

平成27年 3月18日

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業 研究実績報告書

課題番号：2407

ジャガイモシストセンチュウの根絶を目指した防除技術の開発と防
除モデルの策定

研 究 期 間：平成24年度～平成26年度（3年間）

研究総括者名：奈良部 孝

試験研究機関名：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構（北海道農業
研究センター）

国立大学法人北海道大学

地方独立行政法人北海道立総合研究機構（北見農業試験場、
工業試験場）

長崎県

雪印種苗株式会社

I. 全体計画

1. 研究目的

ジャガイモシストセンチュウの国内での発生面積は約 1 万 ha まで拡大しており、発生密度の高い圃場では馬鈴しょの収量が著しく減少する等、大きな被害を受けている。また、本線虫発生圃場では種馬鈴しょ生産ができないため、種馬鈴しょの供給が滞ることで地域の馬鈴しょ生産体系そのものへの影響も懸念されている。このような状況の中、本線虫を根絶に至らしめる防除技術は確立しておらず、発生地域の更なる拡大の防止及び根絶に向けた防除技術の開発が喫緊の課題となっている。

このため、本課題では、本線虫に対して防除効果の高い技術を開発し、既存の防除技術と組み合わせて、根絶を目指した防除モデルを策定するとともに、本線虫を高感度に検出するための技術を開発し、根絶を確認するための手法を構築する。

2. 研究内容

(1) 中課題 1：ジャガイモシストセンチュウの新たな防除技術の開発

ジャガイモシストセンチュウは、環境耐性及び薬剤耐性のあるシストの状態で土壤中に長期間生存できることから、既存の防除技術では根絶は困難である。そこで本課題では、シストからの幼虫ふ化を効率的に誘導し、根絶に至らせる方法として、利用形態の異なる 3 通りのふ化促進物質利用技術を開発する。既存の防除技術と組み合わせて利用でき、効果が高く、生産現場で使える技術をめざす。

1) 小課題 1：ナス科対抗植物の栽培による線虫密度低減技術の開発【雪印種苗、農研機構（北海道農業研究センター）】

ナス科植物の中にはジャガイモシストセンチュウのふ化促進物質を根から分泌するものの、好適な寄主でないため、幼虫がふ化して根に侵入しても、全く成長できない植物（以下「対抗植物」という。）が知られている。この対抗植物を活用し、耐久態のシストから幼虫を一斉にふ化させ、幼虫を根に取り込んで死滅させることにより、線虫密度低減を図る。本課題では、これらナス科対抗植物の中から、線虫密度低減効果の確認されたトマト野生種 (*Solanum peruvianum*) とハリナスビ (*S. sisymbriifolium*) について、実際の生産現場で利用できる線虫密度低減効果の高い栽培法を確立する。まずは、北海道内における播種時期や栽培期間、播種密度が、対抗植物の生育や線虫密度低減に及ぼす影響を確認する。その際、栽培にあたって問題となり得る雑草対策について検討するとともに、病害虫の発生状況についても確認する。さらに、生産者が利用できるよう機械播種を主体とした播種方法を開発する。

2) 小課題 2：天然物由来ふ化促進物質資材の低コスト・安定供給技術の開発【雪印種苗、道総研（工業試験場）】

これまでに、吸着性・徐放性に優れる培地でジャガイモシストセンチュウの寄主植物の一つであるトマトを養液栽培し、ふ化促進物質が大量に吸着した栽培後

の培地を乾燥後粉末化することで、線虫密度低減効果のあるふ化促進物質資材を作製した。本課題では、本資材を実際の生産現場で利用できるよう、効力の向上と安定供給をめざす。工業試験場は、トマト栽培とふ化促進物質の吸着に優れた培地の材料及び製法について、物性評価を行いながら、コストを考慮して検討・改良を加える。雪印種苗は、得られた資材のふ化促進物質吸着量を最大にするトマト栽培方法を開発し、製剤化する。

一方、得られた天然物由来のふ化促進物質資材の品質評価は、現在のところ生物検定（実際に線虫と接触させたときのふ化率など）のみで行っているが、製品化に向けては、ロット間の品質管理などにおいて、物質そのものの定性・定量評価が必要になる。そのため本課題では、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の高感度分析装置を用いて、トマト由来のふ化促進物質の解明を進め、単離を行う。さらに、小課題3の「ソラノエクレピンA」（馬鈴しょ由来のふ化促進物質）との構造及び諸性質の差異を明らかにし、天然物由来のふ化促進物質資材の定性・定量評価方法を開発する。

3）小課題3：合成ふ化促進物質の低コスト供給及び効果的な処理技術の開発【北海道大学、農研機構（北海道農業研究センター）】

これまでに、馬鈴しょ由来のふ化促進物質「ソラノエクレピンA」の人工合成に世界で初めて成功し、強力なふ化促進活性を証明した。ソラノエクレピンAが低コストで大量に合成できれば、小課題2の天然物の利用に比べて、少量でも効果が高く使い勝手の良い線虫防除剤の供給が可能となる。そこで本課題では、圃場試験に供試できる程度のソラノエクレピンAの安定供給が可能な合成法を開発する。また、ソラノエクレピンAは構造が複雑で合成コストがかさむことから、ソラノエクレピンAと同様のふ化促進活性を示す類似化合物を探索し、合成を行う。また、これら合成ふ化促進物質の効果を室内試験によって評価するとともに、評価の高かった合成ふ化促進物質について、線虫汚染圃場での実用性の評価を行い、効果的な土壌処理法を開発する。

（2）中課題2：ジャガイモシストセンチュウの根絶を目指した防除モデルの策定

既存の防除技術である抵抗性馬鈴しょの栽培では年間80～90%、輪作の導入及び殺線虫剤（粒剤）の土壌施用では年間30～50%程度の線虫密度を低減させる効果が知られている。本課題では、これら既存の防除技術と組み合わせて、中課題1で新たに開発する「対抗植物の栽培」と「ふ化促進物質資材の土壌施用」を主要な馬鈴しょ栽培地域3か所において、現地の畑輪作に適合するよう導入し、根絶を目指した線虫密度の低減を図る。現地実証試験において、試験開始前の線虫汚染程度（高、中、低）に応じた防除効果を明らかにし、地域ごとの防除モデルを策定する。

1) 小課題1：北海道・道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示
【農研機構（北海道農業研究センター）】

3年間の防除組み合わせとして、1年目：ナス科対抗植物の休閑緑肥、2年目：ふ化促進物質資材処理後の非寄主作物栽培（豆類、野菜等）、3年目：抵抗性馬鈴しょ栽培を基本とし、道央地域の実情に応じた処理・栽培形態（処理・栽培の順番の変更、3処理から2処理を選択、薬剤防除との併用など）を検討して効果を実証する。

これらの試験結果をもとに、コスト・労力と線虫密度低減効果を分析し、道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における最適な防除モデルを提示する。

2) 小課題2：北海道・道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示【道総研（北見農業試験場）】

道東地域は、気象条件や土質、輪作体系等が道央地域と異なるほか、澱粉原料用馬鈴しょの栽培が主であるため、より低コストな防除技術が求められていることから、これら特性に合致した防除モデルを開発する必要がある。

そこで、道東地域の特性を踏まえて、各防除技術を組み合わせた現地実証試験を実施し、道東地域における線虫防除効果を明らかにするとともに、道央地域との相違点について明らかにする。

これらの試験結果をもとに、道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における最適な防除モデルを提示する。

3) 小課題3：暖地二期作馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示【長崎県】

暖地二期作馬鈴しょ栽培では、春作（5月収穫）と秋作（9月中旬植え）の間の約3か月間を裸地にしておくことが多く、この間に対抗植物の栽培や防除資材を投入することで、線虫密度を低減できる可能性がある。

本課題では、「抵抗性馬鈴しょ（春作）－ナス科対抗植物（又はイネ科緑肥作物＋ふ化促進物質資材）－抵抗性馬鈴しょ（秋作）」の1年3輪作を基本に行い、線虫密度の推移を明らかにする。具体的には、暖地では、青枯病などの馬鈴しょとトマトの共通病害虫が存在するため、新たに導入するナス科対抗植物については、青枯病発生助長のリスク評価についても検討する。また、イネ科緑肥作物は、ネコブセンチュウ等の暖地で問題となる線虫対策や、梅雨期の畑地表土の流亡防止対策や土壌物理性の改善効果が期待できることから、ふ化促進物質資材と組み合わせてジャガイモシストセンチュウに対する効果を明らかにする。

これらの試験結果をもとに、コスト・労力と線虫密度低減効果の関係を分析し、暖地二期作馬鈴しょ栽培における最適な防除モデルを提示する。

(3) 中課題3：ジャガイモシストセンチュウの根絶を確認するための手法の構築

根絶を確認するためには、現状では広大な面積の多量の土壌試料の調査が必要で

あり、困難を極める。そこで、各種防除を行った圃場における線虫分布特性を明らかにし、効率的・省力的で精度の高い検出法とサンプリング法を開発し、現状よりも容易に根絶を確認するための手法を構築する。

1) 小課題1：線虫活性卵の検出法の高精度化【農研機構（北海道農業研究センター）】

ジャガイモシストセンチュウは、寄生活性を失った死亡線虫やその残骸が長期間圃場に残ることが、根絶確認を難しくする一因となっていることから、寄生活性のある線虫のみを高精度に検出できる技術を開発する。

従来、線虫卵の生死の確認には、高倍率観察により卵の充実度や寄生菌の有無から判別する方法やナイルブルーなどの染色液で卵を染色する方法（以下「従来法」という。）が用いられるが、時間と手間がかかるうえ、熟練しないと結果は不明瞭となるなどの問題点がある。そこで本課題では、中課題1－3）の合成ふ化促進物質を利用し、寄生活性のある卵から確実にふ化幼虫を出現させる処理条件を解明して、簡便に卵の生死を判別できる手法を開発する。さらに、寄生活性のある線虫のみを簡便かつ高精度に検出できる「プラスチックカップ検診法」（以下「カップ検診法」という。）を利用し、特に低密度土壌における検出精度を向上させる条件を解明して、より精度の高い技術に改良する。

これら2つの技術は、異なる視点から線虫検出を行うものであることから、両者の組み合わせ効果を検証し、検出精度のさらなる向上をめざす。

2) 小課題2：モデル圃場における線虫検出精度の検証【道総研（北見農業試験場）、農研機構（北海道農業研究センター）、長崎県】

小課題1で開発する線虫活性卵の高精度検出法を用いて、中課題2の現地実証圃場において2～3年間の定点観測による線虫検出調査を行い、線虫密度の推移を栽培履歴とあわせて解析し、実用性を検証する。具体的には、線虫対策によってごく少発生（あるいは非検出）になった圃場を選定し、土壌採取地点数を既存の文献情報等を踏まえ数段階に設定したサンプリングを実施する。サンプリング法と各検出法及びポット栽培による線虫確認の有無の関係、さらに線虫分布特性等を明らかにし、最小限の労力で根絶確認が可能な要件を解明したうえで、根絶確認手法を構築する。

3. 年次計画

項目	平成24年度	平成25年度	平成26年度
1. ジャガイモシストセンチュウの新たな防除技術の開発			
(1) ナス科対抗植物の栽培による線虫密度低減技術の開発	ナス科対抗植物の栽培による線虫密度低減技術の開発 (雪印種苗、農研機構 [北海道農業研究センター])		
(2) 天然物由来ふ化促進物質資材の低コスト・安定供給技術の開発	天然物由来ふ化促進物質資材の低コスト・安定供給技術の開発 (雪印種苗、道総研 [工業試験場])		
(3) 合成ふ化促進物質の低コスト供給及び効果的な処理技術の開発	合成ふ化促進物質の低コスト供給及び効果的な処理技術の開発 (北海道大学、農研機構 [北海道農業研究センター])		
2. ジャガイモシストセンチュウの根絶を目指した防除モデルの策定			
(1) 北海道・道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示	北海道・道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示 (農研機構 [北海道農業研究センター])		
(2) 北海道・道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示	北海道・道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示 (道総研 [北見農業試験場])		
(3) 暖地二期作馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示	暖地二期作馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示 (長崎県)		
3. ジャガイモシストセンチュウの根絶を確認するための手法の構築			
(1) 線虫活性卵の検出法の高精度化	線虫活性卵の検出法の高精度化 (農研機構 [北海道農業研究センター])		
(2) モデル圃場における線虫検出精度の検証	モデル圃場における線虫検出精度の検証 (道総研 [北見農業試験場]、農研機構 [北海道農業研究センター]、長崎県)		
所要経費 (合計)	15,000 千円	14,850 千円	14,110 千円

4. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	農研機構（北海道農業研究センター）	奈良部 孝	40
1. ジャガイモシストセンチュウの新たな防除技術の開発	農研機構（北海道農業研究センター）	○ 伊藤 賢治	10
(1) ナス科対抗植物の栽培による線虫密度低減技術の開発	雪印種苗 農研機構（北海道農業研究センター）	△ 佐久間 太 伊藤 賢治	20 前出
(2) 天然物由来ふ化促進物質資材の低コスト・安定供給技術の開発	雪印種苗 〃 〃 〃 道総研（工業試験場） 〃	桂川 尚彦 副島 洋 眞木 祐子 小鏑 亮介 (平成26年5月～) 野村 隆文 △ 執行 達弘	10 20 40 10 20 20
(3) 合成ふ化促進物質の低コスト供給及び効果的な処理技術の開発	北海道大学 農研機構（北海道農業研究センター）	△ 谷野 圭持 奈良部 孝	20 前出
2. ジャガイモシストセンチュウの根絶を目指した防除モデルの策定	農研機構（北海道農業研究センター）	○ 奈良部 孝	前出
(1) 北海道・道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示	農研機構（北海道農業研究センター）	△ 奈良部 孝	前出
(2) 北海道・道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示	道総研（北見農業試験場） 〃 〃	△ 古川 勝弘 小野寺鶴将 (平成26年5月～) 佐々木 純 (平成26年5月～)	5 35 10
(3) 暖地二期作馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示	長崎県 〃	△ 菅 康弘 (平成24年4月～25年3月まで) 福吉 賢三 (平成25年4月～) 寺本 健	15 15 10
3. ジャガイモシストセンチュウの根絶を確認するための手法の構築	道総研（北見農業試験場）	○ 小野寺鶴将	前出
(1) 線虫活性卵の検出法の高精度化	農研機構（北海道農業研究センター）	△ 奈良部 孝	前出
(2) モデル圃場における線虫検出精度の検証	道総研（北見農業試験場） 〃 〃	△ 古川 勝弘 小野寺鶴将 (平成26年5月～) 佐々木 純 (平成26年5月～)	前出 前出 前出

	農研機構（北海道農業研究センター） 長崎県 〃		相場 聡 寺本 健 菅 康弘 (平成 24 年 4 月～ 25 年 3 月まで) 福吉 賢三 (平成 25 年 4 月～)	1 0 前出 前出 前出
--	-------------------------------	--	---	-------------------------------

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

Ⅱ. これまでに得られた成果の概要

1. 中課題1：ジャガイモシストセンチュウの新たな防除技術の開発

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
(小課題1) ・ナス科対抗植物については、播種時期や栽培期間、播種密度が生育に及ぼす影響、及び、栽培上問題となり得る雑草及び病害虫の発生状況を確認し、対応策を明らかにする(小課題1関連)。(平成24年度) ↓ ・ナス科対抗植物については、生産者が利用できるよう機械播種を主体とした播種方法を開発する。また、改良した栽培法によって、対抗植物の生育や線虫密度低減に及ぼす影響を確認する(小課題1関連)。(平成25年度) ↓ ・ナス科対抗植物の栽培マニュアルを策定し、期待される線虫防除効果を明示する(小課題1関連)。(平成26年度) (小課題2)	・対抗植物の栽培法は、播種時期：6月上旬から8月上旬、播種量：1.0kg/10a、雑草防除：除草剤(メトリブジン水和剤)の土壌処理、が効果的であった。一定量の根量確保で線虫密度を90%以上低減することができた(表1)。(平成24年度) ※1 ↓ ・汎用機械であるブロードキャスター及びドリルシーダーを用いて、種子を肥料で増量することにより、対抗植物を播種できることを確認した。播種法による生育差は認められなかった(図1)。播種量を半量(0.5kg/10a)としても除草剤処理によって20本/m²以上の株数が確保でき、現地汚染圃場の線虫密度(中～高密度)を、播種2か月後に約90%低減することができた。ただし、大型汎用機械による播種作業の精度が低いと、十分な線虫密度低減効果が得られないことが明らかとなった(表2)。(平成25年度) ※2 ↓ ・北海道の大規模栽培における機械播種体系を前提とした、ナス科対抗植物栽培マニュアルを作成した。本マニュアルに基づく栽培により、延べ5回の現地実証試験すべてにおいて、線虫卵密度は栽培前の20%以下に低減した(図2、表3)。線虫発生程度が乾土1gあたり50卵程度の中密度であれば要防除水準である乾土1gあたり10卵以下まで減少効果が期待できることが分かった。(平成26年度) ※3 ・多孔質鉱物資材を培地としてトマトを養液

・天然ふ化促進物質については、製法の改良による効力の向上を確認する（小課題2関連）。（平成24年度）	栽培し、栽培後の培地を乾燥後粉末化することで、ふ化促進物質が大量に吸着した資材約5tを生産者レベルで作製できた。鉱物の組成はゼオライト（以下「TZ」という。）：珪藻土（以下「WS」という。）=3:7がトマト栽培にもふ化促進物質の吸着にも優れ、粉碎後の粒度を1mm以下にするとふ化促進効果がより高まった（図3，4）。（平成24年度）※4
↓ ・天然ふ化促進物質については、製法の改良を進め、一定の効力を得るための資材コストを明らかにする。また、効力のもととなる物質を特定し、諸性質を明らかにする（小課題2関連）。（平成25年度）	↓ ・平成24年度に明らかになったふ化促進物質の吸着性とトマト栽培適性から、資材の配合比と粒度を改良し（TZ：WS=4:6及び直径3mmに小径化）、2tの量産品を試作した。この試作資材を用いたトマト栽培は順調で、今後、栽培後資材のふ化促進効果試験を実施予定である。一方、低コスト化をめざした「混合法」で得られた資材は、トマトの栽培及びふ化促進物質吸着で従来品に劣らず（図5）、資材コストの低減（1kgあたり200円台から100円台）が図られることが明らかとなった。（平成25年度）※5 ・トマト根浸出物中に含まれるふ化促進活性のもととなる物質について精製をすすめた結果、馬鈴しょ由来のソラノエクレピンAとは異なる物質であることが明らかとなり（図6）、トマト由来のふ化促進物質を特定するためのNMR解析が可能なレベルまで純度を上げることができた（図7）。（平成25年度）※6 ・人工気象器内ポット栽培による予備試験の結果、改良した天然ふ化促進物質資材10aあたり200～500kg処理相当で、処理55日後に約90%の線虫密度低減効果が得られた（図8）。（平成25年度）※7 ↓

↓ ・合成ソラノエクレピン A の圃場における処理法と線虫防除効果を明らかにする。低コストで合成可能な類似ふ化促進物質を見だし、ふ化促進活性を明らかにする（小課題 3 関連）。（平成 26 年度）	A の線虫汚染土壌 1 kg 当たり 10^{-5} g 処理（10a あたり 1g 処理相当）によって、97% の線虫密度低減を実現した（図 8）。（平成 25 年度）※ 7 ↓ ・現地線虫汚染圃場において、合成ソラノエクレピン A 水溶液を、噴霧器を用いて土壌表面に散布・混和处理を行ったところ、0.1mg/m²処理では、処理後約 2 か月で卵密度が初期密度の 15%まで減少し要防除水準以下となった。0.025 mg /m²濃度でも約 50%に減少した（図 13）。（平成 26 年度）※12 ・ソラノエクレピン A と構造の類似した化合物約 40 種類を合成し、線虫ふ化活性を調査したところ、ソラノエクレピン A に匹敵する活性を持つものは見いだせなかったが、$10^{-6} \sim 10^{-7}$ g /ml 濃度でわずかなふ化活性を示すものが複数見つかった（図 14）。（平成 26 年度）※13
成果目標：ナス科対抗植物とふ化促進物質の利用技術を開発して、利用マニュアルを策定し、期待される防除効果を明示する。	

<成果の概要の補足>

※ 1 トマト野生種では、馬鈴しょに登録のある除草剤（メトリブジン水和剤 100g/100L）を播種時土壌処理することで、他の処理区より多い乾物重（310kg/10a）が得られた。雑草との競合に勝てば初期段階から根量が確保されるため、除草剤区は播種後 2 か月で卵密度を 86%低減できた。雑草が多くてもある程度根量が確保された区（単独区、+ベッチ 3 kg 区）では 3 か月後には卵密度を 90%以上低減することができた（表 1）。なお、播種時期が早い場合は圃場により 2 ～ 3 回の疫病防除が必要であった。

表 1 対抗植物各処理区の線虫密度低減効果（現地圃場（檜山地域））

処理区（10a あたり播種量）	播種時 卵密度	播種後 1 か月		播種後 2 か月		播種後 3 か月	
		卵数	播種時比	卵数	播種時比	卵数	播種時比
トマト野生種 1kg 単独	26.1	29.6	113	15.5	59	2.5	10
トマト野生種 1kg+除草剤	27.4	9.3	34	3.8	14	1.0	4
トマト野生種 1kg+ベッチ 3kg ^{a)}	9.6	4.7	49	5.8	60	0.6	6

