

緑豆すき込み法を用いた

ダイズシストセンチュウの生物的防除法の開発

Development of biological control method  
for soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*,  
in green soybean cultivation using  
short-term field cultivation and soil incorporation of mung bean

東京農工大学大学院  
生物システム応用科学府  
生物機能システム科学専攻

平成 27 年度入学

近松 誠也

SEIYA CHIKAMATSU

学籍番号 17701109

指導教員 豊田 剛己 教授

2022 年 3 月

## 要旨

短期緑豆栽培およびすき込みを用いたダイズシストセンチュウの生物的防除法の開発

Development of biological control method for soybean cyst nematode,

*Heterodera glycines*, in green soybean cultivation using

short-term field cultivation and soil incorporation of mung bean

ダイズシストセンチュウ (Soybean Cyst Nematode(以下 SCN); *Heterodera glycines*) という植物寄生性線虫がダイズの収量減に大きく関わる。ダイズの主な生産地であるアメリカでは、SCN によって年間約 1500 億円以上の被害が出ていると推定されており、SCN の防除が必要となる。防除には、有機リン系の剤や土壌くん蒸剤のような農薬が使用されることがあるが、欧米では農薬の使用規制が強化され、日本でも減農薬の志向が強くなってきている。アメリカのダイズ生産地では、トウモロコシをはじめとする SCN の宿主ではない作物と輪作することで、土壌中の SCN 密度を減少させるといった対策を行っている。日本ではダイズの他に、エダマメも多く栽培されており、特に関東の都市近郊が産地となっている。都市近郊では、宅地と隣接していることが多く、特に農薬を使用しづらい。農薬以外の防除として注目されている、クロタラリアやアカクローバーなどの緑肥栽培による SCN 防除は、その栽培期間が 2~3 か月必要であり、作型に合わない場合もある。そこで当研究室では、新たな生物的防除法として、緑豆を 2~3 週間程度といった短期間栽培し、その後すき込むことで SCN を孵化 (2 期幼虫 (J2)) させ、宿主がないことを利用して餓死させるという「緑豆すき込み法」を提唱している。先行研究における室内試験で SCN の孵化適温が 25°C から 30°C であり、孵化には土壌水分が重要であることが示された。本研究では、実際の SCN 発生圃場を用い、2017、2018 そして 2020 年に緑豆すき込み法の実証試験を行い、緑豆すき込み法の圃場レベルでの有効性を検証することを目的とした。

結果としては、2018 年の圃場試験でのみ緑豆すき込みによって SCN 密度を減少させることができた一方で、2017 年と 2020 年では SCN 密度は減少しなかった。2017 年は、緑豆すき込み後 14 日間の地温が約 28 °C であり、土壌水分も充分であったため、他の原因としてすき込んだ緑豆植物体量が少なかったためであると考えられた。2020 年は、すき込み後の地温が 30 °C 以上と高く、孵化に適した地温ではなかったことが原因であると考えられた。緑豆すき込みによって SCN 密度が 80% 近く減少した 2018 年は、すき込み後灌水した処理区で、すき込み後 30 日間の平均地温が 28.5 °C であり、水分も 2017 年に行ったポット試験で示された、SCN 孵化に必要な土壌水分である pF2.76 を下回る日が続き、かつすき込まれた緑豆植物体も、2017 年の 211g/m<sup>2</sup> と比較して 3 倍以上の 736g/m<sup>2</sup> であったために、SCN 密度が大きく減少したと考えられた。以上より、緑豆すき込み法は緑豆生育、そして緑豆すき込み後の土壌水分と地温を適切に管理するで、圃場レベルでも SCN 密度を減少させることができる。

## 目次

第1章	序論.....	1
第1節	線虫および植物寄生性線虫について.....	1
第2節	シストセンチュウの生態とダイズシストセンチュウによる被害.....	2
第3節	ダイズシストセンチュウの防除法について.....	4
第4節	本論文の目的.....	5
第2章	ダイズシストセンチュウ発生圃場を用いた緑豆すき込み法の実証実験	
	(2017年度) .....	6
第1節	はじめに.....	6
第2節	材料および方法.....	6
第3節	結果.....	11
第4節	考察.....	18
第5節	まとめ.....	19
第3章	ダイズシストセンチュウの孵化に対する水分の影響 (ポット試験) .....	20
第1節	はじめに.....	20
第2節	材料および方法.....	20
第3節	結果.....	27
第4節	考察.....	30
第5節	まとめ.....	30
第4章	ダイズシストセンチュウ発生圃場を用いた緑豆すき込み法の実証実験	
	(2018年度) .....	31
第1節	はじめに.....	31
第2節	材料および方法.....	34
第1項	埼玉県.....	34

第2項 神奈川県.....	37
第3項 奈良県.....	38
第3節 結果.....	40
第1項 埼玉県.....	40
第2項 神奈川県.....	52
第3項 奈良県.....	54
第4節 考察.....	56
第5節 まとめ.....	57
第5章 ダイズシストセンチュウ発生圃場を用いた緑豆すき込みの実証実験 (2020年度) .....	58
第1節 はじめに.....	58
第2節 材料および方法.....	58
第3節 結果.....	61
第4節 考察.....	65
第5節 まとめ.....	65
第6章 総合考察.....	66
引用文献 .....	68
付録 各年の圃場試験のまとめ.....	77
謝辞 .....	78

## 第1章 序論

### 第1節 線虫および植物寄生性線虫について

線虫とは線形動物門 (Phylum Nematoda) の一般的な名称であり、自由生活種や寄生性の種を含めると、1億種は超えるといわれている (白山, 2003)。森林の腐植層には  $1\text{m}^2$  に1千万頭以上の線虫が生息し (Yeates, 2007)、世界中の表層土壌全体に  $4.4 \pm 0.64 \times 10^{20}$  頭生息する (Hoogen *et al.*, 2019) とまでいわれている。線虫はサイズとして  $0.2\text{mm}$  から  $6\text{m}$  のものまで存在し (Bernard *et al.*, 2017)、線虫の既知種はおおよそ2万種である。その中で半数の50%は海に存在する海産線虫で、25%が土壌や淡水に存在し、細菌や菌類、微小動物を摂食する自由生活性線虫、15%が昆虫から動物まで様々な動物を寄主とする動物寄生性線虫、残り10%が植物に寄生する線虫 (植物寄生性線虫) である (二井, 2020)。様々な存在する線虫だが、口器などの形態によって細菌食性、(糸状)菌食性、肉食性、雑食性、植物食性にわけられる (岡田, 2007)。これら線虫は生態学的な指標として用いられ、例えば、国や地域によらず分布する種が多く、世界共通の指標化が可能であることや、細胞系譜や遺伝情報が豊富なため多細胞動物のモデルとなりうる (岡田, 2007)。モデル生物として、毒性試験などの環境への影響評価に利用される例もある (Samoiloff *et al.*, 1980)。こういったメリットを有する線虫の中で特に自活性線虫に関しては、土壌生態系の主要メンバーとして、他の微生物等と複雑に関係しながら土壌中での有機物分解や物質循環に一役を担っており、地球全体の恒常性維持に大きな役割を果たしている (二井, 2020)。

また、植物を加害する線虫 (植物寄生性線虫) は、頭部の先端にストローのような細長い呼吸口 (口針) を持ち、自活性線虫とは異なり、運動が鈍い (三枝, 1993)。2006年の段階では植物寄生性線虫はすでに4100種まで同定されている報告もある (Decraemer and Hunt, 2006)。この植物に寄生する線虫だが、農業生産に大きな損失を負わせており、全世界の損失額を推定した研究例によると、1年間で約US1000億ドルの損失が発生していると考えられており (Baekers *et al.*, 1998; Bernard *et al.*, 2017; Kushida and Kondo, 2015; Oka *et al.*, 2000)、インドからの報告では全生産量の12.3%に当たるとまでいわれている (Singh *et al.*, 2015)。植物寄生性線虫は卵の後、1期幼虫 (first-stage juveniles; J1) 2期幼虫 (感染虫態 (infective-stage)、second-stage juveniles; J2)、3期幼虫 (third-stage juveniles; J3)、4期幼虫 (fourth-stage juveniles; J4) の4段階の幼虫期を経て、成虫 (Adults) となる (Decraemer and Hunt, 2006)。植物寄生性線虫にはその寄生パターンから大きく分けて2種類あり、植物の外部から植物細胞を加害する外部寄生性線虫 (Ectoparasitic nematodes) と植物の体内に入り内部から加害する内部寄生性線虫 (Endoparasitic nematodes) である。前者で代表的なものとしては、ラセンセンチュウ (*Helicotylenchus*, *Rothylenchus*, *Scutellonema*)、ワセンチュウ (*Criconemoides*)、イシユクセンチュウ (*Tylenchorhynchus*) などがあげられる。後者の代表的なものとして、移動性内部寄生性線虫 (migratory endoparasite) であるネグサレセンチュウ (*Pratylenchus* spp.) や、定

着性内部寄生性線虫 (sedentary endoparasite) であるシストセンチュウ (*Globodera*, *Heterodera* spp.) とネコブセンチュウ (*Meloidogyne* spp.) があげられる (二井, 2020)。

上記で挙げた植物寄生性線虫類の中で、特に作物に被害を与える主要な線虫は、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三種類である (三枝, 1993)。ネコブセンチュウはサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) を代表として、ウリ科やナス科や、それに根菜類に多く被害を及ぼす (九沖農研, 2013)。植物体に寄生した後ステージが進み、雌成虫になると卵のうというゼラチン状の物質を作り、その中に 1 日あたり 30~80 の卵を形成していく (Karssen and Moens, 2006)。このネコブセンチュウは自身の感染による被害とともに、萎凋病や苗立枯病などの発生と被害助長といった複合病をもたらし、被害をさらに拡大させることが知られている (平野 1993)。

ネグサレセンチュウは種によって異なるものの、かなり宿主範囲が広く、ジャガイモやコムギ、コーヒー、バナナなど、多くの作物の根に寄生し、収量を下げる (Duncan and Moens, 2006)。また、*Verticillium* 病などの他の病原菌との複合病を引き起こすことがある (九沖農研 2013)。シストセンチュウに関しては第 2 節で紹介する。

## 第 2 節 シストセンチュウの生態とダイズシストセンチュウによる被害

シストセンチュウは第 1 節でも述べたように、代表的な定着性植物寄生性線虫であり、世界中の多くの国で問題となっている。ムギ、イネ、ジャガイモやダイズといった多くの重要な作物で収量減を引き起こしている (Turner and Rowe, 2006)。シストセンチュウには代表的な属が 2 つあり、*Heterodera* 属と *Globodera* 属である。これらシストセンチュウの生活環としては図 1-1 の通りである (Lambert and Bekal, 2002)。シスト内の卵から 2 期幼虫 (J2) が孵化し、その J2 が近傍の宿主の根に侵入し、発達中の維管束細胞に移動する。侵入後、J2 は分泌物を植物細胞内とその周辺に出し、フィーダー細胞という栄養細胞を作る。シストセンチュウにおいて、このフィーダー細胞は近傍の細胞の細胞壁を分解し、合胞体 (シンシチウム) を形成することで、大きくなる。そしてフィーダー細胞から栄養を吸い取り、J2 は脱皮・拡大することで、J3、J4 となり、最終的に袋状に拡大した雌成虫と土壌中の雄成虫が交尾することで、雌成虫内に卵を形成する。成熟し蔵卵した雌成虫はそのまま死に、シストと呼ばれる被囊となる。このシストは表皮がタンニン化されており、物理的に防御されている。

そのため、乾燥耐性が強く、種によっては数十年間土壌中で生存する (石橋 2003)。宿主範囲は狭く、寄主植物の根から出される孵化促進物質に反応して孵化することが一般的であるが、キマメシストセンチュウ (*Heterodera cajani*) やムギシストセンチュウ (*Heterodera avenae*) は水のみでも孵化が起こることが知られている (Perry, 2002)。

ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*, Soybean Cyst Nematode ; SCN、以下 SCN と記載) はダイズを代表としてアズキやエンドウなどのマメ科作物を寄主とするシストセンチュウであり、世界的に見ても重要な害虫である (九沖農研 2013)。シストは先細り

### Sedentary Endoparasitic Nematodes

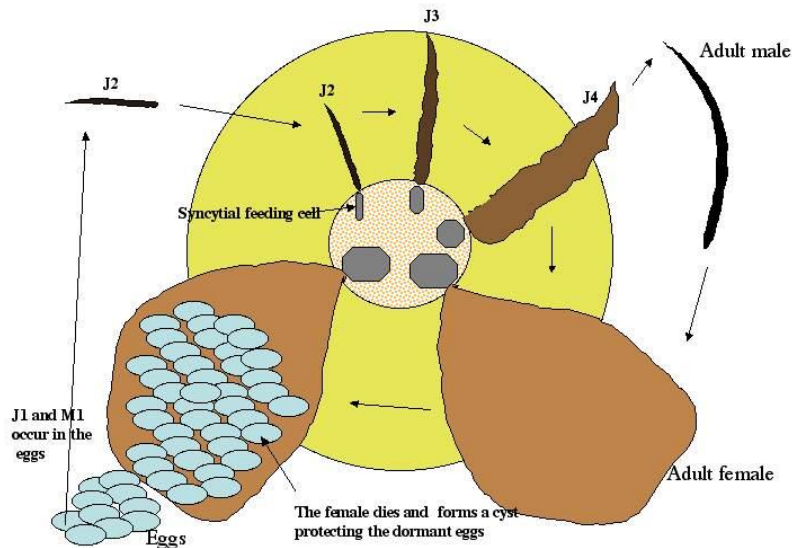


図 1-1. Cross section of a soybean root depicting the life cycle of the soybean cyst nematode  
 Source: Introduction to Plant-Parasitic Nematodes, *The Plant Health Instructor*.  
 DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-01

(シストセンチュウの 2 期幼虫 (J2) が植物根に寄生した後の生活環を示した図である)

のレモン型であり、シスト内に含まれる卵の数は 200~400 卵という記載 (九沖農研 2013) や、約 500 卵という記載 (Turner and Rowe, 2006) もある。孵化後の生活環は Lauritis ら (1983) が示すように、卵から孵化した 2 期幼虫は、ダイズ根に侵入すると、3 日で脱皮し 4 日目に 3 期幼虫になる。5 日目に性分化が起こり、6 日目の脱皮を経て、7 日目に 4 期幼虫になる。この後、雌の場合、10 日目に嚢を持った成虫になり、交配 (12 日目) 後に体内で胚発生が起こり (12 日目から 17 日目)、1 期幼虫ができ、脱皮後、19 日目から卵内に 2 期幼虫の状態にとどまる。21 日目からは孵化が可能になり、宿主がいる状態では孵化し、新たな 2 期幼虫が感染していく。

SCN は、日本だけでなく、ダイズの生産量が世界 2 位であるアメリカでも、大きな被害をもたらしている (Allen *et al.*, 2017)。アメリカでは、1996 年から 2016 年までで合計約 3.2 兆円の被害が発生していると算出されており、一年あたりに換算すると、1500 億円以上もの被害をもたらしていると推定されている (Bandara *et al.*, 2020)。2005 年時点ではあるが、190 万トンもの収量減を引き起こしており (Wrather and Koenning, 2006)、対策が必要な重要害虫である。日本ではダイズだけでなく、エダマメにも被害が大きく出ており、ダイズ主産地の北海道だけでなく、日本各地に被害が広がっている (Aiba, 2001、伊藤ら, 2006)。

### 第3節 ダイズシストセンチュウ (SCN) の防除法について

SCN の防除法の一つとして、宿主ではない作物とダイズを交互に栽培していく輪作が挙げられる (Niblack and Chen, 2004)。特にダイズを大規模に栽培するアメリカなどでは、輪作体系を取り入れている生産者が多く、アメリカのダイズ生産者の 7 割近くがダイズとトウモロコシの輪作を行っている (USDA, 2014)。実際に、トウモロコシとの輪作によって SCN 密度が幅はあるものの 20~80%減少する報告もある (Chen *et al.*, 2014)。加えて、ダイズの単一栽培より宿主ではないトウモロコシやソルガムを 1~2 年栽培し、その翌年にダイズを栽培する輪作体系により収穫量を 10~40%上昇させるといった報告例もある (Koenning *et al.*, 1993)。

宿主のいない状態で SCN を孵化させ、孵化幼虫の餓死による密度低減を目的に、孵化促進物質の研究も行われている。その中の代表的なものとして、インゲン豆の乾燥させた根から抽出及び同定されたグリシノエクレピン A は、合成するコストは高いものの、SCN の孵化を促進することが確認されており、大豆の生産量増加への一助となる可能性を秘めている (Masamura *et al.*, 1982, 1987; Shiina *et al.*, 2010)。その他に、亜鉛化合物も卵の孵化を促進することが知られている (Teft and Bone, 1984)。

輪作だけでなく緑肥による耕種的防除も行われており、緑肥として代表的なアカローバーやクロタラリアの栽培およびすき込みによって SCN 密度を低減できることが示されている (Kushida *et al.*, 2002, 2003)。近年ではツバキやシャクヤクからの抽出物による SCN の孵化抑制効果が確認される例や (Wen *et al.*, 2019)、カバークロップとしてライムギやナタネを 7 か月程度栽培することで土壤中の SCN 密度を抑える例 (Wen *et al.*, 2017)、また、アマナズナ (カメリナ) を約 1 か月栽培することで栽培土壌の SCN 密度を 50%程度低減させる例 (Acharya *et al.*, 2019) など、多くの植物体が SCN の孵化および密度低減に関与することが示唆されている。

また、緑肥栽培だけでなく、その他の有機物施用によっても防除が可能であると示唆されており、粉状の松樹皮を 1kg 土壌あたり 50g 混ぜ込むことで微生物バイオマスが増加し、線虫密度が減少した報告例 (Reynolds *et al.*, 1999) や、オリーブの油かすの抽出液を土壌 1kg あたり 20ml 加えることで線虫密度が減少した報告例 (Rodriguez-Kabana *et al.*, 1992) などもある。

SCN を含めた線虫防除のために化学農薬、有機リン系の農薬や、くん蒸剤を用いる場合もある。くん蒸剤としてよく用いられる D-D 剤やクロロピクリンは SCN の密度減少効果として 18~80%とばらつきが大きく、くん蒸処理時の土壌環境や気温を含めて外的影響によって防除効果に差が出てしまう (Bruin & Pedersen, 2008)。



#### 第4節 本論文の目的

日本ではダイズの他に、エダマメも多く栽培されている。特に都市近郊での栽培が盛んであり、日本における生産量ランキングでは、群馬県が生産量1位(6,420トン)、埼玉県が3位(5,870トン)、千葉県が4位(5,830トン)、神奈川県が8位(2,730トン)(2018年段階で、農林水産省作物統計より)と、関東の主要生産地で全国生産量(63,800トン)の約33%を占めている。そういった中でSCNは関東以北だけでなく、以南まで広がっており(相場, 2005、伊藤, 2016)、被害も多くの場所で発生している。日本ではSCNの防除に化学農薬を用いる場合があるが、特に土壌くん蒸のような殺線虫効果の高いものは、人体害リスクや土壌残留の問題から使用を控える生産者が増えている。土壌くん蒸剤は欧米で規制が進んでおり、EUではD-Dは使用禁止になり、クロロピクリンも2012年で全廃になっている(小原, 2015)。エダマメ栽培が盛んな都市近郊では、農地が宅地と隣接する場合が多く、特に農薬を使用することが困難である。緑肥栽培による防除に取り組む生産者もいるが、クロタラリアを代表とする線虫防除に効果のある緑肥の多くは生育に数か月を有するため(Kushida *et al.*, 2003)、生産者の作物生産体系に合わないことが多いと考えられる。そこで当研究室では、安全な生物的防除法として、宿主となるエダマメの栽培前に、緑豆を栽培し、その後緑豆を土壌にすき込むことでSCNを孵化させ、さらにその後、一定期間裸地状態を維持することによってSCNを餓死させるという「緑豆すき込み法」を検証している。

当研究室においてこれまで、もやし残渣およびその抽出液がSCNの孵化促進効果を有することを証明してきた(Toyota *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2015)。しかしながら、孵化促進効果を示すほどの量を圃場に撒くことが困難であるため、もやしの原料である緑豆に目を付けた。緑豆であれば、もやし残渣のように工場から運送する必要もなく、かつ手軽に手に入り、撒く量もそれほど必要ないためである。通常緑肥は数か月単位の栽培が多く、輪作体系に合わない場合があり、この点を考慮しても緑豆は短期栽培(約2週間~1か月)で効果が期待できるため有用であると考えられる。王晓曼(2017)によって、ポット試験にてSCN密度を減少させる効果が確認され、その際に、土壌水分と地温がSCNの孵化および密度減少に寄与すると示唆された。そこで、本研究では、実際の埼玉県、神奈川県、奈良県にあるSCN発生圃場を用いて、緑豆すき込み法の圃場レベルでの有効性を検証することを目的とした。

## 第2章 SCN発生圃場を用いた緑豆すき込みの実証実験（2017年度）

### 第1節 はじめに

本章では、埼玉県三郷市のSCN発生しているエダマメハウスにおいて2017年度に行った緑豆すき込みの実証試験の結果を示す。2016年度に行われた同一ハウスでの実証試験では、緑豆すき込みによってSCN密度が減少した処理区もあった一方で、多くのプロットでは密度に変化はなかった(王, 2017)。地温は約28℃と孵化適温とされている25℃(Ito *et al.*, 2015)よりも高かったが、山田(2017年度修士論文)によって30℃でも孵化が促進されることが示されており、温度だけの影響ではないことが窺えた。王(2016年度修士論文)がChapter 5において、緑豆すき込み後の土壌水分が30%以上あれば、SCN密度を75%減少させることができるが、23%程度では25%の減少効果に抑えられることを示している。

したがって、SCNの孵化及び餓死には地温だけでなく、十分な土壌水分が必要であることが示唆されてきた。そこで2017年度の圃場試験では、実際の圃場で緑豆すき込み法を行い、すき込み後の灌水の有無がSCN密度にどのように影響するかを調べることを目的とした。

### 第2節 材料および方法

#### 【対象圃場】

埼玉県三郷市にあるエダマメハウス2棟(横5m、奥行き50m)のうち、両ハウス入口から10mをお借りした(図2-1-1)。東側のハウスをA、西側のハウスをBとした。

#### 【試験処理区】

- 1) 対照区(コントロール(Control: Cont): 緑豆栽培および灌水を行っていない)
- 2) 緑豆区(緑豆栽培区(Mung Bean 9kg/10a: MB9): 緑豆播種直後は水やりをせず、播種4日後に10L/m<sup>2</sup>灌水した)
- 3) 緑豆+灌水区(緑豆すき込み後に灌水を行う区(Mung Bean 9kg/10a + irrigation: MB9i): 緑豆播種時にハウスAでは30L/m<sup>2</sup>、ハウスBでは20L/m<sup>2</sup>灌水した)
- 4) 緑豆+灌水+太陽熱区(処理区3に灌水後の太陽熱処理を加えた区(Mung Bean 9kg/10a + Soil Solarization: MB9SS): 播種時の灌水量は処理区3と同様で、灌水後、ビニールマルチで被覆した)
- 5) 太陽熱区(太陽熱処理のみの区(Soil Solarization: SS): 緑豆播種は行わず、処理区3, 4と同時に灌水し、ビニールマルチで覆った)

処理区の広さと位置を図2-1に示した。各処理区は縦2m×横5mとし、均等間隔に4地点設けた(横から1m間隔に4地点)。各地点は土壌採取後のSCN密度定量および緑豆植物体生育調査を行った場所である。この地点の大きさはそれぞれ0.5m×0.5m(0.25m<sup>2</sup>)である。9kg/10aは播種量を示したものである。播種量は、1処理区あたり90g(約1400粒)

である。

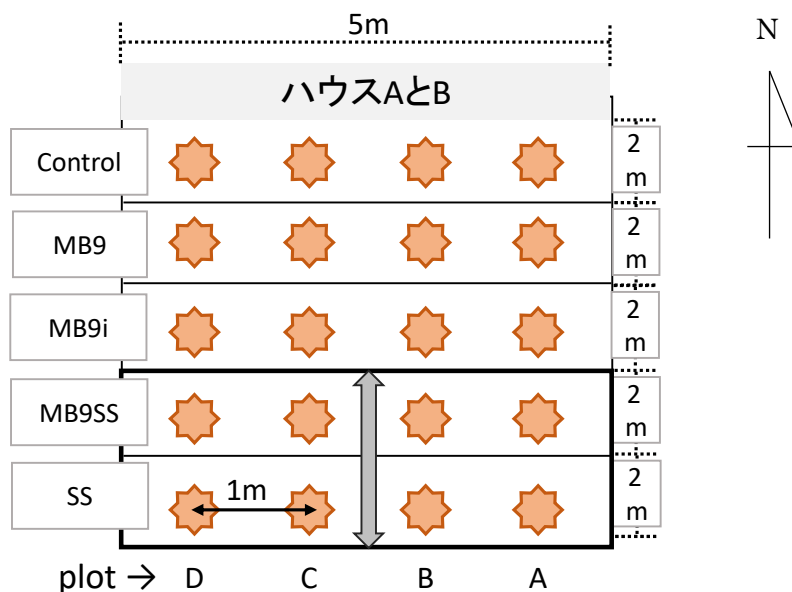


図 2-1. 2017 年埼玉県における処理区の簡易図

対照区（非緑豆区）；Control、緑豆 9kg/10a 播種区（すき込み後非灌水）；MB9、  
緑豆 9kg/10a 播種区（すき込み後灌水区）；MB9i、緑豆 9kg/10a 播種＋太陽熱  
処理区；MB9SS、  
太陽熱処理のみ区；SS 区

MB は緑豆（Mung Bean）を意味する、SS は太陽熱処理（Soil Solarization）  
を意味する。

SS 記載区は 7 月 21 日の灌水後、半透明（白）のマルチシートで被覆した。

各処理区の面積は南北 2m、東西 5m の 10m<sup>2</sup>とし、調査地点は処理区の端から  
1m 間隔に 4 点とった。

各調査地点は 0.5m 四方の 0.25m<sup>2</sup>とした。

【試験行程（時間経過含む）】以下は 2017 年に行ったものである。

7 月 7 日（1）：土壤採取用のオーガー を用いて、各地点 A～D から 5 点、深さ 0～20cm ま  
での土壤を採取した。採取した土壤を袋内でよく混和した後、半量を圃場  
に戻し、残りの半量を実験供試用とした。

7 月 7 日（2）：緑豆種子（品種：グリーンマッペ、中原種苗）を播種し、土壤表面の種子を  
土壤中に埋没させるために、靴で踏みこんだ。

7 月 7 日（3）：MB9i と MB9SS にそれぞれバケツを用いて 30L/m<sup>2</sup>（ハウス A）、20L/m<sup>2</sup>  
（ハウス B）の水を灌水した。

7 月 7 日（4）：MB9 と MB9i に土壤中の pF を測定するテンシオメーター（大起理化）を  
深さ 10～15cm のところに挿し、土壤水分を観察した。

7 月 11 日：両ハウスの MB9 に 10L/m<sup>2</sup> 灌水した（播種後 4 日目）。

7月21日(1):各地点A~Dの緑豆生育(本数と地上部生重量)を測定した。

7月21日(2):農家の方にトラクターで緑豆をすき込んでいただき(耕耘は約15~20cmまで)、その後上記のようにオーガーにて土壌を採取した。

7月21日(3):両ハウスにおいて、MB9i、MB9SS、SSに灌水チューブを用いて灌水した後(灌水量不明)、太陽熱消毒区(MB9SSとSS)に対して半透明(白)のマルチシートで被覆した。

7月25日:ハウスBのみで上記のように土壌を採取した(すき込み後4日目)。

8月1日:ハウスBのみで上記のように土壌を採取した(すき込み後11日目)。

8月4日:両ハウスで上記のように土壌を採取した(すき込み後14日目)。

灌水に関して:灌水は灌水チューブを使用し、灌水量は蛇口と灌水チューブの間に水量メーターをつなぎ合わせ測定した。

#### 【採取土壌の調査方法】

##### ・ベルマン法

使用土壌は7月21日(緑豆すき込み0日目)、7月25日(緑豆すき込み4日目)、8月1日(緑豆すき込み11日目)、8月4日(緑豆すき込み14日目)のサンプルを用いた。

1. 半分に折ったキムワイプ上に土壌(生土)20gを測りとり、包んだ後ベルマン法用のふるい(直径6.5cm)に乗せた。
2. ゴムチューブおよび1.5mlチューブを付け、水で満たした漏斗に、上記のふるいを上から乗せ、土壌が水で満たされるまで水を添加し、静置した。静置条件は室温約25℃、3日間である。
3. 3日後、チューブを外し、0.02%Tween 20を1 $\mu$ l添加した後、軽くボルテックスした。
4. 実体顕微鏡にてチューブ内のSCNの2期幼虫数を計数した。

