2$

含水率 (%、生土あたり) : $(\text{生土} - \text{乾土}) / (\text{生土}) \times 100$

含水比 (%、乾土あたり) : $(\text{生土} - \text{乾土}) / (\text{乾土}) \times 100$

最大容水量 (%、乾土あたり)

: $(W3 - W4 - (W3c - W4c)) / (\text{乾土}) \times 100$

水分量を脱イオン水で最大容水量の 40% に調節した土壌 50 g を 3 つの 2 L 容ポリビンにそれぞれ充填した。2 μL (慣行量の 25%、CP25 区) および 4 μL (慣行量の 50%、CP50%) の 99.5% クロルピクリン (三井化学、三井東圧クロールピクリン) を添加して蓋を閉め、30°C の恒温器内で 3 日間培養した。1 つのポリビンは無処理として何も加えなかった。開封後に土壌をビニール袋に移してドラフト内で 1 時間換気し、以下の実験に用いた。

0.5 g のくん蒸土壌 (生土) を DNA 抽出用のビーズを充てんしてオートクレーブにかけたスクリーチューブに入れ、熱殺した *P. penetrans* (109 頭/15 μL) および *D. destructor* (260 頭/40 μL) を添加した。線虫の熱殺は、線虫懸濁液約 1 mL を 2 mL チューブに入れて、チューブを 65°C のウォーターバスで 15 分間湯煎して行った。線虫が死んだことは実体顕微鏡下で線虫の動きをみて確認した。非くん蒸土壌にもコントロールとして線虫を添加した。各処理 20 本のチューブを用意して 30°C の高温器内で培養して、培養 0、3、7、14 日目にチューブを回収後に -80°C で冷凍保存してから改変沖繩法を用いて DNA 抽出を行った (4 連)。DNA 抽出したサンプルは滅菌蒸留水で 10 倍希釈後に NEG プライマーおよび Dd プライマーを用いて real-time PCR にかけた。

また、くん蒸処理が確実に行われていることを確認するため、希釈平板法で細菌および糸状菌の密度を求めた。希釈平板法は土壌 10 g を

200 mL 三角フラスコに入れて滅菌生理食塩水 (0.9%NaCl) 90 mL を加えて超音波洗浄機で 2 分間処理して、これを 10^{-1} 希釈液とした (1 連)。懸濁液 100 μ L を取って滅菌生理食塩水 900 μ L に懸濁して 10^{-2} 希釈液を作成した。同様の操作を繰り返して段階希釈液を作成し、ローズベンガル培地 (Martin, 1950) と 1/100 普通ブイヨン培地 (Eiken Chemical Co., Ltd.) に 100 μ L を塗布した (2 連)。寒天培地を 30°C で培養して糸状菌は 4 日後に、細菌は 10 日後にコロニー数を計測した。

< 結果および考察 >

糸状菌密度は CP25% 区で 97.6%、CP50% 区で 99.6%、コントロール区に比べて減少した。細菌密度は CP25% 区で 61%、CP50% 区で 81%、コントロールに比べて減少した (表 II-18)。この減少率は過去の報告 (Itoh et al., 2000) の、20~80% 減少するという結果より高かったことから、土壌くん蒸は適切に行われていたと判断した。

Table II-18. Density of fungi and bacteria in fumigated soil.

	Fungi		Bacteria	
	$\times 10^2$ CFU/g	%	$\times 10^6$ CFU/g	%
	dry soil		dry soil	
control	600	100	22	100
CP25%	15	2.4	9	39
CP50%	2	0.4	4	19

P. penetrans の DNA 量はくん蒸 14 日後までにコントロール区で 99.9%、CP25% 区で 99.8%、CP50% 区で 99.7%、0 日目に比べて減少した (図 II-8)。また *D. destructor* の DNA 量はくん蒸 14 日後までにコントロール区で 99.7%、CP25% 区で 99.5%、CP50% 区で 96.6%、0 日目に比べて減少した (図 II-9)。

DNA の土壌残存性は過去の報告と同様の結果を示した。すなわち、Min et al. (2011) は死んだ *Meloidogyne incognita* (二期幼虫) を砂土に添加するとその DNA は添加後 10 日間で 92% 減少したと報告した。また MacMillan et al. (2006) は *Phasmarhabditis*

hermaphrodita の DNA は線虫の死後 6 日までは検出されたが、8 日後以降は DNA が検出されなくなったと報告している。また Morrissey et al. (2015) の研究では細胞外 DNA を土壌に添加すると 13 日間で 99% が減少した。これらの研究は、今回の CP 区での DNA 減少率 (99% 以上) が非くん蒸の土壌でみられる現象とほぼ同じ結果になったことを示した。よって、死んだ線虫の DNA はくん蒸後の土壌であっても速やかに分解されることが示唆された。

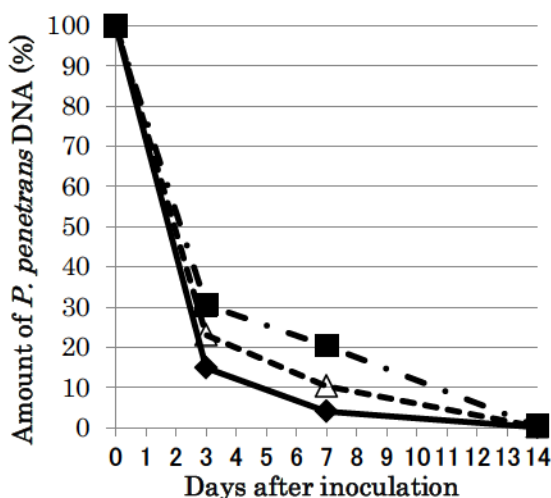


Fig. II-8. Fate of *Pratylenchus penetrans* DNA in fumigated and non-fumigated soil after inoculation of 100 dead individuals (0.5 g soil)⁻¹. ◆, non-fumigated soil; △, fumigated soil with 25% of chloropicrin commonly used; ■, fumigated soil with 50% of chlor

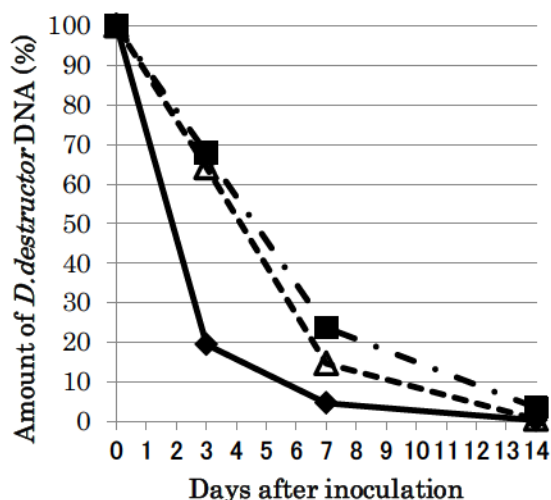


Fig. II-9. Fate of *Ditylenchus destructor* DNA in fumigated and non-fumigated soil after inoculation of 260 dead individuals (0.5 g soil)⁻¹. ◆, non-fumigated soil; △, fumigated soil with 25% of chloropicrin commonly used; ■, fumigated soil with 50% of chlor

7) まとめ

沖縄県圃場においてキクを加害する植物寄生性線虫の定量法を開発するため、プライマーを設計し、検量線を作成した。この定量法を用いて現場圃場の線虫密度を測定し、キクの草丈との関係を調査した。

Pratylenchus pseudocoffeae、*P. kumamotoensis* および *P. coffeae* の DNA を特異的に増幅するプライマーをそれぞれ作成した (表 II-2、3、4)。近縁種を用いた特異性の検討の結果、*P. pseudocoffeae* および *P. coffeae* のプライマーの特異性は確認されたが、*P. kumamotoensis*

のプライマーは *P. vulnus* の DNA を *P. kumamotoensis* の増幅効率に対して 4.7% の効率で増幅してしまう可能性があることが明らかになった (表 II-7)。

P. penetrans のプライマー (Sato et al., 2007)、*P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* のプライマーの検量線を作成した (図 II-3)。Ct 値を y 、線虫密度を x とすると、*P. penetrans* は $y = -0.9502x + 35.035$, $R^2 = 0.9502$ ($P < 0.05$)、*P. pseudocoffeae* は $y = -1.2379x + 34.156$, $R^2 = 0.9792$ ($P < 0.05$)、*P. kumamotoensis* は $y = -0.9613x + 35.541$, $R^2 = 0.9774$ ($P < 0.05$) となった。また検出限界はいずれも 4 頭/20 g 乾土であると決定できた (図 II-4)。

沖縄県キク圃場から採取した土壌合計 33 サンプルを分析した結果、*P. penetrans* は 18 サンプルから 4~1553 頭/20 g 乾土の範囲で、*P. kumamotoensis* は 1 サンプルから 53 頭/20 g 乾土検出された。*P. pseudocoffeae* は検出されなかった (表 II-14、16)。また、複数の種が同時に検出されたサンプルはなかった。このうち 22 サンプルについてはキク栽培中の 3 圃場および収穫時の 1 圃場から採取したため、草丈との関係を調べた。その結果、栽培中の土壌分析では、生育不良プロット 5 つのうち 4 プロットから、生育良好プロット 3 つのうち 1 プロットから *P. penetrans* が検出された (表 II-14)。不良プロットのみから *P. penetrans* が検出された圃場についてはキクの生育不良は *P. penetrans* の影響があることが示唆された。また、不良・良好すべてのプロットから *P. penetrans* が検出された ZM-2 圃場は栽培開始から 1 ヶ月と日が浅く、草丈の伸長も十分でなかったため、収穫時の密度と草丈の調査も行った。2 要素の間に関係性はみられなかったが、*P. penetrans* 密度が 500 頭/20 g 乾土以上になると不良品化率が 40% 以上になった地点が 2 プロット存在した (図 II-6)。

また死んだ線虫の DNA はくん蒸処理土壌においても速やかに分解されることが示唆された (図 II-8、9)。

以上より、沖縄県キク圃場において 3 種の *Pratylenchus* 属を定量する手法を開発した。今後キク圃場における線虫診断法の開発が可能になるだろう。

第Ⅲ章 サツマイモネコブセンチュウの潜在的被害予測技術である幼苗検定の代替手法としての real-time PCR 法の開発

1. はじめに

千葉県のスイカ・トマトの年2作体系の施設栽培において、近年、植物寄生性線虫 *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood (大嵩&若梅, 2006) やホモプシス根腐病菌 *Phomopsis sclerotioides* (穴戸&竹内, 2005) による被害が目立つようになっている。病原菌が定着した畑地で連作を続けると、一般的には発病率がだんだん高くなる(小川, 1988)。このような連作障害を避けるため土壌くん蒸剤が用いられているが、それでもなお被害が発生する圃場が出てきている。そこで、新しい土壌消毒法の開発と普及が求められている。

新しい土壌消毒法の一つに低濃度エタノール消毒がある。低濃度エタノール消毒とは、1%程度の濃度に希釈したエタノールを灌水装置などで散布し、消毒したい深さまで土壌を湿潤状態にすると同時に、農業用ポリエチレンフィルムで土壌表面を1週間以上覆うという簡便な技術である。実際の畑地に低濃度エタノールを処理した場合、ウイルスを除く土壌伝染性病害虫および雑草に十分な密度の低減効果が得られることがわかっており、その効果は主要な土壌くん蒸剤に比べても十分である(小原, 2013)。

低濃度エタノール消毒は土壌還元消毒(新村, 2000)の一種である。すなわち、炭素源を投入した土壌を一時的に湛水状態にすることで土壌中の空気が追い出され、さらに微生物による有機物の分解により残留している酸素が消費される。これにより土壌の還元化が促進され、これに伴う様々な環境変化によって病原体の生存が抑制される(新村, 2000; Momma et al., 2010)。門馬(2013)は土壌還元消毒のことを anaerobicity-mediated biological soil disinfection (ABSD) と称することを提唱している。

土壌還元消毒の中でも低濃度エタノール消毒は新しい技術であり、現場への普及には様々な技術改善が必要である。2012年に千葉県内で行われた現地実証試験では、*Meloidogyne* spp. やホモプシス根腐病菌 *P. sclerotioides* に対する防除効果は得られたものの、コスト面および

作業性（灌水チューブの設置の手間や灌水に時間がかかること）などが問題となった（横山&大木, 2013）。そこで、エタノール処理量の減量および頭上かん水装置を利用して簡略化した作業体系での実証試験が行われることになった。その際に必要となったのが、作業体系の違いが病害虫防除に及ぼす影響の評価であった。

植物寄生性線虫の防除が的確に行われていたと証明するには、防除後に線虫が作物に被害を及ぼさない程度の低密度に抑えられたことを示すか、または作物を栽培してみて被害が出ないことを確認する必要がある。土壌中から線虫を分離する手法はいくつか存在するが、いずれも分離率が 100%である保障はなく、仮に線虫が検出されなくなったとしても存在しないとは言い切れない。また、植物寄生性線虫が低密度で検出された場合に防除が失敗したと判断することも出来ない。極端な例を挙げれば、1 圃場あたりに植物寄生性線虫が 1 頭存在しても、その圃場の作物収量が経済的な損失を受けるほど落ちるとは考えにくいからである。線虫防除が成功した証明を行うには、線虫密度の減少とその後の作物被害度の関係を明らかにする必要がある。そのため防除後に実際に作物を栽培して被害度を確認することが一番望ましいが、それでは結果が出るまで時間がかかり、仮に防除が失敗していた場合、別の防除手段をとることが出来ず、その年の作物収量が減ってしまう。そのため、作付け前の植物寄生性線虫密度とその後に栽培された作物の被害度の関係を明らかにすることで、作物収量に経済的な損失が生じない線虫密度を定める取り組みが行われている（Min et al., 2012）。

トマトの線虫被害を防除出来ているか評価するための最も効率のよい手法は、作付け前の線虫密度を測定してトマトの潜在的な線虫被害を予測することである。しかし、これには線虫が低密度から高密度まで幅広く生息している多数の圃場で作物を栽培し、被害度を追跡調査する必要がある。本章で研究対象とした圃場は商業用にトマトを栽培しており、すべての圃場で土壌消毒が行われていた。そのため、様々な密度の *M. incognita* が存在するサンプルを用意することが出来ない。そこで、ポットと検定作物を用いたトマトの潜在的な線虫被害度の予測技術に着目した。

植物体を用いた土壌病害虫の診断法に幼苗検定がある。牛尾ら

(2010) は *Phomopsis* sp. が引き起こすスイカホモプシス根腐病の被害を予測するため、キュウリの幼苗を用いた生物検定法の開発を報告している。この手法は対象土壌をポットに充填し、キュウリの幼苗を1ヶ月栽培後、キュウリの被害度から土壌の病原菌汚染程度を診断する方法である。千葉県はこのキュウリ幼苗検定をトマト圃場における *Meloidogyne* spp. の診断へ応用しようとしていた。キュウリ幼苗を用いた *Meloidogyne* spp. の診断については、過去に *Meloidogyne* spp. に汚染された土壌にくん蒸剤および殺線虫剤を使用し、その殺虫程度を評価するためにキュウリ幼苗が用いられた例があり (Giannakou et al., 2002)、有用な診断法であると考えられるが、反面、大量の土壌を必要とする、診断までに1ヶ月もかかる、栽培のための場所や管理の手間が必要となるといった問題点がある。そのため、本章では幼苗検定の結果をより簡便に予測出来ないかという観点から、幼苗検定の結果と土壌中の線虫密度の関係を明らかにすることとした。

植物寄生性線虫を計測する方法としては、水を満たした漏斗に土壌を入れた篩を乗せ、時間とともに下方に落ちてきた線虫を捕まえて顕微鏡下で計測するベルマン法が、その簡便さから広く普及している。しかし、ベルマン法は休眠体や卵の状態の線虫を集めることが出来ない。その他、培養温度など研究施設的环境によって、得られる密度が施設ごとに異なることがある (三原&門馬, 未発表)。ベルマン法を用いた *Meloidogyne* spp. の計数はとても結果が変動しやすく、それ故、密度測定の目的には適さないと考えられる (Den Nijs & Van Den Berg, 2013)。事実、ベルマン法を用いた計測で植物寄生性線虫がいなかった圃場において、その後栽培された作物に線虫害が知られたという例がある (Sato et al., 2011)。この現象は現地で土壌消毒を行った土壌でも見られ、消毒直後にはベルマン法で植物寄生性線虫が検出されないものの、実際に作物を栽培すると線虫害が発生した (Min et al., 2011)。これらの結果はベルマン法では検出出来なかった植物寄生性線虫が作物に被害を及ぼすほど存在していたということを示唆した。

ベルマン法の欠点を克服するため、real-time PCR を用いた植物寄生性線虫の定量法に着目した。Real-time PCR による線虫密度の測定法は、実験者の技術や形態学的知識は要求されないという点や、休眠体やシストのような運動性のない状態の線虫も検出出来る点でベルマ

ン法よりも植物寄生性線虫の定量の精度が高いと考えられている。これまで、real-time PCR を用いて土壌中の植物寄生性線虫の密度を測定し、密度とそこで栽培された作物の被害度との関係を調べた研究は、*Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev and Schuurmans-Stekhoven とダイコンの関係 (Sato et al., 2013)、*M. incognita* とナスの関係 (Watanabe et al., 2013)、*Hirschmanniella diversa* Sher とレンコンの関係 (Koyama et al., 2013) が報告されている。しかし、本論文を始める時点では、*M. incognita* とトマトあるいはキュウリの関係については研究例がなかった。

本章では、*M. incognita* の作付け前密度からトマトの被害度を予測する技術を開発するための前駆体となる研究を行った。すなわち、*M. incognita* の潜在的被害を予測する迅速診断法を開発することを目的とした。そのために、real-time PCR またはベルマン法で求めた *M. incognita* の密度とキュウリ幼苗検定の結果との関係を明らかにした。

2. 材料、方法、結果および考察

1) 供試圃場

千葉県にあるスイカ・トマトの年2作体系のハウス圃場4棟にて実験を行った。



Fig. III-1. Green houses where this study was conducted.

2) 事前調査のための土壌採取

<材料および方法>

5棟のハウスの土壌中に *Meloidogyne* spp.が存在するか事前に調査した。

2013年5月にスイカ栽培中のハウス（1棟 4.5×45 m）から土壌を採取した。1棟のハウスあたり2か所から深層 30 cm 以下の土壌を採取して混合し、約 120 g 土壌を1棟のサンプルとしてそこから土壌 DNA を抽出した。

3) 土壌からの DNA 抽出

<材料および方法>

土壌サンプルを 60℃の恒温乾燥器内で 48 時間乾燥させた。乾土 20 g をボールミル（Retsch, MM-400）にかけて粉碎し、そこから 0.5 g を土壌 DNA 抽出に用いた（2連）。土壌からの DNA 抽出法は Sato et al.（2010）の手法に従った。詳細については第Ⅱ章「Ⅱ-2-2）」に記した。得られた DNA 抽出液を滅菌蒸留水で 10 倍希釈して real-time PCR にかけた。プロトコールについては第Ⅱ章「Ⅱ-1-2）」に記した。*Meloidogyne* spp.を検出するプライマーは RKNf（5,-GCT GGT GTC TAA GTG TTG CTG ATA C-3,）および RKNr（5,-GAG CCT AGT GAT CCA CCG ATA AG-3,）（Toyota et al., 2008）を用いた。なお、得られた Ct 値を密度に変換する式は、村上（2013）が作成した検量線を基に得られたものを使用した。村上（2013）の式は $y = -1.0028x + 34.044$ （ x : *M. incognita* 二期幼虫/20 g 乾土、 y : Ct 値）であった。

<結果>

土壌を採取したハウスの下層には *Meloidogyne* spp.が 20～234 頭/20 g 乾土の範囲で存在することがわかったため（表Ⅲ-1）、以下の実

験を行った。

Table III-1. Density of *Meloidogyne* spp. detected in subsurface soils which were collected from deeper than 30 cm during cultivation of water melon.

Green house	Density of <i>Meloidogyne</i> spp. (J2eq/20 g dry soil)
No.1	234
No.2	194
No.3	33
No.6	181
No.7	20

J2 means a second juvenile.

4) 植物寄生性線虫の同定

RKN プライマーは *M. incognita*、*M. arenaria*、*M. javanica* および *M. hapla* の DNA を増幅してしまうため、上記の結果では種の同定までは行うことが出来なかった。そこで、土壌 DNA を用いて PCR-RFLP 法 (岩堀ら、2000) を行い、種の同定を試みた。

<材料および方法>

PCR に用いる DNA Polymerase は TaKaRa Ex Taq (Mg^{2+} free Buffer) (タカラバイオ) を用いた。*Meloidogyne* spp. のミトコンドリア DNA の一部を増幅するためのプライマーは Harris et al. (1990) の forward(5'-TAA ATC AAT CTG TTA GTG AA-3') および reverse(5'-ATA AAC CAG TAT TTC AAA CT-3') を用いた。TaKaRa Ex Taq 0.2 μ L、10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ L、 $MgCl_2$ 2.0 μ L、dNTP 2.0 μ L、10 μ M Harris プライマー各 1.5 μ L および滅菌蒸留水 13.3 μ L、合計 23 μ L を 1 チューブあたりの反応液とした。サンプル分をまとめて作った反応液を 200 μ L チューブに分注し、土壌 DNA 2.0 μ L を添加して指ではじいて中身をよく混ぜた。卓上遠心機で液体を下に落としたのち、サーマルサークルにかけた。PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C 2 分、(94 $^{\circ}$ C 1 分、48 $^{\circ}$ C 2 分、68 $^{\circ}$ C 3 分) \times 40 サイクル、72 $^{\circ}$ C 10 分とした。PCR 産物を電

電気泳動（100V、20分）にかけ、1770bpの位置にバンドが出ることを確認した。1.5 mL チューブに PCR 産物 8 μ L、制限酵素 *Hinf*I 1 μ L および制限酵素に添付の 10 倍濃縮緩衝液 1 μ L を添加し、指ではじいてよく混ぜた。卓上遠心機で液体を下に落としたのち、37°C に設定したサーマルサークルに 1 時間かけた。制限酵素処理終了後、1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動（100V、30 分）を行った。ゲルに入れる制限酵素処理サンプルは 2~4 μ L とした。

<結果>

Meloidogyne spp. の制限酵素処理後の断片サイズを表 III-2 に示す。また電気泳動の結果を図 III-2 に示す。結果、900, 410, 290, 170bp の 4 つのバンドおよびダイマーが確認されたため、本論文で用いた土壤中に優占している種は *M. incognita* と判明した。

Table III-2. Fragment length of *Meloidogyne* spp. using endonuclease *Hinf* I .

Nematode	Length of PCR product (bp)	Length of fragment (bp)
<i>M. incognita</i>	1770	900, 410, 290, 170
<i>M. arenaria</i>	1770	900, 700, 170
<i>M. javanica</i>	1770	1600, 170
<i>M. hapla</i>	—	—

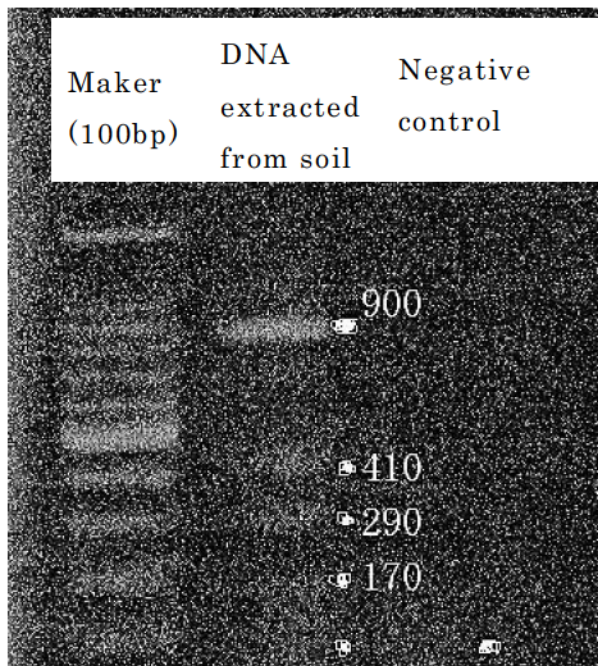


Fig. III-2. RFLP pattern of DNA extracted from soil after digestion by endonuclease *Hinf* I .

5) 供試圃場における土壌消毒の実施

<材料および方法>

スイカ収穫後の 2013 年 6 月 20 日および 21 日に、土壌くん蒸剤 1,3-dichloropropene (商品名 D-D) およびエタノール (商品名: エコロジアル、エタノール濃度 65%、日本アルコール産業株式会社) による土壌消毒を行った。処理区の詳細を表 III-3 に記す。D-D 処理区は薬剤を 15 mL/m²、低濃度エタノール処理区 (EtOH 頭上かん水区、EtOH 減量区および EtOH 区) は 65%エタノールを 0.35~0.39%に希釈したものを 110~130 L/m² 土壌に使用した。処理後に 1,3-D 処理区はガスバリアー性フィルム (0.02 mm、岩谷マテリアル) で、低濃度エタノール処理区はポリエチレンフィルム (0.05 mm、東罐興業) で土壌を被覆した。2013 年 7 月 11 日に被覆を剥がして、翌日に 21 日間育苗したトマト苗 (みそら 64、みかど協和) を定植した (400 株/ハウス)。トマトの収穫は 2013 年 9 月 5 日に始まり、2013 年 12 月 5 日まで慣行法に従って栽培・収穫を行った。

Table III-3. Experimental design

	Green house	Concentration of ethanol (%)	Date
D-D 区	No.1	(D-D 処理)	6/21
EtOH 頭上かん水区	No.2	0.36	6/21
EtOH 減量区	No.6	0.35	6/20
EtOH 区	No.7	0.39	6/20

6) 土壤消毒前後および栽培後の土壤採取

<材料および方法>

土壤は処理前（6月19日）、処理後ビニール被覆を外す時（7月12日）および栽培終了時（12月5日）に採取した。

各ハウスにランダムに3地点をとり、50 cm²の範囲の3～5か所からオーガー（直径10 cm、オーリー）で土壤を採取して混合し、それぞれ土壤サンプルとした。土壤は表層0～30 cmと30～45 cmの2つの深度からそれぞれ採取した。土壤はベルマン法、土壤DNAの抽出および幼苗検定に用いた。

7) 土壤中の *M. incognita* の定量

線虫密度の測定は real-time PCR 法およびベルマン法を用いて行った。

7-1) *M. incognita* 定量のための検量線の作成；チューブ直接添加法

前述した方法で 0.5 g のボールミル土壤から DNA を抽出し、real-time PCR にかけた（2連）。また、得られた Ct 値を密度に変換するための検量線を作成した。

土壤 DNA を用いて測定した Ct 値と土壤中の *M. incognita* 密度の関係は砂土（Min et al., 2011）や黒ボク土（Watanabe et al., 2013; 村上, 2013）で報告されている。千葉県は後者と同じ黒ボク土で

あったが、DNA を抽出する際に不純物を完全に取り除けないという問題が発生したため、この不純物が DNA の抽出効率に影響している可能性が考えられた。そこで、千葉県の土壌は前述した黒ボク土の検量線（村上, 2013）と同じ関係性になるのか検討した。

<材料および方法>

村上（2013）や Min et al. (2011)は既知数の対象線虫を 20 g 土壌に添加し、これをボールミルして、0.5 g ボールミル土壌から DNA を抽出して検量線を作成していた。しかし、この手法では大量の対象線虫が必要となるため、直接スクリーチューブに *M. incognita* と 0.5 g ボールミル土壌を添加する方法を試みた。

土壌は DNA 抽出および real-time PCR を行い、Ct 値が Undertermined になった D-D 消毒直後土壌をボールミルして用いた。*M. incognita* はネコブセンチュウ被害の現れたトマト根をカミソリで薄くスライスしてベルマン法にかけ、抽出したものを用いた。

ビーズ(ジルコニアビーズ 0.1 mm 径 0.75 g およびガラスビーズ 0.5 mm 径 0.25 g) を充填してからオートクレーブ（121℃15 分）で滅菌したスクリーチューブを用意した。*M. incognita* を 1、5、25、125 頭スクリーチューブのキャップに添加し、キャップを閉めてから卓上遠心機にかけ、キャップに *M. incognita* が残っていないことを確認した。キャップを開けて 60℃の乾燥器に 18 時間入れ、*M. incognita* 添加時に加えた水分を蒸発させた。その後、チューブにボールミルした土壌 0.5 g を加えて、黒ボク土抽出法（Sato et al., 2010）にて DNA を抽出した（3 連）。

<結果と考察>

Ct 値を y 、線虫密度を x とすると、チューブ直接添加法は $y = -1.0596x + 40.560$ となった（図 III-3）。この値は村上（2013）の $y = -1.0028x + 34.044$ と比べて、 y 切片が 6.5 高くなった。この差には、*M. incognita* の体をボールミルしていないことが影響していると考えられたため、従来通りの方法で検量線を作り直すこととした。

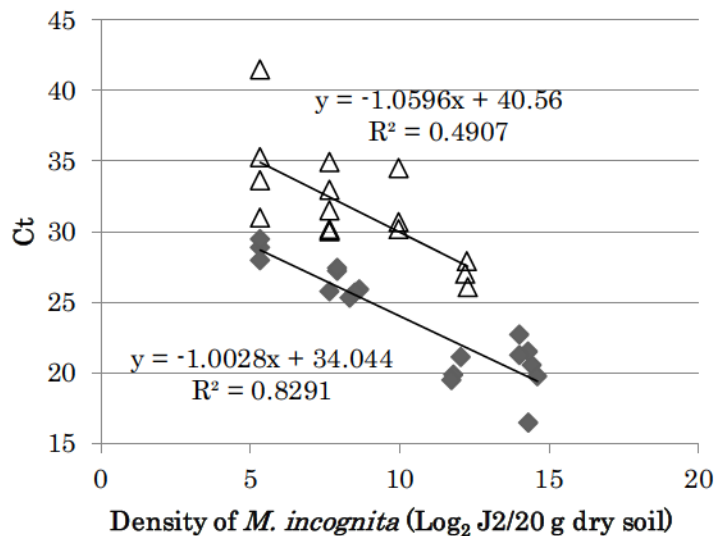


Fig. III-3. Calibration curves of *Meloidogyne incognita*. △: Directly added nematodes in a tube, ◆: Murakami, 2013. J2 means a second juvenile.