トマト野生種 1kg+ベッチ 5kg ^{a)}	3.4	3.3	97	3.6	106	1.8	53
トマト野生種 1kg+ライ麦 2kg ^{b)}	7.5	1.5	20	6.4	85	5.8	77

注) a)マメ科緑肥, b)イネ科緑肥、ともに雑草抑制を目的にトマト野生種と混播した。

※2 トマト野生種は、汎用播種機械であるブロードキャスター及びドリルシーダーを用いて、播種できることを確認した。播種後の生育は播種方法で大きな差はなく（図1）、播種後の除草剤管理（メトリブジン水和剤 100g/100L）で、乾物収量 600～700kg/10a が得られた。生育途中の雑草対策にメトリブジン水和剤（100g/100L）を利用したが、トマト野生種に生育障害は認められなかった。一方、除草剤が利用できないことを想定してフレイルモアによる高刈りを実施したが、トマト野生種は地上部を刈られてもわき芽を伸ばし再生した。ハリナスビについても4ha 規模で汎用機械播種ができることを確認し、除草剤処理と地上部高刈りで生育管理ができた。ただし、機械播種については播種精度が低いと十分な線虫密度低減効果が得られないことが明らかとなった（表2、ブロードキャスターの反復①のみ播種精度が高く生育良好、他の区は播種ムラで雑草繁茂となった）。

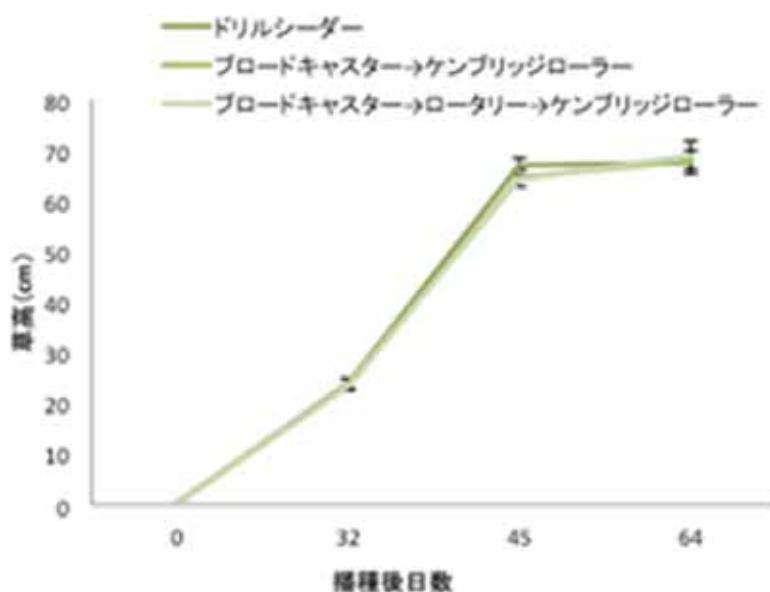


図1 3通りの播種法によるトマト野生種の生育状況の推移(雪印種苗圃場(長沼))

表2 トマト野生種の播種方法の違いによる線虫密度低減効果(現地圃場(オホーツク地域))

処理区	反復	初期 卵数	播種2ヵ月後 卵数	初期 密度比	補正密度 指数
ブロードキャスター		16.8	1.6	10	14
		57.4	46.4	81	121

	17.8	11.9	67	100
ドリルシーダー	65.0	36.9	57	85
	82.4	54.1	66	98
	61.0	30.8	50	75

注1) トマト野生種 1kg/10a+ライムギ 2kg/10a (雑草抑制目的) を夏播きで利用

注2) 卵数は乾土 1g あたり

注3) 補正密度指数: ブロードキャスター③区 (播種ムラでトマト野生種の生育が認められなかった区) を基準

※3: 平成26年度までの3年間 (予備試験を含め4年間) とも、北海道の線虫発生圃場にトマト野生種 (*Solanum peruvianum*) またはハリナスビ (*S. sisymbriifolium*) の種子 1 kg/10a 相当を6月中旬～7月上旬に播種し、休閒緑肥として 60～80 日間栽培すると、卵密度は栽培前の 20%以下に低減した (図2)。線虫発生程度が乾土 1 g あたり 50 卵程度の中密度であれば要防除水準である乾土 1 g あたり 10 卵以下まで減少効果が期待できる。大規模栽培の場合、ドリルシーダーまたはブロードキャスターで肥料と同時に播種すると、対抗植物は良好に発芽・生育し、また、線虫密度低減効果が得られることが明らかとなった (表3)。雑草が多いとナス科対抗植物の生育量が確保できず、短期間栽培での線虫密度低減効果が得られないことがあるので、雑草の多発圃場では雑草対策が必須であった。以上をとりまとめて、栽培マニュアルを作成した。

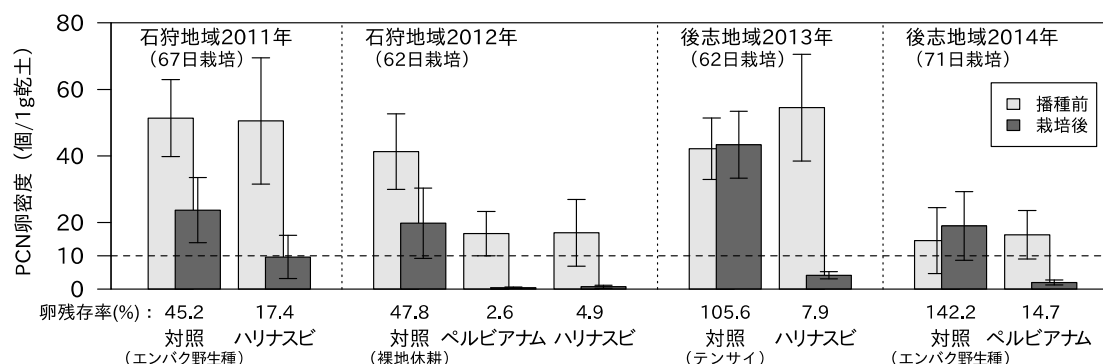


図2 北海道の現地実証試験におけるナス科対抗植物短期間栽培の線虫密度低減効果

注) ペルビアナム: 野生トマト「ポテモン」(雪印種苗 (株))、ハリナスビ: 「ロケットリーフ」((有) TOMTEN) を使用。誤差棒は標準偏差、 $y=10$ の破線は要防除密度水準を示す。

表3 野生トマトの播種方法と PCN 密度低減効果及び生育量 (道東地域、2014 年)

播種法・処理	卵密度 (個/1g 乾土)		草丈 (cm)	乾物収量 (kg/10a)
	播種前	栽培後		
ブロードキャスター	16.9	1.8	82	521
ドリルシーダー	16.7	1.1	79	559
対照 (エンバク野生種)	20.4	25.5	108	445

注) 栽培期間は 62 日 (7/3 播種、9/3 刈り取り)。

※4 TZ : WS=10:0、5:5、3:7 の組成の鉱物ペレットを培地としてトマトを栽培し、ふ化促進物質を吸着させ、ふ化促進物質資材を作製した。ペレットの強度は、3:7 はややもろく、トマトの収量及び糖度は 5:5 と 3:7 で有意な差はなかった。ペレットを粉碎後、線虫汚染土壌 100g と混和し 41 日間 22℃で培養したときのふ化幼虫数は、10:0<5:5<3:7 の順で多く（残存卵は逆に少なく）なり（図3）、ペレット破碎後の粒度が 1 mm を超えると徐々にふ化率が下がる傾向にあった（図4）。以上から、ペレットの強度を保ちながら WS の割合の高いペレットを製造し、粒度 1 mm 以下の割合が高くなるような粉碎法が、ふ化促進効果の向上に有効である。

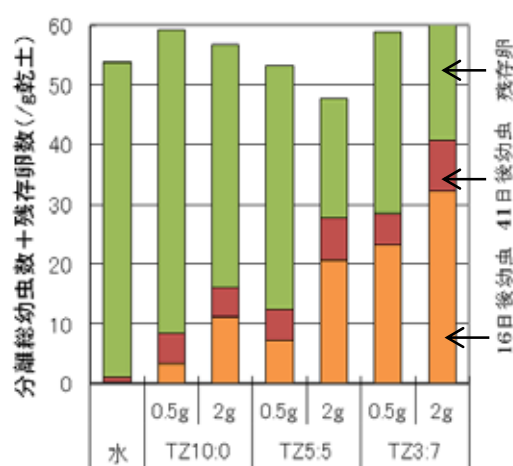


図3 ふ化促進物質資材の組成の違いによるふ化促進効果の差異(100g カップ試験)

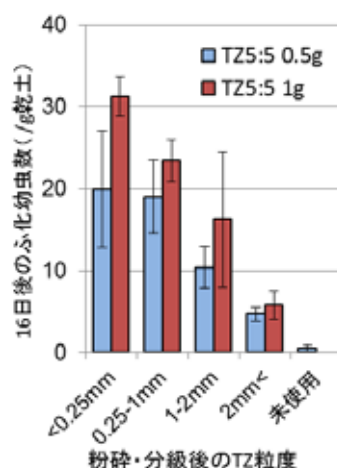


図4 粉碎後粒子サイズ違いによるふ化促進効果の差異(100g カップ試験)

※5 これまでふ化促進物質を吸着する効果の高いトマト栽培用培地として、TZ : WS= 5:5 の組成で複合して焼成した鉱物ペレット（TZ5WS5）を使用していたが、製造コスト高であった。そこで両者を別々に焼成してから混合させた資材（TZ600+WS600）を培地としてそれぞれトマトを栽培し、ふ化促進物質を吸着させ、ふ化促進物質資材を作製した。それぞれトマト栽培後の培地についてふ化促進活性及び徐放性について検証したところ、大きな差異は見られなかった（図5）。このことから、複合させるステップを除くことで製造コスト低減（1 kg あたり 200 円台から 100 円台）が図れることが明らかになった。さらに、トマト栽培後の粉末化工程を省略し低コスト化できるよう、直径 3 mm に小径化した資材を用いた混合法の試作を継続している。

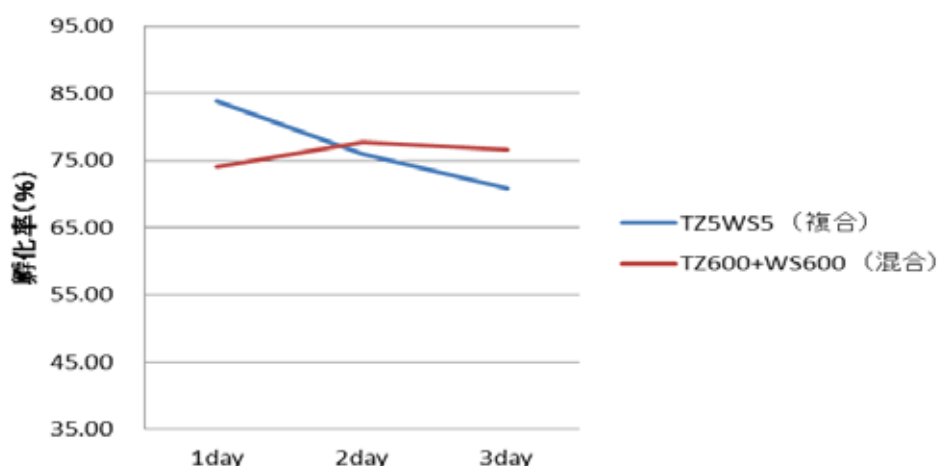


図5 複合により得られた資材のふ化促進活性及び徐放性

平成 24 年度の試験結果から、ふ化促進物質の吸着性では TZ : WS = 3:7 の配合比よりも、強度や製造歩留まりの面では TZ : WS = 5:5 の配合比が適していた。そこで、平成 25 年度は両方の利点が期待できる TZ : WS = 4:6 の配合比の鉍物ペレットを試作し、2 t の量産品を完成させた。また、従来の鉍物ペレットは成形のしやすさから直径 6 mm としていたが、保水力が高くトマト栽培上有利な直径 3 mm のペレットも試作した。現在、技術的課題を解決して量産化を進めている。これら新規形態の資材を用いたトマト栽培を北海道農業研究センターと現地の生産者のハウスで実施しており、生育・収穫量とも従来品と同程度以上の結果が得られた。

※6 本事業開始前の試験結果からトマト根浸出物中に 3 種類のふ化促進物質が存在することが予想されていたが、その精製・単離は極めて困難であった。本事業では、ソラノエクレピン A が得られたことから、この物質が溶液中では分解速度が比較的速いことを明らかにすることができた。これに対応し、トマト中ふ化促進物質の迅速精製法を構築することで、精製効率が大幅に向上させることができた。

これらのうち、物質 C はソラノエクレピン A との挙動の類似性から同一物質である可能性が示唆されていた。そこで合成ソラノエクレピン A を標品として HPLC の保持時間による比較を行ったところ、活性画分の溶出時間とソラノエクレピン A の溶出時間が異なり、物質 C とソラノエクレピン A が異なる物質であることが示唆された (図 6)。さらに、活性画分の NMR 分析を行ったところ、ソラノエクレピン A は検出されず、トマト根浸出物中にソラノエクレピン A 以外のふ化促進物質が存在することを支持する結果となった。この画分はさらに精製をすすめ、活性成分が主体として検出されるレベルにまで純度が向上した (図 7)。現在、この画分について NMR 分析をすすめている。

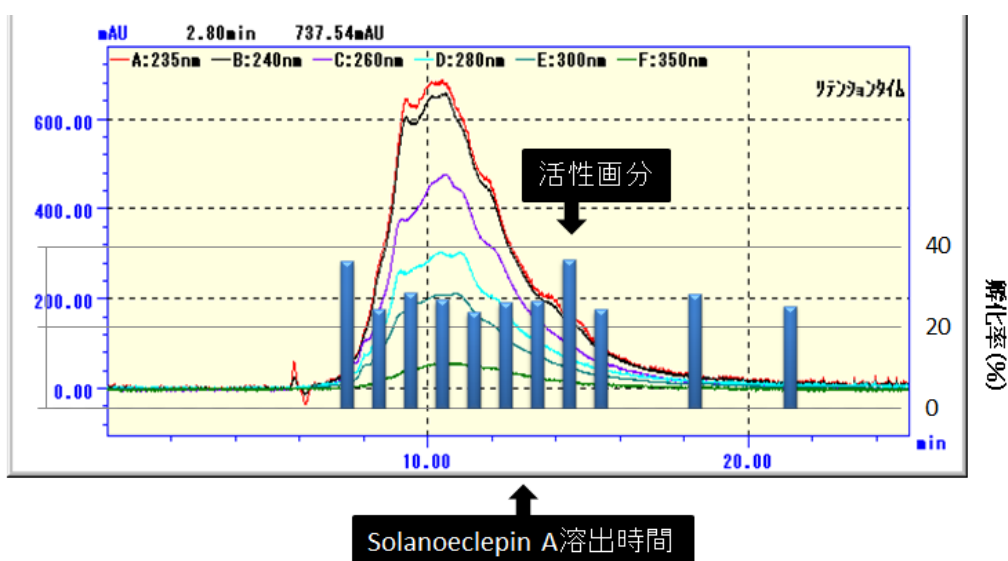


図6 トマト根由来物質 C の HPLC 精製時のクロマトグラム及び各画分のふ化促進活性

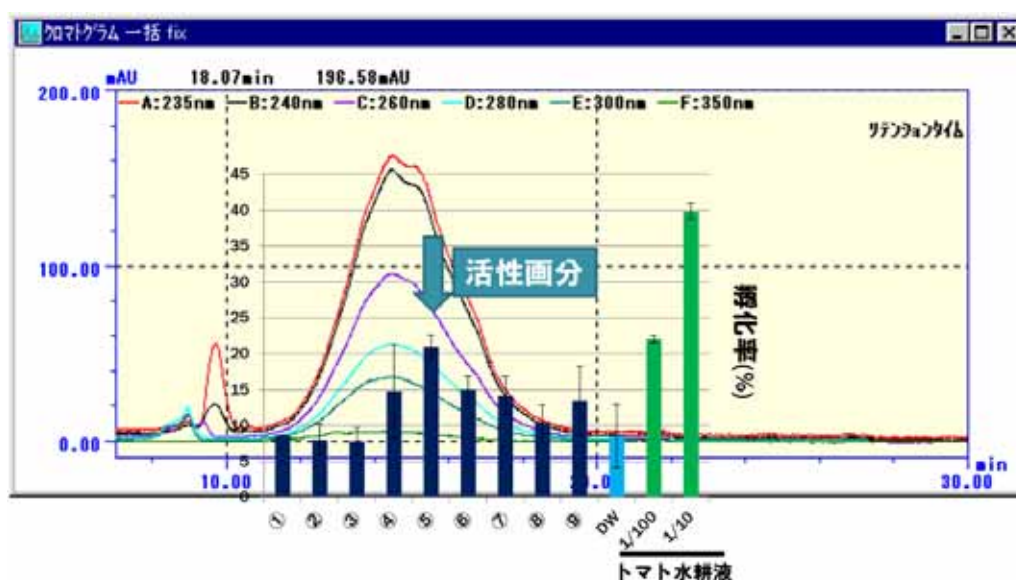


図7 トマト根由来物質 C の HPLC 精製時のクロマトグラム及び各画分のふ化促進活性

※7 ふ化促進物質の吸着材として TZ : WS= 3:7 の組成の鉱物ペレットを培地としてトマトを栽培し、栽培後粉碎した資材は、同 5:5 の組成よりもふ化促進効果に優れた。トマト栽培時の灌水量を多めにした資材（農研 3:7）は、さらに効力が高かった。人工気象器内ポット試験による最適条件下の予備試験において、天然ふ化促進物質資材 200～500kg/10a 処理相当で、最もふ化促進効果の高い資材では処理 55 日後に約 90% の線虫密度低減効果が得られた（図 8）。また、同条件で合成ソラノエクレピン A の効果を確認したところ、10a あたり 1 g 処理で 97% の線虫低減を実現した（図 8）。

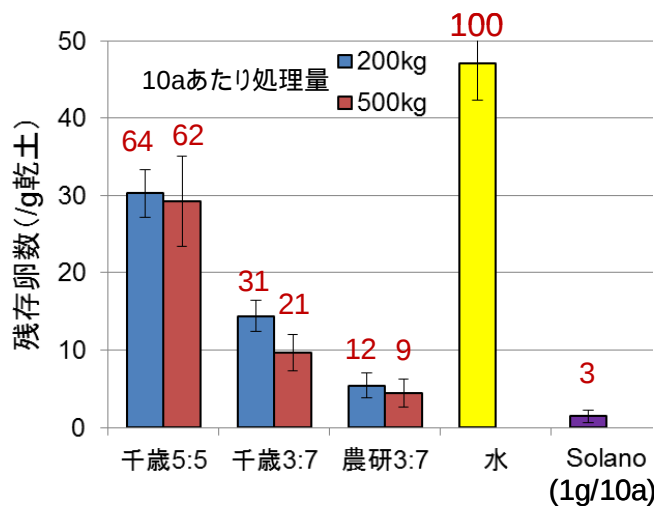


図8 ポット試験による天然物及び合成ふ化促進物質資材処理による線虫密度低減効果

注) 赤字は無処理(水のみを添加)を 100 としたときの相対線虫密度。実際の処理量は土壌1kg 当たりそれぞれ、2g、5g、 10^{-7} g/ml $\times$ 100ml を混和又は散布。

※8：平成24～26年度の3年間の試験において、北海道の線虫発生圃場にトマト由来の天然ふ化促進物質資材10aあたり500kg～1t処理したところ、24年度と25年度の試験では無処理比50%前後の線虫密度低減効果が得られたが、26年度の試験では実施圃場すべてで効果が全く認められなかった(図9)。26年は干ばつ傾向で、資材処理後約1か月間降雨がなかった圃場もあり、気象条件が効果に影響を与えることが示唆された。

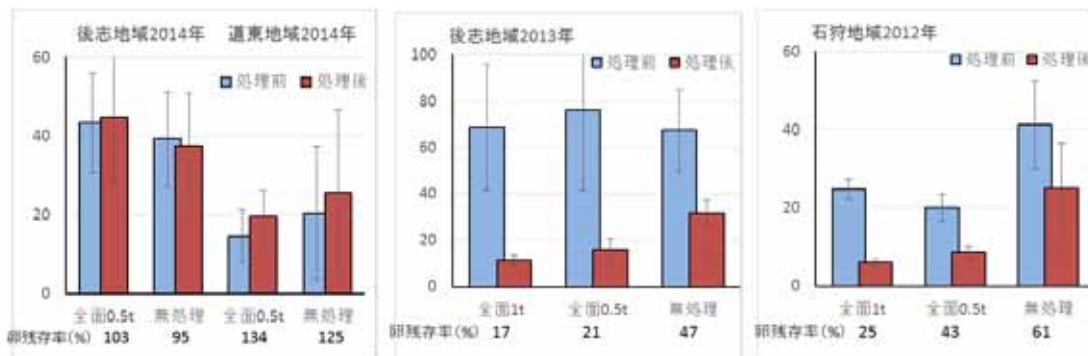


図9 北海道の現地実証試験における天然ふ化促進物質資材の線虫密度低減効果

注) 前年にトマトを栽培した圃地を粉砕して資材化したものを使用。誤差棒は標準偏差を示す。

※9：粉砕処理が不要でふ化促進物質の吸着性に優れるトマト栽培用の圃地として、ヤシ殻(ココピート)及び園芸培土のそれぞれに珪藻土を混合したものを選定した。トマトを約5か月栽培した圃地を乾燥し線虫汚染土壌と混和したところ、ヤシ殻のふ化活性は高く、従来の圃地成分である珪藻土と混合することで、ふ化促進効果が向上した(図10)。この混合圃地は粉砕処理が不要で低コストであり、トマト収量は従来の圃