ベルマン法は活動性のある線虫を土壌から分離する方法であるが、線虫の状態に影響されるため、分離率がよくて50%程度と言われている。過小評価のおそれはあるが、線虫群を調べたり、本研究のように緑豆すき込みによりどの程度SCNが増えたかを検証する上では、有用な実験手法である。

##### ・DNA抽出およびリアルタイムPCR

##### 〔DNA抽出〕

供試土壌は7月7日(播種0日目)、8月4日(緑豆すき込み後14日目)のサンプルを用いた。

ベルマン法では目的の線虫以外にも多くの植物寄生性線虫が遊出してくる可能性があり、様々な線虫を同定していくには経験値が必要となる。そこで、土壌からDNAを抽出し、種に特異的なプライマーを用いて、目的の線虫のみを同定する方法がこれまで当研究室で数多く研究されてきた。

DNA 抽出法の開発過程の詳細は省くが、これまで Goto *et al.* (2009) によって土壌締固め法が開発されたが、Goto *et al.* (2010)は土壌締固め法とボールミル（当時は Retsch 社の Mixer Mill MM400 を使用）法を比較し、ボールミル法がより土壌からの DNA 定量に適していることが示された。また、Sato *et al.* (2010)によって、土壌からの DNA 抽出法（従来法）が確立された。その後、Cheng *et al.* (2018)によってボールミル法が改良され、Retsch 社の Mixer Mill MM400 から MP Biomedicals 社の Fast Prep を使用することで、より簡単に土壌を粉砕し、DNA 抽出に用いることができるようになった。この Fast Prep は 2017 年の段階で本研究室にて用いられるようになり、DNA 抽出を効率化した。現在 DNA 抽出方法に関しては更に改善されており、未発表であるが、ステンレスボール法（第 5 章の第 2 節にて紹介および使用）が活用されようとしている。

本章における DNA 抽出方法は Fast Prep を用い、かつ DNA 簡易抽出キット（簡易法）を使用したものである。下記に詳細な実験手法を記載する。

1. 採取した土壌を数日間風乾させ、目開き 2mm のふるいに通し、よく混和した後、200g の風乾土を 60°C 1 日乾燥させた。60°C 乾燥させた土壌は -20°C に保管した。
2. Fisher Scientific 社製の 15mL Centrifuge チューブ 1 本に、上記 60°C 乾燥土を 10g 入れ、その次にステンレスボール法（φ 8.0mm）を 8 個入れた（3 連、計 30g 土）。
3. 2 のチューブを MP Bio 社製の Fast Prep に 4.5m/sec でボールミルにかけた。この時、チューブが線対称に置かれるよう気を付けた。
4. ボールミル後の粉砕土壌をひとまとめにし、よく混和した。
5. 50mL の Centrifuge 遠心管に粉砕土壌を 5g 取り、サケ DNA（Deoxyribonucleic, Acid form Salmon Sperm, Wako）入りリン酸バッファー（Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を 2.50g と NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 37.08g 量り取り、800ml の MQW で溶かしたあとに 1L にメスアップ）を 10ml 加えた。
5. 振とう機（TS-10, TAITEC）を用いて 200rpm で 30 分振とうした。
6. 遠心分離機を用いて 8,000rpm で 10 分間遠心し、上清を 2ml チューブに移した。  
これ以降は GEL/PCR 精製キット（FAVORGEN）を用いた
7. FADF Column を Collection Tube に取り付けた。
8. FADF Column に FADF Buffer を 250μl 添加し、6 でできた上清を 50μl をピペッティングしながら FADF Buffer に加えた。
9. FADF Column が取り付けられたまま Collection Tube を 10,000×g, 30 秒遠心分離し、ろ液を捨てた。
10. 事前に Ethanol を加えた Wash Buffer を 750μl、FADF Column に加え、再び 10,000×g, 30 秒遠心分離し、ろ液を捨てた。
11. FADF Column の蓋は閉めたまま、再び 10,000×g で 3 分遠心分離し、カラムを乾かした。
12. 乾燥させた FADF Column を新しい 1.5ml チューブに取り付け、FADF Column の中央に Elution Buffer 50μl を直接ゆつくりと加えた。

13. 2分静置した後、 $10,000\times g$  で2分遠心分離し、DNAを溶出させた。
14. 200 $\mu$ l チューブに滅菌脱イオン水を90 $\mu$ l 加え、そこに13で溶出させたDNA抽出液(原液)を10 $\mu$ l 加え、タッピングをし、1/10DNA溶液(テンプレートDNA溶液)を作成した。これをリアルタイムPCRに供試した。

#### [リアルタイムPCR]

リアルタイムPCRとはDNA断片を増幅することでDNA量を測定し、目的生物やウイルスを定量的に測定する技術である。

リアルタイムPCRの手順に関しては変わっておらず、過去の先輩方の通りである。

下記手順

1. まずは反応液を作成した。調べるサンプル数に応じて液量が変わるため、使用するチューブの大きさは変化するが、大体600 $\mu$ lか1.5mlのものを使用した。空のチューブに始めに滅菌済み脱イオン水を2.2 $\mu$ l $\times$ (サンプル数+ネガティブコントロール(滅菌脱イオン水)+1、下記試薬も同様)添加し、次に10pMのプライマー(配列は※1を参照)をそれぞれ0.4 $\mu$ l( $\times$ 同上)ずつ添加し、最後にSYBR Green Master Mix (Applied Bio Systems社製)を5.0 $\mu$ l( $\times$ 同上)添加し、タッピングして、よく攪拌した。これを反応液とした。プライマーはGoto *et al.* (2009)より引用した。
2. PCR用8連チューブのチューブ1本に反応液8 $\mu$ lと10倍希釈済みのテンプレートDNA溶液2 $\mu$ lを加え、リアルタイムPCR装置(Applied Bio社製 Step One)にかけた。  
反応条件は、  
95 $^{\circ}$ C (10秒)  
95 $^{\circ}$ C (5秒) + 60 $^{\circ}$ C (20秒) を40サイクル  
60 $^{\circ}$ Cから90 $^{\circ}$ C (0.3 $^{\circ}$ C/秒)  
90 $^{\circ}$ C (15秒)  
とした。

3. 出てきたCt値を検量線(式1)にあて、SCN密度を測定した。

$$\text{Ct 値} = -2.2813 \times \log_{10}(\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 37.04 \quad (\text{式1})$$

式1に関しては未発表である。またSCNnewプライマーを用いた検量線である。

#### ※1. プライマーに関して

Gotoら(2009)によって、SCN密度を調べるために必要なプライマー(Forward primer (*H. glycines* 44r ITS1 position 44-62)): 5'-CTA GCG TTG GCA CCACCA A-3'、Reverse primer (*H. glycines* 124r ITS1 position 143-124): 5'-AAT GTT GGG CAG CGT CCA CA-3')が開発された。しかしながら、このプライマーはSCN (*H. glucines*)にのみ特異的なわけではなく、クローバーシストセンチュウ (*H. trifolii*) やテンサイシストセンチュウ (*H. schachtii*) などの他のシストセンチュウのDNAも増幅する可能性が考えられていた。そこで、新たに使用したプライマー(SCNnew、実験時点では未発表)を開発し、正

確に SCN 密度を推定しようとした。この SCNnew プライマーの配列は次の通りである。  
Forward primer (*H. glycines* ITS1) : 5' -CTG CAC ATG TGA AAG CCT GTG TA-3'  
Reverse primer (*H. glycines* ITS1) : 5' -GAG CGT GCA TCC CAC ATT G-3'  
(Shirai and Toyota, 2019)

#### 【土壌水分・地温測定】

王曉曼 (2016 年度修士論文) によって、これまで緑豆すき込み法には適した地温と水分が必要であることが示唆されてきた。そこで DECAGON の水分・地温センサー (Em50 および 5TM) を用いて、圃場の値を測定し、緑豆すき込み法が効果を示す最適な条件を調べた。

### 第 3 節 結果

両ハウスの緑豆生育を図 2-2 に示した。緑豆本数に関しては処理区間で有意な差はなかった (図 2-2-1)。しかし、図 2-2-2 に示したように、全重量 (地上部+地下部) においては、MB9i (ハウス A : 211 g/m<sup>2</sup>、ハウス B : 194 g/m<sup>2</sup>)、MB9SS (ハウス A : 144 g/m<sup>2</sup>、ハウス B : 183 g/m<sup>2</sup>) の方が、すき込み後灌水を行っていない MB9 (ハウス A : 39.8 g/m<sup>2</sup>、ハウス B : 47.3 g/m<sup>2</sup>) に対して有意に大きかった (Fisher の最小有意差法、 $p < 0.05$ )。

土壌水分と地温に関して、ハウス A での推移は図 2-3、ハウス B での推移は図 2-4 に示した。ハウス A において、播種後は MB9 (すき込み後非灌水) と MB9i (すき込み後灌水) とともに約 0.24 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> であり、その後変動はあるものの、徐々に値が下がり、すき込み直前は約 0.18 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> までになった。7 月 21 日のすき込み後、MB9i では灌水 29 時間後に最大値 (0.352 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>) を示した。MB9 はすき込み後灌水していないため、0.200 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> 以下であったが、7 月 26 日の雨 (28.5mm/日) により、MB9 でも最大 0.276 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> まで上昇した。すき込み後 14 日間の平均水分は、MB9 で 0.222 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>、MB9i で 0.286 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> であった。地温は MB9 と MB9i での差はなく、播種からすき込みまでの期間は約 27°C から約 33°C までを推移し、すき込み後 14 日間の平均地温は MB9 で 28.1°C、MB9i で 27.5°C と、28°C 前後であった。

ハウス B もハウス A と同様の傾向を示し、播種後からすき込み直前まで徐々に下がり、すき込み直前では MB9 と MB9i とともに約 0.16 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> まで下がった。MB9i は灌水後に 0.410 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> まで上昇し、そのゆっくり減少した。ハウス A と異なる点として、7 月 26 日の雨によって MB9 でそこまで急激に上昇せず、7 月 29 日 16 時の段階で 0.206 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> 止まりであった。すき込み 14 日間の平均水分は、MB9 で 0.186 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>、MB9i で 0.305 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> であった。地温はハウス A 同様に、播種からすき込みまでの期間は約 27°C から約 33°C までを推移し、すき込み後 14 日間の平均地温は MB9 で 28.8°C、MB9i で 27.8°C であった。

表 2-1 に、ベルマン法を用いて、緑豆すき込み後 0、4、11、14 日目の土壌から遊出した SCN の 2 期幼虫の数を示した。Control では A から D どの地点でもすき込み後 11 日目に最大を示し、遊出数の平均は 68 頭 (20g 絶乾土あたり) であった。また、MB9 も同様にすき込み後 11 日目で最大を示し、遊出数の平均は 295 頭 (20g 絶乾土あたり) であった。一方、MB9i はすき込み後 4 日目で最大を示し、遊出数の平均は 747 頭 (20g 絶乾土あたり) であった。その後すき込み後 14 日目の段階での、各処理区の遊出数の平均は、Control で 28 頭 (20g 絶乾土あたり)、MB9 で 75 頭 (20g 絶乾土あたり)、MB9i で 158 頭 (20g 絶乾土あたり) と、どの処理区も減少した。表 2-1 をもとに、各処理区の SCN の 2 期幼虫数の差、つまりはすき込み後 0 日目からどの程度、孵化・増加したかを示したグラフが図 2-5 になる。平均で、Control では 65 頭 (20g 絶乾土あたり)、MB9 では 233 頭 (20g 絶乾土あたり)、そして MB9i では 637 頭 (20g 絶乾土あたり) 増加した。MB9i は Control や MB9 に対して有意に増加した結果となった (Fisher の最小有意差法、 $p < 0.05$ )。

図 2-6 にはハウス A と B、両ハウスの播種前 (7 月 7 日) とすき込み後 14 日目の土壌の SCN 密度を示した。ハウス A はハウス奥、つまりは SS (太陽熱処理区) に近づくにしたがって、SCN 密度が減少した。一方、ハウス B は反対にハウス手前、つまりは Control 側で低密度となった。そのため、SCN 密度の変化を量的変化量で評価するのは困難であると考えられた。変化率 (各地点の播種前を 100 とした時の、すき込み後 14 日目の密度) が、増加傾向 (110%以上) になった地点数は、両ハウス合わせて、Control で 8 地点中 8 地点、MB9 で 8 地点中 8 地点、MB9i で 8 地点中 6 地点、MB9SS で 8 地点中 6 地点、SS で 8 地点中 4 地点であり、SS 以外で SCN 密度が増加傾向となった。



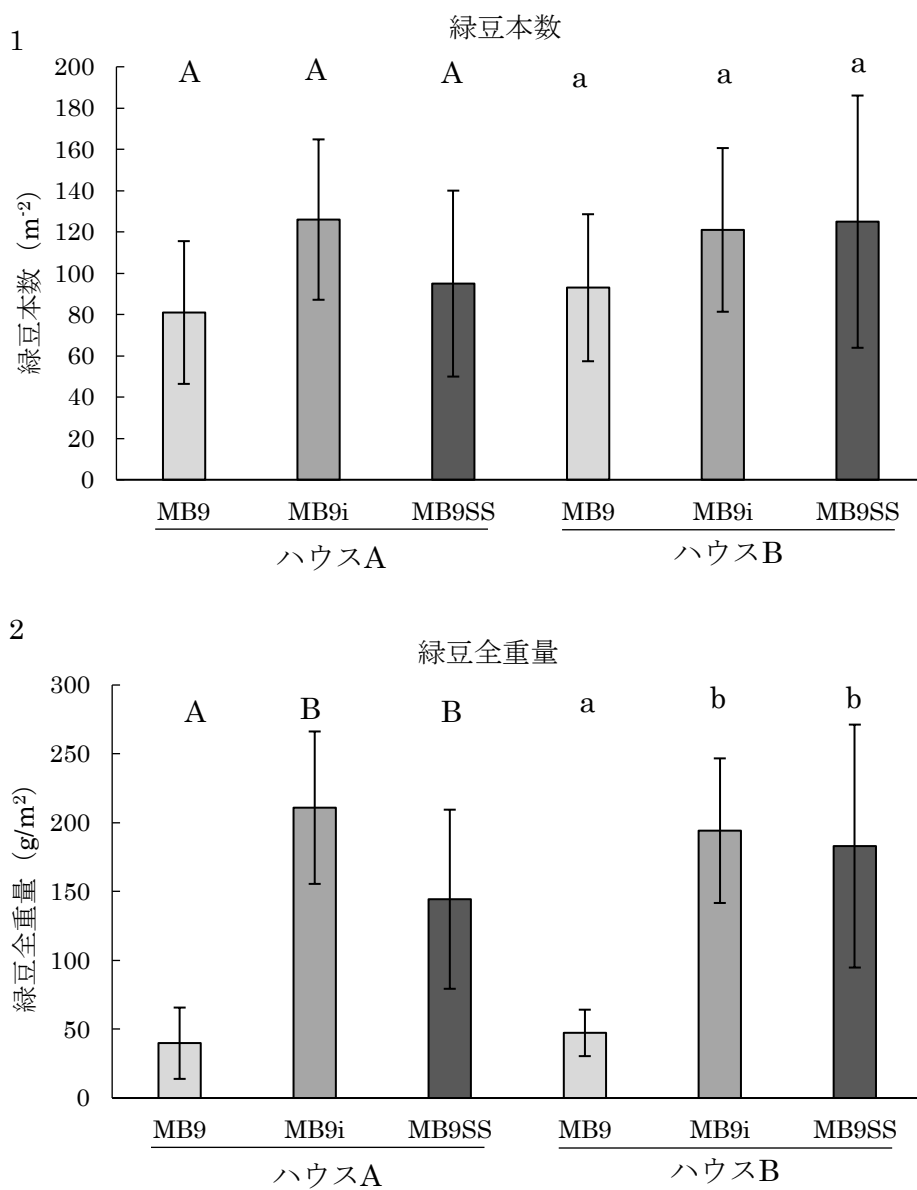


図 2-2 上図 (2-2-1) 緑豆本数、下図 (2-2-2) 緑豆全重量

緑豆 9kg/10a 播種区(すき込み後非灌水区); MB9、緑豆 9kg/10a 播種区(すき込み後灌水区); MB9i、緑豆 9kg/10a 播種+太陽熱処理区; MB9SS

MB は緑豆 (Mung Bean) を意味する、SS は太陽熱処理 (Soil Solarization) を意味する。

全重量は地上部と地下部を合わせたものである。

異なる英字は有意確率 5% で有意差あり (Fisher の最小有意差法)。英字の大小で別々の検定。

両ハウス、設定した区画 0.25m<sup>2</sup> 内の本数と全重量を測定し、1m<sup>2</sup> に換算した値をグラフ化した。

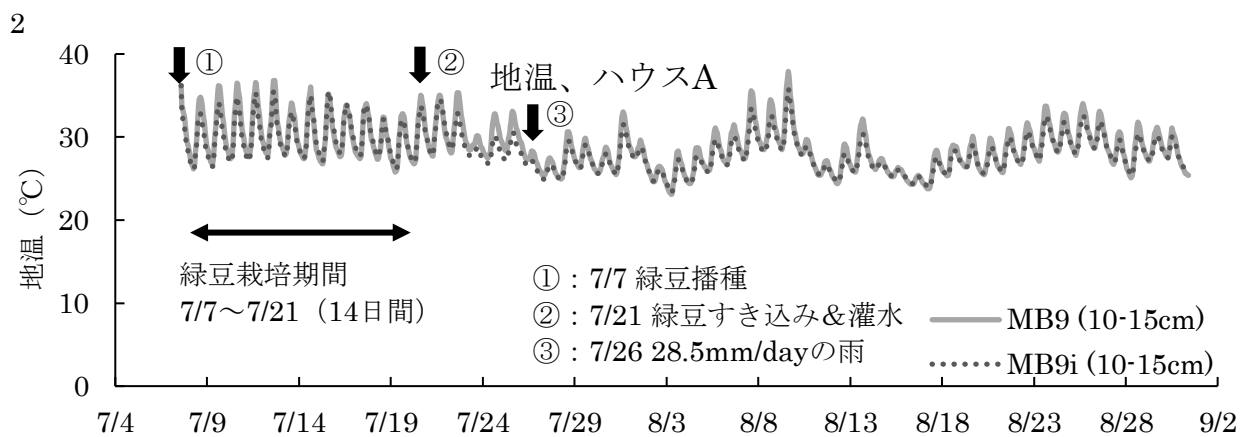
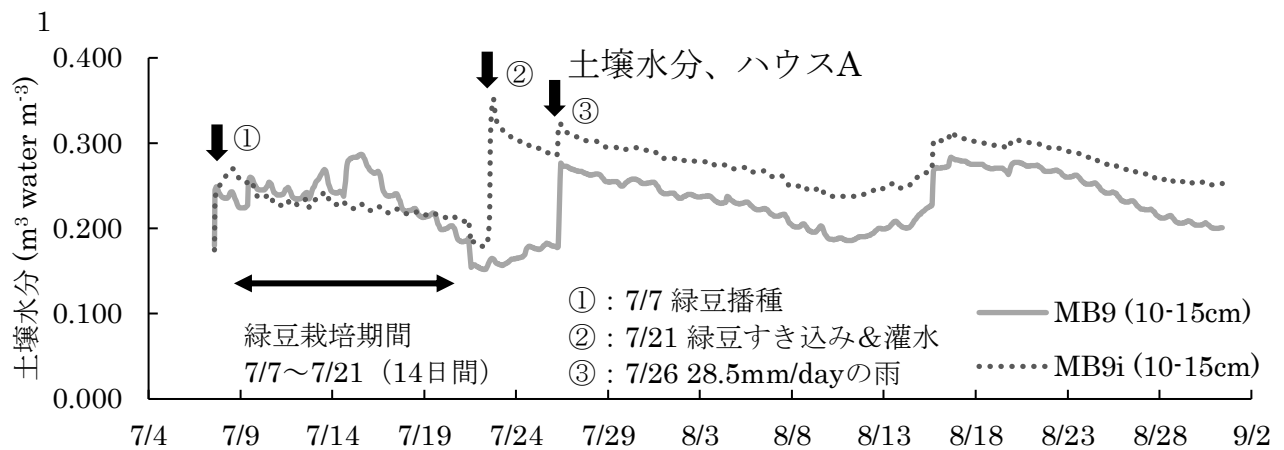


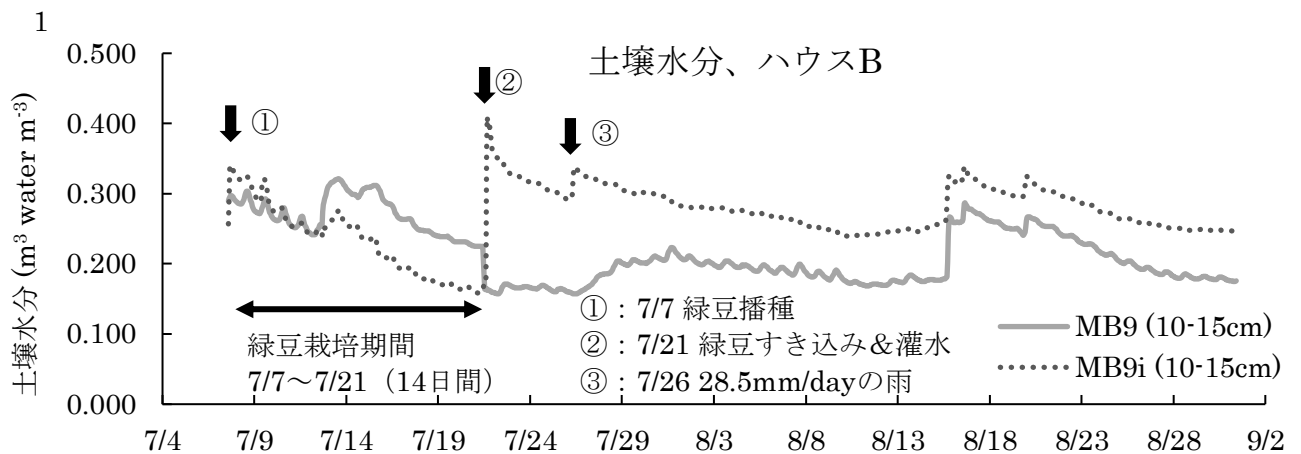
図 2-3. ハウス A の土壌水分 (2-3-1) と地温 (2-3-2) の推移

播種時からすき込み 41 日目までを表している。

測定した深さは 10~15cm (水分センサー (5TM) のセンサー部分が 5cm) とした。

実線が MB9 (緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水))、破線が MB9i (緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区)) を示す。

7 月 21 日に緑豆すき込みおよび灌水 (灌水量不明) を行った。7 月 26 日には 28.5mm/日の大雨が降った。



2

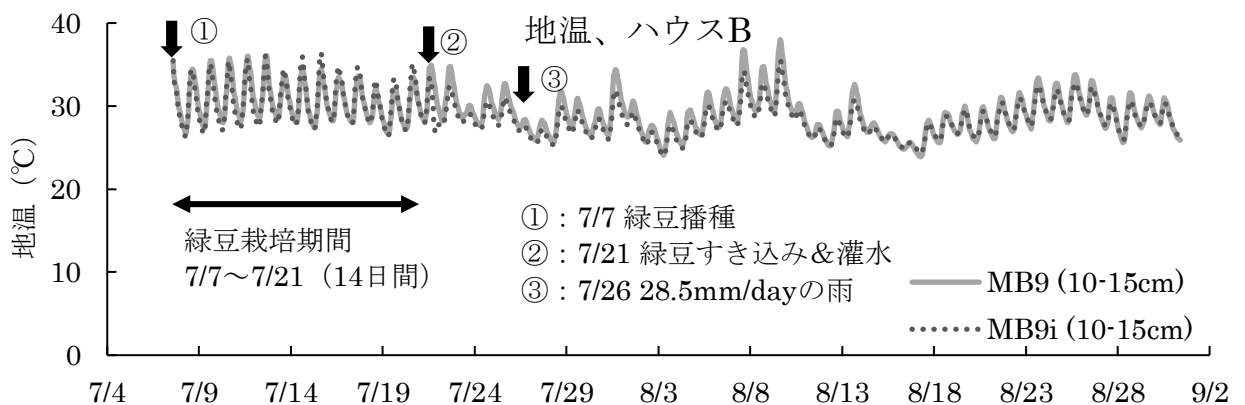


図 2-4. ハウス B の土壌水分 (2-4-1) と地温 (2-4-2) の推移

播種時からすき込み 41 日目までを表している。

測定した深さは 10～15cm (水分センサー (5TM) のセンサー部分が 5cm) とした。

実線が MB9 (緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水))、破線が MB9i (緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区)) を示す。

7 月 21 日に緑豆すき込みおよび灌水 (灌水量不明) を行った。7 月 26 日には 28.5mm/日の大雨が降った。

表 2-1. 緑豆すき込みの有無とその後の灌水の有無が及ぼす SCN2 期幼虫遊出数の変化

処理区 (ハウスB)	緑豆すき込み後日数			
	0	4	11	14
Control-A	3	13	104	16
Control-B	3	8	16	2
Control-C	10	5	78	7
Control-D	10	8	75	88
MB9-A	107	30	83	69
MB9-B	107	101	300	70
MB9-C	17	96	333	17
MB9-D	17	294	464	144
MB9i-A	32	337	457	84
MB9i-B	32	781	245	99
MB9i-C	247	1317	1126	357
MB9i-D	247	551	216	91

ハウス B において行った緑豆すき込み後 0, 4, 11, 14 日目に採取した土壌を用いて行ったベルマン法の結果示した表である。

実験に供試した処理区は、対照区（非緑豆区）；Control、緑豆 9kg/10a 播種区（すき込み後非灌水）；MB9、緑豆 9kg/10a 播種区（すき込み後灌水）；MB9i、MB は緑豆（Mung Bean）を意味する。

0 日目は各処理区、区画 A と B、C と D をそれぞれの土壌を混和して測定したため、A と B、C と D の値が同値となっている。ベルマン法は 2 連で行った。

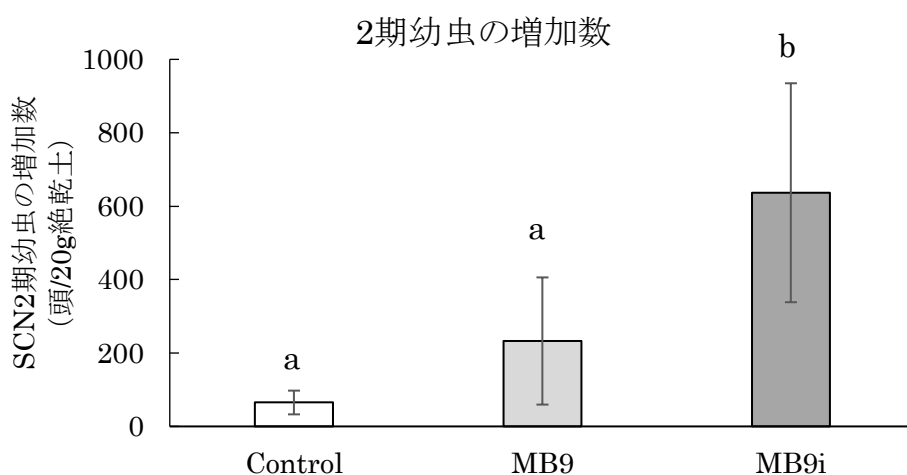


図 2-5. 緑豆すき込みの有無とその後の灌水の有無が及ぼす SCN 孵化に対する影響

緑豆すき込み後の土壌からベルマン法にて遊出される SCN の 2 期幼虫数から、緑豆すき込み前の土壌から遊出される SCN の 2 期幼虫数を差し引いた値。

（『すき込み後 4, 11, 14 日の内の最大遊出数』－『すき込み後 0 日の遊出数』の平均）異なる英字は有意確率 5% で有意差あり（Fisher の最小有意差法）。