7-2) *M. incognita* 定量のための検量線の作成；土壤添加法

<材料および方法>

土壤は D-D 消毒直後土壤のボールミル前のものを、*M. incognita* は NIAS(National Institute of Agrobiological Sciences) Genebank で購入したもの (MAFF108258) を使用した。実験は二度行い、一度目は土壤 4 g を、二度目は土壤 10 g を用いた。土壤をボールミルの容器に入れて、土壤の上から *M. incognita* を添加した。土壤 4 g には *M. incognita* を 5、25 頭、土壤 10 g には 5、25、125 頭添加した (2 連)。

添加方法を以下に記す。*M. incognita* の懸濁液 10 μL 程度をスライドグラスに出して線虫数を計測後、2 つの方法で土壤に添加した。1 つ目はスライドグラスに水道水をピペットで垂らして、*M. incognita* を土壤に流し込む方法であり、2 つ目はスライドグラス上で計測した線虫を一旦ピペットで回収して土壤に直接添加する方法である。いずれも添加後に 2~3 回、水道水をピペットで吸ってスライドグラス上から土壤に流し込む、あるいはピペットの中で出し入れしてから、スライドグラスおよびピペット上に *M. incognita* が残っていないか確認し

た。*M. incognita* 添加土壌の入ったボールミル容器を 60℃の恒温乾燥機で乾燥されたのちにボールミルして、得られた土壌を用いて DNA 抽出ならびに real-time PCR を行った (2 連)。

<結果および考察>

土壌 4 g の検量線と土壌 10 g の検量線の差は傾き 0.09、y 切片 0.72 であった。この差は誤差の範囲内であると考えて、両方のデータを用いて作成した検量線を作成した。その結果、関係式は $y = -1.1586x + 37.142$ 、 $R^2 = 0.8972$ ($P < 0.001$) となり、村上 (2013) の検量線と比べて y 切片が 3.1 高くなった (図 III-4)。よって、千葉県黒ボク土壌には村上 (2013) の検量線ではなく、本論文で作成した検量線を用いることにした。

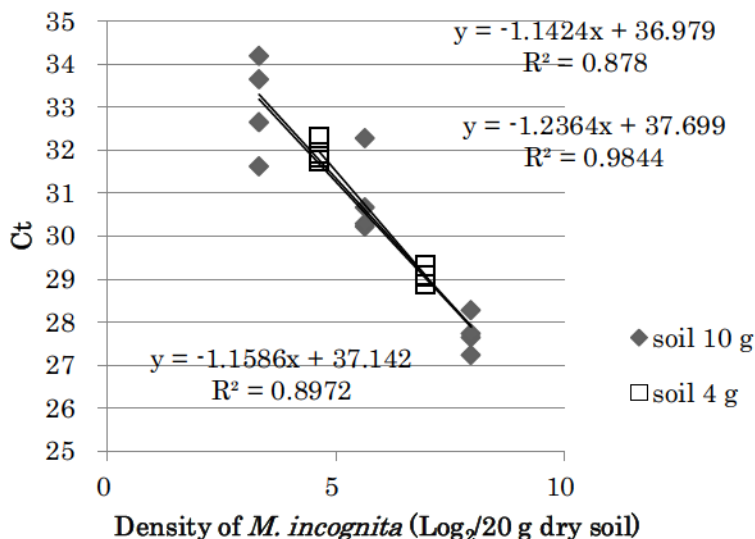


Fig. III-4. Calibration curve of *Meloidogyne incognita* using adding inematodes n soil method. J2 means a second juvenile.

新たに作成した検量線を用いて、得られた Ct 値を *M. incognita* 密度に変換した (表 III-4, 5)。上層の *M. incognita* は消毒前、直後および収穫後でそれぞれ、42~1647、0~68、0~266 頭/20 g 乾土の範囲で存在した。また下層の *M. incognita* は消毒前、直後および収穫後でそれぞれ、110~1651、4~265、0~839 頭/20 g 乾土の範囲で存在した。

上層については EtOH 減量区 1ヶ所を除いて *M. incognita* は 0 頭/20 g 乾土あるいは消毒前密度と比べて 22% 以下に減少した。収穫後の密度は EtOH 頭上かん水区 1ヶ所および EtOH 区 1ヶ所で 159 頭/20 g 乾土以上に爆発的に増加していた。それ以外のサンプルは 0~14 頭/20 g 乾土であった。下層については、消毒直後でもすべてのサンプルで *M. incognita* が検出され、収穫後には 8 サンプルで 2 倍以上に増加していた。

Table III-4. Density of *Meloidogyne incognita* in surface soils measured with real-time PCR before and after soil disinfection and after harvesting.

	Density of <i>Meloidogyne incognita</i> (J2eq/20g dry soil)		
	Before disinfection	After disinfection	After harvesting
D-D 区	151	0	7
	42	0	0
	1647	0	0
EtOH 頭上かん水区	100	0	159
	205	4	7
	286	13	4
EtOH 減量区	62	68	0
	113	4	14
	260	0	6
EtOH 区	114	25	266
	205	3	0
	145	0	0

J2 means a second juvenile.

Table III-5. Density of *Meloidogyne incognita* in subsurface soils measured with real-time PCR before and after soil disinfection and after harvesting.

	Density of <i>Meloidogyne incognita</i> (J2eq/20g dry soil)		
	Before disinfection	After disinfection	After harvesting
D-D 区	220	48	135
	1651	5	0
	576	55	12
EtOH 頭上かん水区	245	159	753
	967	84	555
	847	138	293
EtOH 減量区	184	101	199
	110	9	3
	341	4	337
EtOH 区	631	265	839
	116	47	0
	406	15	69

J2 means a second juvenile.

7-3) ベルマン法による *M. incognita* の抽出および計数

<材料および方法>

ベルマン法による *M. incognita* の抽出および計数は共同研究者の三原氏に行って頂いた。ベルマン法は 20 g 土壌を二重に重ねたタイピング紙に取り、1 mm メッシュの篩に乗せてからベルマン法用のろうとに重ねた。ろうとの下部にチューブを取り付けてろうと内部を水道水で満たし、室温で 3~4 日間静置した (3 連)。得られた線虫懸濁液を回収して顕微鏡下で *M. incognita* の数を計測した。

<結果>

上層の *M. incognita* は消毒前、直後および収穫後でそれぞれ、18～521、0～18、0～46 頭/20 g 土壌の範囲で存在した。また下層の *M. incognita* は消毒前、直後および収穫後でそれぞれ、12～577、0～7、0～128 頭/20 g 土壌の範囲で存在した（表Ⅲ-6, 7）。

上層については *M. incognita* は0頭/20 g 乾土あるいは消毒前密度と比べて17%以下に減少した。収穫後の密度はD-D区1ヶ所およびEtOH 頭上かん水区1ヶ所を除いて増加していた。下層については3ヶ所すべてが0頭/20 g 乾土になったのはD-D区のみで、それ以外のEtOH 処理区では1ヶ所あるいは2ヶ所から7頭/20 g 乾土以下の *M. incognita* が検出された。収穫後にはEtOH区1ヶ所以外のサンプルで *M. incognita* が検出された。

Real-time PCR 法とベルマン法の結果は相関関係を示さなかった（ $P=0.97$ ）（図Ⅲ-7）。Real-time PCR 法では *M. incognita* が検出されなかったがベルマン法では検出されたサンプルは72サンプル中9サンプルあり、反対にベルマン法では検出されなかったが real-time PCR 法では検出されたサンプルは15サンプルあった。

Table III-6. Density of *Meloidogyne incognita* in surface soils measured with the Baermann method before and after soil disinfection and after harvesting

	Density of <i>Meloidogyne incognita</i> (J2/20g dry soil)		
	Before disinfection	After disinfection	After harvesting
D-D 区	148	1	0
	28	0	37
	66	0	1
EtOH 頭上かん水区	64	0	35
	232	0	3
	276	0	0
EtOH 減量区	19	0	4
	521	0	9
	120	3	7
EtOH 区	18	0	46
	105	18	37
	432	0	39

J2 means a second juvenile.

Table III-7. Density of *Meloidogyne incognita* in subsurface soils measured with the Baermann method before and after soil disinfection and after harvesting

	Density of <i>Meloidogyne incognita</i> (J2/20g dry soil)		
	Before disinfection	After disinfection	After harvesting
D-D 区	24	0	99
	55	0	128
	261	0	17
EtOH 頭上かん水区	53	0	102
	577	2	2
	32	1	3
EtOH 減量区	195	1	4
	137	0	76
	75	7	14
EtOH 区	44	0	0
	377	2	28
	12	0	2

J2 means a second juvenile.

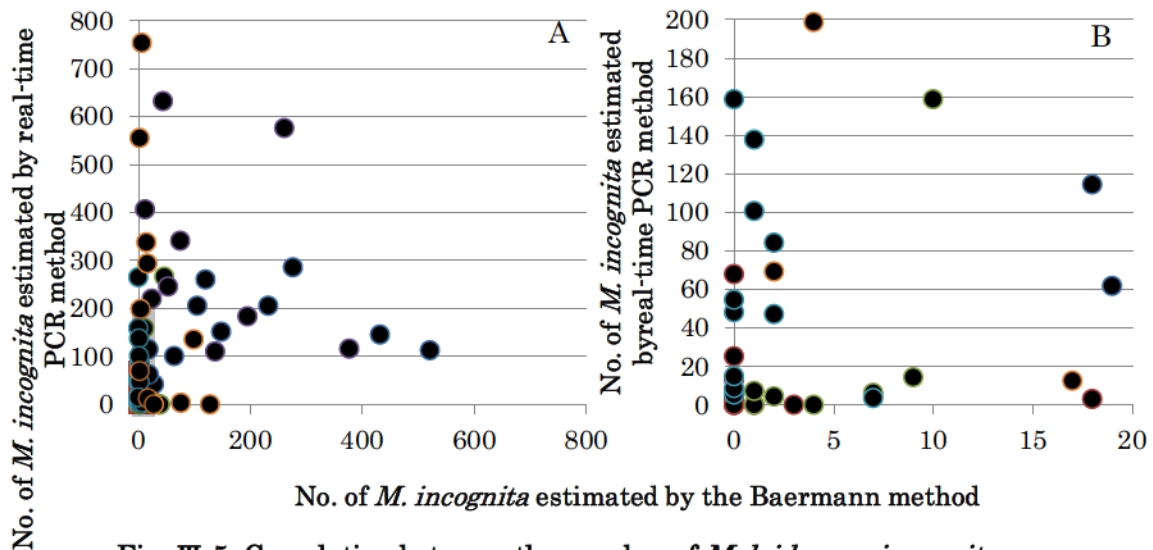


Fig. III-5. Correlation between the number of *Meloidogyne incognita* (J2eq/20 g soil) estimated by the Baermann method and by real-time PCR method. J2 means a second juvenile. All data (A) and macrograph (B) of the gray area in Fig. III-5A.

8) キュウリ幼苗検定法

<材料および方法>

キュウリ幼苗検定は共同研究者の三原氏に行って頂いた。採取した土壌に化学肥料 (N:P:K=5:5:5) を 1 g/kg 土壌となるようによく混合して、16 連セルトレー (7×7×6 cm/セル) に土壌 120 g を充填した。5 日間あるいは 7 日間育苗したキュウリ苗 (南極 1 号、ときわ研究所) を 1 セルあたり 1 株定植して、25℃、明期：暗期=12h:12h に設定した人工気象室内で 1 か月間栽培した。栽培後にセルから根をちぎらないように慎重にキュウリ苗を抜き取り、水を満たした洗面器の中で十分に土壌を洗い落とした。根の形態を観察し、ネコブ指数を判断した。被害は Minuto et al. (2006) の例に従い、5 段階で評価した。すなわち、0：ネコブなし、1：5 つ以下の小さいネコブ、2：5 つ以上の小さいネコブ、3：大きなネコブ、4：大きなネコブが大量につき、明らかに根のサイズを小さくしている、と評価した (図 III-7)。ネコブ指数は以下の式を用いて 0~100 の値に計算した。

$$\text{ネコブ指数} = [\Sigma(\text{各被害度の株数} \times \text{被害度}) / (\text{全株数} \times 4)] \times 100$$

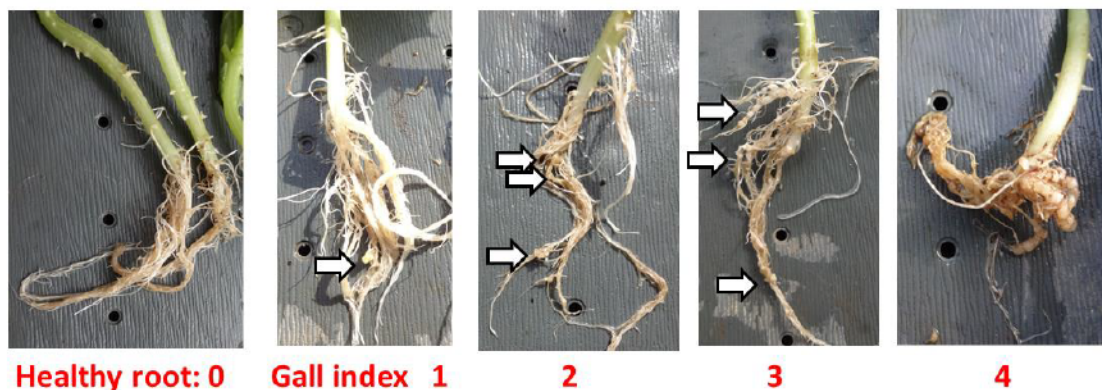


Fig. III-6. Standard of gall Index of cucumber seedling assay.

<結果および考察>

消毒直後の土壌は、上層では線虫害がみられなかったが、下層土では 12 サンプル中 10 サンプルで被害が見られた（ネコブ指数 2~48）。また、収穫後の土壌は、上層では 8 サンプルで（ネコブ指数 0~75）、下層土では 9 サンプルで（ネコブ指数 0~61）被害がみられた（表Ⅲ-8、9、図Ⅲ-7）。消毒方法の違いによる有意な差はみられなかった（ $P=0.33$ ）。

幼苗検定のネコブ指数と real-time PCR 法およびベルマン法で求めた *M. incognita* 密度を図Ⅲ-8、9 に示す。

Real-time PCR 法で *M. incognita* が検出されなかった 13 サンプルのうち、11 サンプルは幼苗検定でもネコブ指数が 0 になった。残る 2 サンプルは 2 以下の低いネコブ指数を示した。Real-time PCR 法で求めた *M. incognita* 密度と幼苗検定のネコブ指数の間には強い相関関係がみられた（ $r^2=0.4586$, $P<0.001$ ）（図Ⅲ-8）。ネコブ指数 20 以上を深刻な被害と設定すると、*M. incognita* が 48 頭/20 g 乾土以上存在する土壌で深刻な被害がみられた。一方、ベルマン法で *M. incognita* が検出されなかった 19 サンプルのうち、8 サンプルでは幼苗検定でネコブ指数がみられた。その値は最大 67、平均 32 であった。ベルマン法で求めた *M. incognita* 密度と幼苗検定のネコブ指数の間には相関関係がみられなかった（ $P>0.1$ ）（表Ⅲ-9）。

よって、ベルマン法よりも real-time PCR 法の方が幼苗検定の結果との相関性が高く、またネコブ指数 20 以上という深刻な被害は real-time PCR 法による密度測定によって予測できることが示された。

Table III-8. Gall index of cucumber seedling assay using surface soils collected after disinfection and harvesting.

	After disinfection		After harvesting	
	Rate of damage seedling (%)	Gall index	Rate of damage seedling (%)	Gall index
D-D 区	0	0	31	8
	0	0	8	2
	0	0	0	0
EtOH 頭上 かん水区	0	0	100	48
	0	0	38	16
	0	0	25	6
EtOH 減量 区	0	0	6	2
	0	0	6	2
	0	0	0	0
EtOH 区	0	0	85	27
	0	0	0	0
	0	0	0	0

Table III-9. Gall index of cucumber seedling assay using subsurface soils collected after disinfection and hervesting.

	After disinfection		After disinfection	
	Rate of damage seedling (%)	Gall index	Rate of damage seedling (%)	Gall index
D-D 区	67	17	100	57
	33	8	0	0
	100	67	0	0
EtOH 頭上 かん水区	100	50	100	61
	100	46	100	48
	100	75	100	53
EtOH 減量 区	67	25	50	19
	0	0	6	2
	17	4	100	53
EtOH 区	100	50	100	50
	33	8	0	0
	0	0	33	13

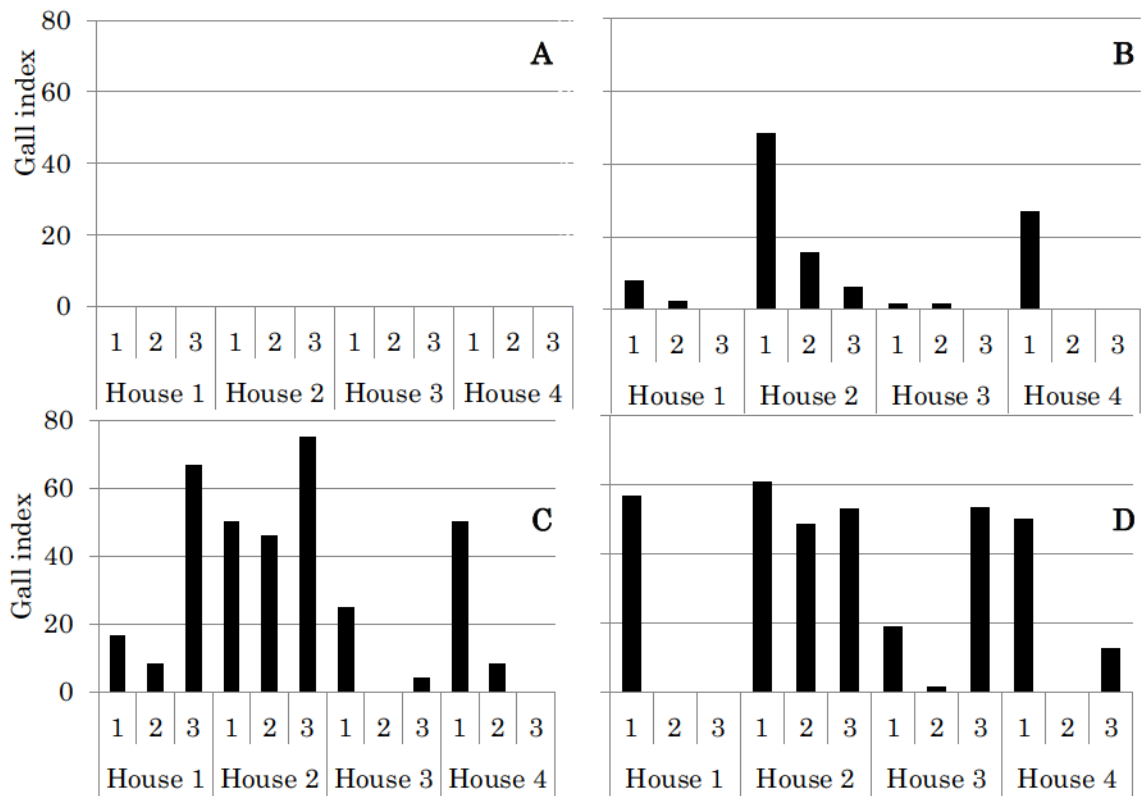


Fig. III-7. The gall indices of the seedling assay. Surface soil after disinfection(A), surface soil at harvest (B), subsurface soil after disinfection (C) and subsurface soil at harvest (D) . House 1 はD-D区、2はEtOH頭上かん水区、3はEtOH減量区、4はEtOH区を示す。

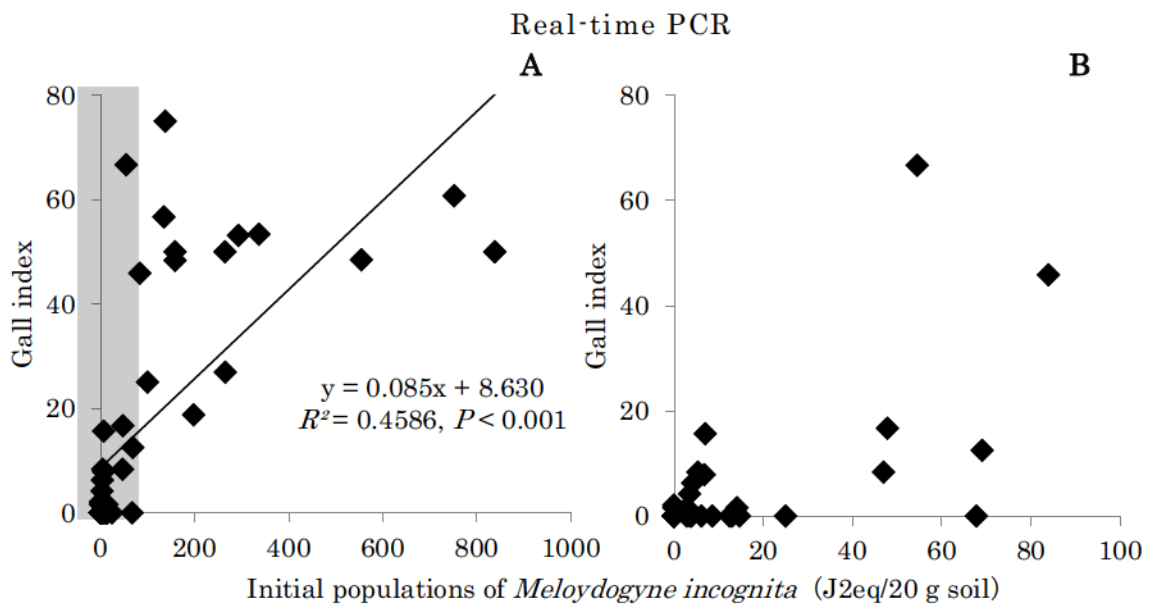


Fig. III-8. Relationship between the gall indices in the seedling assay and the initial populations of *Meloydogyne incognita* with the real-time PCR method. All data(A) , macrograph (B) of the gray area in Fig III-8A.

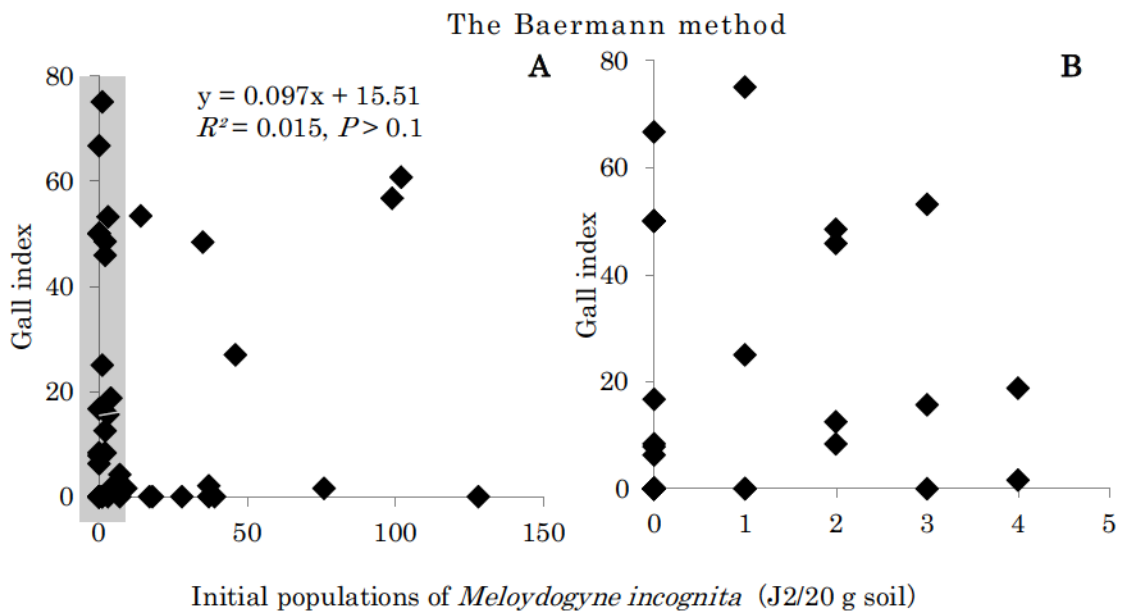


Fig. III-9. Relationship between the gall indices in the seedling assay and the initial populations of *Meloydogyne incognita* with the Baermann method. All data(A) , macrograph (B) of the gray area in Fig III-9A.

9) 圃場で栽培したトマト根のネコブ被害度の調査

各消毒処理後、ハウスでは 2013 年 12 月 5 日まで慣行法に従ってトマトの栽培・収穫を行った。収穫終了後に各ハウス 3 地点（土壌採取地点と同じ場所）からトマト 5 株を採取し、その根のネコブ着生程度を評価し、ネコブ指数を算出した。評価法および算出法は幼苗検定と同様に行った。

<結果および考察>

全 12 サンプルのうち、EtOH 頭上かん水区のみ、3ヶ所中 2ヶ所の株からネコブ被害がみられた（ネコブ指数 5～50）（表Ⅲ-10）。ネコブ指数 5 および 50 を示した地点の消毒直後の real-time PCR 法で求めた *M. incognita* 密度は上層 0 頭および 13 頭/20 g 乾土、下層 159 頭および 138 頭/20 g 乾土であった。収穫後はそれぞれ上層 159 頭、4 頭/20 g 乾土、下層 753 頭、293 頭/20 g 乾土であった（表Ⅲ-3, 4）。また幼苗検定の結果は消毒直後の上層がどちらも 0、下層が 50 および 75、収穫後の上層が 48 および 6、下層が 61 および 53 であった（表Ⅲ-8, 9）。

上層の土壌は消毒直後に幼苗検定でネコブ指数がみられなかったにも関わらず、収穫後では幼苗検定およびハウスで栽培したトマトの根にネコブ指数がみられた。これは消毒直後に下層の土壌に生き残っていた *M. incognita* が上層に移動してきた可能性が考えられる。土壌サンプリングの深さについて、Perry et al. (2009)は 30 cm またはそれ以下で十分であるとしているが、一方、Ogbuji (1981)は 75-90 cm の深さまで根にネコブが着生していたと報告している。これはつまり、*Meloidogyne* spp.はこのような深さまで存在していたということを示している。よって、上層（0-30 cm）だけの分析ではなく、下層（30-45 cm）も含めた分析を行わなければ、*M. incognita* の被害は正確には予測できないと考えられる。

Table III-10. Gall index of tomato cultivated in the green houses.

	Rate of damage seedling (%)	Gall index
D-D 区	0	0
	0	0
	0	0
EtOH 頭上かん水区	100	50
	0	0
	20	5
EtOH 減量区	0	0
	0	0
	0	0
EtOH 区	0	0
	0	0
	0	0

10) まとめ

M. incognita の潜在的被害を予測するため、キュウリ苗を用いた幼苗検定に代わる real-time PCR 法の開発を行った。千葉県トマト栽培ハウス 4 棟においてそれぞれ異なる土壌消毒を行い、その消毒前後およびトマト栽培後の土壌を採取して、*M. incognita* の密度測定および幼苗検定を行い、密度とネコブ指数の関係を調査した。

M. incognita の密度測定は DNA 抽出と real-time PCR を組み合わせた real-time PCR 法とベルマン法の 2 通りの手法で行った。その結果、real-time PCR 法で *M. incognita* が検出されなかった 13 サンプルのうち、幼苗検定でネコブ指数（最大 2）を示したのは 2 サンプルであったが（図 III-8）、一方ベルマン法で *M. incognita* が検出されなかった 19 サンプルのうち、8 サンプルでは幼苗検定でネコブ指数（最大 67）がみられた（図 III-9）。*M. incognita* 密度と幼苗検定のネコブ指数の間には強い相関関係がみられたのは real-time PCR 法のみであった（ $P < 0.001$; 図 III-8）。

幼苗検定におけるネコブ指数 20 以上を深刻な被害と設定すると、

real-timePCR 法で求めた *M. incognita* 密度が 48 頭/20 g 乾土以上存在する土壌で深刻な被害がみられることがわかった (図Ⅲ-8)。

上層の土壌は消毒直後に幼苗検定でネコブ指数がみられなかったにも関わらず、収穫後では幼苗検定およびハウスで栽培したトマトの根にネコブ指数がみられた (図Ⅲ-7)。よって、上層 (0-30 cm) だけの分析ではなく、下層 (30-45 cm) も含めた分析を行わなければ、*M. incognita* の被害は正確には予測できないと考えられる。

Real-time PCR 法は用いる土壌の量が少なくすみ、また迅速に診断できることから、下層土まで診断できる手法として幼苗検定に代わる土壌診断法を開発することが出来た。

第IV章 2種の土壌くん蒸剤が土壌微生物群集と発病リスクに与える影響

1. はじめに

コンニャク (*Amorphophallus konjac*) はサトイモ科の作物であり、その球茎は日本、中国、ミャンマー、韓国など東南アジアで食用とされてきた。また近年はコンニャクの主成分であるグルコマンナン（食物繊維）が健康によいことで世界中から注目されている。日本では年間6万t以上生産されており、群馬県が全国の栽培面積の約80%を占める最大産地となっている（平成24年度、農林水産省）。

コンニャクの球茎（イモ）は3~4年かけて収穫される。種イモを植えると根が伸びて小さなイモ（生子：きご）ができる。この生子を翌年植え直すと1年かけてイモが太り、一年玉となる。これを3年繰り返して三年玉（大きいもので直径30cmほど）となったものを収穫する。イモは低温に弱く腐りやすい。霜害を避けるため、秋に畑から掘り起こして保管して春に再度植え直す必要がある。

コンニャクは毎年同じ畑に植え直す連作体系を取っているため、根腐病 (*Pythium aristosporum*)、腐敗病 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、乾腐病 (*Fusarium solani*)、白絹病 (*Sclerotium rolfsii*)、ネコブセンチュウ (*Meloidogyne* spp.) などの土壌病害が発生しやすい。対策として土壌くん蒸剤のクロルピクリン（商品名クロピク；CP）を用いた土壌消毒が毎年行われている。しかし土壌くん蒸剤は環境破壊や人体への健康被害が懸念されるため、近年、新しい防除体系への転換が求められている。

農業現場では今、多様な土壌病虫害防除法が求められている。すなわち、常に強力な土壌くん蒸剤に頼るのではなく、メタムソディウム（商品名キルパー；MS）などの殺菌効果の穏やかなくん蒸剤を導入して強力な薬剤（CP）の使用量・回数を減らしたり、被害が甚大でない圃場では緑肥作物や輪作体系を導入したりと、防除法を圃場条件に合わせて選択することが望まれている。そのため、新たな土壌診断技術、つまり病虫害の密度が低く、土壌本来の微生物多様性によって発病が抑制されると期待される場合は農薬を使わない、病虫害の密度が中程

度の場合は農薬以外の生物防除などを行う、そして甚大な被害が予想される場合は農薬を用いる、というように土壌の状況に合わせて防除法を診断する技術が求められている。

本章の目的は、2種のくん蒸剤（CPおよびMS）が土壌の本来持っている病害抑止性や静菌作用に与える影響の比較であった。具体的には群馬県のコンニャク圃場について、土壌病害虫、すなわち、コンニャク根腐病菌（*P. aristosporum*, *P. myriotylum*）、およびネコブセンチュウ（*Meloidogyne* spp.）の密度変化と土壌微生物の群集構造や微生物活性の変化を調査した。また室内で病害虫を接種後に栽培試験を行ってリサーチジェンスの発生リスクのくん蒸剤処理土壌間の比較とその差の要因を調べた。

2. 材料、方法、結果および考察

1) 室内試験：室内くん蒸

圃場でのくん蒸は地温などの環境状況に著しく結果が影響されると考えられたため、はじめにポリビンを用いた室内くん蒸を行った。

1-1) 予備試験

<材料および方法>

2013年に群馬県コンニャク圃場から消毒前に表層0-30 cmの土壌を採取した。5 mmの篩にかけた後、実験まで4℃で保管した。以下、この土壌を2013FB（F圃場消毒前）土壌とする。

