

論文題目

東京都市近郊の枝豆栽培圃場における
ダイズシストセンチュウの診断及び防除法の開発

The development of diagnosis and prevention methods for the soybean cyst nematode in
green soybean fields of the suburbs of Tokyo.

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

博士後期課程

伊藤大輔

目次

0. 緒言	1
植物寄生性線虫について	1
ダイズシストセンチュウについて	2
ダイズシストセンチュウの診断方法	3
ダイズシストセンチュウの防除方法	4
都市近郊エダマメ生産の特徴と意義	6
本研究の目的	6
1. ダイズシストセンチュウの診断手法の開発	7
1.1 ボールミル・リアルタイム PCR 法によるダイズシストセンチュウ診断方法の開発	7
1.1.1 目的	7
1.1.2 材料と方法	7
1.1.3 結果および考察	9
1.2 ダイズシストセンチュウの土壌深度分布	10
1.2.1 目的	10
1.2.2 材料と方法	11
1.2.3 結果	11
1.2.4 考察	12
1.3 第 1 章要約	12
2. 都市近郊エダマメ栽培圃場におけるダイズシストセンチュウ密度の調査	13
2.1 目的	13
2.2 材料と方法	14
2.3 結果	15
2.4 考察	17
2.5 第 2 章要約	17
3. 植物寄生性線虫及び土壌理化学性とエダマメ収量との関係	18
3.1 目的	18
3.2 材料と方法	18
3.2.1 調査対象地域及び調査方法	18
3.2.2 植物寄生性線虫及び土壌化学性の分析項目	19
3.2.3 解析方法	20
3.3 結果	20
3.3.1 植物寄生性線虫及び土壌化学性の分析結果	20
3.3.2 植物寄生性線虫密度及び土壌化学性とエダマメ収量との関係	22
3.3.3 定植時期別の植物寄生性線虫とエダマメ収量との関係	26

3.3.4 定植時期別の推定地温とダイズシストセンチュウ孵化適温との関係	30
3.3.5 重回帰分析による定植時期別の減収要因の推定	33
3.3.6 ボールミル・Real-time PCR 法によるダイズシストセンチュウ要防除水準の作成	34
3.4 考察	35
3.5 第3章要約	36
4. ダイズシストセンチュウの生物的防除手法の開発	37
4.1 もやし残渣によるダイズシストセンチュウ防除手法の開発	37
4.1.1 室内試験 もやしの部位別ダイズシストセンチュウ卵密度低減効果の検証	37
4.1.1.1 目的	37
4.1.1.2 材料と方法	37
4.1.1.3 結果	39
4.1.1.4 考察	41
4.1.2 室内試験 もやしの根に着目した添加量の検討	42
4.1.2.1 目的	42
4.1.2.2 材料と方法	42
4.1.2.3 結果	43
4.1.2.4 考察	44
4.1.3 圃場試験	45
4.1.3.1 目的	45
4.1.3.2 材料と方法	45
4.1.3.3 結果および考察 (2010 年 9 月～2011 年 6 月)	46
4.1.3.4 結果および考察 (2011 年 8 月～11 月)	48
4.2 もやし残渣振とう液によるダイズシストセンチュウ防除手法の開発	50
4.2.1 室内試験 もやし残渣振とう液がダイズシストセンチュウ卵密度および植物体に及ぼす影響	50
4.2.1.1 目的	50
4.2.1.2 材料と方法	50
4.2.1.3 結果	52
4.2.1.4 考察	54
4.2.2 もやし残渣振とう液の化学性の検証	55
4.2.2.1 目的	55
4.2.2.2 材料と方法	55
4.2.2.3 結果および考察	56
4.2.3 もやし残渣振とう液の作製手順の検討	57
4.2.3.1 目的	57

4.2.3.2 材料と方法.....	57
4.2.3.3 結果および考察.....	57
4.2.4 圃場試験 もやし残渣振とう液添加によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果の検証.....	59
4.2.4.1 目的.....	59
4.2.4.2 材料と方法.....	59
4.2.4.3 結果および考察（2010 年 7 月～2011 年 6 月）.....	61
4.2.4.4 結果および考察（2011 年 8 月～11 月）.....	63
4.2.5 継続的にもやし残渣振とう液を添加した圃場でのエダマメ栽培試験.....	65
4.2.5.1 目的.....	65
4.2.5.2 材料と方法.....	65
4.2.5.3 結果.....	66
4.2.5.4 考察.....	70
4.3 緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除手法の開発.....	72
4.3.1 室内試験 緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験.....	72
4.3.1.1 目的.....	72
4.3.1.2 材料と方法.....	72
4.3.1.3 結果.....	73
4.3.1.4 考察.....	74
4.3.2 室内試験 低密度播種における緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験.....	75
4.3.2.1 目的.....	75
4.3.2.2 材料と方法.....	75
4.3.2.3 結果.....	76
4.3.2.4 考察.....	77
4.3.3 圃場試験 7 月上旬播種における緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験.....	78
4.3.3.1 目的.....	78
4.3.3.2 材料と方法.....	78
4.3.3.3 結果.....	78
4.3.3.4 考察.....	79
4.3.4 圃場試験 8 月下旬播種における緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験.....	80
4.3.4.1 目的.....	80
4.3.4.2 材料と方法.....	80
4.3.4.3 結果.....	80

4.3.4.4 考察.....	81
4.4 ダイブシストセンチュウの孵化促進を利用した防除法の適用可能時期の推定	82
4.4.1 目的	82
4.4.2 材料と方法.....	82
4.4.3 結果	83
4.4.4 考察	87
4.5 第4章要約.....	88
5. 総合考察.....	90
謝辞.....	93
引用文献	94
付録.....	100

0. 緒言

植物寄生性線虫について

線虫とは線形動物門の一般的な名称であり、海底、湖底、陸上を問わず多くの場所に生息する（白山, 2003）。土壌線虫は主に自活性線虫と植物寄生性線虫に大別される。自活性線虫は食性ごとに細菌食性、糸状菌食性、捕食性、雑食性などに分類される線虫であり（岡田, 2007）、植物寄生性線虫は頭部に有する口針を用いて植物根内に侵入・寄生することで、作物の品質や収量の低下などを引き起こす。日本において、作物に被害を与える主要な植物寄生性線虫は、ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ、シストセンチュウの3種類である（三枝, 1993）。

ネコブセンチュウは宿主植物の根にゴールと呼ばれるコブを形成し、養水分を奪って作物に被害を与える。農業生産において問題になるネコブセンチュウは4種、サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*)、ジャワネコブセンチュウ (*M. javanica*)、アレナリアネコブセンチュウ (*M. arenaria*)、キタネコブセンチュウ (*M. hapla*) が多種類の農作物に被害を与え、難防除害虫として知られている（奈良部, 1995）。また、これまでの研究においてサツマイモネコブセンチュウ及びジャワネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウがダイズに寄生することが知られている（古賀ら, 1983; 岡田, 1996）。国内の地理的分布では、本州においてはサツマイモネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウが高い頻度で検出され（奈良部, 1995）、関東においてもこの2種が広く分布しているとの報告がある（奈良部ら, 1988）。

ネグサレセンチュウは移動性の内部寄生性線虫であり、卵以外のステージで根へと侵入し、移動しながら摂食・発育・産卵を行う（岩堀ら, 2013）。作物生産上重要な種はキタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus penetrans*)、クルミネグサレセンチュウ (*P. vulnus*)、ミナミネグサレセンチュウ (*P. coffeae*) である。これらネグサレセンチュウのうち本州においては主にキタネグサレセンチュウ及びクルミネグサレセンチュウが分布するが、クルミネグサレセンチュウでは木本類で検出されることが多く、ジャガイモ、イチゴ、その他少数の作物でしか存在が確認されていない（後藤, 1974）。関東圏においては、主にキタネグサレセンチュウが確認されており（大類ら, 1999）、ダイズへの寄生も認められる（山田, 1967）。

シストセンチュウは生活環にシストのステージを有する線虫のことであり、シストは雌成虫が死亡した後に表皮がタンニン化した卵を内包する皮袋のことである。農業生産の上で主に問題となるのは、シストセンチュウ (Heteroderinae 亜科) の *Globodera* 属、

Heterodera 属の 2 属である。*Globodera* 属にはジャガイモシストセンチュウ (*G. rostochiensis*)、タバコシストセンチュウ (*G. tabacum*) などが属しており (百田, 2004)、2015 年 8 月にはこれまで国内で発生が確認されていなかったジャガイモシロシストセンチュウ (*G. pallida*) が確認された (平成 27 年 8 月 19 日 農林水産省報道発表資料)。*Heterodera* 属にはダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) 以外にイネシストセンチュウ (*H. elachista*)、テンサイシストセンチュウ (*H. schachtii*) などが属している (百田, 2004)。

ダイズシストセンチュウについて

本論文で取り扱うダイズシストセンチュウが寄生する主な作物としてはダイズ、アズキ、インゲン、ハナマメなどのマメ科作物であり、被害はダイズで著しく、アズキではそれより少なく、インゲンではごく軽いといった違いがある (三枝, 1993)。

ダイズシストセンチュウの寄生メカニズムは宿主の根から分泌される孵化促進物質の刺激を受け、シスト内に内包される卵が孵化、土壤中を移動して宿主の根に寄生するというものである (海妻ら, 2003)。本線虫の被害を受けた作物根は、水分・養分の吸収の阻害や根粒菌の着生数減少などの影響を受け、葉が黄化・萎縮する症状を呈する。実際にダイズシストセンチュウが激発した圃場では減収率が 90 %以上に及ぶことが報告されている (海妻ら, 2003)。

ダイズシストセンチュウの生活環はダイズの栽培期間である夏にかけて二期幼虫が宿主の根内に侵入、二期幼虫は根内で細胞中の栄養を摂取し 3 期幼虫、4 期幼虫と成熟して雌成虫となる (三枝, 1993)。一方で 3 期幼虫の一部は雄となり、根外へ移動して雌成虫と交尾をおこない、雌成虫は卵を生産する (Klink *et al.*, 2007)。卵の生産を終えた雌はタンニン化した皮膜を持つ茶色いレモン状のシストに変化し、土壤中に脱落して栽培期間中に世代を繰り返す (三枝, 1993)。概ね 1 世代は 3~4 週間で生活史が完了すると報告されており (Alston & Schmitt, 1988)、関東地方で 1~2 世代、北海道では 1 世代とされ、晩秋の低温になるとシストの状態越冬し、次年度に宿主がいなくとも卵はシストに守られているため、長期間に渡り土壤中で生存することができる (海妻ら, 2003)。

ダイズシストセンチュウの日本における分布範囲について、いくつかの報告をまとめると、北海道、本州、九州のいくつかの圃場において検出されており、中には要防除水準を超える圃場もある (相場, 2001; 相場, 2002; 相場, 2006; 相場, 2007; 相場, 2008; 相場ら, 2004; 伊藤ら, 2006; 岩堀ら, 2010)。このことから、日本においてダイズシストセンチュウ

ウは広く分布しており、宿主作物であるダイズ、エダマメ、アズキなどの減収被害の一因となっていることが推測される。

ダイズシストセンチュウの経済的な被害規模は世界的に大きく、1994年の主要なダイズ生産10ヶ国のうち4ヶ国（アメリカ、中国、カナダ、ブラジル）でダイズシストセンチュウによるダイズの減収被害が報告されており、全病害虫によるダイズ損失量約1500万tのうちダイズシストセンチュウが約20%を占めており、1種類の病害虫による被害規模としては最大である（Wrather *et al.*, 1997）。

また、主要なダイズ生産国の中でも最大のダイズ生産量を誇るアメリカでは、ダイズの減収被害についての詳細な推計がなされている。1974年から1994年の20年間に於いて病害虫によるダイズ損失量のうち約20%をダイズシストセンチュウが占めていた（Wrather *et al.*, 1995）。この割合は1種類の病害虫が占める割合としては最大である。

2000年代に入ってもこの割合を下回ることなく、ダイズシストセンチュウによるダイズ損失量は全病害虫に占める割合としては約30%（2003年から2005年の平均値）であり、金額に換算すると約1500億円/年と大きな被害をもたらしている（Wrather *et al.*, 2006）。また、ダイズの生産量は1974年から2005年の間に2.5倍に増加しており（FAO）、この間ダイズシストセンチュウによる被害の割合は変化しておらず、ダイズシストセンチュウによる被害は拡大傾向にあるものと推測される。実際にアメリカにおけるダイズシストセンチュウの分布域は1954年から2014年にかけて拡大傾向を示し、ニューヨーク及びウエストバージニア州を除く全てのダイズ生産地で発生が確認されている（Tylka & Marett, 2014）。

ダイズシストセンチュウの診断方法

シストセンチュウを土壌から分離する方法として、ふるい分け法やフェンウィック法といった方法がある。ふるい分け法はビーカーに土壌を入れ、水流によって攪拌し、浮遊物を網目の異なるふるい2つに流し込んでシストを分離する（佐野ら, 2004）。フェンウィック法も同様に水流によって土壌を攪拌し、フェンウィック缶と呼ばれる側面に穴の開いた缶を用いて浮遊物を缶の側面から流出させ、ふるいを用いて浮遊物を得る方法である（Fenwick, 1940）。この他に比重液を用いた遠心浮遊法があり、ふるい分け法やフェンウィック法との併用で高い抽出効率が得られる（清水, 1978）。得られた浮遊物は顕微鏡下で観察し、夾雑物からシストを選別する。選別の際には土壌粒子や微細な種子、糸状菌の菌核等とシストを見誤ることがあるので、注意を要する（岩堀ら, 2013）。選別後はシストを

ピンセットや針で破壊してシスト内に存在する卵を取り出して計数する。このようにシストセンチウの卵密度を計測するには、顕微鏡下における夾雑物中からのシストの正確な選別、シストを破壊しての卵数の計測が必須であり、手間が掛かる。また、シストセンチウの種同定には形態的な観察のほかに PCR-RFLP 分析（ポリメラーゼ連鎖反応・制限酵素断片長多型分析）においてバンドパターンを確認する手法が用いられる（大類, 1997; 岩堀ら, 2013）が、複数種が混在していた場合には目的の線虫密度を計測するためにシストから得られた卵を個別に PCR-RFLP 分析によって種を判別するか、顕微鏡下での形態観察によって種を判別する必要がある、診断を行うために大きな労力が必要となる。

ダイズシストセンチウのシスト密度と宿主作物の収量との関係はいくつかの研究が行われており、主にダイズシストセンチウ密度とダイズの収量との関係を調査した例がある（斎藤, 1985; Franc & Dropkin, 1986; Chen *et al.*, 2001）。Franc & Dropkin（1986）及び Chen *et al.* (2001) では 10%減収に達するダイズシストセンチウ卵密度はそれぞれ、60 卵/20 g 乾土、500 卵/20 g 乾土と幅がある。国内の報告では 20 g の土壌あたり、約 1.2 シストが 10%減収の水準とされており、1 シストにつき 200 卵が内包されると仮定すると 20 g 土壌あたり約 240 卵が要防除水準となる（斎藤, 1985）。エダマメにおいてもダイズシストセンチウシスト密度とエダマメ収量との関係が調査されており、0.4 シスト/20 g 乾土の密度で 10%減収に達し、同様に 1 シストにつき 200 卵が内包されるとすると 80 卵/20 g 乾土が 10%減収の要防除水準となる（及川ら, 1991）。しかし、シスト当たりの卵数は数卵から数百卵とばらつきがあるため、シスト数から要防除水準を決定することは精度の点で問題がある。

近年では土壌中の植物寄生性線虫を診断する方法として、Real-time PCR を用いた診断がある（Madani *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2011）。この手法では、多検体を同時に分析できることや種特異的なプライマーを用いることで対象とする植物寄生性線虫のみを検出及び定量できるという利点がある。また、Real-time PCR 法により測定した植物寄生性線虫密度と宿主作物の被害度との関係が研究されており、経済的許容水準の推定が行われている（Sato *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2013）。

ダイズシストセンチウの防除方法

ダイズシストセンチウに限らず、植物寄生性線虫の一般的な防除方法は薬剤防除である。ダイズシストセンチウの防除に用いられる薬剤としては主にくん蒸剤（D・D）が用いられる。しかし、ダイズシストセンチウは薬剤抵抗性が強いことが報告されており（佐

藤, 1968)、いくつかの研究において D-D 剤によるくん蒸を行っても、ダイズシストセンチュウの密度を 20~40 %削減する程度であると報告されている(Bruin & Pedersen, 2007; Bruin & Pedersen, 2008; Murillo-Williams *et al.*, 2010)。これはダイズシストセンチュウの薬剤抵抗性が高いことを示唆しており、既存の報告において D-D 剤を気化してダイズシストセンチュウの卵及びシストに直接曝露しても 8~25%の卵が生存し、卵から孵化して幼虫になったが、比較対照に供試されたキタネコブセンチュウは全ての卵が幼虫にならなかったと報告されている(佐藤, 1968)。このことから、ダイズシストセンチュウの卵が D-D 剤に対して高い抵抗性を有しており、他の植物寄生性線虫よりも防除効果が劣ると考えられる。

薬剤以外の防除方法としては、緑肥植物(クローバ類、ベッチ類、クロタリヤ)の利用、輪作、有機物施用が挙げられる。緑肥植物(クローバ類、ベッチ類、クロタリヤ)をもちいたダイズシストセンチュウの防除メカニズムはマメ科緑肥によってダイズシストセンチュウの孵化を誘導、根に侵入させるが、ダイズシストセンチュウに対して抵抗遺伝子を持つため、ダイズシストセンチュウは成虫になれずに個体密度が低減するという方法である。緑肥作物をもちいた防除試験の結果では 2~4 ヶ月間の栽培でダイズシストセンチュウ卵密度を 70~90 %程度低減することが報告されている(Kushida *et al.*, 2002; 山田ら, 2003; 山田ら, 2004)。しかし、高い密度低減効果を得る為には 5 月から 9 月の数ヶ月にかけて栽培を行う必要があり、この期間は作物を栽培できないことになる。これに対して輪作では、宿主以外の作物を栽培することでダイズシストセンチュウ密度の自然減少を期待する方法である。1 年間の輪作を行うことでダイズシストセンチュウの密度が低下する場合もある(橋本ら, 1988)が、密度の低下がみられないとの報告もあり(石川ら, 1983; 及川ら, 1991)、効果が異なる要因については不明瞭である。施肥によるダイズシストセンチュウ被害の抑制として、堆肥施用により、ダイズシストセンチュウの被害が抑制されるという報告があり、牛糞堆肥を 4 t/10a 施用することでダイズシストセンチュウの被害を軽減し、収量が確保された(田澤ら, 2008)。しかし、有機物施用によりダイズシストセンチュウ密度が抑制される傾向は一貫しては認められず、他の報告においては、堆肥を 4 t/10a 施用した場合でもダイズシストセンチュウ密度の抑制効果は認められない(国分ら, 1983)。また、収量の改善も認められなかったことから、実用的な意義は認めがたいとしており(国分ら, 1983)、収量改善効果及び作用機序が不明瞭な点や通常の堆肥施用量(1 t/10a)の 4 倍程度が必要な点から有機物施用単独でダイズシストセンチュウを防除することは難しいと考えられる。

ダイズシストセンチュウに特化した防除方法として、孵化促進物質による防除が挙げられる。孵化促進物質はインゲンの根から単離されたグリシノエクレピン A という化合物であり(Masamune *et al.*, 1982)、既に構造が決定されている(Fukuzawa *et al.*, 1985)。防除メカニズムとしては、宿主作

物の非存在下において、孵化促進物質であるグリシノエクレピン A を土壌に添加、ダイズシストセンチュウを孵化させ、餓死にいたらせる方法である(奈良部, 2008)。グリシノエクレピン A の構造が決定されてから、人工的な全合成が試みられており、合成に成功しているが(Murai, 1989)、20 以上の合成過程が必要であり (Shiina *et al.*, 2010)、現在でも実用化には至っていない。

都市近郊エダマメ生産の特徴と意義

エダマメ生産は都市近郊で盛んであり、千葉県、新潟県、福島県、埼玉県において栽培面積が大きい (Konno, 1970)。関東圏では、特に千葉県、群馬県、埼玉県、神奈川県、東京都において生産が盛んで、平成 26 年度の農林水産省の統計資料によると上記の都県で全国の出荷量の約 38% を占めている。また、都道府県別の出荷量において、千葉県が最も多く (6330 t)、群馬県が 4 位 (4430 t)、埼玉県が 5 位 (4230 t)、神奈川県が 8 位 (2340 t)、東京都が 9 位 (1330 t) と出荷量の上位を占めている。また、関東圏の生産地では単位面積当たりの収量が多いのも特徴の 1 つである (上記都県の平均値 : 790 kg/10a、全国平均値 : 587 kg/10a)。

関東圏においてエダマメは経済的にも重要な作物であり、特に促成栽培エダマメにおいて価格が高い。東京都中央卸売市場の平成 26 年度統計資料によれば、年間を通したエダマメの平均価格は 794 円/kg であり、5 月出荷のエダマメ平均価格は 1318 円/kg、6 月出荷のエダマメ平均価格は 966 円/kg である。また、東京都中央卸売市場で取引されるエダマメの割合では、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県、茨城県、栃木県を合わせると年間の平均占有率が 31%、5 月出荷のエダマメでは 43%、6 月出荷のエダマメでは 93%、7 月出荷のエダマメでは 75% と早生エダマメの供給率が高い。以上のことから、都市近郊 (関東圏) におけるエダマメ生産は出荷量及び単位面積当たりの収量が多く、平均価格の高い 5 月及び 6 月の占有率が高いことから、農業生産上重要な作物であると考えられる。

本研究の目的

本研究ではリアルタイム PCR 法を用いてダイズシストセンチュウを定量し、エダマメ収量との関係を解析することにより、要防除水準を作成すること及びダイズシストセンチュウの新規防除手法の開発を目的とした。

1. ダイズシストセンチュウの診断手法の開発

1.1 ボールミル・リアルタイム PCR 法によるダイズシストセンチュウ診断方法の開発

1.1.1 目的

ダイズシストセンチュウの診断法として、従来のふるい分け法やフェンウィック法では夾雑物中からシストを選別する手間や、顕微鏡下でシストを破壊しての卵数の計測に手間を要する。そのため、土壌締固め・Real-time PCR 法を介したダイズシストセンチュウの検量線が作製され、ダイズシストセンチュウ卵数の定量がおこなわれた (Goto *et al.*, 2009)。その後、土壌の前処理として土壌締固め処理よりもボールミル処理によって土壌を粉碎・攪拌したほうが簡便であったため、乾燥後、土壌の粉碎・攪拌処理をボールミルでおこない、新たにダイズシストセンチュウ卵数を定量するための検量線を作製することにした。

1.1.2 材料と方法

・土壌中に存在するシストの分離

東京都のダイズシストセンチュウ汚染土壌からシストを分離するために、ふるい分けシスト洗い流し法をおこなった。この方法は水流によってシストを浮上させ、網目の異なる 2 つのふるいによってシストを分離する方法である。操作手順を以下に示す。

- 1) 風乾させた土壌 50 g を 2 L の容器に入れ、水道水を注いで攪拌した。
- 2) 粗大な夾雑物とシストを分離するため、網目 212 μm のふるいの上に網目 710 μm のふるいを重ね、浮遊物を上澄みごと、重ねたふるいの上に流し込んだ。
- 3) この過程を 3~4 回繰り返した。
- 4) 重ねたふるいの上から水道水を流し、微小な夾雑物を流した。
- 5) 網目 212 μm のふるいに残った夾雑物を採取した。

このようにして得た、夾雑物をシャーレに取り、顕微鏡下で夾雑物の中からシストを採取する。採取したシストを顕微鏡下で割り、シストに包まれる卵を取り出し、実験に供試した。東京都のダイズシストセンチュウ汚染圃場では土壌 50 g あたり、 16 ± 2 個のシストが含まれていた。

・検量線作製の準備

上記のふるい分け洗い流し法により得られたシストを顕微鏡下で破壊してダイズシストセンチュウの卵を得た。卵は蒸留水中に静置させた状態でピペットを用いて吸い上げ、60 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間乾燥させたダイズシストセンチュウ非汚染土壌 (Real-time PCR 法により

ダイズシストセンチュウが検出されなかった土壌) 20 g にそれぞれ 50、120、250、500、1000、1500 卵添加し、再度 60℃で 24 時間乾燥させ、ボールミルにより粉碎・攪拌をおこなった。なお、ダイズシストセンチュウ卵を添加する土壌の反復は 50~250 卵の添加量では反復 3、500~1500 卵の添加量では反復を 2 とした。その後、土壌 0.5g をスクリーキャップチューブ (20 %スキムミルク溶液 125 μ l、ジルコニアビーズ、0.1 mm 径 : 0.75 g、0.5mm 径 : 0.25 g、内部標準としてジャガイモシストセンチュウの DNA 溶液 : 10 μ l を含む) に入れ、メタゲノムの抽出をおこなった。なお、本論文で「ボールミル・Real-time PCR 法」と記した場合は本法で用いたメタゲノム抽出およびReal-time PCR 法をおこない、ダイズシストセンチュウ卵数を定量したものとする。

メタゲノムの抽出方法

- 1) 60℃で湯せんした Lysis buffer (0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) , 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) 1 ml を添加後、Bead beating (5000 rpm、60 秒を 2 回) をおこない、遠心処理 (12000 g、5 分、20 °C) をおこなった。
- 2) 上清 600 μ l を 2 ml のエッペンチューブに移し、その上清に 5 M NaCl を 377 μ l、10 % CTAB を 270 μ l を添加・ボルテックスで混合後、60 °C 10 分間湯せんをおこない、途中数回振とうした。
- 3) 室温になるまで放冷し、- 20℃で冷却したクロロホルム 500 μ l を添加・ボルテックスで混合後、遠心処理 (15000 g 20 分 20 °C) をおこなった。
- 4) 上清 1200 μ l を別の 2 ml エッペンチューブに移し、20 % PEG (20% PEG, 1.6 M NaCl) 溶液を 720 μ l 添加、ボルテックスで混合後、遠心処理 (15000 rpm, 20 分, 4 °C) をおこなった。
- 5) チューブ内の溶液を出来る限り取り除き、70 %エタノール溶液 1 ml を加え、遠心処理 (15000 rpm, 5 分, 4 °C) をおこなった。
- 6) エタノール溶液を出来る限り取り除き、TAITEC VC-15 Sp (遠心減圧乾燥器) により、チューブ内に残っていた溶液を乾燥させ、TE-buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を 100 μ l 加え、1 時間放置した後に冷凍保存した。

以上の方法で抽出した溶液を滅菌蒸留水と混合し 10 倍希釈した。その後、反応液と混合して Real-time PCR (Applied Bio-systems、StepOne™ Real-Time PCR System) をおこなった。なお、ダイズシストセンチュウ特異プライマーの配列を表 1、反応液と抽出液の組成を表 2、Real-time PCR の反応時間を表 3 に示す。

表 1 ダイズシストセンチュウ特異プライマーの配列

対象線虫	プライマー	5'-3'
ダイズシストセンチュウ	フォワード (SCNf)	cta gcg ttg gca cca cca a
	リバーズ (SCNr)	aat gtt ggg cag cgt cca c

表 2 Real-time PCR における反応系(1 サンプルあたり)

Fast SYBR® Green Master Mix	5 µl
プライマー-F (5 µM)	0.4 µl
プライマー-R (5 µM)	0.4 µl
滅菌蒸留水	2.2 µl
DNAサンプル	2 µl

表 3 Real-time PCR における反応条件

	反応条件
ダイズシストセンチュウ	1. 95 °C-10秒 2.【 95°C-5秒, 60 °C-20秒】× 40 サイクル 3. 60°C-95°C(融解曲線解析のため)

1.1.3 結果および考察

締固め・Real-time PCR 法 (Goto, 2009) およびボールミル・Real-time PCR 法を介して得た Ct 値を示す (表 4)。両者を比較すると、ダイズシストセンチュウ卵を 50~1000 卵添加した土壌では、ボールミル処理をおこなった実験区で Ct 値が 0.7~3.1 小さくなる結果となり、最も低密度に設定した 50 卵/20 g 乾土の密度でも検出することが出来た。

ダイズシストセンチュウ卵数と Ct 値との関係は関係式 $y = -3.713x + 36.544$ 、決定係数が 0.95 ($p < 0.01$) となった (図. 1)。

以上の結果から、既存研究から報告されている防除水準 (60~500 卵/20 g 乾土) よりも低いダイズシストセンチュウ卵密度であってもボールミル法を介した Real-time PCR 法によって測定することができると考えられる。今後の実験において、今回作製した関係式からダイズシストセンチュウ卵数に換算することとした。

表 4 締め固め・Real-time PCR 法およびボールミル・Real-time PCR 法

によって得られた Ct 値 (平均値±標準偏差)

SCN卵数/ 20g-soil	50	120	250	500	1000	1500
締め固め・Real-time PCR法 (後藤, 2009)	31.4±1.3	—	29.5±0.1	29.1±0.8	28.6±0.5	27.7±0.3
ボールミル・Real-time PCR法 (本法)	30.7±0.8	28.7±0.5	27.1±0.6	26.0±0.4	25.7±0.1	25.1±0.2

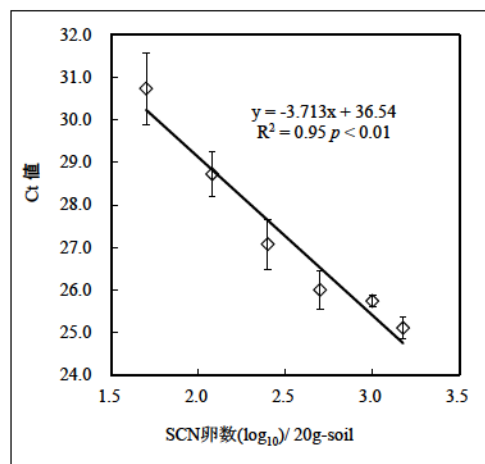


図. 1 ボールミル・Real-time PCR 法を介したダイズシストセンチュウ卵数と Ct 値との関係

1.2 ダイズシストセンチュウの土壌深度分布

1.2.1 目的

植物寄生性線虫の圃場内の水平分布については研究が多数おこなわれており、ランダムな水平分布パターンを示さず、凝集部位とまばらに分布する部位とに分かれることが知られている (水久保, 2004)。サンプルサイズ及び土壌採取量は、ネコブセンチュウを例にすると小規模プロット (0.25 m² 程度) では、10 cm³ 内でランダムに集中分布するため、サンプルサイズ 1、10 ml 以上であれば良いとされている (皆川, 1992)。しかし、サンプルを採取する際の土壌深度は宿主となる植物の根の分布を参考におこなうべきであると考えられている。

そこで本節では、エダマメ栽培後圃場にプロットを設け、土壌深度別のダイズシストセンチュウの存在比を調査し、土壌サンプリングにおける適当な土壌深度を決定する目的で調査を行った。

1.2.2 材料と方法

東京都にあるダイズシストセンチュウ汚染圃場において波板で囲いを作り、0.5 m×0.5 m (0.25 m²) のプロットを6つ作製し、そのうちの3プロットにおいて土壌サンプリングをおこなった。サンプリングはルートオーガーをもちい、土壌表層から60 cm までを採取し、表層から15 cm、15 cm から30 cm、30 cm から60 cm までに分けた。サンプルサイズは1プロット(0.25 m²)あたり3点採取し、ポリ袋に入れて混合し、約150 g を1サンプルとした。その後、土壌を持ち帰りボールミル・Real-time PCR 法によって、土壌深度ごとにサンプルを分析し、各深度のダイズシストセンチュウ卵密度及び存在比を算出した。

1.2.3 結果

ダイズシストセンチュウの卵密度は各プロットにおいて、土壌深度 0-60 cm の合計で1606～5327 卵/20 g 乾土の間で分布していた (図.2 左)。存在比では土壌深度 0-15 cm に44% (13～63%)、15-30 cm に52% (34～85%)、30-60 cm に4% (1～10%) が存在しており、土壌深度 0-30 cm に平均して96% (90～99%) のダイズシストセンチュウが存在していた (図.2 右)。

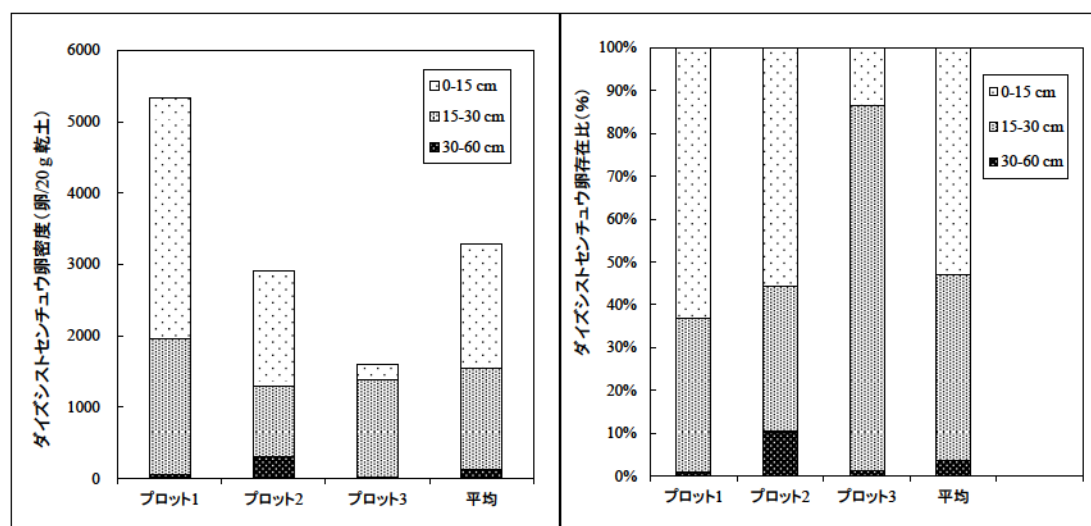


図. 2 各土壌深度におけるダイズシストセンチュウ卵密度の分布 (左) 及び存在比 (右)

1.2.4 考察

土壌深度 0-30 cm に 90%以上のダイズシストセンチュウが存在していた。これは、エダマメの作土層及び根域に依存するものと考えられ、作土層としてダイズでは概ね 25 cm が目安とされている（農林水産省, 2008）。また、既往の研究において、土壌深度ごとのダイズ根系を研究した例によると、土壌深度 13-21 cm に根が集中するという結果が得られており（小柳, 1998; 辻ら, 2002）、ダイズシストセンチュウの深度分布においても既往の研究に追従する結果であった（Alston & Schmitt, 1987）。

今回の調査結果において土壌深度 0-30 cm にダイズシストセンチュウ密度の分布が集中した理由として、ダイズと同種であるエダマメの根域が同様の範囲に集中していたためと推測され、根域を考慮した土壌採取の深度としては 0-30 cm 程度が適当と考えられる。

1.3 第 1 章要約

本章ではボールミル・Real-time PCR 法によるダイズシストセンチュウ定量のための検量線を作成し、試料採取のための予備調査としてダイズシストセンチュウの土壌深度分布を調査した。その結果、ボールミル・Real-time PCR 法を用いた場合では添加したダイズシストセンチュウ卵密度と Ct 値との間に相関が得られ ($R^2=0.95$ 、 $p<0.01$)、土壌中のダイズシストセンチュウを定量可能であるとの結論を得た。また、ダイズシストセンチュウの土壌深度分布では土壌深度 0-30 cm に 90%以上のダイズシストセンチュウが存在しており、既往の研究におけるダイズの根の分布やダイズシストセンチュウの深度分布と概ね整合がとれることから試料採取時に対象とする土壌深度は 0-30 cm が適当であると結論した。

2. 都市近郊エダマメ栽培圃場におけるダイズシストセンチュウ密度の調査

2.1 目的

既往の研究では都市近郊のダイズもしくはエダマメ栽培圃場（東京都、埼玉県、千葉県、茨城県、群馬県、栃木県）においてダイズシストセンチュウの発生が報告されている（表 5）。しかし、エダマメ栽培圃場を中心とした報告は少なく、ダイズ栽培圃場の報告が中心となっている。

そこで、本章では埼玉県を中心として千葉県及び神奈川県のエダマメ栽培圃場におけるダイズシストセンチュウ密度の分布を明らかにすることを目的として調査を行った。

表 5 関東圏のダイズ及びエダマメ栽培圃場でのダイズシストセンチュウ検出状況

都県	発生の有無	文献	調査圃場	検出圃場	検出率 (%)	作物
東京都	○	伊藤ら(2006)	60	18	30.0	エダマメ
埼玉県	○	相場(2006)	8	4	50.0	ダイズ
千葉県	○	相場(2002)	20	3	15.0	ダイズ
茨城県	○	相場(2001)	30	19	63.3	ダイズ
群馬県	○	相場(2004)	13	7	53.8	ダイズ
栃木県	○	相場(2002)	12	3	25.0	ダイズ
神奈川県	未報告	-	-	-	-	-
計			143	54	37.8	全体
			83	36	43.4	ダイズ