地より高く、軽量で取り扱いやすいなど、従来品より優位性が認められた。

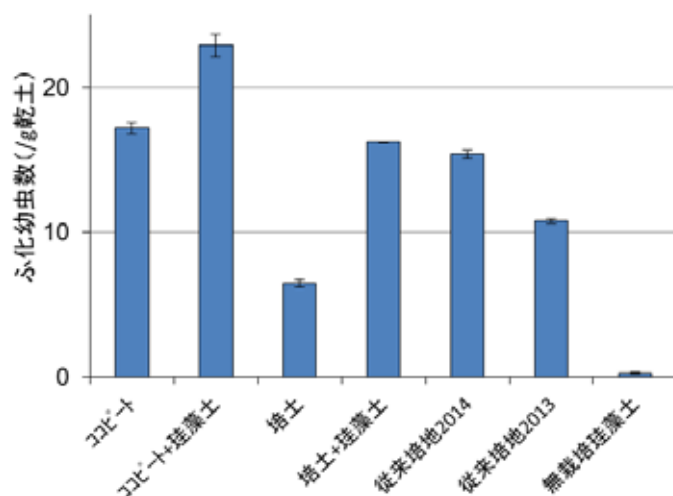


図 10 トマトを約 5 か月栽培した各種培地の線虫汚染土壌に対する線虫ふ化促進効果

注) 線虫汚染土壌 100g に各培地 0.25～1g 混和後、9 日目にベルマン法でふ化幼虫を分離。誤差棒は標準偏差を示す。

※10 ソラノエクレピン A の合成はすでに成功していたが、再精製することで、天然のふ化促進物質（トマト水耕液）と同等の高いふ化率を得た（図 11）。

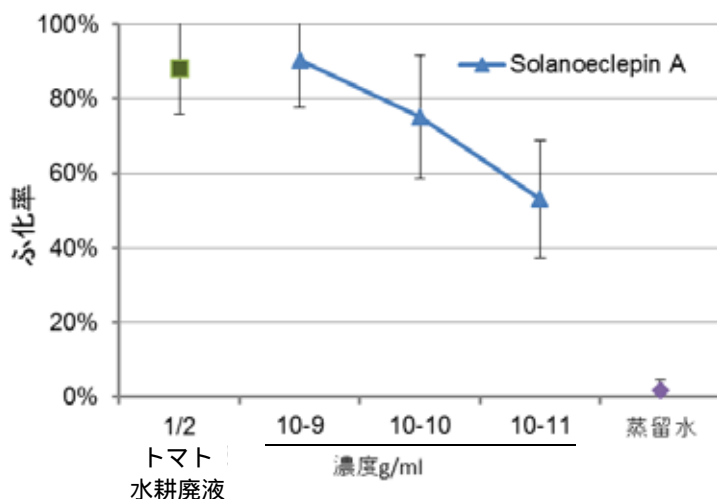


図 11 ソラノエクレピン A 及びトマト水耕廃液のふ化促進活性

注) ふ化率＝22℃21 日後のふ化幼虫／初期卵数、卵懸濁液試験

※11 ソラノエクレピン A の構造をヒントに合成した新規化合物 ISE-015～021 のうち、ISE-016 と ISE-017 は 10^{-7} g/ml 濃度で、天然ふ化促進物質（トマト水耕液）と比較するとふ化率は低いながらも安定したふ化率が認められた（図 12）。なお、ソラノエクレピン A によるふ化率は、これまでの試験では高い結果（70～80%程度）を示していたが、今

回の試験では、供試卵の状態が悪い等の条件下で実施したため、ふ化率が低い結果となった（天然ふ化促進物質の場合、供試卵の状態が悪い等の条件下でも高いふ化率を示すが、その原因は現時点では不明である。）。このため、今後、ソラノエクレピン A の至適ふ化条件を調整した後、再試験を実施することで、ふ化率の上昇が期待できる。

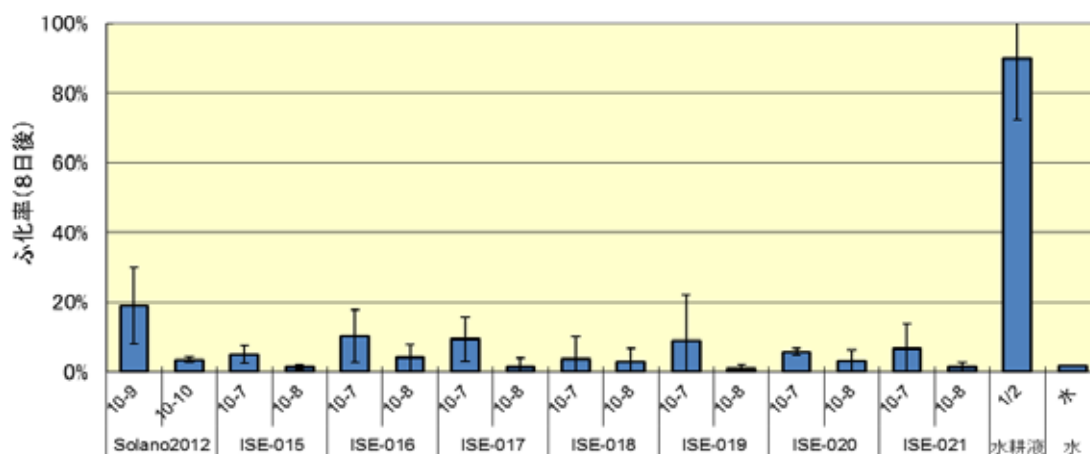


図 12 新規化合物及びソラノエクレピン A、トマト水耕廃液のふ化促進活性

注) ふ化率=22℃ 8 日後のふ化幼虫／初期卵数、卵懸濁液試験

※12：散布濃度を 10^{-6} ～ 10^{-7} g/ml、散布量 300ml/m²として、現地線虫汚染圃場に人工合成したソラノエクレピン A 水溶液を、噴霧器を用いて土壌表面に散布・混和处理を行った。ソラノエクレピン A の 0.1mg/m²処理では、処理後約 2 か月で PCN 密度が初期密度の 15%まで減少して要防除水準以下になり、0.025 mg /m²濃度でも約 50%に減少した（図 13）。ソラノエクレピン A 処理量は 1ha あたり 1g で有効であり、有機リン系殺線虫剤の有効成分量 1ha あたり 3kg と比較して、ごく少量で効果が高かった。

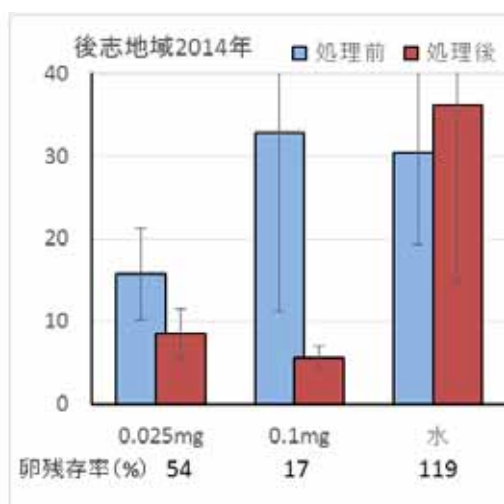


図 13 ソラノエクレピン A 水溶液処理による線虫卵密度低減効果

7/9 処理 9/9 調査

※13 ソラノエクレピン A の構造をヒントに合成した新規化合物 ISE-027～037 のうち、

ISE-029, 032, 035 はソラノエクレピン A と比較すると高濃度でふ化率は低いながらも、安定したふ化率が認められた（図 14）。しかし、さらに条件を変えてもふ化率の上昇は認められず、線虫汚染土壤中でのふ化促進効果も認められなかったことから、ソラノエクレピン A 代替品候補は見いだせなかった。

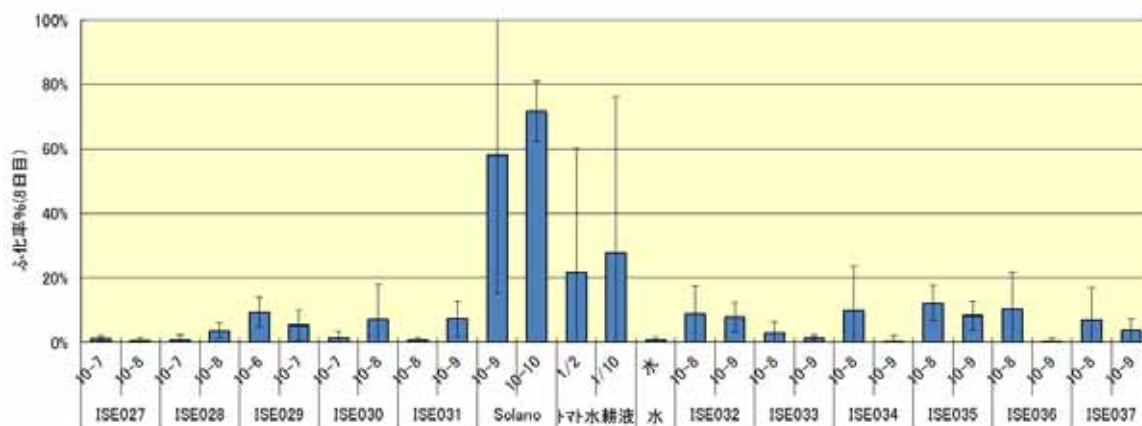


図 14 新規化合物及びソラノエクレピン A、トマト水耕廃液のふ化促進活性

注) ふ化率＝22℃ 8 日後のふ化幼虫／初期卵数、卵懸濁液試験

2. 中課題2：ジャガイモシストセンチュウの根絶を目指した防除モデルの策定

(1) 全体計画の概要

工程表	進捗状況・成果
(小課題1) ・個別・複数の線虫防除技術を現地の線虫汚染圃場において実践し、初年度の防除効果を明らかにする。問題点及び地域の実情に応じた改良点を明らかにし、地域間で共有するとともに次年度に生かす(小課題1関連)。(平成24年度) ↓ ・初年度に指摘された改善点をもとに、同一圃場において初年度とは異なる処理を実施し、2年間の相乗的な防除効果を明らかにする(小課題1関連)。(平成25年度)	・北海道・道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示として、天然物由来ふ化促進物質資材の栽培前処理(5月、1t/10a)では無処理比50%以上(図1)、ナス科対抗植物の栽培では同80~90%の線虫密度低減効果(図2)を実証した。(平成24年度)※1 ↓ ・北海道・道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における防除モデルとして、現地実証圃場において、平成24年度、ナス科対抗植物、ふ化促進物質資材及び抵抗性馬鈴しょの各処理によって線虫密度を低減し、さらに平成25年度、抵抗性馬鈴しょを栽培し、2年間(及び平成23年度の予備試験を含めると3年間)の相乗効果を確認した。その結果、平成23年度の試験前に約70~80卵/g乾土の高密度発生であった現地実証圃場を、平成23年度と24年度の処理で同1~3卵程度まで低減でき(図3)、さらに平成25年度の抵抗性馬鈴しょ全面栽培によって、卵密度は、圃場内すべての採集地点において検出限界に近い1卵/g乾土未満となった。根絶状態に近づいたものの、精度の高い検出法により、まだ生きた卵が残存することが確認できた(表1)。 平成25年度より試験を開始したもう一つの現地実証圃場において、処理77日後、ナス科対抗植物栽培は無処理比約90%低減、非寄主作物(てん菜)+ふ化促進物質資材処理は同約50%低減の効果が得られた(図4)。 特に、中課題1で改良した資材を用いること

↓ ・3年間のそれぞれ異なる防除技術の組み合わせによって得られた防除効果を比較し、地域の実情に合致し、かつ根絶を目指せる防除モデルを策定する（小課題1関連）。（平成26年度） ↓ （小課題2） ・個別・複数の線虫防除技術を現地の線虫汚染圃場において実践し、初年度の防除効果を明らかにする。問題点及び地域の実情に応じた改良点を明らかにし、地域間で共有するとともに次年度に生かす（小課題2関連）。（平成24年度） ↓ ・初年度に指摘された改善点をもとに、同一圃場において初年度とは異なる処理を実	で、処理量 500kg /10a の畦間処理でも、1 t/10 a の全面処理と同程度の効果が得られた。これによってコスト・労力の削減が期待できる。（平成25年度）※2 ↓ ・北海道・道央地域の青果用馬鈴しょ栽培における防除モデルとして、非寄主作物と抵抗性品種2作（又は対抗植物かふ化促進物質資材と抵抗性品種）を組み合わせることで、中密度程度（約50卵/g乾土）の線虫汚染圃場において根絶に近い卵密度まで低減が可能であった（図5）。一方、高密度（約100卵/g乾土）の線虫汚染圃場では同程度の効果を得るのに、抵抗性品種3作が必要であった（図6）。いずれも完全な根絶達成までにはさらに年限を要することが考えられたが、上記輪作を行うことで、根絶の可能性が示された。以上のことから、根絶を目指した防除モデルは、青果用馬鈴しょ抵抗性品種「キタアカリ」「とうや」「きたかむい」等の栽培3作以上と非寄主作物の輪作が有効であり、ふ化促進物質や対抗植物の輪作への導入は根絶までの年限の短縮に有効であると結論した。（平成26年度）※3 ・北海道・道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示として、天然由来ふ化促進物質資材の処理（6月、1 t/10a）では処理前比約50%の線虫密度低減効果が認められた（図7）。小麦等収穫後（8月下旬以降）圃場への処理では同資材の効果は判然としなかった。（平成24年度）※4 ↓ ・北海道・道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における防除モデルとして、平成24年度
--	--

施し、2年間の相乗的な防除効果を明らかにする（小課題2関連）。（平成25年度）	の小麦収穫後、ふ化促進物質資材を0.5～1 t/10a処理した現地実証圃場に、平成25年度、生育初期のてん菜畦間、ニンジン播種前、小麦収穫後（連作区）にふ化促進物質資材を追加処理した。 てん菜畦間処理（6月上～中旬、666kg/10a）の結果は、処理前比20～50%の線虫密度低減効果が認められた（図8）。平成24年度処理と合わせた2年間の相乗効果の程度は不明瞭であった（図9）。ニンジン播種前処理（1 t/10a）の結果は、線虫密度が無処理を含め極低密度に下がった（図8，9）。小麦収穫後（連作区）処理（0.5t/10a）は調査中である。いずれの処理区も処理前の卵密度が低く、卵数のみの調査では明瞭な結果が得られなかったため、中課題3のカップ検診法などを用いた検出法による調査を継続している。（平成25年度）※5
↓ ・3年間のそれぞれ異なる防除技術の組み合わせによって得られた防除効果を比較し、地域の実情に合致し、かつ根絶を目指せる防除モデルを策定する（小課題2関連）。（平成26年度） （小課題3） ・個別・複数の線虫防除技術を現地の線虫汚染圃場において実践し、初年度の防除効果を明らかにする。問題点及び地域の実情に	↓ ・北海道・道東地域の澱粉原料用馬鈴しょ栽培における防除モデルとして、初期密度が0～14卵／乾土1gと低い場合、3年間の輪作体系を、「非寄主作物－非寄主作物－馬鈴しょ抵抗性品種」とすることで、ふ化促進物質資材処理の有無にかかわらず、根絶に近い卵密度（0～1.5卵／乾土1g）まで低減できた（図10）。根絶を目指した防除モデルは、澱粉原料用抵抗性品種「アーリースターチ」「アステルタ」「コナユキ」等と非寄主作物の輪作が有効であり、低密度であれば抵抗性品種2作で根絶の可能性が示された。（平成26年度）※6 ・暖地二期作馬鈴しょ栽培における防除モデルの提示として、春作馬鈴しょ収穫後のイネ科緑肥作物播種時と緑肥鋤き込み時にふ化

応じた改良点を明らかにし、地域間で共有するとともに次年度に生かす（小課題 3 関連）。（平成 24 年度）	促進物質資材を施用したところ、イネ科緑肥作物播種時の施用でふ化幼虫の減少し始める時期が遅くなる傾向を認めたが、イネ科緑肥作物鋤き込み時の施用ではふ化幼虫の発生を確認できなかった（図 11）。また、ポット試験において、ナス科対抗植物の栽培による後作馬鈴しょでの青枯病発生リスクが高まることが判明した（図 12）ため、これらの暖地馬鈴しょ圃場への適用は困難と判断した。（平成 24 年度）※ 7
↓ ・初年度に指摘された改善点をもとに、同一圃場において初年度とは異なる処理を実施し、2 年間の相乗的な防除効果を明らかにする（小課題 3 関連）。（平成 25 年度）	↓ ・暖地二期作馬鈴しょ栽培における防除モデルとして、抵抗性馬鈴しょ二期作の間（6～8 月）に、ふ化促進物質資材を全面処理し、イネ科緑肥作物の栽培体系における線虫の動態を調査した（表 2，3）。この栽培体系によって線虫密度を極低密度まで低減できたが、抵抗性品種馬鈴しょ＋イネ科緑肥作物でも同程度、抵抗性馬鈴しょ二期作だけでもある程度の低減が可能であった（図 13, 14）。一方、現地実証圃場において生存卵があるにもかかわらず、ふ化促進物質資材の施用でふ化幼虫の遊出は認められなかった（図 15）。この理由として、高温や乾燥がふ化を阻害している可能性が見いだされたので（図 16）、ふ化促進物質資材の処理時期を変えるなどの工夫が必要であることが分かった。（平成 25 年度）※ 8
↓ ・3 年間のそれぞれ異なる防除技術の組み合わせによって得られた防除効果を比較し、地域の実情に合致し、かつ根絶を目指す防除モデルを策定する（小課題 3 関連）。（平成 26 年度）	↓ ・暖地二期作馬鈴しょ栽培における防除モデルとして、抵抗性品種の 4 作連続作付け（表 4）後の土壌から活性のある線虫卵が認められないことから、根絶した可能性があると考えられた（図 17）。ふ化促進物質資材の施用時期は、春作後の 5 月下旬処理で二期幼虫の遊出が認められたことから（図 17）、地温が

	上昇して線虫卵のふ化に不適になる前の春作収穫直後～5月下旬までの時期が最も適する。根絶を目指した防除モデルは、抵抗性品種「アイユタカ」等を春作と秋作に栽培し、2年連作（抵抗性品種4連作）することが有効で、1作目の春作収穫直後にふ化促進資材を投入するとさらに効果的である。<u>（平成26年度）※9</u>
成果目標：中課題1の対抗植物及びふ化促進物質と既存の防除技術（抵抗性馬鈴しょや薬剤防除、輪作等）とを組み合わせ、各馬鈴しょ産地の実情に応じた根絶を目指した防除モデルを策定する。	

＜成果の概要の補足＞

※1： ふ化促進物質資材5月31日の1t/10a処理は、無処理比50%以下に線虫密度を低減した（図1）。その他の処理時期・処理量でも線虫密度の低減傾向があったが、有意な差は認められなかった。平成24年度は、平成23年度ほどふ化促進物質資材の効果が安定しなかった。気象要因、特に、8～10月の記録的な高温の影響があったのかもしれない。

一方、ナス科対抗植物の栽培は、播種時期を変えた直播栽培、及び8月中旬以降の移植栽培ともに、無処理比80～90%の線虫密度低減を実現した（図2）。環境要因に左右されず、安定して線虫密度を低減できるものと考えられる。

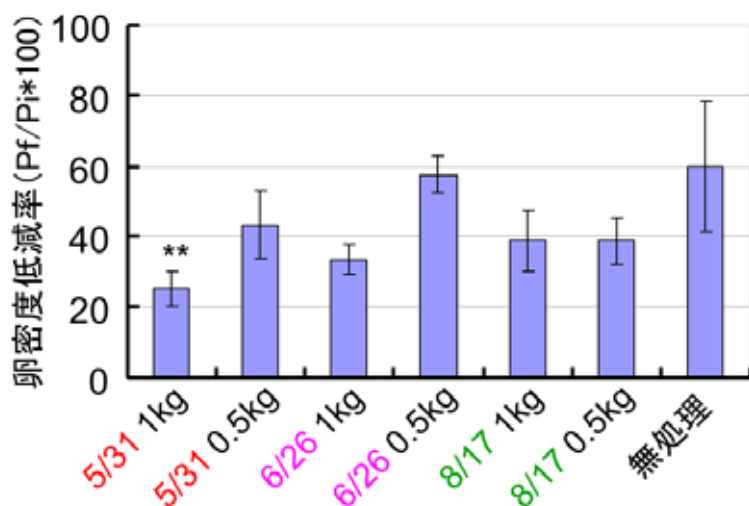


図1 処理時期・処理量別のふ化促進物質資材処理後の卵密度低減効果 (現地実証圃場 (石狩地域))

