

(様式 1 1)

論文審査の要旨 (課程博士)

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主 査 豊田 剛己



副 査 橋本 洋平



副 査 佐藤 令一



副 査 梶田 真也



副 査 有江 力



学位申請者	循環生産システム学専修 平成 25 年度入学 学籍番号 13701392 氏 名 兒山 裕貴
申請学位	博士 (農学)
論文題目	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 Development of a soil diagnostic method of soil-borne pathogens using real-time PCR and risk assessment in their population explosion after fumigation
<p>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。不必要な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ことを目的とした。</p> <p>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 <i>Pratylenchus</i> 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 <i>P. pseudocoffeae</i> および <i>P. kumamotoensis</i> の特異的プライマーを設計した。<i>P. penetrans</i> のプライマー (Sato et al., 2007) も合わせて、3 種の <i>Pratylenchus</i> 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 <i>Pratylenchus</i> 属の密度を測定した。その結果、<i>P. penetrans</i> は 18 サンプルから 4~1553 頭/20 g 乾土の範囲で、<i>P. kumamotoensis</i> は 1 サンプルから 53 頭/20 g 乾土検出された。<i>P. pseudocoffeae</i> 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 <i>Pratylenchus</i> 属を定量する手法を開発することが出来た。</p> <p>次にサツマイモネコブセンチュウ <i>Meloidogyne incognita</i> 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</p>	

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、常にクロロピクリン(CP)のような強力な土壌くん蒸剤に頼るのではなく、カーバムナトリウム塩(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 含量の減少は一般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。

上記からなる本論文の研究成果は、博士(農学)に十分値すると判断する。