2.2 材料と方法

表 6 に調査地域及び調査圃場数を示す。埼玉県では 8 市町、62 圃場、神奈川県では 2 市 9 圃場、千葉県では 1 市 2 圃場を調査した。調査はルートオーガーを用いて土壌表層から 30 cm までの土壌を対象とし、圃場の 5 点から土壌を採取した。採取した試料は混合試料として 1 サンプルとした。分析はボールミル・Real-time PCR 法によりダイズシストセンチュウ密度を測定した。

表 6 調査地域及び調査圃場数

調査地		圃場数	調査年
埼玉県	鶴ヶ島市	4	2013
	所沢市	5	2013
	浦和市	8	2013
	草加市	6	2014
	三郷市	10	2014、2015
	八潮市	20	2013、2014、2015
	行田市	6	2015
	小川町	3	2015
神奈川県	相模原市	6	2015
	三浦市	3	2015
千葉県	君津市	2	2015

2.3 結果

調査圃場 73 圃場中、ダイズシストセンチュウが検出されたのは 63 圃場であり、検出率にして 86.3%であった（図. 3 左）。圃場当たりのダイズシストセンチュウ卵密度は平均値で 559 卵/20 g 乾土（以下、単位同様）、中央値で 120 卵、最大値で 13746 卵であった（図. 3 左）。ダイズシストセンチュウ卵密度は 0～400 卵未満の圃場が 73 圃場中 59 圃場であり、データ全体の約 80%を占めていた（図. 3 右）。

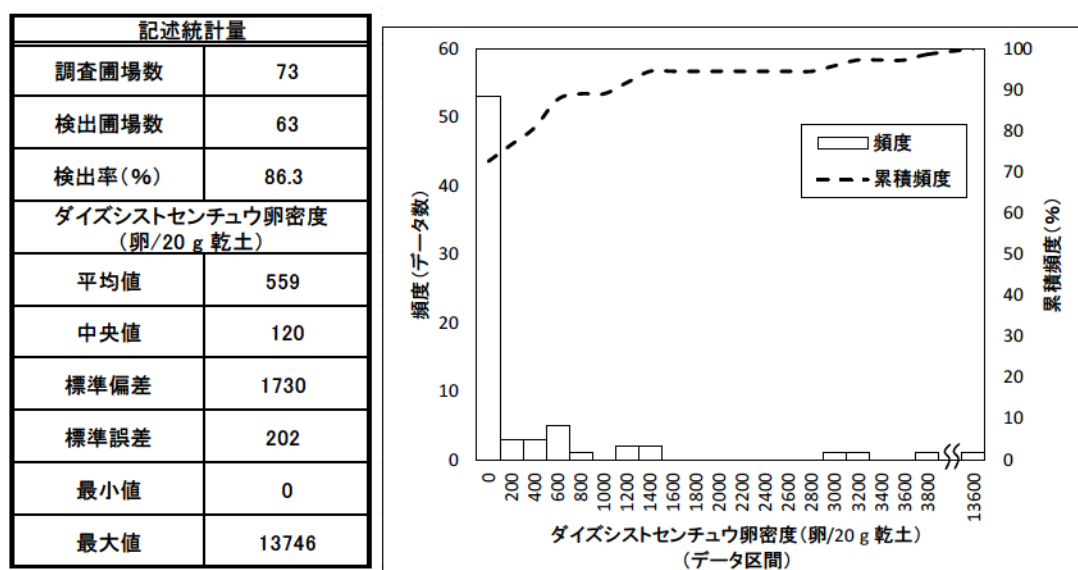


図. 3 調査圃場におけるダイズシストセンチュウの検出率及び卵密度

最も多くの圃場数を調査した埼玉県においては、小川町を除く地域で検出され、最大の密度を示した圃場は八潮市の圃場であった（図. 4 及び表 7）。また、神奈川県、千葉県においてもダイズシストセンチュウが検出されており、神奈川県の三浦市では今回の調査において最大の密度（13746 卵/20 g 乾土）を示した（表 7）。

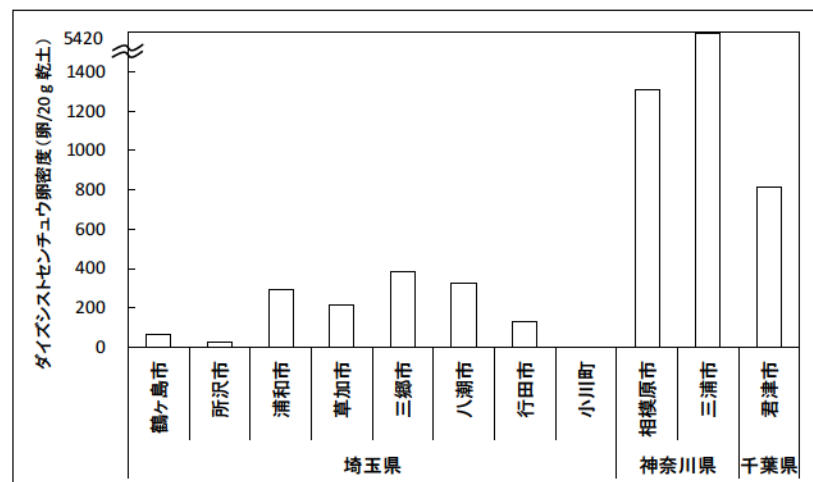


図. 4 各地域におけるダイズシストセンチュウの平均卵密度

表 7 各地域におけるダイズシストセンチュウ卵密度の平均値及び最大値、最小値

調査地域		調査圃場数	ダイズシストセンチュウ卵密度 (卵/20 g 乾土)		
			平均値	最大値	最小値
埼玉県	鶴ヶ島市	4	61	133	27
	所沢市	5	27	40	11
	浦和市	8	289	722	50
	草加市	6	211	383	120
	三郷市	10	384	1305	66
	八潮市	20	323	3065	0
	行田市	6	128	725	0
	小川町	3	0	0	0
神奈川県	相模原市	6	1310	3956	90
	三浦市	3	1598	13746	981
千葉県	君津市	2	812	1255	368

2.4 考察

本研究におけるエダマメ栽培圃場のダイズシストセンチュウ調査では、本線虫が発生している可能性のある圃場を中心に調査を行った。既往の研究における圃場の選択基準は明確ではないが、栽培圃場の調査結果と比較すると、ダイズ栽培圃場の平均検出率 43.4%（相場, 2001; 相場, 2002; 相場, 2004; 相場, 2006）に対してエダマメ栽培圃場では 86.3%と約 2 倍の検出率であった。この検出率の差の原因として、水田転換畑におけるダイズ栽培の影響が考えられる。ダイズ栽培における水田転換畑の面積割合は平成 23 年から平成 27 年の平均値で 62%と高い割合であり、ダイズシストセンチュウは水田における湛水処理により密度が低下することが分かっている（酒井ら, 1987; 清水ら, 1988）。また、ダイズではダイズシストセンチュウ抵抗性品種があり、既往の研究から抵抗性品種を導入することでダイズシストセンチュウ密度を低減できることが示されている（橋本ら, 1988）。実際に関東で導入できるダイズシストセンチュウ抵抗性品種として、ナカセンナリや東山 230 号、東山 234 号等の品種がある（農林水産省, 2015）。このため、水田利用による湛水処理やダイズ栽培で利用される抵抗性品種の導入等の要因によりダイズ栽培圃場とエダマメ栽培圃場との間でダイズシストセンチュウの検出率に差が生じているものと推察される。

2.5 第 2 章要約

関東圏のエダマメ栽培圃場を中心としてダイズシストセンチュウを調査したところ、調査圃場の 86.3%から本線虫が検出された。既往の研究ではダイズ栽培圃場においてダイズシストセンチュウの調査を実施しており、これまでのいくつかの報告をまとめると関東圏の調査圃場のうち 43.4%で本線虫が検出されていた。エダマメ栽培圃場と比較してダイズ栽培圃場で本線虫の検出率が低くなる原因としてはダイズの栽培圃場の約 60%が水田転換畑であるため、湛水処理によってダイズシストセンチュウ密度が抑制されていることやダイズ栽培において導入される抵抗性品種によって密度が低減されていることが推察された。これらのことから、水田転換や抵抗性品種を導入できないエダマメ栽培圃場においては本線虫が高頻度で存在しているものと考えられる。

3. 植物寄生性線虫及び土壌理化学性とエダマメ収量との関係

3.1 目的

ダイズシストセンチュウと宿主作物との関係は既に報告されており、ダイズシストセンチュウ密度が高くなると収量が減少する傾向になることが分かっている(Chen *et al.*, 2001; Francé & Dropkin, 1986)。しかし、これまで報告されているダイズシストセンチュウ密度の推定にはふるい分け法が用いられており、顕微鏡下で夾雑物中からシストを分離し、シストを破壊して内蔵される卵を計数する必要がある非常に手間の掛かる方法である。そのため、迅速に多検体を分析するためにボールミル・リアルタイム PCR 法による密度測定の結果と宿主作物の収量との関係を調査し、ボールミル・リアルタイム PCR 法を用いた場合の要防除水準を新たに設定する必要がある。

また、ダイズシストセンチュウ以外の植物寄生性線虫（キタネグサレセンチュウやサツマイモネコブセンチュウ等）がダイズに被害を与えることが知られており（Shmitt & Barker, 1981; Kinroch, 1982）、エダマメにおいても他の植物寄生性線虫が被害を及ぼす可能性がある。そのため、ダイズシストセンチュウ密度を調査すると同時に他の植物寄生性線虫密度についても調査する必要がある。ダイズの収量には土壌の化学性も関係しており、既存の報告においては土壌が高 pH であると収量が減少することや交換態のリンやカリウム等が収量を増加させることが示されている（Rogovsca *et al.*, 2007; Villami *et al.*, 2012）。今回調査対象地域とした埼玉県施設促成栽培のエダマメ圃場の一部では土壌表面に塩類の集積が見られたため、土壌化学性がエダマメの収量に影響することも考慮し、いくつかの土壌化学性の項目を設けて関係性を解析した。

本章の目的は

- 1) ダイズシストセンチュウとエダマメ収量との関係から要防除水準を設定すること
- 2) 他の植物寄生性線虫密度とエダマメ収量との関係を明らかにすること
- 3) 施設栽培エダマメ圃場の土壌化学性を把握するとともにエダマメ収量への影響を調査すること

以上の3点である。

3.2 材料と方法

3.2.1 調査対象地域及び調査方法

調査対象とした地域は埼玉県三郷市・八潮市とし、施設栽培エダマメ圃場において調査した。表8に調査圃場の概要を示す。調査は2014年及び2015年に実施した。調査では圃

場内に 1m² (1 m×1 m) のプロットを作成し、プロット内において栽培前の土壌採取を行った。土壌試料は土壌深度 0-30 cm を対象とし、1 プロット内から 5 地点の土壌を採取及び混合して 1 試料とした。持ち帰った土壌試料は 2 mm でふるい、60℃で 24 時間乾燥した後、ボールミルにより粉碎した土壌を供試土壌とした。収穫時には同様のプロット内において収量調査用のエダマメを採取した。収量調査は、株から莢を外した後に莢の重量を測定した。単位面積当たりの株数を計測して栽植密度を求め、莢の重量から単位面積当たりの収穫量を計算した。2014 年度では 6 圃場を対象に 29 プロットを調査し、2015 年度では 5 圃場を対象に 45 プロットを調査した。

表 8 調査圃場の概要

調査年	生産者 ID	プロット数	定植時期	前作
2014	A	2	2月	ネギ
	B	4	2月	レタス
	C	4	2月	コマツナ
	D	5	2月	コマツナ
	E	4	3月	コマツナ
	F	10	3月	コマツナ
2015	G	9	2月	ホウレンソウ
	H	9	2月	コマツナ
	I	10	2月	コマツナ
	J	8	3月	コマツナ
	K	9	3月	コマツナ

3.2.2 植物寄生性線虫及び土壌化学性の分析項目

植物寄生性線虫はダイズシストセンチュウ及びキタネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウを対象にボールミル・リアルタイム PCR 法により密度を測定した。表 9 にリアルタイム PCR の密度測定における各線虫のプライマー及びサイクル条件を示す。

土壌の化学性は塩類集積がみられたことから、pH (H₂O)、電気伝導度 (EC)、硝酸態窒素、水溶性カリウム、水溶性カルシウム、可給態リン酸を測定した。pH (H₂O)、EC、硝酸態窒素、水溶性カリウム、水溶性カルシウムは蒸留水と土壌を 1 : 5 (w/w) で混合し、200 rpm で 1 時間振とうした後に No.5C のろ紙 (東洋ろ紙会社) でろ過した溶液を分析に供試した。pH (H₂O) 及び EC の測定はコンパクト pH メーター及び EC メーター (堀場製作所) を用い、硝酸態窒素及び水溶性カリウム、水溶性カルシウムはそれぞれ LAQUA twin、硝酸イオンメーター (B-741、堀場製作所 (以下同様))、カリウムイオンメーター (B-731)、カルシウムイオンメーター (B-751) を用いて測定した。

表 9 リアルタイム PCR の密度測定における各線虫のプライマー及びサイクル条件

植物寄生性線虫	プライマー	配列	サイクル条件	引用文献
ダイズシストセンチュウ (<i>Heterodera glycines</i>)	SCNf	5'-ctagcgttggcaccaccaa-3'	95°C-10 s	Goto <i>et al.</i> (2009)
	SCNr	5'-aatgttgggcagcgccac-3'	95°C-5 s 60°C-20 s x 40 cycles	
キタネグサレセンチュウ (<i>Pratylenchus penetrans</i>)	NEGf	5'-attccgtccgtggttgctatg-3'	95°C-20 s	Sato <i>et al.</i> (2011a)
	NEGr	5'-gccgagtgtaccaccgataag-3'	95°C-3 s 62°C-30 s x 40 cycles	
ネコブセンチュウ (<i>Meloidogyne</i> spp.)	RKNf	5'-gctggtgtctaagtgttgctgatac-3'	95°C-10 s	Min <i>et al.</i> (2011)
	RKNr	5'-gagcctagtgtaccaccgataag-3'	95°C-5 s 60°C-20 s x 40 cycles	

3.2.3 解析方法

植物寄生性線虫密度及び土壌化学性とエダマメ収量との関係は単相関分析により解析を行った。また、収量に関係する因子を重み付けするために重回帰分析（ステップワイズ法・増減法）を行った。統計解析には エクセル統計 for Windows ver.1.10 を使用した。

3.3 結果

3.3.1 植物寄生性線虫及び土壌化学性の分析結果

ダイズシストセンチュウは全てのプロットで検出され、2014 年と 2015 年の密度は 17～9068/20g 乾土の範囲であった（表 10）。キタネグサレセンチュウは 69 プロットと大半のプロットで検出されており、2014 年と 2015 年の密度は 5～79 頭/20g 乾土の範囲であった。ネコブセンチュウはプロット全体の約 1/3 にあたる 26 プロットで検出されており、2014 年と 2015 年の密度は 1～93 頭/20g 乾土の範囲であった。

表 10 植物寄生性線虫密度の分析結果（平均値±標準偏差）

調査年	生産者 ID	ダイズシストセンチュウ (eggs/20 g dry soil)			キタネグサレセンチュウ (J2/20 g dry soil)			ネコブセンチュウ (J2/20 g dry soil)		
2014	A	109	±	13	24	±	8	0	±	0
	B	145	±	29	38	±	3	2	±	3
	C	177	±	113	33	±	5	1	±	3
	D	440	±	382	31	±	4	0	±	0
	E	120	±	79	36	±	8	0	±	0
	F	1401	±	2298	46	±	7	13	±	22
2015	G	83	±	17	50	±	13	59	±	29
	H	70	±	15	55	±	21	36	±	32
	I	83	±	96	22	±	17	8	±	16
	J	3093	±	2581	43	±	21	9	±	17
	K	172	±	299	36	±	25	4	±	12

土壌化学性では 2014 年と 2015 年において pH(H₂O)で 5.76～7.36、EC で 0.27～1.36 mS/cm、硝酸態窒素で 19～641 mg/kg 乾土、水溶性カリウムで 40～550 mg/kg 乾土、水溶性カルシウムで 133～2608 mg/kg 乾土の範囲であった（表 11）。

表 11 土壌化学性の分析結果（平均値±標準偏差）

調査年	生産者 ID	pH (H ₂ O)			EC (mS/cm)			硝酸態窒素 (mg/kg dry soil)		
2014	A	7.4	±	0.0	0.74	±	0.18	146	±	21
	B	6.5	±	0.0	0.48	±	0.05	73	±	22
	C	6.9	±	0.0	0.67	±	0.17	180	±	33
	D	6.6	±	0.1	0.80	±	0.26	65	±	29
	E	6.7	±	0.1	0.36	±	0.08	129	±	60
	F	6.2	±	0.2	0.64	±	0.19	85	±	30
2015	G	6.9	±	0.1	0.37	±	0.08	109	±	71
	H	6.7	±	0.1	0.95	±	0.19	421	±	127
	I	6.1	±	0.0	1.22	±	0.13	162	±	47
	J	6.3	±	0.2	0.65	±	0.20	33	±	25
	K	6.9	±	0.1	0.91	±	0.11	225	±	53
調査年	生産者 ID	水溶性カリウム (mg/kg dry soil)			水溶性カルシウム (mg/kg dry soil)			可給態リン酸 (mg/kg dry soil)		
2014	A	455	±	134	394	±	20	22	±	5.9
	B	96	±	13	640	±	99	8.7	±	6.0
	C	69	±	21	1339	±	378	10	±	2.8
	D	172	±	67	901	±	130	56	±	13
	E	159	±	72	366	±	268	13	±	6.0
	F	70	±	21	1261	±	397	1.0	±	0.0
2015	G	211	±	52	426	±	153	-		
	H	111	±	35	1291	±	349	-		
	I	245	±	54	2280	±	361	-		
	J	86	±	23	1357	±	473	-		
	K	119	±	31	1659	±	395	-		

3.3.2 植物寄生性線虫密度及び土壌化学性とエダマメ収量との関係

2014 年度調査における植物寄生性線虫とエダマメ収量との関係では、ダイズシストセンチュウ及びキタネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウと収量との間に負の相関が認められた ($p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ 、図. 5)。2014 年度調査における土壌化学性とエダマメ収量との関係では、pH (H₂O) 及び水溶性カリウムとの間に正の相関が認められ ($p < 0.001$ 、 $p < 0.05$)、EC と水溶性カルシウムとの間に負の相関が認められた ($p < 0.01$ 、 $p < 0.001$)。

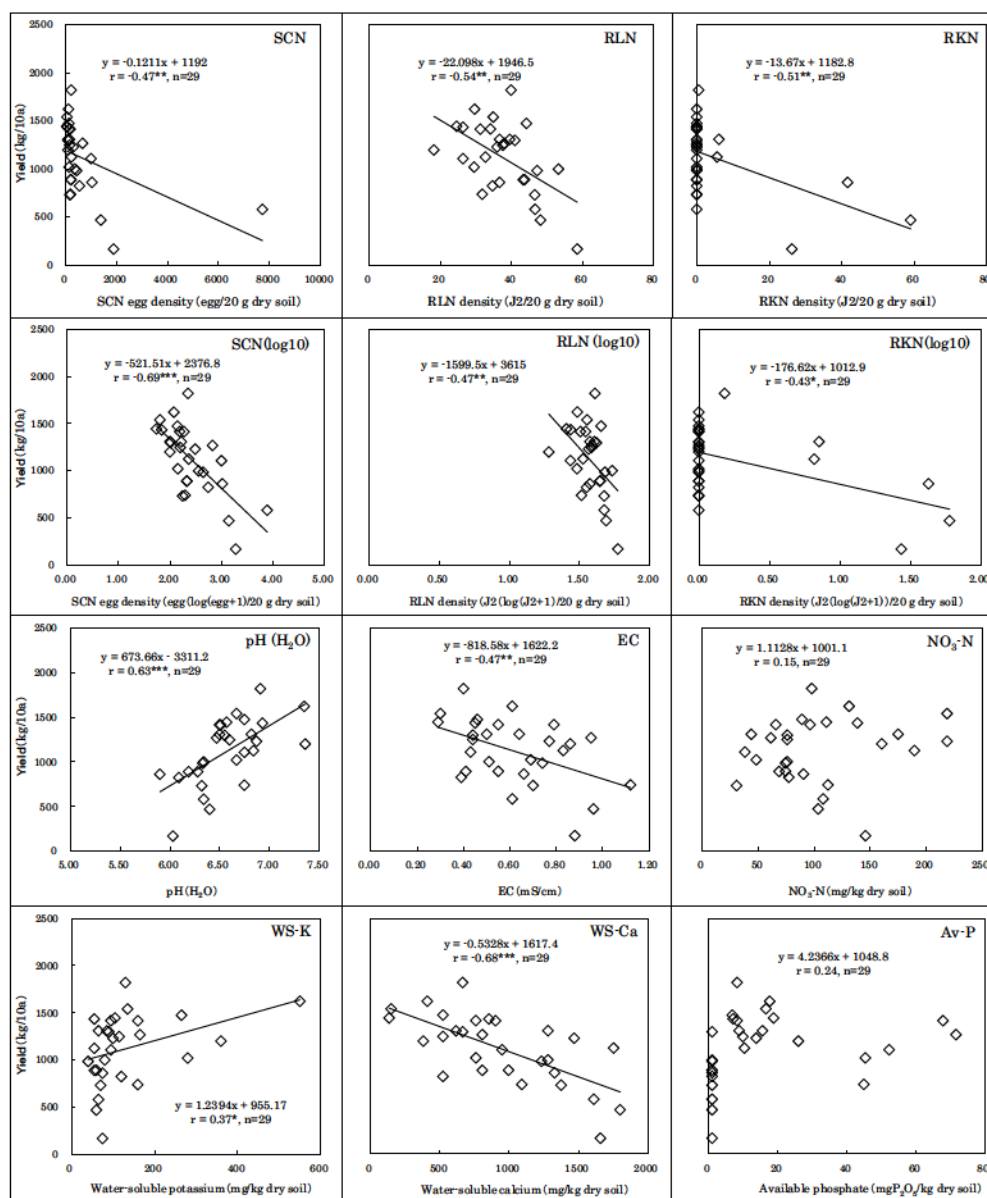


図. 5 2014 年度調査における植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係

(SCN : ダイズシストセンチュウ、RLN : キタネグサレセンチュウ、RKN : ネコブセンチュウ、NO₃-N : 硝酸態窒素、WS-K : 水溶性カリウム、WS-Ca : 水溶性カルシウム、Av-P : 可給態リン酸

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)

2015 年度調査における植物寄生性線虫とエダマメ収量との関係では、ダイズシストセンチュウ及びキタネグサレセンチュウとエダマメ収量との間に負の相関が認められた ($p < 0.001$ 、 $p < 0.01$, 図. 6)。2015 年度調査における土壌化学性とエダマメ収量との関係では、EC 及び水溶性カリウム、水溶性カルシウムとエダマメ収量との間に正の相関が認められた ($p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ 、)。

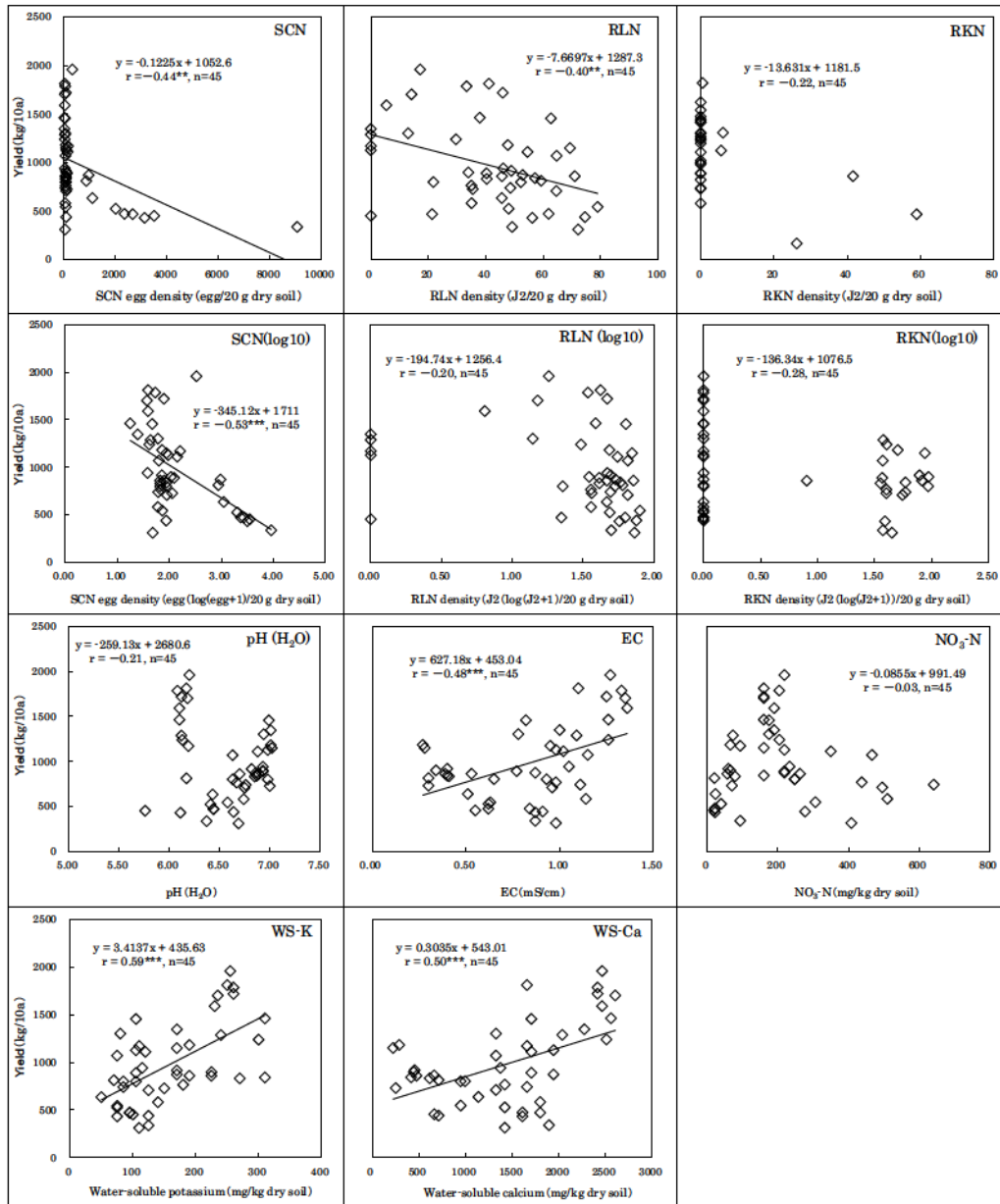


図. 6 2015 年度調査における植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係

(SCN : ダイズシストセンチュウ、RLN : キタネグサレセンチュウ、RKN : ネコブセンチュウ、
NO₃-N : 硝酸態窒素、WS-K : 水溶性カリウム、WS-Ca : 水溶性カルシウム、Av-P : 可給態リン酸
* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)

2014 年度及び 2015 年度調査における植物寄生性線虫とエダマメ収量との関係では、ダイズシストセンチュウ及びキタネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウと収量との間に負の相関が認められた (図. 7、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.01$)。2014 年度及び 2015 年度調査における土壌化学性とエダマメ収量との関係では、水溶性カリウムとエダマメ収量との間に正の相関が認められた ($p < 0.001$)。

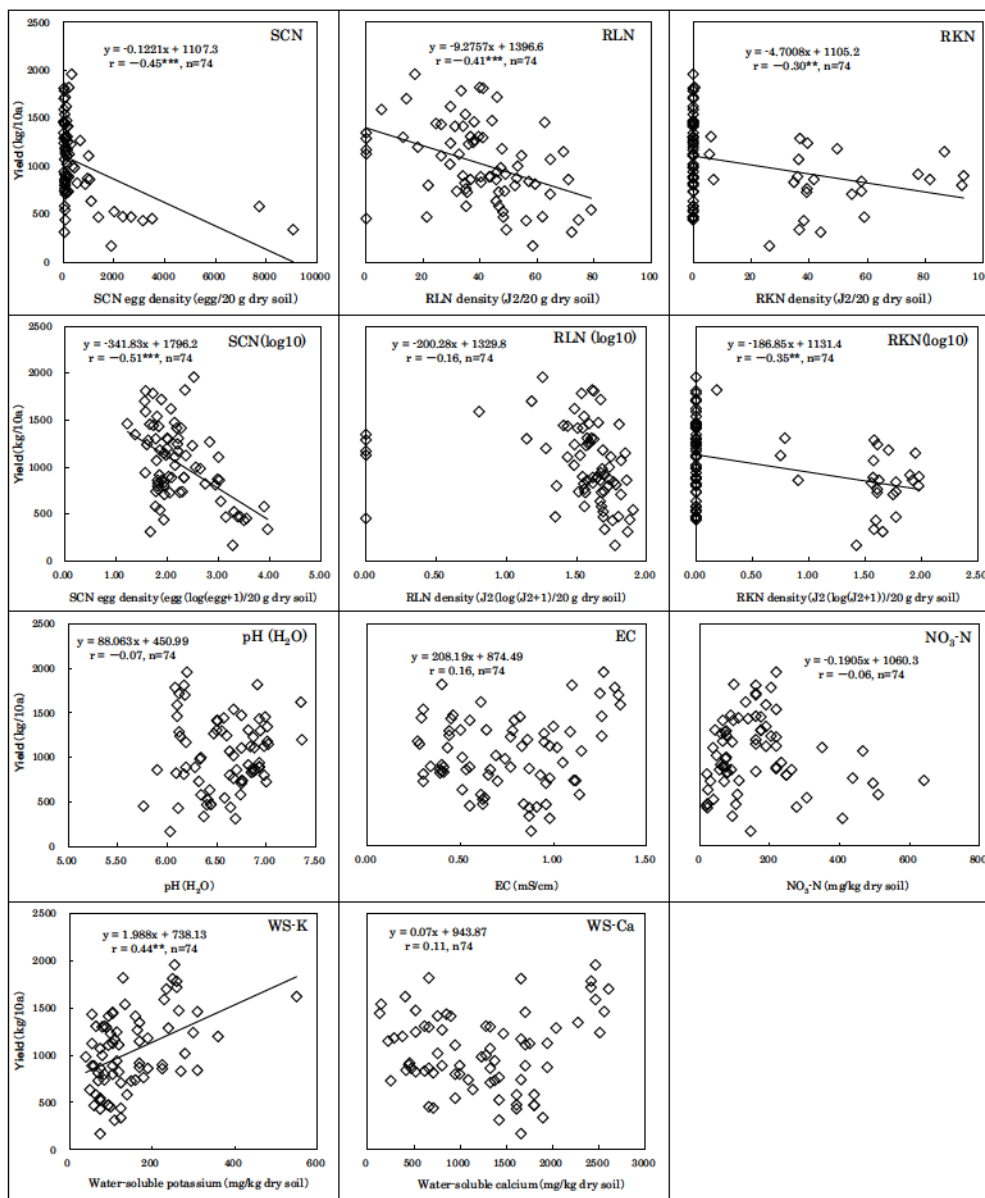


図. 7 2014 年度及び 2015 年度調査における植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係

(SCN : ダイズシストセンチュウ、RLN : キタネグサレセンチュウ、RKN : ネコブセンチュウ、NO₃-N : 硝酸態窒素、WS-K : 水溶性カリウム、WS-Ca : 水溶性カルシウム、Av-P : 可給態リン酸

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)

植物寄生性線虫において、ダイズシストセンチュウ、キタネグサレセンチュウはいずれのデータセットにおいてもエダマメ収量との間に負の相関を示した（表 12）。ネコブセンチュウにおいては 2014 年度においてエダマメ収量との間に負の相関が認められた。土壌化学性では、水溶性カリウム濃度とエダマメ収量との間で両年において正の相関が認められ一定の傾向を示した。pH（H₂O）では 2014 年度にエダマメ収量との間に正の相関が認められた。水溶性カルシウム及び EC では 2014 年度においてエダマメ収量との間に負の相関が認められた。

表 12 各調査年度及び両年度における植物寄生性線虫及び

土壌化学性とエダマメ収量間の相関関係

		枝豆収量				2014 & 2015	
		2014		2015			
		r	P	r	P	r	P
植物寄生性線虫	SCN	-0.47	**	-0.44	**	-0.45	***
	SCN (log10)	-0.69	***	-0.53	***	-0.51	***
	RLN	-0.54	**	-0.40	**	-0.41	***
	RLN (log10)	-0.47	**	-0.20		-0.16	
	RKN	-0.51	**	-0.22		-0.30	**
	RKN (log10)	-0.43	*	-0.28		-0.35	**
土壌化学性	pH (H ₂ O)	0.63	***	-0.21		0.07	
	EC	-0.47	**	0.48	***	0.16	
	NO ₃ -N	0.15		-0.03		-0.06	
	WS-K	0.37	*	0.59	***	0.44	***
	WS-Ca	-0.68	***	0.50	***	0.11	
	Av-P	0.24		—		—	

（SCN：ダイズシストセンチュウ、RLN：キタネグサレセンチュウ、RKN：ネコブセンチュウ、NO₃-N：硝酸態窒素、WS-K：水溶性カリウム、WS-Ca：水溶性カルシウム、Av-P：可給態リン酸、

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ ）

3.3.3 定植時期別の植物寄生性線虫とエダマメ収量との関係

前節でダイズシストセンチュウ密度とエダマメ収量との関係を解析したが、2年間のデータセットを用いて解析したところ、ダイズシストセンチュウ卵密度が13~100卵/20g乾土の密度でエダマメ収量が310~1811kg/10aと大きく異なり、相関係数も -0.51 ($p < 0.001$)と低かったため、本節ではこの原因を検討した。

ダイズシストセンチュウの孵化は温度に強く依存することが知られており、これまでの報告によると孵化に最適な温度は概ね 25°C 前後である(岡田, 1977; Alston & Schmitt, 1988)。ダイズシストセンチュウと比較して、他の植物寄生性線虫の孵化適温はキタネグサレセンチュウでは $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ (Pudasaini *et al.*, 2008)、サツマイモネコブセンチュウで 12°C (Goodell and Ferris, 1989)とダイズシストセンチュウと比較して低い。このため、定植時期によって被害に関与する植物寄生性線虫が異なるとの仮説を立てた。施設エダマメ栽培の定植時期は概ね2月と3月に分かれたため、2月定植のデータと3月定植のデータに分けて、植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係を解析した。

2月定植エダマメのデータでは、キタネグサレセンチュウ及びネコブセンチュウ密度とエダマメ収量との間に負の相関が認められた ($p < 0.05$, 図. 8)。また、土壌化学性では硝酸態窒素含量とエダマメ収量との間に負の相関関係が認められた ($p < 0.01$)。

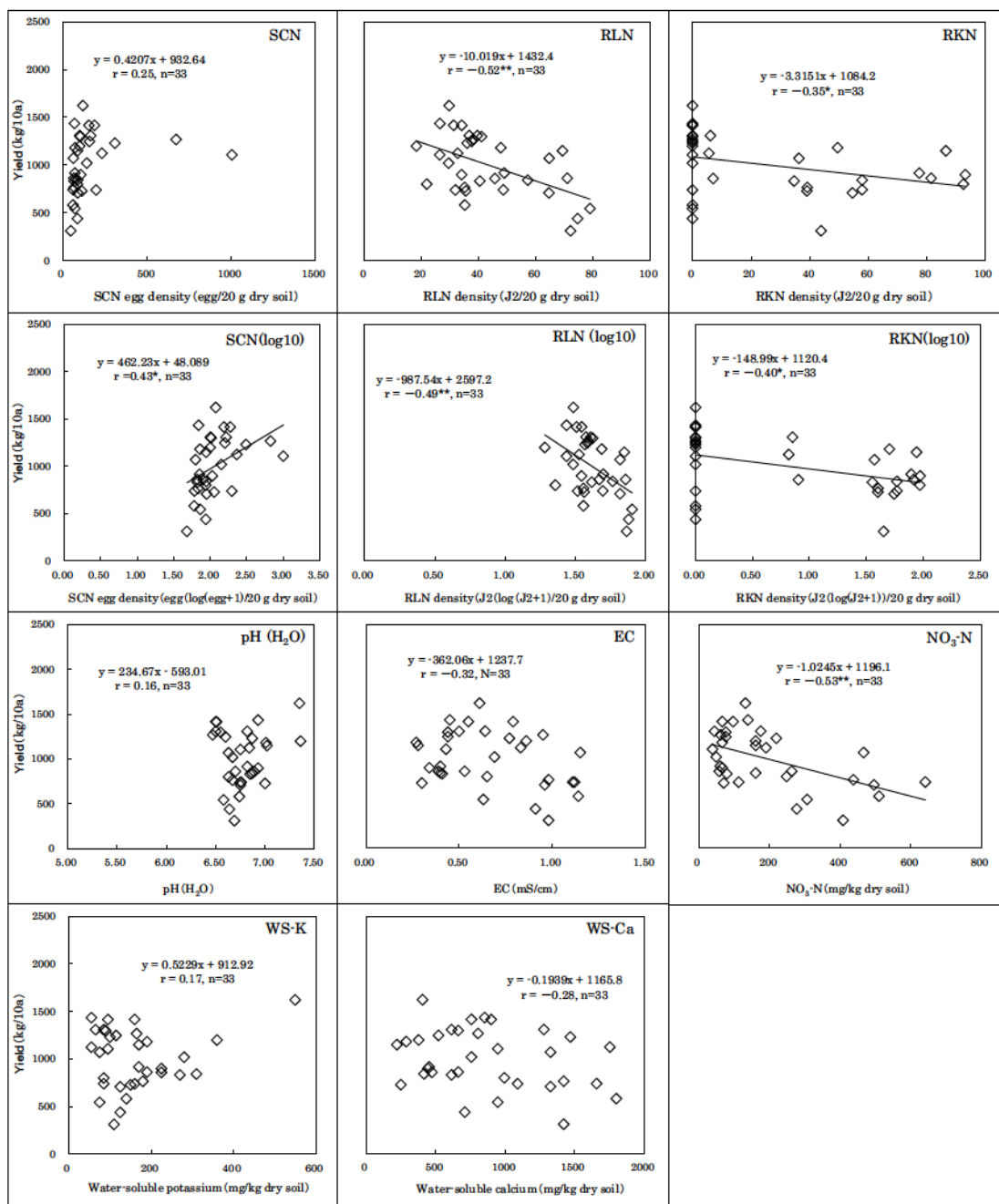


図. 8 2014 年度および 2015 年度の 2 月定植エダマメにおける
植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係