2013FB土壌30 gを50 mL容ポリビンに充填し、MSは慣行量（有効成分30%のキルパー：50 L/10a）の200%（20 μL/30 g土壌）およびその1/10にあたる20%（2 μL/30 g土壌）、CPは慣行量（有効成分80%のドロクロ：30 L/10a）の125%（6 μL/30 g土壌）およびその1/10にあたる13%（0.6 μL/30 g土壌）を添加した（表IV-1）。CPは三井東圧クロールピクリン99.5%（三井化学）を、MSはキルパー液剤30.0%（三菱商事）を用いた。くん蒸剤は圃場条件下では表層の15

cm まで拡散していると仮定し、また土壌の比重を 1 g/cm^3 と仮定して、10a を土壌 150 t として計算した。慣行量に対する割合が違う理由は、圃場での使用量ではなく有効成分の量を CP に合わせようとしたためである。ポリビンは薬剤ごとに 6 連で用意し、そのうち 3 つを 25°C 暗所の恒温器内で 1 日くん蒸し、残りの 3 つは同じ恒温器内で 7 日間くん蒸した。くん蒸後に野外でフタをあけ、小型扇風機の前にフタを開けたまま 30 分静置して換気した。換気後、土壌 10 g を呼吸活性測定に、土壌 3 g を ATP 含量の測定に使用した。呼吸活性はくん蒸 1 日間のサンプルについては開封 0 日目～7 日目および 1 ヶ月後、くん蒸 7 日間のサンプルについては開封 0、1、2、4 日目および 1 ヶ月後、ATP 含量は両培養期間とも開封 1 日目および 1 ヶ月後に測定した。

呼吸活性は土壌 10 g を 30 mL 容バイアル瓶に充填してブチルゴム栓でフタをし、中の空気を 0.5 mL シリンジでとってガスクロマトグラフィー (GC-8A、SHIMADZU) で CO_2 濃度を測定した。バイアル瓶を 25°C で 4 時間培養後に再度、中の空気を 0.5 mL シリンジでとって CO_2 濃度を測定して 0 時間目との差から呼吸速度を求めた (1 連)。

ATP 含量の測定は ATP 含量測定キット、ルシフェール 250 (キッコーマン) を用いて浦嶋ら (2007) の手法で行った。土壌 3 g と 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0) 300 mL を 500 mL 容ポリビンに充填して、5 分間振とう機で振とうした (120 r/min) (1 連)。小試験管に懸濁液 1 mL と ATP 消去試薬 0.1 mL を添加して攪拌後、 30°C の恒温器内で 30 分静置した。静置後、溶液 0.1 mL を測定用チューブに添加して ATP 抽出試薬 0.1 mL と混合、20 秒後に発光試薬 0.1 mL を添加してただちにルミノメーター (ルミテスター C-100, キッコーマン) で発光量 RLU 値 (relative light unit) を測定した (1 連)。検量線には 8 nmol ATP 標準試薬 (キッコーマン) を段階希釈したもの (2×10^{-11} , 8×10^{-11} , 3×10^{-10} , 1×10^{-9} , $5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$) を用いて、乾土 1 g あたりの ATP 含量を求めた。

Table IV-1. Design of preriminally experiment of fumigation using sealed bottle

	Concentration of active ingredient	Commonly used ($\mu\text{L}/30\text{ g soil}$)	Addition ($\mu\text{L}/30\text{ g soil}$)	Ratio of addition to commonly used (%)
Control			0	0
MS66.3%	30%	10	20	200
MS6.6%			2	20
CP125%	99.5%	4.8	6	125
CP13%			0.6	13

<結果および考察>

呼吸活性については、くん蒸 1 日間の場合、MS20%区と CP13%区は無処理区と同じ挙動を示した (図IV-1)。MS200%区は開封 2 日目まで呼吸活性が減少し続け、3、4 日目と増加し、その後緩やかに減少した。CP125%区は開封 0 日目が最も呼吸活性が低く、2 日目まで増加し、その後緩やかに減少した。くん蒸 7 日間の場合、MS20%区と CP13%区は開封 2 日目の計測が出来なかったため挙動がわからなかった。MS200%区は開封 0 日目が最も低く、1 日目に最大になり、その後緩やかに減少した。CP125%区は開封 0 日目が最も低く、2 日目に最大になり、その後緩やかに減少した (図IV-2)。

CP125%区が示した山型の呼吸活性の推移は Naganawa et al. (1990)も報告している。すなわち、CP を $18.5\ \mu\text{L}/100\text{ g}$ 土壌に添加して 3 日間土壌をくん蒸した場合に、開封 1 日目までに呼吸活性が最小値を示し、その後 2 日目までに最大値を迎えることを明らかにした。 $18.5\ \mu\text{L}/100\text{ g}$ 土壌という CP の添加量は CP125%区 ($20\ \mu\text{L}/100\text{ g}$ 土壌) とほぼ同等であった。また、Naganawa et al. (1990)は呼吸活性の最大値を迎えるまでにかかる期間は、くん蒸剤の添加量が少ない、くん蒸期間が短い、あるいは土壌の粒子が粗い場合に短くなると報告している。この報告は CP 処理土壌の呼吸活性が最大値を迎える期間は実験条件によって左右されることを示した。

MS200%区の呼吸活性はくん蒸 1 日間の場合では開封後も値が下が

ったが、くん蒸 7 日間の場合では開封後に活性が増加した。一方、CP125%区はくん蒸 1 日間の場合でも開封後に値が下がらなかった。MS 処理土壌における有効成分 MITC の発生と消失について、Triky-Dotan et al. (2007)は 34 土壌を調査した結果、密閉系では砂の割合が低いほど、添加後 152 時間までの積算 MITC 濃度の値は低くなることを明らかにした。60 $\mu\text{L/g}$ 乾土添加した MS (有効成分 37%) は速いもので添加 10 時間以内に MITC 濃度曲線の最大値を発生し、50 時間以内に検出されなくなった。一方遅いものでは添加から 50 時間後まで濃度が増加し、150 時間たっても MITC が検出された。本論文で用いた 2013FB 土壌の砂の割合は測定していないが、砂質土ではなかったため、くん蒸 7 日間 (168 時間) までの間に MITC の発生と消失が終わっていたと考えられる。また、くん蒸 1 日間 (24 時間) ではまだ MITC に分解されていない MS が土壌中に残存しており、開封・換気をしてその後フタを閉めることで再度 MITC がポリビンの中に発生したと考えられる。CP については、Triky-Dotan & Ajwa (2013)が CP を 100 mg/kg 土壌添加した場合に、密閉系では添加後 24 時間で CP 濃度は初期値の 20~60%に減少すると報告している。また、Qin et al. (2016)の研究では CP を 100 mg/kg 土壌に添加した場合、1 日間培養後に CP の濃度は添加量の約 60%に減少した。よって、くん蒸 1 日間の CP125%区では開封時に CP の有効成分が残存していたと考えられるが、しかし、その後の開封・換気処理によって CP の有効成分はその後再び密閉しても微生物に影響を与えないレベルまで消失したと考えられる。

ATP 含量については、無処理区において開封後 1 ヶ月の値が開封 0 日目の約半分になった (図IV-3)。よって何も処理せずとも、ポリビンの中で培養するだけで ATP 含量は減少することが示唆された。Ross et al. (1980)は 3 つの土壌を 25°C で 28 日間および 56 日間培養して土壌の ATP 含量を測定した。その結果、28 日間培養した土壌より 56 日間培養した土壌の方で ATP 含量が減少した土壌が 1 つあった。その原因は微生物密度や活性の変化によるものと考察していた。2013FB 土壌は Ross et al. (1980)が報告した土壌と同様の性質を持っていたと考えられる。

くん蒸 1 日間の場合、開封 0 日目の ATP 含量は無処理区と比べて、

MS200%区で 48%、CP125%区で 8%に減少し、開封 1 ヶ月後ではそれぞれ 95%、81%まで回復した。くん蒸 7 日間の場合、開封 0 日目の ATP 含量は無処理区と比べて、MS200%区で 17%、CP125%区で 1%に減少し、開封 1 ヶ月後ではそれぞれ 75%、32%まで回復した (図 IV-4)。よって、MS200%区、CP125%区ともにくん蒸期間は 7 日間の方が殺菌効果が高く、7 日間くん蒸した場合は 1 ヶ月たっても完全には ATP 含量が回復しないことが示された。

呼吸活性の結果から、MS はくん蒸 1 日間ではその後の開封・換気が不十分なことと、CP の有効成分は同じ条件下では開封・換気によって MS よりも素早く消失する可能性が示唆された。ATP 含量の結果からは、CP を慣行量の 125%添加すると微生物バイオマスの回復に 1 ヶ月以上かかる可能性が示唆された。

予備実験の当初の目的はくん蒸後の呼吸活性および ATP 含量の最大値と最小値を薬剤間で比較することであった。しかし、Naganawa et al. (1990) の結果と同様に、呼吸活性は開封後 2~4 日目までに最大値を迎えていたと考えられるが、その変化は連続的であり、1 日に 1 回 4 時間で発生した CO₂ の平均を求める方法では、最大値と最小値を正確に求めることは出来ないと考えられた。同様に、ATP 含量も常に変化し続けていると考えられたため、ATP 含量の最大値と最小値も正確に測定することは出来ないと判断した。

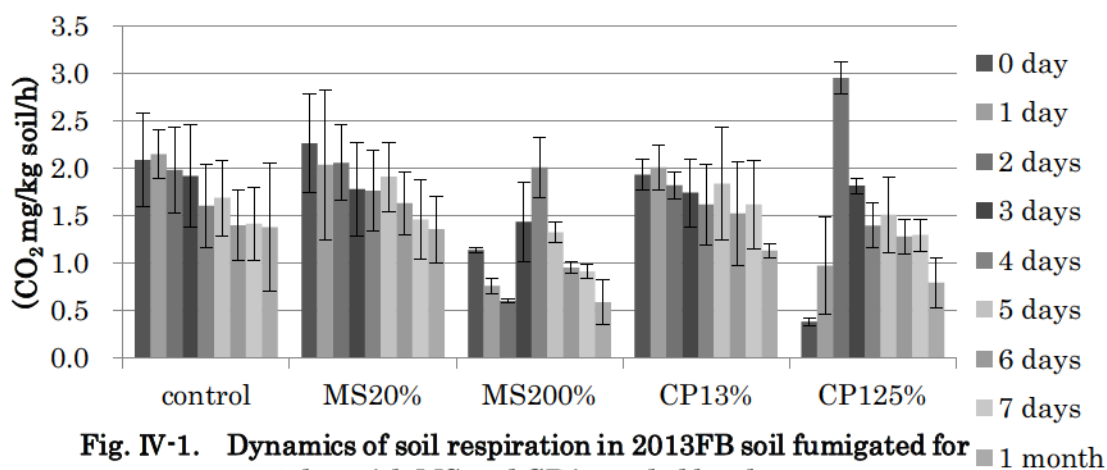


Fig. IV-1. Dynamics of soil respiration in 2013FB soil fumigated for 1 day with MS and CP in sealed bottle.

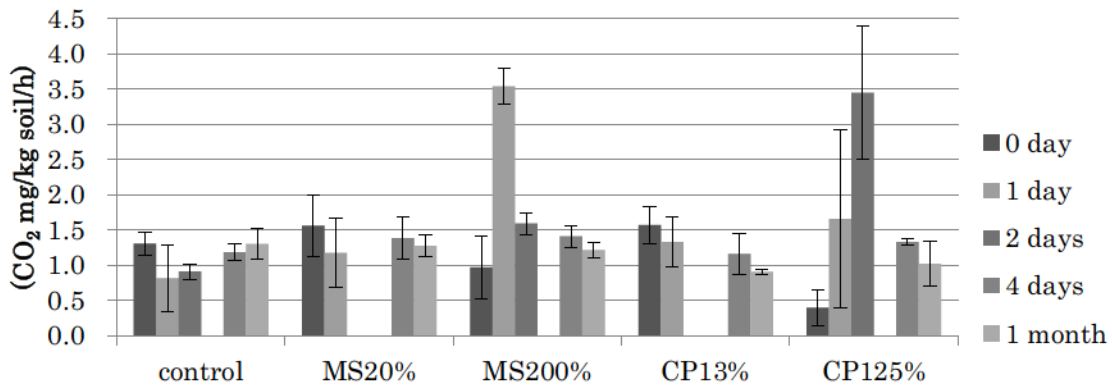


Fig. IV-2. Dynamics of soil respiration in 2013FB soil fumigated for 7 day with MS and CP in sealed bottle.

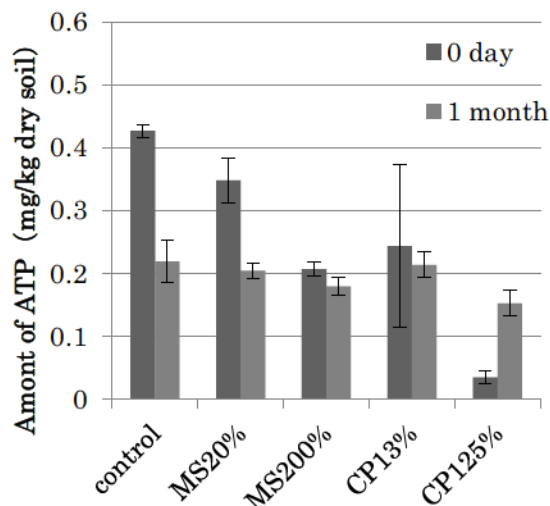


Fig. IV-3. Dynamics of ATP content in 2013FB soil fumigated for 1 day with MS and CP in sealed bottle.

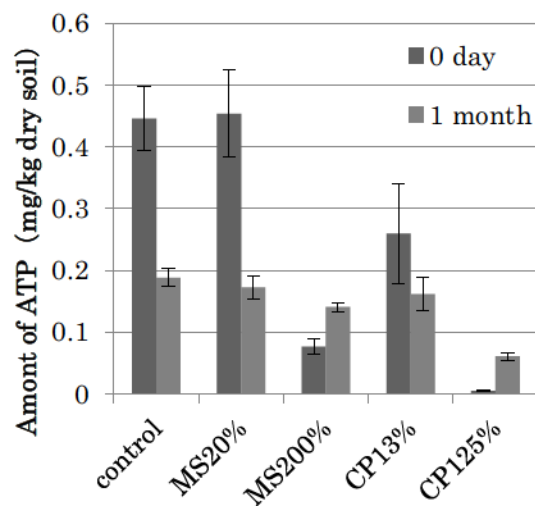


Fig. IV-4. Dynamics of ATP content in 2013FB soil fumigated for 7 day with MS and CP in sealed bottle.

1-2) くん蒸期間の検討

室内くん蒸を行う上で、何日間くん蒸を行ってからポリビンを開封すべきか検討した。

<材料および方法>

2014年に群馬県のコンニャク圃場 T 圃場の CP 区から消毒前の 3 月

にスコップで表層 0~15 cm の土壌を採取した。5 mm の篩にかけた後、実験まで室温で保管した。以下、この土壌を 2014TBC (T 圃場消毒前無処理区) 土壌とする。

2014TBC 土壌の最大容水量を測定した。測定方法は「II-6) くん蒸土壌における DNA 消失時期の特定」に記した。

2014TBC 土壌 30 g (滅菌蒸留水を添加して最大容水量の 60% の水分含有量に調節したもの) を 50 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを 30°C の恒温器で 1 日間前培養した後に、くん蒸剤を添加した。くん蒸剤は慣行量 (有効成分 80% のドロクロ : 30 L/10a、有効成分 30% のキルパー : 50 L/10a) の 50% (MS : 5.0 μ L/30 g 土壌、CP : 2.4 μ L/30 g 土壌) を添加した。ポリビンを 30°C の恒温器内で 1 日間、3 日間、7 日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壌を移し、1 時間ドラフト内で換気後に ATP 含量を測定した。各処理 3 連、測定は 1 連で行った。

<結果および考察>

ATP 含量は無処理区でも培養期間が長くなるごとに値は減少した (図 IV-5)。MS を処理した土壌では、3 連の平均値はくん蒸 7 日間まで減少し続けたものの、くん蒸 7 日間の ATP 含量の数値は、3 連の平均値が 0.15 mg/kg 乾土であったのに対して、標準偏差は 0.08 mg/kg 乾土と大きくなった。これは、「1-1) 予備試験」で考察したように、くん蒸 7 日間までの間に MITC の発生と消失が終わっていたと考えられることから、ATP 含量の回復が始まっていたサンプルがあったためと考えられる。CP を処理した土壌では 1 日間くん蒸した場合より 3、7 日間くん蒸した場合の方が有意に ATP 含量が減少した ($P < 0.05$)。Qin et al. (2016) の研究では CP を 100 mg/kg 土壌添加した場合に 15 日間くん蒸しても添加量の約 20% が残存したことから、7 日以上くん蒸を続けても ATP 含量は減少し続ける可能性が考えられた。

以上の結果から、7 日間くん蒸した場合にはすでに MS の殺菌効果が消失して ATP 含量の回復が始まっていた可能性を考慮して、3 日間が本論文で行う実験系に最も適したくん蒸培養期間であると判断した。

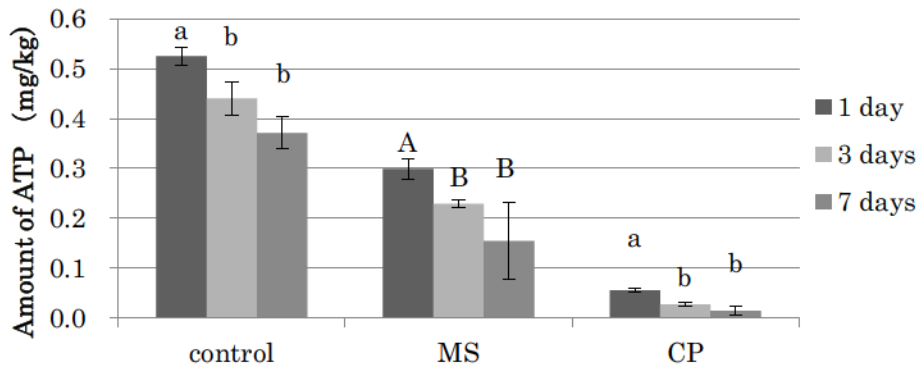


Fig. IV-5. ATP content in 2014TBC soil fumigated for 1, 3 and 7 days with MS and CP in sealed bottle. Different alphabets mean significantly differences among the same fumigant ($P < 0.05$).

1 - 3) 処理濃度の検討 (2014TBC 土壌)

<材料および方法>

「1 - 2) くん蒸期間検討」と同じ土壌 (2014TBC) 300 g (滅菌蒸留水を添加して最大容水量の 60% の水分含有量に調節したもの) を 500 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを 30°C の恒温器で 1 日間前培養した後に、慣行量 (有効成分 80% のドロクロ : 30 L/10a、有効成分 30% のキルパー : 50 L/10a) の 12.5% ~ 100% に当たるくん蒸剤を添加した (表 IV-2)。無処理区には何も加えなかった (各処理 2 連)。ポリビンを 30°C の恒温器内で 3 日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壌を移し、1 時間ドラフト内で換気して別のポリビンにつめ、再度 30°C で培養した。

表 IV-3 に分析項目とサンプルを採取した時期を記す。

Table IV -2. Design of an experiment to decide an appropriate concentration of fumigant using 2014TBC soil.

Fumigant	Dosage of fumigant ($\mu\text{L}/300 \text{ g soil}$)				
	(Concentration of ones commonly used)				
	Control	12.5%	25%	50%	100%
MS	0	12.5	25.0	50.0	100.0
CP		6.0	12.0	24.0	48.0

Table IV-3. Items of an experiment to decide an appropriate concentration of fumigant using 2014TBC soil.

Period of incubation after fumigation	ATP content	Soil respiration	Density of fungi and bacteria	Density of free-living nematodes
After unsealing	○	—	○	○
1 week later	○	○	—	—
2 weeks later	○	○	○	○
1 month later	—	—	○	—

ATP 含量および呼吸活性は前述した方法と同じ手法で行った。

自活性線虫密度はベルマン法を用いて各処理 2 連のボトルから 1 ボトルあたり 2 連で土壌 19.8~20.2 g から線虫を抽出して、実体顕微鏡下で頭数を計測した。1 ボトルあたりの 2 連は混ぜて計測した。

一般糸状菌密度および一般細菌密度は希釈平板法で求めた。希釈平板法は土壌 10 g を 200 mL 三角フラスコに入れて滅菌生理食塩水 (0.9%NaCl) 90 mL を加えて超音波洗浄機で 2 分間処理して、これを 10^{-1} 希釈液とした (1 連)。懸濁液 100 μ L を取って滅菌生理食塩水 900 μ L に懸濁して 10^{-2} 希釈液を作成した。同様の操作を繰り返して段階希釈液を作成し、ローズベンガル培地 (Martin, 1950) と 1/100 普通ブイヨン培地 (Eiken Chemical Co., Ltd.) に 100 μ L を塗布した (2 連)。寒天培地を 30°C で培養して糸状菌は 2、4 日後に、細菌は 10 日後にコロニー数を計測した。

<結果および考察>

ATP 含量については、開封直後に MS 区で無処理区の 44~90% に、CP 区で 6~21% に減少した。開封後の ATP 含量の回復程度は、MS 区では開封 1 週間後ではほぼ頭打ちになっていたが、CP25% 区~100% 区では 2 週間後まで ATP 含量が増加した (図 IV-6)。

呼吸活性について開封 1 週間後では MS 区では無処理区の 59~90% と無処理区以上の値を示す処理区はなかったが、CP 区では 68~138% と、無処理区より活性が高くなった処理区があった。開封 2 週間後に

は全ての区で無処理区と同等かそれ以下になった（図IV-7）。

自活性線虫の密度は無処理区が 126 頭/20 g 土壌であったのに対して、1 頭/20 g 土壌以上検出された処理区はなかった。2 週間後まで培養しても自活性線虫は増加しなかった（表IV-4）。

一般糸状菌密度は MS12.5%区、CP100%区を除いて有意差はなかった（図IV-8）。CP100%区の 2 週間後における急激な密度の増加は、平板培地上のコロニーの形態が 1 種類だったことから、なんらかの菌が混入した可能性が高いと考えられる。一般細菌密度は開封直後では MS 区の方が CP 区より有意に密度が高かったが（ $P < 0.05$ ）、開封 2 週間後には有意差はみられなくなった（図IV-9）。

ATP 含量の薬剤間の傾向および 2 週間後の回復傾向は細菌密度の傾向に似ていた。一方で糸状菌密度の傾向は薬剤間およびくん蒸後日数によってほとんど変化がなく、ATP 含量の傾向とは異なった。よって、くん蒸後の ATP 含量の違いは細菌密度の違いによって生じている可能性が考えられた。

MS 処理土壌および CP 処理土壌において、慣行量の 12.5%と 25%を添加した場合、および 50%と 100%を添加した場合はそれぞれ開封直後の ATP 含量に有意差がみられなかった。そのため、以下の試験には慣行量の 25%および 100%の添加を行うこととした。

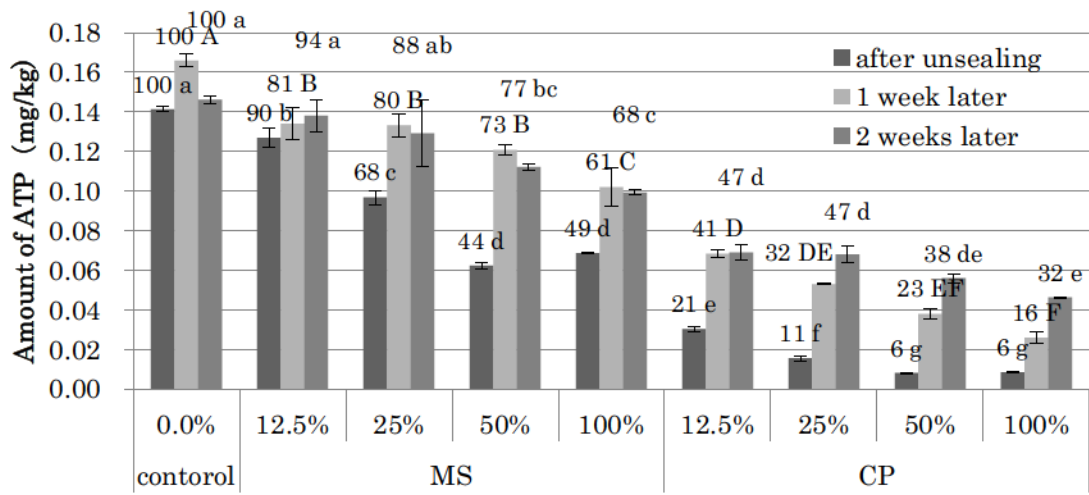


Fig.IV-6. ATP content in 2014 TBC soil treated with different concentrations of fumigants. Figures are ratios of ATP to the control. Different alphabets mean significant differences among the same incubation period. (P<0.05)

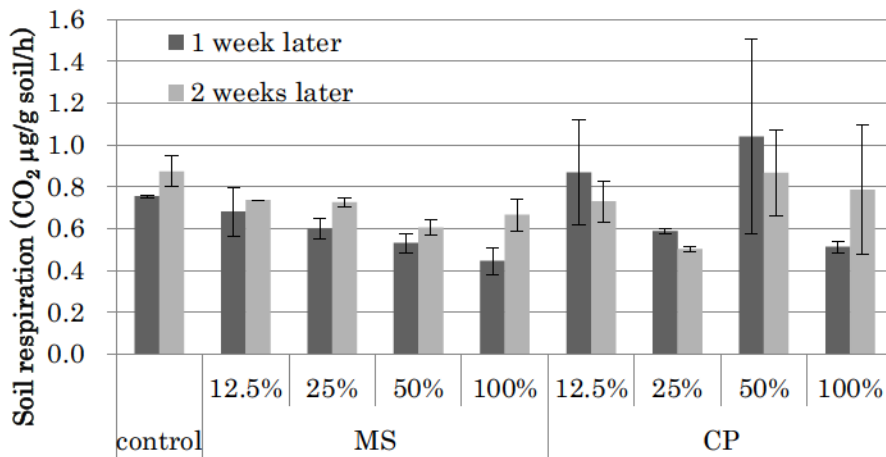


Fig. IV-7. Soil respiration in 2014TBC soil treated with different concentrations of fumigants.

Table IV-4. Density of free-living nematodes (individuals/20 g soil) in 2014 TBC soil treated with different concentrations of fumigants.

	Period of incubation after fumigation		
	After unsealing	2 weeks later	4 weeks later
Control	126	91	86
MS12.5%	0.5	0	0
MS25%	0.0	0	0
MS25%	0.0	1	1
MS100%	0.0	0	0
CP12.5%	0.3	0	0
CP25%	0.0	0	0
CP50%	0.0	0	0
CP100%	0.3	0	0

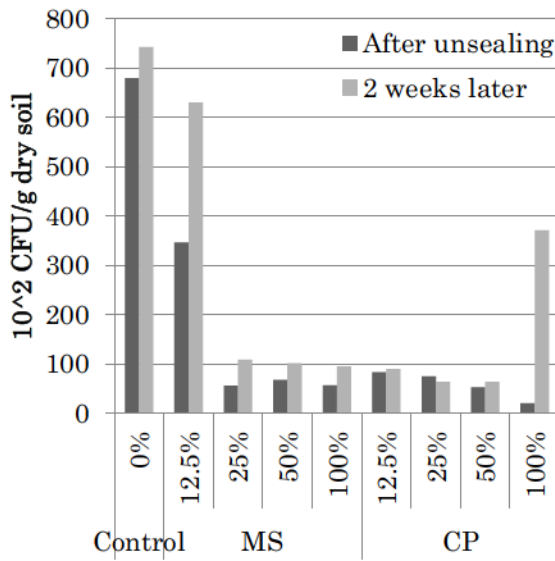


Fig. IV-8. Density of culturable fungi in 2014 TBC soil treated with different concentrations of fumigants.

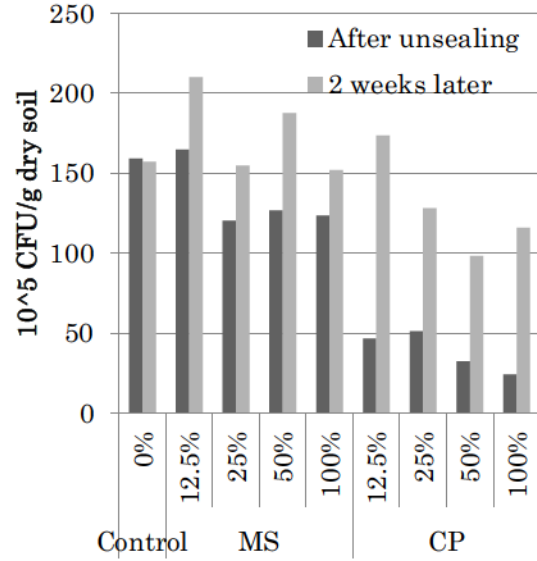


Fig. IV-9. Density of culturable bacteria in 2014 TBC soil treated with different concentrations of fumigants.

1-4) 処理濃度の検討 (2015THC 土壌)

「1-3) 処理濃度の検討 (2014TBC 土壌)」の反復実験を、異なる土壌を用いて行った。

<材料および方法>

2015年に群馬県のコンニャク圃場 T 圃場の無処理区から栽培後の11月にスコップで表層0-15 cmの土壌を採取した。5 mmの篩にかけた後、室温で実験まで保管した。以下、この土壌を2015THC土壌(T圃場収穫後無処理区)とする。

2015THC土壌150 g(脱イオン水を添加して最大容水量の60%の水分含有量に調節したもの)を500 mL容ポリビンに充填した。ポリビンを30°Cの恒温器で1日間前培養した後に、慣行量(有効成分80%のドロクロ:30 L/10a、有効成分30%のキルパー:50 L/10a)の25%および100%に当たるくん蒸剤(MS:12.5 μ L/150 g、50 μ L/150 g、CP:6 μ L/150 g、24 μ L/150 g)を添加した。無処理区には何も加えなかった(各処理2連)。30°Cの恒温器内で3日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壌を移し、1時間換気した後にATP含量の測定と希釈平板法を用いて一般糸状菌密度、一般細菌密度測定を行った。また呼吸活性を、土壌10 gを30 mL容バイアル瓶に充填して直後に0時間目のCO₂濃度を測定し、7日間30°C暗所で培養後、168時間後に再度CO₂濃度を測定して0時間目との差から呼吸速度を求めた(1連)。

<結果および考察>

ATP含量については、MS区で無処理区の40~104%、CP区で8~19%になった。MS25%区の値(104%)は無処理区と比べて有意差がみられなかった(P=0.4)(図IV-11)。

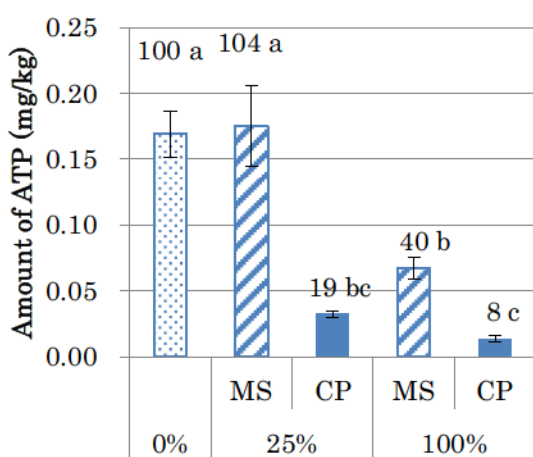
呼吸活性について、開封直後から7日目までのCO₂発生量を時間当たりに換算した値は、MS区よりCP区の方が高い傾向にあったが、有意差はみられなかった(P=0.08)(図IV-12)。

希釈平板の結果、一般糸状菌密度はMS区よりCP区の方が密度が

低いという傾向を示した。一方、一般細菌密度は 100% 処理区では一般糸状菌と同じく MS 区より CP 区の方が密度が低かったが、25% 処理区では逆に CP 区の方が MS 区より低かった。

この結果を「1-3) 処理濃度の検討 (2014TBC 土壌)」の結果と比較すると、MS25% 区の ATP 含量が、2014TBC 土壌では無処理区の 68% に有意に減少していた ($P < 0.05$) のに対して、2015THC 土壌では 104% となり、無処理区との有意差がみられなかった ($P = 0.4$)。この結果は 2015THC 土壌の MS25% 区はくん蒸処理が適切に行われていなかった可能性を示した。

糸状菌および細菌密度は 2014TBC 土壌と 2015THC 土壌で異なる傾向を示した。2014TBC 土壌では ATP 含量と一般細菌密度の傾向が類似していたが、2015THC 土壌では逆に一般糸状菌密度の傾向が ATP 含量の傾向に類似していた。2014TBC 土壌と 2015THC 土壌では採取した時期および保管温度が異なるために微生物群集構造が異なり、薬剤に対する感受性が異なった可能性が考えられた。



FigIV-11. ATP content in 2015THC soil treated with different concentrations of fumigants. Figures are ratios of ATP to the control. Different alphabets mean significant differences ($P < 0.05$).

