

2013年度(平成25年度)九州沖縄農業試験研究の成果情報 (成果情報名をクリックすると成果の詳細にジャンプします。)

生産環境推進部会

- | | |
|---|----------------|
| 1 露地野菜等に対する土壌の可給態リン酸含量に応じたリン酸施肥基準 | 鹿児島県農業開発総合センター |
| 2 安価な小型データロガーを用いた土壌酸化還元電位の自動経時計測方法 | 九州沖縄農業研究センター |
| 3 モリブデン化合物とベンガラを用いた水稲湛水直播のための種子被覆法 | 九州沖縄農業研究センター |
| 4 土壌の可給態リン酸含量が秋まきニンジンの収量、外観品質に及ぼす影響 | 鹿児島県農業開発総合センター |
| 5 圃場における大腸菌群数把握のための土壌サンプリング方法 | 宮崎県総合農業試験場 |
| 6 ITSプライマーを用いたPCR法により土壌繊毛虫を簡便・高感度に検出できる | 九州沖縄農業研究センター |

[成果情報名] 露地野菜等に対する土壌の可給態リン酸含量に応じたリン酸施肥基準

[要約] 黒ボク土畑の露地野菜等に対する土壌の可給態リン酸含量（トルオーグ法）に応じたリン酸施肥量の基準を設定した。可給態リン酸含量が 50mg/100g 乾土を超える場合は無施肥、30～50mg/100g 乾土では 50%減肥が可能である。

[キーワード] 可給態リン酸、土壌診断、水溶性リン酸、減肥基準、黒ボク土

[担当] 生産環境部土壌環境研究室

[代表連絡先] 電話 099-245-1156

[研究所名] 鹿児島県農業開発総合センター

[分類] 普及成果情報

[背景・ねらい]

農産物価格が低迷するなか、近年の肥料価格の高騰は生産コストを高くする一因になっている。この対策として、土壌に蓄積した養分を土壌診断によって適正に評価し、養分状態に応じた施肥を行うことが重要である。特に、露地野菜畑ではトルオーグリン酸含量が増加傾向にあり、4割程度が 50mg/100g 乾土を超過しているため、減肥基準の策定が急務である。そこで、リン酸の多少が生育、収量に影響しやすい秋冬作の中から、植付け方法や根群域が異なる葉茎菜類のハクサイ、根菜類のニンジン、春夏作からイモ類のカンショを代表作物に選定し、可給態リン酸含量とリン酸施肥の違いが収量に及ぼす影響を調査し、土壌の可給態リン酸含量レベルに応じた、統一的なリン酸施肥基準を設定する。

[成果の内容・特徴]

1. 可給態リン酸含量が概ね 50mg/100g 乾土以上では、ハクサイ、ニンジン、原料用カンショとも収量が定常状態になり、リン酸施肥による増収効果がないため無リン酸栽培でも目標収量の達成が可能である（図 1～3）。
2. 可給態リン酸含量が概ね 50mg/100g 乾土以下において、秋冬作のハクサイ、ニンジンでは可給態リン酸含量の違いが収量に大きく影響する。一方、春夏作の原料用カンショでは可給態リン酸含量の違いが収量に及ぼす影響は小さい（図 1～3）。
3. 可給態リン酸含量 10mg/100g 乾土以下では、ハクサイおよびニンジンの収量の低下が大きく、特に、ニンジンは基準量のリン酸を施肥しても十分な収量が得られないため、リン酸質資材の施用による土づくりが必要である（図 1、2）。
4. 可給態リン酸含量 30～50mg/100g 乾土の場合、水溶性リン酸量は 5～8 kg/10a と推定される。露地野菜でリン酸吸収量が 10kg/10a を超える品目は殆どなく、リン酸吸収量の半分以上が土壌から供給されるため、50%のリン酸減肥が可能である（表 1）。
5. 以上の結果から、土壌診断結果による可給態リン酸含量に応じたリン酸施肥基準を表 1 のように設定する。

[普及のための参考情報]

1. 土壌診断処方箋を作成する場合等、施肥指導に活用する。
2. 鹿児島県内の露地野菜畑における可給態リン酸含量の平均値は約 65mg/100g 乾土で、10mg/100g 乾土未満が 2割、10～30mg/100g 乾土が 3割、30～50mg/100g 乾土が 1割、50mg/100g 乾土以上が 4割程度である。
3. 本成果で示したリン酸施肥基準は、牛ふん堆肥施用を前提（ハクサイ、ニンジンは 2 t/10a、原料用カンショは 1 t/10a）として設定している。
4. 水溶性リン酸は作物に容易に吸収される形態のリン酸である。トルオーグリン酸含量から水溶性リン酸を推定する方法は（2011年度 研究成果情報「黒ボク土における可給態リン酸含量に対応したハクサイのリン酸施肥」）を参考にする。

[具体的データ]

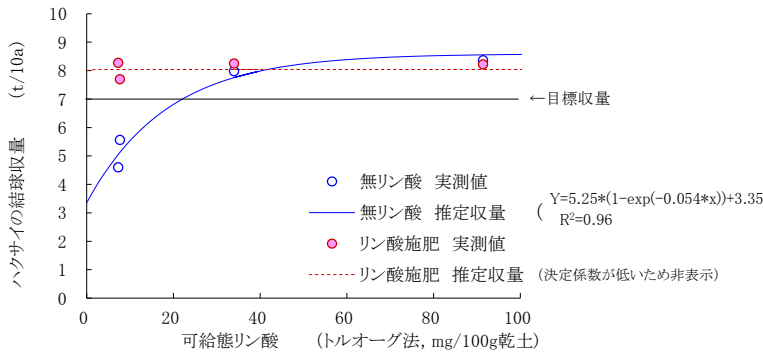


図1 可給態リン酸含量とハクサイ結球収量との関係

(耕種概要)
 試験年度: 2010~2011
 試験場所: 農業開発総合センター
 リン酸吸収係数: 1,860
 供試品種: 黄楽90
 定植: 10月中旬
 収穫: 1月下旬
 栽植密度: 4,167株/10a
 施肥区のリン酸施肥量: 20kg/10a
 目標収量 7t/10aでのリン酸吸収量:
 8kg/10a (結球4.5kg+外葉3.5kg)