(SCN : ダイズシストセンチュウ、RLN : キタネグサレセンチュウ、RKN : ネコブセンチュウ、
NO₃-N : 硝酸態窒素、WS-K : 水溶性カリウム、WS-Ca : 水溶性カルシウム、Av-P : 可給態リン酸、

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)

3月定植エダマメのデータでは、ダイズシストセンチュウ及びキタネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウとエダマメ収量との間に負の相関が認められた ($p < 0.05$, 図. 9)。土壌化学性においては、EC 及び硝酸態窒素、水溶性カリウムとエダマメ収量との間に正の相関が認められた ($p < 0.05$)。

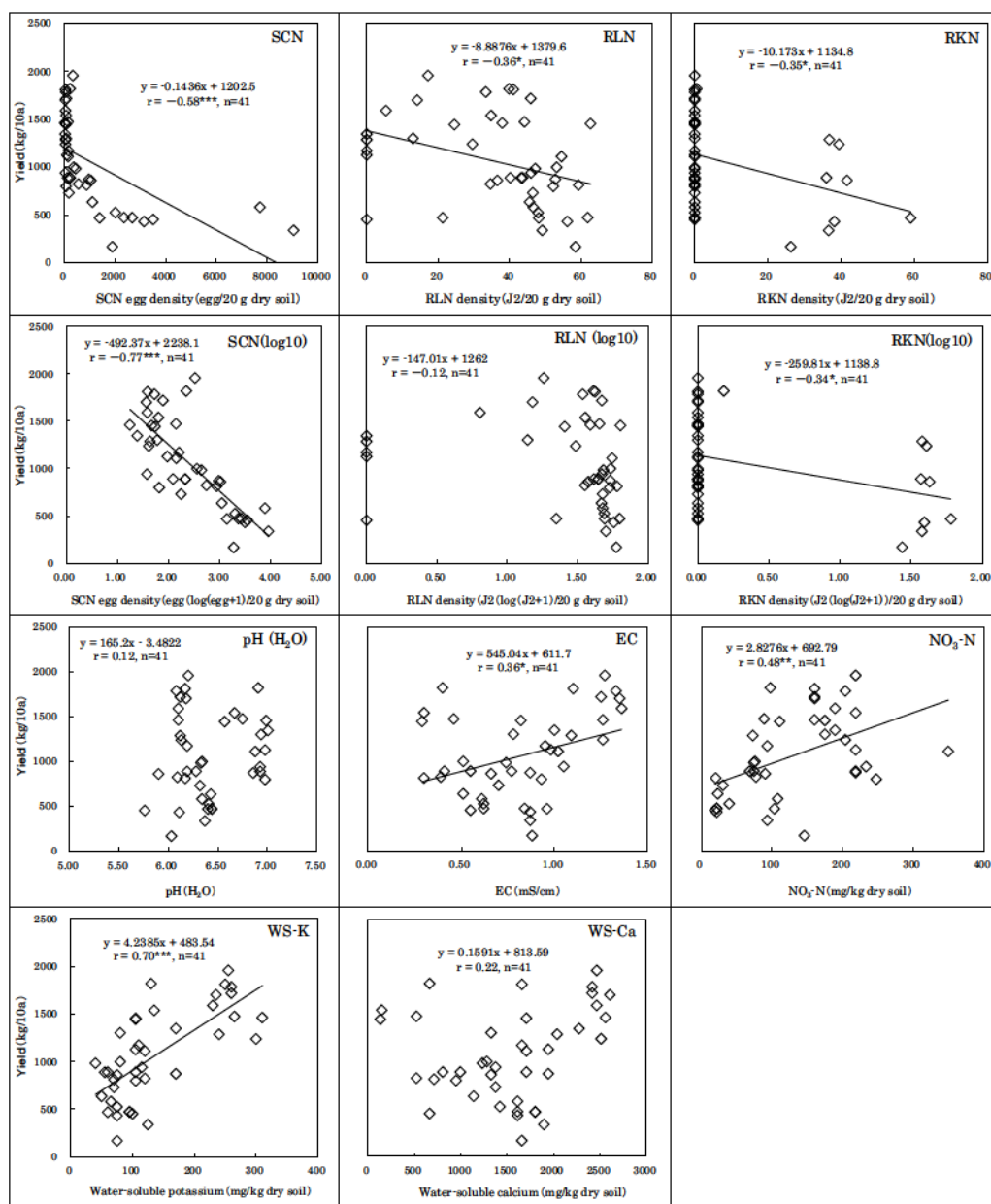


図. 9 2014 年度および 2015 年度の 3 月定植エダマメにおける
植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係

(SCN : ダイズシストセンチュウ、RLN : キタネグサレセンチュウ、RKN : ネコブセンチュウ、
NO₃-N : 硝酸態窒素、WS-K : 水溶性カリウム、WS-Ca : 水溶性カルシウム、Av-P : 可給態リン酸、
* $p < 0.05$ 、 ** $p < 0.01$ 、 *** $p < 0.001$)

2月定植の場合と3月定植の場合を比較すると、ダイズシストセンチュウにおいてエダマメ収量との関係が逆転しており、3月定植のデータではエダマメ収量と負の相関を示した ($p < 0.001$, 表 13)。また、硝酸態窒素においても定植時期によりエダマメ収量との関係が逆転しており、2月定植のデータではエダマメ収量に対して負の相関を示した ($p < 0.01$) のに対して、3月定植のデータではエダマメ収量に対して正の相関を示した ($p < 0.01$)。

表 13 2014 年度及び 2015 年度の 2 月定植及び 3 月定植における
植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量間の相関関係

		枝豆収量			
		2月定植		3月定植	
		r	P	r	P
植物寄生性線虫	SCN	0.25		-0.58	***
	SCN (log10)	0.43	*	-0.77	***
	RLN	-0.52	**	-0.36	*
	RLN (log10)	-0.49	**	-0.12	
	RKN	-0.35	*	-0.35	*
	RKN (log10)	-0.40	*	-0.34	*
土壌理化学性	pH (H ₂ O)	0.16		0.12	
	EC	-0.32		0.36	*
	Nitrate	-0.53	**	0.48	**
	WS-K	0.17		0.70	***
	Ws-Ca	-0.28		0.22	

(SCN : ダイズシストセンチュウ、RLN : キタネグサレセンチュウ、RKN : ネコブセンチュウ、
NO₃-N : 硝酸態窒素、WS-K : 水溶性カリウム、WS-Ca : 水溶性カルシウム、Av-P : 可給態リン酸、
* $p < 0.05$ 、 ** $p < 0.01$ 、 *** $p < 0.001$)

3.3.4 定植時期別の推定地温とダイズシストセンチュウ孵化適温との関係

前節で定植時期別に植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係を解析した結果、2月定植の場合はダイズシストセンチュウとエダマメ収量との間に負の相関が認められず、3月定植の場合は同関係において負の相関が認められた。このためダイズシストセンチュウ密度とエダマメ収量との関係における2月定植と3月定植の違いについて検討を行った。

ダイズシストセンチュウの孵化は温度に依存することが知られており、これまでの報告によると孵化に最適な温度は概ね25℃前後である（岡田, 1977; Alston & Schmitt, 1988）。そこで、2014年10月から11月の外気温（越谷アメダス）と施設内地温（実測）の関係を解析したところ、相関係数が0.79（ $p < 0.001$ ）であったため、越谷アメダスの外気温のデータから施設内地温を推定した。なお10月から11月の施設内地温は外気温と比較して平均で約2℃高かったことから、推定に際しては外気温に2℃を加算して推定地温とした。また、推定した最高地温がダイズシストセンチュウの孵化適温である25℃以上に達する積算日数を求めた。解析は2014年度及び2015年度調査時のエダマメの定植時期である2月中旬から3月下旬とし、極早生及び早生エダマメの一般的な生育過程から収穫日を仮定して行った（表14）。

表14 仮定した定植日及び想定される生育ステージ

定植時期	仮定した定植日と生育ステージ		
	定植日	開花日 定植後35日	収穫日 開花後40日
2月中旬	2月15日	3月21日	5月1日
2月下旬	2月25日	3月31日	5月10日
3月上旬	3月5日	4月10日	5月20日
3月中旬	3月15日	4月20日	5月30日
3月下旬	3月25日	4月30日	6月10日

※熊本野菜振興協会の極早生・早生枝豆の定植日と経過日数による生育ステージをもとに編集

いずれの年度においても 2 月中旬及び 2 月下旬では推定される開花期もしくは開花期以降にダイズシストセンチュウの孵化適温に達する日数が増加しており、3 月に定植した場合では定植直後もしくは開花期以前に孵化適温に達する日数が増加し始めた（図. 10, 図. 11）。また、25℃以上に達する積算日数では 2 月中旬から下旬では 9～18 日であるのに対して、3 月上旬から下旬では 23～46 日であった（表 15）

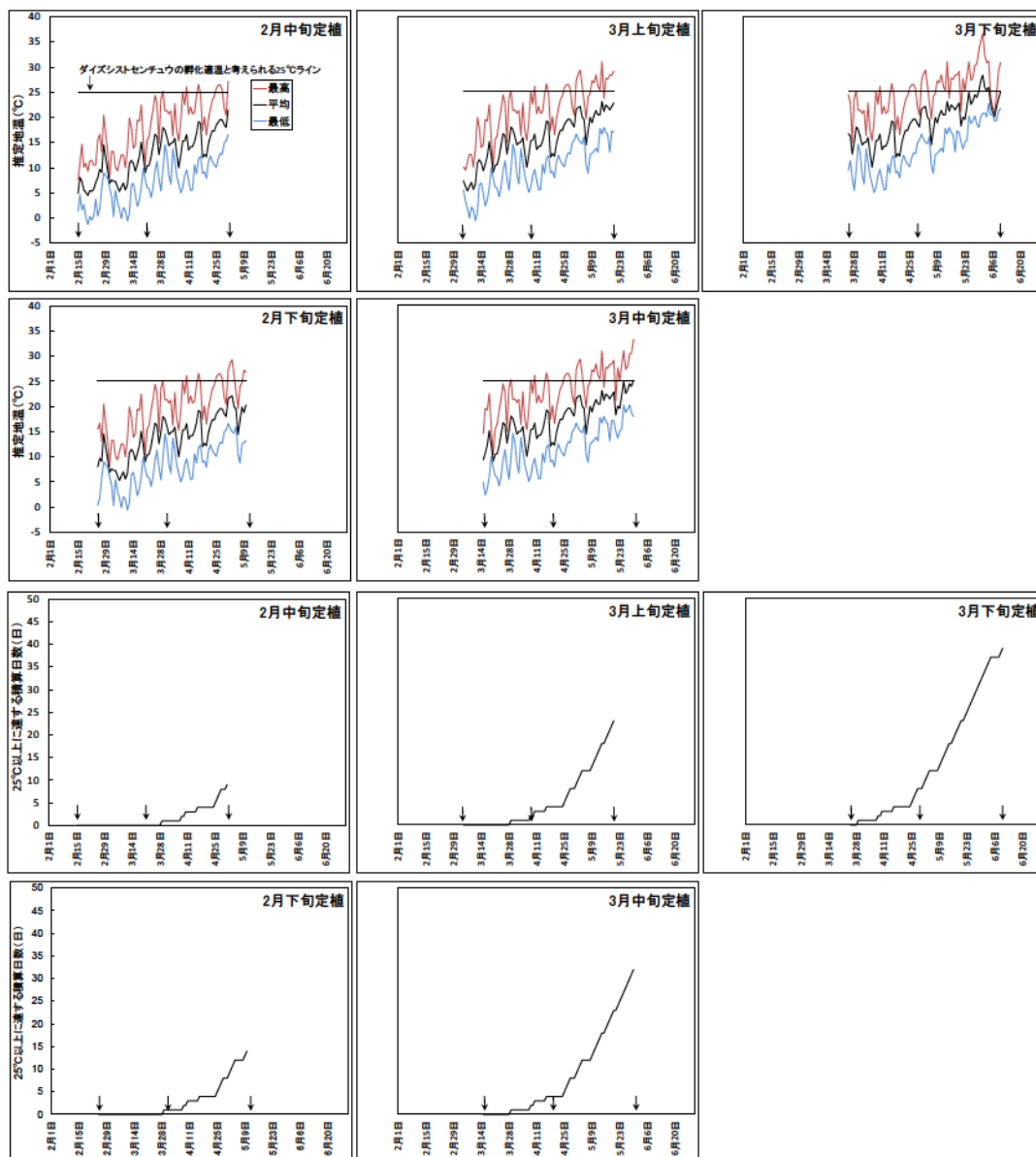


図. 10 2014 年度の推定地温及び推定地温が 25℃以上に達する積算日数の推移

(↓：左から順に推定される定植日、開花日、収穫日を示す)

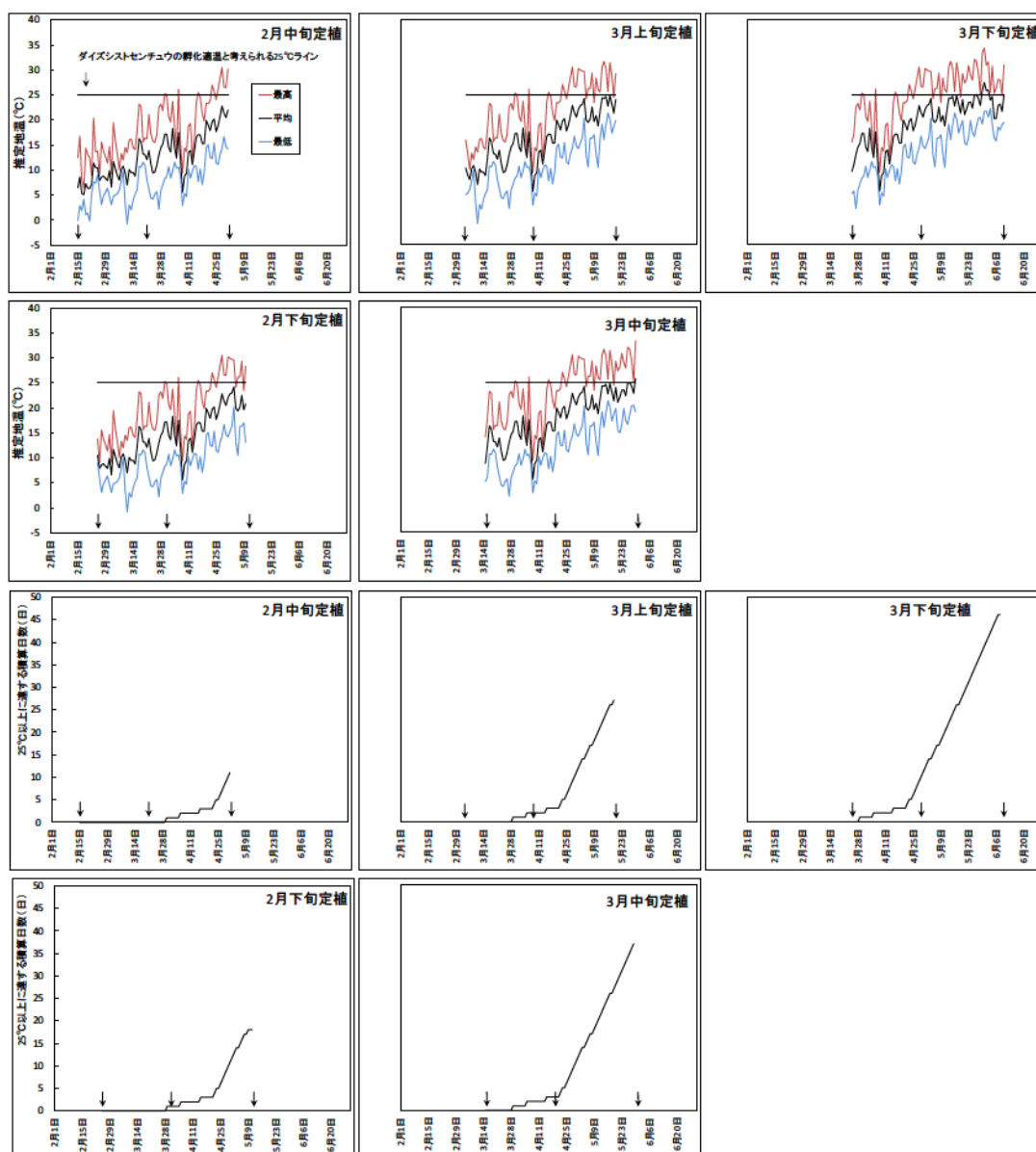


図. 11 2015 年度の推定地温及び推定地温が 25℃以上に達する積算日数の推移
(↓：左から順に推定される定植日、開花日、収穫日を示す)

表 15 各年度における推定地温の積算日数

定植日(仮定)		開花日 定植後35日	収穫日 開花後40日	25℃以上に達する 積算日数(日)	
				2014年	2015年
2月中旬	2月15日	3月21日	5月1日	9	11
2月下旬	2月25日	3月31日	5月10日	14	18
3月上旬	3月5日	4月10日	5月20日	23	27
3月中旬	3月15日	4月20日	5月30日	32	37
3月下旬	3月25日	4月30日	6月10日	39	46

3.3.5 重回帰分析による定植時期別の減収要因の推定

これまでに単相関分析を行い、植物寄生性線虫及び土壌化学性とエダマメ収量との関係を解析したが、多数の因子とエダマメ収量間で関係が認められた。そのため、定植時期別に重回帰分析を行い、減収に関与する因子の推定及び重み付けをおこなった。変数の選択はステップワイズ法（増減法）によりおこない、説明変数は植物寄生性線虫としてダイズシストセンチュウ、キタネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウを、土壌化学性としてpH（H₂O）、EC、硝酸態窒素、水溶性カリウム、水溶性カルシウムとし、目的変数をエダマメ収量とした。

2月に定植をしたデータセットにおいて選択された説明変数はキタネグサレセンチュウ及び硝酸態窒素であり、いずれも収量に対して負に働く変数であった（表16）。また、標準偏回帰係数の値ではキタネグサレセンチュウ及び硝酸態窒素で同程度の値であった。3月に定植をしたデータセットにおいて選択された説明変数はダイズシストセンチュウ及び水溶性カリウムであり、ダイズシストセンチュウがエダマメ収量に対して負に働き、水溶性カリウムがエダマメ収量に対して正に働く変数として選択された。

表 16 定植時期別の重回帰分析結果

定植時期	説明変数	偏回帰係数	SE	標準偏回帰係数	P value	R ²
2月	切片	1443	126	-	***	0.39
	RLN	-7.01	2.99	-0.37	*	
	硝酸態窒素	-0.73	0.30	-0.38	*	
	Y =(-7.01×RLN)+(-0.73×硝酸態窒素) +1443					
3月	切片	1589	229	-	***	0.70
	SCN (log10)	-353	68	-0.56	***	
	水溶性カリウム	2.32	0.65	0.38	**	
	Y =(-353×SCN(log10))+(2.32×水溶性カリウム) +1589					

(SCN : ダイズシストセンチュウ、RLN : キタネグサレセンチュウ、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)

3.3.6 ボールミル・Real-time PCR 法によるダイズシストセンチュウ要防除水準の作成

ダイズシストセンチュウとエダマメ収量との関係が得られた 3 月定植のデータセットを用いて回帰式及び回帰モデルの 95%信頼区間を求めて、減収曲線を作成した。なお、減収率を求めるにあたり、SCN 卵密度が 17~40 卵と比較的低密度の条件で栽培されたエダマメの平均収量 1441 kg/10a を 100%として減収曲線を求めた。得られた回帰式は決定係数が 0.6006 ($n=41$, $p < 0.001$) であった (図. 12 左)。減収曲線では 5%減収で 58 卵/20 g 乾土 (以下単位同様)、10%減収で 81 卵、20%減収で 160 卵、30%減収で 316 卵、40%減収で 624 卵、50%減収で 1233 卵であった (図. 12 右)。

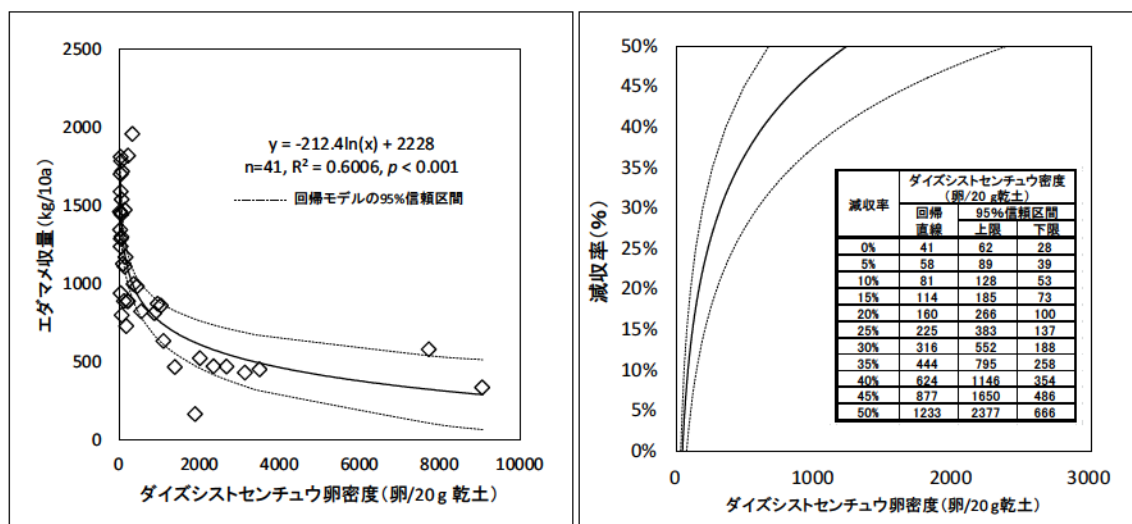


図. 12 ダイズシストセンチュウ卵密度とエダマメ収量の関係 (左) 及び減収曲線 (右)

3.4 考察

2年間の調査において、調査年ごとに解析した結果ではダイズシストセンチュウ及びキタネグサレセンチュウとネコブセンチュウとエダマメ収量との間に関係性が得られたものの、ダイズシストセンチュウの孵化適温に着目して定植時期別にデータを分離することで異なる関係性が得られた。3月定植のデータセットにおいてはダイズシストセンチュウとエダマメ収量との間に関係性が得られ、EC ($r = 0.36, p < 0.05$)、硝酸態窒素 ($r = 0.48, p < 0.01$)、水溶性カリウム ($r = 0.70, p < 0.001$) と収量との間に正の相関が認められ、重回帰分析においても水溶性カリウムが収量を増加させる働きのある因子として選択された。既往の研究においても、ダイズシストセンチュウが存在する圃場で尿素を用いて窒素を3~7 kg/10a追肥することで対照区と比較してダイズの収量が3~32%改善されたこと（江村ら, 1992）や土壌中のカリウム濃度がダイズ収量と正の相関を示すことが報告されている（Avendano *et al.*, 2004）。今回の結果においてもダイズシストセンチュウによる減収被害が発生しやすい状況下（ダイズシストセンチュウの孵化適温になる日数が多い条件下）においては栄養塩類が豊富に存在していた方が減収の程度が軽くなることを示している。

対照的にダイズシストセンチュウの孵化適温に達しにくいと考えられる2月定植時期のデータセットにおいては、ダイズシストセンチュウとエダマメ収量との間に関係性が認められず、重回帰分析の結果でもキタネグサレセンチュウが収量を低下させる因子として選択された。Schmitt & Barker (1981) によるとダイズではキタネグサレセンチュウ密度が6頭/20 g 乾土で5%減収に達し、今回得られたキタネグサレセンチュウとエダマメ収量との関係では、7頭/20 g 乾土で5%減収に達することから、同様の傾向である。また、土壌の化学性と収量との関係では栄養塩類が正の相関を示さず、硝酸態窒素がエダマメ収量と負の相関を示したことから、キタネグサレセンチュウによる減収被害は栄養塩類によって軽減されることがなく、独立的に塩類障害という形でエダマメの減収に関与しているものと推測される。しかし、重回帰分析の結果では決定係数が0.39と低く収量を予測する上では十分な精度ではなく、2月定植のエダマメ栽培については減収要因を再度検討する必要があると考えられる。

3月定植のデータセットを用いて重回帰式を求めた場合の決定係数は0.70、単回帰分析では0.60という精度であった。既往の報告で示されている重回帰式もしくは単回帰式の精度（決定係数）は0.56（Villamil *et al.*, 2012）、0.76（Chen *et al.*, 2001）、0.89（Francel & Dropkin., 1986）と幅があるが、今回得られた予測式の精度は概ねこの範囲に入っており、ダイズシストセンチュウによる減収被害を予測する上では適当な精度であると考えられる。

また、得られた要防除水準では 81 卵/20g 乾土の密度で 10%減収に達するという結果であった。この結果は串田ら（2010）が報告しているダイズシストセンチュウの 10%減収に達する SCN 密度（約 30 卵/20 g 乾土、ふるい分け法による密度推定）に近い結果であった。このため、Real-time PCR 法によるダイズシストセンチュウ密度の測定でもふるい分け法と同様にエダマメの減収被害を推定できるものと考えられる。

3.5 第 3 章要約

本章では、ボールミル・Real-time PCR 法を用いたダイズシストセンチュウの要防除水準を作成することを目的として、栽培前のダイズシストセンチュウ卵密度とエダマメ収量との関係を調査した。その結果、ダイズシストセンチュウとエダマメ収量との関係は定植時期別に異なっており、2 月に定植した場合はダイズシストセンチュウ卵密度とエダマメ収量との間に負の相関が認められないのに対して、3 月に定植した場合はダイズシストセンチュウ卵密度とエダマメ収量との間に負の相関が認められた ($R^2=0.60$ 、 $p<0.001$)。

2 月に定植した場合のエダマメ収量を説明する変数を重回帰分析によって解析したところ、キタネグサレセンチュウ密度及び硝酸態窒素含量がエダマメ収量に対して負に働く因子として選択された。同様に 3 月に定植した場合は、ダイズシストセンチュウ卵密度がエダマメ収量に対して負に働く因子として、水溶性カリウム濃度が正に働く因子として選択された。

定植時期別に関与する因子が異なる原因として、ダイズシストセンチュウに対する地温の影響が考えられた。推定した地温の結果から、2 月に定植した場合はダイズシストセンチュウの孵化適温と考えられる 25℃に達する日数が概ねエダマメの開花期以降に 9 日から 18 日と少なく、3 月に定植した場合は定植直後もしくは開花期以前から 25℃に達する日が発生し、その日数は 23 日から 46 日と 2 月に定植した場合よりも多かった。以上のことから、3 月に定植した場合にダイズシストセンチュウの孵化及びエダマメへの感染が多くなり、2 月定植のエダマメよりもダイズシストセンチュウを主とした減収被害が生じやすいと考えられる。また、ボールミル・Real-time PCR 法を用いたダイズシストセンチュウの要防除水準として、ダイズシストセンチュウ卵密度 81 卵/20 g 乾土であると 10%減収に達するとの推定結果が得られた。

4. ダイズシストセンチュウの生物的防除手法の開発

4.1 もやし残渣によるダイズシストセンチュウ防除手法の開発

目的

Toyota *et al.* (2013) により、もやし残渣を土壌に添加することで、ダイズシストセンチュウの孵化を促進し、土壌中において孵化個体（二期幼虫）が初期密度から最大約 14 倍まで増加することが示された。また、もやし残渣を 2 週間ごとに土壌に対して 1 % (w/w) 添加することで、実験開始から 8 週間で最大約 90 % のダイズシストセンチュウ卵を減少させることに成功しており、これは孵化した二期幼虫が貯蔵養分を使い果たして餓死していることを示している。

そこで本節では、もやし残渣において孵化促進効果の高い部位を選別し、密度低減効果の向上と添加回数を減少させることを目的として実験をおこなった。また、圃場においてももやし残渣の添加によりダイズシストセンチュウ卵密度を低減できるか試験を行った。

4.1.1 室内試験 もやしの部位別ダイズシストセンチュウ卵密度低減効果の検証

4.1.1.1 目的

もやしの生産工場やカット野菜の工場では葉の出ているもやしや出ていないもやし、食用部位や根など様々な形態のもやしが残渣として廃棄されている。そこで本節では、展葉の有無および、食用部位・根の部位の違いに着目し、それぞれのもやしについてダイズシストセンチュウ卵の孵化促進試験をおこない、孵化促進効果の高い残渣を選別した。

4.1.1.2 材料と方法

プラスチック容器に水を含ませた脱脂綿を置き、その上に緑豆もやしの種子（(株) サラダコスモから分譲された種子）を播種した。その後、暗条件下、25℃、3 日間、生育させて葉の出ているもやしを栽培した。その後、一部のもやしを明条件下に移し、室温、1 日間生育させ、展葉したもやしを栽培した（図. 13）。その後、各もやしを食用部と根に分け、供試するまで冷凍保存した。また、各もやしの栽培にもちいた脱脂綿から残っていた水分 50～75 ml を絞り出した（以下、脱脂綿液）。脱脂綿液はもやしの根から分泌される孵化促進物質を含む可能性があるため、冷凍保存し、試験に供試し、ダイズシストセンチュウに対する密度低減効果を検証した。

供試土壌は東京都にあるダイズシストセンチュウ汚染圃場から採取した土壌をもちいた（ダイズシストセンチュウ卵密度：5375±1547 卵/20 g 乾土、ボールミル・Real-time PCR 法により測定）。実験はアグリポット（直径 6.5 cm 高さ 5 cm）でおこなった。アグリポットに水分状態を最大容水量の 50 %に調節したダイズシストセンチュウ汚染土壌 50 g を充填し、展葉前・展葉後、各部位のもやし残渣をそれぞれ 1 g、脱脂綿液は 1 ml（いずれも重量比で 2 %）添加し、攪拌した。以上の処理に対し、なにも添加せずに攪拌のみおこなう実験区を対照区とした。実験期間は 4 週間とし、アグリポットの反復は 3、培養は BIOTRON LPH-200 において 25℃定温でおこなった。もやし残渣の添加後 2 週間、4 週間の時点（実験終了）で土壌 10 g を採取し、ベルマン法により線虫を抽出し、自由生活性線虫およびダイズシストセンチュウ二期幼虫の個体数を計数した。また、4 週間経過した時点（実験終了時）に残った土壌を 60℃で乾燥させ、そのうち 20 g をボールミル・Real-time PCR 法に供試し、土壌中のダイズシストセンチュウ卵密度を測定した。



図. 13 供試したもやしの食用部位と根（左：展葉前，右：展葉後）

4.1.1.3 結果

自由生活性線虫の個体数の推移では、時間経過（2週間後および4週間後）、葉の展開の有無に関わらず、食用部を添加することで平均密度 7977~10399 頭/20 g 土壌（以下、単位同様）、根を添加することで 2733~3163 頭、脱脂綿液では 239~293 頭であった（図. 14）。分散分析の結果では、食用部、根、脱脂綿液の順に自由生活性線虫数が多くなる結果となった ($p < 0.05$)。

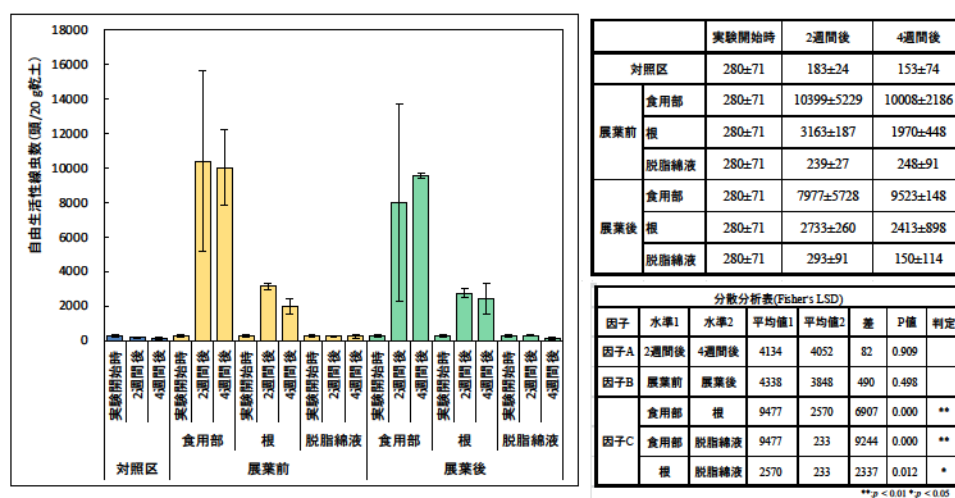


図. 14 各もやしおよび脱脂綿液を添加した際の自由生活性線虫数の推移及び各添加物が自由生活性線虫数に及ぼす影響（平均値±標準偏差）

ダイズシストセンチュウ二期幼虫数は2週間経過した時点で、葉の展開の有無、部位に関わらず、対照区と比較して2~4倍の密度となった（図. 15）。しかし、4週間経過した時点では、二期幼虫数は対照区と比較して統計的に有意な差はなかった。分散分析の結果においても葉の展開の有無や部位によって二期幼虫数に違いはみられず、添加物の違いによる差は見られなかった（表 17）。

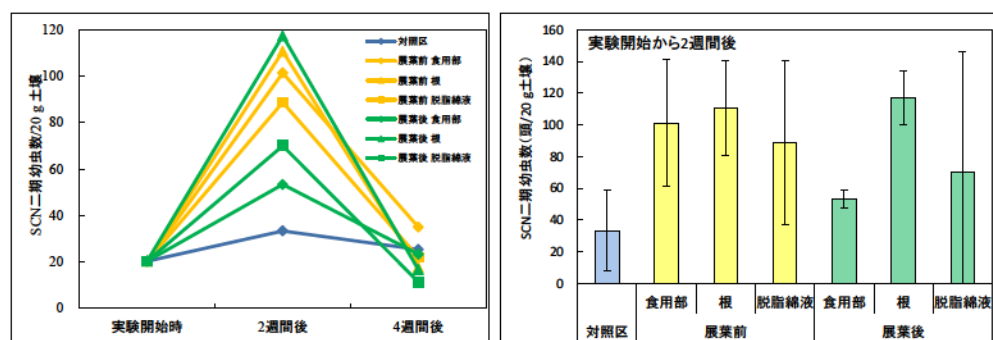


図. 15 各もやしおよび脱脂綿液を添加した際のダイズシストセンチュウ二期幼虫数の推移（左）及び実験開始から2週間後の二期幼虫数の比較（右、平均値±標準偏差）

表 17 各もやしおよび脱脂綿液を添加した際のダイズシストセンチュウ二期幼虫数の推移（左、平均値±標準偏差）及び各添加物がダイズシストセンチュウ二期幼虫数に及ぼす影響

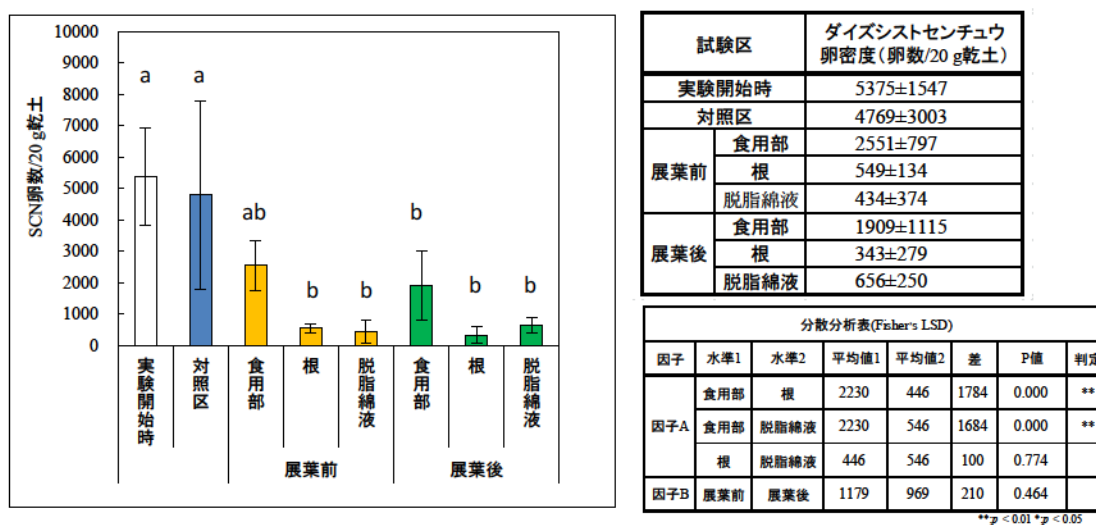
		実験開始時	2週間後	4週間後
対照区		20±4	33±25	25±15
展葉前	食用部	20±4	101±40	35±9
	根	20±4	111±30	18±9
	脱脂綿液	20±4	89±52	22±5
展葉後	食用部	20±4	53±6	23±12
	根	20±4	117±17	17±13
	脱脂綿液	20±4	70±76	11±12