注) 処理量は1㎡当たりの投入資材量、**は5%水準で無処理と比較し有意差有り

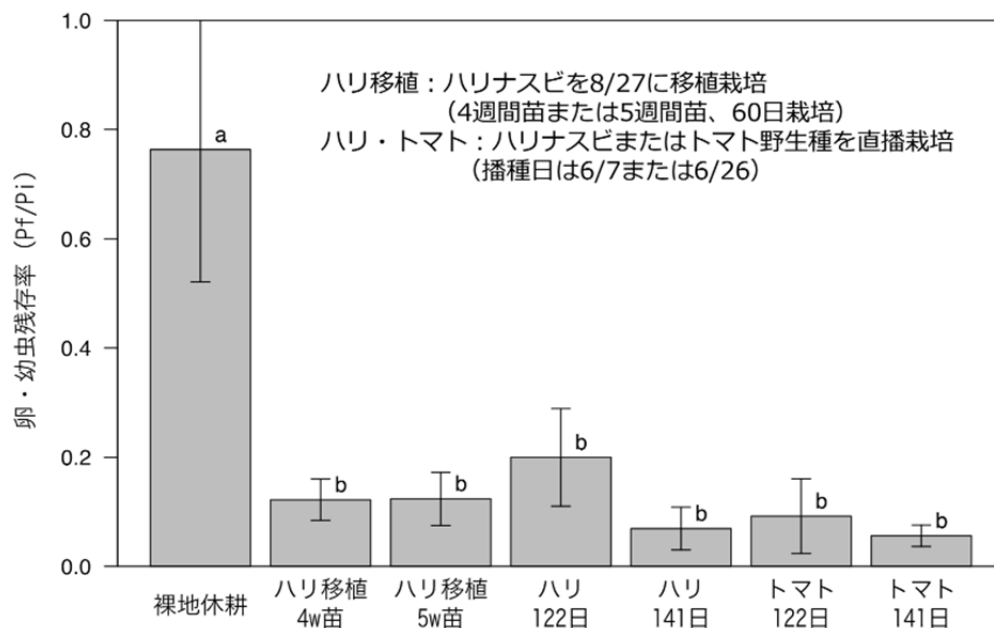


図2 栽培法別のナス科対抗植物栽培後の卵密度低減効果(現地実証圃場(石狩地域))

注) 同一のアルファベット間には有意差なし (Tukey-Kramer, $P>0.05$)

※2: 道央地域の現地実証圃場においては、平成 23 年度からナス科対抗植物の栽培、及びふ化促進物質資材処理後の非寄主作物（エンバク）の栽培を行い、図 3 の輪作計画に従って、抵抗性馬鈴しょを組み合わせた線虫根絶を目指した試験を実施している。2 年輪作（平成 23 年度：ナス科対抗植物栽培又は非寄主作物栽培＋ふ化促進物質資材処理、平成 24 年度：抵抗性馬鈴しょ栽培）によって、平成 25 年度の栽培前には、中～高密度圃場（初期密度約 70 卵/g 乾土）を、同 1～3 卵程度まで低減できた（図 3）。平成 25 年度の全面抵抗性馬鈴しょ栽培終了後の卵密度は、圃場内すべての採集地点において検出限界に近い 1 卵/g 乾土未満であった。根絶状態に近づいたものの、精度の高い検出法により、まだ生きた卵が残存することが確認できた（表 1）。

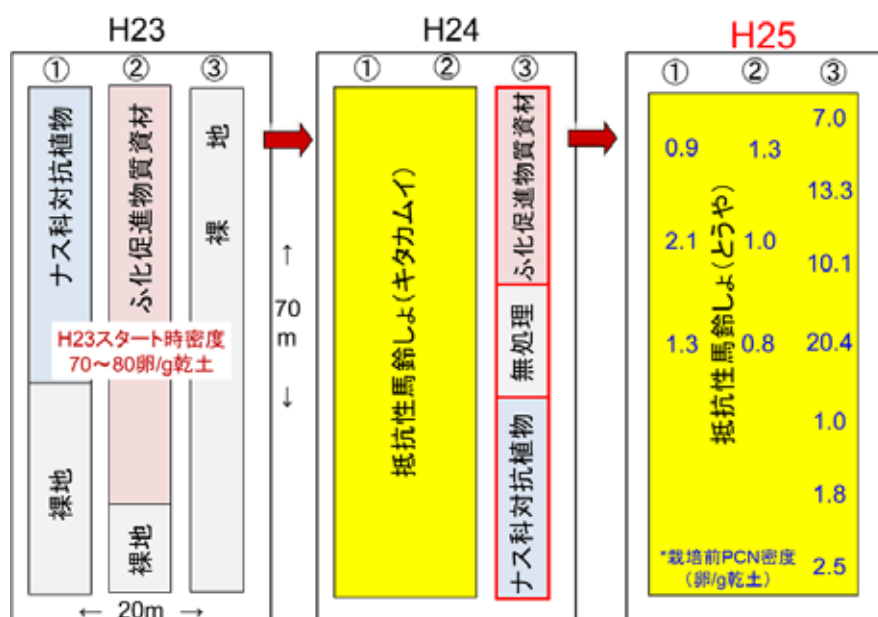


図3 根絶をめざした3年間の輪作体系と平成 25 年度試験前の線虫密度(石狩地域現地実証圃場)

表1 根絶をめざした輪作圃場の平成 25 年度栽培終了後の線虫密度(石狩地域現地実証圃場)

土壌採集地点	卵計数法 ¹⁾ (卵+幼虫数) /g 乾土			ふ化促進物質法 ²⁾ 分離幼虫 /100g 乾土			カップ検診法 ³⁾ 観察雌成虫 /125g 乾土		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
5m	0.5	0.1	0.3	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2
15m	0.0	0.2	0.3	0.6	5.6	1.7	0.3	0.2	1.3
25m	0.2	0.3	0.7	7.7	1.8	2.5	0.0	0.0	2.1
35m	0.0	0.4	0.4	0.3	3.4	1.0	0.1	0.0	2.2
45m	0.1	0.3	0.3	0.3	0.8	0.6	0.0	0.3	0.0
55m	0.1	0.3	0.1	0.4	0.6	0.4	0.0	1.1	0.0
65m	0.3	0.2	0.2	0.1	2.1	0.3	0.0	0.6	0.0

1),2),3) それぞれの手法については中課題3で詳述

平成 25 年度より試験を開始した現地実証圃場において、ナス科対抗植物（ハリナスビ）播種後 77 日目の線虫密度は、無処理比で約 90%低減されていた。一方、ふ化促進物質資材を 10a あたり 500kg 及び 1 t 処理し、非寄主作物（てん菜）を栽培した区では、処理 77 日後に同約 50%低減の効果が得られた（図 4）。ふ化促進物質資材の製法の改良によって、平成 24 年度に 1 t/10a を要した処理量が、半量の 500kg/10a で安定した線虫低減効果を発揮した。特に、中課題 1 で改良したふ化促進物質資材（農研 3:7、中課題 1 の図 8）を用いることで、処理量 500kg /10a の畦間処理でも、1 t/10a の全面処理と同程度の線虫低減効果が得られた。なお、ナス科対抗植物とふ化促進物質資

材の同時処理は、対抗植物単独よりやや低減効果が高かったが、有意な差は無かった。

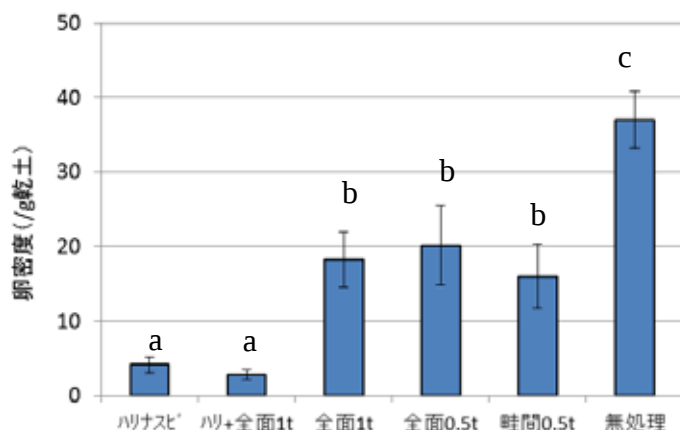


図4 ナス科対抗植物及びふ化促進物質資材処理 77 日後の線虫密度 (現地実証圃場 (後志地域))

注) 同一アルファベットは 1 %水準で処理間に有意差なし (Tukey 法)

※ 3 : 発生確認以降、抵抗性品種と非寄主作物の輪作を実施し根絶めざす北海道道央の 2 圃場について、10×10m メッシュに分割し、各区画の個別サンプリングにより残存線虫分布を精度の高い検出法を用いて検討した。試験開始時の線虫密度が中密度 (40 ~60 卵/g 乾土) だった現地圃場 A は、平成 24 年に圃場 38 区画中 21 区画で残存線虫が検出されたが、平成 25 年には 11 区画、平成 26 年には 6 区画となり密度も減少した (図 5)。抵抗性馬鈴しょ品種 2 作目栽培後の平成 25 年以降の圃場は、従来法 (フェンウィック法によるシスト分離後、顕微鏡による卵数計数) ではほとんど生存卵を検出できない低密度レベルに達し、中課題 3 で後述する精度の高い検出法である「ふ化促進物質法」により生存卵がわずかに検出された。また、最終年となった平成 26 年に「カップ検診法」により次世代線虫の増殖が確認されたのは 1 区画で 1 個体だけであった。

2012(H24)年 5 月								→	2013(H25)年 11 月								→	2014(H26)年 10 月								
	7.5m		15m		22.5m		30m			7.5m		15m		22.5m		30m			7.5m		15m		22.5m		30m	
	Egg	F	Egg	F	Egg	F	Egg	F		J2	F	J2	F	J2	F	J2	F		J2	F	J2	F	J2	F	J2	F
5m	0	0.0	0	0.0	-	-	-	-		0	0	0	0	-	-	-	-		0	0	0	0	-	-	-	-
15m	150	1.0	98	0.7	217	3.3	169	3.7		2	0	6	0	18	1	12	1		2	0	0	0	15	0	0	0
25m	13	0.0	18	4.0	263	14.7	16	4.0		0	0	0	0	117	39	0	3		0	0	8	0	10	1	0	0
35m	10	0.0	0	1.3	117	4.3	7	3.0		4	0	30	0	164	2	1	0		0	0	0	0	3	0	0	0
45m	8	0.0	10	0.3	4	0.7	0	0.0		0	0	0	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
55m	8	0.0	8	0.0	0	0.0	0	0.0		0	0	0	0	4	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
65m	228	2.3	0	0.0	11	0.3	15	0.0		0	0	0	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0	0	0
75m	0	0.0	13	0.0	0	0.0	0	0.0		0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
85m	0	0.0	3	0.0	0	0.0	0	0.0		0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
95m	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0		0	0	0	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0

図 5 現地 A 圃場 100x37.5m 内の 10x10m メッシュ各区画における線虫分布の 3 年間の推移

Egg: フェンウィック法による卵数/100g 乾土、J2:ふ化促進物質法のふ化幼虫数/400g 乾土、

F:カップ検診法の次世代雌観察数/125ml 土壌

初期密度 : 40~60 卵/g 乾土 (H22 年栽培前)

栽培履歴 : 2010(H22)抵抗性馬鈴しょ、2011(H23)ダイコン・キャベツ、
2012(H24)抵抗性馬鈴しょ、2013(H25)赤カブ、2014(H26)裸地

抵抗性品種は「キタアカリ」「とうや」「キタカムイ」を使用

一方、試験開始時の線虫密度が高密度（100 卵/g 乾土）だった現地圃場 B は、抵抗性品種を 3 作した平成 26 年は、従来法ではほとんど生きた卵が検出できない低密度レベルに達し、「ふ化促進物質法」により、圃場の半分の区画では確認されず根絶の可能性が考えられ、残りの半分の区画でわずかな残存が確認されたのみであった。また、この圃場では、「カップ検診法」による次世代線虫の増殖は全く確認されなかった（図 6）。

以上の結果から、2 圃場とも平成 26 年度内に完全な根絶達成までには至らず、さらに年限を要することが判明したが、抵抗性品種 3 作以上と非寄主作物を組み合わせた輪作によって、スタート時に高密度圃場であっても根絶の可能性が示された。

2014(H26)年 10 月

	26m		19.5m		13m		6.5m	
	J2	F	J2	F	J2	F	J2	F
5m	0	0	0	0	4	0	1	0
15m	0	0	0	0	1	0	1	0
25m	0	0	0	0	1	0	1	0
35m	0	0	0	0	0	0	0	0
45m	0	0	0	0	1	0	0	0
55m	0	0	0	0	0	0		
65m	0	0	1	0				
75m	0	0						

図 6 現地 B 圃場 80x32m 台形圃場内の 10x10m メッシュ各区画中心点における線虫分布

J2:ふ化促進物質法のふ化幼虫数/400g 乾土、F:カップ検診法の次世代雌観察数/125ml 土壌

初期密度：約 100 卵/g 乾土（2009 年栽培前）

栽培履歴：2009(H21)抵抗性馬鈴しょ、2010(H22)ダイコン、2011(H23)抵抗性馬鈴しょ、2012(H24)ブロッコリー、2013(H25)ダイコン、2014(H26)抵抗性馬鈴しょ

※ 4：道東の現地実証試験では、ふ化促進物質資材 1 t/10a 処理区において、処理後の卵密度がどの地点でも低下し、全体としても有意に卵密度が低くなった（図 7 左）。一方、0.5t/10a 処理区では、処理後の卵密度が高い傾向があり、全体として卵密度低下は認められなかった（図 7 右）。1 t/10a 処理区での低減率は、50%であった。なお、現地実証圃場の処理前の線虫密度が低かったため、より高密度圃場での試験が求められる。

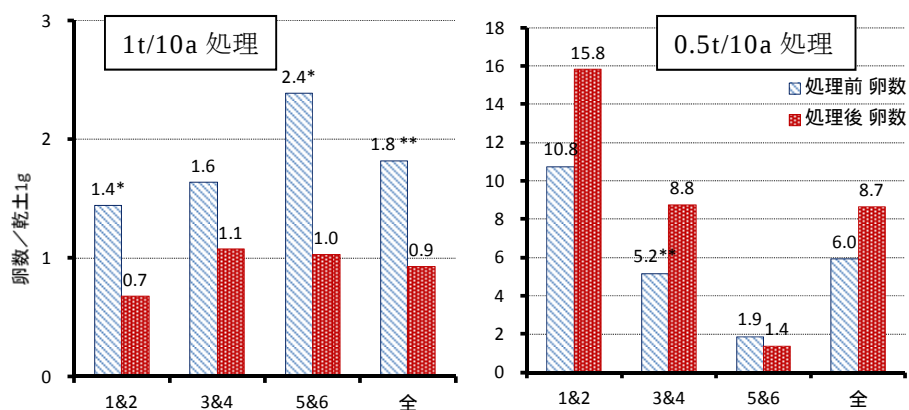


図7 ふ化促進物質資材の処理前後の卵密度比較(現地実証圃場(オホーツク地域))

注) *は5%水準で、**は1%水準で、処理前後の卵密度に有意差があり(t検定)。

各処理区を6分割して土壌採取し、1&2区、3&4区、5&6区をそれぞれ混合して、一つの試料とし、全6区を混合した試料も用意した。

※5： 道東地域では、平成24年度、小麦収穫後(8月下旬～10月上旬)にふ化促進物質資材を1t/10a処理した現地実証圃場において、平成25年度、てん菜畦間(生育初期(6月上中旬、666kg/10a)3圃場(A、B1及びC1)、ニンジン播種前(7月上旬、1t/10a)1圃場(C2)及び小麦収穫後(8月中旬、0.5t/10a)1圃場(B2)にふ化促進物質資材の追加処理を実施した。

てん菜畦間処理では、反復間にばらつきがあるものの、処理平均では処理前比20～50%の線虫密度低減が見られた(図8)。ただし、これは処理した部分のみの結果であるため、耕起後の圃場全体の線虫密度低減率の調査を行い、線虫密度を確認する必要がある。また、2年間を通した線虫密度の変化を見ると、全体的に線虫密度の低下傾向が認められるものの(図9)、反復間のばらつきや無処理区でも線虫密度の低下が認められ、相乗効果(小麦収穫後処理+てん菜畦間処理)の程度は明確でない。上記同様、圃場全体の線虫密度低減率の調査を行い、更に検討する。

ニンジン播種前処理では、ふ化促進物質資材の効果は判然としなかった(図8及び9のC2)。この理由としては、卵密度がゼロに近い極低密度であり、サンプル毎に卵があるかないかという状態であったことから、従来法の実体顕微鏡による卵の生死判断が困難であったと考えられる。このような極低密度圃場での調査は、従来法では困難であるため、今後、中課題3で進めている検出法の精度調査と合わせて、ふ化促進物質資材処理の効果及び影響の確認を検討する。

小麦の連作処理では、秋にサンプリングを行い、カップ検診法(中課題3の検出法)などをを用いた調査を実施中である。道東地域における畑作物の輪作では小麦、馬鈴しょ、てん菜の3作物が主体で、小麦が連作されることも多い。ふ化促進物質資材の処理時期として、小麦収穫後は重要であることから、この時期のふ化促進物質資材の処理を今後も継続して検討する。

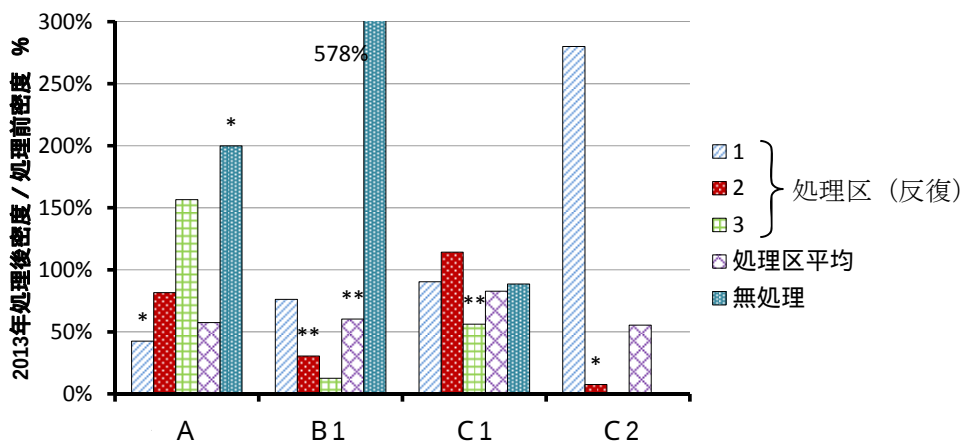


図8 てん菜畦間 (A、B1、C1) 及びにんじんは種前 (C2) のトマト由来ふ化促進物質資材の処理効果 (現地実証圃場 (道東))

注) 処理前後の線虫密度で、* : 5%有意差、** : 1%有意差

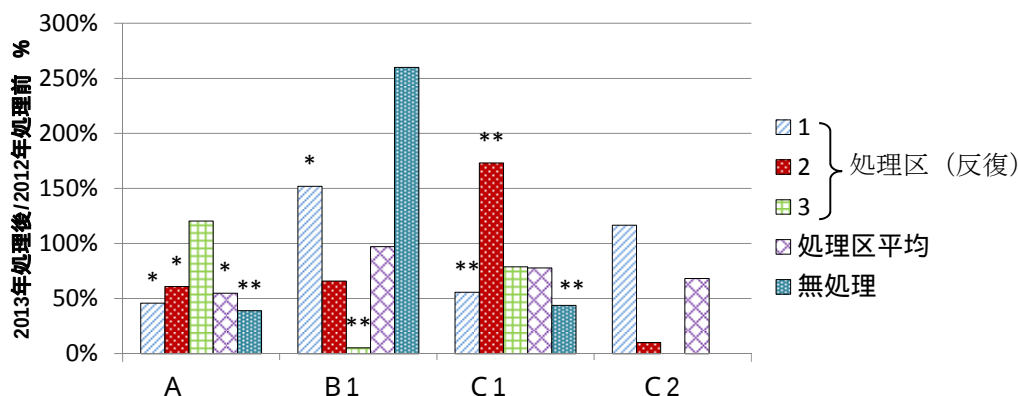


図9 2年間のトマト由来ふ化促進物質資材の処理累積効果 (現地実証圃場 (道東))

注) C2は、極低密度で、無処理では卵密度はいずれもゼロ (シストは検出)

処理前後の線虫密度で、* : 5%有意差、** : 1%有意差

※6 : 試験開始時発生が低密度 (10 卵/g 乾土以下) であった北海道道東の輪作圃場において、非寄主作物栽培時に天然ふ化促進物質資材の処理を行い、作物を替えて2年2作後、3年目に馬鈴しょ抵抗性品種を栽培し、線虫密度推移を明らかにした。

試験を実施した6圃場では、H24~25年の2年間にわたり、ふ化促進物質資材の処理試験を実施したが、いずれも卵密度の低減効果は判然としなかった。その理由として、試験開始時の卵密度が低く、かつ、残存していた卵は最近生産されたものではない可能性が高く、ふ化活性が低い卵が多く含まれていたことが考えられる。一方で、最終年に馬鈴しょ抵抗性品種を栽培したところ、全ての区で卵数がほぼゼロとなった (図10、6圃場のうち4圃場のデータを示す)。