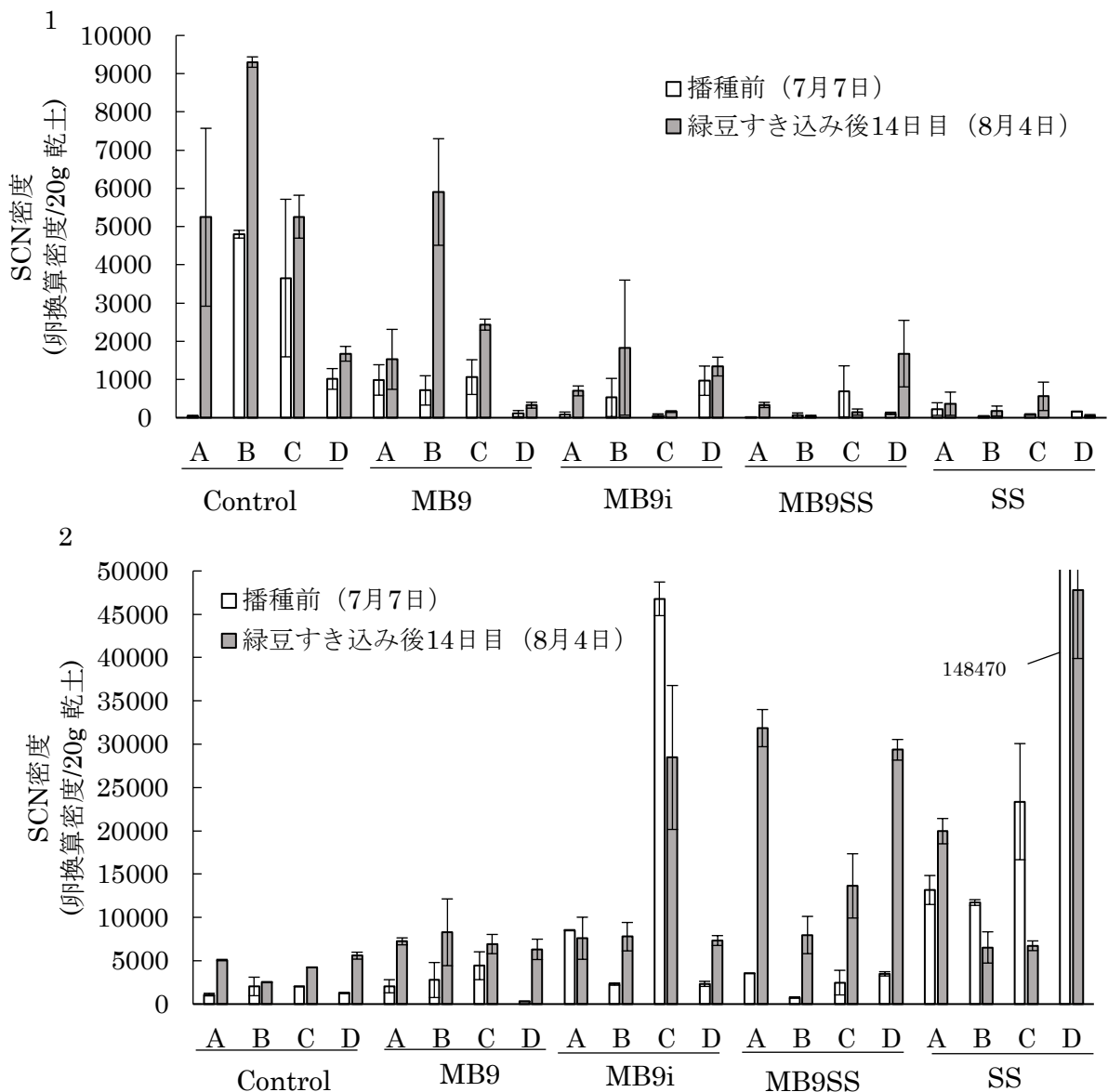


図 2-6. 緑豆すき込みの有無と灌水および太陽熱処理が SCN に及ぼす影響 (2017 年度)

図 2-6-1 がハウス A、図 2-6-2 がハウス B を示す。

各処理区の各地点 (A~D) から播種前 (7 月 7 日) とすき込み後 14 日目の土壌を対象に SCN 密度を推定した。

対照区 (非緑豆区) ; Control、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水) ; MB9、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水) ; MB9i、緑豆 9kg/10a 播種 + 太陽熱処理区 ; MB9SS、太陽熱処理のみ区 ; SS 区

MB は緑豆 (Mung Bean) を意味する、SS は太陽熱処理 (Soil Solarization) を意味する。

リアルタイム PCR によって出てきた Ct 値を、

$$Ct \text{ 値} = -2.2813 \times \log_{10} (\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 37.04 \quad (\text{式 1})$$

にあてはめ、値を算出した。

#### 第4節 考察

2017年度実証実験では、SCN発生圃場のハウスを2棟使用し行ったが、緑豆すき込み法によるSCN密度減少効果は確認されなかった。ベルマン法の結果より、ハウスBにおいては緑豆すき込みによるSCNの孵化およびその後の減少は確認されたが、密度が数千から数万頭いる中で数百頭の孵化効果と、大きく密度を減少させるには至らなかった。2017年度において、孵化促進効果自体は見えたものの、密度減少できた地点がMB9iでは8地点中2地点しかなく、これは土壤にすき込まれた緑豆の植物体量が不十分であったことが原因ではないかと考えられた。王(2016年度修士論文)の結果では、土壤中の水分が低い条件(18~28%程度)ではあったものの、緑豆を249g/m<sup>2</sup>すき込んでも密度は減少しなかった。2017年度の緑豆生育量をみてみると、播種直後に灌水し、緑豆生育の環境を整えた場合であっても、ハウスAのMB9iにおいて211g/m<sup>2</sup>であり、孵化は一定程度促進しても、SCNの密度を大きく減少させることのできる緑豆植物体量ではなかったことが考えられた。このことより、緑豆すき込み後14日間において、SCN密度を減少させるには、土壤水分が0.3 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>前後と十分にあり、かつ地温も平均で25°C付近ではないが30°C以下であるという、孵化に適した土壤環境だけでなく、そもそも孵化を促進させるに足る必要十分な緑豆植物体量が、緑豆すき込みでは重要であると示唆された。

また、2017年度では緑豆をすき込んでから14日目の土壤を採取し評価を行った。Gieslerら(2011)によると、SCNの2期幼虫は宿主のいない状態では数日から1週間程度で餓死すると述べられており、孵化したSCNの2期幼虫は餓死したと考えられる。しかしながら、ハウスBのMB9iですき込み14日目のベルマン法による遊出数が158頭(20g絶乾土あたり)であり、依然100頭以上存在することからも、緑豆すき込みから2週間ではなく、1か月でどの程度密度が変化するかを調べる必要があると考えられた。

今回の土壤のサンプリング方法に関しては違いがあり、採取後にビニール袋内でよく混和していたが、播種前の土壤は半量圃場に戻し、すき込み後14日目の土壤では戻さなかった。2017年度の圃場試験後の10月に行った実験において、ハウスAのMB9より深さ20cmの土壤を採取し、手で袋内の土壤塊を崩しつつよく混和し、その後圃場に戻す土壤を別の袋に移し、残った土壤とで密度に違いがあるかを確認した。圃場に戻す想定 of 土壤(戻し土壤)と、残す土壤それぞれを2mm以下、2~5mm、5mm以上に分け、SCN密度を測定し比較すると、どのサイズの土壤でも、戻す土壤の方が密度が高かった(図2-7)。そのため、採取した土壤を圃場に半量戻した播種前土壤の実際のSCN密度は、今回測定したSCN密度と異なる可能性があると考えられた。このことより、採取した土壤の半量を圃場に戻すことは、SCN密度の変化を追う上で、正確性に欠けたと考えられた。

正確な評価という点では、サンプリング誤差も考えられた。2017年度においては、トラクターによる耕耘後そのまま圃場から土壤をサンプリングしたが、シストセンチュウは図2-6より圃場内でもかなりばらつきがあり、かつ隣接地点でもばらつきが発生する。よって、

翌年以降の実証実験では、トラクターによる耕耘後、再度スコップ等で各地点の土壌を混和し、できるだけ均一な条件に整える必要があると考えられた。

SS区（太陽熱処理区）では8地点中4地点で密度が減少傾向にあったが、地温を測定しておらず、SCN の死滅に必要な高い地温であったかはわからなかった。次年度でSS区でも地温の推移を測定し、実際に太陽熱消毒が効果を示すかを確認する必要がある。

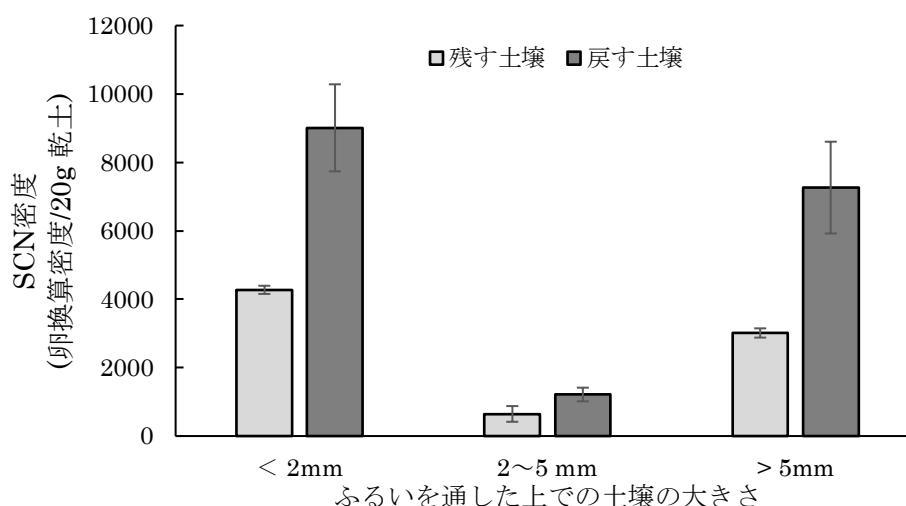


図 2-7. 採取土壌の半量を圃場に戻した場合の SCN 密度に対する影響

2017 年 10 月 19 日にハウス A の MB9 で、深さ 20cm までの土壌を用いた。土壌採取はオーガーを使用した。採取後、袋内でよく混和後、圃場に戻すことを想定した土壌の半量を別の袋に移し、元の袋に残った土壌を「残す土壌」、半量を圃場に戻す想定で別の袋に移した土壌を「戻す土壌」とし、SCN 密度をリアルタイム PCR を用いて推定した。土壌を分けた後、目合いが 2mm と 5mm のふるいを用いて、2 つの土壌を 2mm 以下、2~5mm、5mm 以上に分け、土壌のサイズごとに分析を行った。

## 第 5 節 まとめ

2017 年度では正確に緑豆すき込み法の効果を評価・確認できなかったが、いくつかの反省点が挙げられ、以下の点を考慮すれば、圃場での緑豆すき込みによる SCN 密度減少を期待できるのではないかと考えられた。

- ・土壌採取前はスコップによる土壌混和を行うこと
- ・採取した土壌は袋内でよく混和後、圃場に戻さず全量持ち帰り、ふるいにかける
- ・すき込み後は 30 日以上の期間をおいて土壌を採取し、SCN 密度を評価する
- ・緑豆生育を良好にするための工夫（播種後すぐの大量灌水や、定期的な灌水）

上記以外にも、すき込み後の土壌水分および地温の推移を測定し、最適な条件を模索する必要がある。

### 第3章 SCNの孵化に対する水分の影響（ポット試験）

#### 第1節 はじめに

本章では、2017年圃場試験のベルマン法の結果（図2-5）より、緑豆すき込みによるSCN卵の孵化促進という点に関しては、これまでの知見通り地温と、加えて十分な土壤水分が必要であることが分かった。しかしながら、この「十分な」の部分が科学的でなく、現時点で土壤何gに水何gといった数値的根拠がない。よって、緑豆すき込み時にいくつかの水分点を作成し、何も栽培しない処理区（無処理区）とも比較しながら、最適な水分条件を模索することとした。

土壤水分点の指標として、今回はpFというものを使用した。土壤水分は土壤カラムを水に入れ、毛管現象で上がった水の高さや、土壤界面での圧力を用いて表現したりするが、pFは水の高さや圧力から変換（水高： $pF = \log H$ 、圧力： $pF = \log(-10.2\phi)$ ）ができる。pFの値によって植物の生育にどのような影響が出るかが知られている。pF0を最大容水量（ヒルガード法における最大用水量とは異なる）として、pF1.8を圃場容水量（その圃場土が保持することのできる、重力水の落ちた状態のこと）、pF2.7を毛管連絡切断含水量、pF3.0を植物生育阻害水分点、pF3.8を初期萎凋点、pF4.2を永久萎凋点、そしてpF7.0を絶乾土とされている。加えて、pF1.8からpF3.0を正常生育有効水分、pF1.8からpF3.8を易有効水分、pF1.8からpF4.2を難有効水分（pF1.8からpF4.2を全有効水分という）、そしてpF4.2からpF7.0は非有効水分といい、この水分レベルまでいくと土壤自体に水分は含まれているが、植物はその水分を全く利用できない（松中、土壤学の基礎（2003）より引用）。このpFという指標における、孵化最適点を探し、実際の圃場で最低限どの程度水をやればよいかを調べた。

#### 第2節 材料および方法

##### 【本実験をするにあたり必要となるpF水分曲線の作成について】

本実験で肝となるpFを求めるには、その土壤の水分含量（g/100g乾土）からpFに換算する式（pF-水分曲線）が必要となってくる。そこで、本実験（ポット試験）をする前に、大起理化工業の広域土壤pF測定器を使用し、pF曲線を作成した。

##### 方法

- 1) 100ml ステンレス試料円筒の底面にガラス繊維ろ紙をあてはめ、その中に埼玉県三郷市エダメハウス土壤（5mmふるい風乾土）をぎりぎりまで詰めた後、重量を測定した。
- 2) バットに水を入れ、できた円筒をゆっくり水につけ、1時間静置した。
- 3) 1時間後、円筒をゆっくりと取り出し後、濡れ雑巾の上で10分静置した。
- 4) 静置後の土壤の入った円筒重量（pF0に換算）を測定した。
- 5) 広域土壤pF測定器の中にpF0の状態の円筒を中に敷いた円板の上に置き、管を繋げた後、蓋を閉め、pF1.8の圧力に設定し、約7日後に土壤が入った円筒重量を測定した。各



pF は pF1.8 (設定値 (SV) 63、kPa = 6.19)、2.0 (SV = 100、kPa = 9.81)、2.3 (SV = 200、kPa = 19.57)、2.5 (SV = 316、kPa = 31.01)、3.0 (SV = 1000、kPa = 98.07) である。

- 6) pF3.0 の円筒重量を測定した後、105°C24 時間で乾燥させ、絶乾土重を測定した。
- 7) 最後に使用した円筒管の重量を測定し、各 pF 時の土壌が含む水分量を算出することで、pF-水分曲線を作成した。

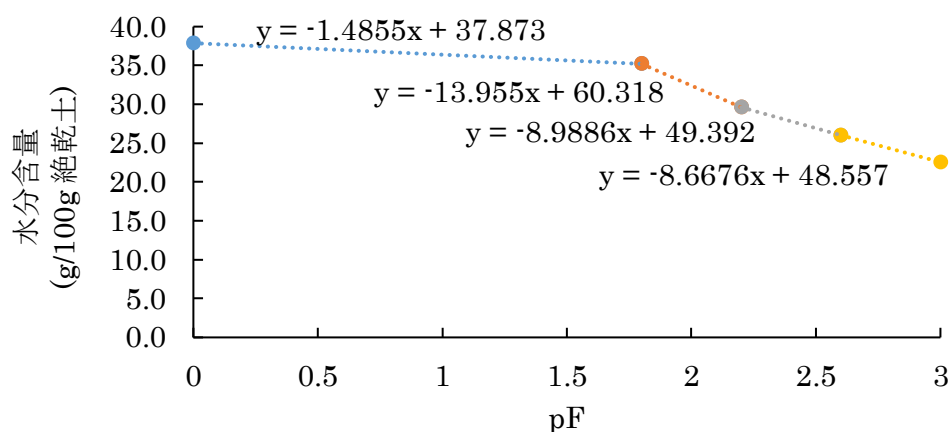


図 3-1. 埼玉県三郷市ハウス土の pF-水分曲線

広域土壌 pF 測定器を用いて、土壌を詰めた円筒を 3 連用意し、pF 0 から 3.0 まで段階的に測定器内に圧力をかけ、各 pF での円筒を含んだ重量を測定。その後、105°C24 時間乾燥させて絶乾土重を測定し、各 pF の段階での水分含量を算出し、グラフ化したもの。

段階的に設定した pF は 0、1.8、2.0、2.3、2.5、3.0 である。

一つの曲線化はせず、使用土壌の水分含量を測定後、あてはまる範囲の式を用いて、pF 値を算出する方法を採用した。

#### 【用意する処理区】

無栽培区 (無処理区、Control) と緑豆栽培区 (Mung Bean, MB)。両区それぞれ水分点を 6 つ (pF2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0 (※ただし、実際の土壌の pF は少し異なる)) 用意。

【実験の流れ (時間経過を含む)】 以下は 2017 年に行ったものである。本試験は BASE3 階の温室にて行った。

～10 月 13 日 : 使用する土壌 (埼玉県三郷市ハウス土) を 5mm ふりいでふるって、その後風乾した。風乾した土壌を一部採取した。

10 月 14 日 : 横、縦、高さ = 45.2cm、30.6cm、25cm のコンテナ (2 つ) に風乾土をつめた。この際、コンテナの中央に仕切りを入れ、Control と MB を半々に設けた。

土の高さは 23cm 程度であった。

下記 Ds は播種日からの経過日数、Di はポット試験開始からの日数

- 10月16日 (Ds0) : MB 区に緑豆 (18kg/10a = 17 粒/MB 区) を播種した。水分センサー、ポーラスカップ型の pF meter (深さ 10~15cm)、温度計 (深さ 12.5cm) を設置。
- 10月18日 (Ds2) : 発芽が始まった。
- 10月23日 (Ds7) : 緑豆植物体数を揃えるため、間引きをし、11 個体とした。
- 10月24日 (Ds8) : この時の緑豆は地表面からの高さが 2~5cm であった。
- 11月3日 (Ds18) (1) : PM14:00 から緑豆すき込みポット作成準備開始。コンテナより緑豆を根から取り出した。次に 2 つコンテナの Control と MB 土壌をそれぞれ別々の袋に入れた。この際の土壌は深さ 15cm までのものを使った。両袋内でそれぞれよく混和した後、乾土約 740g (この時生土で約 1kg) を更に 18 袋×2 (各処理区の各 pF を 3 連) に分割した。
- 11月3日 (Ds18) (2) : 各 pF 値になるように袋に水を添加し、よく混和した。この時添加した水分量は、Control においては pF2.0 設定の土壌に対して 102.5g、pF2.2 設定には 83.5g、pF2.4 設定には 64.6g、pF2.6 設定には 45.7g、pF2.8 設定には 26.7g、pF3.0 設定には 7.78g とした。加えて、MB においては pF2.0 設定の土壌に対して 105.4g、pF2.2 設定には 86.5g、pF2.4 設定には 67.6g、pF2.6 設定には 48.6g、pF2.8 設定には 29.7g、pF3.0 設定には 10.74g とした (ただし、実際の pF は pF-水分曲線にあてはめた結果、表 3-1 となった)。
- 11月4日 (Di0) (1) : 混和された土壌 (袋内の) において、MB のもののみ (18 ポット) 各袋 0.62g の緑豆を入れ、更に混ぜ込んだ。
- 11月4日 (Di0) (2) : 各袋から土壌をとり、ベルマン法 (生土 20g で 1 連) と土壌水分測定に供試した。
- 11月4日 (Di0) (3) : 各袋の土壌をそれぞれ 1/10000a ポットに入れ、ラップをかけた後、保温マット (25°C 設定) の上に置いた。ポットの配置は図 3-2 で示した。
- 11月8日 (Di4) : 各ポットから線虫スコープで 2 点取りし、ベルマン法 (生土 20g で 1 連) と土壌水分測定 (1 連) に供試した。
- 12月4日 (Di30) : ベルマン法とリアルタイム PCR 法用に各ポットから土壌を採取

表 3-1. 設定した pF と実際の pF の違い

処理区	設定pF	水添加後の土壌水分含量(g)	実際のpF	
Control	2.00	47.6	2.00	
		47.8	1.99	
		47.8	1.99	
	2.20	46.2	2.09	
		46.4	2.07	
		46.3	2.08	
	2.40	43.2	2.28	
		44.2	2.22	
		43.2	2.29	
	2.60	41.4	2.42	
		41.0	2.46	
		40.9	2.47	
	2.80	39.8	2.59	
		39.3	2.66	
		38.5	2.76	
	3.00	35.9	3.12	
		37.1	2.95	
		36.3	3.06	
	MB	2.00	48.4	1.97
			49.3	1.94
			48.0	1.98
2.20		46.4	2.07	
		45.3	2.14	
		45.4	2.14	
2.40		43.4	2.27	
		44.2	2.22	
		43.0	2.29	
2.60		41.4	2.43	
		41.6	2.41	
		41.0	2.46	
2.80		39.4	2.65	
		39.5	2.63	
		38.6	2.75	
3.00		37.5	2.90	
		36.0	3.10	
		36.3	3.06	

Ds18 (播種後 18 日目)において、生土約 1kg に対して各 pF 値になるように水分を添加 (添加量は Control と MB で異なる (11 月 3 日 (Ds18) (2)) の欄を参照) したが、上から水を添加した土壌を均一の水分条件にするには困難がある。よって、できる限り、段階的に水分を添加することで、均一な条件にできるよう努めた。ただし、設定した pF と、実際の pF には差が発生する可能性があるため、水分添加後の土壌の水分含量を測定し、図 3-1 の pF-水分曲線を用いて実際の pF 値を算出したのが表 3-1 である。土壌水分含量は 100g 乾土あたりである。

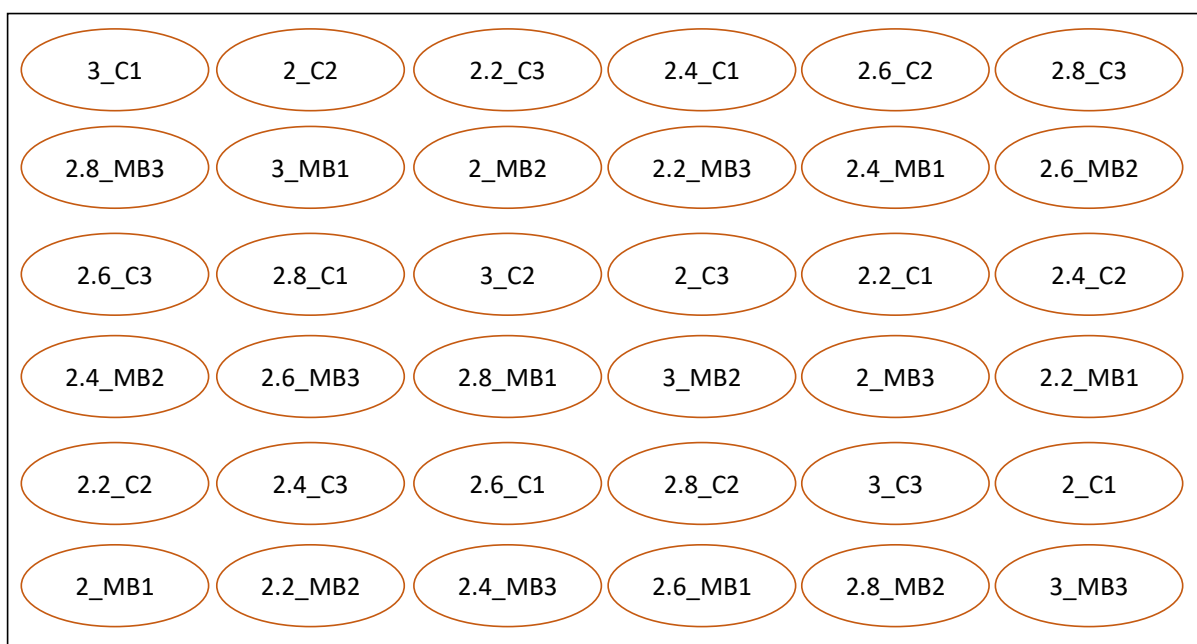


図 3-2. 保温マット上のポット配置図 (円の中は、設定 pF 値\_処理区+反復番号)  
 C = Control (対照区)、MB = Mung Bean (緑豆すき込み区)  
 Control と MB および同 pF 条件がなるべく重ならないように、  
 ランダム配置になるようにポットを配置した。  
 各処理区の各 pF それぞれ 3 反復で行った。

## 【採取土壌の調査方法】

### ・ベルマン法

使用土壌は緑豆すきこみ 0、4、30 日後にポットから採取した土壌とした。方法に関しては第 2 章の方法に記載している通り行った。

### ・DNA 抽出およびリアルタイム PCR

#### DNA 抽出

本章における DNA 抽出方法は土壌粉砕には **Fast Prep** を用い、抽出自体は、簡易法とは異なり、従来法を使用したものである。下記に詳細な実験手法を記載する。

従来法をするにあたり、以下の試薬を調整、作成した。

**0.5M Tris-HCl (pH8.0)** : Tris 60.57g を脱イオン水で溶かし、その溶液に対して 5M HCl にて pH8.0 に調整しながら 1L を作成。

**0.5M EDTA (pH8.0)** : EDTA 73.06g を脱イオン水で溶かし、その溶液に対して NaOH にて pH8.0 に調整しながら 500ml を作成。

**20% SDS** : ドデシル硫酸ナトリウム 20g を 200ml ビーカーにはかりとり、80ml 程度の脱イオン水に溶かす。泡が消えるまで待つ。100ml のメスシリンダーに移し、100ml に脱イオン水でメスアップ後、室温にて保管（オートクレーブはかけない）。

**TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)** : 0.5M Tris-HCl (pH8.0) を 1ml、0.5M EDTA (pH 8.0) を 0.1ml とり、50ml にメスアップした。その後、121°C15 分でオートクレーブし、室温にて保管。

**5M NaCl** : NaCl 29.22g を 200ml ビーカーにとり、約 90ml 程度の脱イオン水で溶かし(徐々に加える)、NaCl を完全に溶かした。その後 100ml メスシリンダーを用いて 100ml にメスアップし、121°C15 分オートクレーブし、室温で保管した。

**10%CTAB** : CTAB (ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミス) 10g を 200ml のビーカーにとり、90ml に脱イオン水ビーカーに加えて、湯銭しつつ溶かした。121°C15 分オートクレーブし、室温にて保管した。メスアップは泡が立つので行わず、また試薬瓶に入れるときにも泡が立たないようにゆっくりそそいだ。

**20%PEG** : Polyethylene glycol 8000 を 20g、200ml ビーカーにとり、脱イオン水を 80ml 程度加えて、湯煎しながら溶かした。溶けてきたら、NaCl を 9.35g 入れて溶かし、100ml メスシリンダーで 100ml にメスアップした。121°C15 分オートクレーブし、室温に戻してから、冷蔵保存した。ただしオートクレーブ後、2 層に液が分かれていたので、混合して保存した。

**20%スキムミルク溶液** : 50ml のメスシリンダーに 0.5M Tris-HCl (pH8.0) 0.8ml、0.5M EDTA (pH8.0) 4ml をはかりとり、脱イオン水で 40ml にメスアップした。熱湯を張ったプラスチックトレーの中に 8.2g のスキムミルクが入った 100ml にメスアップ後の液を入れ、スキムミルクを溶かした。その液を試薬瓶に移し、115°C5 分オートクレーブにかけた後、

20%SDS 溶液を 1ml 添加し、振って混ぜ、冷凍保存した。

Lysis buffer (10mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 0.5% SDS) : 0.5M Tris-HCl (pH8.0) を 2ml、0.5M EDTA (pH8.0) を 10ml、それぞれピペットマンで測りとり、100ml メスシリンダーに入れ、メスアップ。試薬瓶に移し替え、121°C 15 分オートクレーブにかけ、溶液がさめた後、20%SDS 溶液を 2.5ml 加え、室温にて保存した。