分散分析表(Fisher's LSD)							
因子	水準1	水準2	平均値1	平均値2	差	P値	判定
因子A	2週間後	4週間後	90	21	69	0.000	**
因子B	展葉前	展葉後	63	49	14	0.192	
因子C	食用部	根	53	66	12	0.341	
	食用部	脱脂綿液	53	48	5	0.684	
	根	脱脂綿液	66	48	18	0.178	

**p < 0.01 *p < 0.05

** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

実験開始から 4 週間後において展葉の有無に関わらず、ダイズシストセンチュウ卵数が対照区と比較して食用部で約 1/2、根と脱脂綿液において約 1/10 まで減少した（図. 16）。また、分散分析の結果から展葉の有無に関わらず食用部よりも根ならびに脱脂綿液においてダイズシストセンチュウ卵数が減少した。



** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

図. 16 実験開始から 4 週間後における各添加物がダイズシストセンチュウ卵数の減少に与える影響（共通のアルファベットを含まない間で有意差あり，Fisher's LSD $p < 0.05$ ）及び添加物の違いおよびもやしの展葉の有無がダイズシストセンチュウ卵数に及ぼす影響

4.1.1.4 考察

展葉の有無に関わらず、もやし残渣の食用部を添加した際には自由生活性線虫密度が実験開始時から2週間後及び4週間後において28～30倍に増加したのに対して、根を添加することで7～11倍、脱脂綿液では顕著な増加は認められなかった。このため、自由生活性線虫の増殖を促すもやし残渣の部位はもやしの食用部、根の順であり、脱脂綿液では増殖を促す効果はないと考えられる。

ベルマン法によって抽出したダイズシストセンチュウ二期幼虫数では、対照区よりも各実験区で二期幼虫数が増加した。これは、各もやしおよび脱脂綿液を添加したことで実験開始から2週間後においてダイズシストセンチュウ卵の孵化が促進され、一時的に二期幼虫数が増加したものと推察される。しかし、もやしの各部位及び脱脂綿液を添加した試験区間で抽出された二期幼虫数に差がなかったことから、ベルマン法による結果では孵化促進効果の高い部位は明確ではなかった。

4週間後のボールミル・Real-time PCR法によるダイズシストセンチュウ卵数の測定結果では、展葉の有無に関わらず、食用部よりも根および脱脂綿液においてダイズシストセンチュウ卵の減少が顕著であった。このことから、根に由来する部位において高い孵化促進効果があると考えられる。しかし、実験開始から2週間後にベルマン法で抽出されたダイズシストセンチュウ二期幼虫数が約100頭/20g乾土であるのに対して、4週間後のボールミル・Real-time PCR法では2500～4500卵/20g乾土の範囲でダイズシストセンチュウが減少しており、孵化促進効果によって得られると想定される二期幼虫数に対して、減少したダイズシストセンチュウ卵数との間に大きな差があった。堤（1969）では、宿主が存在しない条件下でダイズシストセンチュウ二期幼虫を25頭/20g土壌の密度で土壌へ接種して経時的にベルマン法により抽出した。その結果では、接種直後から接種15日後まではベルマン法で二期幼虫が検出されたが、接種後15日を超えると二期幼虫は検出されなかったとされている（堤, 1969）。以上のことから、2週間経過した段階でダイズシストセンチュウの二期幼虫は運動性を失い、既に餓死及び分解に至っている可能性が考えられた。そのため次節で経時的にボールミル・Real-time PCR法をおこない検証することにした。

4.1.2 室内試験 もやしの根に着目した添加量の検討

4.1.2.1 目的

前節において、もやしの食用部を添加することで実験開始時からのダイズシストセンチュウ卵密度の減少率は約 60%、根の部位を添加することで約 90%の減少率であった。このため、根の部位に高いダイズシストセンチュウ卵密度低減効果があると考えられた。

そのため本節では、もやしの根に着目し、ダイズシストセンチュウ卵の減少に対して適当であると考えられる添加量について実験をおこなった。

4.1.2.2 材料と方法

供試するもやしの根は前節で栽培及び冷凍保存したものをを用いた。

供試土壌は東京都にあるダイズシストセンチュウ汚染圃場から採取した土壌をもちいた（ダイズシストセンチュウ卵密度：4277±1693 卵/20 g 乾土）。実験はアグリポット（直径 6.5 cm 高さ 5 cm）をもちいた。アグリポットに水分状態を最大容水量の 50%に調節したダイズシストセンチュウ汚染土壌 70 g を充填し、もやしの根をそれぞれ 1%、3%、9% (w/w) 添加・攪拌した。以上の処理に対し、なにも添加せずに攪拌のみおこなう実験区を対照区とした。実験期間は 4 週間とし、アグリポットの反復は 3、培養は BIOTRON LPH-200 において 25℃定温でおこなった。

前節においてベルマン法によって測定したダイズシストセンチュウ二期幼虫数が実験終了時までには減少した卵数と大きな差があったため、本節では実験開始から 2 週間後及び 4 週間後にボールミル・Real-time PCR 法をもちいて、経時的に DNA 量を調べることにした。

実際の測定はもやし残渣の添加後 2 週間、4 週間経過した時点で土壌 35 g を採取し、ボールミル・Real-time PCR 法をおこない、土壌中のダイズシストセンチュウ卵密度を測定することにした。

4.1.2.3 結果

実験開始から、2週間後において対照区で初期密度（4277 卵/20 g 乾土、以下単位同様）から 2901 卵まで減少した（図. 17）。根の部位を添加した実験区では、1%添加区で 423 卵、3%添加区で 314 卵、9%添加区で 597 卵まで減少し、全ての実験区においてダイズシストセンチュウ卵数が減少した。その後、4週間経過した時点（実験終了時）では対照区では 3088 卵、1%添加区で 347 卵、3%添加区で 230 卵、9%添加区で 274 卵と2週間後から4週間後ではほぼ横ばいの推移であった。分散分析の結果では、時間経過（2週間後および4週間後）および添加量（1%、3%、9%（w/w））によってダイズシストセンチュウ卵数は約 400 卵～300 卵であり、統計的に有意な差は検出されなかった。実験開始時からの減少率では、対照区では約 30%、根の部位を添加した実験区においては添加量に関わらず、約 90%の減少率であった（図. 18）。

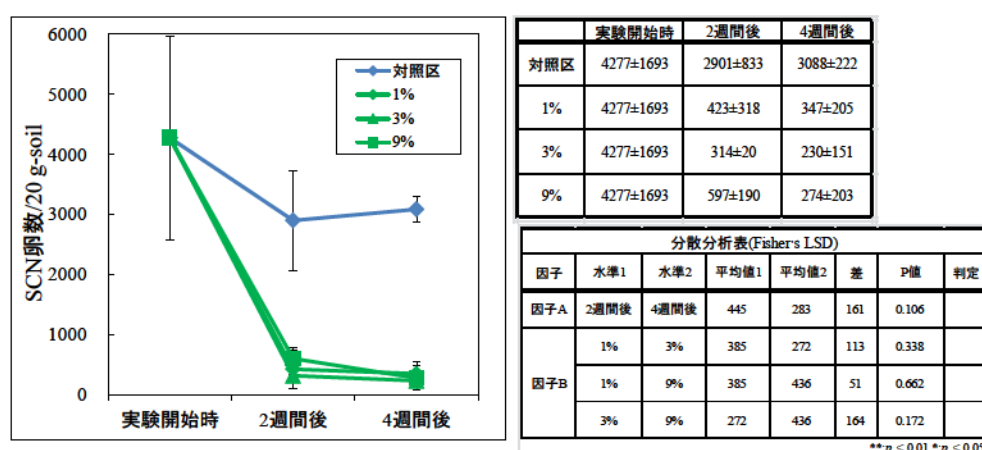


図. 17 もやし根を添加した際のダイズシストセンチュウ卵数の推移（平均値±標準偏差）及び時間経過ともやし根の添加量がダイズシストセンチュウ卵数に及ぼす影響（二元配置分散分析）

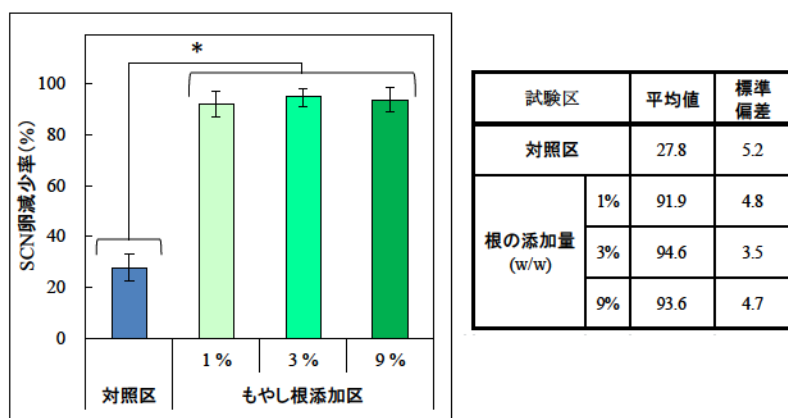


図. 18 実験開始時から実験終了時までのダイズシストセンチュウ卵の減少率（平均値±標準偏差、対照区との間に有意差あり、Shirley-Williams test、 $p < 0.05$ ）

4.1.2.4 考察

根の部位を添加した実験区（1%、3%、9%（w/w））において、2週間経過した時点でダイズシストセンチュウ卵数は実験開始時の約 1/10 まで減少した。このことから、実験開始から 2 週間までの間にダイズシストセンチュウ卵の孵化、二期幼虫の餓死および虫体の分解がおこなわれ、DNA が分解され、減少していると推察された。

このため、前節の実験において、実験開始から 2 週間後のベルマン法によって抽出されたダイズシストセンチュウ二期幼虫数と実験終了時にボールミル・Real-time PCR 法によって測定したダイズシストセンチュウ卵数の結果との間に大きな差ができたのは、2 週間経過した時点で大半の孵化した二期幼虫が運動性を失い、分解されていたことが原因であると推察される。

今回の実験結果から、1~9%の添加量では、全ての実験区で減少率が約 90 %であり、大きな差はなかった。そのため、実際の野外土壌への添加量は堆肥の施肥量を基準として、検討することにした。農林水産省が発表している、堆肥施肥量の目安は豚ふん堆肥および牛糞堆肥で 1~2 t/10 a である。作土層を土壌表層から 15 cm までと仮定し、今回の実験の添加量を換算すると、1% : 1.3 t/10 a、3% : 3.9 t/10 a、9% : 11.7 t/10 a となる。9%の添加量では堆肥の施肥基準の約 5 倍となり、土壌にすき込む労力を考慮すると現実的ではない。1% および 3% 程度が適当であると考え、実際の圃場に添加した際に密度低減効果が低下する可能性を考慮し、堆肥施肥基準の倍量にあたる 3%を実際の圃場試験に適用することとした。

4.1.3 圃場試験

4.1.3.1 目的

室内試験において、ダイズシストセンチュウ汚染土壌にもやし残渣を添加することでダイズシストセンチュウ卵密度を低減できることを明らかにした。そのため、圃場においてもやし残渣を添加することでダイズシストセンチュウ卵密度を低減できるか検証することを目的に圃場試験をおこなった。

4.1.3.2 材料と方法

試験は東京都府中市に位置するほ場にプロット（50 cm×50 cm）を設けておこなった（図. 19）。6つのプロットのうち3つはもやし残渣を添加し攪拌する実験区、残り3つは対照区として何も添加せずに土壌の攪拌のみおこなう実験区とした。

実験は2010年9月17日から開始した（エダマメ栽培後）。図. 20にもやし残渣添加のタイミングおよび土壌サンプリングのスケジュールを示す。もやし残渣添加によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果の検証は2010年9月から2011年6月までと2011年のエダマメ栽培後の8月から11月にかけておこなった。もやし残渣の添加量は1回の添加につき約1.2 kg/プロットとし、土壌のサンプリングはルートオーガーをもちいて土壌深度0-30 cmまでを対象とし、1プロットから3点採取後、1つのサンプリングバッグに入れて混合し、150 ～ 200 gをサンプルとして持ち帰った。

採取したサンプルは網目5 mmのふるいを通したものを60℃、24時間乾燥させ、ボールミル・Real-time PCR法に供試し、ダイズシストセンチュウ卵数を測定した。

最後に2011年4月26日に地温を上昇させる目的でもやし残渣を添加した後に透明ビニールのマルチをおこなった。

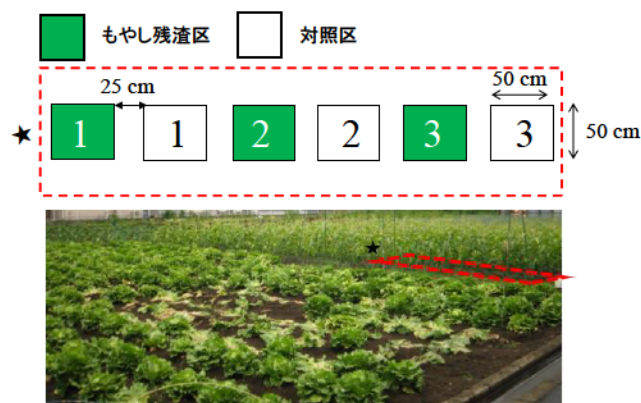


図. 19 もやし残渣区および対照区の模式図

		2010年 9月17日	10月2日	11月9日	12月9日	2011年 4月26日
もやし残渣添加	エダマメ 栽培終了	○	○	○	○	○ (マルチ有)
土壌サンプリング		○			○	○

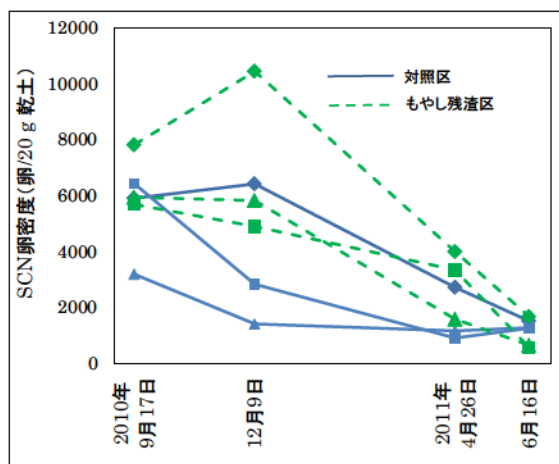
		6月16日	8月19日	8月25日	9月9日	11月10日
もやし残渣添加	エダマメ 栽培開始		エダマメ 栽培終了	○	○	
土壌サンプリング		○		○	○	○



図. 20 もやし残渣添加のタイミングおよび土壌サンプリングのスケジュール及び
4月26日の透明ビニールマルチの状況

4.1.3.3 結果および考察 (2010年9月～2011年6月)

9月から4月にかけてもやし残渣を4回添加したが、対照区と比較してダイズシストセンチュウ卵数の顕著な減少はみられなかった (図. 21)。4月から6月にかけてもやし残渣を1回添加したところでは、対照区がほぼ横ばいの推移であるのに対して、もやし残渣区では約70%の減少率であり、ダイズシストセンチュウ卵数が減少する傾向にあった。



		2010年		2011年	
採取日		9月17日	12月9日	4月26日	6月16日
備考					エダマメ 栽培開始時
対照区	1	5904	6415	2716	1511
	2	6418	2824	897	1247
	3	3186	1403	1155	1267
もやし 残渣区	1	7815	10444	3992	1668
	2	5678	4888	3335	559
	3	5934	5816	1573	643

図. 21 対照区およびもやし残渣区のダイズシストセンチュウ卵数の推移
(試験開始時 2010 年 9 月 17 日～エダマメ栽培開始時 2011 年 6 月 16 日、
土壌深度 0-30 cm、表中の数値は土壌 20 g あたりのダイズシストセンチュウ卵数)

対照区における減少率の平均値が 71%であるのに対して、もやし残渣添加区では 86 %の減少率であり、もやし残渣を添加することで 14%多くダイズシストセンチュウ卵数が減少した（図. 22）。エダマメ栽培開始時のダイズシストセンチュウ卵密度の比較では、対照区と比較すると、もやし残渣区のプロット 1 では、対照区と比較して顕著な差はなかったが、プロット 2 および 3 において対照区と比較して約 50%の卵密度となった（図. 23）。

9 月～4 月にかけてもやし残渣を添加することで対照区と比較して顕著な減少率を示さなかった。これは、ダイズシストセンチュウの孵化に温度が密接に関係していると考えられる。室内試験においてダイズシストセンチュウの孵化に対する温度の影響を調べた例では日中 26℃、夜間 22℃の条件下において最大の孵化率になることが示されている（Hill & Schmitt, 1989）。このため、もやし残渣を添加しても温度条件によって孵化が阻害されたものと推察される。

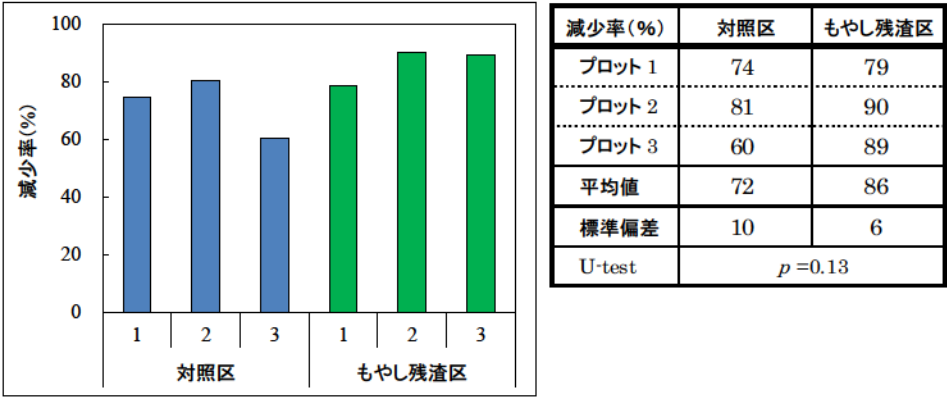


図. 22 対照区およびもやし残渣区におけるダイズシストセンチュウ卵減少率
(試験開始時 2010/9/17～エダマメ栽培開始時 2011/4/26、表中の数値は減少率 (%) を示す)

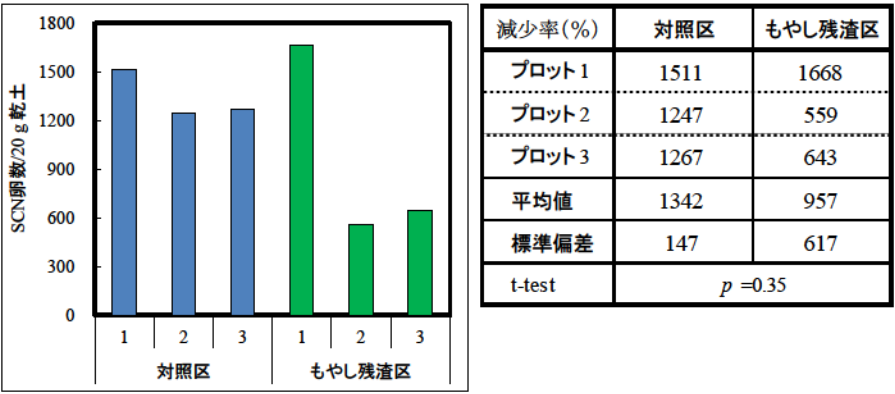


図. 23 エダマメ栽培開始時における対照区およびもやし残渣区のダイズシストセンチュウ卵数
(2011 年 6 月 16 日 土壌深度、0-30 cm)

4.1.3.4 結果および考察 (2011 年 8 月～11 月)

栽培後のダイズシストセンチュウ卵数では、対照区で 1370 卵/20 g 乾土であるのに対して、もやし残渣区において 6287 卵/20 g 乾土であり、もやし残渣区においてダイズシストセンチュウ卵数が多かった (図. 24)。8 月 25 日にもやし残渣を添加し、約 2 週間後の結果では、対照区がほぼ横ばいの推移であるのに対して、もやし残渣区では 68%の減少率であった。その後 9 月 9 日にもやし残渣を添加し、11 月 10 日までの推移は対照区において 70 %の減少率であり、もやし残渣区では 41%の減少率となり、対照区において減少率が高くなる傾向となった。8 月 25 日から 11 月 10 日までの減少率は対照区のプロット 1 において 81%と高い減少率となったが、プロット 2 および 3 では 43%および 55%の減少率であった (図. 25)。対照区に対してもやし残渣添加区ではプロット 1～3 において 80～90%の減少率であり、統計的に有意な差はないがもやし残渣添加区において減少率が 25%高くなる結果となった。

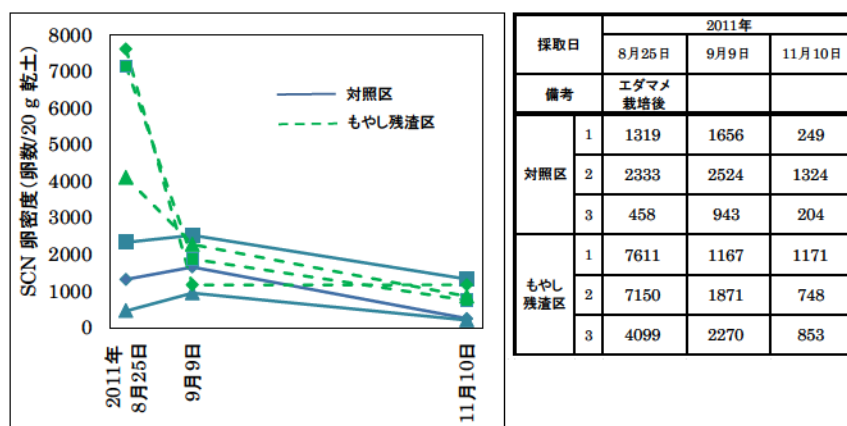


図. 24 対照区およびもやし残渣区のダイズシストセンチュウ卵数の推移 (エダマメ栽培終了後 2011/08/25 から 11/10 まで 土壌深度, 0-30 cm)

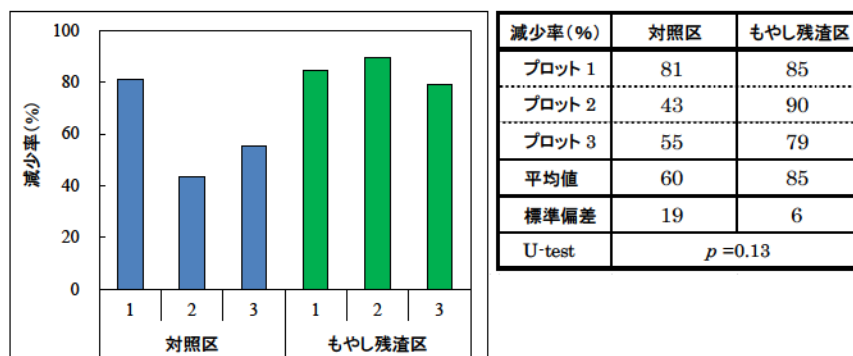


図. 25 対照区およびもやし残渣区のダイズシストセンチュウ卵の減少率 (エダマメ栽培終了後 2011 年 8/25 から 11/10 まで)

11月10日の卵密度では対照区のプロット2において約1300卵/20g乾土ともやし残渣区のプロット1（約1200卵/20g乾土）と同程度、もやし残渣区のプロット2および3では約800卵/20g乾土と対照区のプロット2よりも少ない卵数となった。もっともダイズシストセンチュウ卵数が少なくなったのは、対照区のプロット1および3であり約200卵/20g乾土であった。3プロットの平均では、対照区において約600卵/20g乾土、もやし残渣区では約900卵/20g乾土であり、統計的に有意な差はないが、もやし残渣区でダイズシストセンチュウ卵密度が高い結果となった。

8月25日以降にもやし残渣を添加することで、栽培後のダイズシストセンチュウ卵密度から、約80%減少した。ただし、対照区においても減少率が60%と高く、ダイズシストセンチュウ卵が自然状態もしくは土壌を攪乱することで孵化している、もしくは天敵微生物によって卵密度が減少しているものと推察される。

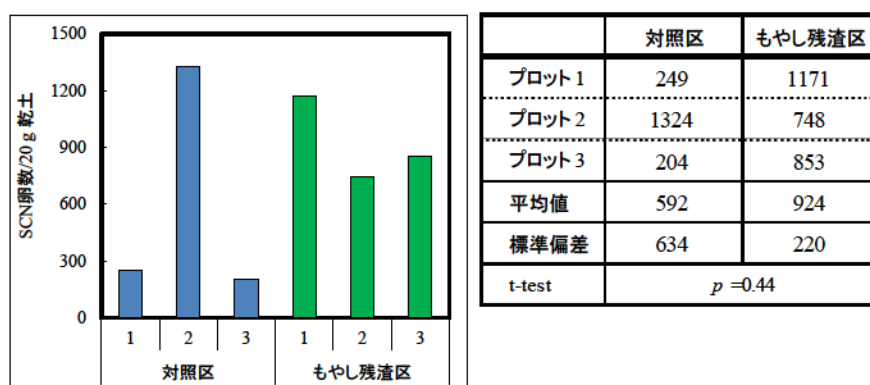


図. 26 エダマメ栽培終了（2011年8月25日）から約2ヶ月後（2011年11月10日）の対照区およびもやし残渣区のダイズシストセンチュウ卵数（0-30 cm）

4.2 もやし残渣振とう液によるダイズシストセンチュウ防除手法の開発

目的

これまでに、もやし残渣によるダイズシストセンチュウの防除について室内試験をおこなない、もやしにダイズシストセンチュウに対する密度低減効果があることが明らかになった。しかし、もやし残渣であると、土壤にすき込む必要があり、作物を栽培中に利用できない。

そこで、4.1.1 の室内試験において脱脂綿に含まれる溶液を土壤に添加した際にもダイズシストセンチュウ卵に対して密度低減効果があった点に着目した。ダイズシストセンチュウの孵化促進物質であるグリシノエクレピンAはインゲンの根に含まれる化合物であるが、インゲンの根以外から分泌される水溶性物質にも孵化促進効果があることが分かっている (Riga *et al.*, 2001)。脱脂綿液にもダイズシストセンチュウ卵密度低減効果が認められたことから、もやしに含まれる孵化促進物質も水溶性もしくは懸濁態の状態で存在しており、もやしと水を混合することで孵化促進効果を有する水溶液が得られると推測された。

そこで、もやし残渣と水を混合・振とうした溶液を作製した。溶液の状態であれば、非宿主植物を栽培中に土壤へ添加することでダイズシストセンチュウの卵密度低減を図ることができると考えられる。

本節において、作製した溶液を土壤に添加した際のダイズシストセンチュウ卵密度低減効果および植物への影響を室内試験及び圃場試験で明らかにし、振とう液の化学性を測定した。

4.2.1 室内試験 もやし残渣振とう液がダイズシストセンチュウ卵密度および植物体に及ぼす影響

4.2.1.1 目的

もやし残渣と水を混合・振とうした溶液を作製し、その溶液を土壤に添加することでダイズシストセンチュウ卵密度低減効果を検証した。また、他の作物を栽培中にもやし残渣振とう液を土壤に添加することを考慮し、植物の生育に対して、どのような影響を及ぼすか検証する目的で室内においてポット試験をおこなった。

4.2.1.2 材料と方法

もやし残渣振とう液の作製方法はサラダコスモから提供されたもやし残渣 (250 g) を刻

み、蒸留水（750 ml）と 1 : 3（w/w）の割合で混合し、200 rpm で 1 時間、振とうした。振とう後、No.2 のろ紙を用い、ろ過をおこない、もやし残渣を除去したものをもやし残渣振とう液（以下、振とう液）とした。

ポット試験は、直径 9 cm、容量 300 ml のビニール製のポットを用いた。そのポットにダイズシストセンチュウ汚染土壌を 150g 供試した。植物への影響を評価するために供試植物としてコマツナを 1 ポットあたり 5 個体成立させた。施肥はおこなわず、処理区はコマツナの栽培中、振とう液で散水し、対照区では蒸留水で散水をおこなった。散水の間隔は 2 日に 1 回、10 ml を散水した。なお、各実験区の反復は 5 とし、コマツナの栽培は BIOTRON LPH-200 内、25℃定温でおこなった。

実験開始から約 2 ヶ月経過した時点で試験を終了し、植物の掘り取りおよび土壌のサンプリングをおこなった。測定は掘り取る前にコマツナの SPAD 値（葉緑素含有量）を葉緑素計（SPAD-502、コニカミノルタセンシング社製）を用いて 5 個体、1 個体当たり 4 枚の葉を測定した。コマツナは地上部および地下部を掘り取り、水道水で根を洗浄した後に 80℃、24 時間乾燥させ、ポットごとにコマツナのバイオマスを測定した。土壌サンプルはポットごとにサンプリングし、ベルマン法による線虫の抽出をおこない、自由生活性線虫数およびダイズシストセンチュウ二期幼虫数を計数した。土壌サンプルの一部はボールミル・Real-time PCR によってダイズシストセンチュウ卵数の測定をおこなった。

4.2.1.3 結果

SPAD 値では、対照区において 36 であったのに対して、振とう液区において 46 であり、対照区と比較して振とう液区において SPAD 値が高くなる結果となった (図. 27、t-test、 $p < 0.05$)。植物体バイオマスでは、対照区において 0.40 g/pot であったのに対して振とう液区において 0.83 g/pot であり、対照区と比較して振とう液区で植物体バイオマスが約 2 倍に増加した (図. 28、t-test、 $p < 0.05$)。

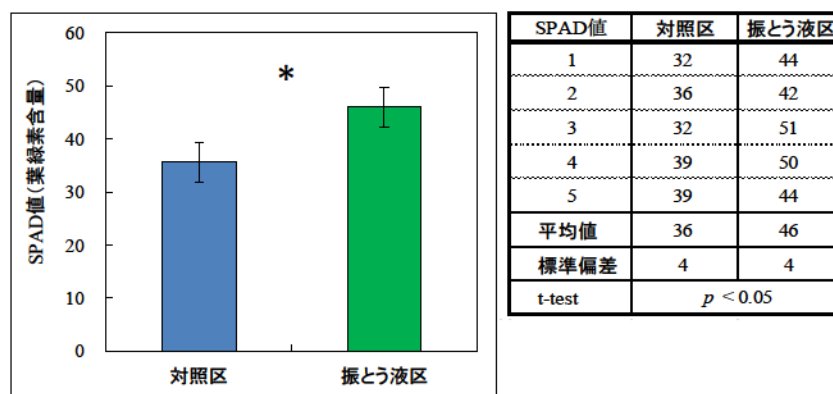


図. 27 振とう液添加による SPAD 値(葉緑素含量)への影響
(平均値±標準偏差、n=5 t-test, $p < 0.05$)

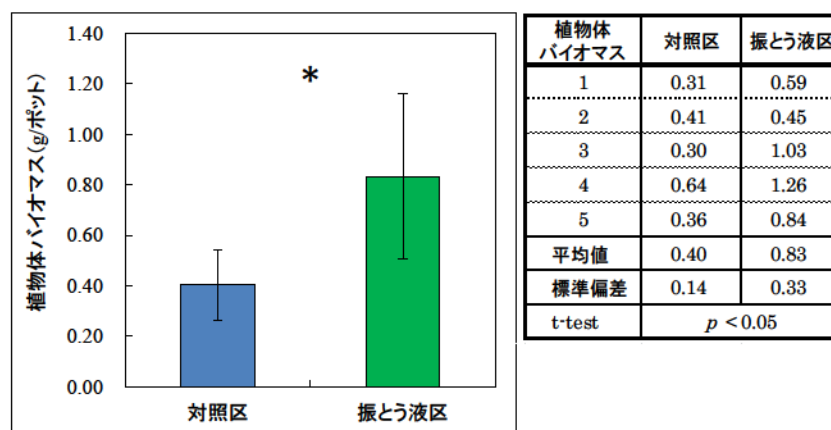


図. 28 振とう液添加による植物体バイオマスへの影響
(平均値±標準偏差、n=5 t-test, $p < 0.05$)

次に振とう液添加による線虫への影響について比較を行った。自由生活性線虫数は対照区において 341 頭/20 g 乾土（以下、単位同様）であったのに対して、振とう液区では 567 頭となり、対照区と比較して振とう液区において自由生活性線虫数が約 1.7 倍多くなった（図. 29, t-test, $p < 0.05$ ）。ダイズシストセンチュウ二期幼虫数では対照区で 22 頭であったのに対して振とう液区では 17 ± 6 頭となり、実験区間において統計的な差はなかった（図. 30, t-test, $p = 0.50$ ）。

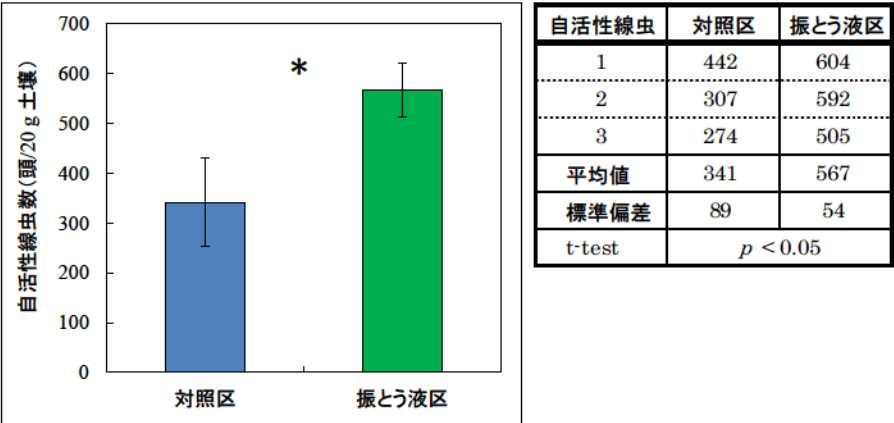


図. 29 振とう液添加による自活性線虫数への影響
(平均値±標準偏差, $n=3$ t-test, $p < 0.05$)

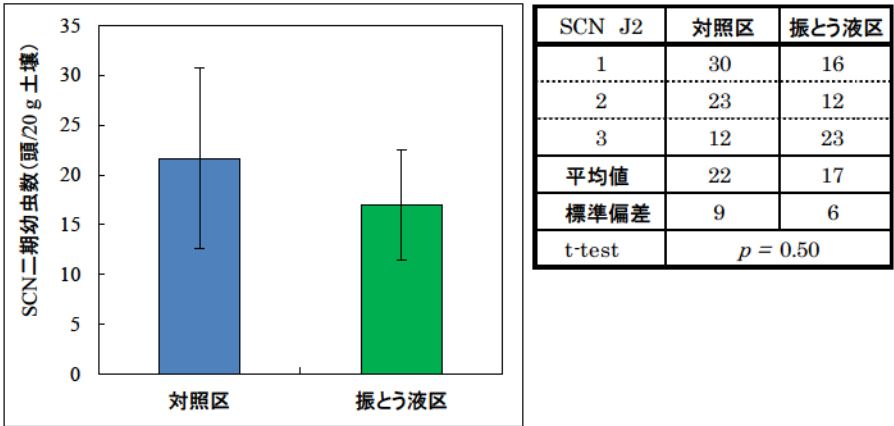


図. 30 振とう液添加によるダイズシストセンチュウ二期幼虫への影響
(平均値±標準偏差, $n=3$ t-test, $p = 0.50$)

最後に実験開始から 2 ヶ月後のダイズシストセンチュウ卵密度を比較すると、対照区では 1599 卵であるのに対して、振とう液区では 297 卵となり、対照区と比較して振とう液区においてダイズシストセンチュウ卵数が約 20%に減少する結果となった (図. 31, t-test, $p < 0.05$)。

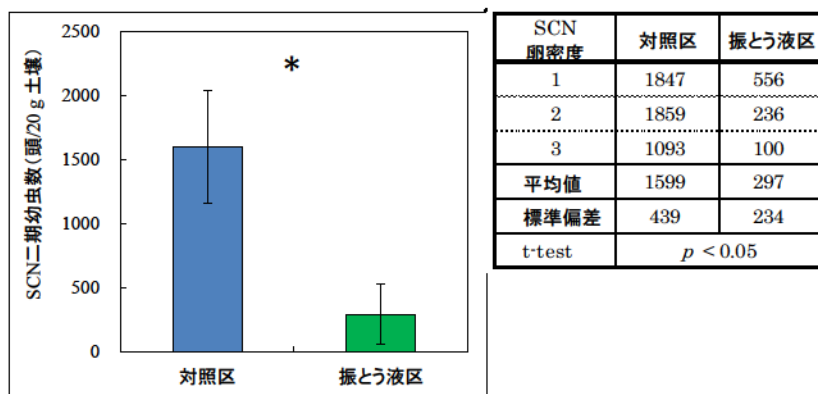


図. 31 振とう液添加開始から 2 ヶ月後におけるダイズシストセンチュウ卵密度への影響
(実験終了時, 平均値±標準偏差, $n=3$ t-test, $p < 0.05$)