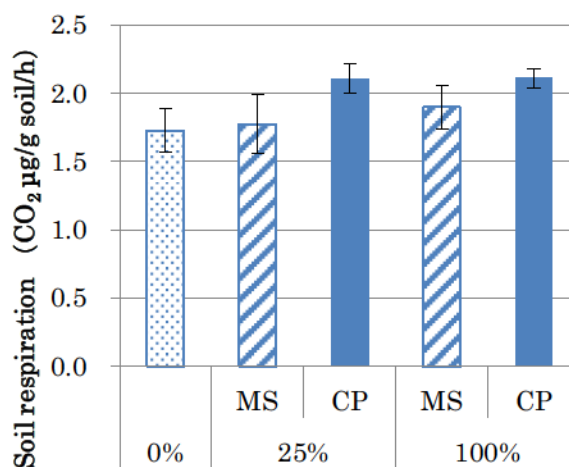


Fig. IV-12. Soil respiration for 7 days in 2015THC soil treated with different concentrations of fumigants.

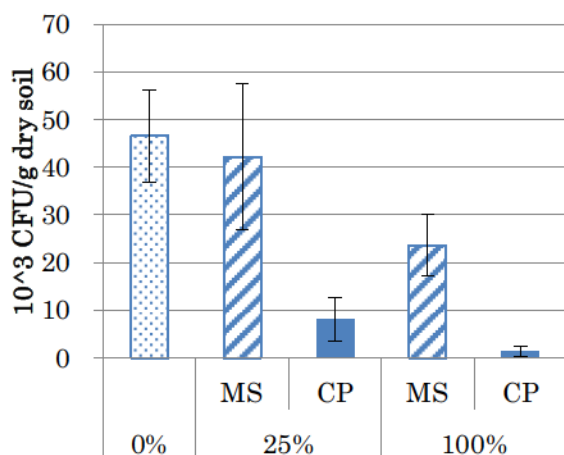


Fig. IV-13. Density of culturable fungi in 2015THC soil treated with different concentrations of fumigants.

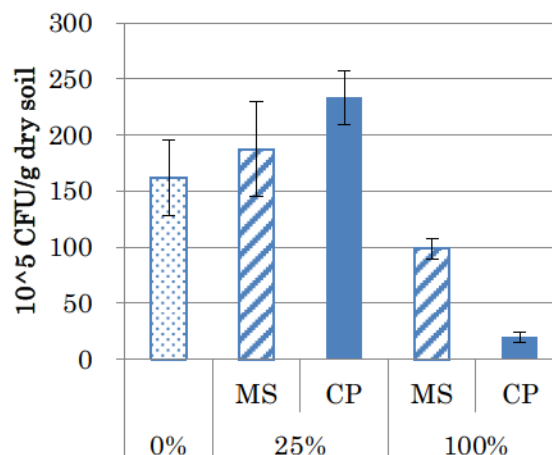


Fig. IV-14. Density of culturable bacteria in 2015THC soil treated with different concentrations of fumigants.

1 - 5) くん蒸時の土壤水分の検討

前述したくん蒸試験はすべて土壤水分を最大容水量の 60%に調節して行ったが、この 60%という数値に根拠はなかった。CP の薬効範囲（拡散範囲）は圃場容水量に対する土壤水分の割合が 45~76%の場合、割合が高くなるほど狭まる（佐々木, 1968）。一方 MS の殺菌効果は土壤水分（含水量/生土量×100）が 31~41%の場合、差がないことがわかっているが（岩崎&嶋崎, 1998）、それ以上乾燥した場合の影響については調査されていなかった。T 圃場の土壤は土壤水分を最大容水量の 60%以上にすると扱いにくかったため、これ以下の土壤水分について影響を評価した。具体的には土壤水分を最大容水量の 40~60%（土壤水分：18~25%）に調節してくん蒸を行い、くん蒸効果に差が出るか ATP 含量で比較した。

<材料および方法>

2015THC 土壤を室内で風乾して水分量を最大容水量の 40%に調節した。この土壤に脱イオン水を添加して、最大容水量の 40%、50%、60%の水分量をもつ土壤を作成した。各土壤 25 g を 500 mL 容ポリビ

ンに充填して 30℃の恒温器で 1 日間前培養した後に、慣行量（有効成分 80%のドロクロ：30 L/10a、有効成分 30%のキルパー：50 L/10a）の 100%に当たるくん蒸剤（MS：8.4 μL/25 g 土壌、CP：4.0 μL/25 g 土壌）を添加した。ポリビンを 30℃の恒温器内で 3 日間培養後に ATP 含量を測定した（2 連）。無処理区として最大容水量の 40%の水分量をもつ土壌を同様にして培養した。試験設計を表 IV-5 に記す。

Table IV-5. Design of an experiment to decide an appropriate moisture condition of soil during fumigation.

Soil moisture (% of Maximum water holding capacity)	Moisture contents (%)	MS100%	CP100%
40%	18.1%	8.4 μL/25 g soil	4 μL/25 g soil
50%	21.7%		
60%	25.0%		

< 結果 >

3 日間くん蒸後の ATP 含量の結果を図 IV-17 に示す。同じ薬剤を処理した区の中では、土壌水分による有意な違いはみられなかった（MS:P=0.95、CP:P=0.49）。

よって、土壌の水分条件は最大容水量の 60%のままとした。

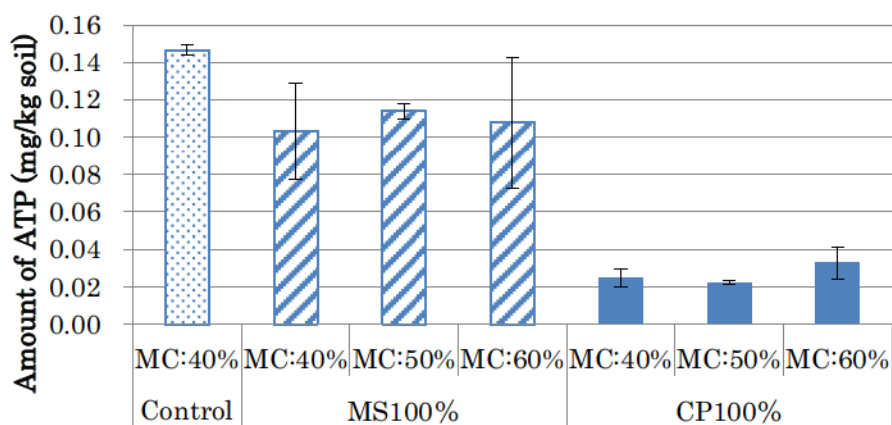


Fig. IV-15. ATP content in 2015 THC soil which was adjusted different conditions of soil moisture and treated with fumigants. MC means ratio of moisture content to maximum water holding capacity.

1-6) 室内くん蒸が土壤微生物に与える影響の評価 (2016 土壤)

「1-3) 処理濃度の検討 (2014TBC 土壤)」と「1-4) 処理濃度の検討 (2015THC 土壤)」で ATP 含量と糸状菌および細菌密度の傾向が異なったため、再度室内くん蒸試験を行った。

<材料および方法>

2016 年に群馬県のコンニャク圃場 F、T 圃場の MS 区および CP 区からと、K 圃場の 1 区および 2 区から消毒前の 3 月にスコップで表層 0~15 cm の土壤を採取した。5 mm の篩にかけた後、実験まで室温で保管した。以下、それぞれの土壤を FMS、FCP、TMS、TCP、K1、K2 土壤とする。

各土壤 150 g (脱イオン水を添加して最大容水量の 60% の水分含有量に調節したもの) を 500 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを 30°C の恒温器で 1 日間前培養した後に、慣行量 (有効成分 80% のドロクロ : 30 L/10a、有効成分 30% のキルパー : 50 L/10a) の 25% および 100% に当たるくん蒸剤 (MS : 12.5 μ L/150 g、50 μ L/150 g、CP : 6 μ L/150 g、24 μ L/150 g) を添加した。無処理区には何も加えなかった (各処理 2 連)。30°C の恒温器内で 3 日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壤を移し、1 時間換気した後に ATP 含量の測定 (抽出 1 連、測定 2 連) と希釈平板法を用いて一般糸状菌密度、一般細菌密度測定 (希釈 1 連、塗布 2 連) を行った。線虫密度はベルマン法を用いて線虫を抽出し、実体顕微鏡下で計数した (2 連)。くん蒸後の土壤を 2 週間 30°C で培養したあとに、FMS および FCP 土壤では希釈平板法および生土 0.5 g からの DNA 抽出を行った (2 連)。生土からの DNA 抽出は、黒ボク土抽出法 (Sato et al., 2010) をわずかに変更して行った (黒ボク土抽出法・群馬)。すなわち、乾土ではなく生土 0.5 g をスクリュューチューブに充填した。また、1 回目にクロロホルムを添加したあとの遠心分離 (15,000xg、15 分、18°C) を、遠心分離 (15,000xg、5 分、18°C) かけたのちに遠心分離機から出してボルテックスし、再度遠心分離 (15,000xg、15 分、18°C) かける方法に変更した。

抽出した DNA の全 DNA 量および糸状菌と細菌の遺伝子コピー数を

測定した。

全 DNA 量の測定には Qubit (Qubit®2.0 フルオロメーター、Life technologies) の dsDNA BR Assay Kit を用いた。キットの Buffer と Reagent を 199:1 の割合で混合し、専用の測定チューブに混合 Buffer 180 μ L を充填し、抽出 DNA を 20 μ L 添加した。添加後ボルテックスを行い、2 分室温で静置後に Qubit で測定した。検量線は付属の試薬を混合 Buffer 190 μ L に対して試薬 10 μ L 添加して同様に測定した。得られた抽出 DNA 液中の DNA 濃度を DNA 抽出過程の液量ロスから計算した抽出効率 (0.44) で割り、さらに生土 0.5 g あたりの乾土量で割って、乾土 1 g あたりの DNA 量を求めた。

糸状菌と細菌の遺伝子コピー数は real-time PCR で求めた。プレートには抽出した DNA を滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを用いた。Real-time PCR は、糸状菌についてはプライマー Its1f (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') (White et al., 1990) および 5.8S (5'-CGC TGC GTT CTT CAT CG-3') (Vilgalys & Hester, 1990) (以下、UFP プライマー) を用いて、95°C 10 秒、(95°C 5 秒、60°C 20 秒) \times 40 サイクル) の条件で、細菌についてはプライマー Eub338 (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG -3') (Lana, 1991) および Eub518 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer et al., 1993) (以下、UBP プライマー) を用いて、94°C 15 分、(94°C 30 秒、53°C 30 秒、72°C 30 秒) \times 40 サイクル) の条件で real-time PCR を行って Ct 値を求めた。既存の Ct 値 (y) と Log_{10} (遺伝子コピー数/ μ L) (x) の検量線 (沢田ら、未発表) を用いて換算した。すなわち、糸状菌については $y = -3.454x + 40.143$ 、細菌については $y = -3.7126x + 37.861$ の関係式を用いて 10 倍希釈サンプル中の Log_{10} (遺伝子コピー数/ μ L) を求めた。この 10 μ L 中の遺伝子コピー数を 10 倍したものを、抽出効率 (0.44) で割り、さらに生土 0.5 g あたりの乾土量で割って、乾土 1 g あたりの遺伝子コピー数を求めた。

< 結果および考察 >

ATP 含量の傾向は、3 圃場 6 土壌において、25%区、100%区ともに MS 区の方が CP 区よりも高い傾向にあった (図 IV-16)。糸状菌の密度

の傾向は土壌によって異なった（図IV-17）。すなわち、FMS 土壌および TMS 土壌では MS 区の方が CP 区より糸状菌密度が高い傾向にあったが、一方で FCP 土壌および TCP 土壌では CP 区の方が MS 区より糸状菌密度が高かった（ $P < 0.01$ ）。K1 土壌および K2 土壌ではどちらも CP 区の方が MS 区より糸状菌密度が高かった（ $P < 0.05$ ）。この傾向の違いは、薬剤使用歴の違いによるものと思われる。F 圃場および T 圃場では 4 年以上、圃場を 2 つにわけて、一方には MS を、もう一方には CP を毎年使用し続けていた。よって消毒前の時点でこれらの MS 土壌および CP 土壌では土壌微生物群集構造が異なり、特に CP 土壌では CP に耐性を持つ菌が存在し、くん蒸後にこれらの菌密度が高くなったと考えられる。細菌密度は、K 圃場を除いて、MS 区の方が CP 区より高い傾向にあった（図IV-18）。これらの結果は CP の方が MS より殺菌効果が高いということを示唆した。では CP 処理区ではどの微生物が MS 処理区より多く殺菌されたのかという点については、培養可能な細菌がより多く殺菌された可能性が考えられた。すなわち、CP 連用土壌を除いて培養可能な糸状菌、細菌ともに薬剤間で ATP 含量と同じ傾向を示したが、CP 連用土壌では CP 区の培養可能な糸状菌密度が MS 区より高くなった。この糸状菌密度の影響は ATP 含量に強くは反映されていなかったことから、逆に、培養可能な細菌の影響の方が強く ATP 含量に反映されていたものと考えられる。しかし、以上の考察は土壌中の糸状菌と細菌のバイオマス比を求めていなかったため、あくまで考察の域を出ない。

2 週間培養後に F 圃場の土壌から DNA を抽出した結果、DNA 量は FMS 土壌、FCP 土壌ともに MS 区の方が CP 区よりも高い傾向にあった（図IV-19）。また遺伝子コピー数は、糸状菌では CP 区の方が MS 区より高い傾向にあったが（図IV-20）、一方、細菌では MS 区の方が CP 区よりも高い傾向にあった（図IV-21）。2 週間培養後に F 圃場の土壌を用いて希釈平板法を行った結果、糸状菌の密度は図IV-20 で示した糸状菌の遺伝子コピー数と同じ傾向を示した（図IV-22）。一方、細菌の密度は FMS 土壌の CP100% 区を除いて CP 区の方が MS 区より密度が高い傾向にあり（図IV-23）、この傾向は図IV-21 で示した細菌の遺伝子コピー数の傾向とは逆であった。これより、まず、土壌の DNA 量と ATP 含量に相関があると仮定すると、くん蒸後の薬剤処理区間の

微生物バイオマスの差は、くん蒸から2週間たって同じ傾向を示し、MS処理区、CP処理区ともに完全には微生物バイオマスは無処理区の水準まで回復していないことが示唆された。その微生物バイオマスを減少させている要因については、細菌の影響が強かった可能性が考えられる。DNA分析の面からみれば微生物バイオマス減少度合いには細菌の影響が強く表れていたが、一方で希釈平板法の結果はCP処理区よりMS処理区の方が密度をより回復していたことを現していた。これは、DNAで分析できる細菌の密度と希釈平板法で分析できる培養可能な細菌の密度が異なる傾向を示すことを示唆した。培地上で生育できる細菌は土壤中に存在する全細菌数より少ないと一般的に知られているため、この結果は培養できる菌とできない菌でCPに対する反応が異なり、特に培養できない菌の方が多く殺菌され、回復も遅かったことを示唆したと考えられる。

自活性線虫密度については、くん蒸直後にCP25%区でのみ線虫が1~15頭/20g土壌の密度で検出された。15頭/20g土壌検出されたのはTCP土壌においてで、無処理区に対する割合は2%であった。この結果はCPを低濃度で処理すると、完全には線虫を殺虫できない可能性を示唆した。

以上の結果より、微生物バイオマスは2014TBC土壌でみられた、MS区の方がCP区よりも高いという傾向が再現された。またその傾向はくん蒸後2週間たってF圃場の2土壌については変わらなかった。また各処理区における微生物バイオマスの差が糸状菌または細菌、どちらに対する影響力の違いによるものなのかどうかは、希釈平板法とDNA分析で細菌の傾向が異なったが、細菌に対する影響の方が強いと考えられる。以上より、MSよりもCPの方が殺菌能力、特に細菌に対する能力が高いが、一方線虫に対する殺虫能力はCPよりもMSの方が高いことが示された。

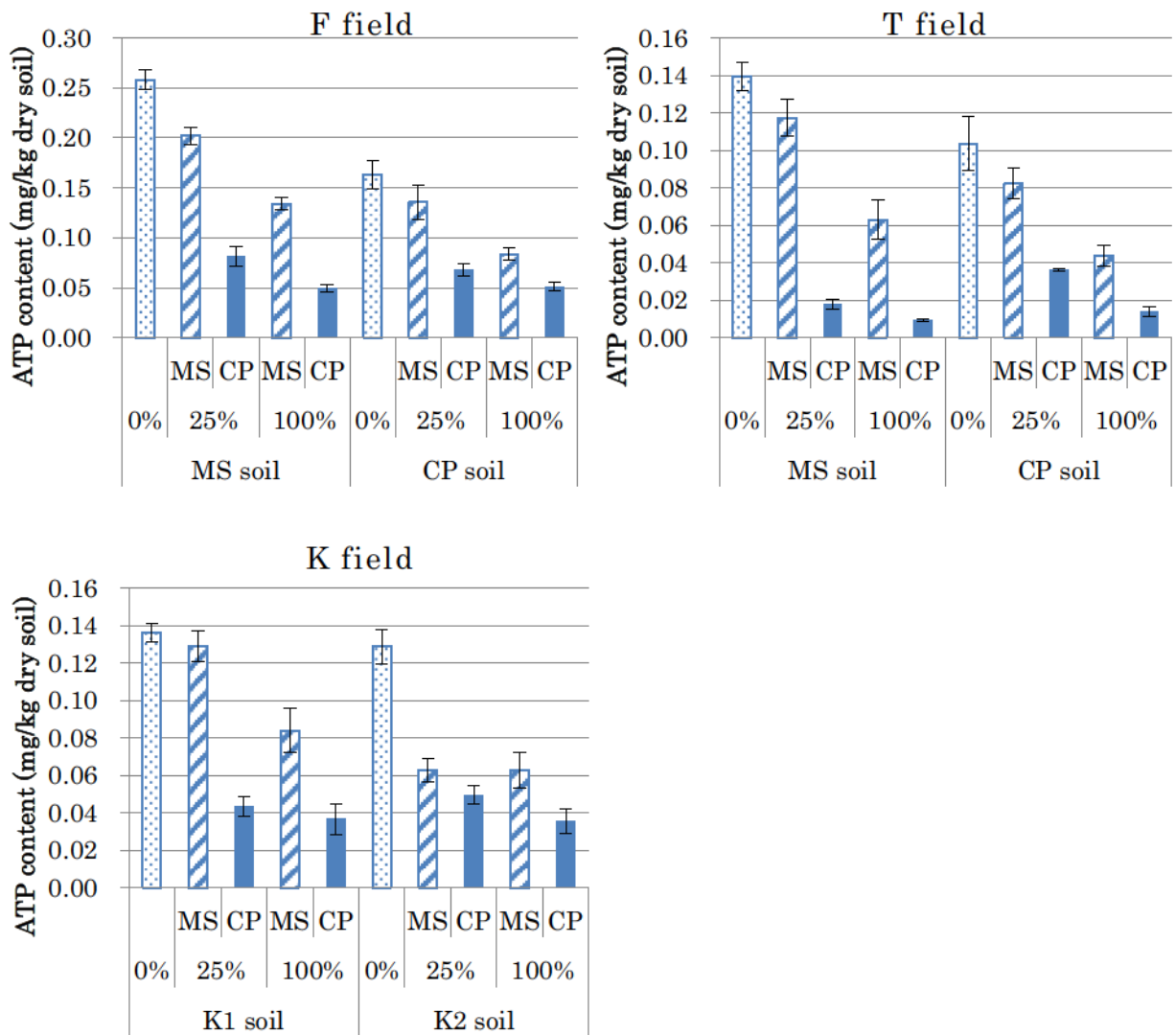


Fig.IV-16. ATP content in three fields' soils treated with different concentrations of fumigants in sealed bottle.

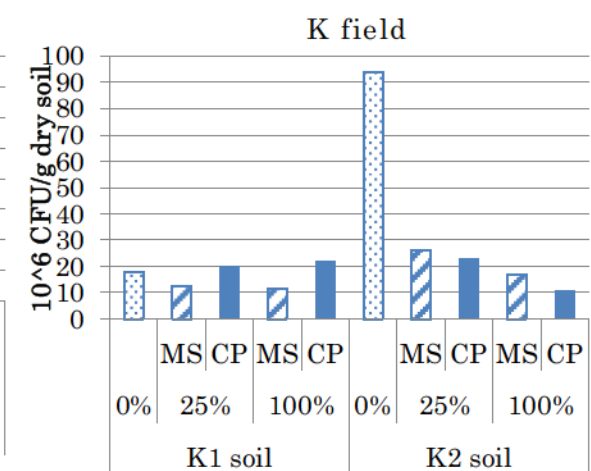
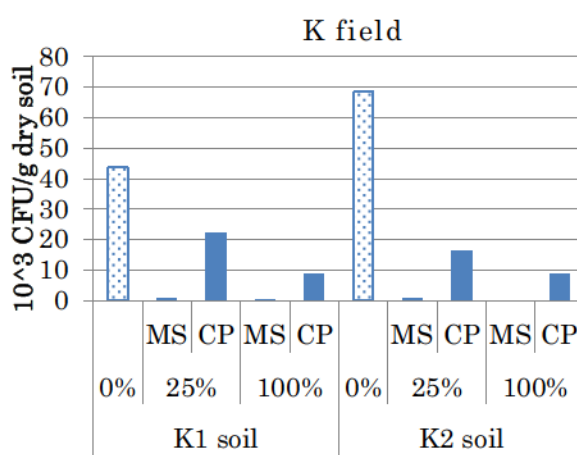
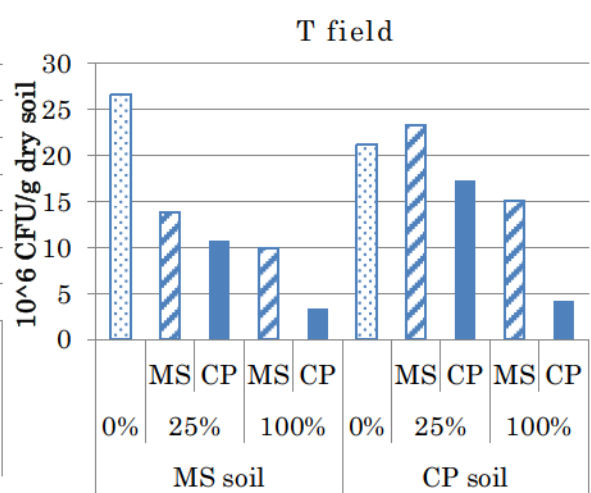
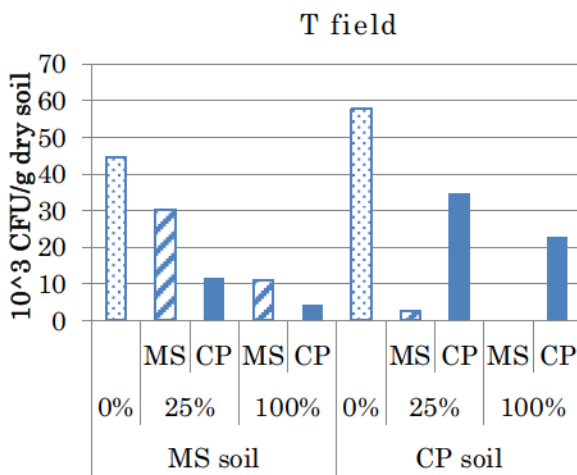
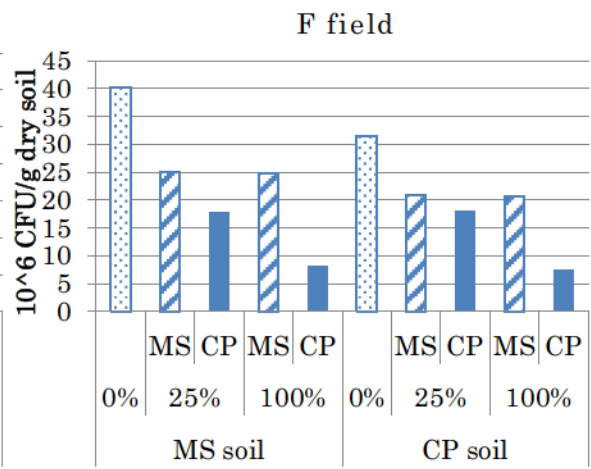
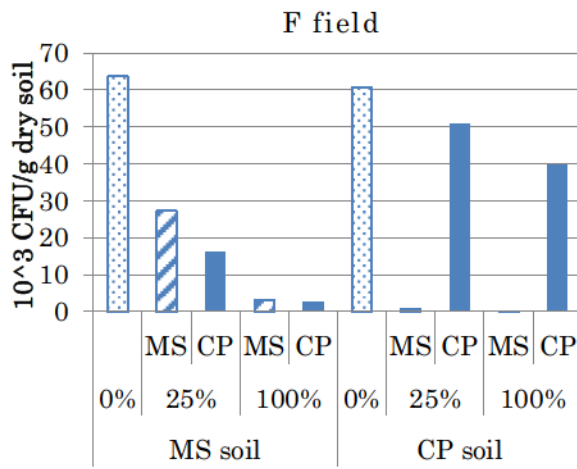


Fig. IV-17. Density of culturable fungi in three fields' soils treated with different concentrations of fumigants.

Fig. IV-18. Density of culturable bacteria in three fields' soils treated with different concentrations of fumigants.

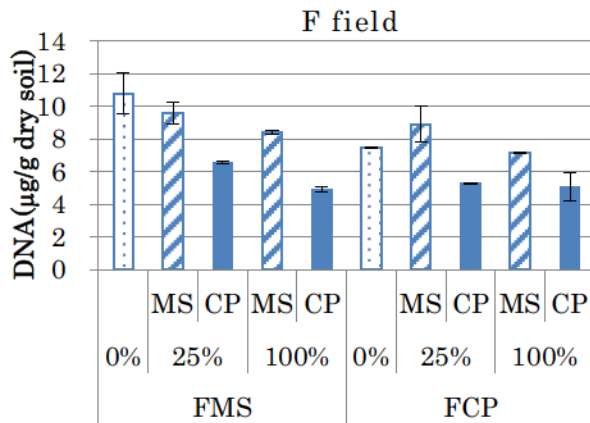


Fig. IV-19. Amount of DNA in FMS and FCP soils treated with different concentrations of fumigants and incubated for 2 weeks.

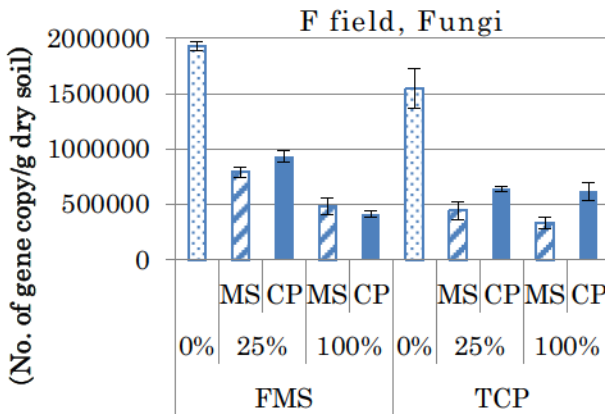


Fig. IV-20. Number of gene copy amplified by UFP primer set in FMS and FCP soils treated with different concentrations of fumigants and incubated for 2 weeks

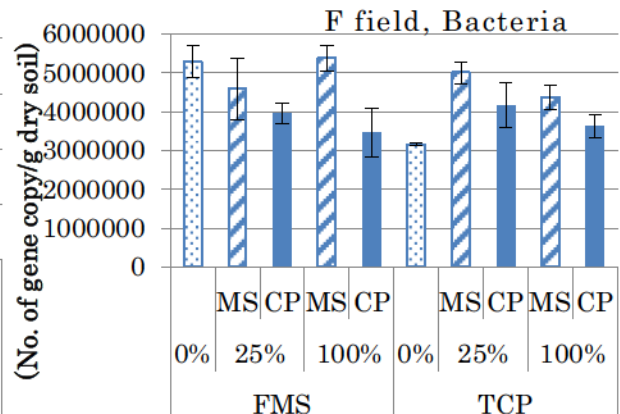


Fig. IV-21. Number of gene copy amplified by UBP primer set in FMS and FCP soils treated with different concentrations of fumigants and incubated for 2 weeks

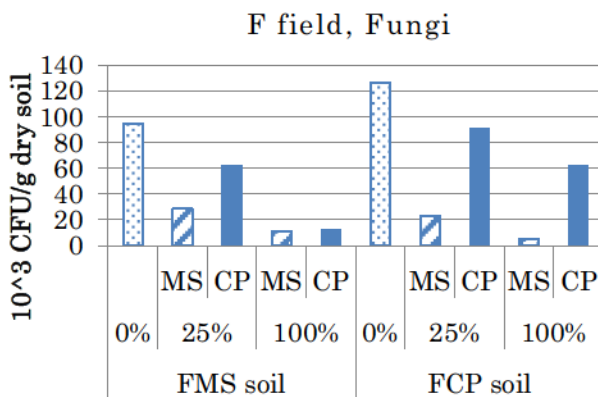


Fig. IV-22. Density of culturable fungi in FMS and FCP soils treated with different concentrations of fumigants and incubated for 2 weeks.

