



Title	植物寄生性線虫の診断技術に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	串田, 篤彦
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11998号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60162
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Atsuhiko_Kushida_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

氏 名 串 田 篤 彦

審査担当者 主 査 教 授
副 査 教 授
副 査 講 師

近 藤 則 夫
増 田 税
秋 野 聖 之

学 位 論 文 題 名

植物寄生性線虫の診断技術に関する研究

本論文は図 40、表 14 を含み、6 章からなる総頁数 124 の論文であり、別に参考論文 1 編が添えられている。

ネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウは、多くの畑作物の根に寄生してその生育を阻害し、収穫物の外観形質の劣化や奇形を発生させるため、大きな減収被害を引き起こし、各地で問題となっている。国内の畑地に分布する 9 種のネグサレセンチュウと 4 種のネコブセンチュウに対する効率的対策には、個々の圃場における発生種や発生密度の情報が不可欠である。本研究は、国内の畑地に発生する両センチュウ対象種の一斉検出および識別法の開発を目的としたものである。その内容は、次のようにまとめられる。

1. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法を応用したネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウの網羅的診断技術

18S-rRNA 遺伝子領域において、SSU18A をフォワードプライマーとし、対象種に高い特異性を持つ 4 種のリバースプライマー SNem (SNem-1、SNem-2、SNem-3 および SNem-4) に GC クランプを付加して PCR 増幅 (アニーリング温度 54℃、35 サイクル) した場合、DGGE ゲル上で最も明瞭なバンド形成が認められた。各対象種のメインバンド位置が異なり、最も高い識別性が得られた DGGE 条件は、変性剤濃度勾配 25-41%ゲルの使用、70V 定電圧 17 時間の泳動であり、この条件でアレナリアネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウの 3 種を除き、対象種のバンド位置が明瞭に異なることが明らかにされた。人為的に作製した線虫群集モデルや各地の畑から分離した線虫群集を用いた検証結果から、本法は対象種を高感度に検出でき、その種を同時に識別できることが確認された。

2. Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) 法を応用したネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウの網羅的診断技術

rDNA-ITS 領域において PNem-F をフォワードプライマーとし、対象種に高い特異性を持つ 2 種のリバースプライマー PNem-R (PNem-R1 および PNem-R2) が設計された。これらのプライマーによるアレナリアネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウの 3 種を除く各対象種の PCR 増幅 DNA (アニーリング温度 56℃、30 サイクル) は、15%T(ポリアクリルアミド/ビス濃度)ゲルの使用、150V 定電圧 250~270 分の泳動条件の PAGE で分離が良好であった。線虫群集モデルおよび多数の地域線虫群集を用いた検証の結果、高感度、高精度に発生種を把握できることが確認された。検出感度やバンドの識別性は、本法の方が DGGE を応用した手法に比べやや優れると評価された。

3. PAGE バンド輝度評価に基づく個体数簡易推定法の開発

キタネグサレセンチュウを材料とし、PAGE のバンド輝度からその個体数を推定する手法が検討された。大きさが極めて異なるキタネグサレセンチュウの2期幼虫と雌成虫（体長で約2.5倍、体幅で約2倍）のDNA量比較から、雌成虫のDNA量は2期幼虫のおよそ1.4倍であることが明らかにされた。このことから、様々な発育ステージが混在するネグサレセンチュウ群集においてもDNA量から個体数を推定することに妥当性はあると考えられた。キタネグサレセンチュウの個体数とそのバンド輝度は、一般圃場に見られる密度範囲で相関し、25サイクルのPCR産物を8 μ l泳動する条件で、最も広い密度範囲（1～200頭）のサンプルが定量できることが明らかにされた。10頭及び100頭に相当する密度マーカー用DNAを作製し、これをサンプルと同時にPCRと電気泳動を行うことで輝度を比較することにより、簡易にその密度レベル（低：1～10頭、中：10～100頭、高：100頭以上）が判別された。また、要防除密度に相当する密度マーカーを用いることにより、防除の要否が簡易に判定することが可能になると考えられた。適切なPCR条件の設定を基礎としたバンド輝度による個体数推定技術は、簡易に線虫密度を把握できる手法として有用性があるものと評価された。

以上より、国内の畑地に発生するネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウの複数種を簡易な一工程で高感度検出、判別する技術の開発は、農業現場での植物寄生性線虫による被害制御に寄与し、この開発過程で明らかになった遺伝型情報は近縁種の分類の基礎として利用できる成果であり、これらは応用上および学術上高く評価できる。よって審査員一同は、串田篤彦が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。