4.2.1.4 考察

はじめに振とう液添加による植物への影響には、SPAD 値が対照区と比較して振とう液区において高くなり、植物体バイオマスも対照区と比較して振とう液区において約 2 倍に増加していた。このことから、植物の生育への悪影響は無く肥料効果が期待できる。

次に自由生活性線虫への影響だが、振とう液添加によって自由生活性線虫数が対照区の 1.6 倍に増加したが、4.1.1 においてもやしの食用部を添加した際の増加率は約 40 倍、もやしの根を添加した際は約 10 倍であった。このことから、振とう液添加によって自由生活性線虫数は増加するが、増加の程度は固形のもやしを添加した場合よりも低いと考えられる。ダイズシストセンチュウ二期幼虫の個体数は実験終了時では実験区間に大きな差はなかった。4.1.1 において、もやしの根を添加後、約 2 週間で孵化から餓死、虫体の分解による DNA 量の減少が推察された。このことから、実験終了時には孵化した個体の大半は既に孵化から餓死、DNA の分解にまで至っており、ベルマン法で抽出されたダイズシストセンチュウ二期幼虫数は実験区間で大きな差がなかったものと推察される。

最後に振とう液添加によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果だが、振とう液添加によって対照区と比較して振とう液区においてダイズシストセンチュウ卵数が約 20%まで低下したことから、振とう液にも、もやし残渣同様に密度低減効果があると考えられる。

4.2.2 もやし残渣振とう液の化学性の検証

4.2.2.1 目的

振とう液の添加によって、コマツナの葉緑素含量およびバイオマスが増加し、生育が促進された。そこで、コマツナの生育が促進された原因を明らかにするため、振とう液中の肥料分（窒素、リン、カリウム）といくつかの化学性を調査した。

4.2.2.2 材料と方法

振とう液の作製はもやし残渣（100 g）と蒸留水（100 ml）を 1 : 1（w/w）で混合し、200 rpm、1 時間振とうした。その後、No.2 のろ紙でろ過をおこなった。

測定項目は pH（H₂O）、電気伝導度（EC）、硝酸態窒素量、アンモニア態窒素量、全窒素量、リン濃度、カリウム濃度を測定した。

pH（H₂O）は Twin pH メーター（堀場製作所社製）をもちいて測定し、EC は同社製の Twin EC メーターをもちいて測定した。

硝酸態窒素量およびアンモニア態窒素量、リン濃度、カリウム濃度は高感度反射式光度計 RQ フレックスプラス（メルク社製）をもちい、試験紙として硝酸態窒素量はリフレクトファント硝酸テスト、アンモニア態窒素量はリフレクトファントアンモニアテスト、リン濃度はリフレクトファントリン酸テスト、カリウム濃度はリフレクトファントカリウムテストにより測定をおこなった。

溶液中の全窒素量は TOC 計（全窒素測定ユニット付属）をもちいて測定をおこなった。TOC 計にもちいるサンプルのみ、メンブレンフィルター（孔径：0.2 μm）をもちいてろ過をおこない、500 倍希釈したサンプルを測定にもちいた。なお、反復は全項目 3 とした。

4.2.2.3 結果および考察

振とう液の化学性では、pH (H₂O) は 7.0 とほぼ中性を示した (図. 32)。硝酸態窒素量およびアンモニア態窒素量は検出限界以下 (検出限界：硝酸態窒素 2 mg/L, アンモニア態窒素 2 mg/L) であったが、溶液中の全窒素量は 267 mg/L が含まれていた。リン、カリウムについても、それぞれ 1L あたり、リン 33 mg、カリウム 208 mg が含まれていた。

前節において振とう液の添加によって葉緑素含量が増加したことから、振とう液中には窒素が含まれていると考察したが、窒素は硝酸態やアンモニア態といった無機態ではなく、有機態窒素として振とう液中に含まれることが推察される。

今回測定したリン、カリウムの量について実際の緑豆もやしに含まれるリン、カリウムの量と比較した。緑豆もやし中の窒素及びリン、カリウム量は食品成分データベースの可食部単位重量当たりの成分量を参考とした。なお、窒素量は可食部の水分量から乾物重を求め、乾物中の 2% が窒素であると仮定して推計した。食品成分データベースの成分量では、緑豆もやしには 1 kg あたり窒素が 920 mg (推計値)、リンが 250 mg、カリウムが 690 mg 含まれていた。この結果と振とう液の分析値を比較すると、振とう液には緑豆もやしに含まれる窒素のうち 29%、リン 13 %, カリウム 30 % が含まれていると考えられる。

以上のことから、振とう液の添加によってコマツナの生育が促進されたのは、振とう液に含まれる窒素・リン・カリウムによる肥料成分によるものであると考えられる。

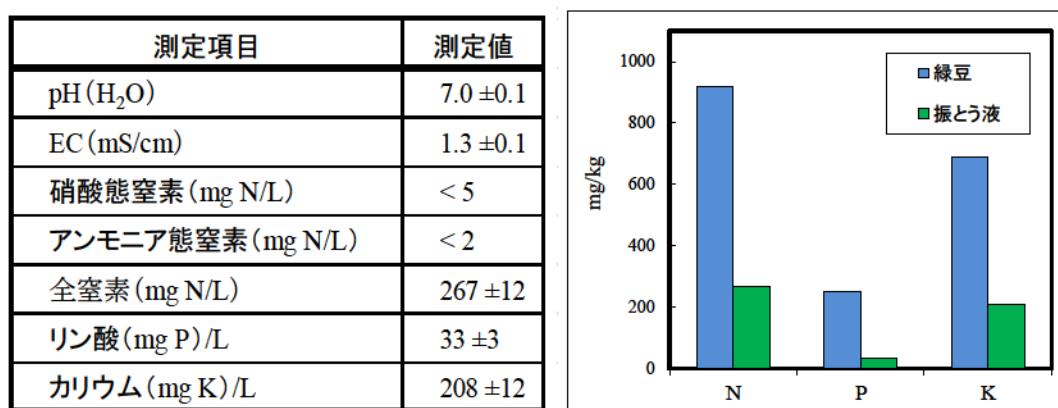


図. 32 もやし残渣振とう液の化学性分析 (左図、平均値±標準偏差、n = 3) 及び緑豆もやしならびに振とう液に含まれる窒素およびリン、カリウム量の比較 (右図)

4.2.3 もやし残渣振とう液の作製手順の検討

4.2.3.1 目的

土壌にもやし残渣振とう液を添加することでダイズシストセンチュウ卵密度を対照区の約 20%まで低減できることが明らかとなった。そこで本節ではもやし残渣振とう液の作製手順である、1) もやしを刻む 2) 水と混合し、200 rpm で 1 時間振とうする といった手順が振とう液を土壌に添加した際のダイズシストセンチュウ卵密度低減効果に及ぼす影響を比較検討することにした。これにより、省くことの出来る工程があるか明らかにすることを目的とした。

4.2.3.2 材料と方法

実験は室内試験とし、アグリポット（直径 6.5 cm 高さ 5 cm）をもちいておこなった。アグリポットに水分状態を最大容水量の約 50 %に調節したダイズシストセンチュウ汚染土壌 50 g を充填した。ダイズシストセンチュウ汚染土壌の実験開始時ダイズシストセンチュウ卵密度は 3980 卵/20 g 乾土であった。

土壌に添加する溶液は以下の 4 種類を作製した。なお、使用したもやし残渣（(株)サラダコスモ）は根と食用部が混合され、使用するまで冷凍保存したものを持ち、いずれももやし残渣（100 g）と蒸留水（100 ml）を 1 : 1（w/w）で使用した。

- 1) もやし残渣を刻まずに 1 時間水に浸漬した溶液（以下、浸漬区）
- 2) もやし残渣を刻み、1 時間水に浸漬した溶液（以下、刻み区）
- 3) もやし残渣を刻まずに水と混合、1 時間 200 rpm で振とうした溶液（以下、振とう区）
- 4) もやし残渣を刻み、水と混合、1 時間 200 rpm で振とうした溶液（以下、従来区）

以上の溶液をアグリポットに対して 2 %（w/w）添加し、混合した。また、対照区として同量の水を添加する実験区を設けた。実験期間は 4 週間とし、アグリポットの反復は 3、培養は BIOTRON LPH-200 において 25℃定温でおこなった。測定は実験終了時にボールミル・Real-time PCR 法により、ダイズシストセンチュウ卵密度を測定した。

4.2.3.3 結果および考察

もやし残渣をもちいて作製した 4 種類の溶液のうち、もっともダイズシストセンチュウ卵密度を低減した処理区は刻み区（実験終了時ダイズシストセンチュウ卵密度：919 卵/20 g 乾土、減少率：77%、以下同様）もしくは振とう区（1059 卵、73%）であり、次いで従来区（1510 卵、62%）、浸漬区（2279 卵、43%）となった（図. 33、図. 34 左図）。

刻み処理ならびに振とう処理によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果に顕著な差

はみられなかった（図. 34 右図）。しかし、従来区と比較して刻み区および振とう区において減少率が 10% 高かったことから、従来の刻み処理および振とう処理を併用しておこなう必要はなく、刻み処理および振とう処理のいずれかの処理をおこなうことで 70～80% のダイズシストセンチュウ卵密度減少率が得られると考えられる。

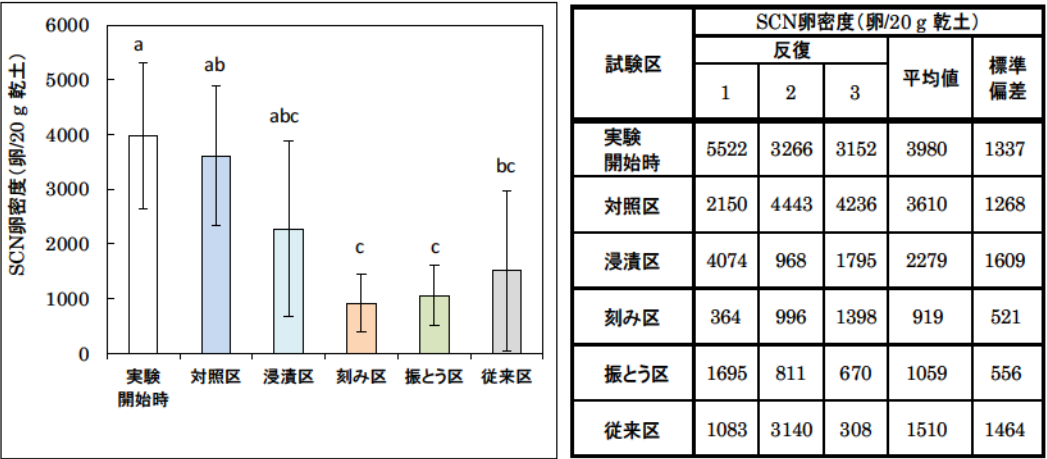


図. 33 振とう液の作製手順がダイズシストセンチュウ卵密度に与える影響
(異なるアルファベットを含む実験区間で有意差あり、 $p < 0.05$)

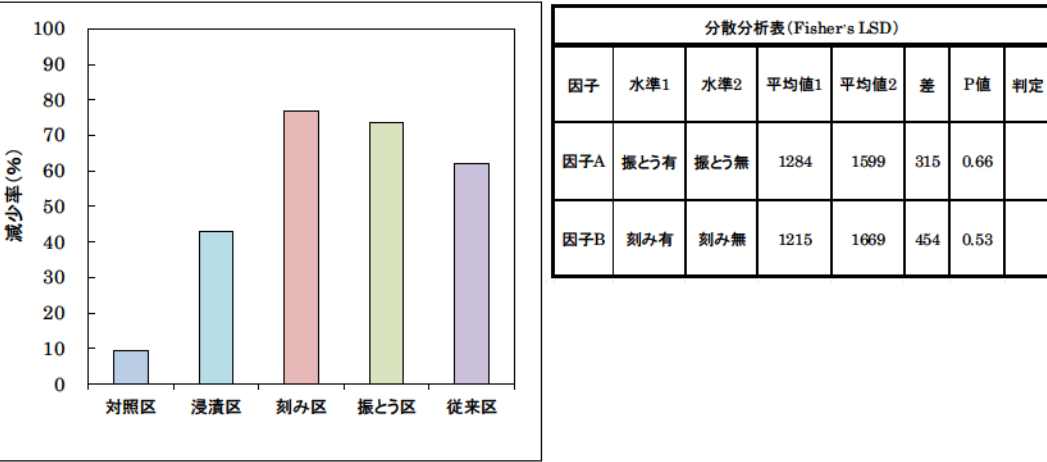


図. 34 振とう液の作製手順がダイズシストセンチュウ卵密度の減少率に与える影響（左図）及び刻み処理および振とう処理がダイズシストセンチュウ卵密度におよぼす影響（右図、二元配置分散分析表）

4.2.4 圃場試験 もやし残渣振とう液添加によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果の検証

4.2.4.1 目的

ダイズシストセンチュウ汚染土壌にもやし残渣振とう液を添加することでダイズシストセンチュウ卵密度を約 80%低減できることを室内試験により明らかにした。そのため、野外土壌においてもやし残渣を添加することでダイズシストセンチュウ卵密度を低減できるか検証することを目的に圃場試験をおこなった。

4.2.4.2 材料と方法

試験は東京都府中市にあるダイズシストセンチュウ汚染圃場に 100 cm×50 cm のプロットを 6 つ設けておこなった。プロットは波板により仕切られており、6 つのプロットのうち 3 つはもやし残渣振とう液を添加する実験区（以下、振とう液区）であり、残り 3 つはもやし残渣振とう液と同量の水道水を添加する対照区とした（図. 35）。

もやし残渣振とう液添加によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果の検証は 2010 年 7 月 9 日から開始し、2011 年 6 月 1 日までとエダマメ栽培後の 2011 年 8 月 25 日から同年 11 月 10 日までとした（表 18）。もやし残渣振とう液の添加量は 1 プロットあたり 20 L を添加した（もやし：水道水=1：4（w/w））。土壌のサンプリングはルートオーガーをもちいて土壌深度 0-30 cm までを対象とし、1 プロットから 3 点採取後、1 つのサンプリングバッグに入れて混合し、150～200 g をサンプルとして研究室に持ち帰った。

採取したサンプルは網目 5 mm のふるいを通し、60℃、24 時間乾燥させ、ボールミル・Real-time PCR 法に供試し、ダイズシストセンチュウ卵数を測定した。

最後に 2011 年 4 月 26 日に地温を上昇させる目的でもやし残渣振とう液を添加した後に対照区および振とう液区において透明ビニールのマルチをおこなった。

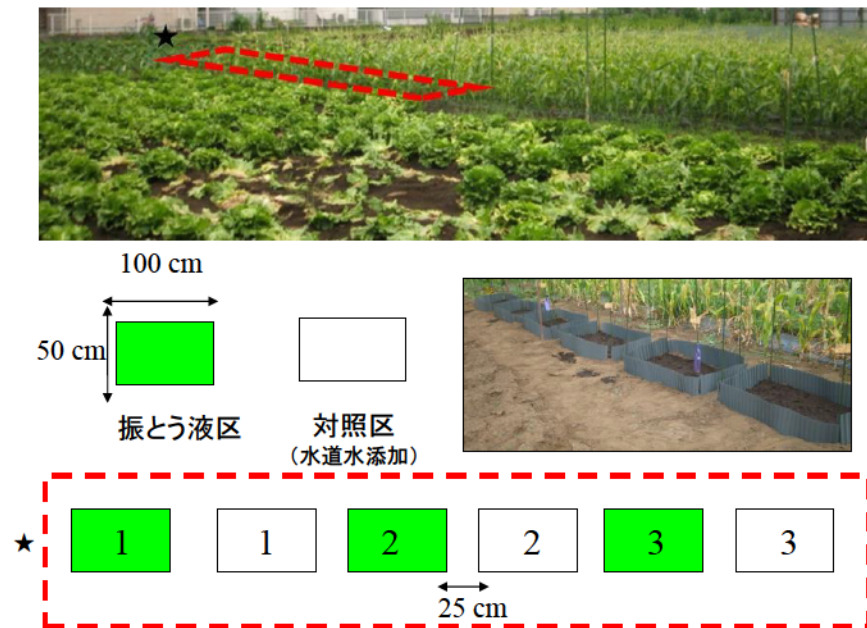


図. 35 もやし残渣振とう液の添加試験をおこなった圃場の写真と試験区の模式図

表 18 振とう液添加のタイミングと土壌サンプリングのスケジュール

	2010年 7月9日	7月23日	8月7日	8月20日	8月31日	9月17日	10月2日	11月9日
振とう液添加	○	○	○	○	○	○	○	○
サンプリング	○					○		

	12月9日	2011年 4月26日 (マルチ設置)	6月1日	8月3日	8月25日	11月10日
振とう液添加	○	○		エダマメ 栽培開始	エダマメ 栽培終了	○
サンプリング	○	○	○			○

4.2.4.3 結果および考察 (2010 年 7 月～2011 年 6 月)

ダイズシストセンチュウ卵密度の推移では、2010 年 7 月から 9 月までは対照区において減少の傾向を示さなかったが、振とう液区においては平均卵密度 1714 卵/20 g 乾土（以下、単位同様）から 634 卵へ減少した（図. 36）。しかし、9 月から 12 月の間では振とう液を添加したが、卵密度の推移は減少傾向を示さなかった。その後、12 月から 4 月までの推移では、対照区において平均卵密度 2840 卵から 1660 卵へ減少しており、振とう液区においても平均卵密度 1080 卵から 692 卵へ減少していた。4 月にビニールマルチを設置してから 6 月までの推移では、対照区において平均卵密度 1660 卵から 1448 卵、振とう液区において 692 卵から 233 卵と減少する傾向にあった。

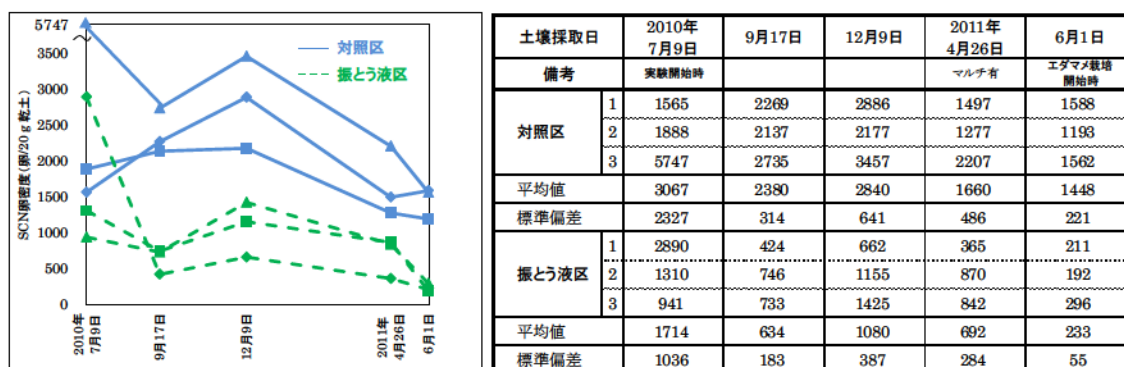


図. 36 2010 年 7 月から 2011 年 6 月までのダイズシストセンチュウ卵数の推移
(土壌深度 0-30 cm、実験開始時から 2011 年のエダマメ栽培開始時まで)

実験開始時からエダマメ栽培開始時までの各プロット間の SCN 卵密度減少率は対照区において-1 から 73%（平均減少率：36%）、振とう液区において 69%から 93 %（平均減少率：82%）であり、振とう液区において対照区よりも約 2 倍の減少率を示した（図. 37）。

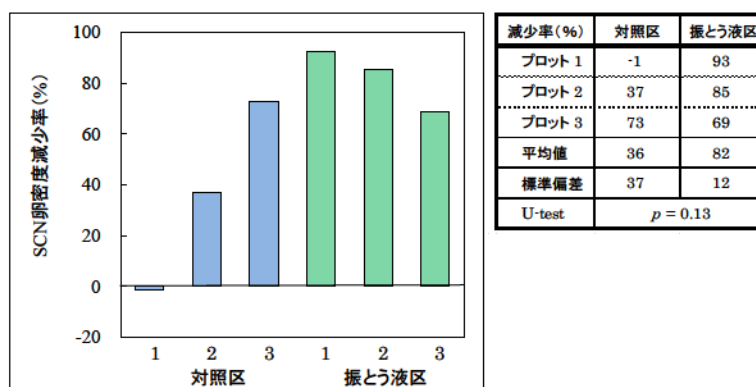


図. 37 2010 年 7 月から 2011 年 6 月までの各プロットにおけるダイズシストセンチュウ卵数の減少率
(実験開始時からエダマメ栽培開始時までのデータで算出)

対照区においてダイズシストセンチュウ卵密度が 1193～1589 卵であるのに対して、振とう液区では 192～296 卵であり、振とう液区においてダイズシストセンチュウ卵密度が低くなった（図. 38, t-test, $p < 0.001$ ）。

以上のように 2010 年 7 月から 2011 年 6 月までの間に振とう液を添加することにより、ダイズシストセンチュウ卵密度は低下した。しかし、2010 年の 9 月から 12 月の間では、前節のもし残渣区同様にダイズシストセンチュウ卵数は減少しなかった。このことから、ダイズシストセンチュウの孵化を促進し、餓死に至らせて卵密度を減少させるためには 9 月から 12 月の間は適していないと推察される。

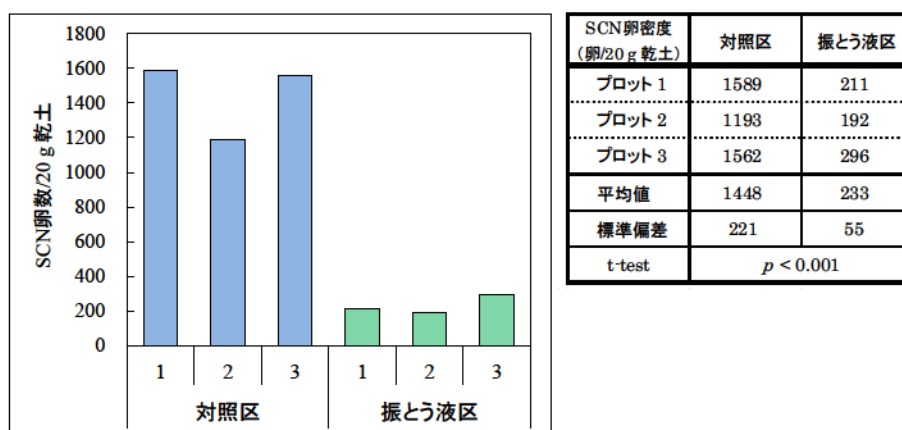


図. 38 エダマメ栽培開始時の各プロットにおけるダイズシストセンチュウ卵数
(土壌深度 0-30 cm, 2011 年 6 月 1 日)

4.2.4.4 結果および考察 (2011 年 8 月～11 月)

収穫後のダイズシストセンチュウ卵密度は平均値で対照区において 5293 卵/20 g 乾土、振とう液区において 6547 卵/20 g 乾土で実験区間に有意な差はなかった (図. 39, t-test, $p=0.28$)。エダマメ収穫後から 11 月 9 日までは、対照区および振とう液区のすべてのプロットにおいて減少する傾向にあった。

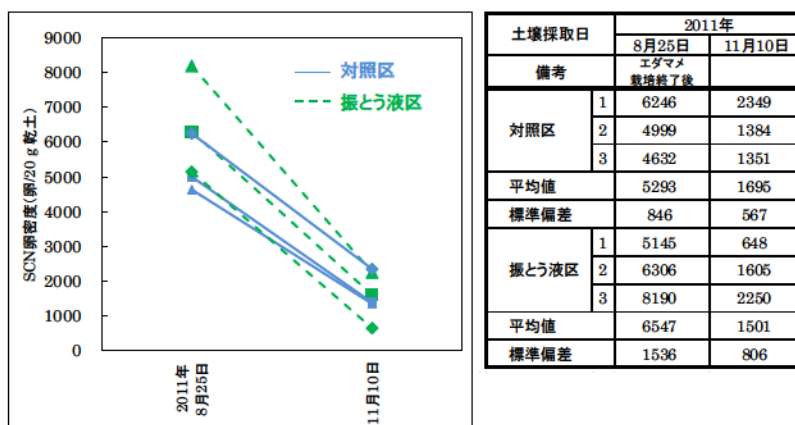


図. 39 2011 年 8 月から 2011 年 11 月までの各プロットにおけるダイズシストセンチュウ卵数の推移 (土壌深度 0-30 cm, 2011 年のエダマメ栽培後から約 2 ヶ月後の 11 月 10 日まで、表中の数値は土壌 20 g あたりのダイズシストセンチュウ卵数)

収穫後から 11 月 9 日までのダイズシストセンチュウ卵密度の減少率は、対照区で 60～70 %の減少率であるのに対して、振とう液区では 70～90 %の減少率であった。減少率の平均値で比較すると、対照区において 69 %であるのに対して、振とう液区において 78 %であり、振とう液区において減少率が約 10 %高くなったが有意差は認められなかった (図. 40, t-test, $p=0.05$)。

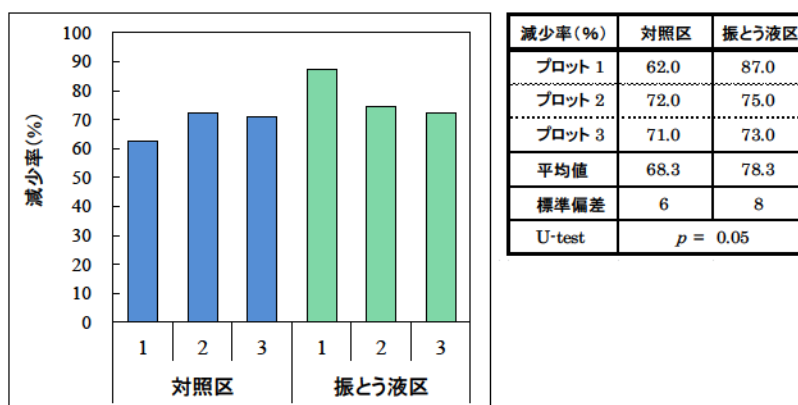


図. 40 2011 年 8 月から 2011 年 11 月までの各プロットにおけるダイズシストセンチュウ卵数の減少率 (2011 年エダマメ栽培後から 2011 年 11 月 10 日までのデータで算出)

11月9日のダイズシストセンチュウ卵密度は振とう液区のプロット1において、対照区よりもダイズシストセンチュウ卵数が少なく、1/2～1/4のダイズシストセンチュウ卵数となった（図. 41）。振とう液区のプロット2および3では、対照区と比較して顕著な差はなかった。平均値で実験区間を比較すると、対照区で1695卵/20g乾土であるのに対して、振とう液区において1501卵/20g乾土であり、実験区間に有意な差はなかった（t-test, $p=0.75$ ）。

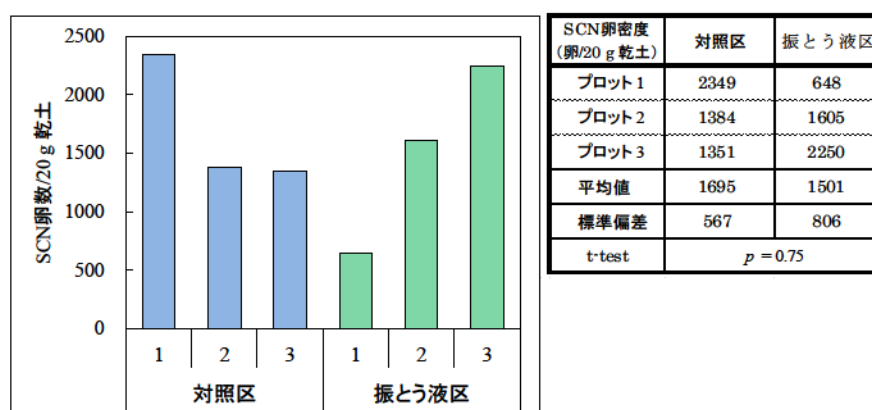


図. 41 2011年11月の各プロットにおけるダイズシストセンチュウ卵数
(土壌深度0-30 cm, 2011年11月10日、表中の数値は土壌20gあたりのダイズシストセンチュウ卵数)

以上の結果から、エダマメ栽培後のダイズシストセンチュウ卵密度の変化では、対照区においてもダイズシストセンチュウ卵数が減少する傾向にあった。Noel & Wax (2003) の報告では、ダイズ・トウモロコシの2年輪作体系において、ダイズ収穫後1年間で最大でダイズシストセンチュウ卵の密度が約70%が減少することを示している。また、1年間を通して、ダイズシストセンチュウの二期幼虫数は宿主の非存在下であっても数頭～数十頭/50g乾土が圃場内の土壌中に存在することが報告されている（佐藤ら, 1969）。さらに、ダイズシストセンチュウの幼虫や卵に寄生する微生物（Crump *et al.*, 1983; Godoy *et al.*, 1982）が報告されており、日本においてもダイズシストセンチュウ密度の減少には天敵微生物の関与が示唆されている（橋本ら, 1988）。以上のことから、8月から11月にかけての密度減少には、孵化から餓死に至るケースや天敵微生物の寄生等によって密度が減少する可能性が考えられる。

4.2.5 継続的にもやし残渣振とう液を添加した圃場でのエダマメ栽培試験

4.2.5.1 目的

もやし残渣振とう液の添加をおこなうことにより、ダイズシストセンチュウ卵密度が低下することが示された。そこで、もやし残渣振とう液の添加により、ダイズシストセンチュウ卵を減少させたことでエダマメを栽培した際の生育過程における病徴発生や収量への影響を検証した。

4.2.5.2 材料と方法

2010年7月9日から2011年4月26日までにもやし残渣振とう液を10回添加した、振とう液区およびその対照区の各プロットにおいてエダマメの栽培試験をおこなった。栽培試験に用いるエダマメの苗を得るために、同圃場の土壌をオートクレーブ滅菌し、セルトレイにその土壌を充填した。セルトレイの各セルにエダマメ（品種名：サヤムスメ）の種子を播種し、BIOTRON-LPH 200内で約10日間生育させた。その後、苗を6月1日に1プロット（0.5 m²）あたり8個体の密度で移植した。なお、施肥はおこなわず、散水は2日に1度プロット内の土壌表面が湿る程度おこなった。7月8日に生育調査をおこない、SPAD値（葉緑素含量）、草丈を測定した。SPAD値は葉緑素計（SPAD-502、コニカミノルタセンシング社製）を用いて、各個体につき3枚の葉を測定対象とした。その後、8月3日にエダマメの収穫および苗の掘り取りをおこなった。収穫時の測定項目は地上部バイオマス、着莢数、1莢重（1莢あたりの重量）、収量とした。また、栽培開始時のダイズシストセンチュウ卵密度と収穫時の各目的変数（地上部バイオマス、着莢数、1莢重、収量）との関係を単相関分析により検討した。なお、栽培前の各プロットにおけるダイズシストセンチュウ卵数は図. 38に示す密度であった。

4.2.5.3 結果

エダマメ栽培開始から約 40 日目のエダマメの状況では、振とう液区と比較して対照区のいずれのプロットにおいても草勢が弱く、葉の黄化症状が確認された（図. 42）。

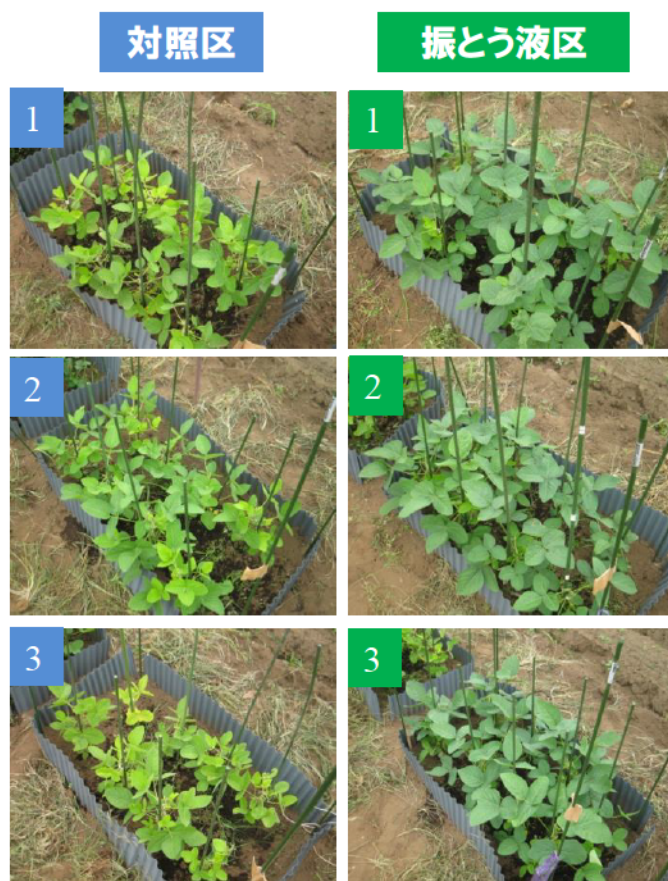


図. 42 移植から約 40 日目におけるエダマメの生育状態の様子
(左上の番号はプロットのナンバー，撮影日：2011 年 7 月 8 日)

移植から 40 日後の SPAD 値では、対照区において 33～38、振とう液区において 42～45 の範囲であった。平均値で比較すると、対照区で 35、振とう液区で 44 であり、対照区と比較して振とう液区において SPAD 値が高くなった（図. 43, t-test, $p < 0.01$ ）。草丈では対照区において 23～26 cm、振とう液区において 26～28 cm であった。平均値で比較すると対照区で 25 cm、振とう液区で 27 cm となり、対照区と比較してやや振とう液区で草丈が高くなったが実験区間において統計的に有意な差はなかった（図. 44, t-test, $p = 0.07$ ）。

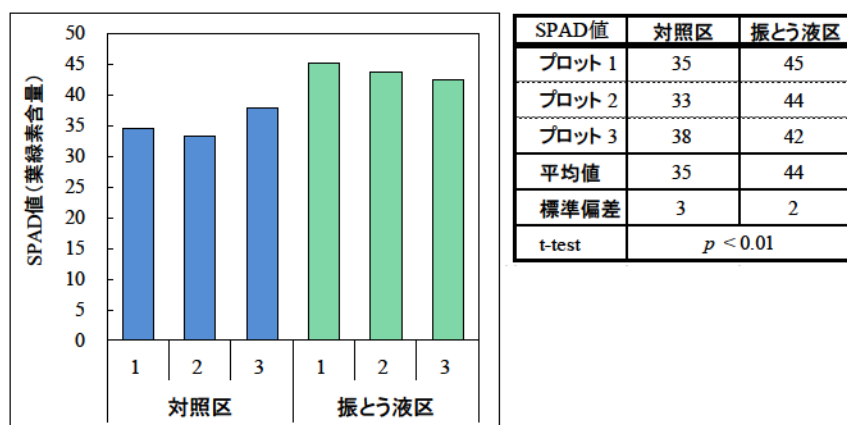


図. 43 エダマメ移植から約 40 日目の各プロットにおけるエダマメの SPAD 値
(測定日：2011 年 7 月 8 日)

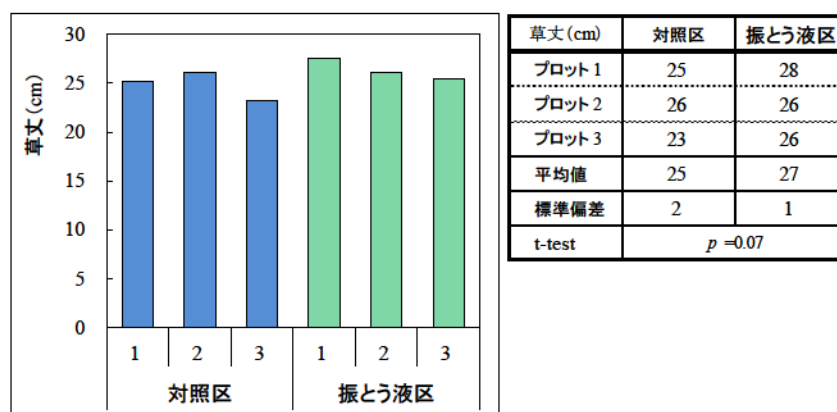


図. 44 エダマメ移植から約 40 日目の各プロットにおけるエダマメの草丈
(測定日：2011 年 7 月 8 日、表中の数字は草丈 (cm))

エダマメ 1 個体あたりの地上部バイオマスは対照区の各プロットにおいて 21～40 g/株、振とう液区の各プロットにおいて 89～95 g/株であり、平均値で比較すると、対照区で 30 g/個体、振とう液区で 92 g/株であり、対照区と比較して振とう液区において地上部バイオマスが高い値を示した（図. 45, t-test, $p < 0.001$ ）。