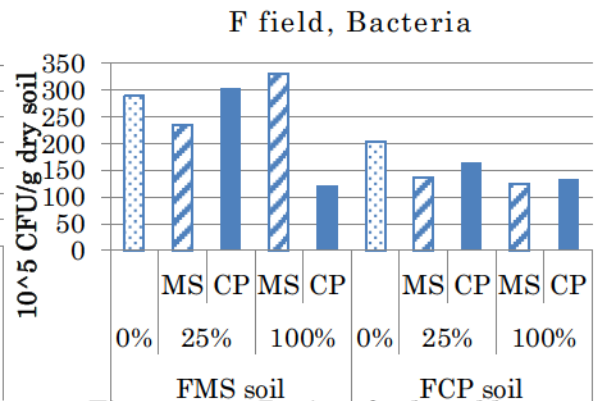


Fig. IV-23. Density of culturable fungi in FMS and FCP soils treated with different concentrations of fumigants and incubated for 2 weeks.

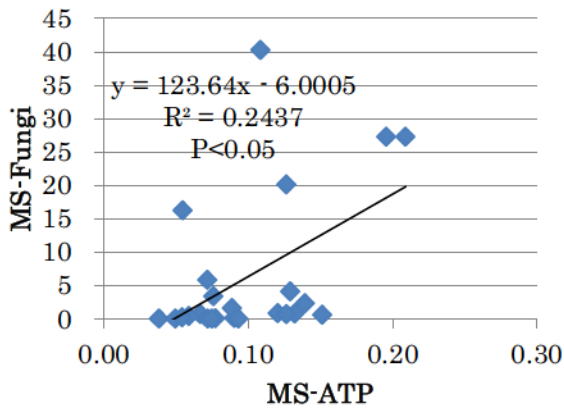


Fig. IV-24. Relationship between ATP content and density of carutuable fungi in soil treated with MS.

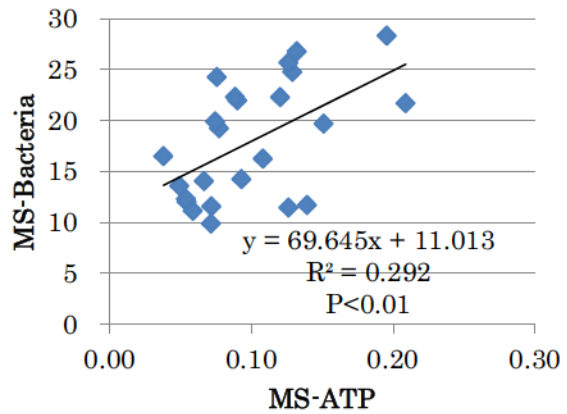


Fig. IV-25. Relationship between ATP content and density of carutuable bacteria in soil treated with MS.

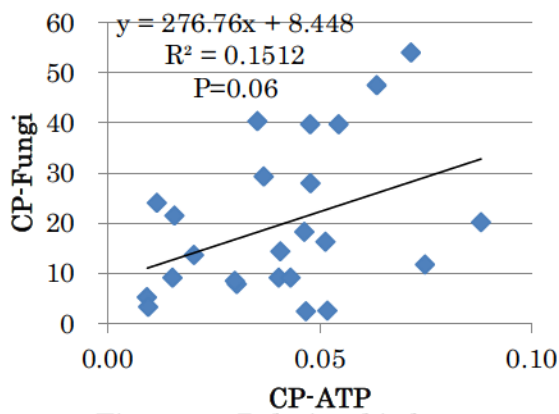


Fig. IV-26. Relationship between ATP content and density of carutuable fungi in soil treated with CP.

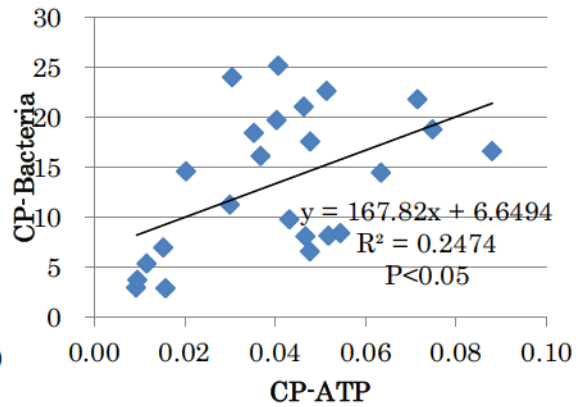


Fig. IV-27. Relationship between ATP content and density of carutuable bacteria in soil treated with CP.

Table IV-6. Density of free-living nematode in soil fumigated with MS and CP in sealed bottle.

	F field		T field		K field	
	F-MS	F-CP	T-MS	T-CP	K-1	K-2
Control	194	76	141	875	129	671
MS25%	0	0	0	0	0	0
MS100%	0	0	0	0	0	0
CP25%	1	0	1	15	0	0
CP100%	0	0	0	0	0	0

2) 室内試験 : *Pythium aphanidermatum* の接種試験

リサーチジェンスのモデル実験として、*P. aphanidermatum* が引き起こすキュウリの苗立枯病の接種試験を行った。

2-1) 栽培期間中の水分条件の検討

Pythium 属による病害は湿潤な環境下で多発するため(埋橋, 2010)、はじめに接種試験における土壤の水分量を検討した。

<材料および方法>

2015THC 土壤 200 g (脱イオン水を添加して最大容水量の 60% の水分含有量に調節したものを) を 500 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを 30°C の恒温器で 1 日間前培養した後に、慣行量 (有効成分 80% のドロクロ : 30 L/10a) の 100% に当たるくん蒸剤 (CP : 32 μ L/200 g 土壤) を添加した。無処理区には何も加えなかった (各処理 2 連)。ポリビンを 30°C の恒温器内で 3 日間培養後に開封してポリ袋に土壤を移し、1 時間換気した後に以下の実験を行った。

P. aphanidermatum OPU854 (大阪府立大学東條博士分譲菌株) をコーンミール寒天培地上で 1 日間培養したのちに、1 cm² の寒天片をベントグラス培地 (300 mL 容三角フラスコに 1 g ベントグラス (タキ

イ種苗) と蒸留水 5 mL を充填してオートクレーブにかけたもの (Lan-Ping et al., 1995) に添加して 3 日間培養した。キュウリ (夏ばやし、タキイ種苗) の表面の農薬を流水でもみ洗いして取り除いた後、表面殺菌を 70%エタノールに 2 分、1%次亜塩素酸ナトリウムに 5 分浸漬して行い、脱イオン水で次亜塩素酸ナトリウムの匂いがなくなるまで複数回リンスした。種子を脱イオン水で湿らせた脱脂綿をひいたガラスシャーレ上に並べて蓋をし、28℃、明期：暗期=18h：6h の人工気象器内に 3 日間置いた。以下、これを催芽処理とする。

土壌 25 g (乾土 20 g 相当) をアグリポット (直径 6.5 cm) に充填して催芽処理から 3 日間たったキュウリをポットあたり 3 粒定植した。ポットの中央に *P. aphanidermatum* を培養したベントグラス種子を 9 粒接種した (3 連)。以下に接種方法を記す。ベントグラス培地は乳鉢上にすべて掻き出してから乳棒で菌糸が攪拌するように混ぜた後、時計皿の上で一粒ずつ分けた。パラフィン紙の上に、70℃で乾燥させた後にボールミルした土壌をスパーテルに一杯乗せ、スパーテルの先で掻き取ったベントグラス培地を土壌に混和した。土壌と混和したベントグラス培地をポットの中央に接種した。接種したベントグラスにかかるようにして脱イオン水を添加して、土壌水分を最大容水量の 60%、65%、70%、80%になるように調節した。28℃、明期：暗期=18h：6h の人工気象器内で一週間栽培して、栽培 4~7 日目の病勢伸展曲線下部面積 (The area under the disease-progress curve: AUDPC) (0：健全~3：枯死、最大値 AUDPC：12) を評価した。

<結果>

CP100%処理区の中で、水分量が最大量水量の 60%、70%および 80%の場合に AUDPC がほぼ最大値 (12) になった (図IV-28)。 *P. aphanidermatum* 無接種区では発病しなかった。水分量が少なすぎると栽培期間中に土壌が乾燥し、キュウリの萎れが生じやすくなったため、以下の実験では接種試験時の土壌水分を最大容水量の 70%になるように調節することとした。

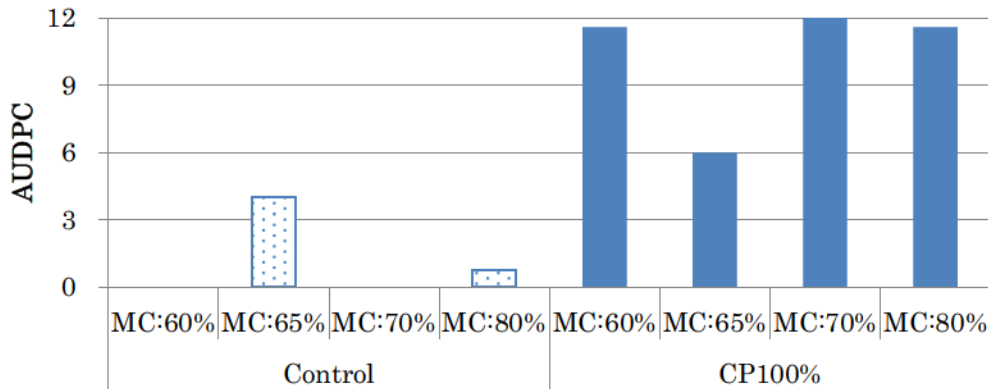


Fig. IV-28. AUDPC of *Pythium aphanidermatum* in soils having different moisture contents. MC means a ratio of soil moisture content to maximum water holding capacity.

2-2) 接種試験：プレ試験

<材料および方法>

2015THC 土壌 150 g (脱イオン水を添加して最大容水量の 60% の水分含有量に調節したもの) を 500 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを 30℃ の恒温器で 1 日間前培養した後に、慣行量 (有効成分 80% のドクロク : 30 L/10a、有効成分 30% のキルパー : 50 L/10a) の 25% および 100% に当たるくん蒸剤 (MS : 12.5 μ L/150 g 土壌、50 μ L/150 g 土壌、CP : 6 μ L/150 g 土壌、24 μ L/150 g 土壌) を添加した。無処理区には何も加えなかった (各処理 3 連)。ポリビンを 30℃ の恒温器内で 3 日間培養後に開封してポリ袋に土壌を移し、1 時間換気した後に接種試験を行った。

土壌 26 g (乾土 20 g 相当) をアグリポット (直径 6.5 cm) に充填して催芽処理から 3 日間たったキュウリ (夏ばやし、タキイ種苗) をポットあたり 3 粒定植した。ポットの中央に *P. aphanidermatum* を 3 日間培養したベントグラス種子を 0、1、3、9 粒接種した (3 連)。接種したベントグラスにかかるようにして脱イオン水を添加して、土壌水分を最大容水量の 70% になるように調節した。28℃、明期 : 暗期 = 18h : 6h の人工気象器内で一週間栽培して、栽培 4~7 日目の病勢伸

展曲線下部面積 (AUDPC) (0 : 健全～3 : 枯死、最大値 AUDPC : 12) を評価した。

< 結果 >

MS100%区を除いて *P. aphanidermatum* の接種量が増える毎に AUPDC も大きくなった (図IV-29)。 *P. aphanidermatum* 無接種区では発病しなかった。 *P. aphanidermatum* を 9 粒接種した場合は全ての区で AUPDC が 10 を超えた。 *P. aphanidermatum* を 3 粒接種した場合は MS100%区、CP25%区および CP100%区の方が無処理区および MS25%区よりも有意に AUPDC が高かった ($P < 0.05$)。よって、MS25%区は CP25%区よりもリサージェンスが起こりにくい可能性が示された。

その一方で、 *P. aphanidermatum* を 1 粒接種した場合は、MS100%区の AUPDC が CP100%区を含む他のどの処理区よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。この結果は当初の予想に反した。すなわち、「1 - 3) 処理濃度の検討 (2014TBC 土壌)」および「1 - 3) 処理濃度の検討 (2015THC 土壌)」でみられた、MS を処理した土壌の方が CP を処理した土壌より ATP 含量が高かった結果から、当初は MS 処理土壌の方が *P. aphanidermatum* の発病を抑制すると予測していた。結果が予想に反した原因として、CP 処理後の土壌にまだ CP の殺菌成分が残っており、接種した *P. aphanidermatum* が生育阻害を受けた可能性が考えられた。

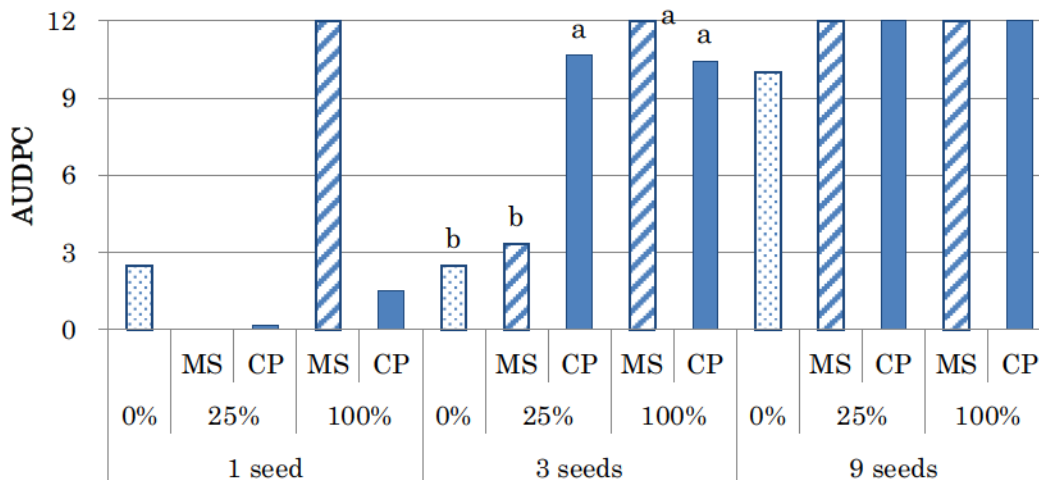


Fig. IV-29. AUDPC of *Pythium aphanidermatum* in soils treated with different concentrations of fumigants (Tukey-kramer, P<0.05).

2-3) 接種試験：くん蒸後の培養期間の検討

CP処理後の土壌にCPの有効成分が残存している可能性があったため、くん蒸後の培養期間を検討した。

<材料および方法>

2015THC 土壌 150 g (脱イオン水を添加して最大容水量の60%の水分含有量に調節したもの) を500 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを30°Cの恒温器で1日間前培養した後に、慣行量(有効成分80%のドロクロ:30 L/10a、有効成分30%のキルパー:50 L/10a)の100%に当たるくん蒸剤(MS:50 µL/150 g 土壌、CP:24 µL/150 g 土壌)を添加した。無処理区には何も加えなかった(各処理3連)。ポリビンを30°Cの恒温器内で3日間培養後に開封してポリ袋に土壌を移し、1時間換気した後にポリ袋の口を縛って30°Cの恒温器で0、3、7日間培養した。

各土壌を用いてATP含量を測定するとともに、前述した手順で接種試験をわずかにかえて行った。変更箇所は*P. aphanidermatum*の接種量を1、3粒にした点と、病勢伸展曲線下部面積(AUDPC)(0:健全~3:枯死、最大値AUDPC:13.5)の評価を栽培3日目からにした点

である。接種試験の無処理区は3日間培養したものを用いた。

<結果>

培養期間の違いによる ATP 含量の差は、無処理区および MS100% 区ではみられなかった ($P=0.72$ 、 $P=0.32$)。CP100%区では開封直後の土壌の方が3、7日目の土壌よりも有意に ATP 含量が低かった ($P<0.05$) (図IV-30)。

CP100%区の AUPDC は *P. aphanidermatum* 1 粒、3 粒接種区のいずれにおいても、培養期間の間に有意な差が見られなかった ($P=0.60$ 、 $P=0.62$) (図IV-31)。そのため、CP 処理後の土壌にまだ CP の殺菌成分が残っており、*P. aphanidermatum* の発病に影響しているという仮説は棄却された。

一方、MS100 区の AUPDC は *P. aphanidermatum* を 3 粒接種した場合は培養期間の間に有意な差が見られなかったが ($P=0.09$)、1 粒接種した場合は開封直後よりも 3、7 日間培養した土壌の方が有意に発病指数が低かった ($P<0.05$)。よって、MS 処理土壌についてはなんらかの因子が開封直後よりも 3 日以上培養した土壌で回復しており、*P. aphanidermatum* の発病を抑制していた可能性が考えられた。

P. aphanidermatum 無接種区では発病しなかった。

実験にかかる時間を短縮するため、次に開封直後の土壌を用いて接種試験を行うこととした。

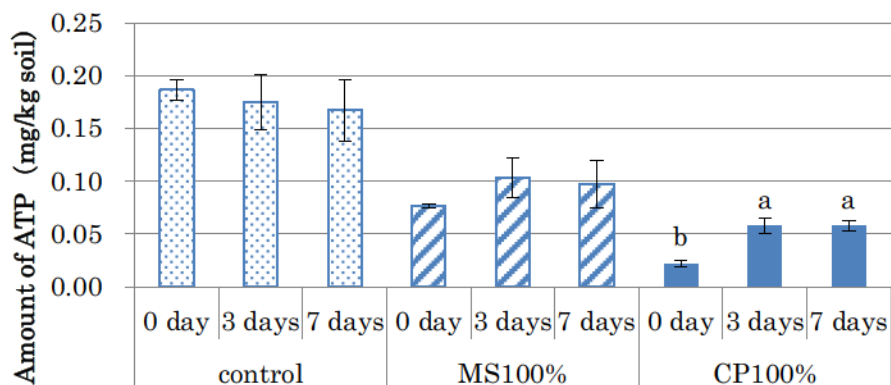


Fig. IV-30. ATP content in soils treated with fumigants and incubated for 0 to 7 days. Different alphabets mean significant differences among the same fumigant (Tukey-Kramer, $P < 0.05$).

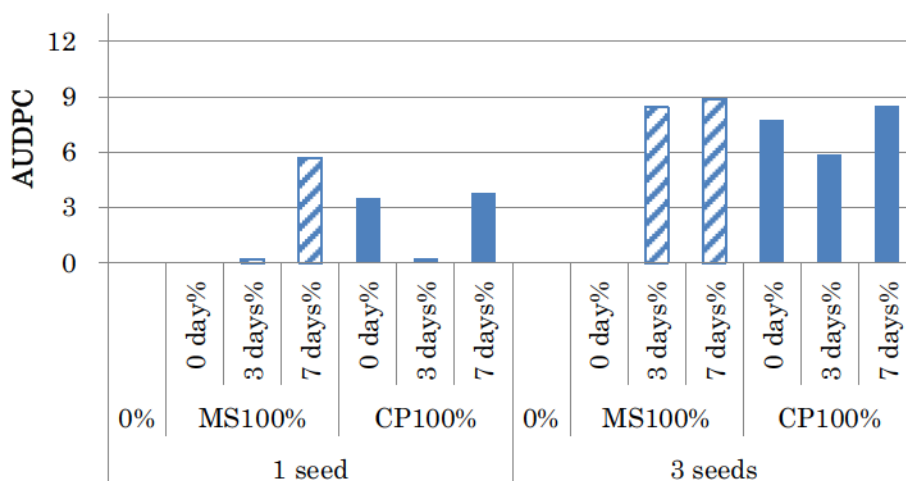


Fig. IV-31. AUDPC of *Pythium aphanidermatum* in soils treated with fumigants and incubated for 0 to 7 days.

2-4) くん蒸直後の土壌を用いた接種試験 (2015年)

<材料および方法>

2015THC 土壌 150 g (脱イオン水を添加して最大容水量の 60%の水分含有量に調節したもの) を 500 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを 30℃の恒温器で 1 日間前培養した後に、慣行量 (有効成分 80%のドロクロ : 30 L/10a、有効成分 30%のキルパー : 50 L/10a) の 25%

および 100%に当たるくん蒸剤（MS：12.5、50 μ L/150 g 土壌、CP：6、24 μ L/150 g 土壌）を添加した。無処理区には何も加えなかった（各処理 3 連）。30°Cの恒温器内で 3 日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壌を移し、1 時間換気した。換気後の土壌を用いて *P. aphanidermatum* の接種試験を行った。接種試験の方法は「2-3）接種試験：くん蒸後の培養期間の検討」と同様に行った。

なお、この試験は「1-4）処理濃度の検討（2015THC 土壌）」と同じ室内くん蒸土壌を用いて行った。実験は 2 回行った。

<結果および考察>

P. aphanidermatum 無接種区では発病しなかった。*P. aphanidermatum* を 1 粒接種した場合は処理区間の AUPDC に有意差はみられなかった（図IV-32）。*P. aphanidermatum* を 3 粒接種した場合は MS25%区と CP25%区の AUPDC の間に有意差はなく、また MS100%区と CP100%区の間にも有意差はみられなかった。一方、*P. aphanidermatum* を 9 粒接種した場合は MS100%区と CP100%区の間には有意差がみられなかったが、一方 MS25%区の AUPDC は CP25%区よりも有意に低かった（ $P < 0.05$ ）。この理由は、MS25%区には CP25%区で殺菌されてしまったなんらかの有益な菌が生き残っていたためと考えられたため、後述する「IV-4）MS25%処理土壌からの拮抗菌の単離」で拮抗菌の単離を試みた。

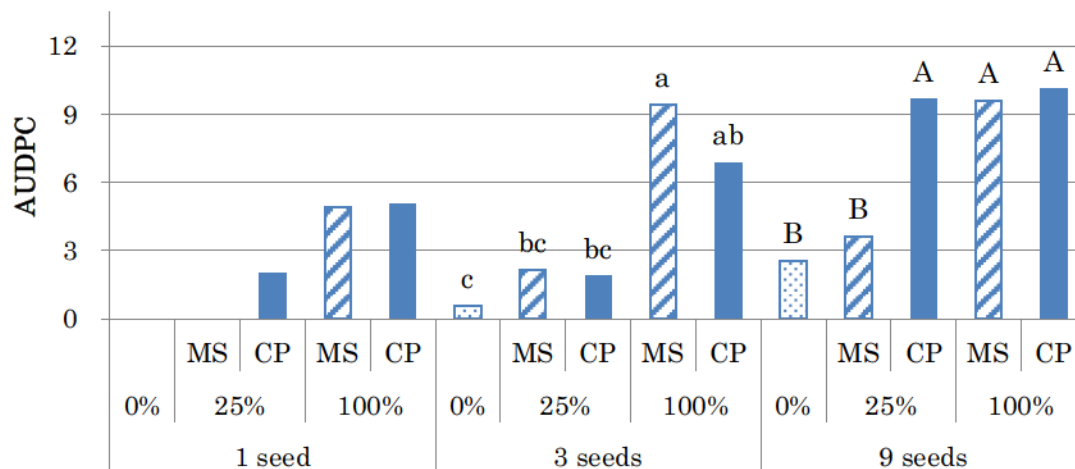


Fig. IV-32. AUDPC of *Pythium aphanidermatum* in soils treated with different concentration of fumigants. Different alphabets mean significant different among the same no. of seed media (Turkey-Kramer, $P < 0.05$).

3) 室内試験：静菌作用の評価試験

土壌の静菌作用への影響を調べるため、シャーレにくん蒸土壌を充填し、その上に *P. aphanidermatum* を培養したベントグラス種子を接種して *P. aphanidermatum* の DNA 量の変化を測定した。

<材料および方法>

2015THC 土壌 150 g (脱イオン水を添加して最大容水量の 60% の水分含有量に調節したもの) を 500 mL 容ポリビンに充填した。ポリビンを 30°C の恒温器で 1 日間前培養した後に、慣行量 (有効成分 80% のドロクロ: 30 L/10a、有効成分 30% のキルパー: 50 L/10a) の 25% および 100% に当たるくん蒸剤 (MS: 12.5 μ L/150 g 土壌、50 μ L/150 g 土壌、CP: 6 μ L/150 g 土壌、24 μ L/150 g 土壌) を添加した。無処理区には何も加えなかった (各処理 3 連)。30°C の恒温器内で 3 日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壌を移し、1 時間換気した。

換気後、土壌 6.5 g (乾土 5 g 相当) を直径 6 cm のガラスシャーレに充填した。土壌の中央にベントグラス培地で 3 日間培養した *P. aphanidermatum* を 9 粒接種し、フタをしてパラフィルムで密閉した。

28℃暗所で1種間培養後、全量を60℃で乾燥、ボールミルしてDNAを抽出した。DNAの抽出は「IV-1-5室内くん蒸が土壤微生物に与える影響の評価(2016土壤)」に記した「黒ボク土抽出法・群馬」を用いた。

実験は2回行い、1回目はくん蒸直後の土壤を用い、2回目は再度2015THC土壤をくん蒸してから1週間30℃暗所で保管後、同様の実験を行った。

<結果および考察>

くん蒸直後の土壤では、MS100%が最もCt値が低く、くん蒸一週間後の土壤では、CP25%およびCP100%が最もCt値が低かった(図IV-33)。

くん蒸直後と一週間後のMS100%の値から、くん蒸1週間後では、MS土壤の静菌作用が回復していたと考えられる。また、くん蒸直後のCPのCt値が予想に反してMSより高かったことから、土壤ではCPの有効成分がまだ残留していた可能性が示唆された。キュウリを用いた接種試験は開放系で行っており、その際にCPの有効成分が*P. aphanidermatum*の発病を阻害しないことは前述したように実験で確認した。しかし、静菌作用の試験ではシャーレを密封するため、CPの残留が問題となっている可能性が再度考えられた。

一方で、無処理区の*P. aphanidermatum*のCt値が2回の実験の間で4違った。実験を行う毎に接種した*P. aphanidermatum*の状態が異なった可能性が考えられた。

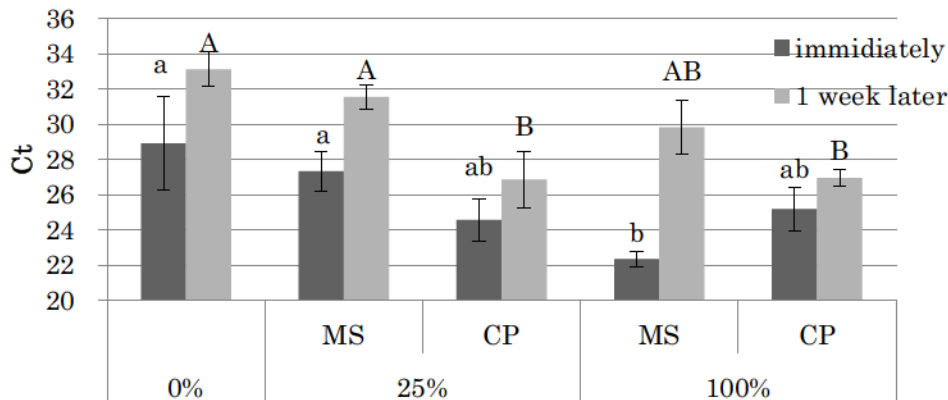


Fig.IV-33. Ct values of *Pythium aphanidermatum* in fumigated soils. *P. aphanidermatum* was inoculated into soil after fumigation and incubated for 1 week..Different alphabets mean significant differences among the same period of incubation after fumigation (

4) MS25%処理土壤からの拮抗菌の単離

P. aphanidermatum の接種試験および拮菌作用の評価試験において、MS25%土壤がCP25%土壤より有意にAUDPCや*P. aphanidermatum*のDNA量の増殖を抑制したことから、MS25%土壤になんらかの有益な菌がいると考え、拮抗菌の単離を試みた。

2015THC土壤150g(脱イオン水を添加して最大容水量の60%の水分含有量に調節したもの)を500mL容ポリビンに充填した。ポリビンを30℃の恒温器で1日間前培養した後に、慣行量(有効成分80%のドロクロ:30L/10a、有効成分30%のキルパー:50L/10a)の25%に当たるMS(MS:12.5μL/150g土壤)を添加した。30℃の恒温器内で3日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壤を移し、1時間換気した。

上記の方法でくん蒸した土壤および無処理の2015THC土壤を用いて希釈平板法を行った。土壤10gを200mL三角フラスコに入れて滅菌生理食塩水(0.9%NaCl)90mLを加えて超音波洗浄機で2分間処理して、これを 10^{-1} 希釈液とした(1連)。懸濁液100μLを取って滅菌生理食塩水900μLに懸濁して 10^{-2} 希釈液を作成した。同様の操作を繰り返して段階希釈液を作成し、ローズベンガル培地(Martin, 1950)

と 1/100 普通ブイヨン培地 (Eiken Chemical Co., Ltd.) に 100 μ L を塗布した (2 連)。寒天培地を 30°C で培養して糸状菌は 4 日後に、細菌は 10 日後に各コロニーの端をオートクレーブ滅菌したつまようじで切り取るか、コロニーにつまようじの先端をつけて、新しい 1/10 ポテトデキストロース寒天培地あるいは 1/10 普通ブイヨン培地に植菌した。

植菌した菌のコロニーが肉眼で確認できるほど生育したところで、先に菌を植菌していた寒天培地の中央にコーンミール寒天培地で 1 日間培養しておいた *P. aphanidermatum* の寒天片 (直径 6 mm) を植菌した。30°C で培養して阻止円が出来るか観察した。

<結果および考察>

糸状菌は 20 菌株、細菌は 160 菌株分離した。そのうち *P. aphanidermatum* に対して弱い拮抗能を示した菌は、無処理土壌で糸状菌 10 菌株、細菌 49 菌株、MS25%土壌で糸状菌 5 菌株、細菌 29 菌株であった。

これらの拮抗菌が CP25%土壌で死滅しているかどうかについては調べる事が出来なかった。

5) 圃場試験：年間を通した呼吸活性と ATP 含量および微生物バイオマスの推移

5-1) 2013 年

<材料および方法>

2013 年は群馬県コンニャク圃場 F、T 圃場において ATP 含量および呼吸活性を継時的に調査した。土壌は処理区あたり 5~10 箇所 of 土壌を表層 0-15 cm をスコップで採取し、よく混合してサンプルとした。5 mm の篩にかけて、実験まで 4°C で保管した。採取したサンプルを用いて ATP 含量と呼吸活性を測定した。

土壌の採取は 2 回目消毒前 (2013 年 4 月 24 日)、1 回目消毒直後 (4

月 24 日)、1 ヶ月後 (5 月 15 日)、4 ヶ月後 (8 月 10 日)、6 ヶ月後 (10 月 11 日)、10 ヶ月後 (2014 年 2 月 13 日) および翌年の消毒前 (2014 年 4 月 10 日) に採取した。なお、10 ヶ月後の T 圃場のサンプルは雪の影響により採取することが出来なかった。

圃場の土壌消毒は 4 月 10 日から 4 月 23 日および 4 月 23 日から 5 月 15 日にかけて行われた (図 IV-34)。F 圃場、T 圃場それぞれ圃場を半分にわけ、片方には MS (商品名: キルパー、有効成分 30%) を 50 L/10a、もう片方には CP (商品名: ドロクロ、有効成分 80%) を 30 L/10a 施用してマルチで被覆した。土壌くん蒸剤の施用は、いずれの薬剤も 2 回にわけて行われた。すなわち、1 回目消毒場所、無処理、1 回目消毒場所、無処理、というように交互に帯状に 1 回目の消毒を行った。約 2 週間の消毒後に 1 回目の消毒箇所のマルチをはがして、今度は無処理の場所に薬剤を施用してマルチで被覆し、さらに 2 週間かけて 2 回目の消毒を行った。このような複雑な処理を行う理由は、群馬県は風が強いので圃場全体を覆うようなマルチ処理が出来ないためである。