以上のことから、道東の低密度線虫発生圃場においては、通常の輪作の中で抵抗性品種を栽培することで、線虫根絶に繋がる密度低減効果を示すことが分かった。

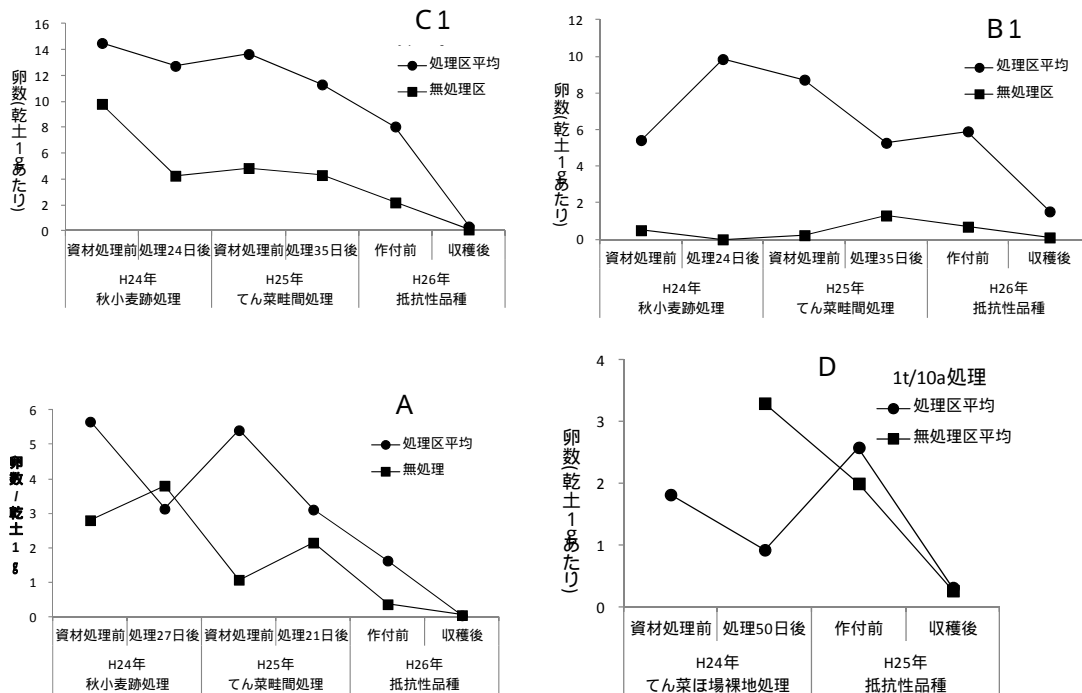


図 10 道東 4 圃場 (C 1、 B 1、 A、 D) における卵密度の推移 (平成 24 ~ 26 年)

注) ふ化促進物質資材は H24 年 1t/10a、H25 年 0.67t/10a 処理、
H26 年抵抗性品種「アーリースターチ」「アステルタ」を栽培、D のみ H25 年に抵抗性
品種「コナユキ」栽培、処理区は 3 区の平均値

※ 7 : ふ化促進物質資材の処理により、イネ科緑肥作物播種時処理 (1' 区) では裸地 (3 区) に比較してふ化幼虫数が減少し始める時期が遅くなった。イネ科緑肥作物鋤き込み時に処理した場合 (1 区) は、その後のふ化幼虫の遊出を認めなかった (図 11)。

ジャガイモ青枯病菌の phylotype I (biovar 3、biovar 4) 及び phylotype IV (biovar N2) 系統菌をナス科対抗植物 (ハリナスビ、トマト野生種) に接種し栽培したところ、ナス科対抗植物はどちらも青枯病に罹病した (図 12)。また、これらをすき込んだ場合、菌を接種したナス科以外の緑肥作物をすき込んだ場合や菌のみを土壤に接種して無栽培とした場合に比べ、後作の馬鈴しょ栽培において青枯病被害が助長された。

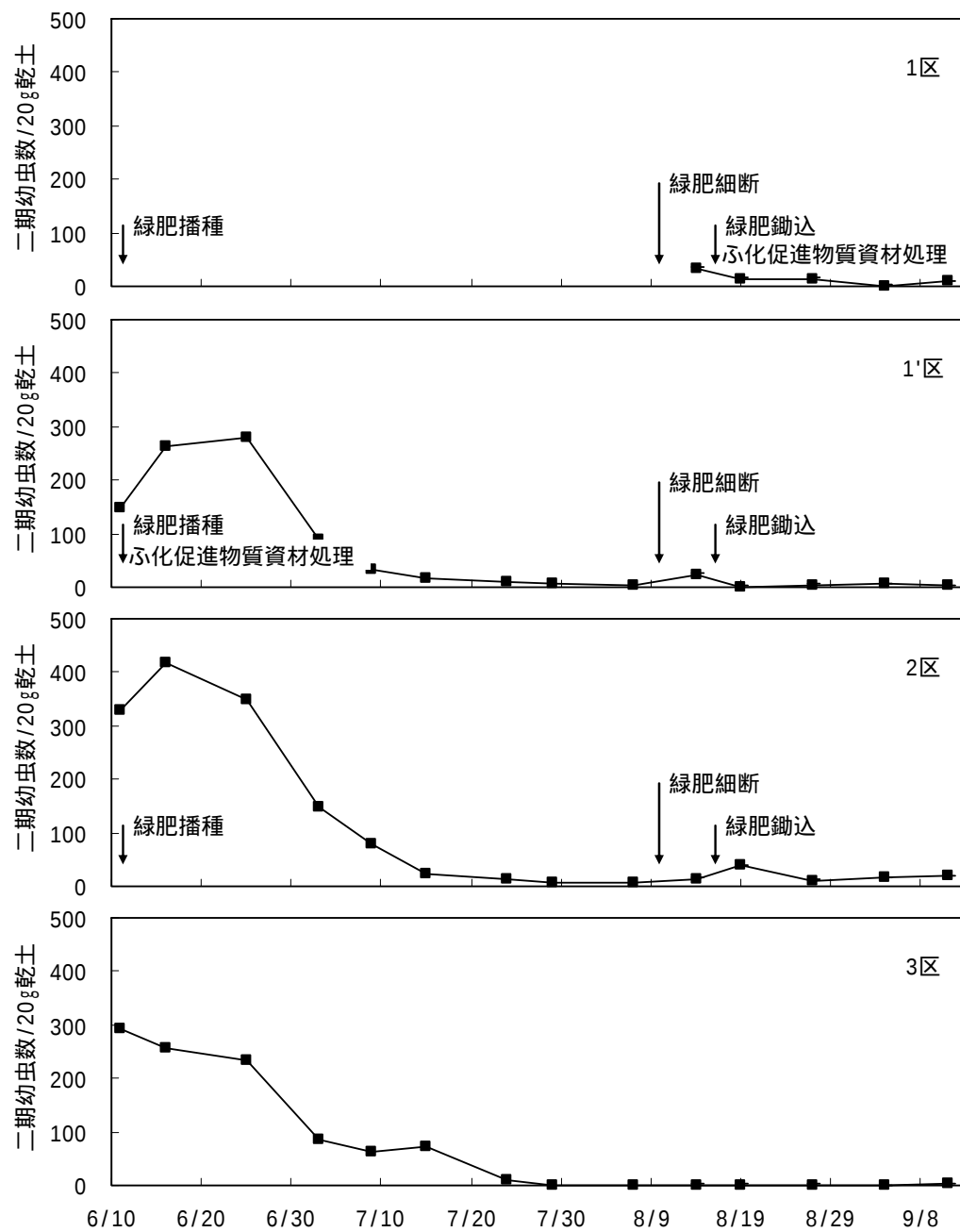


図 11 ふ化促進物質資材処理区及び無処理区のふ化幼虫数の推移(平成 24 年、現地実証圃場(雲仙))



図 12 青枯病に罹病したナス科対抗植物(左:ハリナスビ、右:トマト野生種)

※ 8 : 暖地二期作馬鈴しょ栽培の現地実証圃場(表 2)において、平成 24 年度秋作では、土壌中のシスト数は、抵抗性馬鈴しょ+緑肥+ふ化促進物質の 1'区及び 2 区では増加しなかったが、抵抗性馬鈴しょ+緑肥の 3 区はやや増加した。また抵抗性馬鈴しょのみの 4 区と感受性馬鈴しょを作付けした 6 区は増加した。その後、平成 25 年度春作で抵抗性馬鈴しょを作付けた 1'～4 区は減少した(図 13)。

土壌中の卵数は、平成 24 年度秋作及び平成 25 年度春作の作付けにより感受性馬鈴しょの 6 区で増加したが、抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物+ふ化促進物質資材処理の 1'区及び 2 区は卵数を低く抑えることができた。抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物の 3 区と抵抗性馬鈴しょの 4 区は、秋作でほぼ変わらなかったものの春作の作付けにより減少した(図 14)。結論として、暖地二期作圃場では、抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物の連作あるいは抵抗性馬鈴しょの連作により、低密度まで線虫密度を低減できる。このため、ふ化促進物質資材は最後に残った卵を根絶するために利用するのが有効である。これについては、中課題 3 で検討する。

表 2 平成 24 年度秋作前～秋作試験区の処理内容(現地実証圃場(雲仙))

No.	処理内容	馬鈴しょ品種	緑肥品種	ふ化促進物質資材施用
1'	抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物 +ふ化促進物質資材	アイユタカ	ねまへらそう	平成 24 年 6 月 11 日(1t/10a 緑肥鋤き込み 時処理)
2	抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物 +ふ化促進物質資材	アイユタカ	ねまへらそう	平成 24 年 8 月 17 日(1t/10a 緑肥播種時処 理)
3	抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物	アイユタカ	ねまへらそう	—
4	抵抗性馬鈴しょ	アイユタカ	—	—
6	感受性馬鈴しょ	ニシユタカ	—	—

注) アイユタカ: 抵抗性馬鈴しょ、ニシユタカ: 感受性馬鈴しょ、ねまへらそう: イネ科緑肥作物
(スーダングラス)

シスト数/50g 乾土

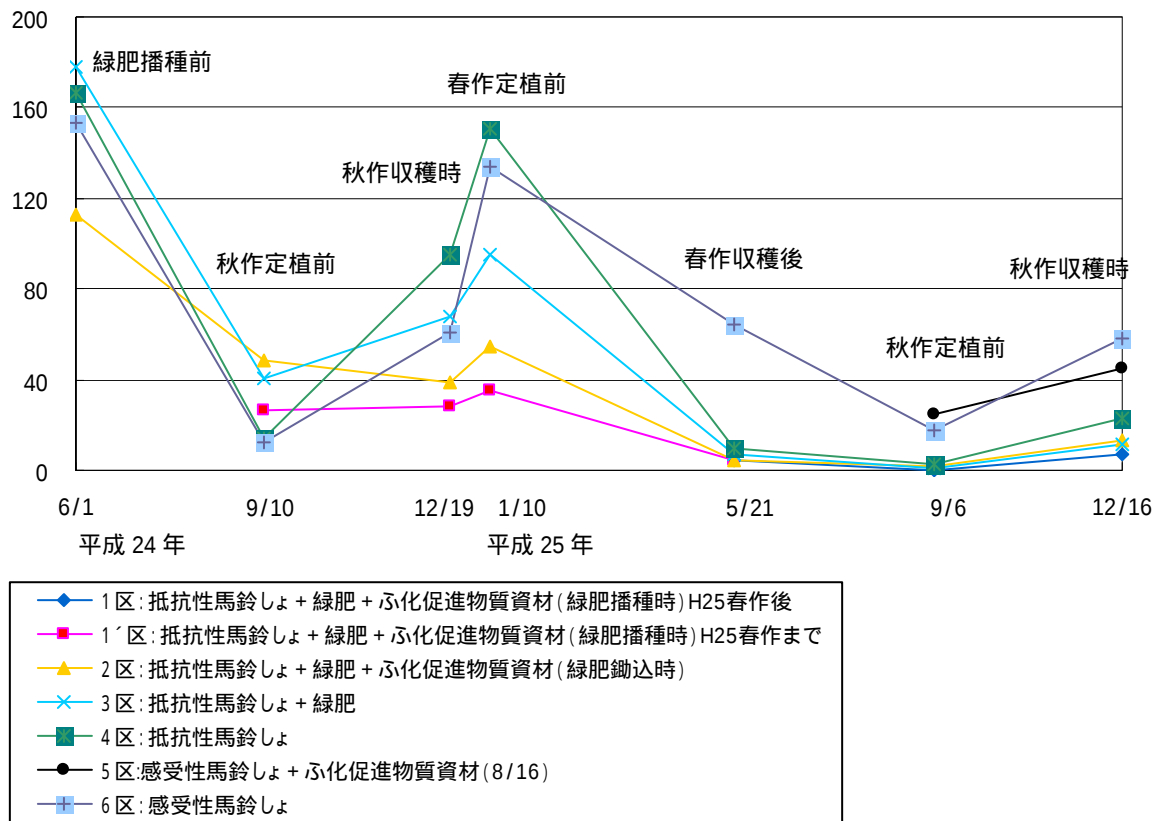


図 13 土壌中のシスト数の推移 (現地実証圃場(雲仙))

注) 1 区は平成 25 年春作後に設置 (H24 秋作～H25 春作は緑肥鋤込時処理)、1' 区は平成 24 年 9 月～25 年 5 月 6 日のみ設置

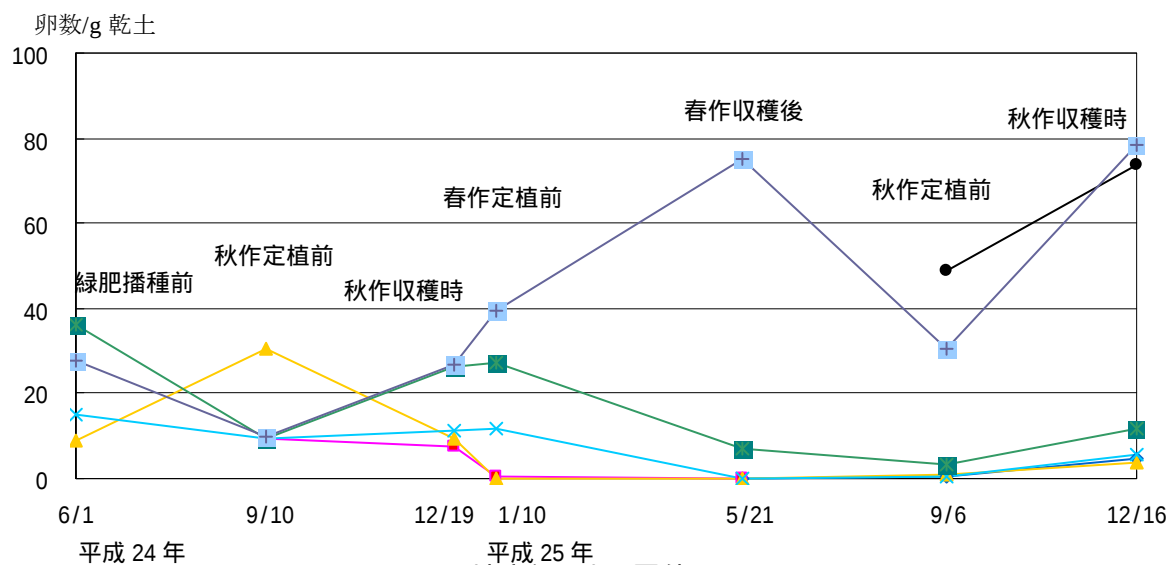


図 14 土壌中の卵数の推移 (現地実証圃場(雲仙))

注) 記号・凡例は図 10 に同じ

平成 25 年度、春作収穫後にイネ科緑肥作物播種時にふ化促進物質資材を処理した 1 区（表 3）では、処理後にふ化幼虫数の増加を認めなかった。また、イネ科緑肥作物 鋤き込み時（8 月 16 日）にふ化促進物質資材を処理した 2 区及び 5 区においてもふ化 幼虫の遊出を認めなかった（図 15）。1 区及び 2 区は抵抗性馬鈴しょ連作によって生 存卵が根絶された可能性があるものの、5 区は感受性馬鈴しょで生存卵が多数確認さ れていることから、ふ化促進物質資材の効果が全く現れなかったと考えられる。現地 実証圃場のある雲仙市では 8 月 8 日～8 月 21 日に降雨がなく、現地実証圃場の土壌水 分量は低い条件であり、またイネ科緑肥作物の播種時及びイネ科緑肥の作物鋤き込み 時の最高地温はそれぞれ 30℃、40℃を超えており、線虫のふ化適温は 20℃前後（山田 ら、2007）とされていることから、ふ化が抑制された可能性が考えられた。そこで、 秋作収穫後（12 月下旬）の処理について検討した結果、ふ化幼虫の遊出が僅かに認め られてふ化促進物質の効果があらわれた可能性が示唆された（図 16）が、平均地温は 10℃、最低地温は 6～10℃と低く、ふ化に不適であることが明らかとなった。

表 3 平成 25 年度春作～秋作後試験区の処理内容(現地実証圃場(雲仙))

区 No.	処理内容	馬鈴しょ品種	緑肥品種	ふ化促進物質資材の処理時期
1	抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物+ ふ化促進物質資材	アイユタカ	ねまへらそう	平成 25 年 6 月 4 日(1t/10a 緑肥播種時処理)
2	抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物+ ふ化促進物質資材	アイユタカ	ねまへらそう	平成 25 年 8 月 16 日(1t/10a 緑肥鋤き込み時 処理)
3	抵抗性馬鈴しょ+イネ科緑肥作物	アイユタカ	ねまへらそう	-
4	抵抗性馬鈴しょ	アイユタカ	-	-
5	感受性馬鈴しょ+ふ化促進物質資材	ニシユタカ	-	平成 25 年 8 月 16 日(1t/10a 処理)
6	感受性馬鈴しょ	ニシユタカ	-	-
7	感受性馬鈴しょ+ふ化促進物質資材	ニシユタカ	-	平成 25 年 12 月 24 日(1t/10a 処理)

注) 7 区は秋作収穫後に設置、アイユタカ：抵抗性馬鈴しょ、ニシユタカ：感受性馬鈴しょ、ねまへら
そう：イネ科緑肥作物（スーダングラス）

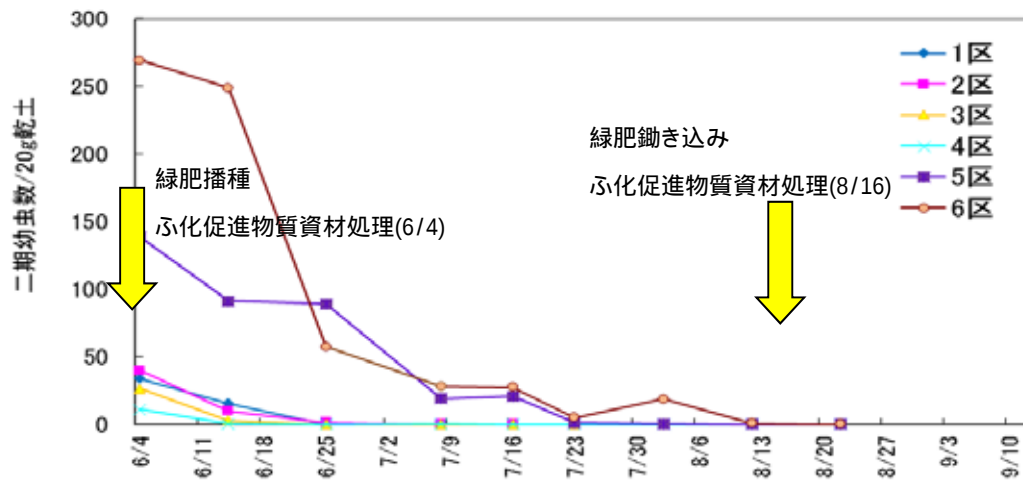


図 15 平成 25 年春作後～秋作前のふ化幼虫数の推移 (現地実証圃場 (雲仙))

注) 数値は 3 反復の平均値

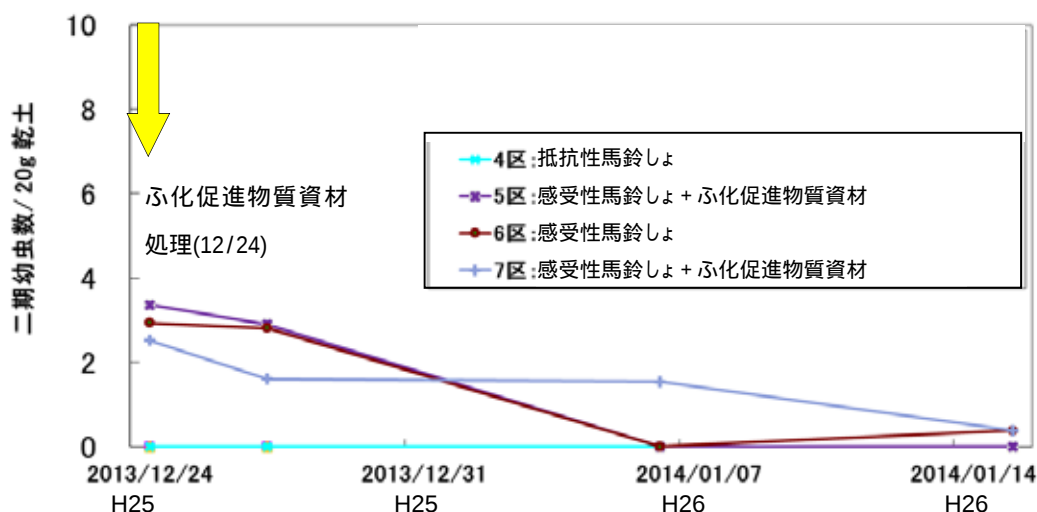


図 16 平成 25 年秋作後～26 年春作前のふ化幼虫数の推移 (現地実証圃場 (雲仙))