以下手順

1. 採取した土壌を数日間風乾させ、目開き 2mm のふるいに通し、よく混和した後、200g の風乾土を 60°C 1 日乾燥させた。60°C 乾燥させた土壌は -20°C に保管した。
2. Fisher Scientific 社製の 15mL Centrifuge チューブ 1 本に、上記 60°C 乾燥土を 10g 入れ、その次にステンレスボール法 (φ 8.0mm) を 4 個入れた (3 連、計 30g 土)。
3. 2 のチューブを MP Bio 社製の Fast Prep に 4.5m/sec でボールミルにかけた。この時、チューブが線対称に置かれるよう気を付けた。
4. ボールミル後の粉碎土壌をひとまとめにし、よく混和した。  
(ここまでは 2017 年の実験と同じ)
5. ビーズ入り 2ml スクリューキャップチューブ (φ 0.1mm ジルコニアビーズ 0.75g + φ 0.5mm ガラスビーズ 0.25g をチューブに入れ、オートクレーブ滅菌し、乾燥させたチューブを指す) に粉碎土壌 0.5g を入れ、解凍済みのスキムミルク 500μl 入れた後、チューブを叩き、全体をなじませ、遠心分離 (12,000g、1 分、20°C) した。
6. チューブに Lysis Buffer を 600μl 入れ、チューブを再び叩きなじませた。
7. ビードビーター (5,000rpm、1 分×2 回) した後、遠心分離 (13,000g、5 分) した。
8. 5M NaCl を 377μl をあらかじめ加えた新しい 2ml チューブに、上澄み 600μl を添加してから、10% CTAB を 270μl 加え、60°C で 10 分培養した。培養の際、3 分→2 分→2 分→3 分後にそれぞれチューブを軽く上下反転させた。
9. クロロホルム 500μl を培養したチューブに入れ、ボルテックスで白濁するまでよく攪拌した後、2 分静置した。
10. 静置したチューブを遠心分離 (15,000g、15 分) した。
11. 新しい 2ml チューブに遠心後の上澄み 1,100μl (550μl を 2 回) を移し、再びクロロホルム 500μl を添加し、ボルテックスで攪拌した。
12. 遠心分離 (15,000g、15 分) した。
13. 新しい 2ml チューブに上澄み 1,000μl を移し、20% PEG 600μl を添加し、ボルテックスで攪拌した。
14. 遠心分離 (15,000rpm、20 分、4°C) した。
15. 上澄みを捨て、70%エタノール 500μl を加えて、遠心分離 (15,000rpm、5 分、4°C) した。
16. 上澄みを捨て、エバポレーターにて約 30 分乾燥させた。
17. 滅菌脱イオン水 100μl を加え、DNA 溶液を作成した。作成した溶液を室温にて約 60

分静置した後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

[リアルタイム PCR]

第2章の第2節の方法に準拠した。検量線は、

$$\text{Ct 値} = -3.2411 \times \log_{10}(\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 35.395$$

(式2)

式2に関しては未発表である。また SCNnew プライマーを用いた検量線である。

### 【ポット内土壌の地温測定】

緑豆すき込み法において、地温は非常に大切である。保温マット上に置いているとはいえ、効果の有無を正確に判断するためには地温の測定が必要と考え、地温を測定することとした。使用した温度ロガー (UIZ 3633、日置電機 (株)) はコミュニケーションベース 3912 に付随するロガーであり、実際の地温測定には温度ロガーに対応したシース型のセンサーを用いた。

### 第3節 結果

緑豆すき込みの有無および土壌水分が SCN の孵化にどのように影響するかについて、ベルマン法を用いて調べた結果を図 3-3 に示した。結果として、緑豆をすき込んでいない対照区 (Control 区) では、水分に関わらず孵化は促進されなかった。一方、緑豆すき込みをした処理区 (MB 区) では、土壌水分含量が増えるにつれて、孵化が促進される傾向にあった。処理区間差を調べてみると、 $pF2.9$  以上では Control 区と MB 区間で有意な差は示されなかった ( $p = 0.21$ ) が、 $pF2.76$  以下では有意な差があった (Fisher の最小有意差法、 $p < 0.05$ )。緑豆すき込み後 30 日目は図表では示さなかったが、SCN2 期幼虫遊出数は Control で  $pF$  関係なく 1~4 頭 (20g 乾土当たり) と少なく、MB も 2~11 頭 (20g 乾土当たり) であり、やや MB で遊出したもの、大きな差はなかった。

図 3-4 には土壌水分が異なる条件での緑豆すき込みの影響を示した。実験に用いた初期土壌 (Ds0) の SCN 密度は 3924 卵 (換算頭数/20g) であった。緑豆すき込み初期土壌に対して有意に密度が減少した処理区は MB3.0 の 1959 卵 (換算頭数/20g) のみであった (Fisher の最小有意差法、 $p < 0.05$ )。また各設定  $pF$  における Control と MB 間では有意な差はどれもなかった。

ポット内土壌の地温に関しては、MB において温度ロガーを深さ 10cm の位置に設置し測定した。ただし、 $pF2.0$  と  $2.8$  は設定ミスで測定できなかった。緑豆すき込み後 4 日間の平均地温は、MB2.2 で  $22.8^{\circ}\text{C}$ 、MB2.4 で  $23.8^{\circ}\text{C}$ 、MB2.6 で  $24.1^{\circ}\text{C}$ 、MB3.0 で  $23.8^{\circ}\text{C}$  であった。また、すき込み後 30 日間の平均地温は、MB2.2 で  $21.5^{\circ}\text{C}$ 、MB2.4 で  $21.4^{\circ}\text{C}$ 、MB2.6 で  $21.4^{\circ}\text{C}$ 、MB3.0 で  $21.2^{\circ}\text{C}$  であった。

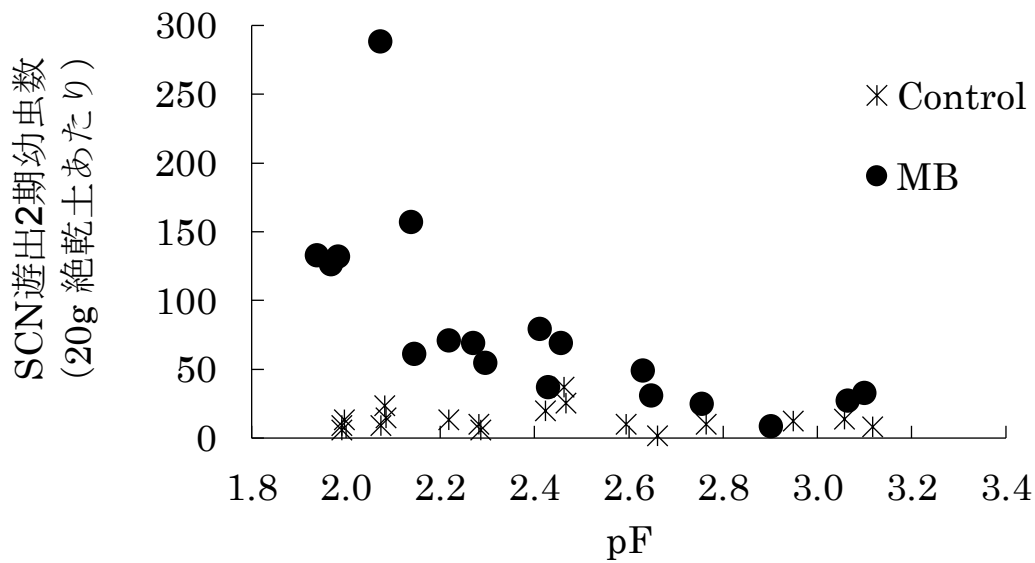


図 3-3. 緑豆すき込み後 4 日目における土壤水分と遊出した SCN2 期幼虫数との関係

Control の 18 ポット、MB の 18 ポットからそれぞれ線虫スコープにて土壤を採取後、ベルマン法（連数無し）にて分離された SCN の 2 期幼虫数を計数した。

すき込み後 0 日目の Control と MB のベルマン法による SCN の 2 期幼虫遊出数は、Control で 5 頭（20g 絶乾土あたり）、MB で 14 頭（20g 絶乾土あたり）であった（土壤かコンテナから袋に移し、よく混和したものを使用）。



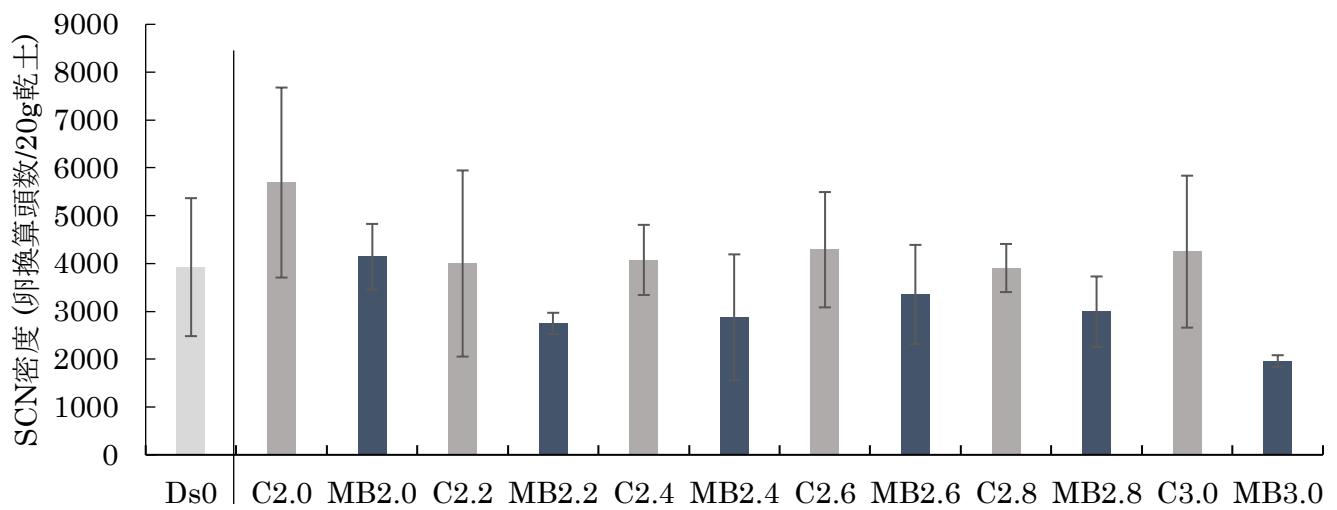


図 3-4. 土壤水分条件が異なる際の、緑豆すき込みが SCN 密度に与える影響

Ds0 : 0 Day after seeding、C : Control、MB : Mung Bean、C と MB 横の数値は設定 pF 値。

Ds0 以外は緑豆すき込み後 30 日目 (Di30) のリアルタイム PCR の結果を示した。

すき込み後 30 日目の土壤採取方法は、移植ごとでポット内土壤をよく混和後、半量採取した。採取土壤は 2mm で振るった後、60°C24 時間乾燥し、DNA 抽出およびリアルタイム PCR に供試した。Ct 値は  $Ct \text{ 値} = -3.2411 \times \log_{10} (\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 35.395$  (式 2) にあてはめ、SCN 密度を算出した。

各設定 pF における Control と MB 間では有意な差は無かった (Fisher の最小有意差法)。

#### 第4節 考察

本ポット試験において、緑豆すき込み後の SCN の孵化に関しては、pF が低くなる、つまりは土壤水分が高くなるにつれて、ベルマン法によって遊出する SCN の 2 期幼虫の数が増える傾向がみられた。このことから、pF2.76 を下回るような水分環境下で、SCN 卵が緑豆植物体から出る孵化物質に反応することで、孵化が促進されたことが考えられた。伊藤 (2016 年博士論文) によって、SCN から出る孵化物質は水溶性と推察されていたが、本実験においてもそれが推定された。

十分な土壤水分を伴った緑豆すき込みによる SCN 卵の孵化効果は確認できたものの、実験に供した土壤の初期密度が 3,924 卵 (換算頭数/20g) に対して、緑豆をすき込んだことによる SCN2 期幼虫の孵化数は多くて pF2.2 の 284 頭/20g 乾土と、最大で約 7% の SCN 卵が反応するのみとなった。そのため、SCN 密度も有意には減少しなかったと考えられる。本ポット試験においてすき込んだ緑豆のすき込み量は各ポット (1/10000a) あたり 0.62g であり、換算すると 62g/m<sup>2</sup> のため、2017 年のハウス B の MB9i における緑豆すき込み量の 194g/m<sup>2</sup> と比較しても 3 割程度少なく、より SCN 密度を大きく下げるには不十分であったことが考えられた。加えて、本試験の緑豆すき込み日である 11 月 4 日のハウス内平均気温が 27.4 °C に対して、すき込み後 30 日目の 12 月 4 日には 20.4 °C と 1 か月間で 7.0 °C 下がり、それに伴い平均地温が孵化に適した 25 °C に到達しなかったことも影響したと考えられた。しかしながら、平均地温は 25 °C を下回る中でも、土壤水分を十分な状態にすれば、緑豆をすき込むことで SCN 卵の孵化が促進されることが示唆され、圃場での緑豆すき込みをする際の有用なデータとなった。

#### 第5節 まとめ

緑豆のすき込み量が少なかったため、SCN 卵の孵化量としては少なく、リアルタイム PCR を用いての SCN 密度変化を追うことはできなかった。しかし、すき込み後の平均地温が 25 °C に達しないながらも、土壤中の水分含量が多くなればなるほど (pF2.76 以下)、緑豆をすき込むことで、SCN 卵の孵化が促進されることが示され、翌年以降の圃場試験におけるすき込み後の十分な灌水の重要性が理解できた。

## 第4章 SCN発生圃場を用いた緑豆すき込みの実証実験（2018年度）

### 第1節 はじめに

本章は、第2章で示した2017年の実証試験および第3章におけるポット試験それぞれの結果を参考に、2017年の同一圃場（埼玉県三郷市エダマメハウス）にて実証試験を行った結果をまとめたものである。加えて、2018年では埼玉県だけでなく、神奈川県と奈良県でも各県の農業研究センターの方々とともに実証試験を行った。その結果もお借りし示す。

2017年においては圃場内でのばらつきが大きく、緑豆すき込みによるSCN密度の変化を正確に見ることができなかった。このばらつきは採取地点の土壌混和が不十分であったことが原因だと推定された。またSCN密度の変化を追うために採取した土壌は、緑豆播種前と緑豆すき込み後14日であり、すき込み後日数がSCNの孵化後2期幼虫が死滅するまで十分でなかったことも考えられた。そのために方法でも記載するが、すき込み後の土壌採取日数を30日に設定し、緑豆すき込みの効果を最大限に活かそうと考えた。

本圃場試験を行うにあたり、千葉県農林総合研究センターの武田藍氏が行った、緑豆栽培後細かく切り、その緑豆植物体に蒸留水を加え、振騰懸濁およびろ過してできた液を使用し、SCN卵に曝露させた際の孵化適温範囲を調べる実験を元に、緑豆すき込みの適当な時期を考えた。実験結果を紹介すると、結果として、緑豆液曝露後、20℃では孵化促進は起こらず、曝露4日後に25℃および30℃で孵化が促進された（図4-1、掲載許可済み）。加えて、25℃一定温度の処理区および20℃と25℃を12時間間隔で交互に与えた処理区ともに、緑豆液曝露後の最大孵化日数は異なるものの、SCN卵の孵化が促進された（図4-2、掲載許可済み）。この結果から、20℃から30℃の間で地温が変動していれば、緑豆すき込後SCN卵は孵化促進されることが示された。上記実験はポット試験であるため、実際の圃場でこの地温の影響がどのように出るかも観察することとした。

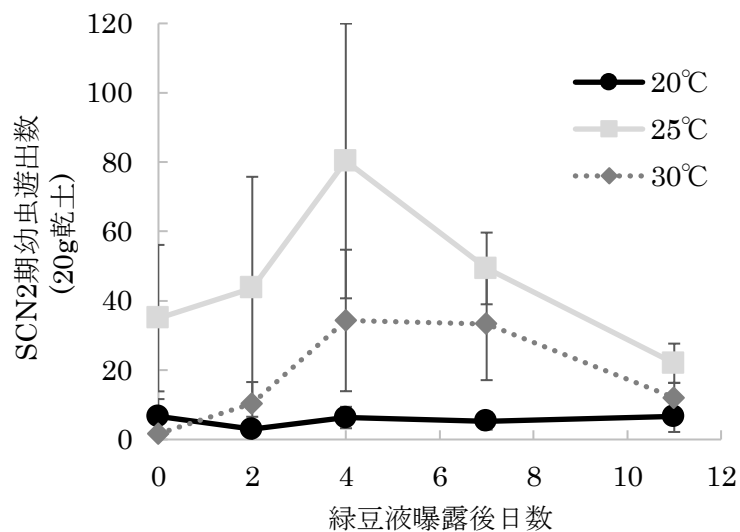


図 4-1. 緑豆液が SCN 卵に及ぼす影響 (温度条件 20、25、30°C)

千葉県農林総合研究センターの武田藍氏実施

直径 9cm のポットに土壌を入れ、約 15 粒ほどの緑豆種子を播種し 1 週間生育した。その後、根を含んで植物体を回収し、3cm 台に細断したものをポリ容器にて入れ、500ml と純水とともに 80rpm で 6 時間振とうした。振とう液を 0.2 $\mu$ m フィルターでろ過し、そのろ過された緑豆液 30ml をポット内に入れた 100g 土壌 (SCN 発生土壌) に添加した。ラップをし、20°C、25°C、30°C の各温度の一定条件下に静置し、0、2、4、7、11 日後に土壌を採取し、ベルマン法にて SCN2 期幼虫を分離、計数した。各温度 3 連で行った。

緑豆液添加直後 (0 日) の各温度での SCN2 期幼虫数は 20°C で 7 頭、25°C で 35 頭、30°C で 2 頭であった (3 連の平均頭数、20g 土壌あたり)。25°C と 30°C は緑豆液添加 4 日後で最大となり、25°C で 80 頭、30°C で 34 頭であった。20°C はほぼ横ばいで、最大遊出数は緑豆液添加 11 日後の 7 頭であった。

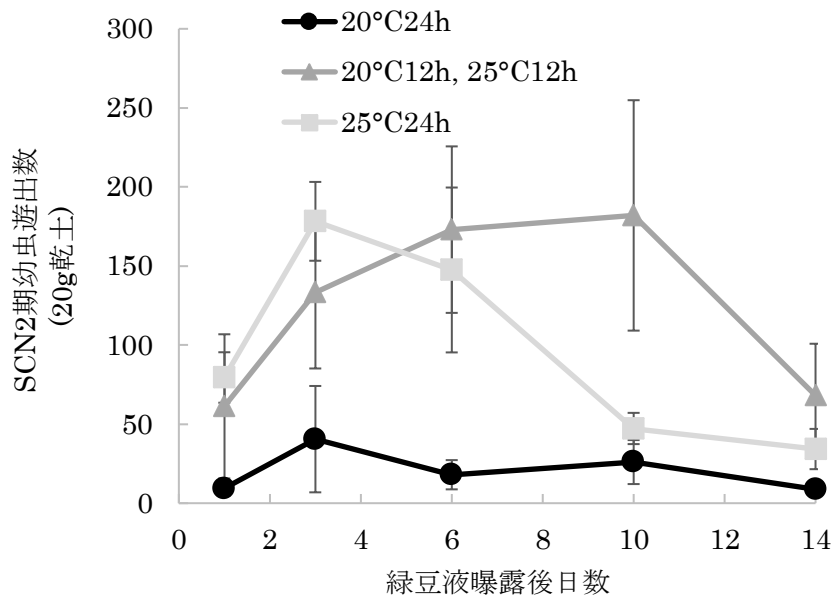


図 4-2. 緑豆液が SCN 卵に及ぼす影響 (温度条件 20、25、20-25°C 変温)

千葉県農林総合研究センターの武田藍氏実施

直径 9cm のポットに土壌を入れ、約 15 粒ほどの緑豆種子を播種し 1 週間生育した。その後、根を含んで植物体を回収し、3cm 台に細断したものをポリ容器にて入れ、500ml と純水とともに 80rpm で 6 時間振とうした。振とう液を 0.2 $\mu$ m フィルターでろ過し、そのろ過された緑豆液 30ml をポット内に入れた 100g 土壌 (SCN 発生土壌) に添加した。ラップをし、20°C 一定、25°C 一定、20°C12h と 25°C12h の繰り返し条件で静置し、緑豆液添加 1、3、6、10、14 日後に土壌を採取し、ベルマン法にて SCN2 期幼虫を分離、計数した。各温度条件を 4 連で行った。

緑豆液添加直後 (1 日) の各温度での SCN2 期幼虫数は 20°C で 9 頭、20-25°C 変温で 61 頭、25°C で 80 頭であった (3 連の平均頭数、20g 土壌あたり)。25°C は緑豆液添加 4 日後で最大となり 80 頭、20-25°C 変温は緑豆液添加 10 日後で最大となり 182 頭であった。20°C はほぼ横ばいで、最大遊出数は緑豆液添加 3 日後の 41 頭であった。

## 第2節 材料および方法

### 【対象圃場】

埼玉県：第2章と同様、三郷市のハウスAとBをお借りし試験を行った。

神奈川県：三浦市にあるエダマメ圃場（露地）の一部お借りし試験を行った。

奈良県：宇陀市の圃場（露地）をお借りし試験を行った。

以下、各県ごとに試験処理区、行程、土壌分析方法を記載していく。

### 第1項 埼玉県

#### 【試験処理区】

##### <ハウスA> (図4-3)

- 1) 対照区（緑豆栽培および灌水を行っていない（Control : Cont））。
- 2) 緑豆区（緑豆播種直後は水やりをし、すき込み後は灌水しない処理区（Mung Bean 9kg/10a : MB9））：緑豆播種量は9kg/10a。
- 3) 緑豆 9kg/10a+灌水区（緑豆漉き込み後に灌水を行う区（Mung Bean 9kg/10a + irrigation : MB9i））：緑豆播種量は9kg/10a。
- 4) 緑豆 18kg/10a+灌水区（緑豆漉き込み後に灌水を行う区（Mung Bean 18kg/10a + irrigation : MB9i））：緑豆播種量は18kg/10a。
- 5) 緑豆 27kg/10a+灌水区（緑豆漉き込み後に灌水を行う区（Mung Bean 27kg/10a + irrigation : MB9i））：緑豆播種量は27kg/10a。

ControlおよびMB9は25m<sup>2</sup>（横5m×縦5m）。MB9i、MB18i、MB27iは65m<sup>2</sup>（横5m×縦13m）。各処理区9地点をサンプル地点とし、ControlとMB9に関して、横1、2.5、4m、縦1、2.5、4mの交点を図4-3のように地点A～Iまで設定した。MB9i、MB18i、MB27iに関しては、横1、2.5、4m、縦2、5.5、9mの交点を地点A～Iと設定した。各地点0.6m×0.6mを調査区画としてスコップにて耕起した。

##### <ハウスB> (図4-3)

- 1) 太陽熱区（太陽熱処理のみ行う区（Soil Solarization : SS））
- 2) 緑豆 9kg/10a+灌水+太陽熱区（緑豆すき込み後に太陽熱処理を加えた区（Mung Bean 9kg/10a + Soil Solarization : MB9SS））：緑豆播種量は9kg/10a。
- 3) 緑豆 18kg/10a+灌水+太陽熱区（緑豆すき込み後に太陽熱処理を加えた区（Mung Bean 18kg/10a + Soil Solarization : MB18SS））：緑豆播種量は18kg/10a。
- 4) 緑豆 27kg/10a+灌水+太陽熱区（緑豆すき込み後に太陽熱処理を加えた区（Mung Bean 27kg/10a + Soil Solarization : MB27SS））：緑豆播種量は27kg/10a。

全処理区において横5mm、縦12.5mとした。各処理区9地点をサンプル地点とし、横1、2.5、4m、縦3.5、6.5、9.5mの交点を図4-3のようにA～Iまで設定した。各地点0.6m×0.6mを調査区画としてスコップにて耕起した。

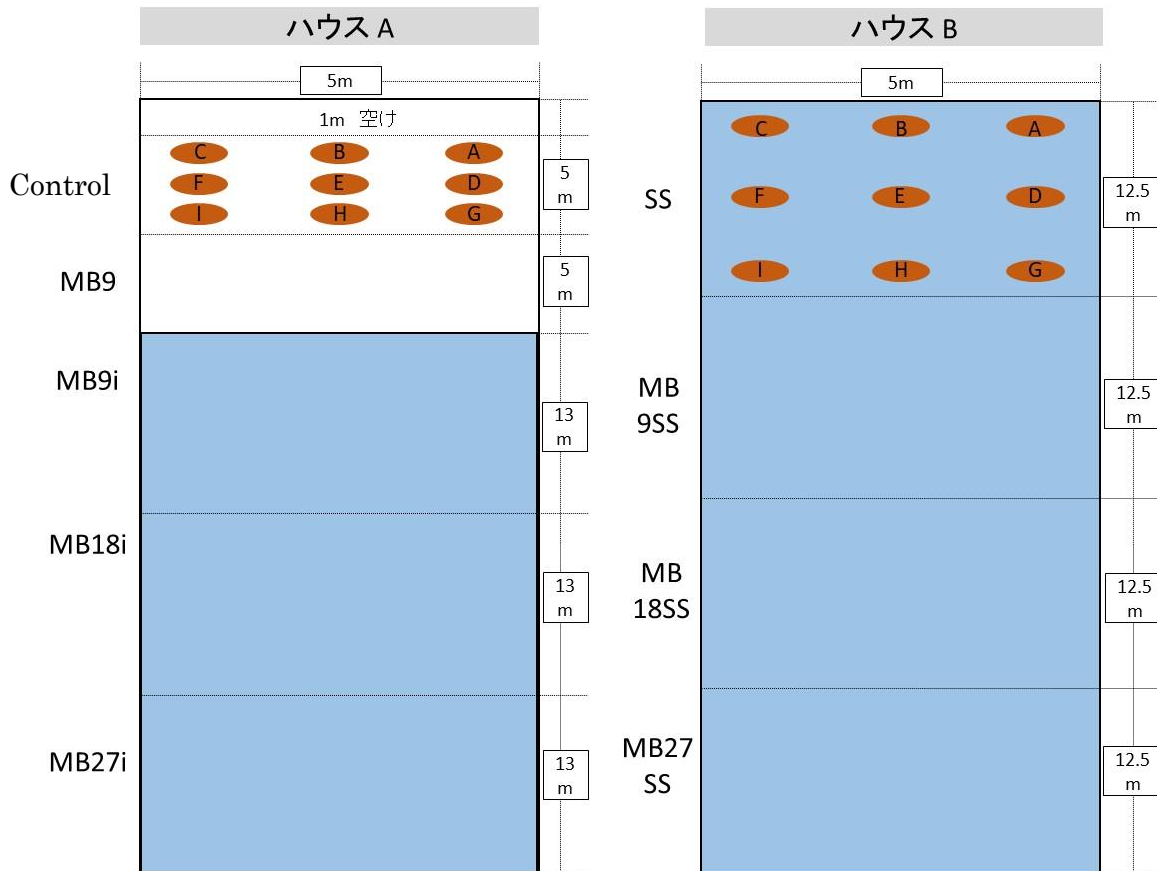


図 4-3. 2018 年埼玉県三郷市における緑豆すき込み試験の処理区（ハウス A と B）

両ハウス（A と B）の大きさは、横 5m、縦 50m である。以下、MB は緑豆（Mung Bean）、SS は太陽熱処理（Soil Solarization）、i は灌水（irrigation）を意味する。

ハウス A の処理区は、対照区（非緑豆区）；Control、緑豆 9kg/10a 播種区（すき込み後非灌水）；MB9、緑豆 9kg/10a 播種区（すき込み後灌水区）；MB9i、緑豆 18kg/10a 播種区（すき込み後灌水区）；MB18i、緑豆 27kg/10a 播種区（すき込み後灌水区）；MB27 とした。Control と MB9 は縦幅 5m、MB9i、MB18i、MB27i は 13m と設定した。サンプリング地点は A～I の 9 地点設け、Control と MB9 においては縦横幅それぞれ 5m の内、1m、2.5m、4m 位置の交点を調査地点とし、MB9i、MB18i、MB27i においては横幅 5m の内、1m、2.5m、4m 位置と、縦幅 13m の内、3m、6.5m、10m 位置の交点を調査地点とした。

ハウス B の処理区は、太陽熱処理のみ区；SS、緑豆 9kg/10a 播種＋太陽熱処理区；MB9SS、緑豆 18kg/10a 播種＋太陽熱処理区；MB18SS、緑豆 27kg/10a 播種＋太陽熱処理区；MB27SS とし、各処理区の縦幅を 12.5m と設定した。ハウス A 同様サンプリング地点は A～I の 9 地点設け、横幅 5m の内、1m、2.5m、4m 位置と、縦幅 12.5m の内、3.5m、6.5m、9.5m 位置の交点を調査地点とした。