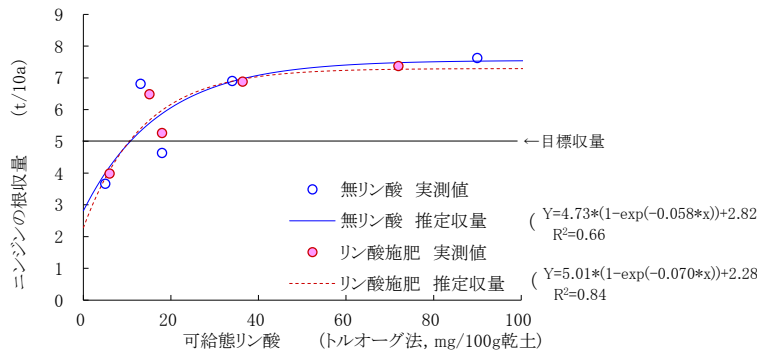


図2 可給態リン酸含量とニンジン根収量との関係

(耕種概要)
 試験年度: 2011~2012
 試験場所: 農業開発総合センター
 リン酸吸収係数: 1,860
 供試品種: ベータ312
 は種: 9月中旬
 収穫: 1月中旬
 栽植密度: 46,800株/10a
 施肥区のリン酸施肥量: 23kg/10a
 目標収量 5t/10aでのリン酸吸収量:
 4kg/10a (葉1.0kg+根3.0kg)

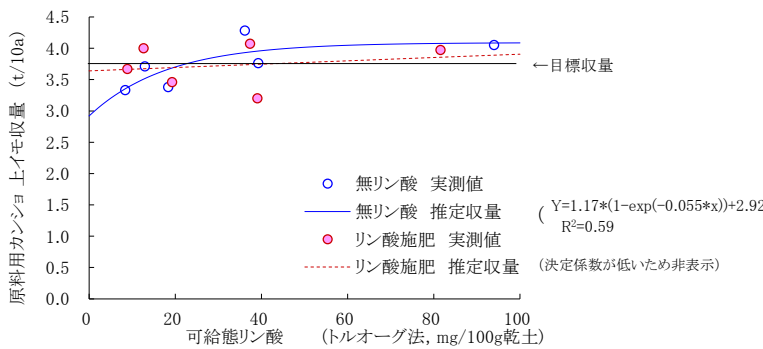


図3 可給態リン酸含量と原料用カンショの上イモ収量との関係

(耕種概要)
 試験年度: 2011~2012
 試験場所: 農開センター 大隅支場
 リン酸吸収係数: 2,400
 供試品種: シロユタカ
 植付け: 6月上旬
 収穫: 10月中旬
 栽植密度: 357株/a
 施肥区のリン酸施肥量: 12kg/10a
 目標収量 3.8t/10aでのリン酸吸収量:
 6kg/10a (茎葉2.0kg+イモ4.0kg)

表1 土壌の可給態リン酸含量に応じたリン酸施肥基準

可給態リン酸含量 (mg/100g乾土)	~10	10~30	30~50	50~
リン酸施肥量 注1, 2) (%)	100% 注3)	100%	50% 注2,4)	無リン酸
水溶性リン酸推定量 (kg/10a) 注4)	~2	2~5	5~8	8~

- 注) 1. 牛ふん堆肥施用を前提とした基準である
 2. 地域のリン酸施肥基準量に対する比率とする
 3. リン酸質資材を施用して、可給態リン酸含量を10mg/100g乾土まで改良したうえで施肥する
 4. 水溶性リン酸がトルオーグリン酸の16%程度であることを考慮して設定した

(上 藺 一 郎)

[その他]

研究課題名: 環境と調和した栽培技術確立事業

予算区分: 委託

研究期間: 2010~2013 年度

研究担当者: 上藺一郎、長友誠、森清文、有村恭平、脇門英美、時村金愛、餅田利之、井上健一、西裕之、三浦伸之、古江広治

[成果情報名]安価な小型データロガーを用いた土壌酸化還元電位の自動経時計測方法

[要約]安価な小型データロガーを利用して、土壌の酸化還元電位を自動で経時的に計測できる。回路のインピーダンスを 100MΩ 以上、一計測を 0.5 秒間とし、それ以外の待機時間は回路を遮断し、1 時間間隔で白金電極と比較電極の間の電位差を計測する。

[キーワード]酸化還元電位、安価、自動経時計測、水田、畑地

[担当]新世代水田輪作・暖地水田輪作

[代表連絡先]q_info@ml.affrc.go.jp、FAX：096-242-7769、TEL：096-242-7682

[研究所名]九州沖縄農業研究センター・水田作・園芸研究領域

[分類]普及成果情報

[背景・ねらい]

水田において、土壌が湛水されると、酸素が消失し、さらに硝酸イオン、マンガン、鉄などが還元され、やがてメタンや硫化物が生成する。酸化還元電位 (Eh) の測定は、このような化学反応が起きうる条件になっているかを把握するために有効な方法であり、水稲に害を及ぼす硫化物の生成や、温暖化を促進するメタンの発生などを評価できる。これまで、酸化還元電位を自動で経時的に計測するには、高価なデータロガーや制御装置を用いて配線を組む必要があり、利用が限られていた。したがって、手動で計測することが一般的となり、経時的な計測には手間がかかった。近年、安価な小型データロガーが販売されたため、これを用いて安価に酸化還元電位を自動で経時的に計測する方法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 白金電極と比較電極の間の電位差を小型データロガーで計測する。その際、計測時の電位消耗がほとんどないように、回路のインピーダンスを 100MΩ 以上とし、計測時以外の待機時間は回路を遮断する電池駆動式の基板を経由させる (図 1)。
2. 電位を消耗しないように、1 回の測定時間を 0.5 秒とし、計測間隔を 1 時間とすると、市販の計器で手動計測した値とほぼ同じ値が、本法の自動計測で得られる (図 2)。
3. 作成した装置の仕様は、計測範囲が酸化還元電位として -1.09~1.51V、分解能が 0.26mV、屋外に設置でき、記録データ数が 60,000 (1 時間間隔で 2,500 日分) で、電池消耗の目安は 2 年間で、水稲や麦類の一作を超える十分な期間の計測値が記録できる。
4. 水田の作土の酸化還元電位の推移を自動計測できる。一例として、水田で湛水直播した際の、種子が無い部分の土壌と種子近傍の土壌の酸化還元電位の推移を計測した結果、両者の差異と、数日で酸化還元電位が低下する傾向と、日変動が観察できた (図 3)。
5. 畑地の作土の酸化還元電位の推移を自動計測できる。一例として、大麦畑の作土を計測した結果、降雨によって酸化還元電位が低下する現象が観察できた (図 4)。