注) 数値は 3 反復の平均値

※ 9 : 暖地馬鈴しょ栽培において、抵抗性品種の二期作及び感受性品種の二期作をそれぞれ 2 年間連続実施したところ (表 4)、抵抗性品種の 4 作連続作付けとなる 1～4 区は、平成 26 年春作後には極めて低い密度になった (図 17)。本 1～4 試験区は中課題 3 で詳述する検出法 (カップ検診法及びふ化促進物質法) によって、土壌中からシストセンチュウ二期幼虫及び活性のある卵が全く確認できなかったことから、本試験区のシストセンチュウは根絶された可能性があると考えられる。

ふ化促進物質資材の効果的な使用時期について検討したところ、8 月 18 日に処理した 6 区 (感受性品種栽培) では秋作植付前の卵数が 30.2 から秋作収穫後には 53.7 となり約 1.8 倍増加したのに対し、春作後 (5 月 23 日) に処理した 8 区 (感受性品種栽培)

では、秋作植付前の卵数が 30.3 から秋作収穫後には 32.3 と増加率を約 1.1 倍に抑えた。このことから、本資材は地温の比較的低い春作後 1 回処理が有効で、秋作栽培における卵数の増加を 40%程度抑制できる (図 17)。

表 4 平成 26 年度春・秋作試験区 (1 ~ 8 区) の処理内容 (現地実証圃場 (雲仙))

No.	処理内容	馬鈴しょ品種	緑肥品種	ふ化促進物質施用時期
1	抵抗性品種 + 緑肥 + ふ化促進物質	アイユタカ (抵)	ねまへらそう	平成 26 年 6 月 5 日 (1t/10a) *
2	抵抗性品種 + 緑肥 + ふ化促進物質	アイユタカ (抵)	ねまへらそう	平成 26 年 8 月 18 日 (1t/10a)
3	抵抗性品種 + 緑肥	アイユタカ (抵)	ねまへらそう	-
4	抵抗性品種	アイユタカ (抵)	-	-
5	感受性品種 + ふ化促進物質	ニシユタカ (感)	-	平成 26 年 8 月 18 日 (1t/10a)
6	感受性品種	ニシユタカ (感)	-	平成 26 年 8 月 18 日 (1t/10a)
7	感受性品種 + ふ化促進物質	ニシユタカ (感)	-	平成 25 年 12 月 24 日 (1t/10a)
8	感受性品種 + ふ化促進物質	ニシユタカ (感)	-	平成 26 年 5 月 23 日 (1t/10a)

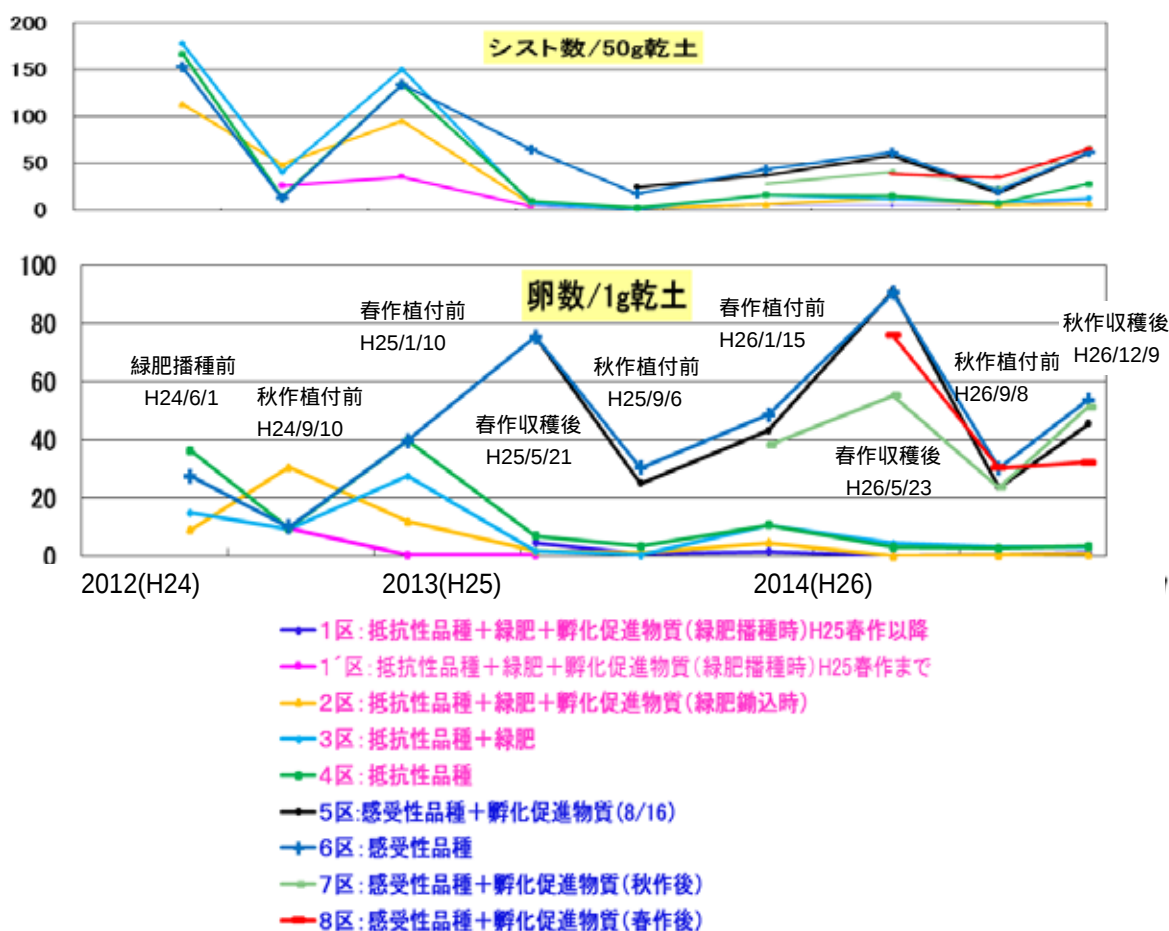


図 17 各区のシスト数及び卵数の推移 (平成 24 年 ~ 26 年) (現地実証圃場(雲仙))

3. 中課題3：ジャガイモシストセンチュウの根絶を確認するための手法の構築

(1) 全体計画の概要

工程表	進捗状況・成果
・合成ふ化促進物質の利用及びカップ検診法による、線虫活性卵の検出精度を明らかにし、既存の手法との労力・精度を比較する（小課題1関連）。（平成24年度）	・土壌から分離したシスト内の卵をふ化促進物質溶液に浸漬させふ化幼虫を検出する方法（以下「ふ化促進物質法」という。）、及び、採取した土壌に馬鈴しょを栽培し、カップ表面に観察される次世代シストを検出する方法（以下「カップ検診法」という。）、の2つの手法を検討したところ、両手法の結果はほぼ一致した（表1）。両手法を組み合わせることで、極少発生 of 土壌においても、生きた線虫の検出精度が向上した。（平成24年度）※1
・各線虫汚染対象圃場において、防除処理前後の線虫密度変化及び圃場内の線虫分布の特徴を明らかにする。（小課題2関連）。（平成24年度）	・現行のサンプリング法である8歩幅法（約278点/ha）と簡便法であるジグザグ法（100点/ha）及び対角法（25～30点/ha）を比較したところ（図1）、古くからの線虫汚染圃場（線虫が一樣に広がっていると考えられる圃場）では、単位土壌あたりのシスト数及び卵密度に有意な差異はなかった（図2）。圃場内の卵密度分布は一樣でないことも確認された（図3）。（平成24年度）※2
↓ ・線虫が根絶状態に近い圃場を選定し、労力・コストをかけた従来型の高精度な線虫検出法と、調査点数と労力を削減した新たな検出法を比較し、検出精度や誤認確率の差異を明らかにする（全小課題共通）。（平成25年度）	↓ ・抵抗性品種を1作又は2作して線虫密度低減を進めた圃場では、現行の卵数調査法では生存卵の確認が困難で、処理間の差異も比較できなかった。そこでふ化促進物質（ソラノエクレピンA又は天然ふ化促進物質）を利用し、卵からふ化した活性のある幼虫を計数する方法を提案し、マニュアル化した（図4）。また、多点サンプリングを行い、本手法により1枚の圃場内の卵密度分布を調査したところ、圃場内には根絶に近い場所と生存卵が残存する場所が明瞭に示された（表

	2)。同じ土壌を用いたカップ検診法による定量結果とは、卵密度 2～3 卵/g 乾土程度まではほぼ一致したが、同 1 卵未満の極低密度では、ふ化促進物質法がカップ検診法より優れた（表 2、図 5）。なお、カップ検診法の精度向上をめざした「濃縮カップ検診法」を考案し（図 4）、精度の検証を実施中である。簡便に圃場内の生存卵の有無を検出するサンプリング法として、ジグザグ法（100 点/ha）と対角法（25～30 点/ha）を比較した結果、採土サンプルから分離したシスト破砕物を全量ふ化促進物質法に供することで、ジグザグ法の有効性が示された（図 6）。（平成 25 年度）※ 3 ・ 1.5～2.5ha の 5 圃場を対象とし、圃場全体を基本的に 1 ha 単位と残りに分割し、現行の 8 歩幅法とジグザグ法により土壌採取を行った（図 7）。また、圃場全体の線虫密度分布を明らかにするため、70×140m の圃場を 7×10m の 140 区画に分割し、各区画の土壌採取を行った。圃場は四角形でないことが多く（図 1）、採取前に圃場の図面を基にして採取プランを立てる必要がある（図 7）。このため、将来的には GIS 等の利用が有効と考えられる。また、一定量の土壌を採取する器具を使用した結果、従来の移植ごてを使った採取より、ばらつきが少なかった（表 4）。 ・従来法やカップ検診法では供試する土壌量が限られるが、ふるい分けを行った分離物を不織布小袋に集め、それを濃縮カップ検診法又はふ化促進物質法に供試することにより、より多量の土壌を検定することが可能と考えられる。このため、不織布小袋に分離物を集め、カップ検診法に供試した予備試験を行
--	--

↓ ・精度が許容できる範囲内で効率的・省力的な線虫検出法とサンプリング法を絞り込み、現地圃場において実証を行う。実証された手法については、根絶を確認するための手法としてマニュアル化する（全小課題共通）。（平成 26 年度）	ったところ、不織布を通してシスト形成が認められた（図 8）。現在、極低密度圃場の土壌サンプルを供試し、検出精度の確認を行っている。採取した土壌を湿潤状態で保管するより、室内で乾燥させて保管した方が、カップ検診時のシスト形成数が多かった（表 5）。土壌採取後、ただちに検定をしない場合、乾燥してから保管の方が良好な結果が得られる可能性が示唆された。（平成 25 年度）※ 4 ・カップ検診法によりカップ表面に観察されるシスト数と土壌中のシスト数及び卵数を比較した結果、ほぼ合致した結果が得られた（図 9、表 6）。なお、春作収穫後は抵抗性馬鈴しょを栽培した区では卵密度が極めて低下し、従来法では、卵数が検出できず、区間の比較もできなかった。しかし、カップ検診法ではこのような低密度発生条件下においてもシストを確認できた。以上のことから、カップ検診法の線虫検出精度が高いことが実証できた。（平成 25 年度）※ 5 ↓ ・簡便で検出精度の高い生存卵の検出法として、「ふ化促進物質法」と 4 反復の「カップ検診法」の組み合わせが最適と判断し、検出マニュアル改訂版を作成した（図 10～13）。現地根絶対策圃場において検出精度を確認した結果、圃場内での残存卵の分布がマップ化でき、根絶した可能性のある圃場の部位が特定できた。さらに、ジグザグ法（100 点/ha 採土）による圃場全体のサンプリングと組み合わせることで、一圃場内での根絶の確認をできるだけ簡便に見極めることが可能と考えられた（図 14、表 7）。（平成 26 年度）※ 6
---	--

	・道東の線虫汚染圃場において面積約 1ha の調査区を 8 歩幅法（約 278 点/ha）と簡便法であるジグザグ法（100 点/ha）でサンプリングを行い、卵密度を従来法（ふるい分け法）とカップ検診法で比較したところ、全ての調査地点において、サンプリング法による卵密度の差異はなかった（図 15～17）。サンプリングをジグザグ法で、密度推定をカップ検診法で行うことで、労力を軽減し従来法と同等の検出精度が得られると考えられる。 <u>（平成 26 年度）※ 7</u> ・抵抗性品種の連作区（4 連作以上）は卵密度がごく低密度化し、従来法（ふるい分け法）では卵が検出されるものの生死の見極めは困難であった。一方、同一試料を用いた、カップ検診法及びふ化促進物質法による検出では、両手法とも抵抗性品種連作区の全区で線虫が検出されず、感受性品種栽培区の全区から検出された（図 18）。根絶の有無を見極めるような低密度下の調査におけるカップ検診法及びふ化促進物質法の有効性が証明できた。土壌深度 30cm までの線虫垂直分布（図 19）、及び線虫の季節消長の調査によって（中課題 2 の図 16）、地表～10cm の土壌を春作収穫後の耕耘後に採集するのが根絶を確認に最も有効であることが分かった。 <u>（平成 26 年度）※ 8</u>
成果目標：効率的・省力的で精度の高い線虫検出法とサンプリング法を開発し、各種線虫防除対策を実施した圃場において根絶を確認するための手法を構築する。	

＜成果の概要の補足＞

※ 1： 抵抗性馬鈴しょやふ化促進物質資材を用いて線虫密度を低減した圃場では、活性のある卵は大部分がふ化して死滅すると考えられるが、活性のない卵は残存し、従来法ではこの卵の生死が判別できない。ふ化促進物質法及びカップ検診法は、ともに

活性のある線虫を検出するのに有効な手法と考えられる。

調査した現地実証圃場は平成 21 年度には中密度（50 卵/g 乾土前後）の線虫発生圃場であったが、その後の抵抗性馬鈴しょと非寄主作物の栽培により、極低密度まで線虫密度が低減した。平成 24 年 5 月、37.5m×100m の圃場を 40 分割して線虫密度調査を行ったところ、長辺 15～35m ラインと 65m ライン付近に活性のある線虫が検出され、線虫密度は西側（③、④列）で多く、東側（①、②列）で少ない傾向があった（表 1）。卵密度は最大でも 3 卵/g 乾土未満の低密度であった。ふ化促進物質法とカップ検診法の線虫検出結果は、ほぼ一致し（表 1 の黄色の塗り潰し部分）、活性のない卵が残存していると考えられる地点（緑色の塗り潰し部分）も判別できた。また、卵密度のより少ない①、②列では、どちらか一方のみで検出される例もあったことから、両手法を組み合わせることで、極低密度発生の土壌においても、活性のある線虫の検出精度が向上すると考えられる。

表 1 1枚の現地実証圃場(石狩地域、37.5a)内での線虫分布

	①列目 7.5m			②列目 15m			③列目 22.5m			④列目 30m		
	卵数	幼虫	カップ	卵数	幼虫	カップ	卵数	幼虫	カップ	卵数	幼虫	カップ
5m	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
15m	150	1.5	0	98	2.5	0.7	217	19	3.3	169	13	3.7
25m	13	1	0	18	0	4	263	21	14.7	16	7.5	4
35m	10	0	0	0	0	1.3	117	2	4.3	7	2	3
45m	8	0	0	10	0	0.3	4	2	0.7	0	0	0
55m	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0
65m	228	8.5	2.3	0	0	0	11	0.5	0.3	15	2.5	0
75m	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0
85m	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
95m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注)・37.5m×100m の圃場を等間隔（縦 7.5m 横 10m）に 40 分割し、中心点付近 9 点（3×3、1m 間隔）を線虫スコープ（深さ 15cm、1 点約 100g 土）で採土、混合して 1 サンプルにする。

- ・圃場は平成 22 年度抵抗性馬鈴しょ、平成 23 年度非寄主作物を栽培、平成 24 年度（5 月 31 日）サンプリングを実施。
- ・卵数：乾土 100g あたりの従来法（染色なし、生死不明の目視結果）
- ・幼虫：計数後の卵をふ化促進物質（20%トマト水耕液）に 2 週間浸漬しベルマン分離
- ・カップ：125ml の土壌をカップに詰め、種馬鈴しょ（男爵薯）を植え付け暗黒 20℃で培養、56 日後カップ外側から観察したシスト形成数。いずれも同一サンプル土壌を用い、3 反復実施した平均値を表示。

※ 2： 現行の 8 歩幅法（約 278 点/ha、1 人の場合の所要時間約 60 分/ha、歩行距離約 1,700m）と同程度の検出精度で、より簡便、労力の少ない土壌サンプリング法を開発する目的で、現行の 8 歩幅法と、簡便法としてジグザグ法（100 点/ha、15～20 分/ha、

約 420m、スコットランドで採用）及び対角法（25～30 点/ha、約 5 分/ha、歩行距離 150m 弱、発生地域における線虫密度調査を目的）とで、検出精度を比較した。古くからの線虫汚染圃場（線虫が一様に広がっていると考えられる圃場）である道東の 9 圃場で、図 1 の通りに実施した。

その結果、8 歩幅法と簡便法（ジグザグ法及び対角法。以下同じ。）では、検出されるシスト数に差異は無く（図 2 左）、卵数では、差異が認められたものもあったが、ほぼ一致した（図 2 右）。このことから少なくとも古くからの汚染地域における線虫密度調査では、簡便法による土壌採取が可能と考えられる。

8 歩幅法とジグザグ法では、1 ha を 4 分割して大まかな圃場内の分布を調査した。その結果、圃場内のシスト及び卵の密度は一樣な分布をしていないことが改めて確認され、シスト密度より卵密度にばらつきが大きかった（図 3、圃場 5 のみ掲載）。

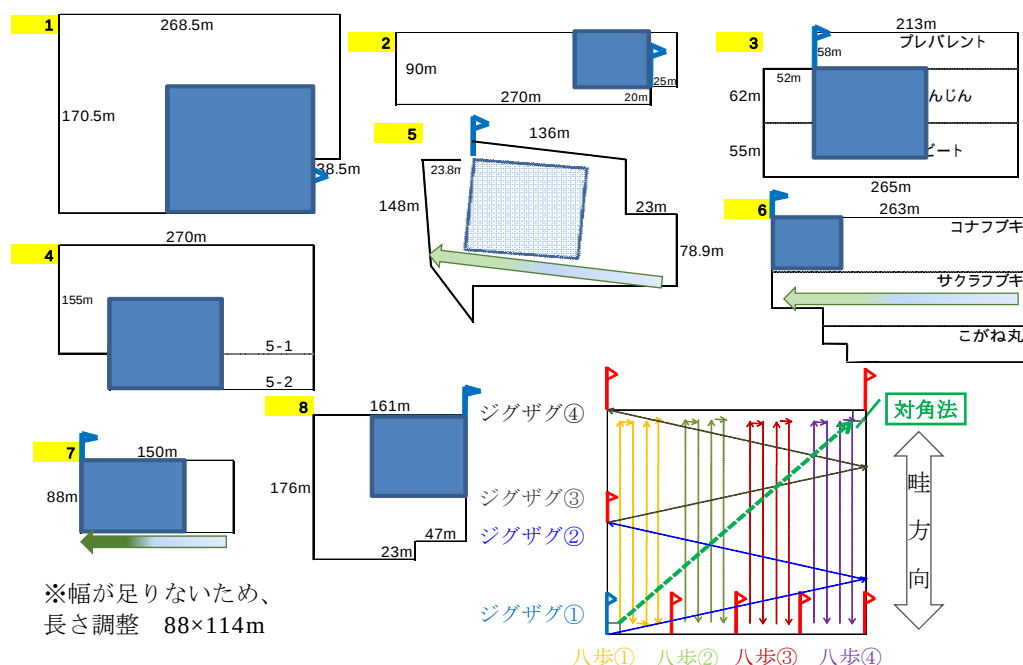


図1 調査圃場の図面と各土壌サンプリング法の模式図(現地実証圃場(オホーツク地域))