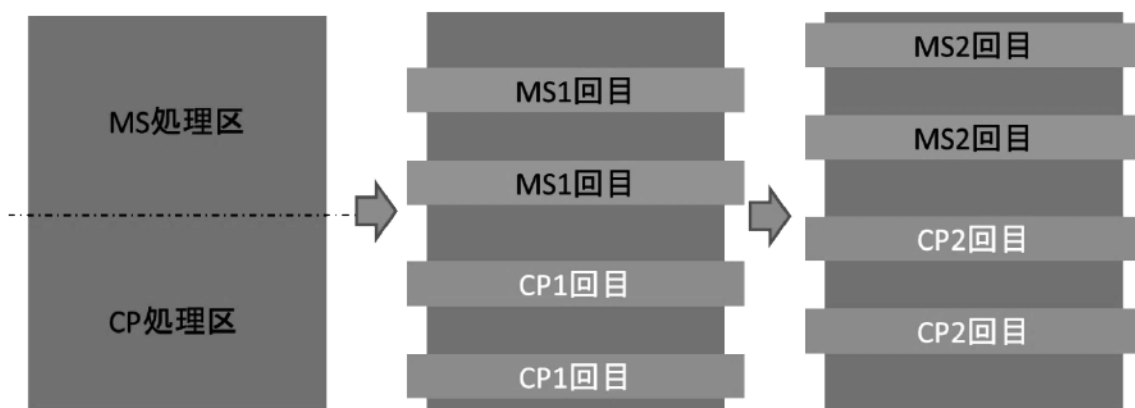


Fig. IV-34. Schematic diagram of fumigation in konjac field in Gunma

<結果と考察>

2013 年の圃場における ATP 含量の推移は、F、T 圃場ともに MS 処理区と CP 処理区で傾向が異なった (図 IV-35)。すなわち、MS 処理区は消毒直後から 6 ヶ月後まで徐々に ATP 含量が低下したが、CP 処理区は消毒直後から 6 ヶ月後までの間にほとんど値に変化がなかった。消毒 1 ヶ月後の ATP 含量は消毒前に比べて MS 処理区で 56~58%に、

CP 処理区で 21~29%に減少していた。F 圃場では 10 ヶ月後の 2 月にも土壌サンプルを採取することが出来たが、その結果、消毒 6 ヶ月後（10 月）の時点で減少していた ATP 含量が 2 月には増加に転じていることがわかった。翌年の消毒前の ATP 含量は 2013 年消毒前に比べて 83~94%まで回復していた。10 月以降の ATP 含量の増加は、コンニャク収穫後に地上部の残渣を土壌にすき込んだため、これを分解して微生物が増殖したためと考えられる。

2013 年の圃場における呼吸活性は ATP 含量とは逆に薬剤の違いではなく、圃場の違いがみられた（図 IV-36）。すなわち、F 圃場は MS、CP 処理区ともに消毒 4 ヶ月後まで呼吸活性が変動したが、T 圃場では 1 ヶ月後以降値が変動しなかった。翌年の消毒前の呼吸活性は 2013 年消毒前に比べて 56~95%まで回復しており、その程度は土壌によって異なった。

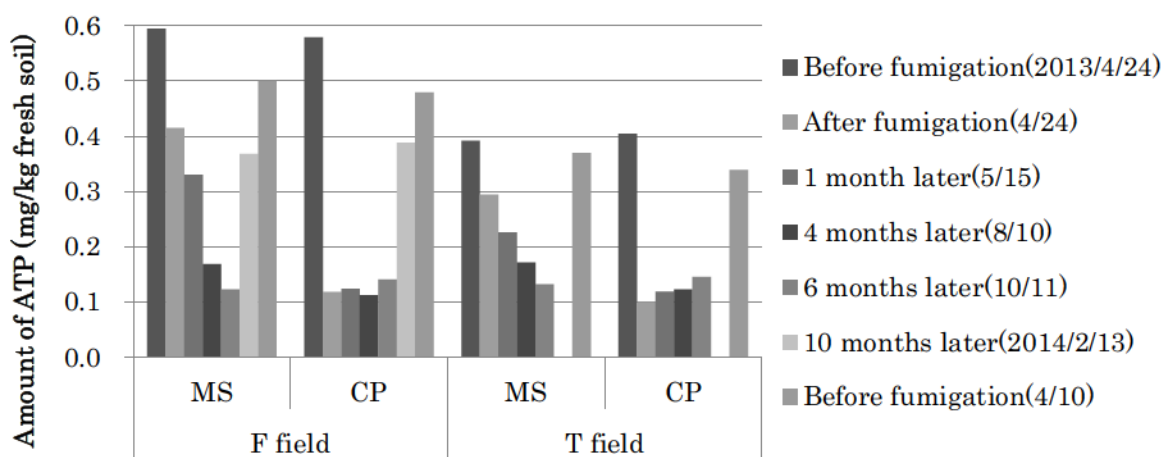


Fig.IV-35. Dynamics of ATP content in soils fumigated with MS and CP in konjac fields in Gunma in 2013.

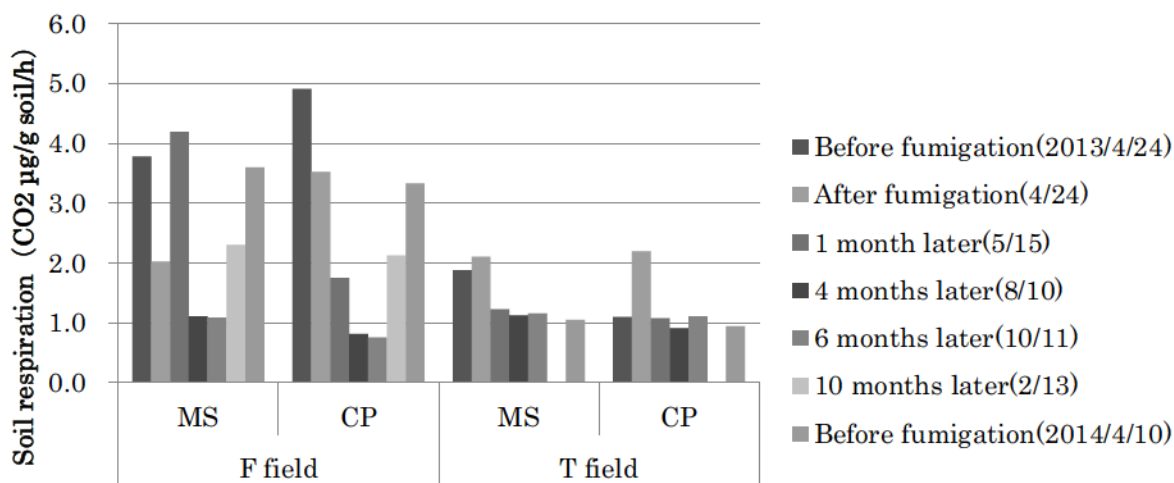


Fig.IV-36. Dynamics of soil respiration in soils fumigated with MS and CP in konjac fields in Gunma in 2013.

5 - 2) 2014 年

<材料および方法>

2014 年は群馬県コンニャク圃場 F、T 圃場において ATP 含量および微生物バイオマスを調査した。土壌は 5~10 箇所の土壌を表層 0-15 cm をスコップで採取し、よく混合してサンプルとした (3 連)。5 mm の篩にかけて、実験まで 4℃で保管した。採取したサンプルを用いて ATP 含量およびベルマン法で抽出した線虫密度を測定するとともに、土壌から DNA を抽出して real-time PCR を用いて病害虫および糸状菌、細菌のバイオマスを測定した。

土壌の採取は消毒前 (2014 年 4 月 10 日)、消毒直後 (4 月 22 日)、1 ヶ月後 (5 月 23 日)、5 ヶ月後 (9 月 7 日) および翌年の消毒前 (2015 年 4 月 6 日) に採取した。圃場の土壌消毒は 4 月 10 日および 4 月 22 日から約 2 週間行われた。

土壌からの DNA 抽出は「1-5) 室内くん蒸が土壌微生物に与える影響の評価 (2016 土壌)」で述べたように、「黒ボク土抽出法・群馬」の手法で行った。土壌は乾土 0.5 g を用いた。抽出した DNA を滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを real-time PCR に用いた。Real-time PCR は、*Meloidogyne* spp. についてはプライマー RKNf (5'- GCT GGT GTC TAA GTG TTG CTG ATA C-3') および RKNr (5'- GAG CCT AGT GAT

CCA CCG ATA AG-3') (Toyota et al., 2008) を、*P. aristosporum* についてはプライマーAsPyF (5'-CTG TTC TTT CCT TGA GGT G-3') および AsARRR (5'-CGT CCA AGA GCA ATA ACC ACT C-3') (Asano et al., 2010) を、*P. myriotylum* についてはプライマーAsPyF (Asano et al., 2010) および kkMYRR (5'-GGAGCC GAA ACT CTC ACA AGA C-3') (Ishiguro et al., 2013) を用いた。*P. aristosporum* を検出するプライマーは *P. arrhenomanes* 特異プライマーとして設計されたものであるが、Asano et al. (2010)の中に *P. aristosporum* も検出するとあったため、実験に用いた。Real-time PCR の条件は RKN 条件：95℃ 10 秒、(95℃5 秒、60℃20 秒 (0.2℃/秒)) × 45 サイクルをいずれのプライマーにも使用した。

<結果>

2014 年の圃場における ATP 含量の推移は、消毒 1 ヶ月後には消毒前の 20～56%に減少した (図IV-37)。

線虫の分析はベルマン法で植物寄生性線虫が検出されなかったため、自活性線虫について行った (図IV-38)。消毒前に 250～1070 頭/20 g 土壌いた自活性線虫は消毒直後には 0～19 頭/20 g 土壌に減少した。F 圃場では消毒後 5 ヶ月経ってもほとんど密度は回復しなかったが、T 圃場では消毒前の 66%まで回復した。

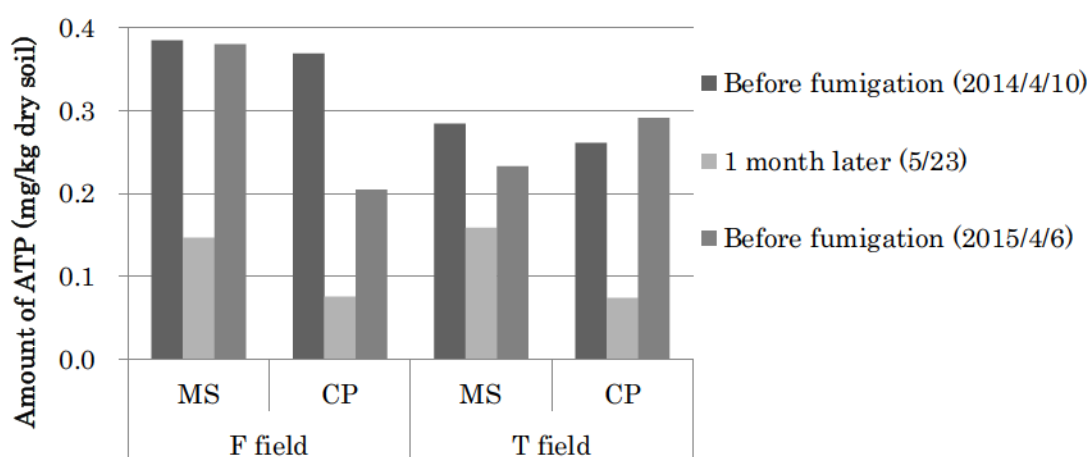


Fig.IV-37. Dynamics of ATP content in soils fumigated with MS and CP in konjac fields in Gunma in 2014.

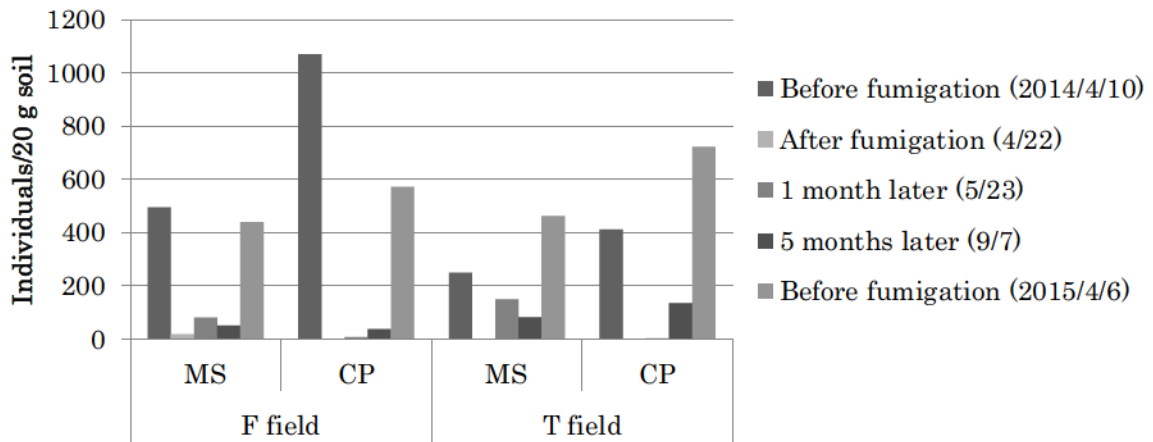


Fig. IV-38. Dynamics of density of free-living nematodes in soils fumigated with MS and CP in conjak fields in 2014.

2014年の圃場における病害虫の密度測定を real-time PCR を用いて行った (表IV-7)。その結果、*P. aristosporum* が消毒前の 7 プロットから、消毒 1 ヶ月後の 3 プロットから検出された。検出された密度は、消毒前の *P. aristosporum* の密度を 100% とすると、F-CP 処理区で 9% 以下、T-MSsyoriku で 120%、T-CP 処理区で 257% であった。消毒 5 ヶ月後に *P. aristosporum* が検出されたプロットはなかった。また、*P. myriotylum* と *Meloidogyne* spp. は検出されなかった。

Table IV-7. Ct value of *Pythium aristosporum* in soil collected from fields before and after fumigation in 2014.

Field	Treatment	Plot No.	Before fumigation		1 month later		5 months later	
			Ct	(%)	Ct	(%)	Ct	(%)
F field	MS	1	ND		ND	ND	ND	ND
		2	ND		ND	ND	ND	ND
		3	ND		ND	ND	ND	ND
	CP	1	33.0	100%	ND	<1%	ND	<1%
		2	32.1	100%	ND	<1%	ND	<1%
		3	33.9	100%	ND	<9%	ND	<1%
T field	MS	1	ND		ND	ND	ND	ND
		2	32.1	100%	ND	<1%	ND	<1%
		3	33.9	100%	33.7	120%	ND	<13%
	CP	1	ND		ND	ND	ND	ND
		2	31.3	100%	29.9	257%	ND	<1%
		3	33.0	100%	34.0	<1%	ND	<1%

ND means underdetermined or ct value was more than 36.

5 - 3) 2015 年

<材料および方法>

2015 年は群馬県コンニャク圃場 F、T、D、S、A 圃場において、ATP 含量および微生物バイオマスを調査した。土壌は 5~10 箇所の土壌を表層 0-15 cm をスコップで採取し、よく混合してサンプルとした (3 連)。5 mm の篩にかけて、実験まで 4℃で保管した。採取したサンプルを用いて ATP 含量およびベルマン法で抽出した線虫密度を測定するとともに、土壌から DNA を抽出して real-time PCR を用いて病害虫および糸状菌、細菌のバイオマスを測定した。

土壌採取は消毒前 (F: 4 月 6 日、T: 4 月 6 日、D: 3 月 28 日、S: 4 月 2 日、A: 4 月 24 日) (S 圃場のみ、2 回目の消毒前に採取) および消毒後約 1 ヶ月後 (F、T、D: 6 月 1 日、S、A: 6 月 8 日) に行っ

た。消毒後の採取は、2回目の消毒の終了日から F: 31日、T: 20日、D: 32日、S: 52日、A: 18日後であった。土壌消毒1回目は (F: 4月6日~4月20日、T: 4月14日~5月2日、D: 3月28日~4月13日、S: 3月24日~4月8日、A: 4月24日~5月8日) に行った。

土壌 DNA 抽出後、糸状菌についてはプライマー ITS1f (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') (White et al., 1990) および 5.8S (5'-CGC TGC GTT CTT CAT CG-3') (Vilgalys & Hester, 1990) (以下、UFP プライマー) を用いて、RKN 条件 (95°C 10 秒、(95°C 5 秒、60°C 20 秒 (0.2°C/秒)) × 45 サイクル) で、細菌についてはプライマー Eub338 (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG -3') (Lana, 1991) および Eub518 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer et al., 1993) (以下、UBP プライマー) を用いて、RKN 条件 (95°C 10 秒、(95°C 5 秒、60°C 20 秒 (0.2°C/秒)) × 45 サイクル) で real-time PCR を行って Ct 値を求めた。

< 結果および考察 >

2015 年の圃場の ATP 含量は、いずれの圃場、処理区でも消毒前に比べて消毒 1 ヶ月後で減少した (表 IV-8)。消毒 1 ヶ月後には、ATP 含量は消毒前の 43~82% に減少した。消毒前の時点で MS 区と CP 区には ATP 含量に違いがみられたが、有意な差がみられたのは A 圃場のみであった ($P < 0.05$)。消毒後には A 圃場を除いて MS 区の方が CP 区より ATP 含量が高い傾向にあり、5 圃場中 F、D、S 圃場では有意な差がみられた ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。ATP 含量の減少率を表 IV-8 に示す。F 圃場を除いた 4 圃場で CP 区の方が MS 区より ATP 含量の減少率が高い傾向にあった。

A 圃場の消毒 1 ヶ月後の ATP 含量が MS 区と CP 区で差がなかった理由は、消毒前の CP 区の ATP 含量が MS 区よりも有意に高かったことが影響したと考えられる。逆に F 圃場の ATP 減少率が CP 区より MS 区で高かった理由は、消毒前の MS 区の ATP 含量が CP 区よりも高い傾向にあったことが影響したと考えられる。よって、5 圃場を調査した結果、圃場環境における ATP 減少率は CP 区の方が高い傾向に

あることが示された。

Table IV-8. Dynamics of ATP content in soil fumigated with MS and CP in konjac fields in Gunma in 2015 (mg/kg dry soil).

	F field		T field		D field	
	Before	After	Before	After	Before	After
MS	0.38	0.17 *	0.23	0.16	0.21	0.17 **
CP	0.20	0.12	0.29	0.15	0.22	0.13

	S field		A field	
	Before	After	Before	After
MS	0.23	0.18 *	0.12 *	0.09
CP	0.26	0.12	0.20	0.09

Before means before fumigation. After means one month after fumigation.
* and ** mean significantly differences between MS and CP (P<0.05, P<0.01, respectively).

Table IV-9. Decreasing rate of ATP content in soil 5 konjac fields in Gunma in 2015 (%).

	F field	T field	D field	S field	A field
MS	56	31	18	20	22
CP	41	48	40	54	57

2015年の圃場における自活性線虫密度は、消毒前の時点でMS区とCP区に差がみられ、A圃場を除いた4圃場ではCP区の方がMS区よりも密度が高い傾向にあった(表IV-10)。自活性線虫密度の減少率の薬剤間の傾向は圃場によって異なった。

Table IV-10. Dynamics of density of free-living nematodes and decreasing rate in soil treated with MS and CP in konjac fields in Gunma in 2015 (individuals/20 g soil)

	F field			T field			D field		
	Before	After	%	Before	After	%	Before	After	%
MS	440	161	63%	462	113	76%	1282	68	95%
CP	572	35	94%	723	238	67%	1850	82	96%

	S field			A field		
	Before	After	%	Before	After	%
MS	221	189	15%	144	20	86%
CP	272	185	32%	87	13	85%

Before means before fumigation. After means one month after fumigation.

P. aristosporum は 5 圃場中 D 圃場でのみ消毒前の全プロットから検出された (表IV-11)。消毒 1 ヶ月後では MS 区の 1 プロットおよび CP 区の 3 プロットでは *P. aristosporum* は検出されなくなった。残る MS 区の 2 プロットでは、消毒前の密度を 100 とすると、相対密度は 19~31 に減少していたが、検出限界以下の値にはならなかった。

P. myriotylum は 5 圃場中 3 圃場で消毒前に検出されたが、消毒 1 ヶ月後にはすべてのプロットで検出限界以下の密度になった (表 IV-12)。

Meloidogyne incognita が検出された土壌はなかった。

Table IV-11. Ct values of *Pythium aristosporum* in soil collected from konjac fields before and after fumigation in 2015.

Field	Treatment	Plot No.	Before fumigation		1 month later	
			Ct	(%)	Ct	(%)
D field	MS	1	31.0	100%	32.7	31
		2	31.1	100%	33.5	19
		3	31.2	100%	ND	<1%
	CP	1	30.3	100%	ND	<1%
		2	29.0	100%	ND	<1%
		3	30.7	100%	ND	<1%

ND means undertermined or ct valus was more than 36

Table IV-12. Ct values of *Pythium myriotylum* in soil collected from konjac fields before and after fumigation in 2015.

Field	Treatment	Plot No.	Before fumigation		1 month later	
			Ct	(%)	Ct	(%)
F field	MS	1			ND	<1%
		2	31.7	100%	ND	<1%
		3			ND	<1%
	CP	1			ND	
		2	ND		ND	
		3			ND	
D field	MS	1	32.8	100%	ND	<1%
		2	33.6	100%	ND	<1%
		3	33.6	100%	ND	<1%
	CP	1	33.8	100%	ND	<1%
		2	33.1	100%	ND	<1%
		3	32.2	100%	ND	<1%
A field	MS	1	32.9	100%	ND	<1%
		2	32.6	100%	ND	<1%
		3	ND		ND	
	CP	1	ND		ND	
		2	ND		ND	
		3	ND		ND	

ND means undertermined or ct valus was more than 36

糸状菌の消毒 1 ヶ月後の相対密度は S 圃場 MS 区を除いて消毒前よりも密度が低かった (表IV-13)。T 圃場では消毒 1 ヶ月後に MS 区が CP 区の約 1/9 に、S 圃場では CP 区が MS 区の約 1/2 になったが、5 圃場で薬剤間の一貫した傾向はみられなかった。

細菌の消毒 1 ヶ月後の相対密度は D 圃場 MS 区を除いて消毒前よりも密度が低かった (表IV-14)。F、D 圃場では消毒 1 ヶ月後に MS 区の方が CP 区より密度が高い傾向にあったが、残る 3 圃場では逆に CP 区の方が密度が高い傾向にあった。5 圃場で薬剤間の一貫した傾向は

みられなかった。

Table IV-13. Relative density of fungi in soil collected from konjac fields 1 month after fumigation in 2015.

	F field	T field	D field	S field	A field
MS	11	6	38	131	8
CP	20	53	18	73	7

Relative density in soil collected before fumigation was 100.

Table IV-14. Relative density of bacteria in soil collected from konjac fields 1 month after fumigation in 2015.

	F field	T field	D field	S field	A field
MS	79	79	122	79	79
CP	64	95	76	95	95

Relative density in soil collected before fumigation was 100.

6) 圃場試験：硝化菌への影響（2015年）

硝化菌はアンモニアから亜硝酸や硝酸を生ずる微生物の総称であり、土壌中の窒素循環に重要な役割を果たしている。しかし、硝化菌は環境ストレスに弱いことが知られているため、くん蒸剤が硝化菌に与える影響を調査した。

<材料および方法>

実験は2015年に、前述したように5圃場から消毒前後に採取した土壌に対して、抽出DNA中のアンモニア酸化細菌（ammonia-oxidizing bacteria：AOB）のアンモニア酸化を担う遺伝子（*amoA*）の測定と、土壌中の硝酸態窒素濃度の測定の2つを行った。

*amoA*の測定はreal-time PCRを用いて行った。Real-time PCRはプライマー*amoA*-1F（5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3'）および*amoA*-2R（5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3'）（Rotthauwe et al., 1997）を用いて、（94℃2分、（94℃30秒、54℃30秒、72℃30秒）

×40 サイクル) の条件で行った。既存の Ct 値 (y) と Log₁₀ (遺伝子コピー数/μL) (x) の検量線 (沢田ら、未発表) を用いて換算した。すなわち、 $y = -3.9259x + 40.205$ の関係式を用いて 10 倍希釈サンプル中の Log₁₀ (遺伝子コピー数/μL) を求めた。この 10 μL 中の遺伝子コピー数を 10 倍したものを、抽出効率 (0.44) で割り、さらに乾土 0.5 g で割って、乾土 1 g あたりの遺伝子コピー数を求めた。

土壌中の硝酸態窒素濃度の測定は反射式環境定量分析システム RQ フレックスプラス 10 (藤原製作所) を用いて行った。土壌は DNA 抽出用に乾燥し、ボールミルにかけたものを用いた。スクリーチューブに土壌 1 g を入れて、遠心機 (12000 g×30 秒) にかけて。土壌をいれたチューブに蒸留水 1 mL を添加して、ビードビーティング (5000 rpm×30 秒) にかけて。ビードビーティングした土壌を遠心機 (8000 g×5 分) にかけて。上澄を 2 mL チューブに移して、RQ フレックスプラス 10 で NO₃⁻ を測定した。検出範囲は 3-90 mg/L の試薬を用いた。検出範囲を超えてしまう場合は蒸留水で 10 倍希釈して測定した。

< 結果および考察 >

2015 年に採取した 5 圃場 10 土壌のサンプルのうち、D 圃場の土壌でのみ検出限界 (Ct 37) 以下の Ct 値が得られた。Ct 値を *amoA* コピー数に変換したところ、CP 区で消毒 1 ヶ月後の方が消毒前よりコピー数が多くなった (表 IV-15)。MS 区には消毒前後で差が見られなかった。

Ct 値が 37 以上になった圃場がほとんどであったことから、サンプル土壌中のアンモニア硝化細菌の密度が低いと考え、密度を求めるのではなく、硝化菌が生産する硝酸態窒素の土壌中の濃度を求めることにした。

Table IV-15. Change in the abundance of *amoA* gene copies of ammonia-oxidizing bacteria in soil collected from konjac field before and 1 month after fumigation.

Field	Treatment	Period	Ct	copies/g dry soil
D field	MS	Before	34.7	1.3×10 ⁵
		After	34.4	1.7×10 ⁵
	CP	Before	36.1	0.9×10 ⁵
		After	33.5	2.8×10 ⁵

土壌中の硝酸態窒素濃度は、5圃場中 D 圃場でのみ消毒前に CP 区の方が MS 区より有意に高かったが (P<0.05)、残りの 4 圃場では処理区間に有意な差はみられなかった (表IV-16)。消毒 1 ヶ月後では、3 圃場 (T、D、S 圃場) で有意に MS 区の方が CP 区より硝酸態窒素濃度が高くなった (P<0.05)。逆に CP 区の方が MS 区より濃度が高い傾向にあったのは、A 圃場のみであった。

Table IV-16. Concentration of NO₃⁻ in soil collected from konjac fields before and 1 month after fumigation in 2015.

		(NO ₃ ⁻ mg/100 g dry soil)	
		Before fumigation	1 month later
F field	MS	4.6	21.4±5.3
	CP	4.7	11.0±2.8
T field	MS	4.2±0.3	15.3±1.2 *
	CP	4.1±0.0	8.7±2.9
D field	MS	2.7±0.4 *	30.3±6.2 *
	CP	6.9±1.5	10.3±4.7
S field	MS	6.0	19.7±2.1 *
	CP	6.0	14.7±0.5
A field	MS	2.9±0.1	4.2±0.5
	CP	3.4±0.3	6.0±1.4

* means significantly differences between MS and CP (P<0.05).

7) 殺菌効果の比較 (*Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus penetrans*, *Pythium aphanidermatum*)

CP と MS、あるいは MS と同じく MITC を有効成分とする農薬の土壌伝染性病害虫に対する殺菌効果は報告例があるが (Gilreath et al., 1994; Csinos et al., 1997)、処理量を変えて行った実験はなかったため、CP と MS の殺菌効果の比較を行った。

<材料および方法>

Meloidogyne sp.については千葉県圃場から採取した汚染土壌を、*Pratylenchus penetrans*については神奈川県三浦半島のダイコン圃場から採取した汚染土壌を実験に用いた。*Pythium aphanidermatum*については汚染土壌が手に入らなかったため、群馬県コンニャク圃場の土壌 (2015THC) に接種源を埋設して実験を行った。

各土壌の最大容水量を測定して、土壌水分を最大容水量の 60% になるように脱イオン水を添加した。*Meloidogyne* sp.汚染土壌は土壌 50 g を、*P. penetrans* 汚染土壌は土壌 120 g を 500 mL 容ポリビンに充填した。群馬県 2015THC 土壌は初めに 50 g を 500 mL 容ポリビンに充填し、その上に *P. aphanidermatum* 接種源を乗せて、接種源を覆い隠すようにさらに土壌 50 g をポリビンに充填した。*P. aphanidermatum* 接種源は、*P. aphanidermatum* OPU854 をコーンミール寒天培地上で 30°C 1 日培養したものをを用いた。菌糸の縁際を寒天培地ごと 1000 μ L 用チップ (直径 6 mm) でくり抜き、寒天片を 2 重にしたガーゼで包んだ。ガーゼは開かないように裁縫用の糸で結んだ。これらの土壌にくん蒸剤を添加し、30°C の恒温器内で 3 日間くん蒸後に開封してポリ袋に土壌を移し、1 時間ドラフト内で換気した。添加したくん蒸剤の量については表 IV-17 に記す。なお、*P. penetrans* 汚染土壌の実験において CP100% 区は設けなかった。

その後、*Meloidogyne* spp. および *P. penetrans* については土壌 10 g を用いてベルマン法を行い (2 連)、実体顕微鏡下で植物寄生性線虫を計数した。*P. aphanidermatum* については土壌中に埋設していたガーゼを回収し、包んでおいた寒天片を取り出してコーンミール寒天培地

上に置いた。30℃で1週間培養し、菌糸の生育を確認した。

Table IV-17. Design of experiments to reveal efficacy of fumigants using sealed bottles.

Commonly used (L/ha) ^a	Treatment	Dosage of fumigant ^b		
		Soil infested by <i>Meloidogyne</i> sp. (μL/50 g)	Soil infested by <i>Pratylenchus penetrans</i> (μL/120 g)	Gunma 2015THC soil (μL/100 g)
	Control	0	0	0
50	MS25%	4.2	10	8.3
	MS100%	16.7	40	33.3
30	CP25%	2.0	4.8	4.0
	CP100%	8.0	19.2	16.0

^a Concentrations of active ingredient of MS and CP are 30% and 80%, respectively.

^b Concentrations of active ingredient of MS and CP are 30% and 99.5%, respectively.