[普及のための参考情報]

1. 普及対象：農業関係の試験研究関係者
2. 普及予定地域・普及予定面積・普及台数等：年に数十台
3. 本法は特許として登録されている。
4. 本特許を利用した計測装置が、藤原製作所から簡易土壌 Eh 計 (FV-702) として販売されている。1 台 (1ch) の価格は、電極を別として、3 万円ほどである。
5. 酸化還元電位は、局所的条件に影響を受けやすいので、複数台での計測が望ましい。比較電極は並列につなぐことによって、複数台で兼用できる。
6. 電極は、土壌と密着させ、長期間動かないように、支柱等で固定する。また、使用前後に、標準試薬を用いて酸化還元電位を計測し、電極の劣化が生じてないか確認する。

[具体的データ]

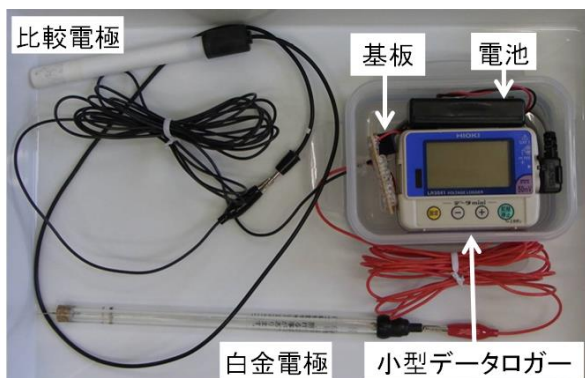


図1 本法の計測装置の構成

回路の開け閉めをする基板を付けて、白金電極(藤原製作所 EP-201型、¥7,000)と比較電極(藤原製作所 4400型、¥20,000)の電位差を小型データロガー(日置電気 LR5041、¥16,000)で計測する。基板には電池から電気を供給する。防水のため、小型データロガー等は密閉容器に入れる。

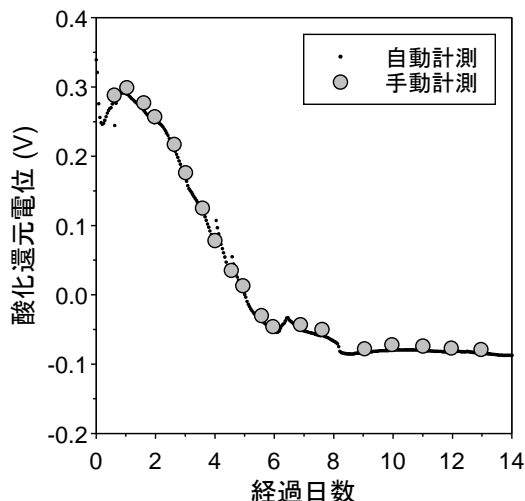


図2 自動計測と手動計測の比較

土壌を容器に詰めて湛水にしてから、本法を用いて1時間おきに土壌の酸化還元電位を自動計測した。また、数～十数時間おきに、市販の手動計測器を同じ電極につないで土壌の酸化還元電位を手動計測した。

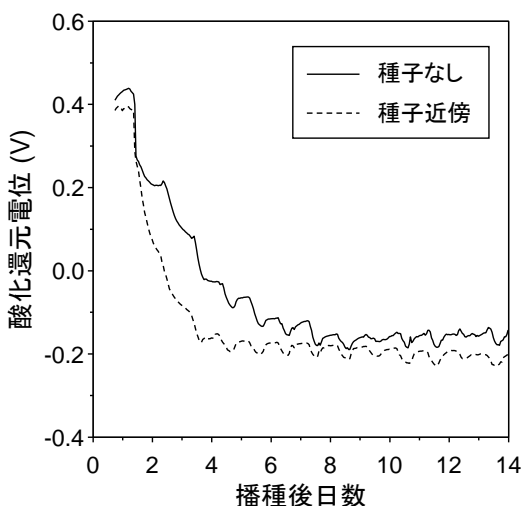


図3 水田の酸化還元電位の計測例

水田(2010年5月25日播種)において、種子近傍と種子がない場所の土壌の酸化還元電位を1時間おきに計測し、各6台の平均を示した。6台の値の標準誤差の平均は、種子なしが0.014V、種子近傍が0.009Vであった。

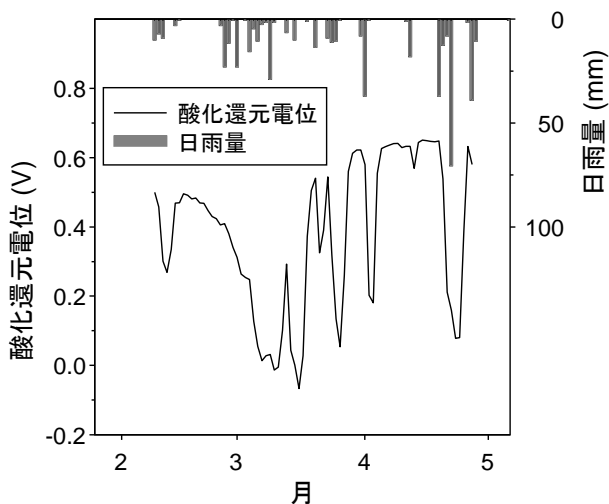


図4 大麦畑の酸化還元電位の計測例

大麦畑(2009年11月播種)で1時間おきに土壌の酸化還元電位を計測し、6台の平均の日平均を示した。6台の値の標準誤差の平均は0.049Vであった。

(原嘉隆)

[その他]

中課題名：新規直播技術を核とした安定多収水田輪作技術の開発

中課題番号：111b5

予算区分：交付金

研究期間：2009～2013年度

研究担当者：原嘉隆、土屋史紀

発表論文等：1)原嘉隆、土屋史紀「湿潤土壌の酸化還元電位を測定する測定装置、および湿潤土壌の酸化還元電位を測定する測定方法」特許第 5366274 号
2)Hara Y. (2013) Plant Prod. Sci. 16: 50-60, 61-68