着莢数は対照区の各プロットにおいて 8～15 個/個体、振とう液区の各プロットにおいて 34～39 個/個体であり、平均値で比較すると対照区で 11 個/個体、振とう液区で 36 個/個体であり、対照区と比較して振とう液区において着莢数が多かった（図. 46, t-test, $p < 0.001$ ）。

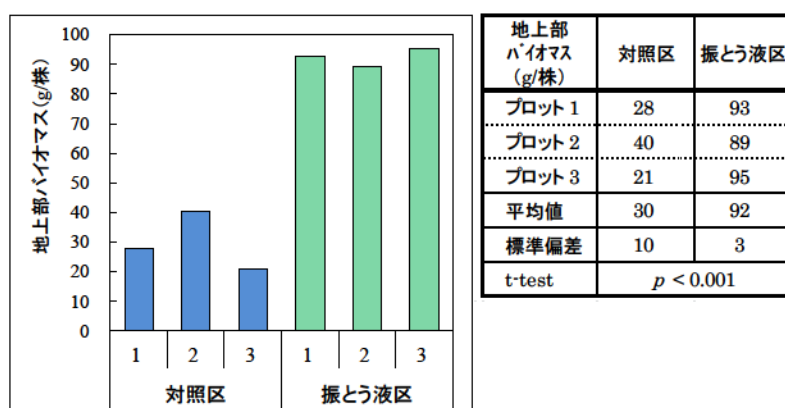


図. 45 収穫時の各プロットにおけるエダマメの地上部バイオマス
(収穫日：2011 年 8 月 3 日、表中の数字は地上部バイオマス (g/個体))

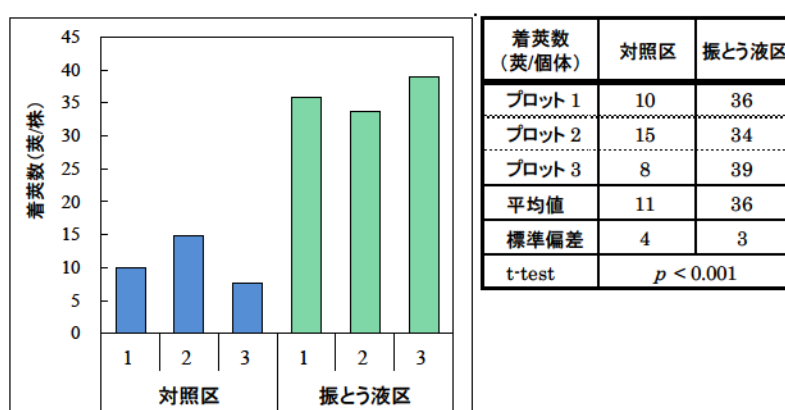


図. 46 収穫時の各プロットにおけるエダマメの着莢数
(収穫日：2011 年 8 月 3 日、表中の数字は着莢数 (個/個体))

一莢重は対照区の各プロットにおいて 0.9~1.3 g/莢、振とう液区の各プロットにおいて 1.3~1.4 g/莢であり、平均値で比較すると対照区で 1.0 g/莢、振とう液区で 1.3 g/莢となり、対照区と比較して振とう液区において 1 莢重がやや増加したが、実験区間において統計的に有意な差はなかった（図. 47, t-test, $p = 0.09$ ）。

収量は対照区の各プロットにおいて 136~310 kg/10 a、振とう液区の各プロットにおいて 674~856 kg/10 a、平均値で比較すると、対照区で 202 kg/10 a、振とう液区で 748 kg/10 a であり、対照区と比較して振とう液区で収量が多くなった（図. 48, t-test, $p < 0.01$ ）。

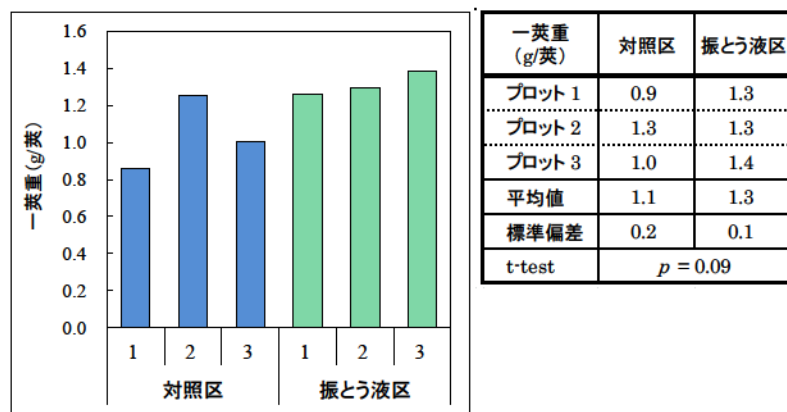


図. 47 収穫時の各プロットにおけるエダマメの 1 莢重
(収穫日：2011 年 8 月 3 日、表中の数字は 1 莢重 (g/莢))

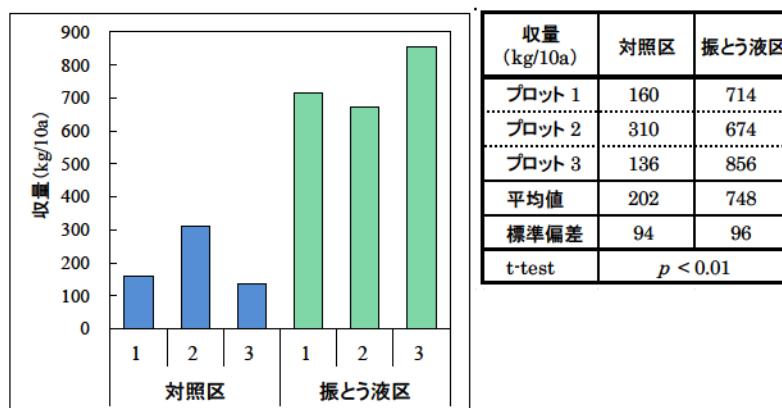


図. 48 収穫時の各プロットにおけるエダマメの収量
(収穫日：2011 年 8 月 3 日、表中の数字は収量 (kg/10a))

最後に栽培開始時のダイズシストセンチュウ卵数と収穫時の測定項目との関係では、地上部バイオマス、着莢数、1 莢重、収量のいずれにおいても開始時のダイズシストセンチュウ卵数が多いプロットで減少する傾向であった（図. 49, $p < 0.05$ ）。

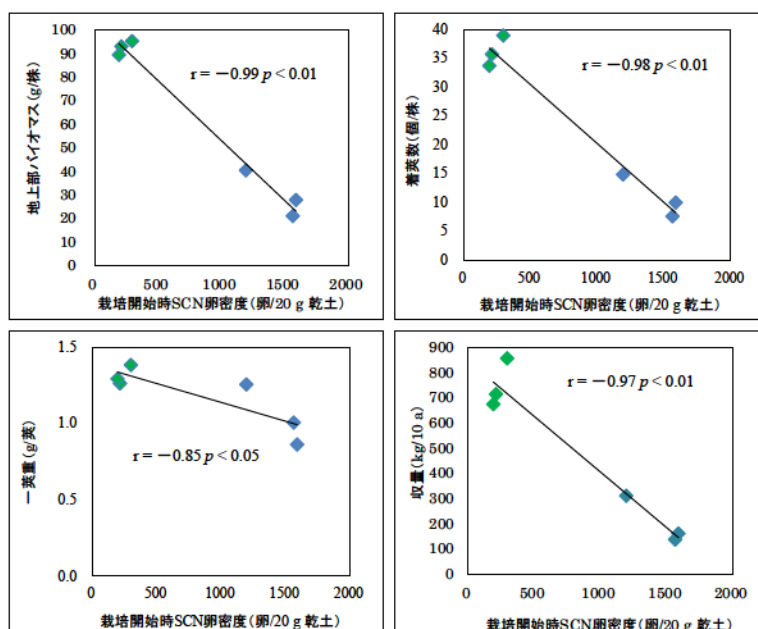


図. 49 栽培開始時のダイズシストセンチュウ卵数と収穫時の各項目との相関関係
（左上：地上部バイオマス，右上：着莢数，左下：収量，右下：1 莢重，緑：振とう液区，青：対照区）

4.2.5.4 考察

はじめに、エダマメの生育過程では移植から約 40 日目の外観において振とう液区と比較して対照区において草勢が弱く、黄色を呈した。SPAD 値においても振とう液区と比較して対照区において低い値となったことから、対照区ではダイズシストセンチュウによる被害によって葉の黄化症状を呈しているものと推測される（図. 43）。

次に収穫時の項目を実験区間で比較すると、地上部バイオマス、着莢数、収量の項目では振とう液区において地上部バイオマス、着莢数で対照区の約 3 倍、収量では約 3.7 倍となった（図. 45、図. 46、図. 48）。このことから、振とう液を土壤に添加することで栽培開始時のダイズシストセンチュウ卵を低密度にし、エダマメの生育および収量が改善されたものと考えられる。

最後に栽培開始時のダイズシストセンチュウ卵数とエダマメ収穫時の各項目との単相関分析では、いずれの項目においてもダイズシストセンチュウ卵数が 1100～1600 卵/20 g 乾土の範囲にあるときには 200～300 卵/20g 乾土のダイズシストセンチュウ卵数と比較して地上部バイオマス、着莢数、1 莢重、収量が低下する傾向にあった（図. 49）。これらのこと

から、今回の実験において栽培開始時のダイズシストセンチュウ卵密度がエダマメの生育、収量を制限している要因であると考えられる。

以上のことから、もやし残渣振とう液を土壤に添加することでダイズシストセンチュウ卵数を低減することができ、エダマメの収量が回復したことから、もやし残渣振とう液添加によるダイズシストセンチュウの防除が可能であると考えられる。

4.3 緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除手法の開発

目的

前節において、もやし残渣を利用したダイズシストセンチュウの生態的防除手法について開発を行い、利用可能性について検証を行った。しかし、もやし残渣を利用した防除手法はもやし生産工場が近隣にある場合に適用可能であり、入手が困難な地域では適用が難しい。そこで、本節ではもやし（緑豆）にダイズシストセンチュウの孵化促進効果が認められる点に着目し、もやしの原料である緑豆種子を直接圃場に播種し、短期間栽培した後、にすき込むことでダイズシストセンチュウを防除できるか検討を行った。

4.3.1 室内試験 緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験

4.3.1.1 目的

緑豆の栽培及びすき込みを通して、ダイズシストセンチュウ密度の低減が可能か検証を行うことを目的として、室内試験を行った。

4.3.1.2 材料と方法

供試土壌は東京都にあるダイズシストセンチュウ汚染圃場から採取した土壌をもちいた。実験はアグリポット（直径 7.0 cm、高さ 5 cm、開口面積 38.5 cm²）をもちい、水分状態を最大容水量の 50%に調節したダイズシストセンチュウ汚染土壌 100 g を充填した。緑豆種子（中原採種場（株））は 1 粒あたり 0.032 g なので、開口面積 38.5 cm² のアグリポットに播種することで、8.4 g/m² となる。そのため、播種密度を 1 粒/ポット（約 9 kg/10a）、3 粒/ポット（約 27 kg/10a）、9 粒/ポット（約 81 kg/10a）として播種した。図. 50 に 1 週間生育させた緑豆を示す。緑豆を 1 週間栽培した後、にすき込みを行い、緑豆と土壌を混合・攪拌した。緑豆を播種する実験区に対して、なにも播種せずに攪拌のみをおこなう実験区を対照区とした。すき込み後の培養期間は最大で 4 週間とし、栽培時のアグリポットの反復は 5 とし、生育が良好だった 3 ポットの土壌を分析試料とした。培養は人工気象器内において 25℃定温、明条件 14 時間、暗条件 10 時間のサイクルでおこなった。すき込み後、2 週間、4 週間経過した時点で土壌 50 g を採取し、ボールミル・Real-time PCR 法をおこない、土壌中のダイズシストセンチュウ卵密度を測定した。

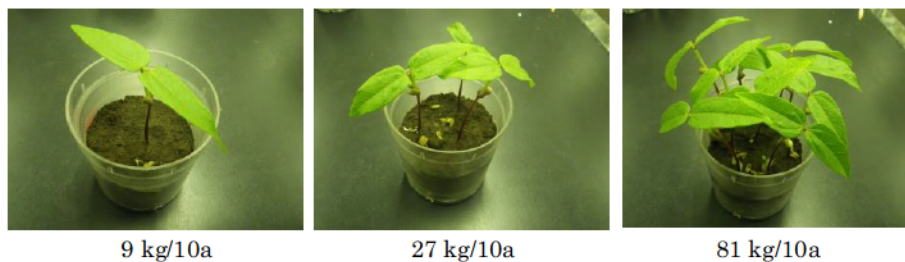


図. 50 1 週間生育させた緑豆

4.3.1.3 結果

実験開始時の平均卵密度は 2376 卵/20 g 乾土（以下、単位同様）、対照区では 2 週間後及び 4 週間後でそれぞれ 2091 卵及び 1644 卵であった（図. 51、表 19）。緑豆 9 kg/10a 播種区ではすき込み後 2 週間及び 4 週間でそれぞれ 659 卵及び 575 卵、27 kg/10a 播種区では同様に 346 卵及び 347 卵、81 kg/10a 播種区では同様に 194 卵及び 239 卵であり、緑豆を播種及びすき込むことで実験開始時及び対照区よりも卵密度が有意に減少した（Tukey-Kramer test, $p < 0.05$ ）。また、緑豆を播種及びすき込んだ実験区では、播種量を増加させることでダイズシストセンチュウ卵密度のがややする低下する傾向にあった。

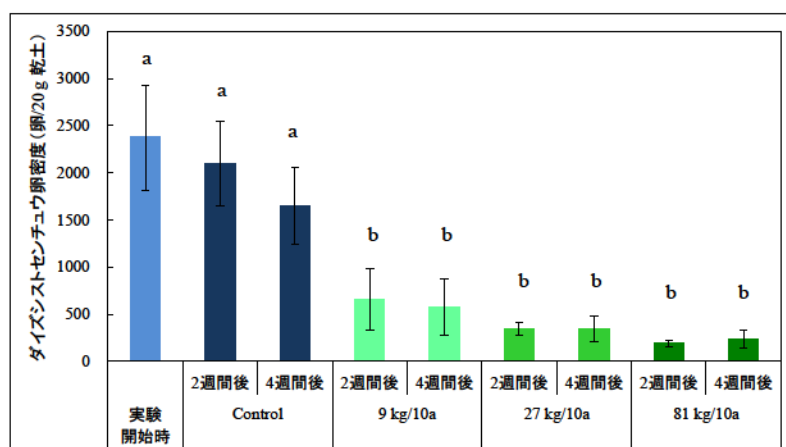


図. 51 緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果
（異なるアルファベット間では有意差あり、Tukey-Kramer test、 $p < 0.05$ ）

表 19 緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ密度低減効果

	実験 開始時	Control		9 kg/10a		27 kg/10a		81 kg/10a	
		2週間後	4週間後	2週間後	4週間後	2週間後	4週間後	2週間後	4週間後
1	2007	2461	2114	655	396	341	413	221	129
2	3018	2218	1442	331	922	280	193	155	298
3	2102	1594	1375	991	407	418	435	206	291
Average	2376	2091	1644	659	575	346	347	194	239
S.D.	558	447	409	330	300	69	134	35	96
S.E.	322	258	236	191	173	40	77	20	55
CV(%)	23	21	25	50	52	20	39	18	40
減少率(%)	—	12	31	72	76	85	85	92	90

4.3.1.4 考察

緑豆播種区（9、27、81 kg/10a）において対照区よりも有意にダイズシストセンチュウ卵密度が低下したことから、緑豆すき込み法によりダイズシストセンチュウを防除できる可能性が示された。

実際の緑肥を播種する密度はクロタラリアを例にすると一般的に 6～9 kg/10a が適当な播種密度とされている（橋爪, 2007）。今回の試験では、ダイズシストセンチュウに対する防除効果を確認する目的で試験を行ったため、9～81 kg/10a と通常の播種もしくは通常の播種量よりも多くした。価格面を考慮すると、クロタラリア：1400～1800 円/kg 程度（タキイ種苗及び雪印種苗）、緑豆：500～700 円/kg 程度（コウベグロサースズ及びポンパレモー）のため 2～3 倍までの播種量であれば、金額面では問題がない。しかし、今回試験を行った 9 kg/10a 以下の播種密度でも同程度の効果を得られるか検討する必要があるため、播種密度を下げた場合の実験を次に行った。

4.3.2 室内試験 低密度播種における緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験

4.3.2.1 目的

前節の緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験において緑豆の播種量を 9～81 kg/10a として試験をおこなったが、通常の緑肥の播種量よりも多いことから、播種密度を低くして試験を行い、低密度の播種量でもダイズシストセンチュウ密度を低減できるか検証を行った。

4.3.2.2 材料と方法

供試土壌は東京都にあるダイズシストセンチュウ汚染圃場から採取した土壌をもちいた。実験はプラスチック製の容器（9.5×13.0 cm、開口面積: 123.5 cm²）をもちい、水分状態を最大容水量の 50%に調節したダイズシストセンチュウ汚染土壌 350 g を充填した。緑豆種子は 1 粒あたり 0.032 g なので開口面積 123.5 cm² の容器に 1 粒播種することで 2.6 kg/10 a の密度となる。そのため、容器あたり 1 粒（約 2.5 kg/10 a）、2 粒（約 5.0 kg/10 a）、4 粒（約 10 kg/10a）の密度として播種した。図. 52 に 1 週間生育した緑豆とすき込み時の様子を示す。緑豆を 1 週間栽培した後、すき込みを行い、緑豆と土壌を混合・攪拌した。緑豆を播種する実験区に対して、なにも播種せずに攪拌のみをおこなう実験区を対照区とした。すき込み後の培養期間は 2 週間とし、栽培時の容器の反復は 5 とし、緑豆の生育が良好だった 3 つ容器の土壌を分析試料とした。培養は人工気象器内において 25℃定温、明条件 14 時間、暗条件 10 時間のサイクルでおこなった。

すき込み後、2 週間経過した時点で容器内の土壌を採取し、ボールミル・Real-time PCR 法をおこない、土壌中のダイズシストセンチュウ卵密度を測定した。また、実験開始時のダイズシストセンチュウ卵密度を 100 として、前述の実験とあわせて緑豆の播種密度とダイズシストセンチュウ卵密度減少率との関係を回帰分析により解析した。

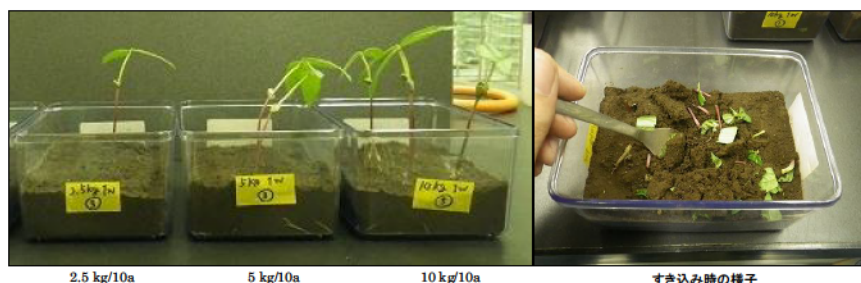


図. 52 1 週間生育した緑豆（左）とすき込み時の様子（右）

4.3.2.3 結果

実験開始時のダイズシストセンチュウ卵密度は 932 卵/20 g 乾土（以下、単位同様）であり、緑豆のすき込みを行ってから 2 週間後の対照区では、1133 卵と実験開始時と比較して卵密度の減少は認められなかった（図. 53、 $p = 0.70$ ）。緑豆をのすき込みを行ってから 2 週間後の実験区では播種密度 2.5 kg/10a で 555 卵、5.0 kg/10a で 588 卵、10 kg/10a で 402 卵であった。実験開始時の卵密度と緑豆をすき込んでから 2 週間経過した試験区を比較すると 10 kg/10a の密度で播種した試験区のみ有意に卵密度が低下していた（ $p < 0.05$ ）。その他の試験区では対照区と比較して 2.5 kg/10a、5.0 kg/10a、10 kg/10a の密度で播種した試験区において有意に卵密度が低下していた（ $p < 0.05$ ）。

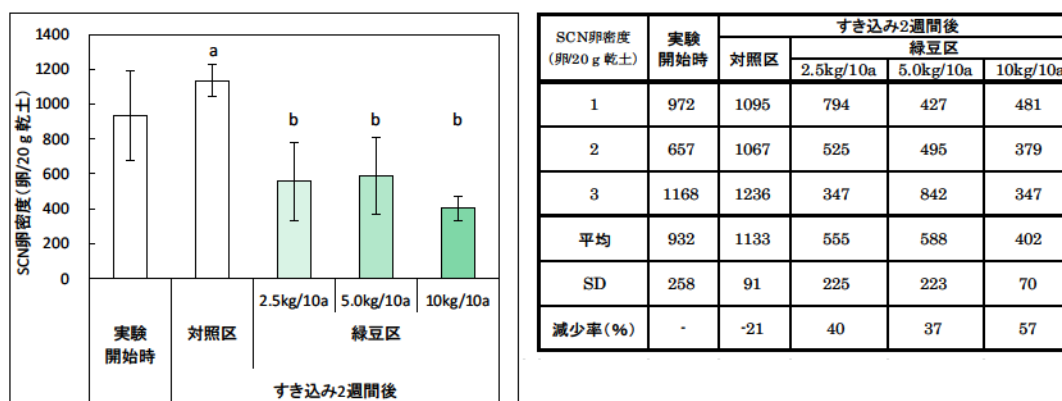


図. 53 低密度播種による緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果
(異なるアルファベット間で有意差あり、Tukey-Kramer test、 $p < 0.05$)

緑豆播種密度とダイズシストセンチュウ減少率との関係では、播種密度の上昇とともに減少率も上昇する傾向を示し、その関係は対数近似による回帰で高い相関が認められた(図. 54, $p < 0.01$)。

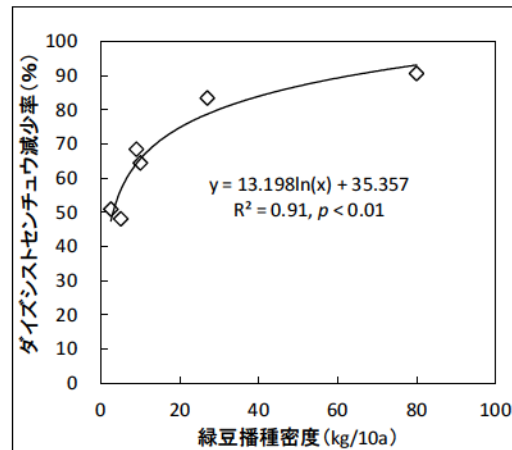


図. 54 緑豆播種密度とダイズシストセンチュウ減少率との関係

4.3.2.4 考察

9 kg/10a よりも播種密度を低下させた場合においても、ダイズシストセンチュウ卵密度の低下は見られ、2.5～5.0 kg/10a も播種量で1週間生育させて、すき込むことで約40%の密度低減効果が得られた。しかし、前節の結果よりもダイズシストセンチュウの密度減少率は低く、回帰分析の結果からもダイズシストセンチュウの密度低減効果は1週間の生育期間では播種密度に依存することが考えられた。このことより、実際の圃場で緑豆すき込み法を適用する際には事前のダイズシストセンチュウの密度に応じて播種量を変えて、目標となる密度まで低減できるように設計する必要があると考えられる。

4.3.3 圃場試験 7月上旬播種における緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験

4.3.3.1 目的

室内試験において緑豆すき込み法によりダイズシストセンチュウの卵密度を低減出来ることが分かった。そのため、実際のエダマメ栽培後圃場において7月上旬に播種を行い、緑豆すき込み法を適用した際のダイズシストセンチュウ卵密度低減効果を検証した。

4.3.3.2 材料と方法

埼玉県三郷市に位置する施設栽培圃場において、0.5m² (50×100 cm) のプロットを3ヶ所設置し、緑豆を9 kg/10aの密度で播種し、すき込みを行う、緑豆区及び緑豆を播種せずにすき込み時に土壌の攪拌のみを行う対照区を設置した。なお、プロットの反復は3とした。試験スケジュールは2015年7月3日にプロットの設置及び実験開始時の土壌採取、緑豆の播種をおこなった。その後、7月16日まで緑豆を生育させ、同日にすき込みを行った。実験終了時の土壌試料は8月4日に採取し、ボールミル・Real-time PCR法によりダイズシストセンチュウ密度を測定した。

4.3.3.3 結果

実験開始時のダイズシストセンチュウ卵密度は対照区及び緑豆区において1380～1321卵/20g乾土（以下、単位同様）であり、実験終了時（すき込みから19日後）では対照区1653卵、緑豆区1293卵と卵密度の減少は認められなかった。気温の推移では、播種1週間後までは最高気温が25℃前後を上下していたが、それ以降は実験終了時まで最高気温（平均：34.8℃）、平均気温（平均：29.1℃）ともに25℃を上回る温度で推移していた。

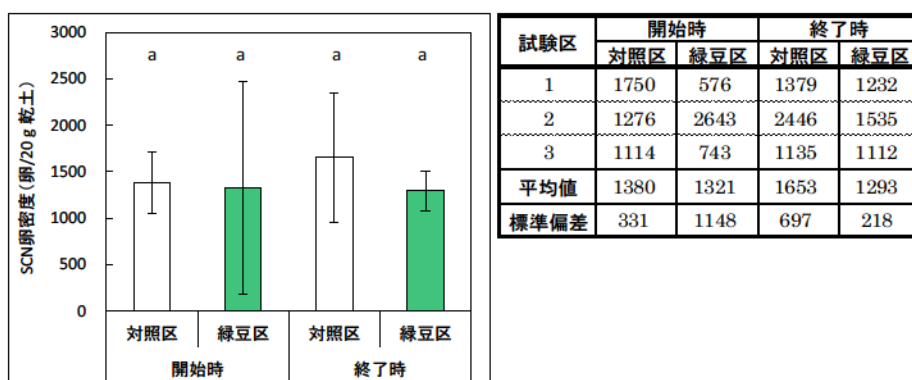


図. 55 7月上旬播種における緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果（平均値±標準偏差、異なるアルファベット間で有意差あり、Tukey-Kramer test, $p < 0.05$ ）

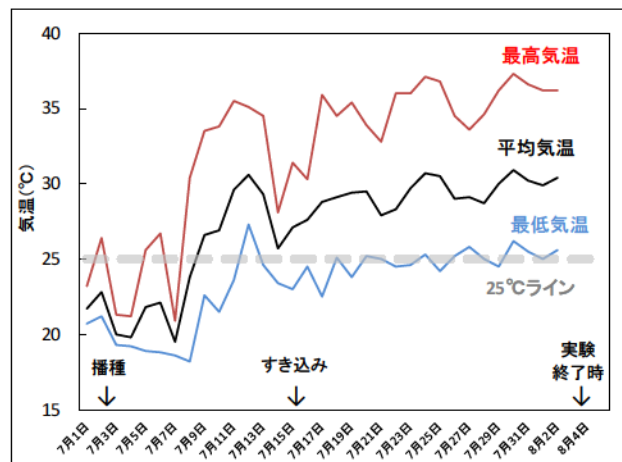


図. 56 7月上旬播種の試験期間中における気温推移 (越谷アメダス)

4.3.3.4 考察

今回の7月に播種した場合の緑豆すき込み法では、ダイズシストセンチュウの卵密度は低下する傾向を示さず、ほぼ横ばいの傾向であった。原因として、気温の推移から推測すると播種後から実験終了時までの地温がダイズシストセンチュウの孵化適温と考えられる25℃よりも高くなり、孵化促進物質の存在下でもダイズシストセンチュウの孵化が促進されなかったのではないかと推測される。

4.3.4 圃場試験 8 月下旬播種における緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除試験

4.3.4.1 目的

前節では 7 月上旬に緑豆を播種し、7 月中旬にすき込みを行ったがダイズシストセンチュウ卵密度の低減効果は認められなかった。そのため、実際のエダマメ栽培後圃場において時期を変えて 8 月上旬下旬に播種を行い、緑豆すき込み法を適用した際のダイズシストセンチュウ卵密度低減効果を検証した。

4.3.4.2 材料と方法

埼玉県八潮市に位置する露地栽培圃場において、0.25 m² (50×50 cm) のプロットを 3 ヶ所設置し、緑豆を 4 kg/10a の密度で播種し、すき込みを行う、緑豆すき込み区及び緑豆を播種せずにすき込み時に土壌の攪拌のみを行う対照区を設置した。なお、プロットの反復は 3 とした。試験スケジュールは 2015 年 8 月 24 日にプロットの設置及び実験開始時の土壌採取、緑豆の播種をおこなった。その後、9 月 17 日まで緑豆を生育させ、同日にすき込みを行った。実験終了時の土壌試料は 10 月 16 日に採取し、ボールミル・Real-time PCR 法によりダイズシストセンチュウ密度を測定した。なお、プロット外で圃場全面に緑豆を 4 kg/10a、8 kg/10a の密度で播種・すき込みを行った場所に置いて、実験終了時に 5 地点混合試料を採取して参考試料として分析を行った。

4.3.4.3 結果

実験開始時では対照区及び緑豆区で同程度のダイズシストセンチュウ卵密度であった (図. 57、対照区 : 2890 卵/20 g 乾土、緑豆区 : 2695 卵/20 g 乾土、以下、単位同様)。その後、緑豆をすき込んでから、約 1 ヶ月後の平均卵密度では、対照区で 2858 卵、緑豆区で 1522 卵と対照区と比較して緑豆区で密度が低下していた (*t*-test, *p* < 0.05)。圃場の全面に 4 kg/10a もしくは 8 kg/10a 播種・すき込みをした試験区でもそれぞれ 1354 卵、385 卵という結果であった。播種から実験終了時までの気温推移では、平均気温が播種時からすき込み 2 週間後まで 20 から 25℃ (平均値 : 22℃) の範囲で推移していた (図. 58)。

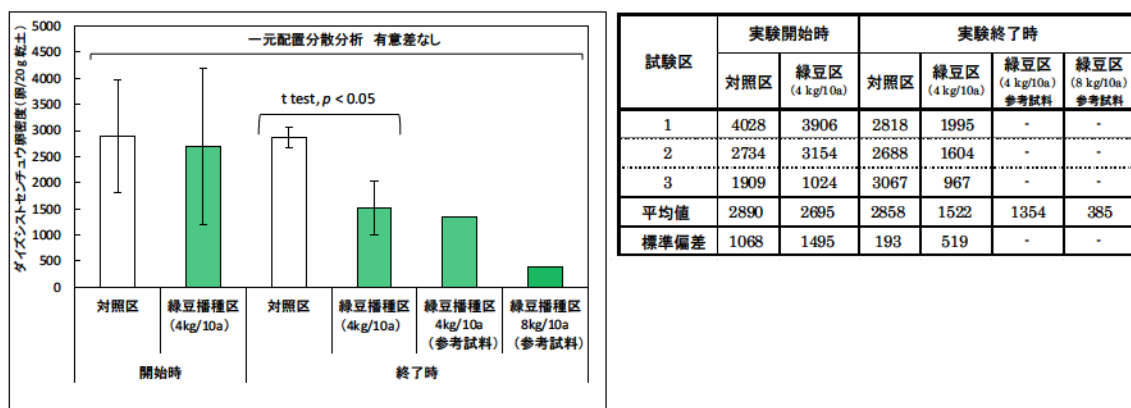


図. 57 8 月下旬播種の緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ卵密度低減効果 (平均値±標準偏差)

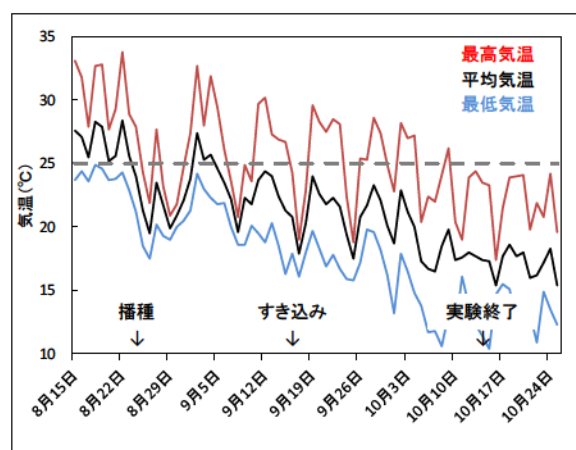


図. 58 8 月下旬播種の試験期間中における気温推移 (越谷アメダス)

4.3.4.4 考察

8 月下旬に播種し、9 月中旬にすき込みを行ったところ、対照区と比較してダイズシストセンチュウ卵密度が約 50%低下する傾向であった。7 月上旬に播種、7 月中旬にすき込みを行った場合と比較して異なる条件は気温推移が考えられる。8 月下旬に播種した場合は平均気温及び最高気温が 25℃前後になるタイミングが多く、7 月上旬に播種した場合は概ね 25℃以上で推移していた。そのため、8 月下旬に緑豆を播種した場合にはダイズシストセンチュウの孵化適温である 25℃前後に達するタイミングが多く、緑豆すき込み法によって密度が低減したものと推測される。

4.4 ダイズシストセンチュウの孵化促進を利用した防除法の適用可能時期の推定

4.4.1 目的

これまでもやし残渣、もやし残渣振とう液、緑豆すき込み法によりダイズシストセンチュウの密度低減効果を確認してきた。しかし、いずれの方法においても対照区と比較してダイズシストセンチュウ卵密度が顕著に低減される時期と低減されない時期があった。そのため、対照区と比較して孵化促進効果を持つ材料を添加することでダイズシストセンチュウ卵密度を効果的に低減できる時期を選別することを目的として解析を行った。

4.4.2 材料と方法

2010 年から 2011 年において実施したもやし残渣及びもやし残渣振とう液添加の圃場試験、2015 年に実施した緑豆すき込み法の圃場試験結果をもとに各プロットの平均卵密度から減少率を算出した。また、ダイズシストセンチュウの孵化に適した時期を選別するため、各試験期間の気温推移（2010 年及び 2011 年：府中アメダス、2015 年：越谷アメダス）のデータと試験期間を重ね合わせ、各手法の適用可能な期間を推定した。

4.4.3 結果

もやし残渣の添加により、ダイズシストセンチュウ卵密度の減少が認められたのは、4月26日及び8月25日にもやし残渣を添加した時期であった（表20）。ダイズシストセンチュウ卵密度の減少率はそれぞれ、4月26日の添加で67.8%（対照区：15.6%）、8月25日の添加で71.9%（対照区：-24.6%）であった。その他の時期においては顕著な減少は認められないか、対照区においても密度が低下する傾向であった。

表20 圃場におけるもやし残渣添加試験による
各時期のダイズシストセンチュウ卵密度減少率の比較

試験年		2010年		2010年/2011年		2011年					
もやし残渣添加日 効果測定日		9月17日 -12月09日		12月9日 -4月26日		4月26日 -6月16日 (ビニールマルチ有)		8月25日 -9月9日		9月9日 -11月10日	
		9月17日	12月9日	12月9日	4月26日	4月26日	6月16日	8月25日	9月9日	9月9日	11月10日
添加回数		3回		1回		1回		1回		1回	
添加日		9月17日 10月2日 11月9日		12月9日		4月26日		8月25日		9月9日	
SCN卵密度 (卵/20g乾土)	対照区	5169	3547	3547	1589	1589	1341	1370	1708	1708	592
	もやし 残渣区	6476	7049	7049	2967	2967	957	6287	1770	1770	924
SCN卵密度 減少率(%)	対照区	31.4		55.2		15.6		-24.7		65.3	
	もやし 残渣区	-8.9		57.9		67.8		71.9		47.8	

もやし残渣振とう液の添加により、ダイズシストセンチュウ卵密度の減少が認められたのは7月9日から8月31日の間に計5回振とう液を添加した時期と4月26日に添加した時期であった(表21)。ダイズシストセンチュウ卵密度の減少率はそれぞれ、7月9日から8月31日の間に添加した場合は63.0%(対照区:22.4%)、4月26日に添加した場合は66.4%(12.8%)であった。その他の時期では減少が認められないか、対照区においても卵密度が低下する傾向であった。

表 21 圃場におけるもやし残渣振とう液添加試験による
各時期のダイズシストセンチュウ卵密度減少率の比較

試験年		2010年				2010年/2011年		2011年			
振とう液添加日 ・効果測定日		7月9日 ・9月17日		9月17日 ・12月9日		12月9日 ・4月26日		4月26日 ・6月1日 (ビニールマルチ有)		8月25日 ・11月10日	
		7月9日	9月17日	9月17日	12月9日	12月9日	4月26日	4月26日	6月1日	8月25日	9月9日
添加回数		5回		3回		1回		1回		1回	
添加日		7月9日 7月23日 8月7日 8月20日 8月31日		9月17日 10月2日 11月9日		12月9日		4月26日		8月25日	
SCN卵密度 (卵/20g乾土)	対照区	3067	2380	2380	2840	2840	1660	1660	1448	5293	1695
	振とう液区	1714	634	634	1080	1080	692	692	233	6547	1501
SCN卵密度 減少率(%)	対照区	22.4		-19.3		41.5		12.8		68.0	
	振とう液区	63.0		-70.3		35.9		66.4		77.1	