< 結果および考察 >

Meloidogyne sp.汚染土壌および *P. penetrans* 汚染土壌の無処理区の植物寄生性線虫の密度はそれぞれ 51 頭/20 g 土壌、38 頭/20 g 土壌であった (表IV-18)。*Meloidogyne* sp.はいずれの薬剤、濃度処理区でも検出されなくなったが、*P. penetrans* は CP25%区で 1 頭/20 g 土壌検出された。この *P. penetrans* の生残率は無処理区に比べて 1.3%と低かったが、汚染密度が高い土壌、例えば 200 頭/20 g 土壌の *P. penetrans* がいる土壌では 2.6 頭/20 g 土壌が生き残る計算になる。Sato et al. (2009)はダイコンを加害する *P. penetrans* の要防除水準を 2.5 頭/20 g 土壌と報告していることから、この 1.3%という生残率は無視してはいけない値だと考えられる。*P. penetrans* 汚染土壌の自活性線虫密度は無処理区で 672 頭/20 g 土壌検出されたが、MS25%区、

MS100%区、CP25%区ではそれぞれ 17 頭/20 g 土壌(無処理区の 3%)、2 頭/20 g 土壌 (0%)、35 頭/20 g 土壌 (5%) 検出された。CP25%区の自活性線虫生残率は *P. penetrans* の生残率より高くなった。これには自活性線虫と植物寄生性線虫のくん蒸剤に対する感受性の違いも考えられるが、無処理区の密度が 18 倍も自活性線虫の方が高かったことも影響していると思われる。過去の研究では、Csinos et al. (1997)が MS と CP を用いて *Meloidogyne* sp.汚染土壌を消毒しており、いずれも *Meloidogyne* sp.は検出されなくなったが、無処理区の密度が 4 頭/150 cm³ 土壌と非常に低かったため、*Meloidogyne* sp.をどこまで殺虫出来るのかについてはデータを得ることが出来ていなかった。よって、今後より高い密度で植物寄生性線虫に汚染されている土壌を用いて再度評価をする必要がある。

Table IV-18. Densities of plant parasitic nematodes in soils treated with different concentrations of fumigants using sealed botteles.

		Density of plant parasitic nematodes (individuals/20 g fresh soil)			
		<i>Meloidogyne</i> sp.		<i>Pratylenchus penetrans</i>	
Control	0%	51	(100%)	38	(100%)
MS	25%	0	(0%)	0	(0%)
	100%	0	(0%)	0	(0%)
CP	25%	0	(0%)	1	(1.3%)
	100%	0	(0%)	-	

- means not conducted.

P. aphanidermatum については、無処理区に埋設した寒天片からはコーンミール寒天培地に移して 1 日後に菌糸の生育がみられた。一方、MS および CP を用いてくん蒸した土壌に埋設していた寒天片からはいずれの濃度で薬剤を処理した区でも菌糸の生育がみられなかった。Csinos et al. (1997)は土壌中の *Pythium* spp.の密度を消毒後に測定しており、その結果、無処理区では 21 CFU (Colony forming unit) /g 土壌いた *Pythium* spp.が MS 処理区では検出されなくなったのに対して、CP 処理区では 28 CFU/g 土壌検出された。本論文で用いた *P.*

aphanidermatum は菌糸体であったが、土壌中には耐久体である卵孢子などの形態で存在している場合もある。菌糸体とその他の形態でくん蒸剤に対する耐性が異なるかどうかはわからないため、今後は寒天培地以外の手法で培養した菌や、植物体に接種した菌を用いる必要があるだろう。

8) くん蒸剤の殺菌効果に与える影響に関するまとめ

本論文では室内くん蒸試験および圃場試験で2種のくん蒸剤の土壌微生物に与える影響を調べた。室内くん蒸試験では2014TBC土壌および2016年に採取した3圃場6土壌において、くん蒸直後の微生物バイオマスはMS区の方がCP区よりも高いという傾向がみられた(図IV-6、16)。2016年F圃場の2土壌において、くん蒸から2週間後のDNA分析(DNA量)を行った結果、同じ傾向がみられた(図IV-19)。しかし、DNAを用いて細菌の遺伝子コピー数を測定した結果は、希釈平板法の細菌密度測定の結果とは傾向が異なった(図IV-20、21、22、23)。データ数が足りないため断言は出来ないが、糸状菌については遺伝子コピー数による計測、すなわち全糸状菌密度も、希釈平板法による培養可能糸状菌密度の測定も同じ傾向を示すが、細菌については培養出来ない菌がCP処理区よりMS処理区で多く生き残った可能性があると考えられる。

微生物バイオマスの圃場試験における傾向は、くん蒸1ヶ月後ではのべ9圃場のうち6圃場でMS区の方がCP区よりもATP含量が高かった(図IV-35、37、表IV-8)。この傾向は室内くん蒸試験の傾向と一致した。糸状菌および細菌のくん蒸1ヶ月後にreal-time PCRで求めた相対密度の傾向は一貫性がなかった(表IV-13、14)。これはくん蒸中の減少率が圃場によって異なったためか、あるいはくん蒸から1ヶ月経つ間に回復する程度が圃場によって異なったためと考えられたが、本論文ではくん蒸直後の密度を測定していなかったために、詳しいことはわからなかった。

Pythium spp.の生残性については、室内くん蒸試験ではMS、CPともに*P. aphanidermatum*の菌糸体を殺菌した。しかし、圃場試験においては1圃場のMS区でくん蒸1ヶ月後でも*P. aristosporum*が検出

された（表IV-11）。

線虫については、室内くん蒸試験では MS より CP の方が線虫の殺虫効果が弱かった（表IV-4、6、18）。圃場試験におけるのべ7圃場の傾向は一貫性がみられなかった（表IV-10）。

9) まとめ

2種のくん蒸剤（クロルピクリン；CPおよびメタムソディウム；MS）が土壌の本来持っている病害抑止性や静菌作用に与える影響を比較した。

ポリビンを用いた室内くん蒸を行った結果、慣行量の25%および100%を使用した場合、どちらもCPの方がMSより微生物バイオマスを減少させることがわかった（図IV-6、16）。各処理区における微生物バイオマスの差が糸状菌または細菌、どちらに対する影響力の違いによるものなのかどうかは、希釈平板法で求めた培養可能な細菌密度とDNA分析で求めた細菌の遺伝子コピー数で傾向が異なったが、細菌に対する影響の方が強いと考えられる（図IV-20、21、22、23）。一方、線虫に対する殺虫能力は、処理濃度を慣行量の25%に減らした場合、MSの方がCPより殺虫能力が高いことがわかった（表IV-4、6、18）。

圃場でくん蒸剤を使用した場合、室内試験の結果と傾向が一致したのはくん蒸1ヶ月後の土壌のATP含量（微生物バイオマス）のみであった（図IV-35、37、表IV-8）。糸状菌および細菌の遺伝子コピー数と自活性線虫の密度の傾向は圃場間で一貫性がみられなかった（表IV-13、14）。

土壌伝染性病害虫の殺菌効果については、植物寄生性線虫は室内くん蒸試験のみで、病原性糸状菌 *Pythium* spp. は室内くん蒸試験と圃場試験の両方で評価した。線虫については前述したとおり、処理濃度を慣行量の25%に減らした場合、MSの方がCPより殺虫能力が高かった（表IV-4、6、18）。*Pythium* spp. については室内くん蒸試験で用いた菌糸体に対してはいずれの薬剤処理も *P. aphanidermatum* を殺菌したが、圃場における *P. aristosporum* の生残性については消毒前に *P. aristosporum* が検出された7プロットのうち、MS処理区の1プロットで消毒1ヶ月後にも検出された（表IV-11）。よって菌糸体以

外の耐久体を取った *Pythium* spp.には MS の殺菌効果が CP より低い可能性が示唆された。くん蒸後の病原菌のリサージェンス発生リスクについて、室内くん蒸を行った土壌に対して *P. aphanidermatum* を接種後にキュウリ幼苗を用いた栽培ポット試験を行った。その結果、MS を慣行量の 25% 使用した区の発病指数は CP を慣行量の 25% 使用した区より有意に低くなった ($P < 0.05$; 図 IV-32)。MS25% 区の土壌からは *P. aphanidermatum* に対する拮抗菌がみつき、MS を処理しても生き残った拮抗菌がこの発病指数の差に影響した可能性が考えられた。

第V章. 総合考察

1. 不必要な農薬を使用しない農業の普及に向けた課題

増え続ける食料需要を賄うためには農業の生産性を上げていく必要があるが、一方で病害虫を防除するための農薬を減らすべきだという消費者の動向や、農薬が土壌微生物に与える悪影響を懸念する声が上がっている。農業の生産性を下げずに農薬の使用を減らすことは、ある条件下では可能である。すなわち、対象となる土壌伝染性病害虫が存在しない圃場において保険的に使用されている不必要な農薬を削減することである。これは、農薬を使用する前に土壌中に土壌伝染性病害虫が農薬を必要とするほどの高い密度で存在するかどうかを診断することで可能になる。

しかし、この診断方法には大きく分けて2つの課題がある。すなわち、病害虫を迅速、簡便かつ正確に計数することが難しいという点と、病害虫の密度と作物の被害度の関係性が明らかになっていないという点である。病害虫密度の測定は農薬を使用する前に行わなければならないため、迅速さが要求される。また普及に向けては簡便かつ誰でも正確に診断できる必要がある。しかし、従来の希釈平板法を用いた糸状菌、細菌の検出やベルマン法を用いた線虫の検出には、培養出来ない微生物を過小評価してしまう、休眠体や卵を抽出出来ないといった問題点がある。そこで、分子生物学的手法、中でも real-time PCR を用いた土壌伝染性病害虫の定量法の開発が盛んに行われている（佐藤 & 豊田, 2013）。また病害虫の密度がわかっても、そこから直接、農薬が必要かどうかを診断することはできず、作物に被害をもたらすような密度なのか検討する必要がある。このような防除の必要となる病害虫の密度は要防除水準と言い、植物寄生性線虫 *Pratylenchus penetrans* のダイコンに対する密度（近岡, 1983; Sato et al., 2009）、*Meloidogyne incognita* のニンジンに対する密度（佐野, 1988）などが報告されているが、あくまで限られた作物と病害虫の関係についての報告である。

また、不必要な農薬を使用しない農業を推進するうえでもう一つの改善すべき点がある。それは生産者の意識である。農薬が土壌微生物

に与える影響、特に作物の生育に関わる微生物機能への影響についての研究は、農薬の不効化 (Racke & Coats, 1988) や硝化菌の減少 (Welsh et al., 1998) などが報告されているが、その知識は生産者まではなかなか浸透していないのが現実である。特に土壌くん蒸剤が土壌の発病抑止能および静菌作用に与える影響についての研究は進んでおらず、室内での病原菌密度を調べた報告 (Toyota et al., 1996; Itoh et al., 2000) や現場での減少の報告 (Nishimura, 2004) 程度しか研究が行われていないため、その影響についての生産者の意識は低い。

そこで、本論文は土壌病害虫の迅速診断法を開発すること (第 II 章、第 III 章) と、くん蒸剤使用後の病害虫増加リスクを評価すること (第 IV 章) を目的に研究を行った。

2. Real-time PCR を用いた植物寄生性線虫の検出法の確立

本論文で主に扱った植物寄生性線虫は *Pratylenchus* 属 3 種と *Meloidogyne* 属 1 種である。そのうち *P. pseudocoffeae* と *P. kumamotoensis* については新たな種特異的プライマーを設計した。またすべての線虫に対して検量線を作成した。

完全に種特異的なプライマーを設計することは難しい (図 V-1)。Kawanobe et al. (2015) はプライマーの 3' 末端から 10 塩基以内に 2 塩基以上のミスマッチがあることで増幅効率は対象 DNA の増幅効率の 1% 以下になると結論付けている。本論文で設計した Ppcof プライマー (対象線虫: *P. pseudocoffeae*、表 II-2) と Pkuma プライマー (対象線虫: *P. kumamotoensis*、表 II-3) については、Pkuma プライマーが 2 種の近縁種の DNA を増幅してしまう可能性が示され、実際に *P. vulnus* の DNA を用いた実験を行ったところ、*P. kumamotoensis* の DNA の増幅効率に対して 4.7% の効率で *P. vulnus* の DNA を増幅した (表 II-7)。配列が似通っている 2 種のうち、*P. pseudopratisensis* は日本での報告および第 II 章で対象としたキクを加害する報告がされていないが、*P. vulnus* は韓国のキク圃場からの検出が報告されており (Han et al., 2006)、また日本の他作物栽培土壌からも検出されている (阿部 & 百武, 1981; 植松ら, 1982; 山田 & 高倉, 1995; 岩堀, 2010)

Table V-1. Number of mismatch of real-time PCR specific primers to closely-related nematodes.

Primer set	Target species	Non-target speices	No. of mismatch ^a (total)	Reference
SCN	<i>Heterodera glycines</i>	<i>H. schachtii</i>	0 (0)	Goto et al., 2009
		<i>H. trifolii</i>	0 (0)	
RKN	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>M. hapla</i>	1 (3)	Toyota et al., 2008
Pkuma	<i>Pratylenchus kumamotoensis</i>	<i>P. pseudopratensis</i>	1 (8)	Koyama et al. in press
		<i>P. vulnus</i>	1 (12)	

^a No. of mismatched base pairs in the non-target species sequence to the region of 10 base pairs from the 3' end of the formard and reverse primers.

ため、*P. vulnus* の誤検出は重要な問題である。そのため、*P. vulnus* を種特異的に検出するプライマーを設計して、Pkuma プライマーが Ct 値を出したサンプルを *P. vulnus* 特異的プライマーで再度分析することを考えた。*P. vulnus* 特異的プライマーは設計することができ、1頭の *P. vulnus* から抽出した DNA を用いた real-time PCR には成功したものの、土壌あるいは線虫懸濁液から抽出した DNA を用いて real-time PCR を行うと、必ず Ct 値が 30 前後で検出されてしまった。何かしらの DNA を誤検出している可能性が高いと考えられるが、その原因までは特定することができなかつた。今後、*P. vulnus* 特異的プライマーの改良を行う必要がある。

P. pratylenchus (Sato et al., 2007; Sato et al., 2010) および *M. incognita* (Toyota et al., 2008; 村上, 2013) についてはプライマーが既に報告されており、土壌中の対象線虫密度と Ct 値の関係を現す検量線も作成されていた。しかし、Sato et al. (2010) の報告は土壌を粉碎する際にボールミルではなく締固め法を使っていたため、また土性によって土壌 DNA の抽出効率が異なる (Zhou et al., 1996) ため、新たに検量線を作成した。*P. pratylenchus* については Sato et al. (2010)

の報告では、 Log_2 換算の乾土 20 g あたりの線虫密度 (x) と Ct 値 (y) の関係は黒ボク土で $y = -0.757x + 36.52$ 、灰色低地土で $y = -0.769x + 34.47$ であった。一方、第 II 章で作成した沖縄県の粘土質土壌に対する *P. pratylenchus* の検量線は $y = -0.9502x + 35.986$ と傾きが理論値 (-1) により近くなった (図 II-3)。締固め法とボールミルの差については Goto et al. (2010) が検討しており、*Heterodera glycines* の検量線はボールミルの方が理論値に近く、また y 切片も低くなった。*M. incognita* の検量線はこれまでに複数回検討されており、砂土では $y = -1.0404x + 34.288$ (Min et al., 2009)、黒ボク土では $y = -0.9179x + 37.37$ (Watanabe et al., 2013) および $y = -1.0028x + 34.044$ (村上, 2013) が報告されている。第 III 章で作成した千葉県黒ボク土に対する *M. incognita* の検量線は $y = -1.1586x + 37.142$ であり (図 III-4)、村上 (2013) の検量線より y 切片が高くなった。その原因は千葉県の土壌には DNA 抽出中に夾雑物が浮遊していたことから、なんらかの物質が DNA 抽出を阻害している可能性が考えられた。

土壌毎の抽出効率の違いは、特に沖縄県の土壌で問題となる。沖縄県の主要土壌は国頭マージ (赤黄色土)、大東マージ (赤黄色土)、島尻マージ (暗赤色土)、ジャーガル (陸成未熟土) に分類され、それぞれ母材および土壌の理化学性が異なる (久場, 1993; 宮丸, 2012)。よって異なるタイプの土壌について、それぞれ対象線虫の検量線を作成することが最も望ましいが、それには土壌および対象線虫の入手が困難であったため、土壌 DNA 抽出効率を測るための内部標準の作成を試みた。

内部標準は水田あるいはレンコン田にしか生息しないと考えられる *Hirschmanniella diversa* の DNA を用いた。DNA を PCR で増幅し、増幅断片長が約 1500bp のものを土壌に添加し、土壌 DNA を抽出して real-time PCR にかけたところ、Div の抽出効率は沖縄県の土壌で 10~55%、徳島県の砂土で 25%、関東の黒ボク土で 24~54% と土壌によって大きく異なった。Div と同時に線虫を土壌に添加してその Ct 値を求め、線虫の Ct 値 (x) と Div の Ct 値 (y) の関係を調べたところ、関係式は $y = 1.1587x + 3.7826$ となり、正の相関関係がみられた ($P < 0.01$) (図 II-6)。よって、Div の抽出効率を用いることで土性の異なる土壌

間でも本論文で作成した検量線によって Ct 値からの線虫密度換算が可能になった。

3. 植物寄生性線虫の密度と作物の被害度の関係

第Ⅱ章ではキクの収量と *Pratylenchus* spp.の密度の関係を、第Ⅲ章ではトマトおよびキュウリ幼苗のネコブ被害と *Meloidogyne incognita* の密度の関係を調べた。

植物寄生性線虫の密度と収量や被害度の関係は、農薬を使用すべきか診断するという意味では、農薬使用前、すなわち作付け前の密度と栽培後の収量や被害度を調査することが望ましい。しかし、キクについてはほとんどの農家が作付け前に農薬を使用してしまうため、作付け前の密度を測定してもその後の収量調査を行うことが出来なかった。そこで、栽培中の線虫密度と生育状況の関係および収穫時の線虫密度と収量を調査した。その結果、3圃場中2圃場では生育不良プロットでのみ *P. penetrans* が検出されたため、植物寄生性線虫がキクの生育不良を引き起こしていると考えられた(表Ⅱ-14)。一方、残る1圃場では生育良好・不良関係なく *P. penetrans* が検出された。この土壌を採取した時点ではまだ生育初期であったため、収穫時の密度と収量の関係を調べた。密度と平均草丈の関係性は明確にはならなかった(図Ⅱ-5)が、密度と不良品化率(草丈60cm以下の株の割合)を調べたところ、500頭/20g乾土以下では不良品率が13%以下であった(図Ⅱ-6)。この密度を超えたプロットは4つあり、そのうち2プロットは商品化率が40%以上であった。よって、植物寄生性線虫が高密度で存在することでキクの生育に影響を及ぼす可能性が改めて示されたが、一方で気になるのは植物寄生性線虫が収穫時に高密度で存在したにも関わらず、生育が良好だった2プロットの存在である。密度を測定したのが定植前であれば、土壌中の拮抗菌などの存在によって線虫密度が増加しなかった、あるいは減少した可能性が考えられるが、収穫時に高密度で存在したということは確実になにかしらの寄主植物が存在したはずである。

このような、収穫時に高密度で植物寄生性線虫が存在しても作物に被害が起こらなかった例は、そもそも収穫時の線虫密度を求めた研究

例が少ないため、あまり報告例がない。しかし、第Ⅲ章でハウス栽培したトマトのネコブ指数と収穫時に採取した土壌中の *M. incognita* 密度を比較すると、EtOH 区の 1 プロットで上層および下層の密度が 266 頭/20 g 乾土および 839 頭/20 g 乾土と全 12 プロット中もっとも高かったにも関わらず (表Ⅲ-4, 5)、ネコブ指数は 0 であった (表Ⅲ-10)。これらの土壌と寄主植物にはいったい何が起こっているのだろうか。今後、この現象を解明することで、新たな防除法の開発の道が開けるかもしれない。

第Ⅲ章の研究の主な目的は植物寄生性線虫の要防除水準を作成することではなかった。しかし、トマトについては土壌消毒後の *M. incognita* の密度と収穫時のトマトのネコブ被害度をみており、またキュウリについては定植前の密度と幼苗のネコブ被害度をみていたため、密度と被害度の関係について若干の知見が得られた。トマトについては被害度を示した株が 12 プロット中 2 プロットのみであったために正確な議論は出来ないが、定植前の上層・下層密度の平均が 79 頭/20 g 乾土であった時に高いネコブ指数 (50) がみられた (表Ⅲ-4, 5, 10)。またキュウリの幼苗検定では、ネコブ指数 20 以上を深刻な被害と設定すると、定植前密度が 48 頭/20 g 乾土以上で深刻な被害がみられた (図Ⅲ-8)。キュウリの *M. incognita* の要防除水準については北海道立総合研究機構 (1998) が、収量が 50% 減となる密度を 2 頭/25 g 土壌と報告している。この報告に比べて今回の結果は 30 倍も密度が高かったが、これには本論文のキュウリ栽培期間が 1 ヶ月と短かったため、初期密度が高くないとネコブ指数が高くならなかったことが影響していると考えられる。よって、キュウリの幼苗については定植前の植物寄生性線虫密度と被害度の関係性を明らかにすることができた。一方で、キクおよびトマトの植物寄生性線虫密度と被害度の関係性は解明することが出来なかった。今後、サンプル数を増やして様々な定植前密度の土壌を用意し、その後の作物の被害度を調べていく必要がある。

4. 土壌消毒と植物寄生性線虫定量法の組み合わせの可能性

これまで *Pratylenchus penetrans* (Sato et al., 2007; Sato et al., 2011)、*Meloidogyne incognita* (Toyota et al., 2008; Watanabe et al.,

2013)、*Hirschmanniella diversa* (Koyama et al., 2013) などの real-time PCR を用いた定量法が開発され、線虫密度と作物の被害度の関係が明らかにされてきた。それに加えて、土壌中に植物寄生性線虫がいるかどうかを必要な指標として研究を行ったのが第Ⅱ章である。すなわち、土壌消毒の殺虫効果を調べるために real-time PCR を用いたのである。

農薬を減らしつつ生産性を上げるためには、農薬に頼らない防除法の開発が必要となる。特に太陽熱消毒や土壌還元消毒などの物理的防除は効果が高いと期待されている。しかし、これらの土壌消毒法を普及するためには技術改善を行う必要があり、作業体系などの工夫が現在も行われている。そこで、改善した土壌消毒法が本当に病害虫を防除できているのかどうかを簡便に調べる技術として real-time PCR が注目された。

定植前の植物寄生性線虫の密度を求める場合と違って、土壌消毒後の線虫密度を求める場合には一つの懸念があった。すなわち、消毒で死んだ線虫の DNA を誤検出してしまい、消毒効果を過小評価してしまうかもしれないという問題である。そこで、第Ⅱ章において土壌くん蒸剤(クロルピクリン)使用後の DNA 分解にかかる時間を調べた。

くん蒸後の土壌に死んだ線虫を添加したところ、添加後 1 週間ではまだ 20% 程度の死んだ線虫由来の DNA が土壌中に残存していたが、添加後 2 週間ではほとんど検出されなくなった(図Ⅱ-6, 7)。よって、土壌消毒から 2 週間たてば死んだ線虫の DNA を誤検出する問題は起こらないことが明らかになった。

土壌消毒はくん蒸剤を使用した場合はビニール被覆を 7 日以上行うよう推奨されている(クロルピクリン工業会)。また太陽熱消毒や土壌還元消毒ではほとんどの場合、2 週間以上ビニール被覆を行う。よって、くん蒸剤を使用後の被覆期間が 2 週間より短い場合は土壌採取のタイミングを後にずらす必要があるが、消毒開始から 2 週間以上たっていれば、正確な定量が出来ると考えられる。

また、第Ⅲ章では *Meloidgynr incognita* については土壌消毒の殺虫効果が下層にまでは十分に及ばないことを明らかにした(表Ⅲ-5)。従来の幼苗検定法では下層土の評価をすることは時間や栽培管理の問題

上難しかったため、real-time PCR を用いた土壌消毒の殺虫効果の評価は従来法に比べて有益であることが示された。

5. 土壌くん蒸剤のリスク

クロルピクリンに代表される土壌くん蒸剤は減収を起こさずに農業を行う上で非常に重要な役割を果たす。その一方で、クロルピクリンは人体に健康被害をもたらす。また、強力な土壌くん蒸剤は土壌伝染性病害虫を殺菌できるが、同時に有益な土壌微生物も殺してしまうと考えられる。よって、第IV章では土壌くん蒸剤のリスクについて研究を行った。

室内でくん蒸試験を行った結果、土壌微生物バイオマスは無処理区に比べてクロルピクリン処理区で7~31%、メタムソディウム処理区で42~62%に減少した(図IV-16)。それでは、土壌中の微生物をおおまかに糸状菌、細菌、線虫、その他の動物にわけた場合、いったい何が土壌くん蒸によって殺菌されたのだろうか。土壌1m²あたりの生物数は、線虫が10⁶~10⁷、原生動物が10⁹~10¹⁰、糸状菌が10¹⁰~10¹¹、細菌が10¹³~10¹⁴といわれている(Brady&Weil, 2002)。よってくん蒸剤によって微生物バイオマスが減少したのは、糸状菌あるいは細菌を殺菌した影響が強いと考えられる。本論文の結果では、くん蒸剤処理区の微生物密度と微生物バイオマスの傾向は培養可能糸状菌の傾向とは一致しないことがあったが、細菌とは傾向が一致した(図IV-17, 18)。よって各処理区における微生物バイオマスの差が糸状菌または細菌、どちらに対する影響力の違いによるものなのかは、細菌に対する影響の方が強いと考えられる。線虫に対しては、慣行量のくん蒸剤を使用すれば両くん蒸剤ともに生き残る線虫はいなかった(表IV-6)。

このように微生物バイオマスが減少することは農業にどんな影響をもたらすのだろうか。第IV章では窒素循環に関わる硝化能と *Pythium* 病の抑止能への影響を明らかにした。硝化能についてはメタムソディウムより多く細菌を殺菌するクロルピクリンを使用した土壌において、硝酸態窒素を生成する硝化能がより減少した(表IV-16)。また *Pythium* 病の抑止能については、クロルピクリンを慣行量の25%処理した土壌でメタムソディウムを25%処理した土壌より抑止能が低下した(図IV

-32, 33)。この抑止能の低下にはおそらく拮抗菌の減少が影響していると考えられるが、この仮説を検証することはできなかった。

硝酸態窒素の生成は作物の生育に必須である。また病害抑止能を失うことは病害発生リスクを高めることと同意である。よって、必要以上の土壤くん蒸剤の使用は農業を行う上でのリスクを高める可能性があることが明らかになった。

6. まとめ

土壤中の植物寄生性線虫を定量することに意味はあるのだろうか。本論文では、キクの生育不良の原因が植物寄生性線虫によるものなのかどうか判断する技術を確立した。これによって殺線虫剤を使うべきなのか、それ以外の要因、土壤硬度や養分などを見直すべきなのかどうか判断できるようになった。また植物寄生性線虫 *Meloidogyne incognita* を防除する際に、防除効果があったのかどうかを診断することができるようになった。これにより、さらなる防除法の改善が進んでいくだろう。

最後に、土壤くん蒸剤を使用することは土壤の硝化能および病害抑止能を低下させる可能性があることを明らかにした。このことは、不必要な農薬を使用しない農業を推進するうえで重要な知見となる。

第VI章. 摘要

作物の収量を確保するために農薬による病害虫と雑草の防除が広く行われているが、その一方で農薬の使用は環境破壊や人体への健康被害が懸念されている。農薬は農業を行う上で必要不可欠であるが、防除対象の存在しない圃場への農薬使用は控えるべきである。 unnecessary 農薬の使用を削減するためには、農薬使用前に土壌病害虫を検出する必要がある。また、農薬が土壌微生物に与える影響のリスクを解明することも、生産者の意識を変える上で重要である。そこで本論文は、土壌病害虫の迅速診断法を開発する(第II章、第III章)とともに、農薬の一種である土壌くん蒸剤が土壌微生物由来の病害抑止性や静菌作用に与える影響を調査する(第IV章)ことを目的とした。

まず、キクに被害を及ぼす3種の植物寄生性線虫の検出法を開発を行った(第II章)。日本のキク圃場には3種の *Pratylenchus* 属が検出されているが、その症状は他の生理障害などと判別がつきにくい。適切な症状の対策を行うためには、防除を行う前に土壌中に線虫が存在するのか診断する手法が必要となる。本論文では初めに *P. pseudocoffeae* および *P. kumamotoensis* の特異的プライマーを設計した。*P. penetrans* のプライマー (Sato et al., 2007) も合わせて、3種の *Pratylenchus* 属の検量線を作成した。得られた検量線を基に、沖縄県キク圃場から土壌33サンプルを採取して土壌DNAを抽出し、3種の *Pratylenchus* 属の密度を測定した。その結果、*P. penetrans* は18サンプルから4~1553頭/20g乾土の範囲で、*P. kumamotoensis* は1サンプルから53頭/20g乾土検出された。*P. pseudocoffeae* は検出されなかった。以上より、沖縄県キク圃場において3種の *Pratylenchus* 属を定量する手法を開発することが出来た。また、土性の異なる土壌間のDNA抽出効率の補正を行うための内部標準の開発と、死んだ線虫由来のDNAが分解されるのにかかる期間の調査を行った。その結果、線虫由来の1500bpのDNA断片をDNA抽出の内部標準とすることができた。また死んだ線虫由来のDNAはくん蒸、非くん蒸土壌ともに2週間で99%以上分解されることが明らかになった。

次にサツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* の潜在的被害を予測する迅速診断法を開発した(第III章)。植物体を用いた土壌

病害虫の診断法に幼苗検定があるが、この手法は時間がかかる、大量の土壌を必要とするなどといった問題点がある。そこで real-time PCR を用いた *M. incognita* の定量と幼苗検定の関係を明らかにすることで、幼苗検定に代わる迅速診断法の開発を試みた。千葉県トマト栽培ハウスから土壌消毒前後およびトマト栽培後の土壌を採取して、*M. incognita* の密度測定および幼苗検定を行い、密度とネコブ指数の関係を調査した。*M. incognita* の密度測定は real-time PCR 法とベルマン法の 2 通りの手法で行った。その結果、real-time PCR 法で *M. incognita* が検出されなかった 13 サンプルのうち、幼苗検定でネコブ指数(最大 2)を示したのは 2 サンプルであったが、一方ベルマン法で *M. incognita* が検出されなかった 19 サンプルのうち、8 サンプルでは幼苗検定でネコブ指数(最大 67)がみられた。*M. incognita* 密度と幼苗検定のネコブ指数の間には強い相関関係がみられたのは real-time PCR 法のみであった($P < 0.001$)。よって、ベルマン法よりも real-time PCR 法の方が幼苗検定の結果との相関性が高いことが示された。Real-time PCR 法で求めた *M. incognita* 密度が 48 頭/20 g 乾土以上存在する土壌では幼苗検定に深刻な被害がみられることがわかった。消毒直後に行った上層(0-30 cm)土壌を用いた幼苗検定ではネコブ指数がみられなかったにも関わらず、収穫後では幼苗検定およびハウスで栽培したトマトの根にネコブ指数がみられた地点があった。よって、下層(30-45 cm)も含めた分析を行わなければ、*M. incognita* の被害は正確には予測できないと示唆された。Real-time PCR 法は用いる土壌の量が少なくすみ、また迅速に診断できることから、下層まで診断できる手法として幼苗検定に代わる土壌診断法を開発することが出来た。