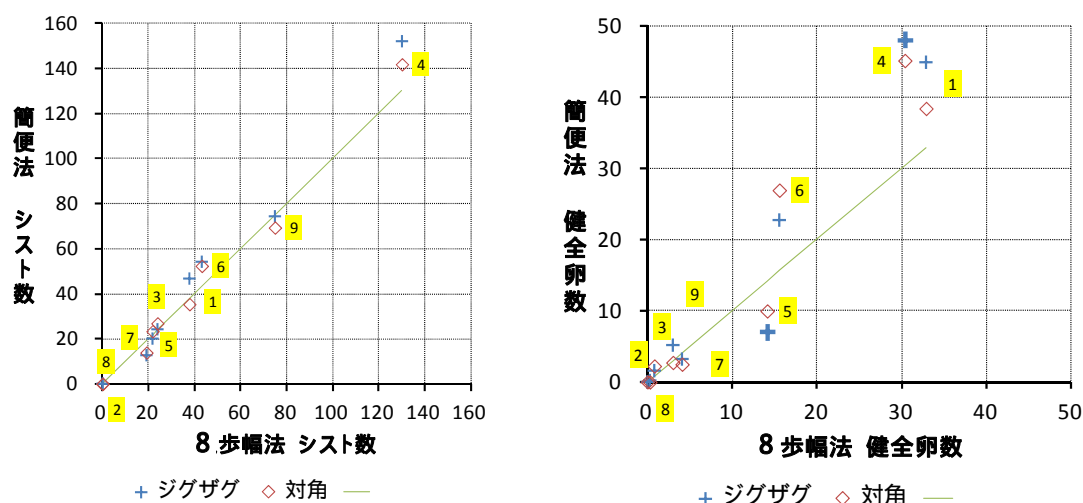


図2 8歩幅法に対する簡便法のシスト数(左)と同卵数(右) (現地実証圃場(オホーツク地域))

注) 数字は圃場番号を示す。

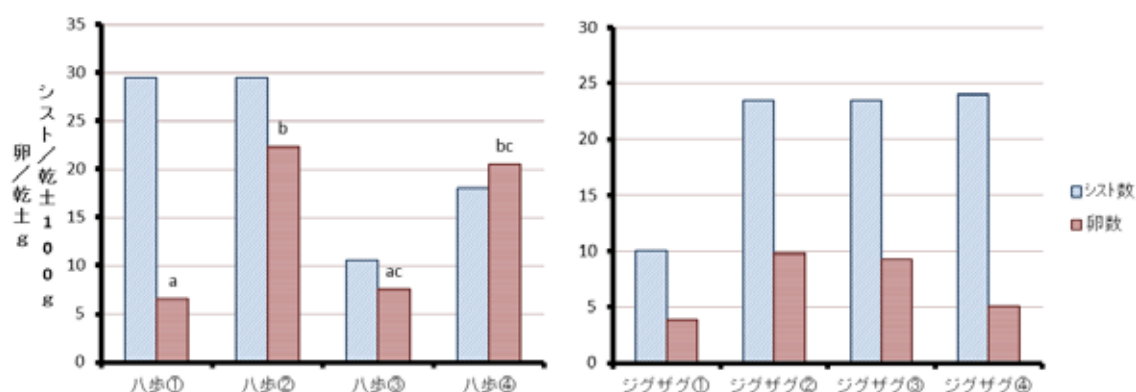


図3 圃場5における4分割して採取した8歩幅法及びジグザグ法のシスト数と卵密度 (現地実証圃場(オホーツク地域))

※3: ふ化促進物質法、すなわち、土壌から分離したシストを破碎して蒸留水に懸濁し、この卵懸濁液 10ml に対し、ソラノエクレピンA (5×10^{-10} g/ml) 又はトマト水耕廃液 (20%濃度) を添加し、22℃で1～2週間培養後、活性のある幼虫を顕微鏡観察するか、ベルマン法 (48 時間) によって卵懸濁液から幼虫を分離することで (図4)、寄生能力のある線虫数を定量できた。ソラノエクレピンA とトマト水耕廃液の違いによる分離幼虫数に有意差はなかった。

ふ化促進物質法を平成 24 年度に線虫の分布調査を実施した現地実証圃場に適用したところ、抵抗性馬鈴しょ 1 作後であったため、まだ残存卵が各地点で認められた (表 1)。この圃場に、平成 25 年度、抵抗性馬鈴しょをもう 1 作し、図 4 の手法で生存卵を検出した。その結果、①列と②列では根絶に近い状態であったが、③列と④列の北

側（番号が若い方）にわずかに生存卵が分布することが分かった。なお、カップ検診法では検出できない地点が認められた（表2）。

また、平成24年度の図4の圃場では、卵数調査だけでは残存卵の分布傾向が全く分からなかったが、図5の手法で生存卵を検出した結果、圃場の左下（北西方向）と右中央（南方向）に多く分布する場所があることが確認できた。なお、カップ検診法でも分布傾向は確認できたが、ふ化促進物質法が定量精度に優れた（図5）。

一方、カップ検診法ではカップあたり125ml以下の土壌を用いるため、125mlあたり1シスト未満の極低密度では検出できない。そこで乾土500g相当量を1つのカップで検定できる手法として、「濃縮カップ検診法」を考案した（図4）。この手法を用いれば、1.5kgの土壌（ジグザグ法で1haの圃場から採取する土壌量に相当）を3反復のカップで検定できる。現在、この手法の有効性を検証中である。

簡便に圃場内の生存卵の有無を検出するためのサンプリング法として、ジグザグ法（100点/ha）及び対角法（25～30点/ha）を試み（図6）、1点あたり10～30mlを採土し、全土壌サンプルからシストを分離して、全量を破碎し、破碎物をふ化促進物質法に供した。その結果、ジグザグ法（図6の赤矢印）は、線虫分布に偏りのある圃場でも生存卵のあるエリアを通る確率が高く、生存卵があればその検出が可能であった。一方、対角法（同青矢印A、緑矢印B）では、生存卵の多いエリアを通るAでは線虫検出が容易であったが、生存卵のほとんど無いエリアを通るBでは検出数はほぼゼロで、分布の偏り次第で残存する線虫を見落とす場合があった（表3）。結果として、スコットランドで採用されているジグザグ法の有効性が示された。

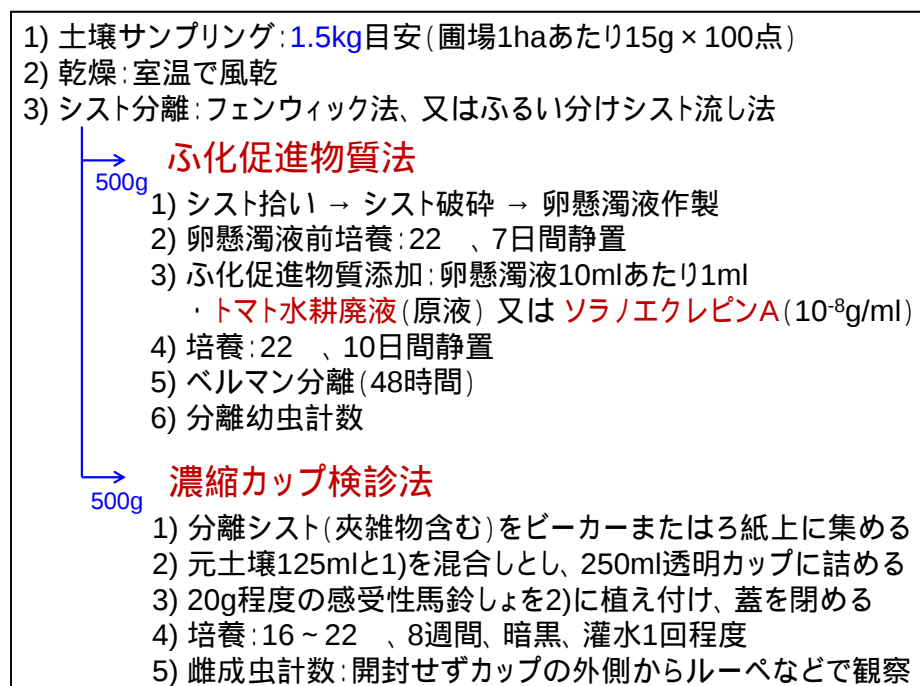


図4 ふ化促進物質法及び濃縮カップ検診法を利用した線虫生存卵の高精度検出・定量法

表2 1枚の現地実証圃場(石狩地域、37.5a)内での線虫の分布(抵抗性馬鈴しょ2作後)

	ふ化物質 ふ化幼虫 /100g乾土	カップ検診 観察雌 /125ml土壌		ふ化物質 ふ化幼虫 /100g乾土	カップ検診 観察雌 /125ml土壌
①列1	0.0	0.0	②列1	0.0	0.0
2	0.0	0.0	2	0.0	0.0
3	0.0	0.0	3	0.0	0.0
4	0.0	0.0	4	0.0	0.0
5	0.0	0.0	5	0.0	0.0
6	0.0	0.0	6	0.0	0.0
7	0.0	0.0	7	0.0	0.0
8	0.0	0.0	8	0.0	0.0
9	0.0	0.0	9	0.0	0.0
10	0.0	0.0	10	0.0	0.0
③列2	1.0	0.0	④列2	1.0	0.0
3	39.0	0.0	3	3.0	0.0
4	2.0	2.0	4	0.0	0.0
5	0.0	3.3	5	0.0	0.0
6	4.0	0.0	6	0.0	0.0
7	0.0	0.0	7	0.0	0.0
8	0.0	0.0	8	0.0	0.0
9	0.0	0.0	9	0.0	0.0
10	0.0	0.0	10	0.0	0.0

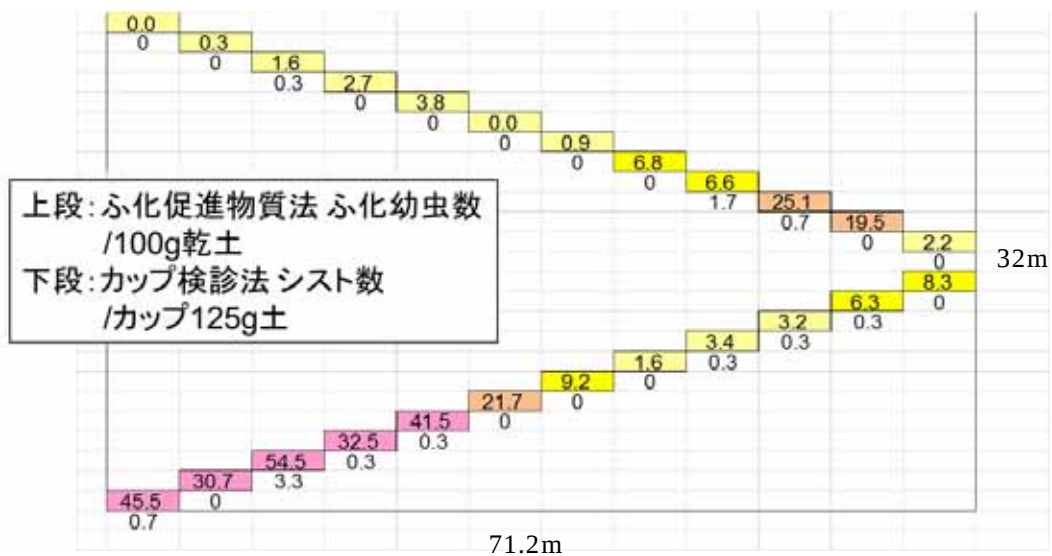


図5 ジグザグ法の採土位置から地点ごとに土壤採取した圃場(27a)の線虫の密度分布(現地実証圃場(石狩地域))

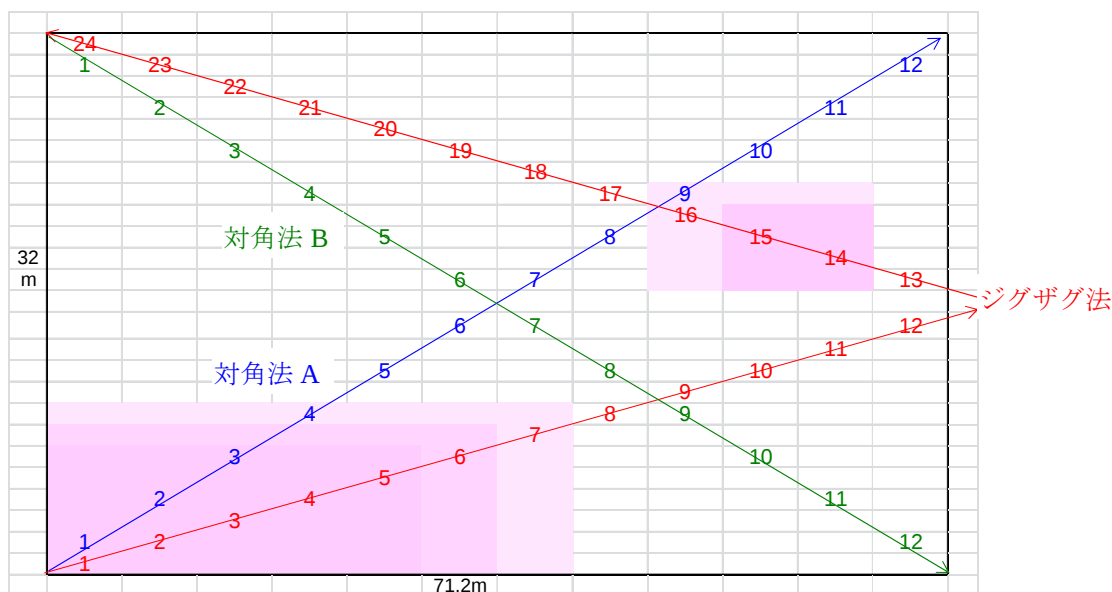


図6 ジグザグ法及び対角法の土壌採取方向(矢印)と採取地点(数字)(図6と同じ現地実証圃場(石狩地域))

注) いずれのサンプリング法も矢印の方向に進み、約 6.5m 間隔で 1 点あたり 10～30ml を採土して混合し、1 サンプルとした。

注) 図中の背景が塗りつぶされているエリアは、図 6 の結果から線虫密度が高いと類推される場所。

表3 サンプリング法による線虫検出数の比較(図7の圃場より線虫分離)

	ジグザグ法	対角法 A	対角法 B
ふ化促進物質法			
ふ化幼虫数/100g 乾土	5.3	0.2	2.7
カップ検診法			
雌成虫数/カップ 125g 土	0.3	0.0	0.0

※4： 1.5～2.5ha の 5 圃場を対象とし、圃場全体を基本的に 1 ha 単位と残りに分割し、現行の 8 歩幅法と簡便法により土壌採取を行った。また圃場全体の線虫密度分布を明らかにするため、70×140m の圃場を 7×10m の 140 区画に分割し、各区画の土壌採取を行った。圃場を一定区画に分割する際、圃場の形状は様々であるため(図1)、採取前に圃場の図面を基に採取プランを立てる必要がある(図7)。このため、将来的には GIS 等の利用が有効と考えられる。

平成 25 年度、市販の「線虫スコープ」を改良し、一定量の土壌採取を可能とした器具を使用した結果、移植ごてを使った土壌採取(平成 24 年度実施)より、ばらつきが少ないことが確認できた(表4)。土壌採取法を標準化するためには、市販で一定量採取できる器具の開発・販売が望まれる。

カップ検診法では生土を使用するが、より多量の土壌を供試するため、不織布小袋（D：15×W：118×H：167mm）を用いてフェンウィック法により分離物を集めて、予備試験を行った。その結果、不織布を通してシストが多数認められた（図8）。英国やオランダでは 1,500ml の土壌全量調査が標準とされているが、同程度ないしさらに多量の土壌を検診可能と考えられる。また、この方法は、カップ検診法への供試を想定しているが、この方法は、小課題 1 で検討中のふ化促進物質法にも応用可能と考えられ、より精度の高い検出法の開発に役立つと考えられる。

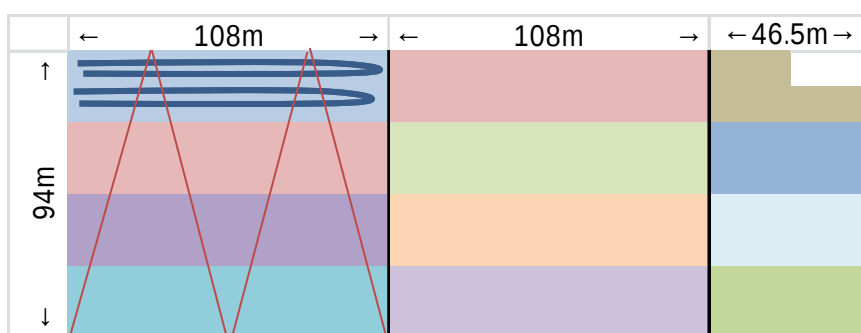


図7 ほ場全体からの土壌採取例

表4 従来法と一定量採取法の土壌量及びばらつきの比較

注1) 単位：グラム



形成シスト数			
反復			
A 圃場	60	37	20
B 圃場	1	6	1

注 1) 平成 25 年 3 月 8 日供試、4 月 26 日
(処理 49 日後) 調査

注 2) A 圃場は夾雑物極多、B 圃場は中程度

図 8 不織布小袋を使ったカップ検診法の結果

表 5 土壌の調整・保管条件のカップ検診の結果

カップ処理期間	処理条件	シスト (雌成虫数)		
2/22～4/26	湿潤	4.0	6 カップ平均	
4/30～6/24	湿潤	8.5	4 カップ平均	
4/30～6/24	乾燥	57.3	**	//

注 1) 2012 年秋産シスト汚染土 101.5 卵/乾土 g

注 2) **は他の処理と 1 %水準で有意差あり (t 検定)

※ 5 : カップ検診法によるシスト数は、感受性馬鈴しょ (ニシユタカ) を作付した 4 区で春作定植前 (1 月 10 日) より春作収穫後 (5 月 21 日) で増加したのに対し、抵抗性馬鈴しょ (アイユタカ) + イネ科緑肥作物 (スーダングラス : ねまへらそう) + ふ化促進物質資材処理区である 1 区と 1' 区、抵抗性馬鈴しょ + イネ科緑肥作物の 2 区、抵抗性馬鈴しょのみの 3 区では新生シスト数が少ないか全く発生を認めなかった (図 9、表 6)。これは土壌中の卵数 (中課題 2 の図 10) の傾向と一致するが、カップ検診法では極低密度での生存卵数を捉えることができ、検出精度が高い。

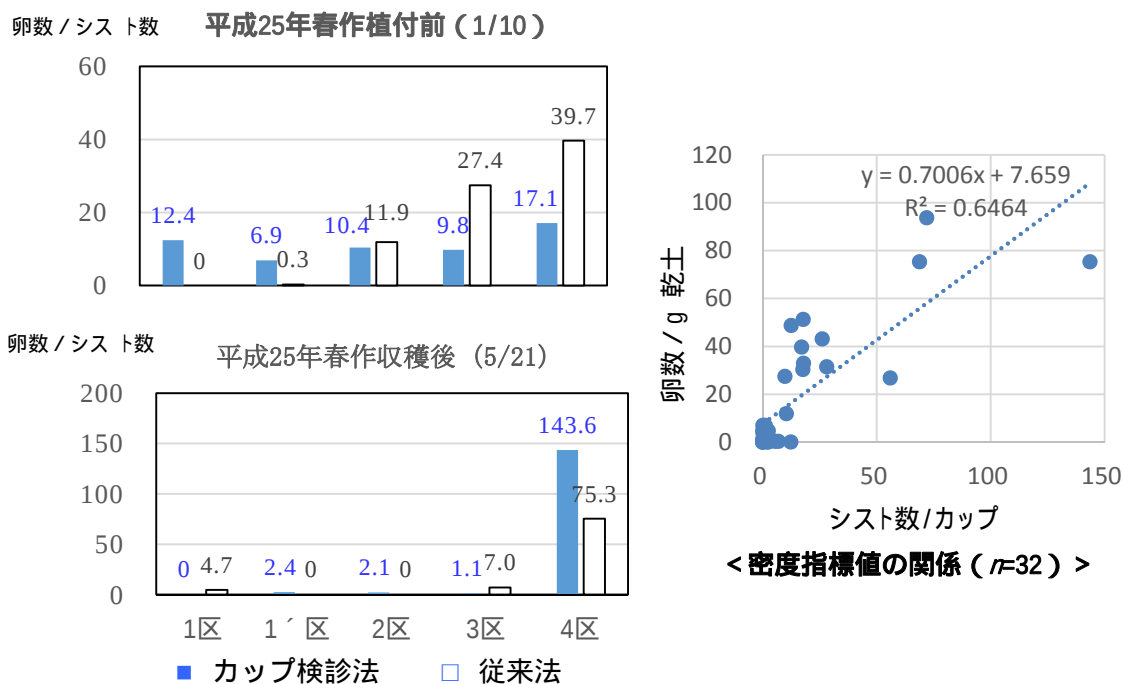


図9 カップ検診法と従来法の比較

表6 カップ検診法によるシスト確認カップ率 (確認件数/供試件数)

	1区	1'区	2区	3区	4区
春作定植前	100(6/6)	66.7(4/6)	100(6/6)	83.3(5/6)	100(6/6)
春作収穫時	11.1(1/9)	-	0(0/9)	11.1(1/9)	100(9/9)
春作収穫後	0(0/9)	44.4(4/9)	44.4(4/9)	22.2(2/9)	100(9/9)

※6：平成25年度に検討した「濃縮カップ検診法」は、様々な手法で濃縮効果を検討したものの、濃縮に見合うシスト検出感度の向上が認められなかった。そこで従来のカップ検診法、すなわち、125mlの土壌をそのまま用いて4反復（土壌約500g）の検診を実施する方法が、確実な高精度検出法であると判断した。もう一つの高感度検診法である「ふ化促進物質法」はソラノエクレピンAの濃度を 10^{-9} ～ 10^{-10} g/mlとして供試卵を培養することで、安定したふ化幼虫の出現が認められた。これら2法を組み合わせ、1～1.5kgの土壌を検診する「生存卵検出マニュアル」を改訂した（図10）。