[成果情報名]モリブデン化合物とべんがらを用いた水稲湛水直播のための種子被覆法

[要約]水稲湛水直播での硫酸塩に起因する苗立ち阻害はモリブデン化合物を種子に被覆すると軽減できる。耐水性ポリビニルアルコールを用いてべんがらを被覆した種子は流亡しにくくなる。両者を合わせた種子被覆は安価で簡易な苗立ち向上技術として利用できる。

[キーワード]水稲湛水直播、苗立ち、モリブデン、べんがら、ポリビニルアルコール

[担当]新世代水田輪作・暖地水田輪作

[代表連絡先]q_info@ml.affrc.go.jp、FAX：096-242-7769、TEL：096-242-7682

[研究所名]九州沖縄農業研究センター・水田作・園芸研究領域

[分類]研究成果情報

[背景・ねらい]

水稲作において直播は省力で安価な手段と期待されるが、湛水直播では苗立ち確保のために過酸化カルシウム剤の被覆が必要とされ、この被覆に労力と費用がかかる。また、より手間がかからない還元鉄被覆（鉄コーティング）も普及しているが、被覆時の発熱による種子への障害を回避する作業が手間であることや、土壌中に種子が埋没すると苗立ちが低下しやすいなどの課題もある。近年、種子近傍での硫化物の生成が苗立ち低下の一因であり、モリブデン酸塩によって硫化物の生成が抑制できることがわかった。そこで、モリブデン化合物と発熱しない酸化鉄を組み合わせた被覆法を検討する。

[成果の内容・特徴]

- 11kgN/10a 相当の硫酸を添加して湛水とした土壌中に水稲種子を播種すると苗立ち（生存）しないが、ポリビニルアルコール（PVA）を用いて微溶性のモリブデン化合物を種子に被覆して播種すると、苗立ち割合が向上する（図1）。安価な三酸化モリブデンでも十分な効果が得られる。
- 乾籾の0.1倍重のべんがら（酸化鉄の粉）に、べんがらに対する重量比が1%である耐水性PVA（ケン化度が97%程度のPVA）の粉を混ぜる。この混合粉を種子に湿らせながら粉衣すると、耐水性PVAが接着剤としてはたらき、種子の表面にべんがらの被覆層ができる。被覆層は乾けば耐水性になる。資材量は少ないので、被覆は簡易である。この被覆種子は、水に馴染んで沈みやすいため、播種時に種子が流亡しにくく、扱いやすい。
- 3~6kgN/10a 相当の硫酸を添加した土壌中に、べんがらと三酸化モリブデンと耐水性PVAを混合して被覆した種子を播種する場合、苗立ち割合が十分向上するために必要な三酸化モリブデンの量は乾籾1kgあたり0.03molMo程度である（図2）。
- 乾籾に対して、0.1倍重のべんがら、0.005倍重（0.035molMo/kg）の三酸化モリブデン、0.001倍重の耐水性PVAを混合し、水稲種子に被覆する「べんがらモリブデン被覆」は、1~10mmol/kgの硫酸塩（硫酸で3~30kgN/10a相当）を含む土壌において、苗立ち向上効果を有する（図3）。被覆に必要な資材費は、乾籾1kgあたり70円程度である。
- 硫酸を施用した水田において、溝切り点播で浅く土中に播種した場合、べんがらモリブデン被覆は、過酸化カルシウム剤被覆にも劣らない苗立ちが得られる（表1）。

[成果の活用面・留意点]

- 本法は、水稲湛水直播を安価で簡易に行う技術として活用できる。
- 本法は、還元鉄被覆と比較して、資材の被覆量が少なく、被覆層も柔らかいので、鳥害を受けやすい。このため、土壌表面ではなく土壌中に播種するのが望ましい。
- 本成果におけるモリブデン化合物の苗立ち向上効果は、硫化物の生成を抑制することによるため、硫化物の基である硫酸根が少ない土壌では顕在化しにくい。

[具体的データ]

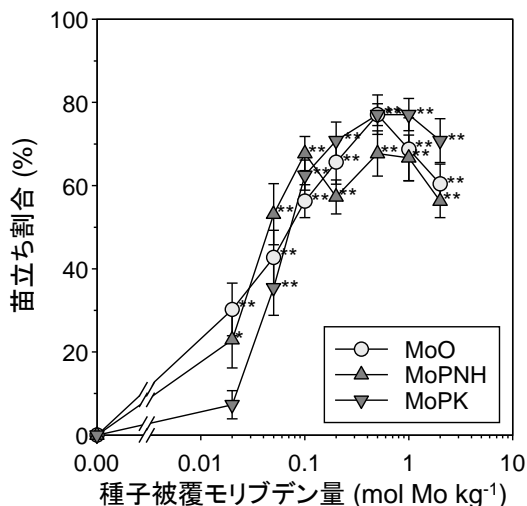


図1 硫酸添加土壌におけるモリブデン化合物の種子被覆が苗立ち割合に及ぼす影響

三酸化モリブデン(MoO)、リンモリブデン酸アンモニウム(MoPNH)、リンモリブデン酸カリウム(MoPK)を被覆。ポットに詰めた土壌に深さ15 mmで種子を播種。20°C定温、光点灯12h/dで、1ヶ月後の第3葉抽出を苗立ちとした。**, *は、無被覆に対する差が1, 5%水準で有意であることを示す。

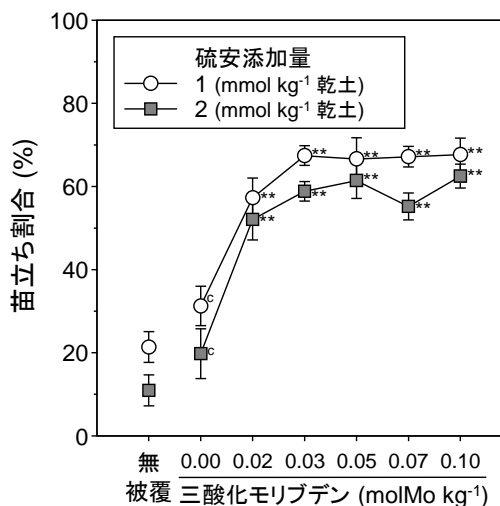


図2 硫酸添加土壌におけるべんがらと三酸化モリブデンの種子被覆が苗立ち割合に及ぼす影響

硫酸(硫酸アンモニウム)1, 2 mmol kg⁻¹(3, 6kgN/10a相当)を土壌に添加。図1と同様に土壌中に水稻種子を播種し、苗立ち割合を調べた。無被覆はべんがらも被覆していない。それ以外はべんがらを0.1倍重被覆。**, *は、モリブデン無⁰に対する差が1, 5%水準で有意であることを示す。