【試験行程（時間経過含む）】以下は2018年に行ったものである。

<ハウスA>

- 7月6日：トラクターで耕耘後、更にスコップで深さ20cmまで各地点を耕起した。線虫スコップを用いて、各地点A~Iから5点、深さ0~15cmまでの土壌を採取した。採取した土壌を袋内でよく混和した。その後、緑豆を播種し、レーキ掛けをした。灌水チューブを引き、Control以外を灌水した（灌水量は約20L/m<sup>2</sup>）。2017年同様に、MB9とMB9iに対し、DECAGONの水分センサー（5TM）を深さ10-15cmのところに設置した。
- 7月7日：更に灌水した（20L/m<sup>2</sup>）。
- 7月8日：更に灌水した（20L/m<sup>2</sup>）。
- 7月9日：更に灌水した（20L/m<sup>2</sup>）。
- 7月10日：更に灌水した（10L/m<sup>2</sup>）。
- 7月25日：緑豆植物体の生育を調査するため、各地点（0.36m<sup>2</sup>）から緑豆本数と地上部生重量を測定した。トラクターで緑豆植物体をすき込んだ後、袋を用意し、A、B、Cそれぞれから深さ15cmの土壌を5点取り、ひとまとめにした（サンプルA-C）。これをD~F、G~Iに対しても行い、各処理区3サンプル作成した（すき込み0日目）。灌水チューブを引き、灌水区（MB9i、MB18i、MB27i）に対して灌水した（灌水量は40L/m<sup>2</sup>）。
- 7月30日：7月25日と同様に土壌を採取した（すき込み4日目）。
- 8月3日：7月25日と同様に土壌を採取した（すき込み8日目）。
- 8月25日：各処理区の各地点より土壌を採取した（すき込み30日目）。
- 灌水に関して：灌水は灌水チューブを使用し、灌水量は蛇口と灌水チューブの間に水量メーターをつなぎ合わせ測定した。

<ハウスB>

- 7月16日：トラクターで耕耘後、更にスコップで深さ20cmまで各地点を耕起した。線虫スコップを用いて、各地点A~Iから5点、深さ0~15cmまでの土壌を線虫スコップを用いて採取した。採取した土壌を袋内でよく混和した。その後、緑豆を播種し、レーキ掛けをした。灌水チューブを引きハウスBは圃場全面に灌水した（灌水量は約50L/m<sup>2</sup>）。
- 8月3日：緑豆植物体の生育を調査するため、各地点（0.36m<sup>2</sup>）から緑豆本数と地上部生重量を測定した。トラクターで緑豆植物体をすき込んだ後、灌水チューブを引き、灌水区（MB9i、MB18i、MB27i）に対して灌水した（灌水量は40L/m<sup>2</sup>）。灌水後、半透明のビニールシートを太陽熱区に広げた。
- 9月11日：スコップで深さ20cmまで各地点を耕起した。線虫スコップを用いて、各地点A~Iから5点、深さ0~15cmまでの土壌に対し線虫スコップを用いて採取し



た。採取した土壌を袋内でよく混和した。

#### 【採取土壌の調査方法】

##### ・ベルマン法

ハウス A に関しては、7 月 25 日（緑豆すき込み 0 日目）、7 月 30 日（緑豆すき込み 4 日目）、8 月 3 日（緑豆すき込み 8 日目）の土壌を 2 連にてベルマン法に供試した。ハウス B に関しては、ベルマン法は行っていない。

##### ・DNA 抽出およびリアルタイム PCR

リアルタイム PCR に供試した土壌は、ハウス A と B ともに播種前とすき込み後約 1 か月の土壌である。DNA 抽出方法およびリアルタイム PCR の方法および検量線は第 2 章の第 2 節と同様である。

#### 【土壌水分・地温測定】

灌水の有無が土壌水分にどのように影響するかを調べるために、ハウス A の MB9 と MB9i、そしてハウス B の縦 25m、横 4.5m の位置に DECAGON の水分・地温センサー (5TM) を深さ 10~15cm に挿し、圃場の値を測定した。また、ハウス B にも同様に、温度ロガー (UIZ3633、日置電機(株)) に接続したシース型の温度センサー ((株) ウイジン) を挿し地温を測定した。

## 第 2 項 神奈川県

#### 【試験処理区】

三浦市のエダマメ栽培歴のある 5 つの圃場を緑豆すき込みの実証試験に用いた。処理区に関しては 5 つ全て全面で、緑豆を播種・すき込み (9kg/10a) を行った (圃場の面積等は聞き取り後記載予定)。ただし、圃場 5 番に関しては初期 (緑豆播種前) の SCN 密度が圃場 3 点からの平均で 27 頭/20g 土壌と、Ito ら (2017) によって示された 10% の収量減を引き起こす密度 (81 頭/20g 土壌) を下回ったため、本稿では扱わない。

#### 【試験行程 (時間経過含む)】

緑豆播種、緑豆すき込み、および本試験間での土壌採取の日にちを表 4-1 に記載した。

表 4-1. 2018 年神奈川県三浦市における圃場試験の行程表

2018年	圃場①	圃場②	圃場③	圃場④
緑豆播種前（土壌採取日）	8月7日	8月7日	7月20日	7月20日
緑豆播種日	8月9日	8月10日	7月25日	7月25日
緑豆すき込み前（土壌採取日）	9月3日	9月3日	8月30日	8月30日
緑豆すき込み日	9月3日	9月6日	9月7日	9月7日
緑豆すき込み約14日後（土壌採取日）	9月18日	9月19日	9月19日	9月19日
緑豆栽培期間（日）	25	27	44	44

緑豆の播種は手でばら播きし、すき込みはトラクターにて行った。

#### 【土壌の採取方法と採取土壌の調査方法】

##### ・土壌の採取方法

各圃場に3つの区画（1m<sup>2</sup>、1m × 1m）を準備し、スコップにて区画内の土壌をよく混和した。各区画から5点土壌を採取し、袋内でよく混ぜた後、サンプルとした。

##### ・DNA 抽出およびリアルタイム PCR

リアルタイム PCR に供試した土壌は、表 4-1 における「緑豆播種前（土壌採取日）」、「緑豆すき込み前（土壌採取日）」、「緑豆すき込み後約 14 日（土壌採取日）」に採取したものである。DNA 抽出およびリアルタイム PCR の方法は埼玉県土壌と同様である。リアルタイム PCR 後、SCN 密度（卵換算頭数）を推定するために用いた検量線は、

$$Ct \text{ 値} = -4.8277 \times \log_{10}(\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 45.714 \quad (\text{式 3})$$

式 3 に関しては未発表である。また SCNnew プライマーを用いた検量線である。

#### 【土壌水分・地温測定】

灌水の有無が土壌水分にどのように影響するかを調べるために、各試験圃場に DECAGON の水分・地温センサー（5TM）を深さ 10～15cm に挿し、1 時間間隔で圃場の値を測定した。

### 第 3 項 奈良県

#### 【試験処理区】

奈良県のエダマメ栽培は 7 月から 10 月にかけて行われることが多く、そのため緑豆すき込みはその期間を外し、かつ一定以上の地温が確保できる 5 月～6 月に行わなければならない。本試験においても、お借りしたエダマメ栽培歴のある圃場にて、5 月～6 月にかけて緑豆すき込みを行った。処理区としては無処理区（Control、緑豆を栽培していない処理区）と緑豆＋マルチ区（MB、緑豆栽培・すき込み（9kg/10a）に加えて、緑豆すき込み後に黒色のビニールマルチを張った処理区）を設けた。

【試験行程（時間経過含む）】2018年に行ったものである。

奈良県での圃場試験では、緑豆播種が5月22日、緑豆すき込みが6月4日である。土壌採取は5月30日（緑豆すき込み5日前）、6月4日（緑豆すき込み直後）、6月26日（緑豆すき込み約3週間後）である。播種は手でばら播きし、すき込みはトラクターにて行った。

#### 【土壌の採取方法と採取土壌の調査方法】

##### ・土壌の採取方法

各圃場に3つの区画（1m<sup>2</sup>、1m × 1m）を準備し、スコップにて区画内の土壌をよく混和した。各区画から5点土壌を採取し、袋内でよく混ぜた後、サンプルとした。

##### ・DNA抽出およびリアルタイムPCR

リアルタイムPCRに供試した土壌は、採取した土壌（3日分）全てである。DNA抽出およびリアルタイムPCRの方法は埼玉県土壌と同様である。リアルタイムPCR後、SCN密度（卵換算頭数）を推定するために用いた検量線は、奈良県土壌での検量線を作成していないため、式1（埼玉県三郷土壌使用）を使用した。またSCNnewプライマーを用いた検量線である。

#### 【土壌水分・地温測定】

灌水の有無が土壌水分にどのように影響するかを調べるために、両処理区にDECAGONの水分・地温センサー（5TM）を深さ10～15cmに挿し、1時間間隔で圃場の値を測定した。

### 第3節 結果

#### 第1項 埼玉県

両ハウスにおける緑豆生育を図4-4に示した。緑豆本数に関しては、播種量依存的に有意に増加した(図4-4-1、Fisherの最小有意差法、 $p < 0.05$ )。本実験では設けた区画の面積(0.36m<sup>2</sup>)に対してばら播いたわけではなく、処理区全体に播いたため、比例関係にはならなかったが、結果として播種方法としては問題なかった。緑豆地上部重量に関しては、両ハウスともに9kg/10a播種区に対して、18kg/10a播種区と27kg/10a播種区でそれぞれ有意に差がみられたが、18kg/10a播種区と27kg/10a播種区間では有意な差はみられなかった(図4-4-2、Fisherの最小有意差法、 $p < 0.05$ )。

2018年に関しても、ハウスAにおいてベルマン法を用いて緑豆すき込みによるSCN孵化促進効果を調べた。結果としては図4-5にあるように、緑豆すき込み4日後にSCNの孵化が最大となり、8日後の段階で緑豆をすき込み、かつ灌水をした処理区でも2期幼虫が全く遊出してこなかった。緑豆すき込み4日後の各処理区の遊出数は乾土20gあたり、Controlで1頭、MB9で0頭、MB9iで78頭、MB18iで191頭、MB27iで204頭であった。すき込み直前(0日目)からすき込み4日目の間で、どの程度SCN卵から2期幼虫が孵化したかを示すデータを、図4-6に示した。結果として、ControlとMB9では2期幼虫は増加せず、MB9iで54頭、MB18iで114頭、MB27iで180頭の遊出数の増加が確認された。ControlとMB9に対して、MB9iは有意差はないものの、MB18iとMB27iは有意に増加した(Fisherの最小有意差法、 $p < 0.05$ )。MB9に対してのMB9iでは遊出数の増加値としては違いがあるものの、有意な差は示されなかった(Fisherの最小有意差法、 $p = 0.19$ )。MB9iとMB18i、MB18iとMB27iそれぞれの間で有意な差はみられなかったが(Fisherの最小有意差法、MB9iとMB18i間： $p = 0.15$ 、MB18iとMB27i間： $p = 0.12$ )、播種量依存的な孵化の促進が傾向としてみられた。また、自活性線虫の遊出数も計測した。その結果は図4-7に示すように、Controlでは減少した一方で、緑豆の播種量が多い処理区ほど自活性線虫の数が増加した。

次に、ハウスAにおける緑豆の播種前とすき込み後30日目から採取した土壌中のSCN密度(卵換算頭数/20g乾土)を示す。図4-8-1には、リアルタイムPCRにて出されたCt値と式1を用いて算出したSCN密度を、各処理区の区画ごとに示した。使用したハウスは縦に50mあり、入口手前から処理区をControl、MB9、MB9i、MB18i、MB27iの順で設定した。播種前の密度分布として、ハウス奥(MB27i側)で10万頭を超える高密度となっていた。同じ処理区内でも播種前の初期密度が大きく異なっていたため、図4-8-2に、各区画で播種前の初期密度を100としたとき、すき込み後30日目の土壌にどの程度SCNが残っているかを、残存率として示した。結果として各処理区の残存率(9区画の平均)、Controlで44%、MB9で10%、MB9iで15%、MB18iで9%、MB27iで19%となった。Controlに対して緑豆をすき込んだ4処理区は有意にSCN密度が減少していたが(Fisherの最小有意差法、 $p < 0.05$ )、緑豆をすき込んだ4処理区間では有意な差は示されなかった。図4-9

にはハウス A の MB9 と MB9i における土壌水分 (図 4-9-1) と地温 (図 4-9-2) の変化を示した。測定位置は深さ 10~15cm とした。図 4-9-1 に示されている通り、播種直後は発芽のために灌水していることもあり、土壌中の水分は高いが、緑豆すき込み直前まで徐々に減少した。緑豆すき込み後は灌水区の MB9i で  $0.392 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$  (pF2.0 程度) まで上昇しその後減少傾向となった。非灌水区の MB9 ではすき込み後は変化がなかったが、7月28日の降雨 (48mm/day) によって、ハウス内に水が浸透した結果、pF2.76 を下回る高水分条件となった。地温は、降雨のタイミング (7月28日と8月8日) でやや低いが、7月から8月を通して、日中は  $30^\circ\text{C}$  以上、夜間は  $25^\circ\text{C}$  前後となっていた。また、表 4-2 には、すき込み後 4 日間と 30 日間それぞれの平均土壌水分、平均地温、平均土壌水分の値から算出した換算 pF 値を示した。土壌水分に関しては、すき込み後 4 日間は、MB9 で  $0.206 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$ 、MB9i で  $0.338 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$  と、灌水の有無で大きく値が異なり、地温も MB9 の  $28.6^\circ\text{C}$  に対して MB9i では  $26.1^\circ\text{C}$  と  $2^\circ\text{C}$  ほど低くなった。すき込み後 30 日間では土壌水分にはそこまで差がないものの (MB9 で  $0.237 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$ 、MB9i で  $0.246 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$ )、地温は MB9 の  $30.5^\circ\text{C}$  に対して MB9i では  $28.5^\circ\text{C}$  と、そのまま  $2^\circ\text{C}$  低くなった。

ハウス B について、図 4-10 に播種前とすき込み後 38 日目の各区画の SCN 密度を示した。ハウス A と同様に処理区間および同処理区内でも密度が大きくばらついていたが、すき込み後 38 日目の方が密度が高い傾向にあった。図 4-11 にはハウス B における土壌水分 (図 4-11-1) と地温 (図 4-11-2) の変化を示した。測定位置は深さ 10~15cm とした。結果として、土壌水分は播種直後の灌水で  $0.280 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$  程度あったが、降雨のタイミングで上昇しつつも徐々に減少し、緑豆すき込み直前では  $0.184 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$  まで減少した。すき込み直後は太陽熱処理のための灌水を行ったため、 $0.487 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$  まで上昇し、その後は急激に減少し  $0.330 \text{ m}^3 \text{ water m}^{-3}$  程度を推移した。地温は播種からすき込み直前まで  $30^\circ\text{C}$  前後を推移していたが、すき込み後の灌水およびビニールマルチ被覆によって、日中は高い時で  $48^\circ\text{C}$ 、夜間は  $30^\circ\text{C}$  まで下がるなど、一日の中でもかなりばらつきが大きかった。表 4-3 には別の温度ロガーおよびセンサーを用いて測定した地温の平均値を示した。なお、測定開始日は 8 月 16 日からである。ハウス手前の 6.5m 地点では  $34^\circ\text{C}$  程度であり、16m 地点および 34.5m 地点では、深さ 10cm で  $36.7^\circ\text{C}$ 、深さ 15cm で  $36.0^\circ\text{C}$  と  $36.3^\circ\text{C}$  であった。

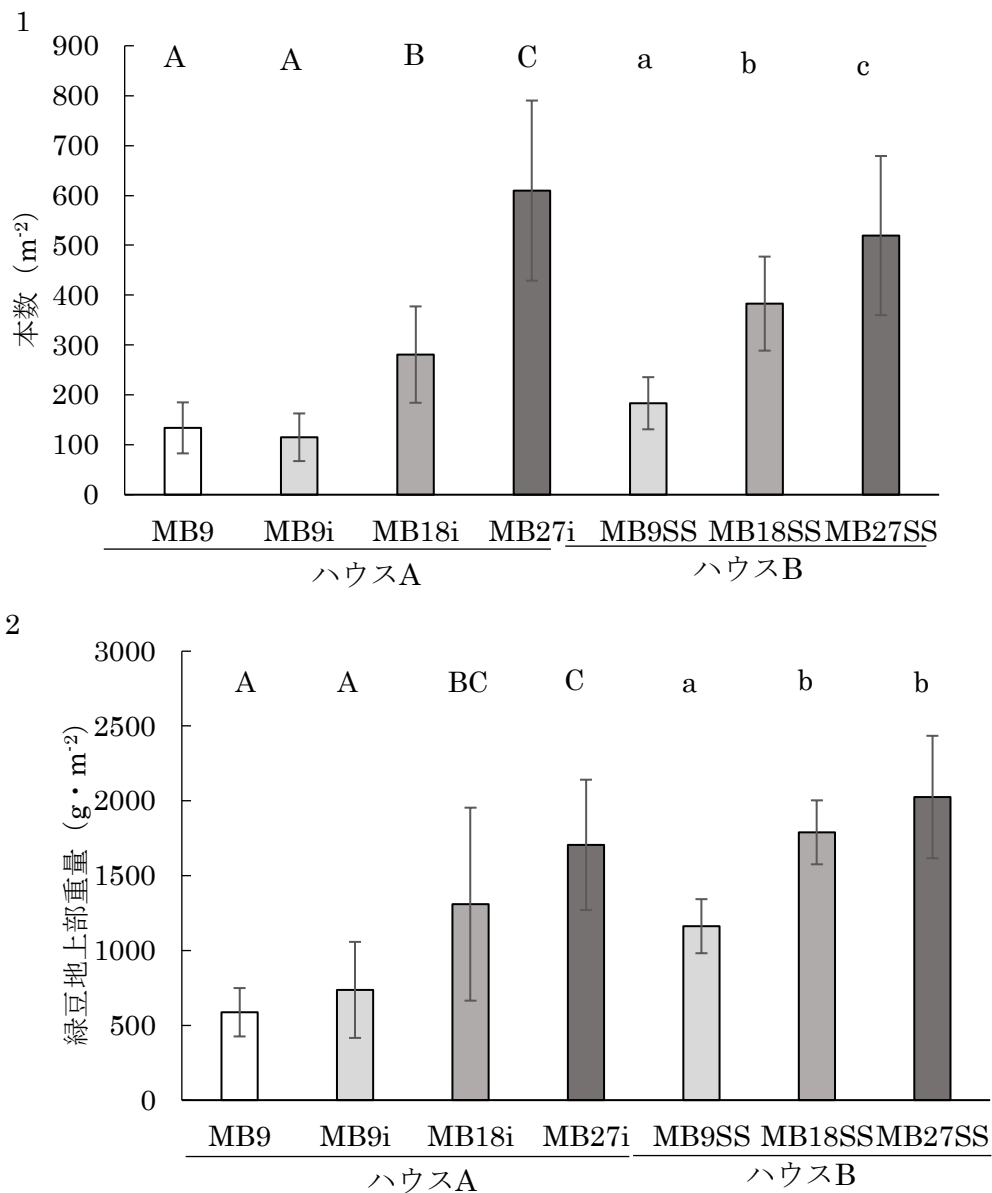


図 4-4. 上図 (4-4-1) 緑豆本数、下図 (4-4-2) 緑豆地上部重量

MB は緑豆 (Mung Bean) を意味し、i はすき込み後の灌水 (irrigation) を意味し、SS は太陽熱処理 (Soil Solarization) を意味する。MB 横の数字は播種量 (kg/10a) を示す。重量は地上部のみである。

異なる英字は有意確率 5% で有意差あり (Fisher の最小有意差法)。英字の大小で別々の検定。

両ハウス、設定した区画 0.36m<sup>2</sup> (0.6m×0.6m) 内の本数と地上部重量を測定し、1m<sup>2</sup> に換算した値をグラフ化した。

重量は地上部のみである。

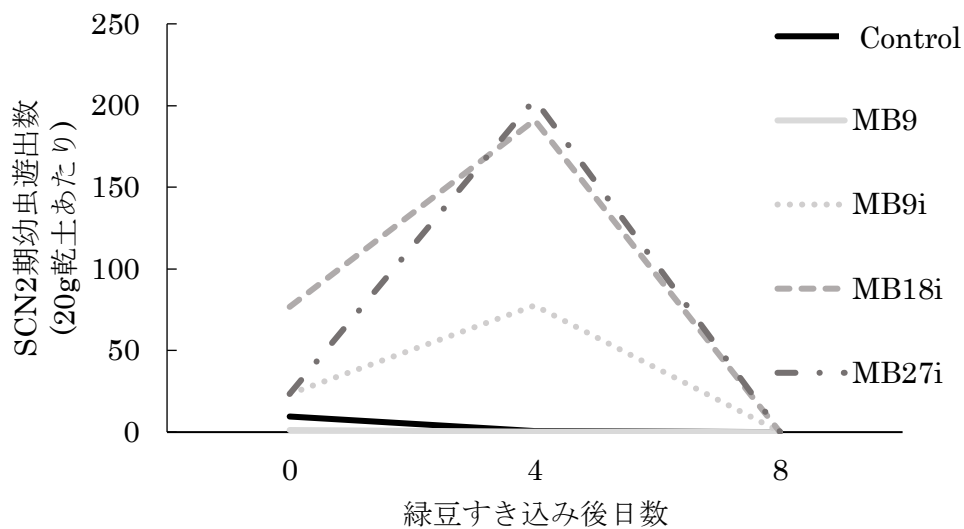


図 4-5. 緑豆すき込み後の SCN2 期幼虫数の変化 (ハウス A)

対照区 (非緑豆区) ; Control、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水区) ; MB9、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB9i、緑豆 18kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB18i、緑豆 27kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB27i。土壤の採取は緑豆すき込み後 0、4、8 日に行い、採取方法は、各処理区の A、B、C から線虫スコップにて深さ 15cm まで土壤を採取し、それをひとまとめにした。これを D~F、G~I でも行い、各処理区 3 つのサンプルを用意した。ベルマン法を用いて線虫を分離し、そのうちの SCN2 期幼虫数を計測した。ベルマン法は 2 連で行った。図に示したグラフは、各処理区 3 つのサンプルの平均値で示した。

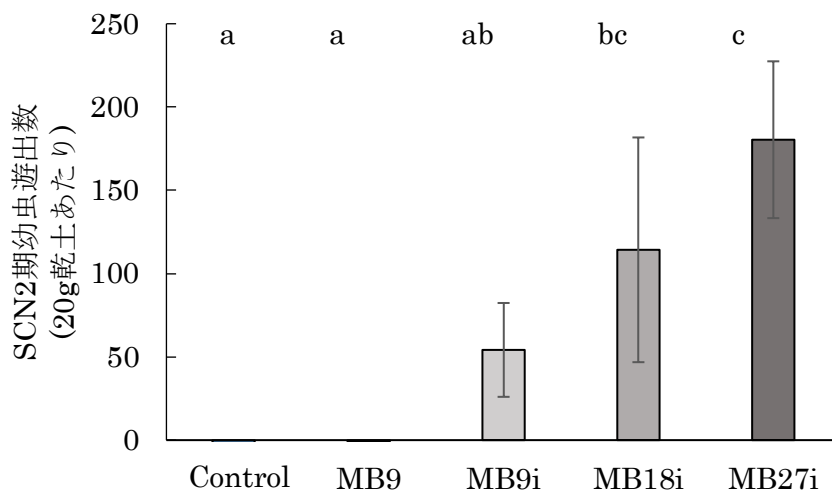


図 4-6. SCN2 期幼虫の増加数 (ハウス A)

対照区 (非緑豆区) ; Control、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水区) ; MB9、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB9i、緑豆 18kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB18i、緑豆 27kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB27i。土壤の採取は緑豆すき込み後 0、4、8 日に行い、採取方法は、各処理区の A、B、C から線虫スコップにて深さ 15cm まで土壤を採取し、それをひとまとめにした。これを D~F、G~I でも行い、各処理区 3 つのサンプルを用意した。ベルマン法を用いて線虫を分離し、そのうちの SCN2 期幼虫数を計測した。ベルマン法は 2 連で行った。グラフの値の算出方法は『「すき込み後 4 日の遊出数」 - 「すき込み後 0 日の遊出数」』である。異なる英字は有意確率 5% で有意差あり (Fisher の最小有意差法)。



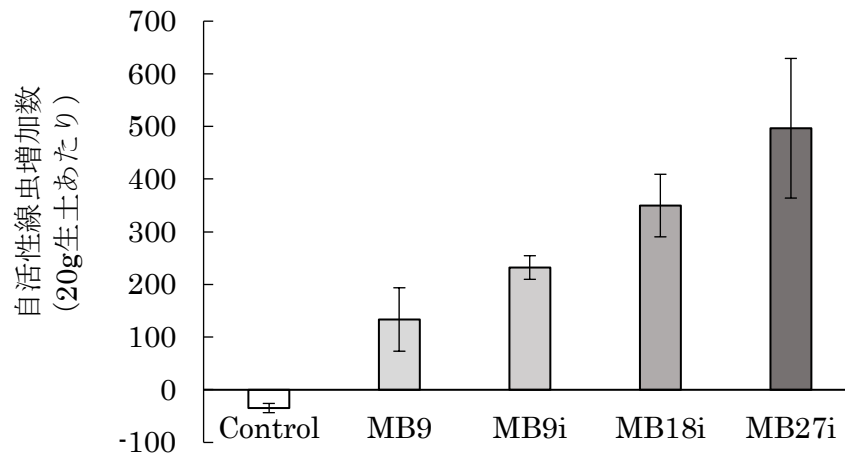


図 4-7. 緑豆すき込み後の自活性線虫の増加数 (ハウス A)

対照区 (非緑豆区) ; Control、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水) ; MB9、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB9i、緑豆 18kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB18i、緑豆 27kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB27i。土壌の採取は緑豆すき込み後 0、4、8 日に行い、採取方法は、各処理区の A、B、C から線虫スコップにて深さ 15cm まで土壌を採取し、それをひとまとめにした。これを D~F、G~I でも行い、各処理区 3 つのサンプルを用意した。ベルマン法を用いて線虫を分離した。本データは SCN2 期幼虫を計測する際に、同じタイミングで自活性線虫の総数も計測したグラフである。ベルマン法は 2 連で行った。グラフの値の算出方法は『「すき込み後 8 日の遊出数」 - 「すき込み後 0 日の遊出数」』である。

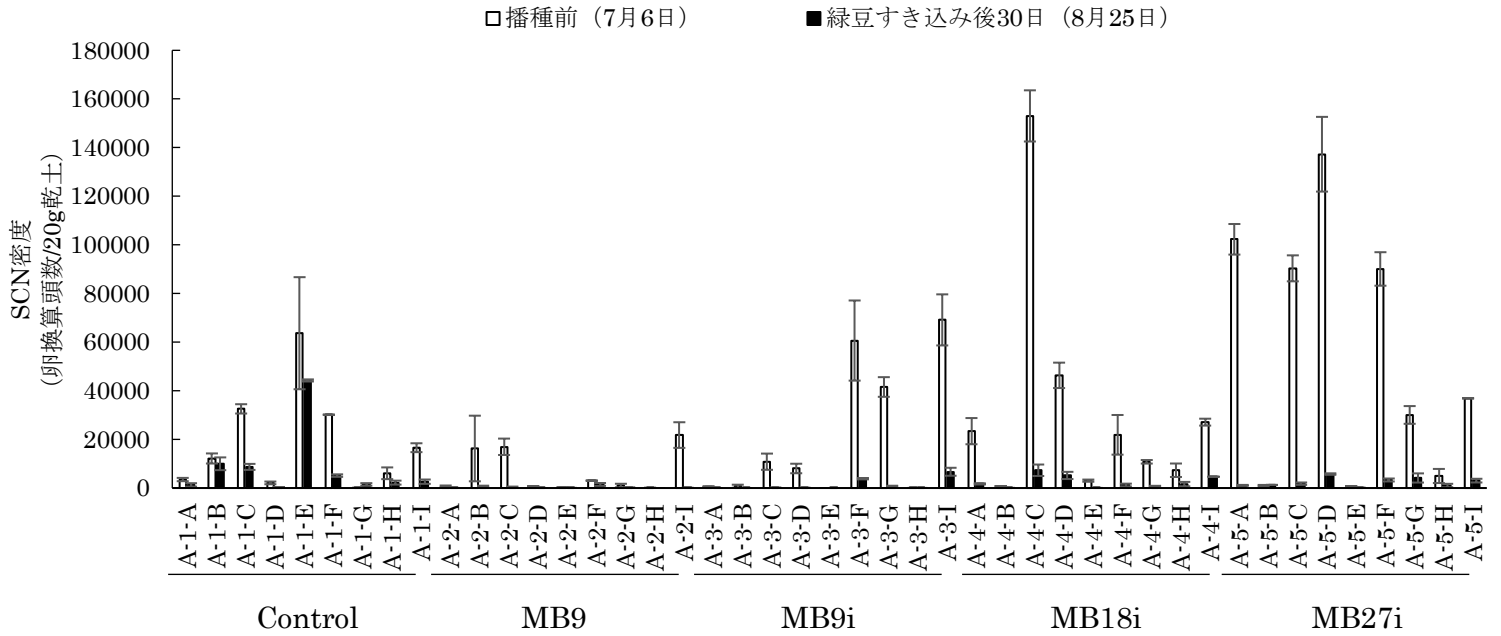


図 4-8-1. SCN に対する緑豆すき込みの影響① (ハウス A)