枝豆栽培

緑豆すき込み法によってダイズシストセンチュウ卵密度の低下が認められたのは、8月24日に播種し、9月17日にすき込んだ場合であり、43.5%（対照区：1.1%）の減少率であった。7月3日に緑豆を播種し、7月16日にすき込みを行った場合では卵密度減少率は0%卵（対照区：-19.8%）と密度低減効果は認められなかった。

表 22 圃場における緑豆すき込み試験による
各時期のダイズシストセンチュウ卵密度減少率の比較

試験年		2015年			
緑豆播種日		7月3日		8月24日	
すき込み日		7月16日		9月17日	
効果測定日		8月4日		10月16日	
播種密度		9 kg/10a		4 kg/10a	
SCN卵密度 (卵/20 g 乾土)	対照区	1380	1653	2891	2858
	緑豆区	1321	1293	2695	1522
SCN卵密度 減少率(%)	対照区	-19.8		1.1	
	緑豆区	0.0		43.5	

ダイズシストセンチュウの密度低減効果のあった時期を推定すると、もやし残渣及びもやし残渣振とう液では共通して4月下旬にビニールマルチを行い、添加した場合に密度低減効果が認められており、それぞれの減少率は対照区よりも約50%高い減少率を示した(図. 59)。もやし残渣及び緑豆すき込み法では、8月の下旬に添加もしくは播種した場合は密度低減効果が認められるが、もやし残渣振とう液では対照区においても密度が減少しており、処理による密度低減効果は認められなかった。また、もやし残渣振とう液については7月9日から9月17日にかけて5回添加したところ、対照区よりも約40%多く密度が減少していた。

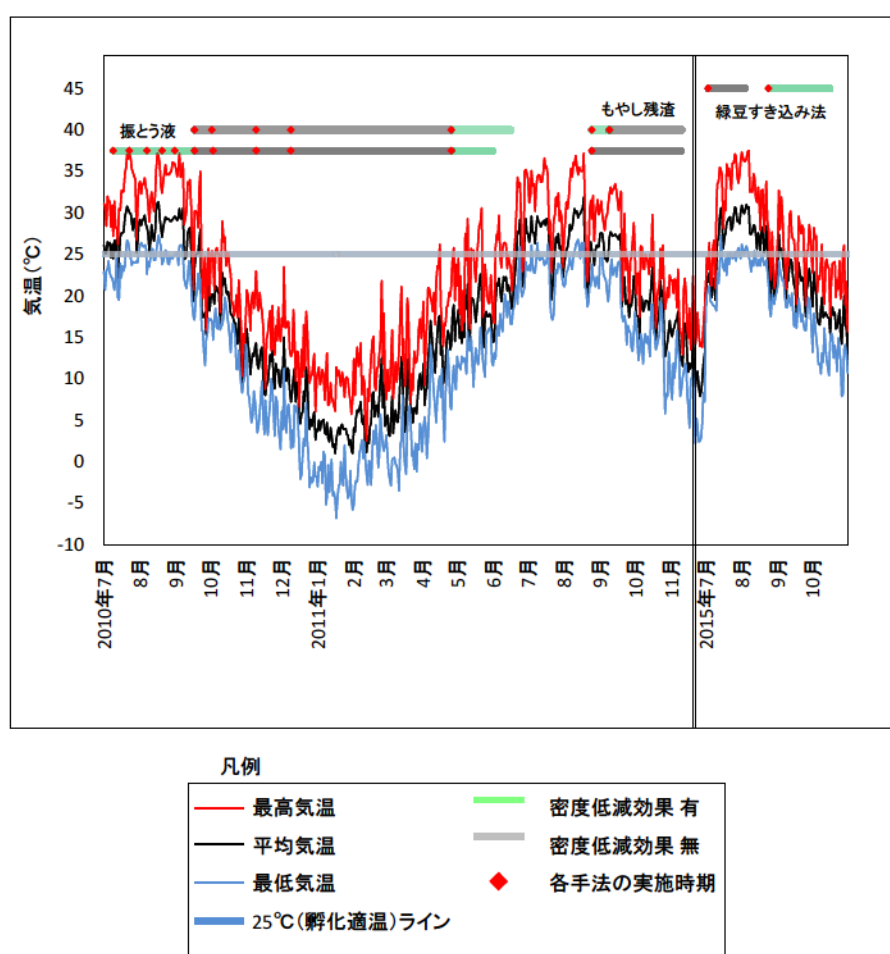


図. 59 各防除手法の実施時期及び密度低減効果の有無と気温推移
(2010年から2011年の気温データ：府中アメダス、2015年：越谷アメダス)

4.4.4 考察

4 月下旬から 6 月にかけてビニールマルチをおこない、もやし残渣及び振とう液を添加することにより、ダイズシストセンチュウ密度が減少しており、気温の推移では最高気温が 25℃前後に達する時期である。また、4 月 28 日から 5 月 25 日の期間は土壌深度 5 cm 及び 10 cm で地温を測定しており、ビニールマルチをした場合では土壌深度 5 cm 及び 10 cm の平均地温は 20.3℃（マルチなし：18.8℃）、平均最高地温は 25.9℃（マルチなし：23.5℃）であった。この時期においてはビニールマルチをせずに孵化促進効果のある材料を添加する試験は行っていないが、地温のデータからビニールマルチをすることでダイズシストセンチュウの孵化適温と考えられる 25℃前後に達する機会が増加するものと推察される。

次に 8 月下旬にもやし残渣及び緑豆すき込み法を行うことでダイズシストセンチュウ卵密度の減少が確認されており、気温の推移と照合すると平均気温及び最高気温が 25℃前後を推移しており、ダイズシストセンチュウの孵化に適した時期であると推定される。また、もやし残渣振とう液を添加した試験区では対照区においても密度が減少していた。対照区においても密度減少した可能性として、1) ダイズシストセンチュウ卵や二期幼虫の含む孵化促進物質による孵化及び餓死による密度減少、2) 天敵微生物による密度減少が考えられる。ダイズシストセンチュウは宿主の非存在下でも密度が減少することが知られている (Francel & Dropkin, 1986)。この現象はダイズシストセンチュウの卵や二期幼虫自身が含まれる孵化促進物質に由来するものと推測される。卵や二期幼虫が含まれる孵化促進物質は水溶性の有機化合物であると推定されており、ダイズシストセンチュウの孵化に及ぼす影響は卵及び幼虫密度に依存することが知られている (岡田, 1977)。そのため、8 月下旬にもやし残渣振とう液を添加した場合には、エダマメ栽培直後でダイズシストセンチュウ卵密度が高い状況であり、対照区においてもダイズシストセンチュウが有する孵化促進物質によって孵化及び餓死に至り、卵密度が低下した可能性がある。8 月下旬のもやし残渣振とう液区及びその対照区では卵密度がそれぞれ 6547 卵/20 g 乾土（以下、単位同様）、5293 卵であり、土壌 1 g を 1 ml に換算して岡田 (1977) の結果と比較したところ、30～40%のダイズシストセンチュウ卵が孵化するものと推測された。この孵化率は 8 月から 11 月における実際の卵密度減少率（対照区：68%、もやし残渣振とう液区：77%）よりは低いものの、ダイズシストセンチュウの減少要因を説明する上では重要な因子であると考えられる。天敵微生物による密度減少では、ダイズシストセンチュウの幼虫や卵に寄生する微生物 (Crump *et al.*, 1983; Goboy *et al.*, 1982) が報告されており、日本においてもダイズシストセンチュウ密度の減少には天敵微生物の関与が示唆されている (橋本ら, 1988)。また、天敵微生物のうち卵寄生菌は地温が高いほどダイズシストセンチュウ卵への寄生率が高まることが報告

されており（氣賀澤, 1992）、エダマメ栽培後の8～9月という地温が高い条件下でダイズシストセンチュウ卵が寄生及び分解されることで密度が減少した可能性がある。

もやし残渣振とう液の場合と同様に8月下旬にもやし残渣を添加した試験区のみダイズシストセンチュウ卵密度が高く（もやし残渣区：6287卵/20g乾土、対照区：1370卵/20g乾土）、もやし残渣による効果かダイズシストセンチュウの有する孵化促進物質や卵寄生菌による効果で密度が低下しているのかは不明であるが、緑豆すき込み法を8月下旬から実施した場合では対照区で密度の減少がみられず、緑豆すき込み処理によって卵密度が減少しており、この時期の気温推移も平均気温が25℃前後を推移しているため防除可能な期間であると考えられる。

以上のことから、孵化促進効果のある材料を土壤に添加することでダイズシストセンチュウの密度を低減するためには、ダイズシストセンチュウの孵化適温と考えられる地温25℃前後になる時期に実施する必要がある。もやし残渣及びもやし残渣振とう液であれば、ビニールマルチをした上で4月下旬から6月上旬、8月下旬から9月中旬にかけて添加する必要がある。緑豆すき込み法では4月中旬から6月上旬に播種し、4月下旬から6月中旬にすき込みもしくは、8月中旬から9月上旬に播種し、8月下旬から9月中旬にはすき込む必要があると推測される。

4.5 第4章要約

本章ではダイズシストセンチュウの防除手法として、宿主が存在しない状況下で孵化促進効果のある材料を添加することで孵化を促進し、餓死に至らせるという生態的特徴を利用した防除法の検討及び開発を行った。

防除手法として、1) もやし生産工場から廃棄されるもやし残渣の添加、2) もやし残渣と水を混合・振とうした溶液（以下、振とう液）の添加、3) もやしの原料である緑豆を圃場に直接播種し、すき込む方法（以下、緑豆すき込み法）について開発及び効果の検証を行った。

もやし残渣について、室内試験において効果を検証したところ、もやし残渣の食用部を土壤に添加することでダイズシストセンチュウ卵密度を50～65%、同様に根を添加することで90%の低減効果が得られた。このため、圃場においてもやし残渣添加によるダイズシストセンチュウの密度低減効果を5パターンの時期に分けて検証した。その結果、4月下旬～6月中旬（密度減少率：67%、ビニールマルチ有）及び8月下旬～9月上旬（密度減少率：68%）において対照区と比較してダイズシストセンチュウ卵密度が顕著に減少していた。その他の時期はダイズシストセンチュウ密度の減少が認められないもしくは対照区においても密度が減少していた。

振とう液について、室内試験でダイズシストセンチュウの密度低減効果を評価した結果、

振とう液を継続的に添加した試験区では、対照区と比較して80%の密度低減効果が得られた。このため、5パターンの時期に分けて、圃場に振とう液を添加し、ダイズシストセンチュウ密度低減効果を検証した。その結果、7月上旬-9月中旬（密度減少率：50%）、4月下旬-6月上旬（密度減少率：62%、ビニールマルチ有）において、対照区と比較してダイズシストセンチュウ卵密度が顕著に減少していた。

緑豆すき込み法について、室内試験による密度低減効果を検証した結果、緑豆を播種後1週間生育させてすき込むことで37～92%のダイズシストセンチュウ卵密度低減効果が得られた。また、播種密度を上げることで密度低減効果が上昇する傾向であった。このため、圃場において緑豆すき込み法の効果を2パターンの時期に分けて検証した。その結果、8月下旬-10月中旬に緑豆すき込み法を行った場合に密度低減効果が得られた（密度減少率：40%）。

最後にこれまでの試験時期を統合して各防除手法において顕著な効果が得られた時期を推定した結果、4-6月及び8-9月の期間に適用することで効果的にダイズシストセンチュウ卵密度を低減できると考えられた。推定された期間では、最高気温もしくは平均気温が25℃前後を推移しており、ダイズシストセンチュウの孵化適温に達するため、孵化促進効果のある材料を添加することで顕著な密度低減効果が得られたものと推測される。

5. 総合考察

ダイズシストセンチュウを対象とした診断及び防除に関する研究は多数報告されているが、実際の生産圃場で適用するのに則した診断技術や防除技術の開発が必要である。本研究では東京近郊で栽培が盛んなエダマメを対象として、ダイズシストセンチュウの要防除水準の作成及び新規防除手法の開発を目的とした。

1. ダイズシストセンチュウの定量及びエダマメ栽培圃場における土壌深度分布

ダイズシストセンチュウの定量にはふるい分け法（佐野ら, 2004）やフェンウィック法（Fenwick, 1940）を介して土壌中からシストを分離し、顕微鏡下で卵を計数する方法が一般的である。しかし、シストを土壌から分離する際に土壌中の夾雑物も同時に分離されることから、シストを選別する必要があり手間が掛かる。また、分離されたシスト内の卵を計数する手間もあるため、本線虫の密度を簡易に把握できる手法の開発が必要とされている（串田, 2010）。そのため、Goto *et al.* (2009) では土壌中のダイズシストセンチュウのDNAを対象として同時に多検体を分析できる土壌締め固め・Real-time PCR法を開発した。本研究では土壌の前処理（粉砕・攪拌）部分にあたる締め固め法をボールミル法に変更することで、より簡易に定量出来るように分析法の開発をおこなった。ダイズシストセンチュウ非汚染土壌に本線虫の卵を 50, 120, 250, 500, 1000, 1500 卵/20 g 乾土になるように添加し、土壌から DNA を抽出して Real-time PCR 法により測定した結果、Real-time PCR 法によって得られる Ct 値と本線虫卵の添加密度との間に有意な相関が得られた ($R^2 = 0.95$, $p < 0.01$)。また、締め固め法と比較してボールミル処理では Ct 値が 0.7~3.1 減少する傾向にあったことから、ボールミル処理において締め固め処理よりも粉砕効率が良いものと考えられる。今回開発したボールミル・Real-time PCR 法では、これまでの研究で比較的低い要防除水準と考えられる約 60 卵/20 g 乾土（Francé & Dropkin, 1986）よりも低い 50 卵/20 g 乾土でも定量が可能であったことから、実際の診断に利用できるものと考えられる。

次に本線虫密度の土壌深度分布について検討をおこなった。本研究では、土壌深度 0-60 cm を対象として本線虫の密度分布を調査した。その結果、土壌深度 0-30 cm に本線虫密度の 90%以上が分布していた。本線虫のダイズ栽培圃場における土壌中の深度分布はおおむね 0-30 cm に 80~90%が存在しているとの報告があり（Alston&Schmitt, 1987）、ダイズの幼苗根では、土壌深度 5-10 cm に分布する根に侵入個体数の 60~70%が集中するとの報告がある（Wu *et al.*, 2011）。したがって、本線虫密度の診断及びエダマメへの感染の両方を考える上では、0-30 cm 深度の土壌を対象とすることが適当であると考えられる。

2. 都市近郊のエダマメ栽培圃場におけるダイズシストセンチュウの発生状況

既往の研究において、ダイズ栽培圃場で本線虫が調査された結果、83 圃場のうち 36 圃場（検出率：43.4%）で存在が確認されている（相場, 2001; 相場, 2002; 相場, 2004; 相場, 2006）。しかし、国内におけるエダマメ栽培圃場を対象とした本線虫の発生状況の調査例は

少ない（伊藤ら，2006）。そこで、本研究では埼玉県、神奈川県、千葉県のエダマメ栽培圃場において本線虫の発生状況を調査した。その結果、73 圃場を調査した中で、63 圃場で本線虫が検出され（検出率：86.3%）、エダマメ栽培圃場で本線虫が高頻度で存在していることが明らかとなった。本研究における調査は本線虫の発生が懸念される圃場を中心としておこなっていることが影響している可能性もあるが、ダイズ栽培圃場における検出率よりも高い結果であり、この検出率の差が生じる原因として、水田転換による本線虫の密度低下（酒井ら，1987；清水ら 1988）やダイズ栽培で導入されているダイズシストセンチュウ抵抗性品種の導入等（橋本ら，1988）の理由によって本線虫密度が低く保たれ、本研究の結果との間に差が生じているものと推察された。

3. 植物寄生性線虫及び土壌化学性、定植時期がエダマメ収量に及ぼす影響

3 種類の植物寄生性線虫及び土壌化学性、定植時期とエダマメ収量との関係を解析したところ、定植時期によってエダマメ収量に関与する植物寄生性線虫及び土壌化学性が異なることが分かった。施設促成栽培によるエダマメは2月と3月に定植されるが、3月定植のエダマメのみダイズシストセンチュウ密度とエダマメ収量との間に負の相関が得られた。これは、ダイズシストセンチュウの孵化温度に起因するものと考えられ、ダイズシストセンチュウの孵化適温とされる地温 25℃前後（岡田，1977；Alston & Schmitt, 1988）に達する日数が2月に定植した場合よりも3月に定植した場合において多くなることが要因として考えられた。一方で2月に定植した場合では、キタネグサレセンチュウ密度とエダマメ収量との間に負の相関が得られており、密度と減収の関係が Shmitt & Barker (1981) の結果と類似していた。キタネグサレセンチュウは孵化適温が 15～20℃ (Pudasaini *et al.*, 2008) とダイズシストセンチュウよりも低いため、2月定植のエダマメ収量に対して負の相関を示したものと考えられる。土壌化学性においてはダイズシストセンチュウの被害が生じやすいと考えられる 3 月定植のエダマメ収量において土壌中の栄養塩類が正の相関を示したのに対して、2月定植の場合では栄養塩類と正の相関が得られず、キタネグサレセンチュウの被害が栄養塩類で軽減されないことが推察された。また、キタネグサレセンチュウが74 地点中 69 地点から検出されており、潜在的にエダマメの減収に関与していると考えられる。

ダイズシストセンチュウ密度と 3 月定植のエダマメ収量との関係から、要防除水準を推定したところ、81 卵/20 g 乾土で 10%減収に達するとの結果が得られ、串田ら（2010）の結果に類似していた。このことから、ボールミル・Real-time PCR 法によるダイズシストセンチュウの密度推定においても要防除水準を推定することが可能であるとの結論を得た。

4. もやし残渣、もやし残渣振とう液、緑豆すき込み法によるダイズシストセンチュウ防除方法の開発

ダイズシストセンチュウの孵化を促進し、餓死に至らせることで本線虫を防除できないか検討をおこなった。もやし残渣、もやし残渣振とう液、緑豆すき込みのいずれの方法も

室内試験及び圃場試験で密度低減効果を発揮したが、圃場試験においては添加する時期によって密度低減効果が発揮されないことがあった。これは先述のダイズシストセンチュウの孵化適温に依存するものと推察され、圃場試験のデータの蓄積から本防除手法の適用に際しては4・6月及び8・9月の地温25℃前後に達する時期が適当であると推察された。エダマメの栽培時期を考慮すると、施設栽培における極早生・早生品種の栽培後（5・6月）や中生品種の栽培後（8・9月）、晩生品種の栽培前（4・5月）などで本防除手法の適用が可能であると推察される。従来の緑肥による防除方法では2～3ヶ月程度の栽培期間が必要であったが（山田, 2003; 山田, 2004）、本研究で開発した手法であれば、3週間から1ヶ月程度で密度を低減させることが可能であり、都市近郊のエダマメ栽培では後作が控えることを考慮すると、短期間で防除するのに適した手法であると考えられる。

謝辞

本研究にあたって御指導を賜った東京農工大学教授 豊田剛己博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の機会を与えて下さった株式会社 環境管理センター 水落憲吾社長や応援いただいた会社の皆様に心より感謝いたします。

最後に生活面で支えてくれた両親や研究生活を共にした同輩の皆様に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- Alston D. G. and Schmitt D. P. (1987) Population density and spatial pattern of *Heterodera glycines* in relation to soybean phenology. *Journal of Nematology* 19: 336-345.
- Alston D. G. and Schmitt D. P. (1988) Development of *Heterodera glycines* life stages as influenced by temperature. *Journal of Nematology* 20: 366-372.
- Avendano F., Pierce F. and Melakeberhan H. (2004) Spatial analysis of soybean yield in relation to soil texture, soil fertility and soybean cyst nematode. *Nematology* 6: 527-545.
- Bruin J. D. and Pedersen P. (2007) Soil fumigation and variety selection to study soybean cyst nematode in IOWA. *Journal of Nematology* 39: 99.
- Bruin J.De., Pedersen P. (2008) Soybean cultivar and planting date response to soil fumigation. *Agronomy Journal* 100: 965-970.
- Chen S. Y., Porter P. M., Orf J. H., Reese C. D., Stienstra W. C., Young N. D., Walgenbach D. D., Schaus P. J., Arlt T. J. and Breitenbach F. R. (2001) Soybean cyst nematode population development and associated soybean yields of resistant and susceptible cultivars in Minnesota. *Plant Disease* 85: 760-766.
- Crump D. H., Sayre R. M. and Young L. D. (1983) Occurrence of nematophagous fungi in cyst nematode populations. *Plant Disease* 67: 63-64.
- FAO HP (<http://www.fao.org/>)
- Fenwick D. W. (1940) Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schantii* from soil. *Helminthology* 4: 155-172.
- Francel L. J. and Dropkin V. H. (1986) *Heterodera glycines* population dynamics and relation of initial population to soybean yield. *Plant Disease* 70: 791-795.
- Fukuzawa A., Furusaki A., Ikura M. and Masamune T. (1985) Glycineoeclepin A, a natural hatching stimulus for the soybean cyst nematode. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 4: 222-224.
- Godoy G. R., Rodoriguez-Kabana R. and Morgan-Jones G. (1982) Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica* 12: 111-119.
- Goodell P. B. and Ferris H. (1989) Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 21: 328-334.
- Goto K., Sato E., and Toyota K. (2009) A novel detection method for the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe using soil compaction and real-time PCR. *Nematological Research* 39: 1-7.
- Hill N. S. and Schmitt D. P. (1989) Influence of temperature and soybean phenology on

- dormancy induction of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 21: 361-369.
- Kinloch R. A. (1982) The relationship between soil populations of *Meloidogyne incognita* and yield reduction of soybean in the coastal plain. *Journal of Nematology* 14: 162-167.
- Klink V. P., Overall C. C. and Matthews B. F. (2007) Developing a systems biology approach to study disease progression caused by *Heterodera glycines* in *Glycine max*. *Gene Regulation and Systems Biology* 2: 17-33.
- Konno S. (1970) Soybean cultivation in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly* 5: 21-27.
- Kushida A., Uehara T. and Momota Y. (2002) Effect of red clover on hatching and population density of *Heterodera glycines* (Tylenchida:Heteroderidae). *Japanese Journal of Nematology* 32: 69-76.
- Masamune T., Anetai, M., Takasugi M. and Katui N. (1982) Isolation of a natural hatching stimulus, glycinoeclepin A, for the soybean cyst nematode. *Nature* 297: 495-496.
- Min Y. Y., Toyota K., Sato E., Mizuguchi S., Abe N., Nakano A. and 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. Nematology* 13: 95-102.
- Murai A. (1989) Total synthesis of glycinoeclepin A. *Pure and Applied Chemistry* 61: 393-396
- Murillo-Ailliams A., Kaspar T. C. and Pedersen P. (2010) Root characteristics of two soybean cultivars grown in fumigated fields in Iowa. *Crop Science* 50: 2037-2045.
- Noel G. R. and Wax L. M. (2003) Population dynamics of *Heterodera glycines* in conventional tillage and no-tillage soybean/corn cropping systems. *Journal of Nematology* 35: 104-109.
- Pudasaini M. P., Viaene N. and Moens M. (2008) Hatching of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*, under the influence of temperature and host. *Nematology* 10: 47-54.
- Riga E., Welacky T., Potter J., Anderson T., Topp E. and Tenuta A. (2001) The impact of plant residues on the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 168-173.
- Rogovska N. P., Blackmer A. M. and Mallarino A. P. (2007) Relationships between soybean yield, soil pH, and soil carbonate concentration. *Soil Science of America Journal* 71: 1251-1256.
- Sato E., Goto K., Min Y. Y., Toyota K. and Suzuki C. (2010) Quantitative detection of *Pratylenchus penetrans* from 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. and 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 & Plant Nutrition* 57: 213-220.
- Shiina Y., Tomata Y., Miyashita, M. Tanino K. (2010) Asymmetric total synthesis of glycinoclepin A: generation of a novel bridgehead anion species. *The Chemical Society of Japan* 39: 835-837.
- Shmitt D. P. and Barker K. R. (1981) Damage and reproductive potentials of *Pratylenchus brachyurus* and *P. penetrans* on soybean. *Journal of Nematology* 13: 327-332.
- Toyota K., Goto K. and Ito D. (2013) Effect of bean sprout residue on the hatching and density of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* in soil. *Nematology* 15: 923-929.
- Tylka G. L. and Marett C. C. (2014) Distribution of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, in the United States and Canada: 1954 to 2014. *Plant Health Progress* 15: 85-87.
- Villamil M. B., Davis V. M. and Nafziger E. D. (2012) Estimating factor contributions to soybean yield from field data. *Agronomy Journal* 104: 881-887.
- Watanabe T., Masamura 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 in an andosol. *Nematological Research* 43: 21-29.
- Wrather J. A., Anderson T. R., Arsyad D. M., Gai J., Ploper L. D., Porta-Puglia A., Ram H. H. and Yorinori J. T. (1997) Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries. *Plant Disease* 81: 107-110.
- Wrather J. A., Chambers A. Y., Moore W. F. and Sciubato G. L. (1995) Soybean disease loss estimates for the Southern United States, 1974 to 1994. *Plant Disease* 79: 1076-1079.
- Wrather J. A. and Koenning S. (2006) Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of Nematology* 38: 173-180.
- Wu H., Wasng Z., Li X. and Liu J. (2011) Temporal-spatial population density of *Heterodera glycines* in soybean roots during the early growth stage. *Nematology* 13: 79-86.
- 相場 聡 (2001) 茨城県内におけるダイズシストセンチュウ発生状況. 日本応動昆学会講演要旨集 45: 32.
- 相場 聡 (2002) 栃木県及び千葉県内におけるダイズシストセンチュウ発生状況. 日本応動昆学会講演要旨集 46: 32.

- 相場 聡 (2006) 岐阜県及び埼玉県の大イヌシストセンチュウ発生状況. 日本応動昆虫学会講演要旨集 50: 99.
- 相場 聡 (2007) 福島県の大イヌシストセンチュウ発生状況. 日本応動昆虫学会講演要旨集 51: 70.
- 相場 聡 (2008) 山形県および宮城県の大イヌシストセンチュウ発生状況. 日本応動昆虫学会講演要旨集 52: 167.
- 相場 聡, 千本木 市夫, 藍沢 亨 (2004) 群馬県, 富山県および新潟県における大イヌシストセンチュウの発生状況. 日本応動昆虫学会講演要旨集 48: 72.
- 江村 薫, 植竹恒夫, 藤田耕郎 (1992) ダイズシストセンチュウ高密度土壌での大豆生産に及ぼす窒素の追肥効果. 関東東山病害虫研究会年報 39: 293-296.
- 後藤 昭 (1974) 本邦におけるネグサレセンチュウ *Pratylenchus* spp. の地理的分布. 九州農業試験場報告 17: 139-224.
- 橋爪 健 (2007) 雪印の線虫対抗作物. 牧草と園芸 55: 11-16.
- 橋本鋼二, 稲垣春郎, 百田洋二 (1988) 抵抗性程度の異なる大豆品種の連作による生育・収量並びにダイズシストセンチュウ密度の変動. 東北農業試験場報告 78: 1-14.
- 石川元一, 渡辺耕造 (1983) 輪作とダイズシストセンチュウ密度. 関東東山病害虫研究会報 30: 189.
- 伊藤 綾, 竹内浩二, 高木章雄, 櫻井文隆, 渋澤英城, 菅谷悦子, 柴森弘己, 山岸 明 (2006) 東京都におけるエダマメの大イヌシストセンチュウ発生実態. 関東東山病害虫研究会報 53: 153-156.
- 岩堀英晶, 立石 靖, 上杉謙太 (2010) 九州中部の大イヌシストセンチュウで検出された主要有害線虫. 九州病害虫研究会報 56: 42-45.
- 岩堀英晶, 上杉謙太 (2013) 有害線虫総合防除技術マニュアル. 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業センター 3-5, 11-12.
- 海妻矩彦, 喜多村 啓介, 酒井真次 (2003) わが国における食用マメ類の研究. 中央農業総合研究センター 360-367.
- 氣賀澤 和男 (1992) ダイズシストセンチュウの卵寄生菌に関する研究 (1) 土壌条件と卵寄生菌の活性. 北日本病害虫研究会報 43: 124-126.
- 串田篤彦, 辻 雅文, 伊藤 登 (2010) ダイズシストセンチュウ密度と感受性ダイズ品種「キタムスメ」収量との関係. 北日本病害虫研究会報 61: 150-153.
- 古賀成司, 小代寛正 (1983) 秋ダイズに対するサツマイモネコブセンチュウ及びジャワネコブセンチュウの寄生性. 九州病害虫研究会報 29: 136-137.
- 国分 喜治郎, 橋本鋼二, 稲垣春郎 (1983) ダイズシストセンチュウ汚染土壌への湛水処理並びに堆肥施用がダイズ品種の生育・収量に及ぼす影響. 日本作物学会東北支部会報 26: 63-65.
- 小柳淳史 (1998) 深さの定量化による作物根系の新しいとらえかた. 日本作物学会紀事 67: 3-10.
- 皆川 望 (1992) ネコブセンチュウの個体群動態と密度推定法. 線虫研究の歩み 中園和年

- 編、日本線虫研究会 87-92.
- 百田洋二 (2004) 各論 3 シストセンチュウ・Heteroderinae 亜科. 線虫の見分け方 植物防疫 8: 23-28.
- 奈良部 孝、難波成任、山下修一、土居洋二 (1988) 関東各地におけるネコブセンチュウ (*Meloidogyne* spp.) の発生状況と分布について. 日本植物病理学会報 54: 387.
- 奈良部 孝 (1995) ネコブセンチュウの新手法による同定とわが国における分布. 関東東山病虫害研究会年報 42: 9-14.
- 奈良部 孝 (2008) 植物の根に関する諸問題 [177] ー植物根由来のふ化促進物質を利用したシストセンチュウの防除ー. 農業および園芸 83: 595-600.
- 農林水産省 (2008) 健康な土づくり基準マニュアル [3] 畑作・野菜. 112-113.
- 農林水産省 (2015) 国産大豆品種の品質評価結果【HP 公表版】. (http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_ziten/pdf/1hyoka26.pdf)
- 及川一也、作山一夫、赤坂安盛、神山芳典 (1991) エダマメ栽培におけるダイズシストセンチュウの被害予測と輪作による線虫密度の変動. 日本作物学会東北支部会報 34: 7-9.
- 岡田浩明 (1996) アレナリアネコブセンチュウの播種前密度がダイズの収量と生育に及ぼす影響. 北日本病虫害研究会報 47: 105-106.
- 岡田利承 (1977) ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines* Ichinohe) の孵化要因に関する研究. 日本線虫研究会誌 6: 1-50.
- 大類幸夫 (1997) ジャガイモシストセンチュウおよび *Heterodera* 属シストセンチュウ 4 種の PCR-RFLP 解析による識別. 日本線虫学会誌 27: 67-75.
- 大類幸夫、水久保 隆之 (1999) 関東地方の作物圃場におけるネグサレセンチュウの種構成ならびにミナミネグサレセンチュウとその形態的類似種の分布境界. 日本線虫学会誌 29: 1-6.
- 三枝敏郎 (1993) センチュウーおもしろ生態とかしこい防ぎ方ー. 農山漁村文化協会 62-64., 77-78.
- 斎藤浩一 (1985) ダイズシストセンチュウ密度とダイズの生育・収量の関係. 関東東山病虫害研究会報 32: 227-228.
- 佐野善一、水久保 隆之、相場 聡 (2004) 2 線虫の分離法. 日本線虫学会 線虫学実験法 86-87.
- 佐藤昭美 (1968) ダイズシストセンチュウの殺線虫剤感受性について. 北日本病虫害研究会報 19: 95.
- 佐藤昭美、大森秀雄 (1969) ダイズシストセンチュウの防除に関する研究. 岩手県農業試験場報告 13: 1-47.
- 酒井真次、村上昭一、長沢次男、橋本鋼二 (1987) ダイズシストセンチュウの動態に対する累年湛水処理の影響. 日本作物学会東北支部会報 30: 71-72.
- 清水啓 (1978) 傾瀉ふるい分け法と遠心浮遊法の併用によるイネシストセンチュウのシストの分離. 日本線虫学会誌 8: 20-23.

- 清水 啓、相場 聡、三井 康（1988）数種作物栽培下におけるダイズシストセンチュウの動態. 北日本病害虫研究会報 39: 187-188.
- 白山義久（2003）第1章 線虫の世界. 線虫の生物学（石橋信義編）. 東京大学出版会 3-11.
- 田澤純子、山本泰由、臼紀一英、三浦重典（2008）浅耕栽培と施肥法または異なる作付体系の組合せがダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) の卵密度推移とダイズの生育に及ぼす影響. 日本作物学会紀事 77: 33-40.
- 辻 博之、山本泰由、松尾和之、臼木一英（2002）火山灰性土壤畑におけるラッカセイ、トウモロコシ、ダイズの根系に及ぼす不耕起栽培の影響. 根の研究 11: 43-49.
- 堤 正明（1969）無寄生状態におけるダイズシストセンチュウ幼虫の生存期間について. 北日本病害虫研究会報 20: 110.
- 水久保 隆之（2004）第6章 土壤線虫・植物寄生性線虫 1 サンプルリング法 線虫学実験法 日本線虫学会 78-86.
- 山田英一（1967）数種作物におけるキタネグサレセンチュウの消長. 北日本病害虫研究会報 18: 124.
- 山田英一、橋爪 健、高橋 穰（2003）マメ科緑肥作物のダイズシストセンチュウ密度低減効果およびキタネグサレセンチュウに及ぼす影響. 日本線虫学会誌 33: 1-3.
- 山田英一、佐久間 太、橋爪 健、高橋 穰（2004）秋まきコムギ収穫跡地に栽培下クリムソンクローバーおよびウーリーポッドベッチのダイズシストセンチュウ密度低減効果. 日本線虫学会誌 34: 31-37.

付録

論文目録

原著論文

- 1) Ito D., Toyota K. and Sedrati G., M. (2015) Suppression of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, using water extrac of bean sprout residue. *Nematology* 17: 523-530.

学会発表

- 1) 伊藤大輔、豊田剛己、加藤雅之、森 久夫、岡田 繁、福地 峻、日比谷利夫、松本裕太、吉田 保、臼倉進一、埼玉県枝豆圃場におけるリアルタイム PCR 法を用いたダイズシストセンチュウの要防除水準の作成、2014 年度日本線虫学会大会



Suppression of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, using water extract of bean sprout residue

Daisuke ITO^{1,2,*}, Koki TOYOTA¹ and Ghalia Missous SEDRATI¹

¹ Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16, Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

² Environmental Control Center Co. Ltd, 323-1, Shimo Ongata-cho, Hachioji, Tokyo 192-0154, Japan

Received: 9 January 2015; revised: 3 March 2015

Accepted for publication: 3 March 2015; available online: 2 April 2015

Summary – The soybean cyst nematode (SCN), *Heterodera glycines*, is a widespread pest in most soybean-producing areas, causing serious damage to soybean crops and resulting in economic losses. We have previously reported that bean sprout residue might function as an environmentally-friendly control agent against SCN. In order to understand the role of water extracted from bean sprout residue as a possible factor in lowering the number of SCN, either water extract of bean sprout residue (WE) or water (W) was applied to pots containing soil infested with SCN, and komatsuna plants, a leafy vegetable, were grown in these pots. After 2 months, the number of SCN, estimated with real-time PCR, was 80% lower in WE than in W and the biomass of komatsuna plants was 100% higher in WE than in W, suggesting that WE has not only an SCN eradication effect but also a fertilisation effect. In field experiments, WE or W was applied ten times during the experimental period from July 2010 to June 2011. The number of SCN decreased by 82% in WE and by 36% in W; however, the marked decrease was observed only between July and September and between April and June. Green soybean plants were grown in the field where WE or W had been applied and the yield was markedly higher in WE (750 g m⁻²) than in W (200 g m⁻²). The hatching stimulation of SCN eggs by WE was tested at four different temperatures (10, 20, 25, 30°C) and was observed only at 25°C. These results show that water extract of bean sprout residue decreases the density of SCN and thereby damage to green soybeans, and that the suppressive effect depends on soil temperature.

Keywords – *Glycine max*, hatching stimulation, Japan, real-time PCR, soybean.

Soybean (*Glycine max*) is a high value crop that represents 50% of the global crop legume area and 68% of global legume production (Herridge *et al.*, 2008). In addition to its nutritional value, soybean has a nitrogen-fixing ability that improves soil fertility (Hungria & Bohrer, 2000). The soybean cyst nematode (SCN), *Heterodera glycines* Ichinohe, is a plant-parasitic nematode that causes severe damage to soybeans worldwide with subsequent economic loss. This loss is estimated to exceed US\$ 1 billion annually in the USA alone (Wrather & Koenning, 2006; Koenning & Wrather, 2010). *Heterodera glycines* continues to spread into new areas, with recent records from the province of Quebec, Canada (Mimee *et al.*, 2014). In Japan, SCN is distributed throughout the country and causes damage to soybeans, mainly in relatively cool regions from central Honshu to Hokkaido (Aiba, 2001). In Tokyo, the damage by SCN is seen in green soybean-growing areas (Itou *et al.*, 2006). Green

soybean is used as a vegetable and is the immature green form of the plant.