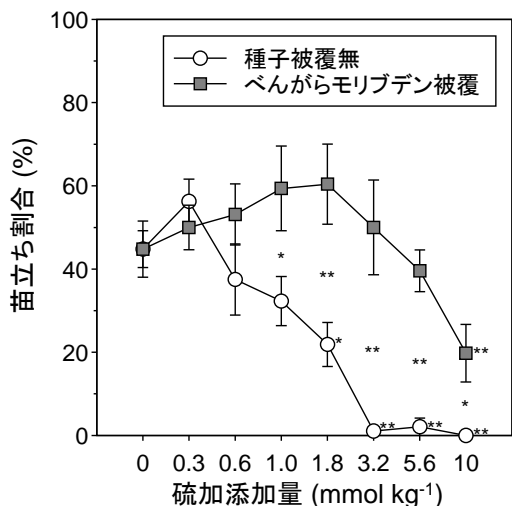


図3 べんがらモリブデン被覆と土壌への硫加添加が苗立ち割合に及ぼす影響

べんがらモリブデン被覆では、三酸化モリブデン0.035molを1kgの糶に被覆した。図1と同様に水稻種子を播種し、苗立ち割合を調べた。記号の近くの**, *は、硫加(硫酸カリウム)無添加に対して1, 5%水準で有意差があることを示す。同じ硫加添加量の記号の中間にある**, *は、処理間差が1, 5%水準で有意であることを示す。

表1 種子被覆が硫酸施用水田の苗立ちに及ぼす影響

種子被覆	苗立ち割合 (%)				平均
	圃場A		圃場B		
	湛水区	落水区	湛水区	落水区	
べんがら	47 b	56 b	55 a	64 b	55 b
べんがらモリブデン	60 a	64 a	65 a	74 a	66 a
過酸化カルシウム剤	60 a	68 a	56 a	55 b	60 b
還元鉄	27 c	30 c	31 b	43 c	33 c

異なる英文字は5%水準で有意差があることを示す。硫酸を4kgN/10a施用。溝切り点播(非覆土、溝は2cmほど)。2013年6月13日に播種した。湛水区は、播種後常時湛水した。落水区は、播種1週間後から1週間落水した。播種2週後に第1葉が抽出したものを苗立ちとした。

(原嘉隆)

[その他]

中課題名：新規直播技術を核とした安定多収水田輪作技術の開発

中課題番号：111b5

予算区分：交付金

研究期間：2009～2013 年度

研究担当者：原嘉隆

発表論文等：Hara (2013) Plant Prod. Sci. 16: 271-275

原嘉隆 (2013) 農業技術大系「作物編」追録 35 号第 2-①巻：技 402 の 1 の 2

[成果情報名] 土壌の可給態リン酸含量が秋まきニンジンの収量、外観品質に及ぼす影響

[要約] 秋まきニンジンでは、土壌の可給態リン酸含量（トルオーグ法）が高いほど根重が増加し、リン酸含有率が高まり、根色の明度、彩度値が大きくなる。これらにはリン酸肥沃度が大きく影響し、施肥リン酸の影響は小さい。

[キーワード] ニンジン、可給態リン酸、リン酸吸収量、根色、黒ボク土

[担当] 生産環境部 土壌環境研究室

[代表連絡先] 電話 099-245-1156

[研究所名] 鹿児島県農業開発総合センター

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

鹿児島県内ニンジン栽培畑における土壌の可給態リン酸含量の平均値は 61mg/100g 乾土で、約 4 割が 50mg/100g 乾土を超過している。このため、可給態リン酸含量に応じた効率的なリン酸施肥が望まれるが、可給態リン酸含量および施肥リン酸の違いがニンジンの根重や根色に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、リン酸肥沃度を調整した圃場において、施肥リン酸の有無がニンジンの収量、根色に及ぼす影響を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. 土壌の可給態リン酸含量を 5～80mg/100g 乾土に調整した黒ボク土畑において、秋まきニンジンの収量はリン酸施肥の有無（0 kg、23kg）に関わらず、可給態リン酸含量が多いほど増加し、50mg/100g 乾土程度で定常状態になる（図 1）。
2. 可給態リン酸含量が多いほど、ニンジンの総リン酸吸収量は増加する（図 2）。総リン酸吸収量が増加するとニンジンの収量が増加するが、リン酸施肥の有無がニンジンの収量に及ぼす影響は小さい（図 1）。
3. 可給態リン酸含量が増えるほどニンジンのリン酸含有率が高まり、根色の明度（L 値）、赤色（a 値）および彩度が高くなる。一方、リン酸施肥ではこれらに差がみられない（表 1）。
4. 以上の結果から、秋まきニンジンの収量、根色にはリン酸肥沃度が大きく影響し、施肥リン酸の影響は小さい。

[成果の活用面・留意点]

1. 本試験の土壌条件は、表層腐植質黒ボク土造成相(pH5.7、リン酸吸収係数 1860)である。
2. 試験圃場のリン酸肥沃度調整は、事前に重過リン酸石灰を施用することで調整した。

[具体的データ]

【試験概要】 供試品種： ベータ312
 栽植密度： (2011年) 畝幅150cm, 株間10cm, 条間15cm, 7条植え 46,700株/10a
 (2012年) 畝幅160cm, 株間8cm, 条間12cm, 6条植え 46,900株/10a
 耕種概要： (2011年) 基肥9月12日, 播種9月13日, 追肥10月14日, 収穫1月18日
 (2012年) 基肥9月12日, 播種9月19日, 追肥10月14日, 収穫1月29日
 施肥： N-P₂O₅-K₂O=18.4-23.0-18.4 (無リン酸区は18.4-0-18.4)
 ※リン酸の効果を明瞭にするため、堆肥無施用条件での試験結果である。