グラフは緑豆播種前 (白抜き) とすき込み後 30 日 (黒塗りつぶし) それぞれの土壤に存在する SCN の密度を、卵換算頭数 (頭/20g 土壤) として表している。対照区 (非緑豆区); Control、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水区); MB9、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区); MB9i、緑豆 18kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区); MB18i、緑豆 27kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区); MB27i。

土壤の採取は播種前 (7 月 6 日) および緑豆すき込み後 30 日 (8 月 25 日) に行った。線虫スコープを使用し、各処理区の各区画より 5 点から採取した土壤をよく混和後、風乾し、2mm のふるいに通した。この土壤を 60°C で 24 時間乾燥し、DNA 抽出およびリアルタイム PCR に供試した。リアルタイム PCR にて表された Ct 値と、式 1 である「 $Ct \text{ 値} = -2.2813 \times \log_{10}(\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 37.04$ 」を用いて、密度を算出した。リアルタイムは各区画 2 連で行った。

2

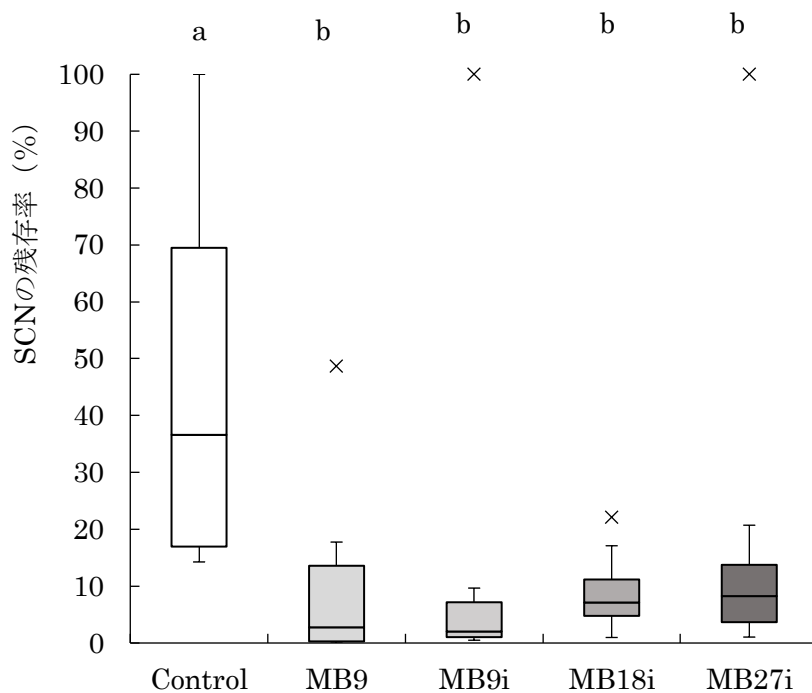


図 4-8-2 : SCN に対する緑豆すき込みの影響② (ハウス A)

本箱ひげ図は、緑豆播種前土壌に対して、緑豆すき込み後 30 日段階でどの程度まだ SCN が土壌に残っているかを、処理区ごとで示したものである。残存率とは「すき込み後 30 日の SCN 密度 ÷ 播種前の SCN 密度 × 100」で示したものである。ただし、100%を超えた場合（播種前よりすき込み後 30 日の方が密度が増えた場合）は 100 とした。

対照区 (非緑豆区) ; Control、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後非灌水区) ; MB9、緑豆 9kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB9i、緑豆 18kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB18i、緑豆 27kg/10a 播種区 (すき込み後灌水区) ; MB27i。各処理区 9 地点分の残存率を用いて箱ひげ図を作成した。

×は外れ値、中央線は中央値、異なる英字は有意確率 5%で有意差あり (Fisher の最小有意差法)。

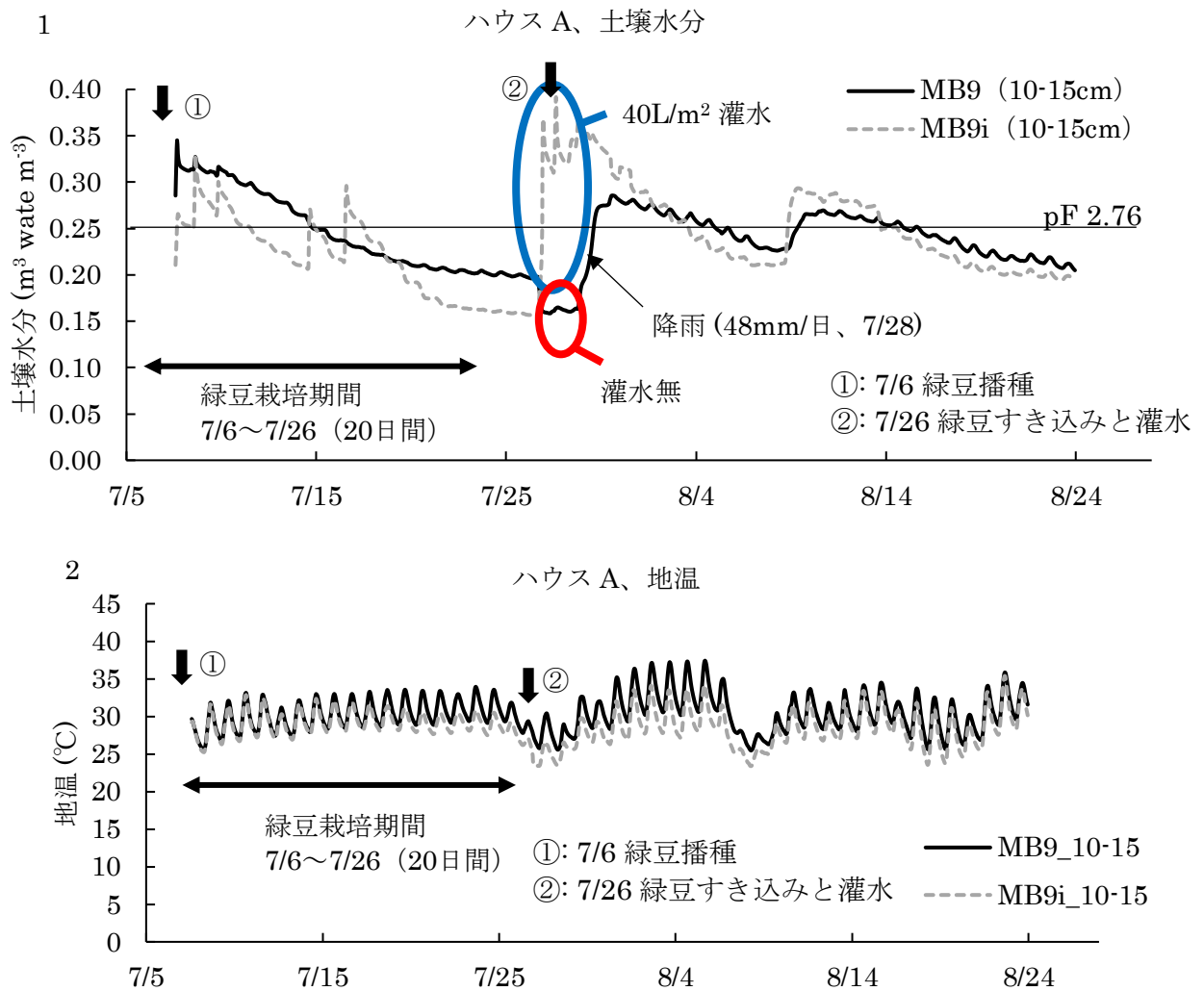


図 4-9. ハウス A の地温と土壌水分の変化 (2018 年、4-9-1: 土壌水分、4-9-2: 地温)

土壌水分および地温は市販のセンサーである 5TM (DECAGON) を用いて 1 時間ごとに測定した。測定処理区は MB9 (緑豆すき込み後非灌水区、黒の実線) と MB9i (緑豆すき込み後灌水区、灰色の破線)。測定深さは 10~15cm。センサーを挿し込んだ位置は、横 5m に対して 1、2.5、4m の 3 点で、その 3 点の平均値をグラフ化したものである。7 月 6 日に緑豆播種し、その後 7 月 26 日に緑豆をトラクターにてすき込んだ。MB9i に関してはすき込み後 40L/m<sup>2</sup> 灌水した。7 月 28 日には 1 日あたり 48mm の大雨を観測した。4-9-1 の土壌水分のグラフにおいて示した pH2.76 の横棒線は、第 3 章にて SCN 卵の孵化が促進されると示唆された土壌水分値である。

表 4-2. MB9 と MB9i における緑豆すき込み後の土壌水分と地温の平均値 (ハウス A)

	すき込み後4日間		
	平均水分 (m <sup>3</sup> water m <sup>-3</sup> )	平均地温 (°C)	換算pF値
MB9	0.206	28.6	>3
MB9i	0.338	26.1	2.25
	すき込み後30日間		
	平均水分 (m <sup>3</sup> water m <sup>-3</sup> )	平均地温 (°C)	換算pF値
MB9	0.237	30.5	2.92
MB9i	0.246	28.5	2.85

すき込み後 4 日間と 30 日間のセンサー値 (水分と地温) の平均値を表している。

換算 pF 値は  $y = 62.941x + 22.409$  ( $x =$  水分センサー値 (m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>)、 $y = 100g$  乾土当たりの水分含量、未発表) と第 3 章の図 3-1 を利用して算出したものである。

測定処理区は MB9 (緑豆すき込み後非灌水区) と MB9i (緑豆すき込み後灌水区)。

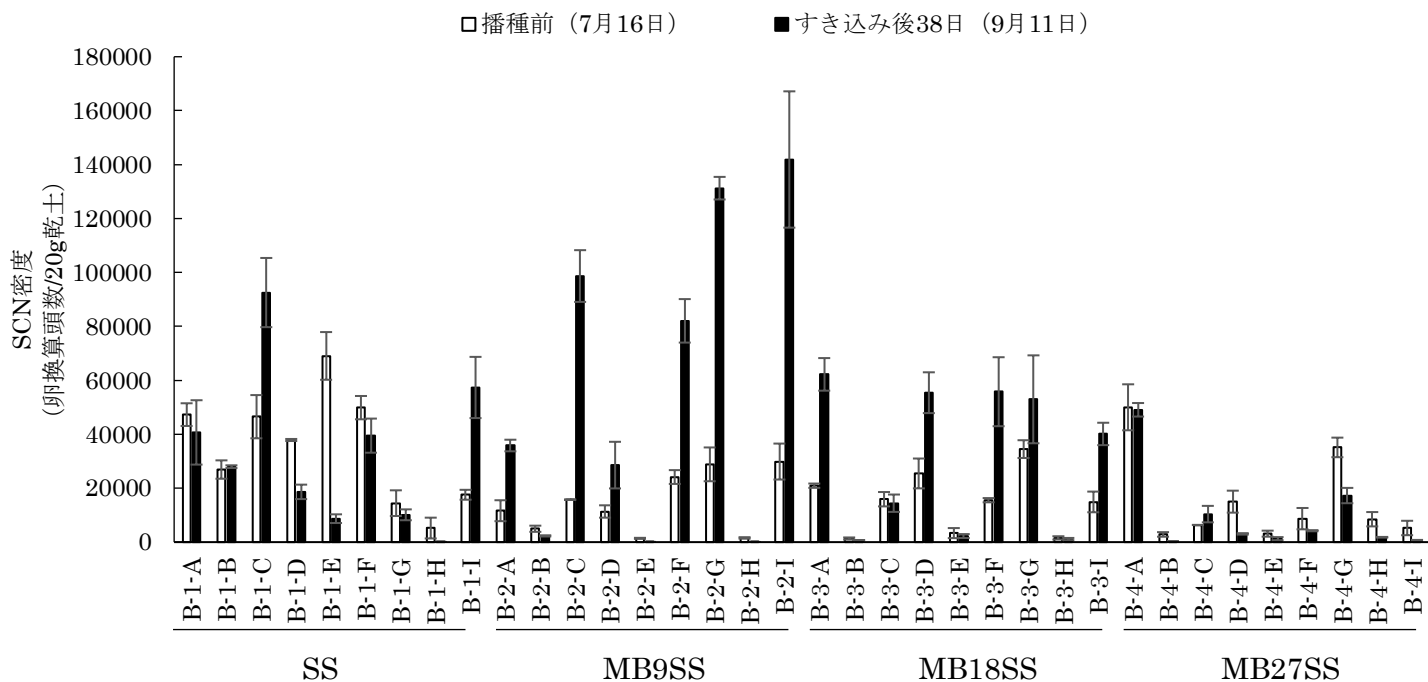


図 4-10. SCN に対する緑豆すき込みの影響 (ハウス B)

グラフは緑豆播種前 (白抜き) とすき込み後 30 日 (黒塗りつぶし) それぞれの土壌に存在する SCN の密度を、卵換算頭数 (頭/20g 土壌) として表している。処理区は、太陽熱処理のみ区 ; SS、緑豆 9kg/10a 播種 + 太陽熱処理区 ; MB9SS、緑豆 18kg/10a 播種 + 太陽熱処理区 ; MB18SS、緑豆 27kg/10a 播種 + 太陽熱処理区 ; MB27SS である。

土壌の採取は播種前 (7 月 16 日) および緑豆すき込み後 38 日 (9 月 11 日) に行った。線虫スコップを使用し、各処理区の各区画より 5 点から採取した土壌をよく混和後、風乾し、2mm のふるいに通した。この土壌を 60°C で 24 時間乾燥し、DNA 抽出およびリアルタイム PCR に供試した。リアルタイム PCR にて表された Ct 値と、式 1 である「 $Ct \text{ 値} = -2.2813 \times \log_{10}(\text{SCN 密度 (卵} / 20\text{g 乾土)}) + 37.04$ 」を用いて、密度を算出した。

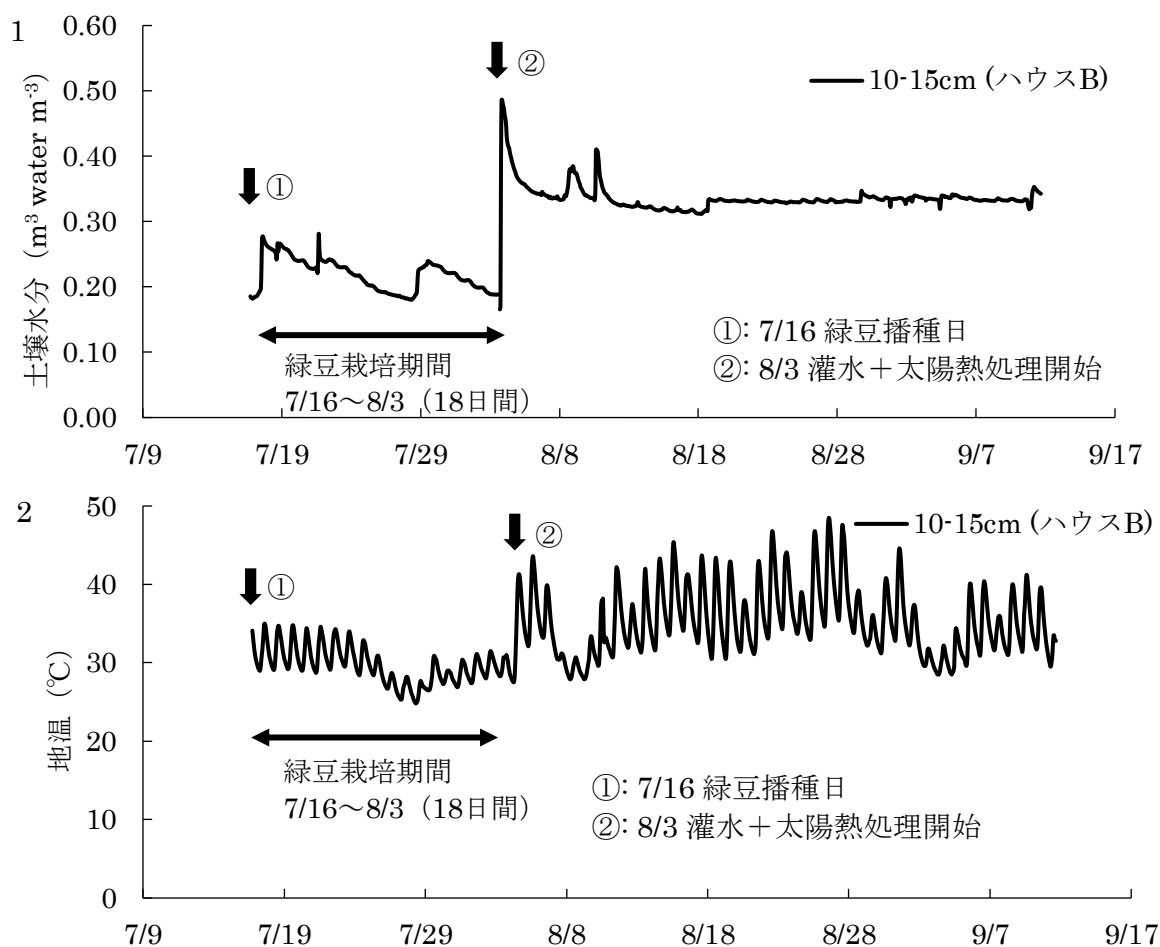


図 4-11. ハウス B の地温と土壌水分の変化 (2018 年、4-11-1: 土壌水分、4-11-2: 地温)  
 土壌水分および地温は市販のセンサーである 5TM (DECAGON) を用いて 1 時間ごとに測定した。測定位置はハウス縦 50m に対して 25m のところ、横はハウスの西側から 0.5m のところとした。測定深さは 10~15cm とした。  
 7 月 16 日の緑豆播種時に灌水 (50L/m<sup>2</sup>) をし、その後 8 月 3 日に緑豆をトラクターにてすき込んだ後も全面灌水 (40L/m<sup>2</sup>) した。すき込み後の灌水前にビニールマルチを全面に敷き、太陽熱処理をできるようにした。

表 4-3. 太陽熱処理後の地温の平均 (ハウス B、測定期間は 8 月 16 日から 9 月 11 日)

ハウス縦、横 深さ	6.5m, 1m		16m, 1m		34.5m, 2m	
	10cm	15cm	10cm	15cm	10cm	15cm
平均地温	34.3	34.0	36.7	36.0	36.7	36.3

ハウス B には 3 か所の深さ 10cm と 15cm に温度ロガー (UIZ3633、日置電機(株)) に接続したシース型の温度センサーを設置し、太陽熱処理によって地温が上昇しているかを確認した。

## 第2項 神奈川県

神奈川県三浦市のエダマメ圃場における、緑豆すき込みによるSCN密度への影響は表4-4に示した。圃場③\_1を除いた地点で、SCN密度が大きく減少し、各圃場のSCN残存率は平均で、圃場①で18%、圃場②で23%、圃場③で54%、圃場④で23%であった。

図4-12にはハウスBにおける土壌水分(図4-12-1)と地温(図4-12-2)の変化を示した。土壌水分および地温の測定は8月10日より行っており、緑豆すき込み後14日目の土壌採取までの期間とした。緑豆栽培期間の内、測定を開始した8月10日から緑豆すき込み前日までの土壌水分および地温の平均は、圃場①で0.154 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> (pF3.0以上)の27.9°C、圃場②で0.253 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> (pF2.3)の27.6°C、圃場③で0.206 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> (pF2.4)の26.8°C、圃場④で0.270 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> (pF2.3)の26.7°Cであった(y = 92.49x + 26.038 (x = 水分センサー、y = 100g 乾土当たりの水分含量)より算出)。また、緑豆すき込み日からすき込み後約14日目の土壌採取日の間における土壌水分と地温の平均はそれぞれ、圃場①で0.193 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>(pF2.6)の25.1°C、圃場②で0.328 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>(pF2.0)の24.9°C、圃場③で0.299 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> (pF2.1)の24.8°C、圃場④で0.299 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup> (pF2.1)の24.5°Cであった(y = 92.49x + 26.038 (x = 水分センサー、y = 100g 乾土当たりの水分含量)より算出)。圃場②の播種(8月10日)以降で、土壌水分の急上昇が確認される日が9日間あり、いずれのも日も降雨が1日あたり10mmを超えていた。

表4-4. 緑豆すき込みによるSCN密度の変化(2018年神奈川県)

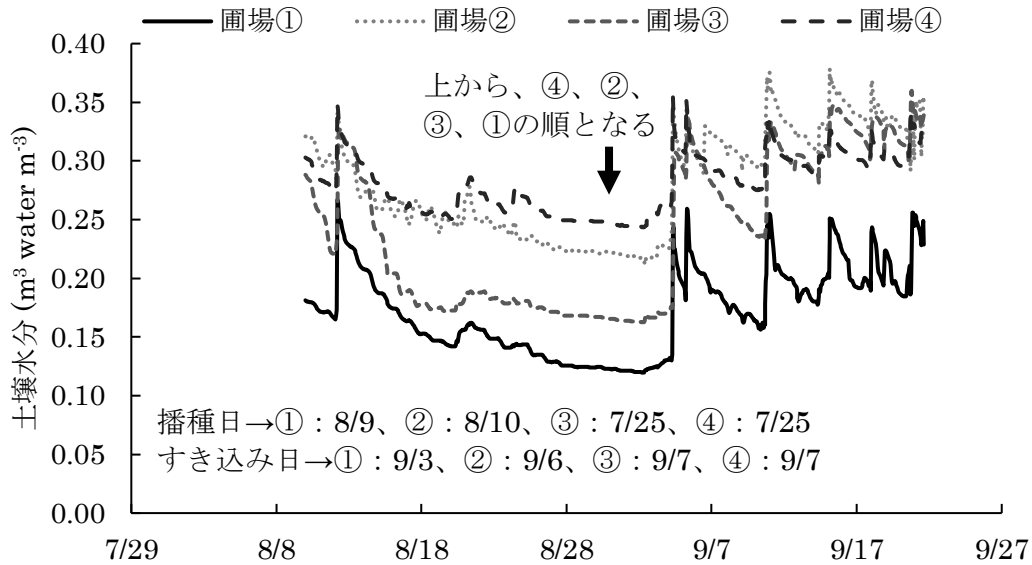
土壌採取地点	ダイズシストセンチュウ密度(卵換算頭数/20g乾土)			残存率(%)	残存率平均(%)
	播種前	すき込み前	すき込み後約2週間後		
圃場①	1	4062	2606	330	8
	2	2810	2852	451	16
	3	1748	3612	541	31
圃場②	1	5062	6337	1372	27
	2	5867	6416	497	8
	3	4152	4157	1336	32
圃場③	1	4365	10052	8793	100
	2	2756	2128	466	17
	3	15855	4813	6912	44
圃場④	1	15509	5396	3561	23
	2	18992	20791	3696	19
	3	20608	17122	5361	26

播種前、すき込み前、すき込み後約2週間の各数値はSCN密度(卵換算頭数/20g乾土)を示す。

残存率 = 「緑豆すき込み後約2週間後の密度」 ÷ 「播種前密度」 × 100 で出される、緑豆すき込み後に土壌中に残ったSCNの割合を意味したものである。圃場③\_1に関しては緑豆すき込み後約2週間後の密度が播種前よりも超えたため、本結果では100と表記した。土壌採取日は表4-1を参照。



1



2

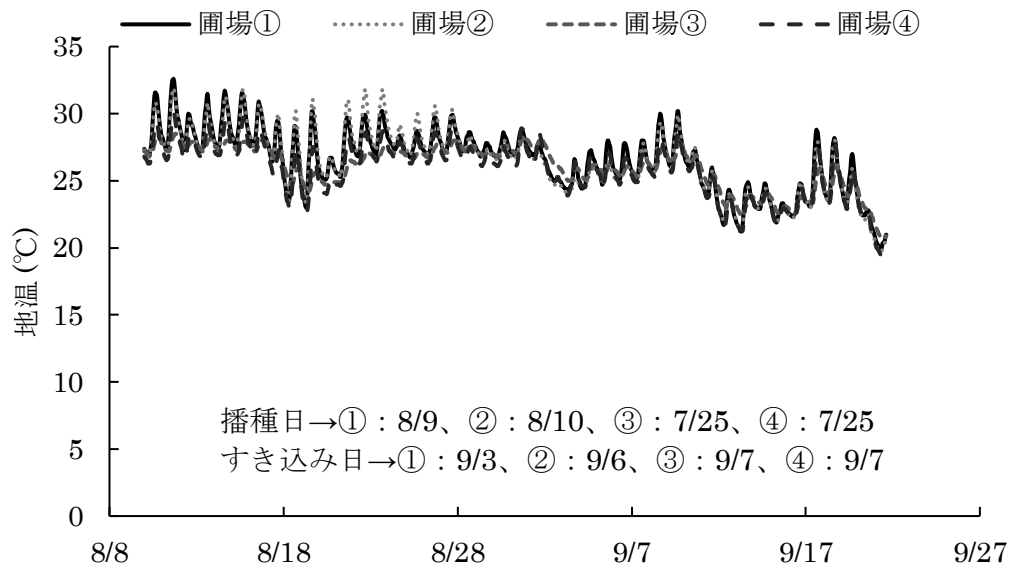


図 4-12. 神奈川県各試験圃場の地温と土壌水分の変化

(2018年、4-12-1: 土壌水分、4-12-2: 地温)

圃場①～④すべて緑豆栽培およびすき込みを行っている。

土壌水分および地温は市販のセンサーである 5TM (DECAGON) を用いて 1 時間ごとに深さ 10～15cm の位置を測定した。

緑豆すき込みは、圃場①が 9 月 3 日、圃場②が 9 月 6 日、圃場③と④が 9 月 7 日とした。緑豆の栽培期間は圃場①が 25 日間、圃場②が 27 日間、圃場③と④が 44 日間である。

### 第3項 奈良県

奈良県のエダマメ圃場における、緑豆すき込みによる SCN 密度への影響は表 4-5 に示した。無処理区 (Control) でも残存率 35%と一定の SCN 密度減がみられたが、緑豆+マルチ区 (MB) では残存率 2%と非常に高い防除効果を示し、MB の方が有意に SCN の密度を減少させた (Fisher の最小有意差法、 $p < 0.05$ )。

図 4-13 にはハウス B における土壌水分 (図 4-13-1) と地温 (図 4-13-2) の変化を示した。播種前 5 日間は  $0.3\text{m}^3 \text{ water m}^{-3}$  前後を推移し、すき込み後は Control と MB どちらも大きく減少したが、6 月 6 日の降雨 (29.5mm/day) によって大きく上昇し、その後は 10mm/day 以上の雨で再上昇するといった推移を示した。そのため、基本的に緑豆すき込み後は  $\text{pF}2.76$  である  $0.241\text{m}^3 \text{ water m}^{-3}$  より高い土壌水分となり、すき込み直後の 6 月 4 日から土壌を採取した 6 月 26 日の間の土壌水分は、Control でも  $0.313\text{m}^3 \text{ water m}^{-3}$  ( $\text{pF}2.2$ )、と高く、緑豆をすき込んだ後マルチをした MB では  $0.388\text{m}^3 \text{ water m}^{-3}$  ( $\text{pF}1.8$ ) と圃場容水量に近いレベルまで土壌水分が維持された。また、地温に関しては、測定を開始した 5 月 30 日から徐々に上昇傾向にあった。すき込み日か (6 月 4 日) ら緑豆すき込み後 22 日 (6 月 26 日) までの地温の平均は、Control で  $21.3^\circ\text{C}$ 、MB で  $23.1^\circ\text{C}$  となった。

土壌採取地点	ダイズシストセンチュウ密度 (卵換算頭数/20g乾土)			残存率 (%)	残存率平均 (%)
	緑豆すき込み 5日前 (5月30日)	すき込み時 (6月4日)	すき込み 22日後 (6月26日)		
Control	1	17258	8316	2652	15
	2	2913	3236	1158	40
	3	10891	14096	5522	51
MB	1	4352	1268	72	2
	2	5119	1048	161	3
	3	16361	4208	403	2

表 4-5. 緑豆すき込みによる SCN 密度の変化 (2018 年奈良県)

緑豆すき込み 5 日前、すき込み時、すき込み 22 日後の各数値は SCN 密度 (卵換算頭数/20g 乾土) を示す。

Control は緑豆非栽培区、MB は緑豆栽培およびすき込み後の黒マルチ被覆の区である。

残存率 = 「緑豆すき込み 22 日後の密度」 ÷ 「緑豆すき込み 5 日前」 × 100 で出される、緑豆すき込み後に土壌中に残った SCN の割合を意味したものである。