最後に 2 種の土壌くん蒸剤が土壌微生物群集と発病リスクに与える影響を評価した(第 IV 章)。農業現場では今、多様な土壌病害虫防除法が求められている。すなわち、常にクロルピクリン(CP)のような強力な土壌くん蒸剤に頼るのではなく、メタムソディウム(MS)などの殺菌効果の穏やかなくん蒸剤を導入して強力な薬剤の使用量・回数を減らすことが望まれている。土壌環境に配慮した総合的な土壌診断法を確立するためには、まず土壌くん蒸剤が土壌環境に及ぼす影響を調査するとともに、どのような土壌条件下で発病リスクが高まるのかを明らかにする必要がある。室内くん蒸の結果、土壌中の ATP 含量は MS 処

理区で無処理区の 42~62%、CP 処理区で 7~31% になった。希釈平板法と DNA 分析の結果、くん蒸による ATP 含量の減少は細菌による影響が高いことが示唆された。自活性線虫はくん蒸処理後に検出されなくなった。くん蒸土壌を用いて *Pythium aphanidermatum* の接種試験を行った結果、MS25% 区の発病指数は CP25% 区よりも有意に低くなった ($P < 0.05$)。よって、土壌の病害抑止能を低下させる作用は CP の方が MS より高いことが示された。くん蒸処理を行った圃場の土壌を採取して ATP 含量を測定した結果、消毒約 1 ヶ月後の ATP 含量は、5 圃場中 3 圃場で有意に CP 区の方が MS 区より低くなった ($P < 0.05$)。この結果は圃場条件というくん蒸剤の殺菌効果が室内くん蒸より効きにくく、また微生物の再侵入がおこりやすい条件下でも、一ヶ月たっても CP 区の方が MS 区より微生物バイオマスが回復していないことを示した。また土壌中の硝酸態窒素は CP の方が MS より少なかった ($P < 0.05$) ことから、CP の方が細菌を殺菌する効果が高い傾向は、硝化菌についても言えることが示唆された。以上より、MS より CP の方が殺菌効果が高く、*P. aphanidermatum* の発病リスクを高める可能性があることが明らかになった。

本論文では real-time PCR を用いたキクおよびトマトの線虫被害を迅速に予測する手法を開発できた。また MS より CP の方がくん蒸剤使用後の土壌の病害虫増加リスクを高める可能性があることが明らかになった。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々からご指導やご協力を賜りました。大変恐縮ではありますが、この場を借りて厚く感謝申し上げます。

指導教員である豊田剛己博士からは辛抱強く、熱心なご指導を賜りました。いろいろなことにつまずき、悩み、立ち上がるまでに時間のかかった私を見守って下さったこと、深く感謝申し上げます。先生は私にとって人生最大の恩師です。5年間も不出来な学生の指導をして下さり、本当にありがとうございました。

また、本論文をご審査頂きました生物システム応用科学府の橋本洋平准教授、梶田真也教授、佐藤令一教授、農学府の有江力教授に深く感謝の意を表します。

本研究は多くの方々のご協力がなければ遂行することができませんでした。第Ⅱ章で土壌採取にご協力下さった、沖縄県農業研究センターの宮丸直子博士、(株)沖縄農業技術開発の吉田晃一氏、線虫を分譲してくださり、また貴重なご助言を頂きました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センターの上杉謙太博士に心より感謝申し上げます。第Ⅲ章で研究を持ちかけて下さり、実験の一部を執り行って頂いた千葉県農林水産部流通販売課の三原千加子博士、たくさんのご助言を頂きました公益財団法人 園芸植物育種研究所の門馬法明博士、国立研究開発法人 農業環境技術研究所小原裕三博士に心から感謝申し上げます。第Ⅳ章では本当に多くの方々にお世話になりました。土壌採取を代行して下さったキルパー協議会の府賀伸彦氏、圃場を案内して下さった群馬県利根沼田農業事務所の熊川保弘氏、吾妻県民局吾妻農業事務所の藤井光一氏、渋川地区農業指導センターの高川功氏、コンニャクの栽培や病害についてご指導くださった渋川コンニャク特産センターの柴田聡氏、群馬県農業技術センターの酒井宏氏、接種試験の菌株を分譲して下さった大阪府立大学 東條元昭博士に厚く御礼申し上げます。そしてなにより、大事な圃場から土壌を採取することをお許し下さった生産者の方々に、心から感謝いたします。

そして、豊田研究室のみなさまに感謝を申し上げます。論文の取りまとめに悩む私の話を聞いて下さり、ご助言下さった伊藤大輔氏には、

大変お世話になりました。伊藤氏がいらっしゃらなかったら私の心は途中でくじけていたかもしれません。また私の話し相手になってくださった後輩たちにも本当に感謝しています。

最後に、博士後期課程まで進学したいと我儘を言った私を温かく見守ってくれた家族に、最大級の感謝を申し上げます。

ありがとうございました。

参考文献

A

阿部恭洋 & 百武一真 (1981) 佐賀県におけるイチゴのクルミネグサレセンチュウによる被害実態と防除。九州病害虫研究会報、27、102-103。

Akgul, H.C., Bayram, S. & Erdogus, F.D. (2010). Two new records of Turkish nematode fauna: *Ditylenchus equalis* and *Pratylenchus pseudopratensis*. *Pakistan Journal of Nematology* 28, 285-293.

Asano T., Senda M., Suga H. & Kageyama K. (2010) Development of multiplex PCR to detect *Pythium* species related to turfgrass disease. *Journal of Phytopathology* 158, 609-615.

B

Bezerova, G.S. & Pokhodenko, A.P. (1978). *Pratylenchus* on soft fruit crops. *Sbornik Nauchnykh Rabot, Nauchno-Issledovatel'skii Zonal'nyi Institut Sadovodstva Nechernozemnoi Polosy* 12, 22-28 (Russian).

Bru, D., Martin-Laurent, F. & Philippot, L. (2008). Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1660-1663.

Bridge, J. & Starr, J.L. (2007). *Plant Nematodes of Agricultural Importance: A Colour Handbook*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, pp. 49.

Brady N. C. & Weil R.R. (2002) The nature and properties of soil. 13th ed., p. 458. Prentice Hall.

C

Cheng Z., Toyota K. & Yamashita K. (2015). Development of real-time PCR primers specific to the potato rot nematode *Ditylenchus destructor* causing damage to garlic to quantify its density in soil. *Nematological Research* 45, in press.

Choi, D.R., Lee, J.K., Park, B.Y., Han, H.R. & Choi, Y.E. (2006). A new and one unrecorded species of *Pratylenchus* from Korea (Nematoda: Pratylenchidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 9, 5-9.

Csinos A.S., Johnson W.C., Johnson A.W., Sumner D.R., McPherson R.M. & Gitaitis R.D. (1997) Alternative fumigants for methyl bromide in tobacco and pepper transplant production. *Crop Protection* 16, 585-594.

近岡一郎 (1983) キタネグサレセンチュウによる作物被害と防除に関する研究, 特に対抗植物の利用について。神奈川農総研研報 125: 1-72.

D

De Ley, P., Felix, M.A., Frisse, L.M., Nadler, S.A., Sternberg, P.W. & Thomas, W.K. (1999). Molecular and morphological characterization of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (nematode: Cephalobidae). *Nematology* 1, 591-612.

de Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A. & van Veen, J.A. (2003). Microbial Community Composition Affects Soil Fungistasis. *Applied & Environmental Microbiology* 69, 835-844.

Dobbs, C.G. & Hinson, W.H. (1953). A widespread fungistasis in soil. *Nature* 172, 1354-1356.

Deimi, A.M., De Luca, F., Vovlas, N. & Troccoli, A. (2009). Characterisation and parasitic habits of a root-lesion nematode from chrysanthemum in Iran and its relationship to *Pratylenchus pseudocoffeae*. *Nematology* 11, 757-768.

Den Nijs, L. & Van Den Berg, W. (2013) The added value of proficiency tests: choosing the proper method for extracting *Meloidogyne* second-stage juveniles from soil. *Nematology* 15, 143-151.

E

F

Ferris V.R., Ferris J.M. & Faghihi J. (1993). Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* 16, 177-184.

G

Gilreath J.P., Jones J.P. & Overman A.J. (1994) Soil-borne pest control in mulched tomato with alternatives to methyl bromide. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 107, 156-159.

Giannakou, I. O., Sidiropoulos, A. and Prophetou-Athanasiadou, D. (2002) Chemical alternatives to methyl bromide for the control of root-knot nematodes in greenhouses. *Pest Management Science* 58, 290-296.

Goto K., Sato E., Li F.G., Toyota K & Sugita T. (2010) Comparison of calibration curves prepared by soil compaction and ball milling methods for direct quantification of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* in soil. *Nematological Research* 40, 41-45.

H

Han, H.R., Lee, J.K., Choi, D.R., Han, M.J. & Park, B.Y. (2006). Occurrence of plant parasitic nematodes in chrysanthemum and ITS and D3-28S rDNA characterization of *Pratylenchus* spp. *Korean Journal of Applied Entomology* 45, 293-299.

Hasan, A. (1988). Interaction between *Pratylenchus coffeae* and *Pythium aphanidermatum* and/or *Rhizoctonia solani* on chrysanthemum. *Journal of Phytopathology* 123, 227-232.

星野（高田）裕子&松本直幸（2004）土壌くん蒸処理後の細菌群集構造のDNA及びRNAレベルにおける変化—Competitor利用による土壌からの拡散抽出法を用いて—。日本微生物生態学会講演要旨集、20、80.

日野沙友里、Thiri M.T.&豊田剛己（2010）殺線虫剤(カズサホスとホスチアゼート)の enhanced biodegradation。土と微生物、64、141。

Harris D.C. (1990) Control Verticilium wilt and other soil-borne diseases of strawberry in Britain by chemical soil disinfestation. *Journal of Horticultural Science* 65, 401-408.

Harris T.S., Sandall L.J. & Powers T.O. (1990) Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22, 518-524.

北海道立総合研究機構。北海道の施設果菜類に発生したサツマイモネコブセンチュウの防除対策

(<https://www.hro.or.jp/list/agricultural/center/kenkyuseika/gaiyosho/h06gaiyo/1993223.htm>) (2016年7月4日閲覧)

I

Ingham, R. E. (1994). Nematodes. In: Weaver, R.W. (Ed.). *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy, pp. 459-490.

Isenbarger, T.A., Finney, M., Rios-Velázquez, C., Handelsman, J. & Ruvkun, G. (2008). Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 840-849.

岩堀英晶、佐野善一&小川哲治（2000）九州・沖縄地域のサツマイモおよびサトイモ圃場における主要有害線虫 1 中南部九州（熊本県・宮崎県・鹿児島県）における調査とDNA解析による効率的な線虫種判別法の開発:1. 中南部九州(熊本県・宮崎県・鹿児島県)における調査とDNA解析による効率的な線虫種判別法の開発。九州病害虫研究会報、46、112-117。

岩堀英晶、上杉謙太&立石靖（2008）沖縄県の畑作物、果樹、雑草等における植物寄生性線虫相。九州病虫害研究報、54、132-137。

岩堀英晶（2010）九州沖縄地域における有害植物寄生性線虫の分類と地理的分布。植物防疫、64、239-245。

Itoh K., Takahashi M., Tanaka R., Suyama K. & Yamamoto H. (2000). Effect of Fumigants on Soil Microbial Population and Proliferation of *Fusarium oxysporum* Inoculated into Fumigated Soil. *Journal of Pesticide Science* 25, 147-149.

岩堀英晶、佐野善一&小川哲治（2000）九州・沖縄地方のサツマイモおよびサトイモ圃場における主要有害線虫 1. 中南部九州（熊本県・宮崎県・鹿児島県）における調査とDNA解析による効率的な線虫種判別法の開発。九州病害虫研究報、46、112-117。

岩崎泰史&島崎豊（1998）2種類の土壌くん蒸剤の土壌中のハウレン

ソウ菱凋病菌に対する薬効範囲の比較。関東東山病虫害研究会年報 45、69-72。

Ishiguro Y., Asano T., Otsubo K., Suga H. & Kageyama K. (2013) Simultaneous detection by multiplex PCR of the high-temperature-growing *Pythium* species: *P. aphanidermatum*, *P. helicoides* and *P. myriotylum*. *Journal of General Plant Pathology* 79, 350-358.

J

K

Kawanobe M., Miyamaru N., Yoshida K., Kawanaka T. & Toyota K. (2015). Quantification of lesion nematode (*Pratylenchus zaeae*), stunt nematode (*Tylenchorhynchus leviterminalis*), spiral nematode (*Helicotylenchus dihystera*), and lance nematode (*Hoplolaimus columbus*), parasites of sugarcane in Kitadaito, Okinawa, Japan, using real-time PCR. *Nematological Research* 45, 35-44.

Kim Ji-In & Minagawa, N. (1996). Classification of root-lesion nematodes occurring in vinyl-houses planted horticultural crops. *RDA Journal of Agricultural Science, Crop Protection* 38, 530-538 (Korean).

Koyama, Y., Thar, S.P., Kizaki, C., Toyota, K., Sawada, E. & Abe, N. (2013). Development of specific primers to *Hirschmanniella* spp. causing damage to lotus and their economic threshold level in Tokushima prefecture in Japan. *Nematology* 15, 851-858.

久場峯子 (1993) 沖縄農地の実態と土壌管理—土壌化学性とサトウキビ畑における施肥管理—。ペトロジスト、37、16-137。

Killham, Ken(1994). "Soil Ecology." Cambridge university press, 194p, Cambridge, United Kingdom.

Karpouzas, D.G., Karanasios, E. & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2004). Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: demonstration and characterization. *Chemosphere* 56, 549-559.

Koyama, Y., Toyota, K., Miyamaru, N., Yoshida, K. & Uesugi, K. (2016). Development of a quantification method with real-time PCR for three *Pratylenchus* species causing damage to chrysanthemum in Japan. *Nematology* 18, 687-695.

高知県農業振興部、病害虫（キク）

(<http://www.nogyo.tosa.pref.kochi.lg.jp/info/list.php?sid=1001&DIID=162>) (2016年5月20日閲覧)

Kim, J.I. & Minagawa, N. (1996). Classification of root-lesion nematodes occurring in vinyl-houses planted horticultural crops. *RDA Journal of Agricultural Science, Crop Protection* 38, 530-538.

Kowalchuk, G.A., Os, G.J., Aartrijk, J. & Van Veen, J.A. (2003). Microbial community responses to disease management soil treatments used in flower bulb cultivation. *Biology and Fertility of Soils* 37, 55-63.

Katsuta A., Toyota K., Min Y.Y. & Maung T.T. (2016) Development of real-time PCR primers for the quantification of *Meloidogyne graminicola*, *Hirschmanniella oryzae* and *Heterodera cajani*, the pests of the major crops in Myanmar. *Nematology*, 18, 257-263.

Klose S., Acosta-Martinez V. & Ajwa H.A (2006) Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil

after fumigation with methyl bromide or alternative biocides. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 1243-1253.

小原裕三 (2013) 低濃度エタノールを利用した土壌還元作用による土壌消毒技術実施マニュアル。植物防疫、67、193-198。

クロルピクリン工業会

(http://www.chloropicrin.jp/fm/hinmoku_02.html) (2016年7月3日閲覧)

L

Lee, J., Lee, S. & Young, J.P.W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65, 339-349.

Li M., Ishiguro Y., Kageyama K. & Zhu Z. (2015). A simple method for normalization of DNA extraction to improve the quantitative detection of soil-borne plant pathogenic oomycetes by real-time PCR. *Applied Microbiology* 61, 179-185.

Lan-ping G.E. & Ichitani T. (1995) Two *Pythium* diseases occurred on wintergrasses. 芝草研究 24、5-12.

Lane, D. (1991) 16s/23s rRNA sequencing, p.115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom.

Lockwood J.L. (1997) Fungistasis in soil. *Biological Reviews* 52, 1-43.

M

Machado A.C.Z., Ferraz L.C.C.B. & De Oliveira C.M.G. (2007).

Development of a species-specific reverse primer for the molecular diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. *Nematropica* 37, 249-257.

Mizukubo, T. (1992). *Pratylenchus pseudocoffeae* n. sp. (Nematoda: Paratylenchidae) from composite plants in Japan. *Japanese Society of Applied Entomology and Zoology* 27, 437-444.

Mizukubo, T., Sugimura, K. & Uesugi, K. (2007). A new species of the genus *Pratylenchus* from chrysanthemum in Kyushu, western Japan (Nematoda : Paratylenchidae). *Japanese Journal of Nematology* 37, 63-74.

Min, Y.Y., Toyota, K., Goto, K., Sato, E., Mizuguchi, S., Abe, N., Nakano, A. & Sawada, E. (2011). Development of a direct quantitative detection method for *Meloidogyne incognita* in sandy soils and its application to sweet potato cultivated fields in Tokushima prefecture, Japan. *Nematorogy* 13, 95-102.

Min, Y.Y., Toyota, K. & Sato, E. (2012). A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. *Nematology* 14, 265-276.

Martin, J.P. (1950). Use of acid, rose Bengal and streptomycin in the plate method of estimating soil fungi. *Soil Science* 69, 215-232.

MacMillan, K., Blok, V., Young, I.M., Crawford, J.W. & Wilson, M.J. (2006). Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time qPCR. *International Journal for Parasitology* 36, 1453-1461.

Morrissey, E.M., McHugh, T.A., Preteska, L., Hayer, M., Dijkstra, P., Hungate, B.A. & Schwartz, E. (2015). Dynamics of extracellular DNA decomposition and bacterial community composition in soil.

Soil Biology and Biochemistry 86, 42-49.

Mocali S., Landi S., Curto G., Dallavalle E., Infantino A., Colzi C., d'Errico G., Roversi P.F., D'Avino L., & Lazzeri L. (2015) Resilience of soil microbial and nematode communities after biofumigant treatment with defatted seed meals. *Industrial Crops and Products* 75, 79-90.

Momma N., Momma M. & Kobara Y. (2010) Biological soil disinfection using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. *Journal of General Plant Pathology* 76, 336-344.

門馬法明 (2013) 土壌還元消毒法によるトマト萎凋病の密度低減効果のメカニズム解析。植物防疫、67、210-213。

村上理沙 (2013) 殺線虫剤使用量の削減を目指した線虫のメタゲノム解析。東京農工大学大学院修士論文。

Minuto, A., Gullino, M.L., Lamberti, F., D'Addabbo, T., Tescari, E., Ajwa, H. and Garibaldi, A. (2006) Application of an emulsifiable mixture of 1,3-dichloropropene and chloropicrin against root knot nematodes and soilborne fungi for greenhouse tomatoes in Italy. *Crop Protection* 25, 1244-1252.

Muyzer G., De Waal E.C. & Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.

宮丸直子 (2012) 沖縄県の低生産性土壌改良における土壌微生物性の評価。博士論文。

N

中園和年、鶴町昌市&照屋林宏（1984）沖縄の野菜栽培における線虫調査。九州病害虫研究会報、30、126-128。

農林水産省（2016）2050年における世界の食料需給見通しー世界の超長期分析モデルを用いた世界の超長期食料需給予測システム構築等分析結果報告書（ベースライン予測結果）（http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_zyukyu_mitosi/pdf/base_line_japanese.pdf）（2016年2月9日ダウンロード）

日本植物防疫協会（1993）農薬を使用しないで栽培した場合の病害虫等の被害に関する調査報告

（<http://www.jppa.or.jp/test/houkokusho.html>）（2016年2月22日ダウンロード）

日本植物防疫協会（2008）病害虫と雑草による農作物の損失。pp. 25-27。

農林水産省（2016）平成27年度 農林水産情報交流ネットワーク事業 全国調査 有機農業を含む環境に配慮した農産物に関する意識・意向調査（http://www.maff.go.jp/j/finding/mind/pdf/yuuki_27.pdf）（2016年5月12日ダウンロード）

Nishimura N. (2004) Suppression of root rot of butter-head lettuce by soil fumigation and biological control. *International Symposium on Identification and Use of Microbial Resources for Sustainable Agriculture*, 162-163.

農林水産省（2015）作物統計（花き）ー花き生産出荷統計（<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001139362>）（2016年5月20日ダウンロード）

永美大志、前島文夫、西垣良夫&夏川周介（2015）農薬中毒臨床例全

国調査 2010～2012 年度。日本農村医学界雑誌、64、14-22。

中田菜々子、横山とも子、牛尾進吾、永沢朋子&吉田重信（2015）リアルタイム PCR による土壌からのウリ類ホモプシス根腐病菌高感度定量のための土壌 DNA 抽出法の改良。日本植物病理学会報、81、194-203。

新村昭憲（2000）ネギ根腐萎凋病の病因と対策（土壌伝染病談話会レポート(第 20 回土壌伝染病談話会講演要旨) -- (第 3 部 現場で問題となっている土壌病害とその対策)。PSJ soilborne disease workshop report、20、133-143。

農林水産省（2015）特定作物統計調査 平成 27 年度産コンニャクいもの栽培・収穫面積および収穫量
(http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokutei_sakumotu/)（2016 年 5 月 30 日ダウンロード）

Naganawa T., Kyuma K., Moriyama Y., Yamamoto H. & Tatsuyama K. (1990) Changes of soil respiration after partial sterilization by autoclaving or addition of agrochemicals. *Soil Science and Plant Nutrition* 36, 587-591.

農薬要覧 2014 年版（2015）日本植物防疫協会

O

Oerke E.C., Dehne H.W., Schonbeck F. & Weber A. (1994). “Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and chash crops.” Elsevier, Amsterdam.

荻原勲（2006）図説園芸学。朝倉書店、pp. 38-40&182-184。

小川奎（1998）講座 微生物段階の土づくり－4 土壌病害をどう防ぐか。農山漁村文化協会、pp. 24-25。

Ogram A., Sayler G.S., Gustin D. & Lewis R.J. (1988) DNA adsorption to soils and sediments. *Environmental Science & Technology* 22, 982-984.

大嵩洋子&若梅均 (2006) 千葉県長生地域におけるトマトでの熱水土壤消毒技術普及の取り組み。Proceedings of vegetable and tea science、3、1-6。

Ogbuji, R.O. (1981) Soil depth distribution of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) from two farmlands in a humid tropical environment. *GeoJournal* 5, 79-80.

P

Patrick Q., Fabrice D. & Patrick T. (1995). Host status of some weeds to *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Helicotylenchus* spp. and *Rotylenchulus reniformis* associated with vegetables cultivated in Polytunnels in Martinique. *Nematropica* 25 149-157.

Perry, R. N., Mones, M. and Starr, J. L. (2009) Root-knot nematodes. CABI, Wallingford, 277 pp.

Q

Qin R., Gao S., Ajwa H. & Hanson B.D. (2016) Effect of application rate on fumigant degradation in five agricultural soils. *Science of the Total Environment* 541, 528-534.

R

Racke K.D. & Coats J.R. (1988) Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: Specificity of enhanced micro-bial degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 193–198.

Read DC. 1987. Greatly accelerated microbial degradation of aldicarb in re-treated field soil, in flooded soil, and in water. *Journal of Economic Entomology*, 180, 156–163.

Ross D.J., Tat K.R., Cairins A. & Meyrick K.F. (1980) Influence of storage on soil microbial biomass estimated by three biochemical procedures. *Soil Biology & Biochemistry* 12, 369-374.

Rotthauwe J.H., Wilzel K.P. & Liesack W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4704-4712.

Romine M. & Baker R. (1973) Soil fungistasis: evidence for an inhibitory factor. *Phytopathology* 63, 756-759.

S

Sato E., Min Y.Y., Shirakashi T., Wada S. & Toyota K. (2007). Detection of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans* (Cobb), in a nematode community using real-time PCR. *Nematological Research* 37, 87-92.

Sato, E., Goto, K., Min, Y.Y., Toyota, K. & Suzuki, C. (2010). Quantitative detection of *Pratylenchus penetrans* from soil using soil compaction and real-time PCR. *Nematological Research* 40, 1-6.

Sato, E., Suga, Y., Kisaki, C., Toyota, K., Miyake, K., Takada, A., Takeuchi, K. & Matsuura, R. (2011). Quantification of *Pratylenchus penetrans* in radish fields using a combination method of soil compaction and real-time PCR to determine the economic threshold. *Soil Science and Plant Nutrition* 57, 213-220.

Suett D.L. & Jukes A.A. (1988) Accelerated degradation of aldicarb and its oxidation products in previously treated soils. *Crop Protection*, 7, 147-152

宍戸雅宏 & 竹内妙子 (2005) スイカ急性萎凋病に対するアンケート調査の分析と防除対策。 *植物防疫*、59、66-68。

Sato, E., Okumura, I., Kokatsu, Y. and Toyota, K. (2013) Effects of the density of root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*), soil chemical and microbial properties on the damage to Japanese radish. *Nematology* 15, 931-938.

佐々木壮 (1968) 土壤水分とクロルピクリンの薬効範囲。 *Kyushu Pl. Prot. Res.* 14, 88-90.

Sato E., Min Y.Y., Toyota K. & Takada A. (2009) Relationships between the damage to radish caused by the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*, its density prior to cultivation and the soil nematode community structure evaluated by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Plant Nutrition* 55, 478-484.

佐藤恵利華 & 豊田剛己 (2013) リアルタイム定量 PCR による土壤微生物の特異的・定量的検出。 *土と微生物* 67, 26-31.

佐野善一 (1988) 夏播きニンジンにおけるサツマイモネコブセンチュウの密度と被害。 *九州病虫研究会報* 34、127-130。

T

Taheri, Z.M., Maafi, Z.T., Subbotin, S.A., Pourjam, E. & Eskandari, A. (2013). Molecular and phylogenetic studies on Pratylenchidae from Iran with additional data on *Pratylenchus delattrei*, *Pratylenchoides alkani* and two unknown species of

Hirschmanniella and *Pratylenchus*. *Nematology* 15, 633-651.

Toyota, K., Shirakashi, T., Sato, E., Wada, S. & Min, Y.Y. (2008) Development of a real-time PCR method for the potato-cyst nematode *Globodera rostochiensis* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Soil Science and Plant Nutrition* 54, 72-76.

Toyota K., Ritz K. & Young I.M. (1996) Microbiological factors affecting the colonisation of soil aggregates by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphanin*. *Soil Biology & Biochemistry* 28, 1513-1521.

Toyota, K., Ritz, K., Kuninaga, S. & Kimura, M. (1999). Impact of fumigation with metam sodium upon soil microbial community structure in two Japanese soils. *Soil Science and Plant Nutrition* 45, 207-223.

豊田剛己 (2012) メタゲノム線虫診断の導入による殺線虫剤使用量の30%削減 成果報告書—抜粋版— 線虫診断・防除マニュアル。

Triky-Dotan S., Austerweil M., Steiner B., Peretz-Alon Y., Katan J. & Gamliel A. (2007) Generation and Dissipation of Methyl Isothiocyanate in Soils Following Metam Sodium Fumigation: Impact on Verticillium Control and Potato Yield. *Plant disease* 91, 497-503.

Triky-Dotan S. & Ajwa H.A. (2013) Dissipation of soil fumigants from soil following repeated applications. *Pest Management of science* 70, 440-447.

U

植松清次、松本幹男、杉田恒雄&小野木静夫 (1982) クルミネグサレセンチュウの発生とイチゴの連作年数および土壌消毒との関係。関東

東山病害虫研究報、29、176-177。

Uesugi, K., Iwahori, H. & Tateishi, Y. (2009). Distribution of three *Pratylenchus* species in chrysanthemum fields in the Kyushu-Okinawa region of southern Japan, with notes on their identification based on PCR-RFLP analysis. *Nematological Research* 39, 17-22.

Uesugi, K., Sumitomo, K., Iwahori, H. & Tateishi, Y. (2011). Host suitability of 6 chrysanthemum cultivars and 22 crop species for *Pratylenchus kumamotoensis*. *Nematological Research* 41, 23-25.

Uesugi, K., Iwahori, H. & Tateishi, Y. (2012). Pathogenicity of *Pratylenchus pseudocoffeae* in chrysanthemum and its reproduction on 23 crops. *Nematological Research* 42, 31-34.

牛尾進吾、町田剛史&竹内妙子（2010）キュウリ幼苗検定法によるスイカホモプシス根腐病菌汚染土壌の診断。千葉県農林総合研究センター研究報告、2、65-69。

浦嶋泰文、中嶋美幸、金田哲&村上敏文（2007）市販キットを用いたATP測定による簡易な土壌バイオマス評価法の開発。Journal of the science of soil and manure, Japan、78、187-190。

埋橋志穂美（2010）農業関連微生物 第8回 *Pythium* 属の新たな分類システム。日本微生物資源学会誌 26、19-27。

V

Villenave, C. & Cadet, P. (1998). Interactions of *Helicotylenchus dihystra*, *Pratylenchus pseudopratensis*, and *Tylenchorhynchus gladiolatus* on two plants from the Soudano Sahelian zone of West Africa. *Nematropica* 28, 31-39.

Vilgalys R. & Hester M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172:4238–4246

W

World Population Prospects: 2015 Revision

(<http://www.un.org/en/development/desa/population/>、2016年2月5日ダウンロード)

和田さと子、豊田剛己、大橋真理子、柳井洋介 (2005) 土壌機能と微生物多様性。土と微生物、59、91-97。

渡邊健、諏訪順子&米山一海 (2002) カーバム系薬剤の土壌消毒跡地におけるハクサイ黄化病発病抑止効果。関東東山病害虫研究会報、49、31-34。

Watanabe, T., Masumura, H., Kioka, Y., Noguchi, K., Min, Y. Y., Murakami, R. and Toyota, K. (2013) Development of a direct quantitative detection method for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in andosol and analysis of relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and yield of eggplant. *Nematological Research* 43, 21-30.

White T.J., Bruns T.D., Lee S. & Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego, California: Academic Press. p. 315-322.

Welsh C.E., Guertal E.A. & Wood C.W. (1998) Effects of soil fumigation and N source on soil inorganic N and tomato growth. *Nutrient Cycle Agroecosyst* 52, 37-44.

X

Xie H., Yan D., Mao L., Wang Q., Li Y., Ouyang C., Guo M. & Cao A. (2015) Evaluation of Methyl Bromide Alternatives Efficacy against Soil-Borne Pathogens, Nematodes and Soil Microbial Community. PLOS ONE, 10. doi:10.1371/journal.pone.0117980

Y

山田英一&高倉重義（1995）北海道の農耕地におけるネグサレセンチュウの種類とその分布 第2報 分布ならびに各種作物収穫期前後の線虫密度。北海道立農業試験場集報、69、19-29。

Yan G. & Smiley R.W. (2008). Detection and Discrimination of *Pratylenchus neglectus* and *P. thornei* in DNA Extracts from Soil. Plant disease 92, 1480-1487.

Yan, G., Smiley R.W. & Okubara, P.A. (2012). Detection and quantification of *Pratylenchus thornei* in DNA extracted from soil using real-time PCR. *Phytopathology* 102, 14-22.

Yan G., Smiley R.W., Okubara P.A., Skantar A.M. & Reardon C.L. (2013) Developing a real-time PCR assay for detection and quantification of *Pratylenchus neglectus* in soil. Plant Disease 97, 757-764.

横山とも子&大木浩（2013）千葉県における低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒の取り組み。植物防疫、76、205-209。

Z

Zhou J., Bruns M.A. & Tiedje J.M. (1996) DNA recovery from soil of diverse composition. Applied and environmental microbiology, 62, 316-322.