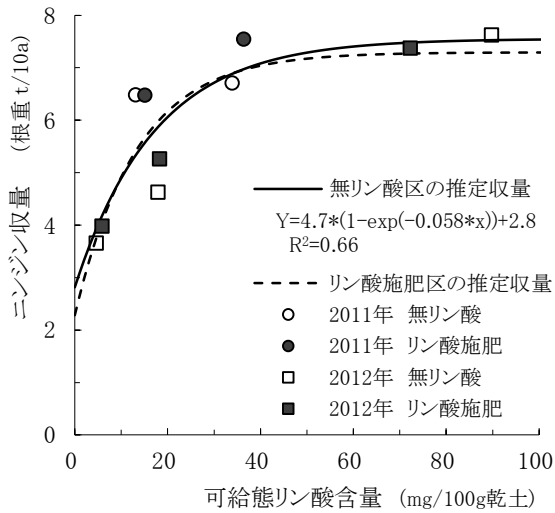


図1 可給態リン酸含量とニンジン収量の関係

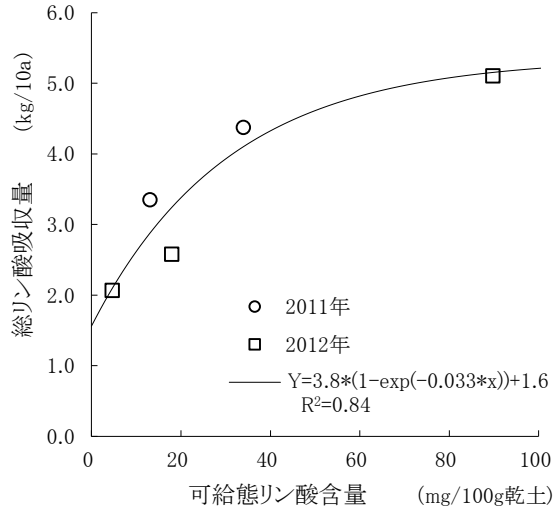


図2 無リン酸区における可給態リン酸含量と総リン酸吸収量との関係

表1 可給態リン酸含量およびリン酸施肥の違いとニンジン収量、根色の関係 (2012年)

可給態リン酸含量	リン酸施肥の有無	収量 (t/10a)		リン酸含有率 (乾物%)		根色 ^{注1)}			
		葉	根	葉	根	L* (明度)	a* (赤色)	b* (黄色)	$\sqrt{(a^2)+(b^2)}$ (彩度)
高P (81mg/100g乾土)	リン酸施肥	1.27	7.37	0.53	0.55	46.4	9.7	19.7	22.0
	無リン酸	1.28	7.62	0.52	0.58	46.4	10.0	20.2	22.5
中P (18mg/100g乾土)	リン酸施肥	0.74	5.26	0.48	0.48	44.9	8.3	18.7	20.5
	無リン酸	0.67	4.63	0.52	0.48	44.2	8.8	19.7	21.6
低P (5mg/100g乾土)	リン酸施肥	0.69	3.98	0.44	0.46	44.0	7.4	17.1	18.6
	無リン酸	0.58	3.66	0.45	0.47	42.3	7.5	16.9	18.5
分散分析 ^{注2)}	可給態リン酸	**	**	*	**	**	**	*	**
	リン酸施肥	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

注1) 調査機器: 同時測光方式 分光式色差計SQ-2000(日本電色工業株式会社)

2) 分散分析の結果, **は1%, *は5%水準で有意差あり, n.s.は有意差なし

(上 藺 一 郎)

[その他]

研究課題名：環境と調和した栽培技術確立事業
 予算区分：委託
 研究期間：2012～2013年度
 研究担当者：上藺一郎、長友誠、古江広治

[成果情報名] 圃場における大腸菌群数把握のための土壌サンプリング方法

[要約] 圃場における大腸菌群数を把握するための土壌サンプリングでは、1～6 cm の深さから、圃場内の四隅の4点、圃場を対角線で結んだ交点、交点と四隅の点との中間点の計9点を採取する。

[キーワード] 大腸菌群、土壌サンプリング

[担当] 土壌環境部

[代表連絡先] 電話 0985-73-2124

[研究所名] 宮崎県総合農業試験場

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

国内における生食用野菜の生産環境では、家畜由来の有機質資材を利用すること等により、圃場に食中毒菌が混入する可能性がある。これらの菌がどの程度圃場に存在するかを計測することは重要である。しかしながら、圃場からどのようにサンプリングをすべきかの知見は少ない。

そこで本研究では、牛ふん堆肥施用圃場において、食中毒菌の一種である大腸菌の近縁種として大腸菌群に注目し、圃場における平均値としての大腸菌群数把握のためのサンプリング方法を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. 圃場を25分割し、作土の上層(1～6 cm)、下層(8～13cm)に分けて大腸菌群数を分析しても、その平均値には有意な差は見られない(図1)。
2. 図1で得られた上層の大腸菌群数のデータからランダムに選択し、信頼区間を分析することにより、サンプリングの精度を確保するために必要なサンプル数をシミュレーションすると、10点以上のサンプルを分析しても飛躍的な精度の向上は見込めない(図2)。これらの結果は下層でも同様である(データ略)。
3. 図1で得られた25点の大腸菌群数のデータからランダムに9点抽出することを50回繰り返したところ、選定した9点(四隅の4点、圃場を対角線で結んだ交点、交点と四隅の点との中間点4点)の平均値の標準偏差の範囲内に収まる(図3、4)。
4. 土壌サンプリング用コア(100ml)を使用するとサンプリングが容易で、分析に必要な50g～100gを採取できる。

[成果の活用面・留意点]