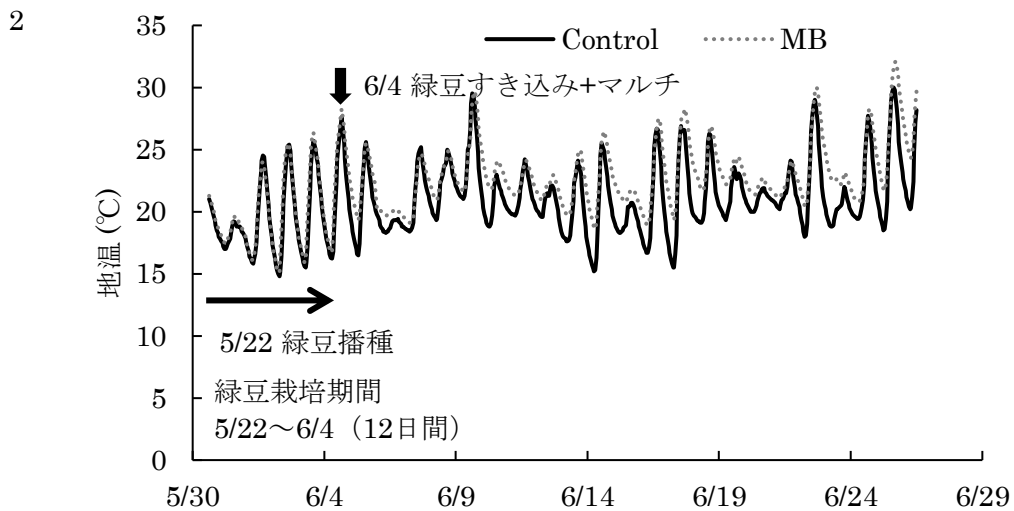
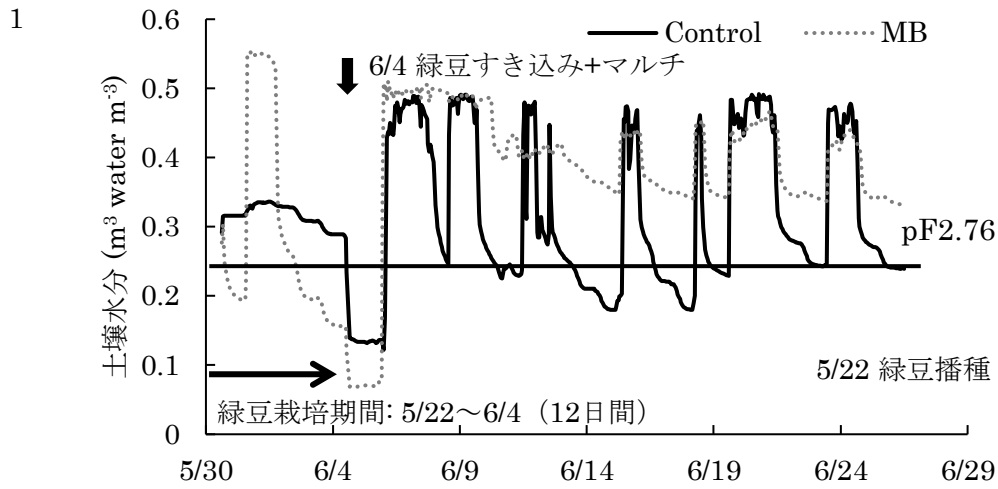


図 4-13. 奈良県における試験圃場の地温と土壌水分の変化

(2018 年、4-13-1 : 土壌水分、4-13-2 : 地温)

土壌水分および地温は市販のセンサーである 5TM (DECAGON) を用いて 1 時間ごとに深さ 10~15cm の位置を測定した。

Control は緑豆非栽培区、MB は緑豆栽培およびすき込み後の黒マルチ被覆の区である。

図 4-13-1 における pF2.8 は  $y = 67.887x + 8.2482$  ( $x =$  水分センサー値、 $y =$  100g 乾土当たりの水分含量、奈良土壌用検量線、未発表) より算出。

#### 第4節 考察

2018年の実証試験では、2017年の実証試験と同様の埼玉県三郷市内ハウスの他、神奈川県と奈良県のSCN発生圃場をお借りし、試験を行った。埼玉県はビニールハウス、神奈川県と奈良県は露地圃場と、降雨や気温の影響の受け方が異なる条件であるが、本試験では緑豆栽培およびすき込みによって、SCN の密度を減少させることができた。

圃場ごとにSCN密度減少の要因を考えると、まず埼玉県においては2017年と大きく異なる点として、緑豆のすき込み量が挙げられる。2017年のMB9iではすき込み量が $211\text{g/m}^2$ であったのに対して、2018年はMB9iで $736\text{g/m}^2$ と、3倍以上のすき込み量となっていた。これは、播種以降の灌水の量と頻度を、2018年では大きく増やしたことが起因したと考えられる。また、2018年には播種後にレーキがけをしたのち、踏むことでの埋没でなく、土壌を被覆するように心がけた。この点も発芽とその後の緑豆生育の安定化につながったと考えられる。一方、緑豆の播種量を増やし、それに伴いMB18iやMB27iではすき込み量がそれぞれ $1310\text{g/m}^2$ 、 $1706\text{g/m}^2$ と増えたにも関わらず、各処理区でSCN残存率は大きく変わらなかった。処理区ごとで播種前のSCN密度にばらつきが大きいため、均一な評価をすることは難しいが、少なくとも $700\text{g/m}^2$ 程度あればSCN密度を80%程度低減できることが期待される結果となった。MB27iの緑豆植物体はかなり徒長し、茎が細くなりかつ葉も小さくなってしまったため、1本あたりの重量がMB9iで $6.4\text{g}$ に対して、MB27iで $2.8\text{g}$ とかなり軽くなっていた。トマトの例ではあるが、栽植密度上げすぎると、得られる植物体バイオマス量が減少するため(横井ら, 2007)、緑豆のすき込み量を減らさないためにも、緑豆の播種量は $9\text{kg}/10\text{a}$ を基本としつつ、土壌の水もちや日当たりを考慮して、必要に応じて播種量を増やすのが良いと推定された。

2018年ハウスAに試験では、すき込み後灌水を行っていないMB9でも、灌水ありのMB9iと同等のSCN密度低減効果が確認された。これは、図4-9-1からもわかる通り、すき込み後2日目の7月28日に $48\text{mm/day}$ の非常に強い雨が降り、ハウス横からハウス内にしみ込んだ雨水によって、MB9iと同程度の土壌水分まで上昇したことが要因であると考えられる。また、Control(緑豆無栽培区)でも約56%の密度低下(残存率44%)がみられた。SCN卵は水に反応して孵化することが示されており(Perry, 2002)、ControlでもMB9の土壌水分と同様の推移であったと仮定すると、7月28日の雨によって土壌水分がpF2.5程度まで上昇した結果、緑豆をすき込んでいないControlでも孵化が促進され、その孵化した2期幼虫が餓死することで、結果として密度が減少したと考えられる。

地温をMB9とMB9iで比較すると、MB9ではすき込み後30日間で $30.5^\circ\text{C}$ 、MB9iで $28.5^\circ\text{C}$ と $2^\circ\text{C}$ 違っていた(図4-9-2、表4-2)。千葉県県の武田氏の結果では基本 $20^\circ\text{C}$ から $30^\circ\text{C}$ の間で推移していれば、孵化は起こると考えられるため、 $30.5^\circ\text{C}$ とわずかに $30^\circ\text{C}$ を超える条件でも孵化が起こり、密度が大きく低下したと考えられる。

2018年のハウスBの試験では、緑豆すき込み後、土壌水分が水分センサー値で $0.256\text{m}^3\text{water m}^{-3}$ (pF2.76)を優に超えていたが(図4-11-1)、全体としてSCN密度減少には至ら

なかった。原因として考えられるのは、地温であり、孵化に適した地温が 20~30°C であるのに対して、緑豆すき込み後の推移が 30~48°C と非常に高く、平均地温としては深さ 10cm で 36.7°C、深さ 15cm で 34.0~34.3°C であった。ハウス B においては太陽熱処理による密度減少を期待していたため、地温のこのような上昇は想定内であったが、太陽熱処理による植物寄生性線虫の防除には、十分な土壤水分条件のもと、35°C から 50°C の地温が 4 週間から 6 週間必要である (Viaene *et al.*, 2006) ことが示唆されており、緑豆すき込みによる孵化促進、そして太陽熱処理による線虫防除、このどちらにおいても不十分な条件となってしまう。SCN 卵は、35°C といった高い地温条件では緑豆を 2000g/m<sup>2</sup> 程度すき込もうとも孵化は促進されず、あくまで地温 20~30°C が重要であることが示唆された。

神奈川県および奈良県の露地圃場でも緑豆すき込みによって SCN 密度を大きく減少させることができた。神奈川県では、お借りした圃場すべてで土壤水分の平均が、第 3 章において SCN 卵の孵化促進が示唆された水分条件 (pF2.76 で、神奈川県の試験圃場では 0.180 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>) より高水分条件であり、地温も 25°C 付近と、適した環境であったことから、高い防除効果を示したと考えられる。奈良県では、エダマメの栽培期間が 7 月から 10 月にかけて行われるということで、早い時期の緑豆すき込み法実施となったが、マルチなしでも平均地温が 20°C あり、マルチをすることで、約 2°C 地温を上げることができた。また、MB は露地ではあるものの、マルチをすることで水分の上下が抑えられ、水分が維持されることで SCN 卵の孵化が安定的に起こった結果、緑豆すき込みも相まって、高い防除効果につながったのではないかと考えられた。Control でも 65% 密度を減少させているが、これはやはり高水分が影響したものであると推定された。

## 第 5 節 まとめ

2018 年では 2017 年の反省を活かし、

- ・ 土壤採取前のスコップによる土壤混和
- ・ 採取土壤はそのまま持ち帰り、風乾後、全量ふるいがけ
- ・ すき込み後 30 日をめどに土壤を採取し分析

これに加え、

- ・ 播種時およびすき込み後の十分な灌水

を徹底した結果、緑豆すき込みによる SCN の密度低減効果を確認することができた。

2020 年においても上記点を踏まえて反復試験を行い、緑豆すき込み法の効果を確認していく。

## 第5章 SCN 汚染圃場を用いた緑豆すき込みの実証実験（2020年度）

### 第1節 はじめに

本章は、第2章および第4章の結果を参考に、2020年度も引き続き同一圃場（埼玉県三郷市エダマメハウス）にて緑豆すき込みの実証実験を行った。これまでの圃場試験より、土壤水分と地温の条件を考慮することで、緑豆すき込みによるSCN防除効果を実際の現地圃場にて確認することができたため、あらためて圃場での反復試験を行い、効果を確認することとした。

2020年における圃場試験では、2018年にて埼玉県および奈良県にて確認された、土壤中の水分が十分（ $pF_{2.76}$ 以下）あれば、緑豆を栽培・すき込まなくても密度を減少させるという点について、灌水のみの区を作成し、確認することとした。加えて、埼玉県三郷市のエダマメ圃場は非常に高密度にSCNが存在するため、緑豆同様SCNの孵化促進効果を示す、同じマメ科植物であるクロタラリア(*Crotalaria* L.) (Aiba and Mitsui, 1995)を混植し効果を確認することとした。

### 第2節 材料および方法

#### 【対象圃場】

埼玉県：2020年においては、第2章および第4章でお借りしたハウスのうち、ハウスAをお借りし試験した。

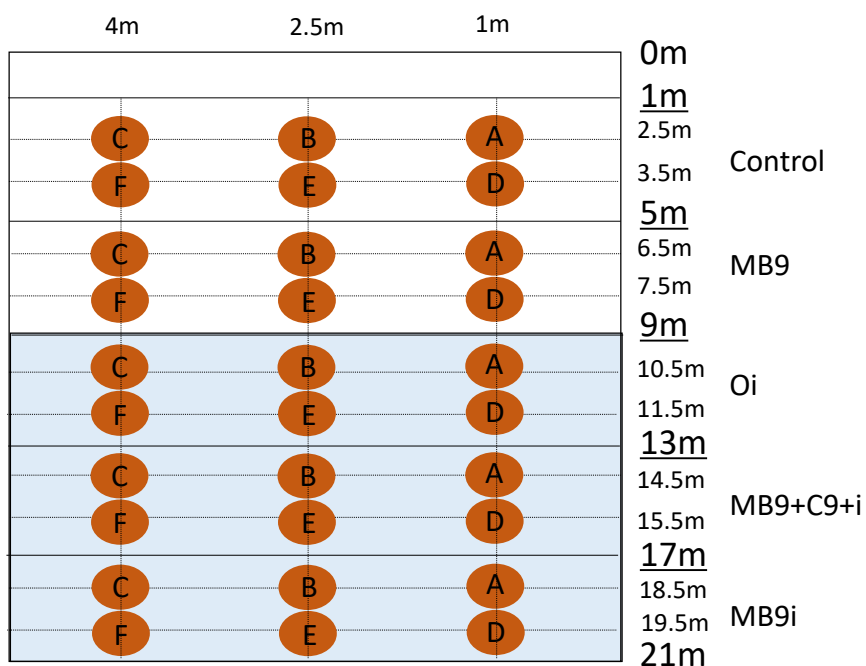
#### 【試験処理区】

<ハウスAのみ>（図5-1に圃場図を示した）

- 1) 対照区（緑豆栽培および灌水を行っていない（Control：Cont））。
- 2) 緑豆区（緑豆播種直後は水やりをし、すき込み後は灌水しない処理区（Mung Bean 9kg/10a：MB9））：緑豆播種量は9kg/10a。
- 3) 灌水区（灌水のみ行う区（Only irrigation：Oi））
- 4) 緑豆 9kg/10a+クロタラリア 9kg/10a +灌水区（緑豆およびクロタラリアを播種・すき込みし灌水を行う区（Mung Bean 9kg/10a +*Crotalaria* 9kg/10a+ irrigation：MB9+C9+i））：両播種量は9kg/10a。
- 5) 緑豆 9kg/10a+灌水区（緑豆漉き込み後に灌水を行う区（Mung Bean 9kg/10a + irrigation：MB9i））：緑豆播種量は9kg/10a。

5つの処理区とも20m<sup>2</sup>（横5m×縦4m）とした。各処理区6地点をサンプル地点とし、横1、2.5、4m、縦1.5、2.5mの交点を図5-1のように地点A～Fまで設定した。各地点0.6m×0.6mを調査区画としてスコップにて耕起した。

図 5-1. 2020 年埼玉県三郷市における緑豆すき込み試験の処理区 (ハウス A)



【試験行程 (時間経過含む)】

<ハウス A>

7月11日：トラクターで耕耘後、更にスコップで深さ 20cm まで各地点を耕起した。線虫スコップを用いて、各地点 A~F から 4 点、深さ 0~15cm までの土壌を採取した。採取した土壌を袋内でよく混和した。その後、緑豆 (MB9+C9+i 区に関してはクロタラリア (本試験ではネマックス (雪印種苗株式会社) も)) を播種し、レーキ掛けをした。ハウス上部のスプリンクラーより Control 以外を灌水した (灌水量は約 29 L/m<sup>2</sup>)。

7月13日：更に灌水した (13L/m<sup>2</sup>)。

8月2日：緑豆およびクロタラリアの生育調査するため、各地点 (0.36m<sup>2</sup>) から緑豆本数と地上部生重量を測定した。

8月3日：トラクターで緑豆植物体をすき込んだ後ハウス上部のスプリンクラーより灌水区 (Oi、MB9+C9+i、MB9i) に対して灌水した (灌水量は 40L/m<sup>2</sup>)。灌水の際、Control と MB9 にはビニールシートで覆い、水が入らないようにした。

8月5日：DECAGON の水分センサー (5TM) を深さ 10-15cm のところに設置した。設置した処理区は Control、MB9、Oi そして MB9+C9+i である。

9月19日：各地点より土壌を採取した (土壌サンプルの取り方は 7月11日と同様である。すき込み後 47 日)。

灌水に関して：灌水はハウス上部に設置されているスプリンクラーを使用した。灌水量は、縦 18cm で横 23cm のアルミトレーを圃場にランダムに 3 つ置き、灌水チューブから出ている水を 30 分間そのアルミトレーにて回収した後、メスシリンダーに移し、面積と回収された水量 (ml) をもとに灌水量を算出した。

#### 【採取土壌の調査方法】

##### ・DNA 抽出およびリアルタイム PCR

リアルタイム PCR に供試した土壌は、播種前 (7 月 11 日) とすき込み後約 1 か月半 (9 月 19 日) の土壌である。DNA 抽出方法は本試験では現在開発途中のステンレスボール法を用いた。このステンレスボール法は、60°C で 1 日乾燥後の土壌を 50ml の遠心管に 10g 加え、ステンレスボール (φ20mm) を 4 つ用いて粉碎後、その遠心管に直接リン酸バッファー 20ml を加え、振とうするものである。一つの遠心管で土壌の粉碎から緩衝液を用いての振とうまで行うことができ、簡便化できる点において本研究室で着目されている。振とう後の上清は、第 2 章第 2 節の [DNA 抽出] の 7 から供試した。リアルタイム PCR の方法は第 2 章の第 2 節と同様である。また検量線は、

$$\text{Ct 値} = -2.7347 \times \log_{10} (\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 37.035 \quad (\text{式 4})$$

式 4 に関しては未発表である。また SCNnew プライマーを用いた検量線である。

#### 【土壌水分・地温測定】

2020 年においても SCN 密度に対する土壌水分と地温の影響を調べるため、DECAGON の水分センサー (5TM) を使用した。設置した処理区は上記にある通り、Control、MB9、Oi そして MB9+C9+i である。



### 第3節 結果

緑豆生育は図 5-2 に示した。緑豆本数および地上部重量は処理区間で有意な差はなかった。クロタラリアは本数自体緑豆とそれほど変わらなかったが (MB9+C9+i : 緑豆本数は 254 本/m<sup>2</sup>、クロタラリアは 247 本/m<sup>2</sup>)、1 本あたりの地上部重量に換算すると、MB9+C9+i において、緑豆は 1.66 g/本、クロタラリアは 0.27 g/本と大きく異なった。

表 5-1 に各処理区の播種前とすき込み後 47 日目の SCN 密度を示した。各処理区の残存率平均は、Control で 123%、MB9 で 59%、Oi で 84%、MB9+C9+i で 271%、MB9i で 268%であった。各処理区、地点ごとでかなりばらつきがあるが、MB9 と Oi で減少傾向にあった。土壌水分の推移 (図 5-3-1) をみると、MB9 は測定期間 (8 月 5 日から 8 月 29 日) の半数以上で、pF 2.76 (0.256 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>) 以上ではあるもの pF 3.0 (0.228 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>) を下回る状態が続いていた。すき込み後に灌水を行った処理区は、Oi で 8 月 7 日 (すき込み後 4 日目)、MB9+C9+i では 8 月 8 日 (すき込み後 5 日目) の段階で pF 3.0 を下回り、その後は pF 3.0 以上が続いた。すき込み後の測定期間 (26 日間) における各処理区の土壌水分の平均は、Control で 0.193 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>、MB9 で 0.227 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>、Oi で 0.184 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>、MB9+C9+i で 0.206 m<sup>3</sup> water m<sup>-3</sup>であった。

地温 (図 5-3-2) は日較差があるもの、測定期間の 26 日間の平均が、Control で 33.1°C、MB9 で 33.3°C、Oi で 31.8°C、MB9+C9+i で 31.8°Cであった。

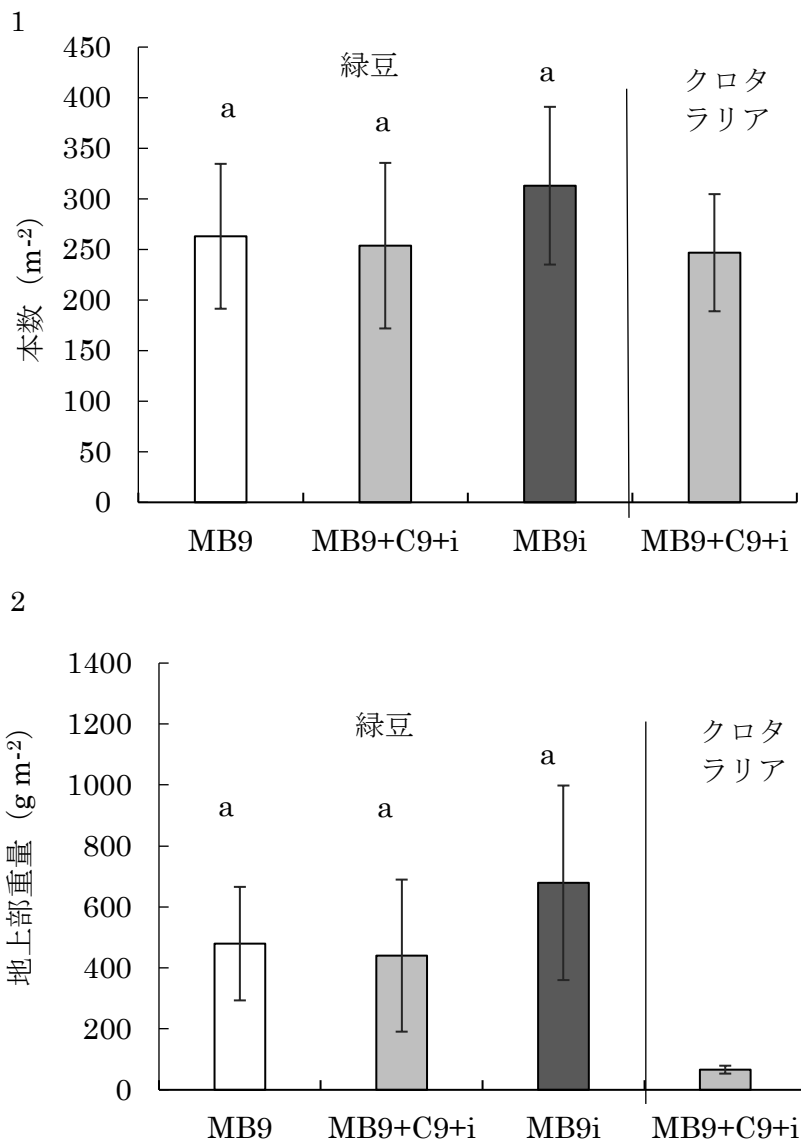


図 5-2 上図 (5-2-1) 緑豆本数、下図 (5-2-2) 緑豆地上部重量

MB は緑豆 (Mung Bean) を意味し、i はすき込み後の灌水 (irrigation) を意味し、C は *Crotalaria* を意味する。MB 横の数字は播種量 (kg/10a) を示す。重量は地上部のみである。

緑豆播種区 (すき込み後非灌水) ; MB9、緑豆とクロタラリアを混植した処理区 (すき込み後灌水) : MB9+C9+i、緑豆播種区 (すき込み後灌水区) ; MB9i。

異なる英字は有意確率 5% で有意差あり (Fisher の最小有意差法)。

両ハウス、設定した区画 0.36m<sup>2</sup> (0.6m × 0.6m) 内の本数と地上部重量を測定し、1m<sup>2</sup> に換算した値をグラフ化した。

重量は地上部のみである。

表 5-1. SCN に対する緑豆すき込みの影響 (ハウス A)

処理区	地点	緑豆播種前 20200711		緑豆すき込み後47日目 20200919		残存率
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	
Control	A	4967	1010	5780	3946	116
	B	59466	11851	16520	1342	28
	C	5757	2216	2055	456	36
	D	6622	3505	7154	1095	108
	E	40758	17785	27572	6551	68
	F	13447	5286	51735	3128	385
MB9	A	11214	2062	10018	3021	89
	B	27287	1298	27976	14073	103
	C	58885	7794	28931	1455	49
	D	22030	5508	10729	3308	49
	E	77838	7655	29234	9083	38
	F	132871	23883	33418	1343	25
Oi	A	13402	1273	14946	4818	112
	B	27223	12695	23886	4537	88
	C	89877	3512	63838	2838	71
	D	9088	3115	10840	2363	119
	E	61646	631	42310	2482	69
	F	65845	17275	28463	1370	43
MB9+C9+i	A	11830	670	11616	3479	98
	B	812	342	2449	1112	302
	C	39740	6931	44671	2735	112
	D	5953	1229	20231	4817	340
	E	1354	175	5993	581	443
	F	12787	2574	42586	9737	333
MB9i	A	3151	652	20733	1629	658
	B	3118	670	2247	1189	72
	C	20130	2725	37648	1276	187
	D	7730	727	28254	2419	366
	E	2954	427	1994	421	68
	F	14831	1747	37956	613	256

播種前、すき込み前、すき込み後約 2 週間の各数値は SCN 密度 (卵換算頭数/20g 乾土) を示す。

対照区 (非緑豆区) ; Control、緑豆播種区 (すき込み後非灌水) ; MB9、灌水のみ行う区 (緑豆非栽培) ; Oi、緑豆とクロタラリアを混植した処理区 (すき込み後灌水) ; MB9+C9+i、緑豆播種区 (すき込み後灌水区) ; MB9i の 5 処理区 (播種量はすべて 9kg/10a)。

残存率 = 「緑豆すき込み後 47 日目の密度」 ÷ 「播種前密度」 × 100 で出される、緑豆すき込み後に土壌中に残った SCN の割合を意味したものである。

リアルタイム PCR にて出た Ct をもとに、Ct 値 =  $-2.7347 \times \log_{10}(\text{SCN 密度 (卵/20g 乾土)}) + 37.035$  (式 4) を利用して密度を算出した。

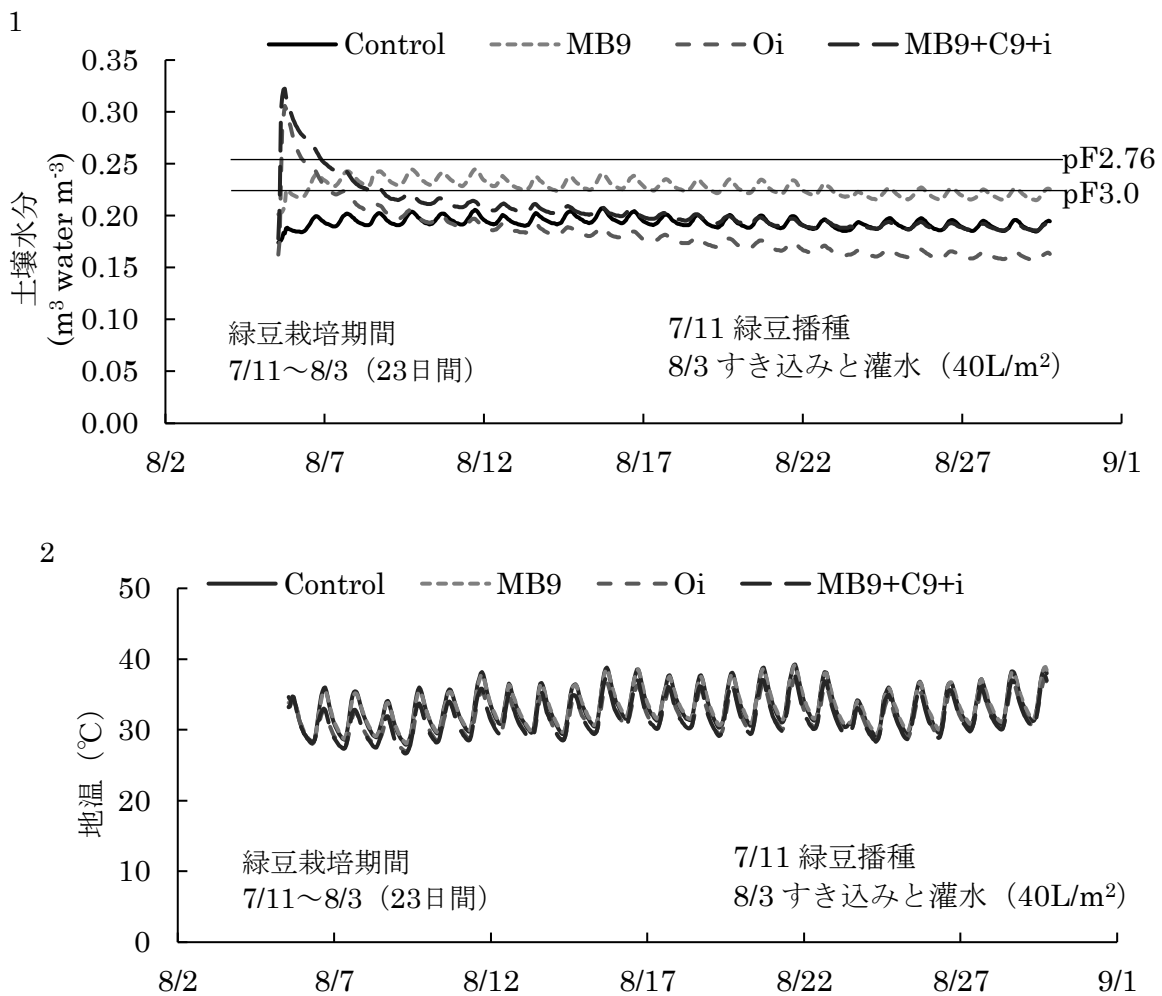


図 5-3. 埼玉県における試験圃場の地温と土壌水分の変化

(2020 年、5-3-1 : 土壌水分、5-3-2 : 地温)