The SCN life cycle consists of six stages: egg, four juvenile stages and adult. The eggs are contained inside a cyst until suitable hatching conditions occur. It is the second-stage juvenile (J2) that hatches from the egg, emerges from the cyst and migrates in the soil to find a host (Davis & Tylka, 2000). Hatched J2 are vulnerable to environmental stresses and are viable in the soil for periods much shorter than if they had remained unhatched (Perry & Moens, 2011). Current control measures for SCN vary from the use of resistant varieties, agrochemicals and antagonistic crops to crop rotation (Sasser & Uzzell, 1991). Another significant control measure is to stimulate hatching in the absence of host plants (Riga *et al.*, 2001). In a previous paper (Toyota *et al.*, 2013), we reported that a hatching stimulus was present in bean sprout residue. The study revealed that bean sprout residue can

* Corresponding author, e-mail: dito@kankyo-kanri.co.jp

stimulate the hatching of SCN J2 prior to planting, and thus depress SCN populations with subsequent protection of newly planted green soybeans. In addition, we demonstrated that the hatching stimulus is extractable with water. However, it is difficult to apply bean sprout residue to continuously planted fields because soil must be ploughed to ensure a better access of the hatching stimulus. Indeed, in Tokyo and adjacent prefectures, leafy vegetables, such as komatsuna (*Brassica rapa* var. *perviridis*) and spinach (*Spinacea oleracea*), are grown in most periods unless green soybean is grown. In such case, it is not feasible to apply bean sprout residue, but applying water extract of bean sprout residue instead is a promising alternative.

The objective of this study is to evaluate the effects of water extract of bean sprout residue (subsequently termed 'water extract', or WE in the Results section) in soil on both SCN density and crop growth and to evaluate the damage to green soybean subsequently grown in that soil.

Materials and methods

SOIL AND NEMATODES

A soil (andosol; loam, sand:silt:clay = 39:22:39) naturally infested with SCN was collected from a farm in Tokyo. This soil is the same as the one used in previous studies (Goto *et al.*, 2009; Toyota *et al.*, 2013). Soil (50 g) was mixed with 2 l of tap water and vigorously shaken. Next, the nematode cysts were extracted by decanting the soil suspension through nested 710 and 212 µm aperture sieves. Cysts caught on the 212 µm aperture sieves were hand-picked with tweezers under a binocular microscope, then eggs were released by poking the cysts with a needle.

BEAN SPROUT ORIGIN AND PREPARATION, AND CHEMICAL ANALYSIS OF WATER EXTRACT

Residue of mung bean sprout was obtained from a bean sprout factory in Nagano Prefecture, Japan (Saladcosmo). During processing, bean sprouts sometimes pile up on the conveyor belt and fall onto the floor; according to the Good Manufacturing Practices (GMPs), they cannot be reprocessed and/or reconditioned to reenter the production line and must be discarded. This is what is called bean sprout residue. The residue was transported under cool conditions (around 4°C) and used for experiments described below within a few days to avoid spillage.

For pot experiments, water extract was prepared by mixing the bean sprout residue (300 g, fresh weight)

with distilled water (1:3, w/w) in a 1 l Erlenmeyer flask; the mix was shaken at 200 rpm for 1 h at room temperature then filtered through a sheet of gauze. For field experiments, the bean sprout residue (5 kg, fresh weight) was mixed with 20 l of tap water in a 20 l plastic bottle; the mix was shaken at 200 rpm for 1 h at room temperature then filtered through a sheet of gauze.

For chemical analysis, bean sprout residue was mixed with distilled water at a ratio of 1:1 to obtain a concentrated solution. The mix was shaken for 1 h at 200 rpm then filtered through a filter paper (No. 2; Toyo Roshi Kaisya); pH and EC were measured using a compact twin pH meter and a EC meter, respectively (Horiba). Ammonium, nitrate, phosphorus and potassium contents were measured with a reflectometer (RQflex Plus[®], Merck). Total water soluble nitrogen content was measured with a TOC/TN analyser (TOC-V CSH, Shimadzu) after filtration through a membrane filter with a 0.2 µm pore size. There were three replicates.

EFFECTS OF WATER EXTRACT OF BEAN SPROUT RESIDUE ON SCN DENSITY AND ON PLANT GROWTH

Pot experiments

The soil (150 g, fresh weight) was put in a vinyl pot (9 cm diam., 7.5 cm height) in five replicates for each treatment, then 10 ml of either distilled water or water extract of bean sprout residue were added. The moisture content was adjusted to 60% of maximum water holding capacity (MWHC). Five seeds of komatsuna were transplanted into each pot and the pots were incubated in a climatron (Biotron LPH-200, Nippon Medical & Chemical, Instruments) at 25°C with a 12 h/12 h light/dark cycle for 8 weeks; the moisture content was adjusted to 60% of MWHC, at 2-3 days intervals, either with distilled water or water extract. The total amount of water applied to each pot was 300 ml. After 8 weeks, chlorophyll content of the leaves was measured with a chlorophyll meter (SPAD-502 plus, Konica-Minolta; three measurements per plant, three plants per pot, five pots per treatment, corresponding to 45 measurements for each treatment). The plants were harvested from the pots and the adhering soil was removed by washing the roots under running tap water. Plant dry matter weight per pot was measured for above-ground and below-ground biomass, after oven drying at 80°C for 1 day. The soil remaining in the pots was mixed thoroughly and 100 g was taken from each pot to measure the density of SCN with real-time PCR described below.

Field experiments

Using plastic sheets, six plots (each 0.5 m × 1.0 m) were prepared in the naturally SCN-infested field in the farmland mentioned above. The six plots were arranged in rows, wherein two treatments (tap water and water extract) were applied in alternate rows. Tap water or water extract (each 20 l) was added per plot according to the schedule listed in Table 1. To increase soil temperature, the soil surface was mulched with a transparent plastic sheet after the treatment of 26 April 2011. Tap water contains some components that can have potential effects on SCN and plant growth, but the differences observed between tap water and water extract sprout residue treatments are considered due to components deriving from bean sprout residue, since the extract was prepared using the same tap water.

Soil samplings were periodically done using a root auger of 3 cm diam. (Table 1). Soil was collected from a depth of 0–30 cm at three places within the same plot and a composite sample was made for each plot. To minimise disturbance, 150 g of soil was collected from each plot at each sampling time and oven-dried at 60°C for 1–2 days immediately after reaching the laboratory. In the soil samples collected on June 1 (the transplanting day of green soybean), soil inorganic N contents were measured with a reflectometer (RQflex plus), ammonium and nitrate were extracted at 1:5 with a 10% (w/v) KCl solution and distilled water, respectively.


In the plots repeatedly treated with water extract or water, green soybean was grown. For seedling preparation,

one seed of *G. max* var. sayamasure (Snow Brand Seed) was put in a 100 ml pot containing 70 g of autoclaved soil then grown in a glasshouse for 2 weeks. A total of 80 seeds were sown in 80 pots. Among them, 48 seedlings were selected that had average height and vigour. Eight seedlings were transplanted into each plot on 1 June 2011. No fertilisers or agrochemicals were applied and watering was sometimes done. On 8 July, the chlorophyll content of leaves and plant heights were measured. On 3 August, green soybean was harvested and the yield of beans with pods was measured.

ESTIMATION OF THE NUMBER OF SCN IN SOIL

To estimate the total number of SCN in soil, a ball milling/real-time PCR method, developed by Goto *et al.* (2010), was used. We originally developed a soil compaction/real-time PCR method to measure all forms of SCN in soil and demonstrated its usefulness by comparing it with the traditional sieving method using a naturally-infested soil (Goto *et al.*, 2009). Then, the ball milling/real-time PCR method was developed because it has an advantage in operability and a similar or even better DNA extraction efficiency to the soil compaction/real-time PCR method (Goto *et al.*, 2010). In this method, soil samples (100 g) were firstly dried in an oven at 60°C for 1 day and then 20 g aliquots of dried soil were pulverised into powder for 2 min at 20 oscillations s⁻¹ in a ball mill (Mixer Mill MM400; Retsch). Secondly, DNA was extracted in duplicate from 0.5 g aliquots of the pulverised soil as described by Sato *et al.* (2010). Lastly, the DNA

Table 1. Schedule of water extract application, soil sampling and green soybean cultivation period.

	2010									2011		
	9 July	23 July	7 Aug.	20 Aug.	31 Aug.	17 Sept.	2 Oct.	9 Nov.	9 Dec.	26 Apr.	1 June	3 Aug.
Application of water or water extract	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
Estimated average soil temperature (10 cm depth) ^{a)}	30.2	30.8	31.2	29.7	26.6	22.7	19.5	12.3	7.4	19.3 ^{b)}	24.2	29.3
Soil sampling	○					○			○	○	○	
Green soybean cultivation												

^{a)} Soil temperatures at 10 cm depth were estimated from air temperatures in Fuchu, Tokyo (data from the Meteorological Station), using the equation for soil temperature at 10 cm depth = 1.05 × average temperature + 0.9 (Chiba Prefecture, https://www.pref.chiba.lg.jp/ninaite/shikenkenkyuu/documents/25_2.pdf). Average soil temperatures are shown for 1 month after each application.

^{b)} From 26 April 2011, temperature sensors were set at depths of 5 cm and 10 cm and recorded at 10 min intervals. The results were 20.8°C (5 cm with mulch), 19.6°C (10 cm with mulch), 19.0°C (5 cm without mulch) and 18.8°C (10 cm without mulch).

extract was suspended in 100 μ l of Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA was used as a template in real-time PCR after 10-fold dilution.

Real-time PCR was performed using a Step One Real-Time PCR System (Life Technologies, Japan) under the manufacturer's recommended conditions (95°C for 10 s (95°C for 5 s and 60°C for 20 s) \times 40 cycles). The reaction volume of 10 μ l contained 5 μ l of Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies), 5 mM of each primer (SCN44f (ITS1 position 44-62, 5'-ctagcgttggcaccaccaa-3') – SCN124r (ITS1 position 143-124, 5'-aatgttggcagcgtccaca-3')) (Goto *et al.*, 2009) and 2 μ l of template DNA.

For SCN quantification in soil, a calibration curve was established by adding different numbers of SCN eggs (50, 120, 250, 500, 1000, 1500) to 20 g of autoclaved soil in three replicates. Soil milling, DNA extraction and real-time PCR were performed as described above. The following relation was generated between the Ct values and the number of eggs:

$$\text{Ct value} = -3.713 \log_{10}(\text{density of SCN (20 g soil)}^{-1}) + 36.54 \quad (R^2 = 0.95).$$

The density of SCN was calculated using this formula. Since the calibration curve was obtained by inoculating eggs, the unit in real-time PCR method is expressed as egg equivalent, although the soil populations may consist of various forms of SCN such as juveniles and adults.

EFFECT OF TEMPERATURE ON SCN J2 HATCH

Eggs of SCN (100 eggs) were put in three replicates in a well in a 24-well plate with 1 ml of water, and then 20 μ l of water or water extract of bean sprout residue, prepared as follows, was added. Bean sprout residue was mixed with distilled water at a ratio of 1:1 and shaken for 1 h. The supernatant was used as water extract after filtration through a filter paper No. 2. The plates were put in the climatron set at 10, 20, 25 or 30°C and the numbers of hatched juveniles and remaining eggs were counted under a microscope after 30 days of incubation.

STATISTICAL ANALYSIS

Significance of correlation coefficient and differences among mean values were analysed by correlation analysis, *t*-test and one-way or two-way ANOVA protected by Fisher's range test ($P < 0.05$) using a software Excel Statistics 2002 (Social Survey Research Information).

Results

EFFECTS OF WATER EXTRACT OF BEAN SPROUT RESIDUE ON SCN DENSITY AND ON PLANT GROWTH

Pot experiments

After 2 months application of water extract of bean sprout residue (WE) or water (W), the density of SCN decreased both in WE and W, but the rate of decrease was different. The SCN density after 2 months was 80% lower in WE than in W and the difference was significant ($P < 0.05$) (Fig. 1A). The chlorophyll content of komatsuna leaves after 2 months of cultivation was significantly ($P < 0.01$) higher in WE than in W (Fig. 1B). Above-ground biomass of komatsuna was also significantly ($P < 0.05$) higher in WE than in W (Fig. 1C).

WE contained fertiliser components, especially N and K (Table 2). Inorganic N content was very low, indicating that the majority of N was present as an organic form in the water extract.

Field experiments

The initial densities of SCN were different among plots, ranging from 1000 to 5500 egg equivalent (20 g soil) $^{-1}$, although there was no significant difference between WE and W (Fig. 2). Because of the large difference, periodical changes in SCN density are shown for each plot, not treatment mean values, and differences between two sampling times (Table 1) were analysed for each plot (Table 3); the rate of decrease was calculated from the percentage change in the densities between two sampling times. During July and September 2010, SCN densities decreased in all three WE plots (average rate of decrease = 50%) but only in one W plot (average decrease = -2%). SCN densities decreased more in WE, although the decreasing rates were not significantly different. During September and December, SCN densities increased both in WE and W, although the reason for the increase in the absence of the host plant was not clear. Then, SCN densities decreased both in WE (average rate of decrease = 37%) and W (average rate of decrease = 42%) during December 2010 and April 2011. During April and June 2011, the decrease was significantly ($P < 0.05$) larger in WE (62%) than in W (10%). During the whole period, SCN densities decreased by 82% in WE and by 36% in W, resulting in average densities of 233 ± 55 and 1448 ± 221 egg equivalent (20 g soil) $^{-1}$ in WE and W, respectively, in June 2011, the starting time of green soybean cultivation. The densities in June were significantly ($P < 0.05$) lower in WE than in W.

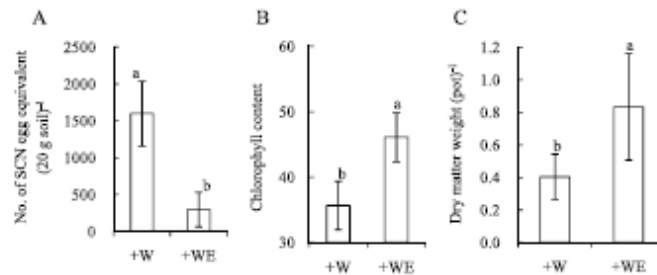


Fig. 1. Effect of water (+W) or a water extract of bean sprout residue (+WE) on A: Density of soybean cyst nematode (SCN; *Heterodera glycines*) (initial density = 3980 egg equivalent (20 g soil)⁻¹); B: Chlorophyll content of komatsuna leaves; C: Dry matter of the above-ground biomass of komatsuna after 2 months application. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

Table 2. Chemical properties of water extract of bean sprout residue.

Parameter	
pH (H ₂ O)	7.0 ± 0.1
EC (mS cm ⁻¹)	1.3 ± 0.1
NO ₃ -N (mg l ⁻¹)	<5
NH ₄ -N (mg l ⁻¹)	<2
Total water soluble N (mg l ⁻¹)	267 ± 12
P (mg l ⁻¹)	33 ± 3
K (mg l ⁻¹)	208 ± 12

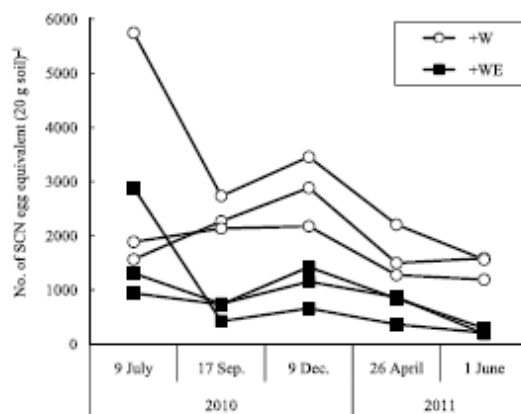


Fig. 2. Periodical changes in the density of *Heterodera glycines* (SCN) in soil treated with water (+W) or a water extract of bean sprout residue (+WE) in field conditions.

Inorganic N content in the soil samples collected on June was 73 ± 19 mg N (kg soil)⁻¹ and 44 ± 14 mg N (kg soil)⁻¹ in WE and W, respectively, and 60% higher in WE, but the difference was not significant ($P = 0.10$).

Green soybean was cultivated in WE and W plots. While plant heights were similar between WE and W (Fig. 3A), chlorophyll content was significantly ($P < 0.05$) higher in WE than in W (Fig. 3B). At harvest, yields of beans were more than three times higher in WE (750 g m^{-2}) than in W (200 g m^{-2}) and the difference was significant ($P < 0.01$) (Fig. 4).

EFFECTS OF TEMPERATURE ON SCN HATCH IN WATER EXTRACT OF BEAN SPROUT RESIDUE

Percentage of SCN hatch differed greatly depending on the temperature (Fig. 5). At 10 and 30°C, hatching rates were very low both in WE and W. At 20°C, 10% of the J2 hatched in W but no further stimulation was observed in WE. Hatching stimulation in WE was observed only at 25°C, where percentage hatch was significantly ($P < 0.05$) higher in WE (88%) than in W (31%).

Discussion

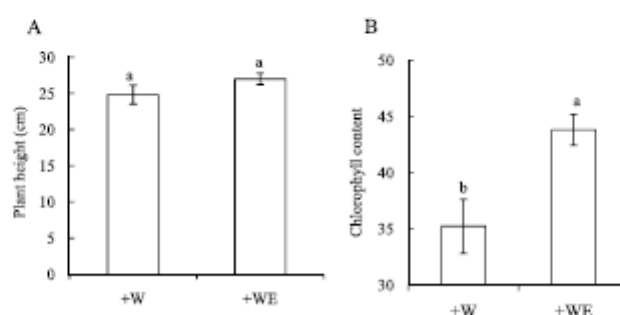
In the present study we have demonstrated that WE decreased the density of SCN in the absence of host plants and thereby decreased damage to green soybean. In addition, the nutrients contained in WE increased the biomass of komatsuna without added fertiliser. The hatching stimulation by bean sprout residue and its water extract has been reported previously (Toyota *et al.*, 2013). This study also demonstrated the fertilisation effect of WE and its practical use in field application compared to bean sprout residue. Ploughing is essential to allow better access of the hatching stimulus in soil. Therefore, it is not possible to use bean sprout residue during the cultivation period of the crop that precedes soybean/green soybean cultivation. This can be overcome by using WE.

Table 3. Decreasing rates (%) of the densities of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, after the addition of water or water extract of bean sprout residue in field trials.

	July to Sept.	Sept. to Dec.	Dec. to Apr.	Apr. to June
Water	-2 ± 50	-18 ± 14	42 ± 6	-10 ± 62
Water extract	50 ± 32	-68 ± 22*	37 ± 11	62 ± 18*

Decreasing rate (%) was calculated from the percentage change in the densities between two sampling times. Minus values indicate increase in density.

* Significantly different ($P < 0.05$) between the two treatments.

**Fig. 3.** Growth of green soybean in a field treated with water (+W) or a water extract of bean sprout residue (+WE). A: Plant height; B: Chlorophyll content. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

Our results have shown that SCN densities in a soil depth of 0–30 cm have been markedly decreased by repeated applications of 40 l m⁻² of WE. However, the decreasing effect of WE was observed only from July to September without mulch and from April to June with mulch, but not from September to April. Whether or not the decreasing effect is observed depends on soil temperature, since the hatch stimulation by WE was observed only at 25°C. During July and September, WE was applied five times, but average soil temperature exceeded 29°C in four of these times and, therefore, it was considered that SCN density might decrease only in the application on 31 August, when the average temperature was 26.6°C. At the application in April, average soil temperature increased with mulch by 1.8°C and 0.8°C at 5 cm and 10 cm, respectively, becoming 23.2°C and 19.6°C at 5 cm and 10 cm, respectively, during the day (07:00–19:00). It was considered that these increased temperature regimes with mulch induced accelerated hatching in WE and, therefore, SCN density decreased more in WE. These results demonstrate that the time when WE is applied to decrease density of SCN in soil is critical in biological control of SCN using bean sprout residue.

Temperature dependence of SCN hatching has been reported previously (Hill & Schmitt, 1989). Hatching rate was higher at 26°C/9 h and at 22°C/15 h (12.3%) than at 22°C/9 h and at 18°C/15 h (4.1%). A hatching experiment was conducted at constant temperatures in this study and a similar result was obtained: hatching in water was best at 25°C, intermediate at 20°C and very low at 10 and 30°C. These results contradict the data of Alston & Schmitt (1988), who reported that SCN hatch occurred at 20–30°C. Sensitivity to temperature in hatch can be different depending on the strain of SCN, but the exact reason is unclear. In this study, SCN densities decreased even in winter, during December and April (average soil temperatures in December was 7.4°C), suggesting that SCN J2 hatch at a wide range of temperatures and then die in the absence of host plants. However, hatching stimulation by WE occurs only at a limited temperature range (around 25°C) and thus enhanced eradication of SCN was observed only in the applications of July and April with mulch. SCN densities increased from September to December in all the plots but the reason is unclear.

SCN densities measured in this study might be underestimated because of imperfect DNA extraction from soil and vary among different soil types because of varying

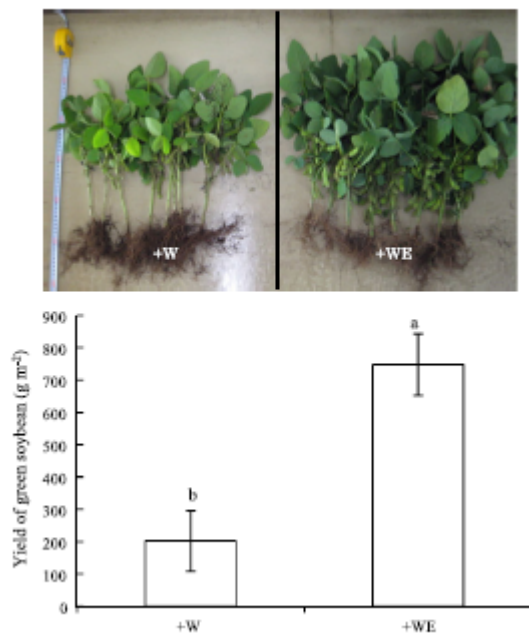


Fig. 4. Yield of green soybean in a field treated with water (+W) or a water extract of bean sprout residue (+WE). Photographs show plants harvested from one plot of each treatment. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$. This figure is published in colour in the online edition of this journal, which can be accessed via <http://booksandjournals.brillonline.com/content/journals/15685411>.

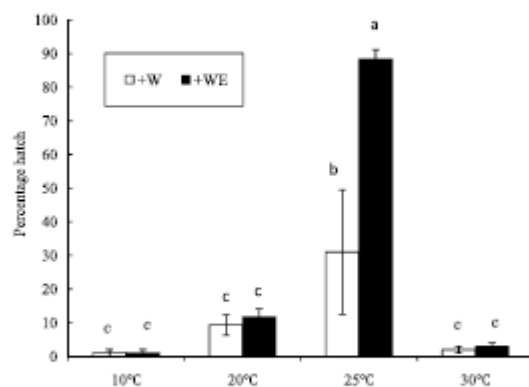


Fig. 5. Hatch of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in water (+W) or a water extract of bean sprout residue (+WE) at different temperatures. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

DNA extraction efficiency. These potential drawbacks, however, will be minimal. For the former, we made a calibration curve by inoculating SCN eggs into soil and, thus, DNA extraction efficiency of SCN inoculated may not be different from that of SCN in natural soils. For the latter, we set up two treatments in the same infested field and thus DNA extraction efficiency will be the same between the treatments. Caution is needed to compare SCN densities among different soils.

WE contained 267 mg N, 33 mg P and 208 mg K in 1 l. For the chemical analysis, the water extract was prepared by mixing bean sprout residue with water at a 1:1 ratio. WE applied to the pot and field experiments was prepared at a ratio of 1:3. If we hypothesise that nutrient content is hence at one-third in the applied WE, concentrations are 89 mg N, 11 mg P and 69 mg K in 1 l. We have applied 20 l of water extract to a 0.5 m² plot once and this corresponds to the addition of 3.6 g N, 0.4 g P and 2.8 g K m⁻². Conventional fertilisation rates in green soybean are 5–7 g N, 2–3 g P and 10–14 g K. Thus, WE and the residue itself may be considered as alternative biofertilisers. Indeed, chlorophyll content of komatsuna leaves increased and biomass doubled with WE, suggesting that WE has a fertilising effect.

SCN density decreases with increasing soil depth and about 90% of SCN populations have been found in roots from 5–15 cm soil depth (Wu *et al.*, 2011). This study supported the distribution of SCN in a soil profile. Our preliminary survey, in which soil sampling was done up to a depth of 60 cm (0–15, 15–30 and 30–60 cm), showed that the density of SCN was 1730 egg equivalent (20 g soil)⁻¹ in 0–15 cm, 1420 egg equivalent (20 g soil)⁻¹ in 15–30 cm and only 124 egg equivalent (20 g soil)⁻¹ in 30–60 cm. These results suggest that the majority of SCN is present in a 0–30 cm soil depth and soil sampling of 0–30 cm provides a measure of the whole SCN population in the field.

Rotation with non-host crops such as sunn hemp and red clover can be an effective method for reducing SCN populations in soybean cropping systems (Warnke *et al.*, 2008). In Tokyo and adjacent prefectures, a favourite rotation crop is komatsuna. Komatsuna cultivation with WE for 2 months markedly decreased SCN density in soil in the pot experiments. Therefore, the best control method using WE is to apply it in a period with an average soil temperature of 25°C, even in the presence of preceding or follow-up crops. The remaining problem is how to apply WE to a large field, since the application rate of 40 l m⁻² corresponds to 400 m³ ha⁻¹. This method may be

confined to a narrow area heavily infested with SCN in a small field.

Bao *et al.* (2013) have reported yield increases in soybean using liquid swine manure and have concluded that soil fertility management may be a useful strategy to alleviate SCN damage to soybean. Our results reveal not only a fertilising effect with WE but also an eradicating effect of SCN, although caution is needed for the timing of application. In conclusion, WE will be an environmentally friendly control measure for SCN.

Acknowledgements

We greatly thank a farmer in Tokyo for providing us with *Heterodera glycines*-infested soil and Saladcosmo Co. for providing us with bean sprout residue. This work was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (No. 22580066).

References

- Aiba, S. (2001). [Ecology and prevention of soybean cyst nematode.] *Plant Protection* 55, 229-232.
- Alston, D.G. & Schmitt, D.P. (1988). Development of *Heterodera glycines* life stages as influenced by temperature. *Journal of Nematology* 20, 366-372.
- Bao, Y., Chen, S., Vetsch, J. & Randall, G. (2013). Soybean yield and *Heterodera glycines* responses to liquid swine manure in nematode suppressive soil and conducive soil. *Journal of Nematology* 45, 21-29.
- Davis, E.L. & Tylka, G.L. (2000). Soybean cyst nematode disease. *Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2000-0725-01.
- Goto, K., Sato, E. & Toyota, K. (2009). A novel detection method for the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using soil compaction and real-time PCR. *Nematological Research* 39, 1-7.
- Goto, K., Sato, E., Faungang, L., Toyota, K. & Sugito, T. (2010). Comparison of calibration curves prepared by soil compaction or ball-mill method for the direct quantification of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* in soil. *Nematological Research* 40, 41-45.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B. & Boddey, R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1-18.
- Hill, N.S. & Schmitt, D.P. (1989). Influence of temperature and soybean phenology on dormancy induction of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 21, 361-369.
- Hungria, M. & Bohrer, T.R.J. (2000). Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. *Biology and Fertility of Soils* 31, 45-52.
- Itou, A., Takeuchi, K., Takagi, A., Sakurai, F., Shibusawa, H., Sugaya, E., Eimori, K. & Yamagishi, A. (2006). [Occurrence of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Ichinohe, and its damage to green soybeans in Tokyo.] *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society* 53, 153-156.
- Koenning, S.R. & Wrather, J.A. (2010). Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009. *Plant Health Progress*. DOI:10.1094/PHP-2010-1122-01-RS.
- Mimee, B., Peng, H., Popovic, V., Yu, Q., Duceppe, M.-O., Tetreault, M.P. & Bélair, G. (2014). First report of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) on soybean in the province of Quebec, Canada. *Plant Disease* 98, 429.
- 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.
- Perry, R.N. & Moens, M. (2002). Survival of parasitic nematodes outside the host. In: Perry, R.N. & Wharton, D.A. (Eds). *Molecular and physiological basis of nematode survival*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 1-22.
- Riga, E., Welacky, T., Potter, J., Anderson, T., Topp, E. & Tenuta, A. (2001). The impact of plant residues on the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23, 168-173.
- Sasser, J.N. & Uzzell, G. (1991). Control of the soybean cyst nematode by crop-rotation in combination with a nematicide. *Journal of Nematology* 23, 344-347.
- 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.
- Toyota, K., Goto, K. & Ito, D. (2013). Effect of bean sprout residue on the hatching and density of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* in soil. *Nematology* 15, 923-927.
- Warnke, S.A., Chen, S., Wyse, D.L., Johnson, G.A. & Porter, P.M. (2008). Effect of rotation crops on hatch, viability and development of *Heterodera glycines*. *Nematology* 10, 869-882.
- Wrather, J.A. & Koenning, S.R. (2006). Estimate of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of Nematology* 38, 173-180.
- Wu, H.Y., Wang, Z.H., Li, X.X. & Liu, J. (2011). Temporal-spatial population density of *Heterodera glycines* in soybean roots during the early growth stage. *Nematology* 13, 79-86.

埼玉県枝豆圃場におけるリアルタイムPCR法を用いた ダイズシストセンチュウの要防除水準の作成

○伊藤大輔^{1,2}・豊田剛己¹・加藤雅之¹・森久夫³・岡田繁¹・福地峻¹・日比谷利夫¹・松本裕太¹・吉田保¹・日倉進一¹
(¹東京農工大BASE・²環境管理センター・³春日部農林振興センター・JAさいかつ・⁴三郷市園芸協会・⁵八潮市園芸協会)

1. はじめに

一部の枝豆生産圃場において
ダイズシストセンチュウ (以下, SCN) の被害が発生している



栽培前にリアルタイムPCR法によるSCN卵密度の測定及び
土壌の元素分析をおこない、枝豆収量との関係性を調査した

- 12圃場(120地点)から土壌採取・SCN卵密度を測定
- 12圃場(67地点)において枝豆の収量調査を実施

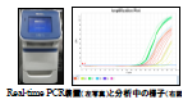
これにより、SCNの要防除水準が求められるが検討を行った

2. 材料と方法

土壌採取
及び
土壌前処理

- 0-30 cmの土壌を採取
- 5 mmふるいによる粗大有機物、石の除去
- 60℃, 24時間乾燥
- 遊星ボールミル処理(土壌の粉砕・均質)

リアルタイムPCR法によるSCN卵密度の測定



- 土壌からのDNA抽出
- SCN特異プライマーによるリアルタイムPCR
- SCN卵によって作成した検量線による卵密度への変換

ポータブル型 蛍光X線分析装置による元素分析



枝豆の生育に關する
元素の簡易スクリーニング
分析でピークが確認された元素
Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Br, Pb

解析方法

- SCN卵密度に影響を及ぼす因子の解析(分散分析)
- SCN密度及び土壌中の元素と枝豆収量との回帰分析
- 枝豆収量予測のための重回帰式の導出

3. 結果および考察

1. SCN卵密度に影響を及ぼす因子の解析

表1 調査した枝豆生産圃場の状況

圃場番号	栽培方式	前年の殺虫剤の使用状況	SCN 卵数/20g soil
A	ハウス	○	515
B	ハウス	○	119
C	ハウス	○	342
D	ハウス	×	126
E	ハウス	×	138
F	ハウス	×	1401
G	露地	○	82
H	露地	○	180
I	露地	×	1365
J	露地	×	733
K	露地	×	714
L	露地	×	59

(○:殺虫剤・殺虫剤に使用済み、×:殺虫剤に使用済み)

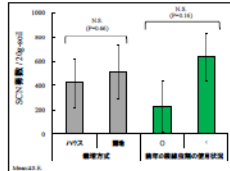


図1 各要素がSCN卵密度に及ぼす影響 (Two way ANOVA)

- ✓ 枝豆生産の栽培方式によってSCN卵密度に差は見受けられなかった
- ✓ 統計的に有意な差は無いが、顯著に差が見られたのは前年の殺虫剤の使用状況であった
一前年に殺虫剤を使用しなかった圃場よりも、使用した圃場でSCN卵密度が低く保たれていた
使用されていた薬剤は、ガススター及びバスタミド(4倍、高濃度分・ダブリン)、デロン(1倍、1.5ダブリン)であった

2. SCN密度及び土壌中の元素と枝豆収量との回帰分析

2-1. SCN卵密度と収量との関係

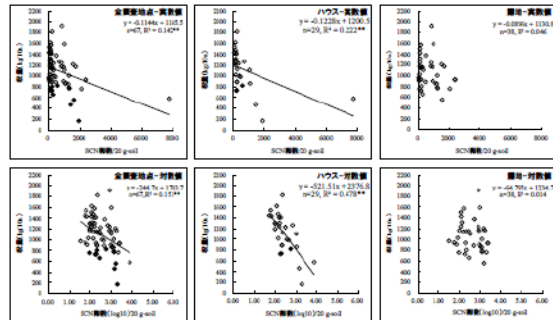


図2 SCN卵密度と枝豆収量との関係 (上段: SCN卵密度(真数値), 下段: SCN卵密度(対数値)). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

- ✓ 回帰分析を行う際にSCN卵密度の真数値よりも対数値を用いることで決定係数が上昇する傾向にあった
- ✓ 全圃場地点でSCN卵密度のデータから枝豆収量内の収量が得られるという予測が適用できたサンプルは全体の88.0%であった
- ✓ ハウスの露地地点でSCN卵密度のデータから枝豆収量内の収量が得られるという予測が適用できたサンプルは全体の88.5%であった
- ✓ ハウスの露地地点において、得られた関係性から平均収量の9%収量を枝豆収量とした場合の要防除水準は990個/20g soilであった
- ✓ 露地圃場においてSCN卵密度と枝豆収量との間に顯著性が認められなかった
この原因として、サンプリングを1月1日に一回、1月1日までの期間が異なること、SCN卵密度が変化しなかったことが推察される

2-2. 各元素濃度と収量との関係

表2 各元素濃度と枝豆収量との関係 (真・負の相関係数, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

解析圃場	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Br	Pb
全圃場地点	-0.326 **	-0.414 **	-0.406 **	-0.170	0.369 **	0.116	-0.185	0.428 **
ハウス	-0.278	-0.484 **	-0.472 **	0.045	0.703 **	0.170	-0.136	0.619 **
露地	-0.356 *	-0.387 *	-0.350 *	-0.324 *	0.340 *	0.059	-0.237	0.076

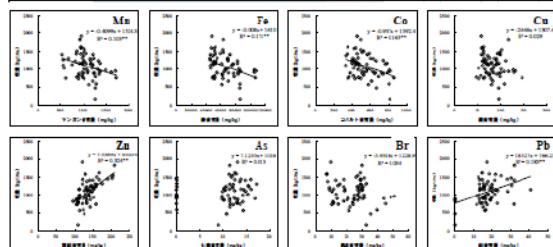


図3 土壌中の各元素濃度と枝豆収量との関係 (p=0.05, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

- ポータブル型蛍光X線分析装置によって測定された元素のうち、
- ✓ マンガン、鉄、コバルト、銅は枝豆収量との間に負の相関係数があった
- ✓ 亜鉛、鉛は枝豆収量との間に正の相関係数があった
一特に鉄に関しては、相関係数が大きく、サンプルを分類(ハウス・露地)しても関係性に変化が見られなかった

3. 重回帰分析による枝豆収量の予測式導出

ハウス栽培において、SCN卵密度と枝豆収量との間に関係性がみられたため、
各元素濃度を因子として組み込み、重回帰分析による予測式の導出を行った

- 変数選択はステップ・ワイズ法とした
- 有意でない変数が選択された際は再解析を行った
- 多重共線性の指標としてVIF (Variance Inflation Factor) を参考にした
- 最終選択の自己相関の指標としてダービン・ワトソン比を参考にした

表3 各要素のラムダ・ラーナ及び導出された予測式

変数	標準偏回帰係数	P値	VIF	ダービン・ワトソン比
SCN卵密度 (log)	-0.4642	0.0013 **		
亜鉛含有量	0.4056	0.0009 **	1.279	2.114
定数	-	0.0053 **		

枝豆収量 (g/20g soil) = 1168.56 - (350.2 × SCN卵密度 (log/20g soil)) + (5.07 × 亜鉛含有量 (mg/kg))

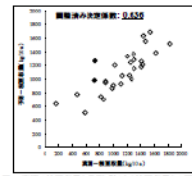


図4 実際の枝豆収量と予測式による枝豆収量との関係

- ✓ 枝豆収量を予測する上で、SCN卵密度のみで予測を行うよりも亜鉛含有量を取り入れることで予測精度が向上した。また、標準偏回帰係数では各説明変数の説明力は同程度であった
- ✓ 重回帰式の適用により、SCN卵密度のデータから枝豆収量内の収量が得られるという予測が適用できたサンプルは全体の92.6%であった