1. 比較的生食に用いられることの多い葉果菜類の栽培畑(黒ボク土及び灰色低地土)で活用できる。
2. 本成果は、平成24年度成果情報「圃場における大腸菌群数を把握するための必要サンプル数」と合わせて、「圃場における大腸菌群数把握マニュアル」として活用できる。
3. 本研究では、0.3a～10a程度の圃場を用いたデータから解析を行っており、圃場の大きさが変わっても大腸菌群の分布傾向や必要サンプル数は変わらないため、本成果における1圃場とは一元管理している圃場とし、面積規模は特に限定していない。
4. 表層の乾燥等物理的要因を排除するために、一般的な土壌採取と同様に1 cm程度取り除いて採取する。採取直後に分析できない場合には、コアをビニールテープで密閉し5℃で保存、48時間以内に分析を完了する。
5. 検出方法は希釈平板法とし、Lennox寒天培地に発色基質(X-GAL)と大腸菌群以外の菌を抑えるための抗生物質(バンコマイシン)を加えたものを用いる。生土：生理食塩水＝1：4として20分間振とうし、混濁液を培地に塗布する。37℃で24時間培養し、コロニー数を計測する。

[具体的データ]

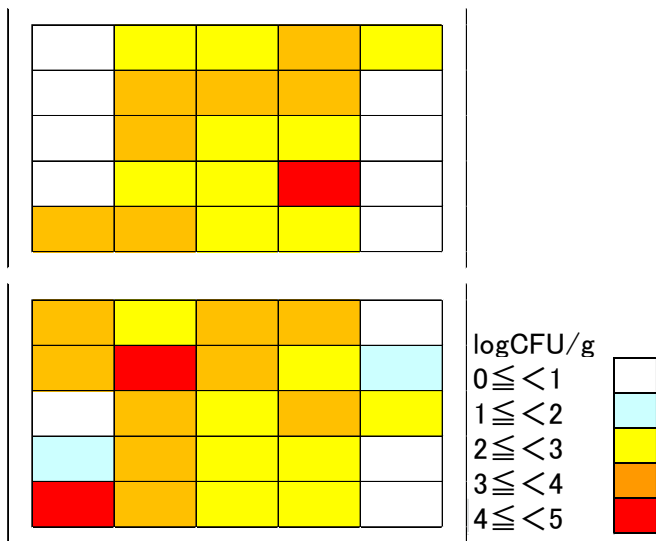


図1 大腸菌群の分布状況

※上段：上層の分布状況、下段：下層の分布状況

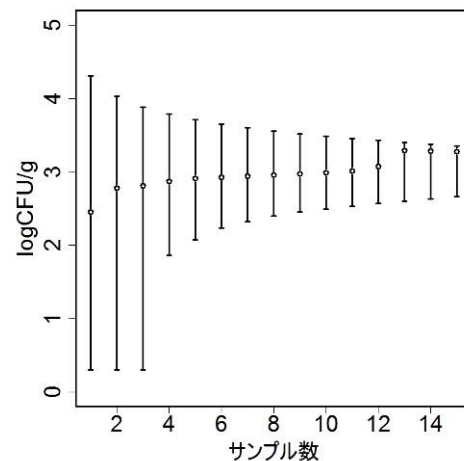


図2 サンプル数と信頼区間の推移

※エラーバーは95%信頼区間。

食総研にて分析。2011年10月

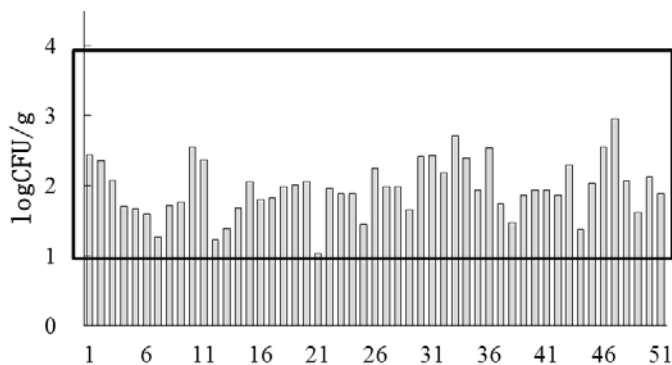


図3 ランダム抽出による平均値

※1：選定した9点による平均値

2～51：9点のランダム抽出による平均値の繰り返し

枠線：抽出した9点による標準偏差の範囲

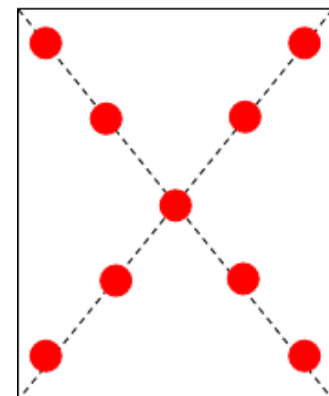


図4 サンプリング位置図

※一般的な対角線採土法を参考にしてサンプル数により改変。

(甲斐憲郎)

[その他]

研究課題名：生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発（生食用野菜）FV-4106

予算区分：生産工程プロジェクト

研究期間：2009～2012年度

研究担当者：甲斐憲郎、塚越芳樹（農研機構食総研）、木嶋伸行（農研機構野菜研）

発表論文等：プロジェクト成果シリーズ「第522集 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因のリスク低減技術の開発 [かび毒・病原微生物（第2編）]」

[成果情報名] ITS プライマーを用いた PCR 法により土壌繊毛虫を簡便・高感度に検出できる

[要約] 土壌の環境 DNA を鋳型として、繊毛虫の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域を標的としたプライマーを用いた PCR 法は、土壌中の繊毛虫を簡便・高感度に検出することができ、検鏡法よりも優れている。

[キーワード] 土壌繊毛虫、ITS 領域、PCR、プライマー、環境 DNA

[担当] 総合的土壌管理・土壌生物機能評価

[代表連絡先] q_info@ml.affrc.go.jp、FAX : 096-242-7769、TEL : 096-242-7682

[研究所名] 九州沖縄農業研究センター・生産環境研究領域

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

土壌繊毛虫は、細胞表面に繊毛を持った単細胞真核生物のグループであり、細菌等の摂食者として土壌生態系内の物質循環に関与していることから、生物指標としての利用が期待できる。土壌繊毛虫の検出は、主に顕微鏡下で形態によって行われているが、近縁種間で形態が極めて似ている場合が多く、属の区別さえ難しいことがある。しかも、顕微鏡下での繊毛虫の検出は、時間もかかり、作業も熟練を要する。そこで、土壌の環境 DNA を鋳型とし、ITS 領域を標的としたプライマーを用いた PCR 法を行い、繊毛虫の簡便な検出手順を確立する。

[成果の内容・特徴]