対照区 (非緑豆区) ; Control、緑豆播種区 (すき込み後非灌水) ; MB9、灌水のみ行う区 (緑豆非栽培) ; Oi、緑豆とクロタラリアを混植した処理区 (すき込み後灌水) : MB9+C9+i の 4 処理区で土壌水分と地温を測定した。

測定深さは 10~15cm。pF 2.76 = 0.256 m³ water m⁻³、pF 3.0 = 0.228 m³ water m⁻³ (y = 62.941x + 22.409 (x = 水分センサー、y = 100g 乾土当たりの水分含量) より算出)

#### 第4節 考察

MB9+C9+iにおいて、10aあたりの播種量(9kg/10a)は緑豆とクロタラリアで変わらないが、1粒あたりの重量が緑豆は約59mgに対して、クロタラリア種子は約16mgと軽い。そのため、クロタラリアの方が約4倍多く播いている。そのため、栽植密度がMB9+C9+iではかなり大きくなり、結果としてクロタラリアは発芽率が43%と低く、かつ養分競合に負け、1本あたりの重量が緑豆の16%と、ひ弱な個体が生長した。緑豆の生育に関して、地上部重量を比較すると、MB9とMB9i、MB9+C9+iの間では有意な差はなく、緑豆は2018年の結果で示唆されたように、播種後に十分な灌水を行ってれば、発芽とその後の生育が安定的であると推定できる。

2020年はMB9でSCN密度が減少傾向なもの、本来大きく密度を減少させることができると期待されていたMB9iやMB9+C9+iで逆に密度が増加してしまった。密度増加に関しては、シストは土壤中の分布が不均一であり、第1章第2節で述べた通り、シスト内の卵数もかなりばらつきがあるため、密度に変化がなかった場合は今回のように増加することもあると推定される。千葉県武田氏のデータより、30°Cでも緑豆懸濁液により孵化が促進されたが、2020年に関してはすき込み期間の地温が30°Cを越し、かつ土壌水分も、測定期間(8月5日から8月29日で、すき込み日は8月3日)の26日間で、どの処理区もpF 3.0を上回るといった乾燥状態が続いたため、緑豆すき込みおよびその後の灌水を行ったMB9iやMB9+C9+iでも密度が減少しなかったと考えられた。

#### 第5節 まとめ

本試験はハウスによる試験のため、基本的に降雨による土壌水分の上昇は期待できず、灌水をしなければ徐々に土壌は乾燥していく。かつ緑豆すき込み後の気温が高いと、ハウス内温度に応答した自動開閉式のハウスでない限り、ハウス内はかなり温度が上昇し、それに伴い地温も緩やかではあるが高くなる。2020年は明らかに土壌水分不足と地温の上昇により、SCN卵の孵化に適した条件を作り出すことができなかった。このことから2020年においては緑豆すき込み法の効果を確認することができなかったと考えられた。

## 第6章 総合考察

これまで SCN の防除法はとして、ホスチアゼートやイミシアホスといった農薬散布による化学的防除や、田畑転換（清水ら, 1988）や輪作や宿主を植えない期間を設ける体系づくり（Noel and Edwards, 1996）、に加えて、長期にはなるがクロタラリア（串田, 2012）や赤クローバーなどを用いた緑肥栽培およびすき込みといった耕種的防除などが実施されてきた。このうち、本研究が対象とした緑豆すき込み法は、農薬を使用せず、短期栽培で SCN 密度を減少できる画期的な防除法である。第2章から第5章の試験で得られた結果をもとに、緑豆すき込み法における SCN 密度減少に必要な条件を以下に記す。

SCN の孵化適温は  $25^{\circ}\text{C}$  程度である（岡田, 1977; 伊藤, 2016）。加えて、第4章にて紹介した武田氏のデータより、 $30^{\circ}\text{C}$  の恒温条件や  $20^{\circ}\text{C}$  と  $25^{\circ}\text{C}$  の変温条件でも孵化が促進されることが判明した。これらより、SCN は  $20^{\circ}\text{C}$  から  $30^{\circ}\text{C}$  の間を推移する環境下で孵化が起りやすいと考えられ、地温が  $20^{\circ}\text{C}$  から  $30^{\circ}\text{C}$  を1か月程度推移する必要がある。日本の本州は気温の日格差が大きく、本研究でお借りした圃場のある埼玉県では月別平均気温が  $20^{\circ}\text{C}$  以上の期間は6月 ( $22.0^{\circ}\text{C}$ ) から9月 ( $23.3^{\circ}\text{C}$ ) までであったため（統計期間1991年から2020年、気象庁ホームページより引用）、5月 ( $18.7^{\circ}\text{C}$ ) と10月 ( $17.5^{\circ}\text{C}$ ) の平均気温の変化を考慮すると、緑豆のすき込み時期として適切な範囲は、5月下旬から10月上旬と推測される。埼玉県三郷市のエダマメ圃場はハウスのため、この期間は気温よりハウス内が暑くなり、かつ6月下旬までエダマメが植わっており、9月中旬にコマツナ栽培が始まるため、地温を考慮するとエダマメ収穫と同時に緑豆播種をすることで、8月の高温期を避けることができると考えられた。2020年において、緑豆すき込みをしても SCN 密度が減少しなかった原因は、灌水区でもすき込み期間に  $31.8^{\circ}\text{C}$  という  $30^{\circ}\text{C}$  を超す平均地温だと考えられるため、地温を考慮し、適切な時期にすき込むことが重要である。2018年の神奈川県では、緑豆すき込み期間（9月3日から9月19日）の三浦市の平均気温が  $24.2^{\circ}\text{C}$  であり、この期間の平均地温は  $24.9^{\circ}\text{C}$  であったため、圃場①から④すべてにおいて SCN 密度が減少したと考えられる。気温が  $25^{\circ}\text{C}$  付近の場合は地温も安定しており、緑豆すき込み期間の日平均地温（水分・地温センサーによる圃場での実測値より）と三浦市の日平均気温（気象庁ホームページより参照）を日別で差を取り比較すると、 $-1.0^{\circ}\text{C}$  から  $+2.4^{\circ}\text{C}$  の範囲で推移していたことから、平均気温が  $25^{\circ}\text{C}$  を推移する時期に露地での緑豆すき込み法を実施すると、より効果的に SCN 密度を減少させることができる可能性がある。ただし、奈良県のようなエダマメの栽培期間が異なる場合は、2018年に実施したように、マルチを用いることで地温を  $20^{\circ}\text{C}$  以上で維持でき、その SCN 密度の減少効果を期待できる。

本研究室において、これまで SCN の孵化と密度減少に資する要因として、温度に着目した研究は多く実施されてきたが、水分に関してはあまり着目してこなかった。第3章では、緑豆すき込み4日目の土壤水分が  $\text{pF } 2.76$  以下であれば孵化が促進されることが判明し、緑豆すき込み後の土壤水分の重要性が確認できた。第4章の2018年度圃場試験において、埼玉県、神奈川県および奈良県のいずれにおいても、緑豆すき込み後の土壤水分が  $\text{pF } 2.76$

を下回ったことが、SCN 密度を下げる大きな要因の一つであったと推定できた。また、埼玉県および奈良県の Control でも 50%以上の密度減少を確認しており、SCN 卵は水のみでも孵化促進されること (Levene et al., 1998; Perry, 2002) が知られているため、孵化という点に関しては、あらためて十分な水分環境が必要であるということも示唆された。

また、圃場試験を行った 3 年間で、すき込まれた緑豆植物体量は異なっていた。2017 年のハウス B の MB9i ではすき込み量が  $211\text{g}/\text{m}^2$  なのに対して、2018 年のハウス A の MB9i では  $736\text{g}/\text{m}^2$  と 3 倍近く差があった。2017 年はこの緑豆のすき込み量が少なかったため、SCN 卵の孵化効果は確認できたものの、SCN 密度が有意には減少しなかったと考えられた。2020 年に関してはすき込み量が  $679\text{g}/\text{m}^2$  (ハウス A の MB9i) であり、2018 年と大きい差はみられなかったが、SCN 密度は減少しなかった。そのため、すき込む植物体の地上部重量だけが SCN の密度を減少させる要因ではないと推定された。2020 年に関しては、緑豆すき込み後の土壤水分が pF 3.0 を上回り、かつ地温も平均で  $30^\circ\text{C}$  といった土壤環境であったことが SCN 密度を減少させることのできなかつた大きな要因だと考えられる。王 (2017) によるポット試験で、緑豆播種後の土壤水分を pF2.8 程度で維持した場合と、pF2.0 程度の維持した場合とで比較することができ、生育が pF2.8 では地上部重量が 10%低くなっており、緑豆播種後の灌水も緑豆生育には欠かせないことが示されている。本圃場試験では 2018 年と 2020 年を通して、播種後  $29\sim 40\text{L}/\text{m}^2$  の灌水に加え、その後の土壤の乾燥状態に応じて適宜灌水を行うことによって、播種量  $9\text{kg}/10\text{a}$  時に  $700\text{g}/\text{m}^2$  程度の緑豆地上部を確保できると考えられた。ただし、この王のポット試験において、緑豆のすき込み量が  $968\text{g}/\text{m}^2$  であっても、すき込み後の土壤水分が pF2.76 を超える pF2.83 では SCN 密度減少率が 20%程度に抑えられる結果となっており、すき込み後には必ず灌水を行うか、または雨予報の前日にすき込む等の工夫が必要である。

上記より、緑豆すき込み法によって土壤中の SCN 密度を 80%以上減少させるためには、すき込み後の平均地温 ( $20\sim 30^\circ\text{C}$ )、湿潤状態の土壤水分 (pF 2.76 以下)、およびすき込まれる緑豆重量 ( $736\text{g}/\text{m}^2$  程度またはそれを超える量)、この 3 点が重要である。生産者の作物生産体系に依存はするものの、緑豆すき込み法は緑豆栽培が約 2 週間から 1 か月で済み、すき込み後にエダマメを栽培する場合は、孵化および餓死に 1 か月かかるものの、直後にエダマメを栽培しない場合は、夏場の緑肥分解速度は地温が高く速いため、次作はすぐに始められると思われる。

緑豆すき込みに関してはコスト面で見ると、緑豆  $9\text{kg}/10\text{a}$  施用した場合、80%の線虫密度減少で期待できる収量増は  $200\text{kg}/10\text{a}$  (Ito et al., 2017 より算出、埼玉県のエダマメ価格は  $500\text{円}/\text{kg}$ ) であり、2 度の耕耘とその燃料費 (3642 円) に人件費 (1000 円/h)、種子代 (7200 円)、灌水とそのチューブ代 (9920 円) を引いても、増収益として約 7.8 万円となる。現在、神奈川県では 20 ha ものエダマメ圃場で本方法が実証されていることから、今後の普及にも期待ができる。

## 引用文献

- Aiba, S., and Mitsui, Y. (1995) Effects of some legumes on hatching of eggs of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan* 46: 197-199.
- Allen, T. W., Bradley, C. A., Sisson, A. J., Byamukama, E., Chilvers, M. I., Coker, C. M., Collins, A. A., Damicone, J. P., Dorrance, A. E., Dufault, N. S., Esker, P. E., Faske, T. R., Giesler, L. J., Grybauskas, A. P., Hershman, D. E., Hollier, C. A., Isakeit, T., Jardine, D. J., Kelley, H. M., Kemerait, R. C., Kleczewski, N. M., Koenning, S. R., Kurle, J. E., Malvick, D. K., Markell, S. G., Mehl, H. L., Mueller, D. S., Mueller, J. D., Mulrooney, R. P., Nelson, B. D., Newman, M. A., Osborne, L., Overstreet, C., Padgett, G. B., Phipps, P. M., Price, P. P., Sikora, E. J., Smith, D. L., Spurlock, T. N., Tande, C. A., Tenuta, A. U., Wise, K. A., and Wrather, J. A. (2017) Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. *Plant Health Progress Journal* 18:19-27.
- Bandara, A. Y., Weerasooriya, D. K., Bradley, C. A., Allen, T. W., and Esker, P. D. (2020) Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLoS One* 15:e0231141.
- Blancharta, E., Villenavea, C., Viallatouxa, A., Barthèsa, B., Girardinb, C., Azontondec, A., and Feller, C. (2006) Long-term effect of a legume cover crop (*Mucuna pruriens* var. utilis) on the communities of soil macrofauna and nematofauna, under maize cultivation, in southern Benin. *European Journal of Soil Biology* 42: S136-S144.
- Bruin, J.D. and Pedersen, P. (2008) Soybean cultivar and planting date response to soil fumigation. *Agronomy Journal* 100: 965-970.



- Bernard, G. C., Egnin, M., and Bonsi, C. (2017) The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. *Nematology-Concepts, Diagnosis and Control*. Chapter 4. DOI:10.5772/intecooen68958.
- Chen, S.Y., MacDonald, D.H., Kurle, J.E., and Reynolds, D.A. (2001) The Soybean Cyst Nematode. University of Minnesota Extension Service.
- Cheng, Z., Shirai, S., Toyota, K., and Ritz, K. (2018) Case study on a modified method to quantify the density of some soil-borne plant-parasitic nematodes in a simpler and less expensive way. *Nematological Research* 48: 11-17.
- Decraemer, W and Hunt, D.J. (2006) Structure and classification. In Perry, R.N. and Moens, M. eds. *Plant nematology*. Wallingford, UK: CABI.
- Giesler, L. J. and Wilson, J. A. (2011) Soybean Cyst Nematode: Identification and Management. NebGuide in University of Nebraska–Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources. G1383: 1-3.
- 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.
- Goto, K., Sato, E., Gang, L. F., Sugito, T., and Toyota, K. (2010) Comparison of calibration curves prepared by soil compaction and ball milling methods for direct quantification of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* in soil. *Nematological Research* 40: 41-45.
- Heatherly, L. G. and Young, L. D. (1991) Soybean and soybean cyst nematode response to soil water content in loam and clay soils. *Crop Science* 31: 191-196.

- Ito, D., Toyota, K., and Sedrati, G.M. (2015) Suppression of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, using water extract of bean sprout residue. *Nematology* 17: 523-530.
- Karssen, G and Moens, M. (2006) Root knot Nematodes. Pp. 60-72. in Perry, R.N. and Moens, M. eds. *Plant nematology*. Wallingford, UK: CABI.
- Kushida, A., Uehara, T. & Momota, Y. (2002) Effect of red clover on hatching and population density of *Heterodera glycines* (Tylenchida: Heteroderidae). *Japanese Journal of Nematology* 32: 69-72.
- Kushida, A., Suwa, N., Ueda, Y., and Momota, Y. (2003) Effects of *Crotalaria juncea* and *C. spectabilis* on hatching and population density of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (Tylenchida: Heteroderidae). *Applied Entomology and Zoology* 38: 393-399.
- Kushida, A. and Kondo, N. (2015) A simple method for the detection and discrimination of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in nematode communities. *Nematological Research* 45:101-114.
- Koenning, S. R., Schmitt, D. P., and Barker, K. R. (1993) Effects of cropping systems on population density of *Heterodera glycines* and soybean yield. *Plant Disease* 77: 780-786.
- Lambert, K., and Bekal, S. (2002) Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. Sedentary endoparasites.
- Lauritis J.A., Rebois R.V., Graney L.S. (1983) Development of *Heterodera glycines* Ichinohe on soybean, *Glycine max* (L.) Merr., under gnotobiotic conditions. *Journal of Nematology* 15(2):272-281.

- Levene, B. C., Owen, M. D. K. and Tylka, G. L. (1998) Influence of herbicide application to soybeans on soybean cyst nematode egg hatching. *Journal of Nematology* 30(3):347–352.
- Masamune, T., Anetai, M., Takasugi, M. and Katsui, N. (1982) Isolation of a natural hatching stimulus, glycinoclepin A, for the soybean cyst nematode. *Nature* 297: 495-496.
- Niblack, T. L. and Chen, S. Y. (2004) Cropping systems, Biology and Management of Soybean Cyst Nematode, eds D. P. Schmitt, R. D. Riggs, and J. A. Wrather, Schmitt & Associates of Marceline 181–206.
- Noel, G. R., and Edwards, D. I. (1996) Population development of *Heterodera glycines* and soybean yield in soybean-maize rotations following introduction into a noninfested field. *Journal of Nematology* 28: 335-342.
- Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I. and Spiegel, Y. (2000) New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science* 56: 983-988.
- Perry, R.N. (2002) Hatching. In: Lee, D.I. (Ed.). *The biology of nematodes*. London, UK, Taylor & Francis, pp. 147-169.
- Reynolds, D. A, Tylka, G. L. and Martinson, C. A. (1999) Effects of swine manure on soybean cyst nematode. *Proceeding of National Soybean Cyst Nematode Conference*, Orlando, Florida, 1996: 16.
- Rodriguez-Kabana, R., Pinochet, J., and Gintis, B. O. (1984) Olive pomace for control of plant-parasitic nematodes. *Nematoropica* 22: 149-158.

- Samoiloff, M.R., Schulz, S., Jordan, Y., Denich, K., and Arnott, E. (1980) A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the Nematoda *Panagrellus redivivus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 1167-1174.
- Sato, E., Goto, K., Min, Y., Y., Toyota, K. and Suzuki, C. (2010) Quantitative detection of *Pratylenchus penetrans* from soil compaction and real real-time PCR. *Nematological Research* 40: 1 1-6.
- Shiina, Y., Tomata, Y., Miyashita, M., and Tanino, K. (2010) Asymmetric total synthesis of glycinoclepin A (VIII): generation of a novel bridgehead anion species. *The Chemical Society of Japan* 39: 835-837.
- Shirai, S., and Toyota, K. (2019) Optimisation of a species-specific primer set to quantify the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, in soil using real-time PCR. *Nematology* 21: 1037-1042.
- Singh, S., Singh, B., and Singh, A.P. (2015) Nematodes: A threat to sustainability of agriculture. *Procedia Environmental Sciences* 29: 215-216.
- Teft, P.M., and L. W. Bone. (1984) Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 17: 275-279.
- Thoden, T. C., Korthals, G. W., and Termorshuizen, A. J. (2011) Organic amendments and their influences on plant-parasitic and free-living nematodes: a promising method for nematode management?. *Nematology* 13: 133-153.
- Tilmon, K.J., Hodgson, E.W., O'Neal, M.E., and Ragsdale, D.W. (2011) Biology of the soybean aphid, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) in the United States. *Journal of Integrated Pest Management* 2: A1-A7.

- 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: 923-927.
- Turner, S. J. and Rowe, J. A. (2006) Cyst Nematodes. P91-122. In Perry, R.N. and Moens, M. eds. *Plant nematology*. Wallingford, UK: CABI.
- USDA (2014) Acreage (June 2014). National Agricultural Statistics Service Information. [https://www.nass.usda.gov/Newsroom/archive/2014/06\\_30\\_2014.php](https://www.nass.usda.gov/Newsroom/archive/2014/06_30_2014.php)
- Valdes, Y., Viaene, N., and Moens, M. (2012) Effects of yellow mustard amendments on the soil nematode community in a potato field with focus on *Globodera rostochiensis*. *Applied Soil Ecology* 59: 39–47.
- Van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D.A., de Goede, R.G.M., Adams, B.J., Ahmad, W., Andriuzzi, W.S., Bardgett, R.D., Bonkowski, M., Campos-Herrera, R., Cares, J.E., Caruso, T., de Brito Caixeta, L., Chen, X., Costa, S.R., Creamer, R., Mauro da Cunha Castro, J., Dam, M., Djigal, D., Escuer, M., Griffiths, B.S., Gutiérrez, C., Hohberg, K., Kalinkina, D., Kardol, P., Kergunteuil, A., Korthals, G., Krashevskaya, V., Kudrin, A.A., Li, Q., Liang, W., Magilton, M., Marais, M., Martín, J.A.R., Matveeva, E., Mayad, E.H., Mulder, C., Mullin, P., Neilson, R., Nguyen, T.A.D., Nielsen, U.N., Okada, H., Rius, J.E.P., Pan, K., Peneva, V., Pellissier, L., Carlos Pereira da Silva, J., Pitteloud, C., Powers, T.O., Powers, K., Quist, C.W., Rasmann, S., Moreno Sanchez, S., Scheu, S., Setälä, H., Sushchuk, A., Tiunov, A.V., Trap, J., van der Putten, W., Vestergård, M., Villenave, C., Waeyenberge, L., Wall, D.H., Wilschut, R., Wright, D.G., Yang, J.-I., and Crowther, T.W. (2019) Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572:194–198.

- Viaene, N., Coyne, D. L., and Kerry, B. R. (2006) Biological and Cultural Management. Pp. 346-369. In Perry, R.N. and Moens, M. eds. *Plant nematology*. Wallingford, UK: CABI.
- Wang, K. H., McSorley, R., and Gallaher. (2003) Effect of *Crotalaria juncea* amendment on nematode communities in soil with different agricultural histories. *Journal of Nematology* 35(3): 294-301.
- Wen, L., Lee-Marzano, S., Ortiz-Ribbing, L.M., Gruver, J., Hartman, G.L., and Eastburn, D.M. (2017) Suppression of soilborne diseases of soybean with cover crops. *Plant Disease* 101: 1918-1928.
- Wen, Y., Meyer, S.L.F., MacDonald, M.H., Zheng, L., Jing, C., and Chitwood, D.J. (2019) Nematotoxicity of *Paeonia* spp. extracts and *Camellia oleifera* tea seed cake and extracts to *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease* 103: 2191-2198.
- Wrather, J.A., and Koenning, S.R. (2006) Estimates of diseases effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of Nematology* 38: 173–180.
- Yeates, G.W. (2007) Abundance, diversity, and resilience of nematode assemblages in forest soils. *Canadian Journal of Forest Research* 37:216-225

- 相場 聡 (2001) SCN の生態と防除 (特集号:ダイズ病害虫の発生生態と防除) 植物防疫  
55(5): 229-232
- 相場 聡 (2005) 中央農研研究成果情報  
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2005/narc05-29.html>
- 石橋信義 (2003) 第 16 章 寄主-寄生者関係. 線虫の生物学 (石橋信義編). 東京大学出版会 226-237.
- 伊藤 綾、竹内浩二、高木章雄、櫻井文隆、渋澤英城、菅谷悦子、栄森弘己、山岸 明 (2006)  
東京都におけるエダマメの SCN 発生実態. 関東東山病害虫研究会報 53: 153-156
- 伊藤大輔 (2016) 博士論文 東京都市近郊の枝豆栽培圃場における SCN の診断及び防除法  
の開発
- 王曉曼 (2017) 修士論文 緑豆を用いた SCN に効果的な防除法の開発
- 岡田利承 (1977) SCN (*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
- 岡田浩明 (2007) 線虫群集を利用して土壌の健康度を評価する. 化学と生物 45 巻 1 号、  
43-50.
- 小原 裕三 (2015) 日本型農業環境条件における土壌くん蒸剤のリスク削減と管理技術の開  
発. (国研) 農業環境技術研究所 課題成果報告.
- 九州沖縄農業研究センター (2013) 有害線虫総合防除技術マニュアル
- 串田篤彦 (2012) SCN の生態的特性と防除対策、p321-325.
- 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一. 農山漁村文化協会 62-64.,  
77-78.
- 清水 啓、相場 聡、三井 康 (1988) 数種作物栽培下における SCN 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.

二井一禎 (2020) 私たちの知らない線虫の世界

[https://www.nippon-soda.co.jp/nougyo/pdf/new001/001\\_038.pdf](https://www.nippon-soda.co.jp/nougyo/pdf/new001/001_038.pdf)

平野和弥 (1993) 線虫病と他病害との複合病に関する一連の研究. 日本植物病理学会会報.

59-3., 233-236.

松中照夫 (2003) 土壌学の基礎

横井真悟, 後藤英司, 古在豊樹, 西村将雄, 田口勝教, 石上靖弘 (2007) 閉鎖型苗生産シス

テムにおける栽植密度および気流速度がセル成型トマト実生苗の生育およびその均一性

に及ぼす影響、植物環境工学、19(4): 159-166.



付録 各年の圃場試験のまとめ

ハウス or 露地	処理区	緑豆播種量 (kg/10a)	播種後の 灌水量 (総量、L/m <sup>2</sup> )	緑豆 栽培期間 (日間)	すき込み量 (g/m <sup>2</sup> )	すき込み後 灌水量 (L/m <sup>2</sup> )	すき込み後の 平均地温 (°C)	すき込み後の 平均水分 (m <sup>3</sup> water m <sup>-3</sup> )	SCN密度 残存率 (%)
2017 埼玉									
ハウスA	Control	0	—	14 (7月7日～ 7月21日)	0	—	28.8	0.186	100
ハウスA	MB9i	9	20	(7月7日～ 7月21日)	211 (記録なし)	—	27.8	0.305	100
埼玉									
ハウスA	Control	0	—	20 (7月6日～ 7月26日)	0	—	30.5	0.237	44
ハウスA	MB9i	9	90	(7月6日～ 7月26日)	736	40	28.5	0.246	15
2018 神奈川									
露地	MB	9	—	圃場①：25 圃場②：27 圃場③：44 圃場④：44	—	露地のため 非灌水	圃場①：27.9 圃場②：27.6 圃場③：26.8 圃場④：26.7	圃場①：0.154 圃場②：0.253 圃場③：0.206 圃場④：0.270	圃場①：18 圃場②：23 圃場③：54 圃場④：23
奈良									
露地	MB	9	—	13 (5月22日～ 6月4日)	—	露地のため 非灌水	23.1	0.388	2
2020 埼玉									
ハウスA	Control	0	—	23 (7月11日～ 8月3日)	0	—	33.1	0.193	100
ハウスA	MB9i	9	42	(7月11日～ 8月3日)	679	40	31.8	0.206	100
2017 埼玉：水分と地温はすき込み後 14 日間 (Control はすき込み後灌水をしていない MB9 のデータを参照) SCN 残存率はすき込み後 14 日後の土壌									
2018 埼玉：水分と地温はすき込み後 30 日間 (Control はすき込み後灌水をしていない MB9 のデータを参照) SCN 残存率はすき込み後 30 日後の土壌									
2018 神奈川：地温と水分は 8/10～すき込み後 14 日まで、SCN 残存率はすき込み後約 14 日後の土壌									
2018 奈良：水分と地温はすき込み後 22 日間、SCN 残存率はすき込み後 22 日後の土壌									
2020 埼玉：水分と地温はすき込み後 26 日間 (MB9i は MB9+CG+i のデータを参照)、SCN 残存率はすき込み後 47 日後の土壌									

## 謝辞

本研究にあたり、常に熱心な御指導ご鞭撻を賜りました豊田剛己教授に心より感謝いたします。また、本論文をご審査いただきました生物システム応用科学府の佐藤令一教授、橋本洋平准教授、鈴木丈詞准教授、農学府の本林隆准教授には厚く御礼申し上げます。

元埼玉県春日部農林振興センターの峯岸芳雄様、神奈川県農業技術センターの太田和宏様、千葉県農林総合研究センターの武田藍様、奈良県農業研究開発センターの井村岳男様には、お忙しい中、共同研究という形で多大なご協力をいただきましたこと、謹んで感謝の意を表します。

大学院進学後の2年間所属した東京農工大学リーディング大学院プログラムの元特任教員の工藤昭英様、坂根シルック様、一條洋子様、および梅村尚子様、そして元BASE事務室の皆様にもこの場を借りて感謝の意を示します。

学位を取得するにあたり、東京都農林水産振興財団 東京都農林総合研究センター 村上ゆり子所長をはじめ、多くの皆様にご理解をいただきましたこと、深く感謝いたします。研究生活を共にした同輩の皆様にも感謝の意を表します。

圃場での実証試験を行う際に、快く圃場をお貸しくださった生産者の方々には感謝の念にたえません。

最後に生活面そして精神面でも支えてくれた両親には感謝してもしきれません。誠にありがとうございました。