1. 畑地圃場（土壌 A、B）から、それぞれ 100 個体の繊毛虫を分離し、顕微鏡下での形態観察および 18S rDNA により種を同定した。その中から土壌 A 由来の *Diaxonella trimarginata* と *Holosticha manca*、土壌 B 由来の *Oxytricha lanceolata* を無作為に選抜し、ITS 領域塩基配列の種特異的な部分からプライマーを設計した（表 1）。
2. 設計したプライマーを用いて PCR を行うと、*D. trimarginata* では 467 bp、*H. manca* では 448 bp、*O. lanceolata* では 452 bp の PCR 産物が増幅される（図 1）。
3. 土壌 A と B から ISOIL for Beads Beating Kit (Nippon gene, Tokyo, Japan) を用いて環境 DNA を抽出し、土壌 A から単離された *D. trimarginata* と *H. manca* に特異的な ITS プライマーを用いて PCR を行うと、土壌 A の環境 DNA を鋳型とした場合、PCR 産物が増幅され、土壌 B の環境 DNA を鋳型にした場合は、増幅されない（図 2）。土壌 B から無作為に 100 個体の繊毛虫を顕微鏡下で単離・同定したときには、*D. trimarginata* と *H. manca* は検出されなかった。
4. 土壌 B から単離された *O. lanceolata* に特異的な ITS プライマーを用いて PCR を行うと、土壌 A と B どちらの環境 DNA を鋳型とした場合でも PCR 産物が増幅される（図 2）。PCR 産物は *O. lanceolata* の配列であることをシーケンスにより確認した。*O. lanceolata* は、土壌 A から無作為に 100 個体の繊毛虫を顕微鏡下で単離・同定したときには検出されなかったが、本検出法であれば検出される。従って、本検出法は検鏡法よりも検出感度が高く、優れている。

[成果の活用面・留意点]

1. 繊毛虫を生物指標として利用していくためには、多種多様な土壌を用いてデータを蓄積し、ある環境で特異的に存在する繊毛虫を特定してゆく必要がある。
2. 本検出法は、土壌環境の指標となる繊毛虫が特定された場合に、土壌診断を行う上での利用が期待できる。

[具体的データ]

表 1 設計したプライマー

標的繊維虫	プライマーの名称	プライマーの配列 (5'→3')	期待される産物長(bp)
<i>Diaxonella trimarginata</i> 	D. trima-ITS-F (Forward)	TAACACTAATCCAATCATTTAAACC	467
	D. trima-ITS-R (Reverse)	GCACTTGTGCAGATGAACTGCG	
<i>Holosticha manca</i> 	H.manca-ITS-F (Forward)	AGCCTTAAGTTGCAGCAAAAGAT	448
	H.manca-ITS-R (Reverse)	GGTCTAAGCACTTGTGCAGATG	
<i>Oxytricha lanceolata</i> 	O.lance-ITS-F (Forward)	ATCAACCTAAACCTAGCCTTCAG	452
	O.lance-ITS-R (Reverse)	AGTTTTAGTGTCTAAGCACTTGC	

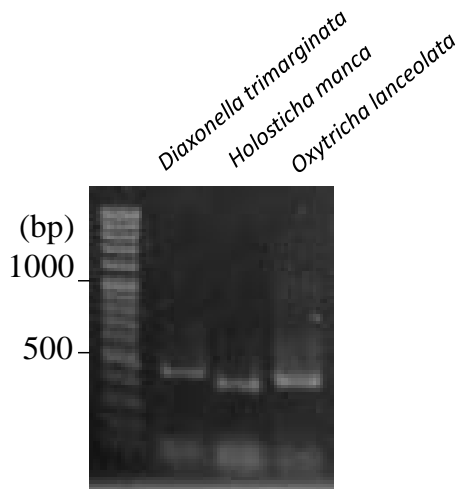


図 1 設計したプライマーによるそれぞれの土壌繊維虫種の PCR 産物の増幅

ファースト PCR は、SR1 および LSUR2 のプライマーセット (Takano and Horiguchi, 2005) を用いる。PCR 反応液の組成は、ろ紙で抽出した繊維虫の鋳型 DNA 全量 (10 µL) に各プライマー (100 pmol) をそれぞれ 0.1 µL、*Taq*DNA ポリメラーゼを 0.1 µL (0.5 unit)、dNTP (各 2.5 mM) 1.6 µL、10×PCR バッファー 2 µL、滅菌蒸留水 6.1 µL を加え、全量を 20 µL とする。PCR 反応条件は、93°C 1 分でプレインキュベーション後、93°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクル行い、その後 72°C 5 分を行う。セカンド PCR は、設計したプライマーを用い、ファースト PCR 産物 0.5 µL を鋳型 DNA として、ファースト PCR と同じ条件で PCR を行う。

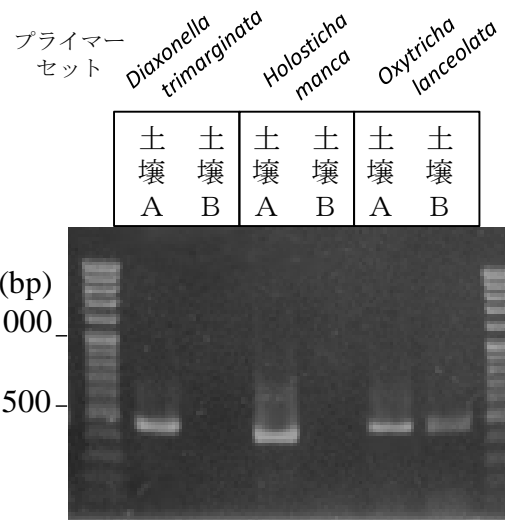


図 2 設計したプライマーによる環境 DNA の PCR 産物の増幅

土壌 A、B は、2008 年 5 月に九州沖縄農業研究センター都城拠点のソルガム栽培後の畑地圃場から採取。

顕微鏡による検出は、繊維虫 100 個体を無作為に単離・同定した結果。

(嶋谷智佳子)

[その他]

中課題名：土壌生物機能を核とした土壌生産力評価法の開発

中課題番号：151c

予算区分：基盤、交付金

研究期間：2011～2012 年度

研究担当者：嶋谷智佳子

発表論文等：嶋谷 (2014) 九州沖縄農業研究センター報告. 61:17-22.