土壌サンプリング:1.5kg 目安(圃場 1ha の場合は、1 点あたり 15g × 100 点採取)

→ **カップ検診法 500g**

- 1) 土壌 125ml を 250ml 透明カップに詰める、4 反復
- 2) 20g 程度の感受性馬鈴しょを 1)に植え付け、蓋を閉める
- 3) 培養:16 ~ 22 、8 週間、暗黒、灌水 1 回程度
- 4) 雌成虫計数:開封せずカップの外側からルーペなどで観察

→ **ふ化促進物質法 500g**

- 1) 乾燥:室温で風乾
- 2) シスト分離:フェンウィック法、又はふるい分けシスト流し法
- 3) シスト拾い → シスト破碎 → 卵懸濁液作製
(分離後約 14 日間冷蔵)
- 4) 卵懸濁液前培養:22 、7 日間静置
- 5) ふ化促進物質添加:卵懸濁液 10ml あたり 1ml
・ソラノエクレピン A(2×10^{-9} g/ml)
- 6) 培養:22 、10 日間静置
- 7) 培養後の卵懸濁液をベルマン分離(48 時間)
- 8) 分離幼虫計数

→ **予備 500g**

図 10 線虫生存卵の高精検出・定量手法(図 4 を一部改訂)

この検出法を用いて、メッシュ分割した圃場(道央の現地圃場 A, B)の各区画における残存線虫の分布を調査した。この場合のサンプリングは、線虫スcoop((株)藤原製作所製、図 11)を用いて、メッシュ中心から上下左右 1m 間隔で 9 点から深さ 0-20cm の土壌を採取し(図 12)、混合サンプル(約 1kg)とした。

従来法では供試土壌からシストは多数検出されるものの(図 13 左)、内部の卵はほとんどが殻のみで内部が充実した生存卵を検出するのはほぼ不可能であった(図 13 右)。この卵懸濁液にふ化促進物質を加えて培養する「ふ化促進物質法」を用いることで、わずかに残る生存卵を検出できた(図 14、中課題 2 の図 5 及び 6 に詳述)。カップ検診法で生存線虫が検出できたのは A, B 圃場あわせて 1 区画のみで、計 14 区画で生存線虫が検出できたふ化促進物質法に比べ、カップ検診法による検出精度は劣るように見えた。しかし、ふ化促進物質法は本来増殖能力の無い線虫を検出している可能性もあり、結論を得るには今後の検討を要する。いずれにせよ、現時点で生きている線虫を検出するふ化促進物質法と次世代増殖能力のある線虫を検出するカップ検診法を組み合わせることで、検出精度の向上が望め、生存状態が類推できると考えられる。



- ← 土壌サンプラーショート
 - ← 線虫スコープ
 - ← チーズサンプラー（半固形物サンプラー）
- M
S

図 11 土壌採取に用いた各サンプラー

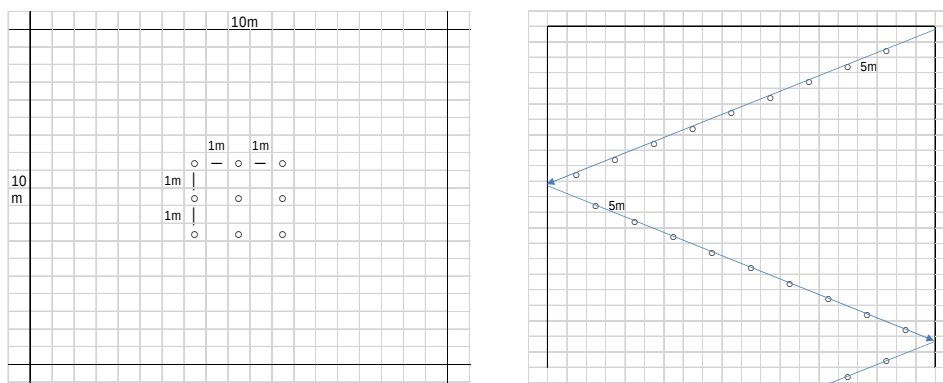


図 12 各手法の土壌採取位置

左：10m×10m メッシュ法の中心 9 点、右：ジグザグ法の 5m 間隔 1 点（100 点/ha）採土）

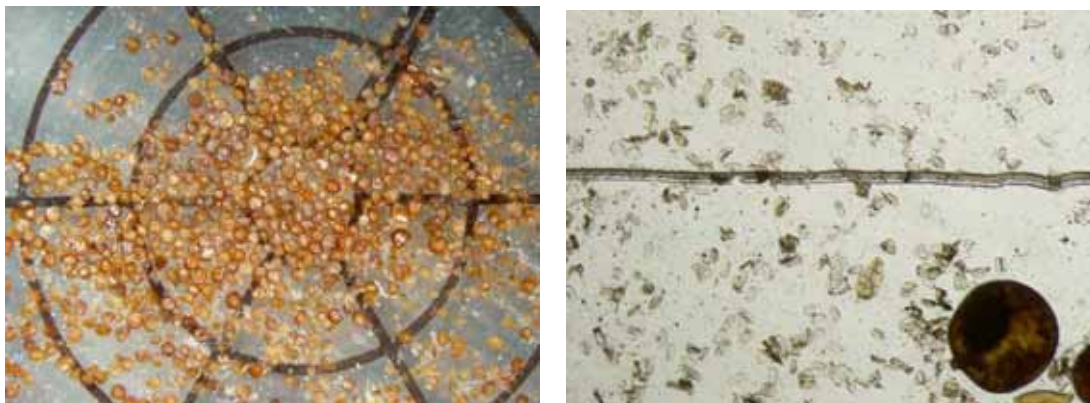


図 13 圃場 B のサンプル土壌から分離されたシスト(左)とシスト破碎後得られた卵(右)

次に、残存線虫のメッシュ分布が判明した現地圃場 A、B において、圃場全体から均一にサンプリングした混合土壌から線虫検出を試みた。サンプリングは圃場内を W 字に一筆書きで歩きながら等間隔（5m）でサンプリングする「ジグザグ法」を採用した（図 14 右、図 15）。1 点あたり 15g 前後の土壌を 0-15cm の深度で採取する道具としてはチーズサンプラー（商品名：半固形物サンプラーコンパクト SS-SOS1817、図

11) が適し、これを用いれば 1ha あたり 100 地点から採取した場合、混合した土壌は 1～1.5kg (湿潤土壌) となり、全量使用が可能であった。なお、通常の線虫土壌サンプリングに使用する線虫スコープの場合、混合した土壌は 9～10kg (湿潤土壌) となってしまう、全量から線虫分離するのは労力的に難しい (表 7)。

図 14 の矢印のようにサンプリングを行った場合、圃場 A、B とも線虫が残存するエリアを通りサンプリングすることから、混合土壌から生存線虫が検出されることが期待される。実際の結果は、チーズサンプラーによる採土の場合、圃場 A では 4 反復中 1 反復で、圃場 B では 6 反復中 1 反復で、ふ化促進物質法によるふ化幼虫を 1 頭確認した (表 7)。土壌量を増やした線虫スコープによる採土の場合、圃場 A では 2 反復ともふ化幼虫数が検出されたが、圃場 B では全く検出されなかった。また、カップ検診法では、メッシュ分割したサンプリングの結果同様、両圃場から全く線虫が検出されなかった。

以上の結果から、ジグザグ法により圃場から均一にサンプリングした土壌から生存線虫を検出する方法は、メッシュ分割した個々の区画をすべて調査する方法に比べて、はるかに労力が軽減され、残存線虫の検出確率は比較的高いと考えられる。しかし、今回の調査のような、ほぼ根絶状態の圃場の場合、反復を多くとらないと検出されない場合があった。メッシュ分割した区画ごとの調査を最終的な根絶確認手法とし、そこに至る前段階の根絶確認手法として、ジグザグ法サンプリングは有効な手段と考えられる。

	7.5m		15m		22.5m		30m	
	J2	F	J2	F	J2	F	J2	F
5m	0	0	0	0	-	-	-	-
15m	2	0	0	0	15	0	0	0
25m	0	0	8	0	10	1	0	0
35m	0	0	0	0	3	0	0	0
45m	0	0	0	0	0	0	0	0
55m	0	0	0	0	0	0	0	0
65m	5	0	0	0	0	0	0	0
75m	0	0	0	0	0	0	0	0
85m	0	0	0	0	0	0	0	0
95m	0	0	0	0	0	0	0	0

	26m		19.5m		13m		6.5m	
	J2	F	J2	F	J2	F	J2	F
5m	0	0	0	0	4	0	1	0
15m	0	0	0	0	1	0	1	0
25m	0	0	0	0	1	0	1	0
35m	0	0	0	0	0	0	0	0
45m	0	0	0	0	1	0	0	0
55m	0	0	0	0	0	0		
65m	0	0	1	0				
75m	0	0						

図 14 平成 26 年 10 月時点での現地圃場 A (左) と B (右) の残存線虫分布
及びジグザグ法によるサンプリング方向 (5m 間隔で約 15g を採土)

注) 記号等は中課題 2 の図 1、2 を参照

表 7 圃場 A、B の採集土壌量及び土壌からの検出線虫数（ジグザグ法によるサンプリング）

	チーズサンプラー						線虫スコープ	
	反復 1	2	3	4	5	6	反復 1	2
圃場 A (37.5a)								
採土量(g 乾土)	367	351	361	363	-	-	2767	2889
1ha 換算	977	937	962	968	-	-	7136	7703
検出幼虫数 ^a	1	0	0	0	-	-	3	2
検出雌成虫 ^b	-	-	-	-	-	-	0	0
圃場 B (27a)								
採土量(g 乾土)	383	395	409	409	426	403	2372	2528
1ha 換算	1021	1054	1090	1091	1135	1074	7906	8427
検出幼虫数 ^a	0	0	0	1	0	0	0	0
検出雌成虫 ^b	-	-	-	-	-	-	0	0

a) ふ化促進物質法によるふ化幼虫数（チーズサンプラーでは採土量あたり、線虫スコープでは乾土 400g あたり）

b) カップ検診法による 125ml 土壌 4 反復の検出雌成虫数（線虫スコープのみ）

※ 7：前年度に引き続き、道東の線虫発生圃場において、北海道において標準のサンプリング法とされている「八歩幅法」と簡便なサンプリング法として採用を検討している「ジグザグ法」の検出精度を比較した。

平成 25 年は、オホーツク地域において馬鈴しょ収穫後の 5 圃場を選定し、それぞれに面積が 1ha 前後となるよう、1～3 点（計 13 点）の調査区を設定した。調査区において八歩幅法、ジグザグ法により土壌サンプリングし、カップ検診法によりシスト着生数を比較した。結果は図 15 のとおりで、ジグザグ法は八歩幅法との間におおむね相関が認められ、ほぼ同等の検出精度が得られたと考えられる。

上記 5 圃場のうち 1 圃場（70×140m）について、7m×10m メッシュで、カップ検診法により線虫密度の分布を調査した。線虫の圃場内分布は、図 16 に示すように一様ではなかった。しかし、このような圃場でも、八歩幅法とジグザグ法で土壌サンプリングを行った場合の線虫密度はほぼ同じと判定されたことから、両手法間の差異はないものと考えられる。

平成 26 年度は、オホーツク地域において馬鈴しょ収穫後の 5 圃場を選定し、それぞれに面積が 1ha 前後の調査区（計 9 点）を設定した。調査区において八歩幅法及びジグザグ法により土壌をサンプリングし、卵密度を比較した。シストの分離はふるい分けシスト流し法によった。結果は図 17 のとおりで、簡便なジグザグ法は、従来の八歩幅法と同等の検出精度が得られたと考えられる。

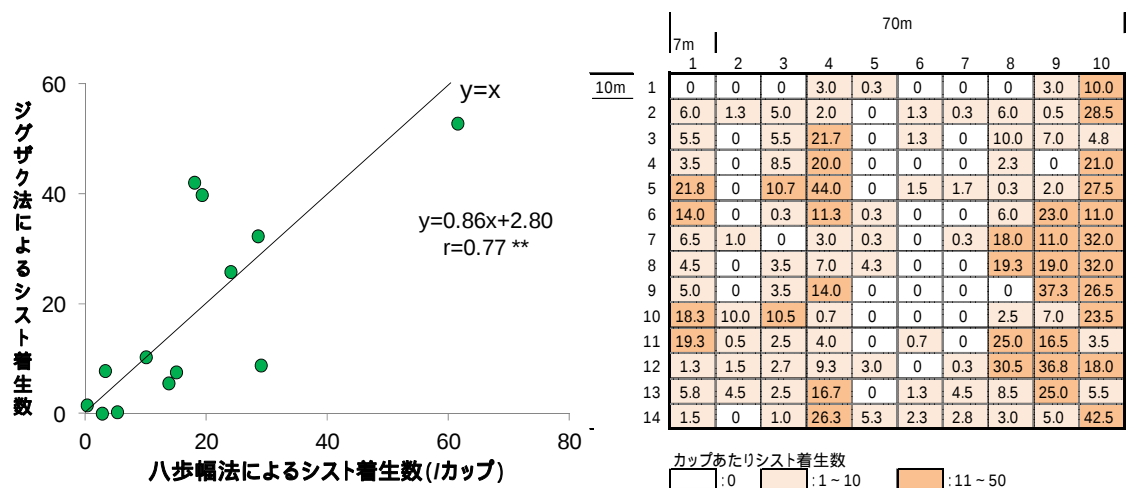


図 15 八歩幅法及びジグザグ法による土壌サンプルのシスト着生数の関係 (平成 25 年、オホーツク地域 5 圃場 13 点)

図 16 70 × 140m 圃場内の線虫密度分布 (カップ検診法によるシスト着生数)

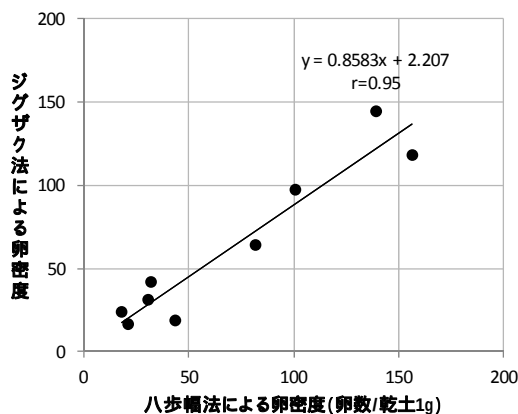


図 17 八歩幅法とジグザグ法による卵密度の比較 (平成 26 年、オホーツク地域 5 圃場 9 点)

※ 8 : 長崎県の暖地二期作馬鈴しょ栽培において、抵抗性品種のアイユタカの 4 連作となる 1~4 区と感受性品種のニシユタカの連作となる 5~8 区の線虫検出を行った。従来法では、1~4 区は、各深度とも低密度ではあるが卵数を認める区があったが、カップ検診法では、全ての区で各深度とも増殖シストを認めなかった。一方、感受性品種のニシユタカを作付けた 5~8 区では各深度とも増殖シストが認められた (図 18)。

抵抗性品種の連作区である 1~4 区で、卵数が認められても増殖しない理由として、従来法では活性のない卵を生卵として計数している可能性が示唆された。そのため、

秋作前の同一試料から分離したシストを破砕して得られた卵の懸濁液にふ化促進物質ソラノエクレピン A 水溶液を加えふ化させた二期幼虫数を調査した結果、1～4 区では二期幼虫のふ化が認められなかったことから活性を有する生存卵がない可能性があると考えられた（図 19）。これらのことから、線虫の根絶を見極めるような低密度下における検診では従来法では判定が困難であり、カップ検診法及びふ化促進物質法の実用性が高いことが明らかとなった。

土壌深度別調査の結果、カップ検診法及び従来法とも、地表面～10cm の深さの土壌に最も多く、次いで 10～20cm、20～30cm の深さの順に多かった（図 18）。なお、長崎県の暖地二期作馬鈴しょの生産現場では、各馬鈴しょ作付け前後に生産者による耕耘が実施され、一般的な耕土層である地表面から深度約 20cm までの土壌が攪拌されるが、それより深い土壌は耕耘されないため固く、採集に労力がかかることからサンプリングには不向きである。これらのことから、線虫を有効にサンプリングするためには耕耘後に地表面～10 cm の深さの土壌をサンプリングすることが最も有効であると考ええる。また、本地域では、感受性品種のバレイショを作付けると土壌中の線虫密度は一年間で最も春作後に高くなる（中課題 2 の図 16）ことから、春作収穫後の耕耘後が最も有効な採集時期であると考えられる。

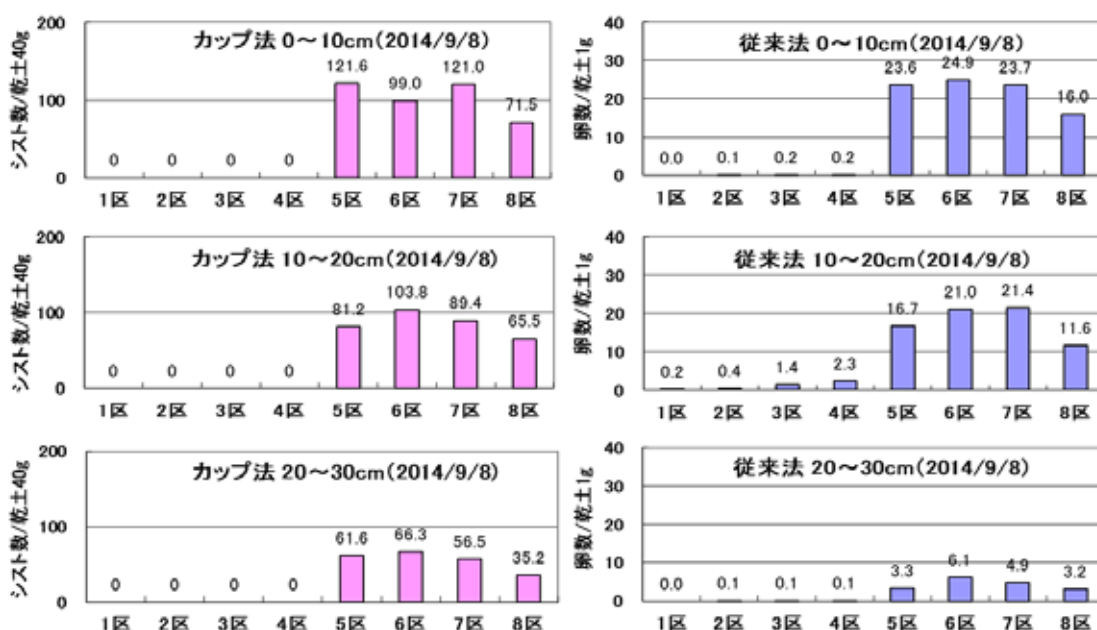


図 18 従来法とカップ法による線虫の垂直分布の比較（2014 年秋作植付前）

注）シスト数（カップ法）は 4 反復、卵数（従来法）は 3 反復の平均値
 カップ法は 18℃の暗所でバレイショ（ニシユタカ）を 60 日間栽培後に得られた新生シスト数を計数 土壌採集時期：2014 年 9 月 8 日

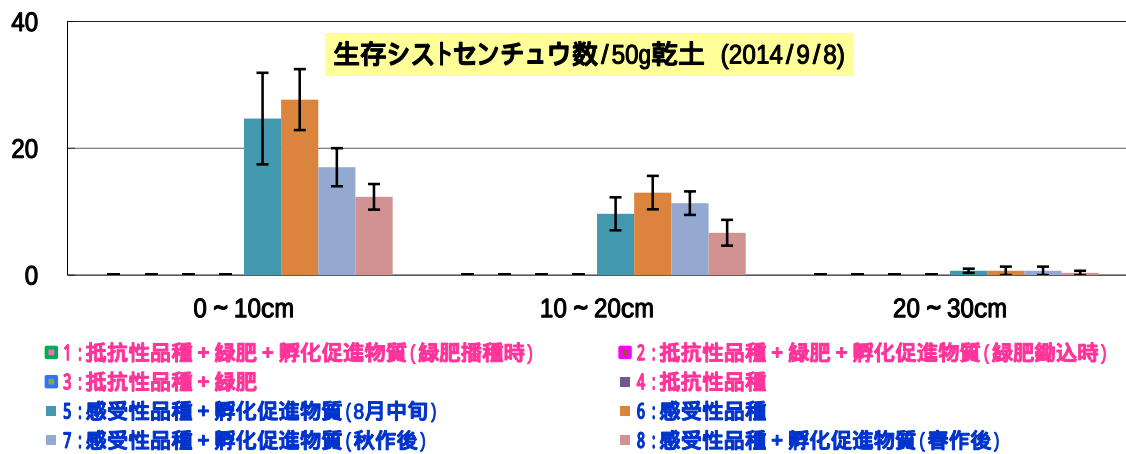


図 19 各区の土壌深度と生存シストセンチュウ数の関係

注) 各区土壌から分離したシストを破碎して得られた卵の懸濁液にソラノエクレピン A 水溶液を加えふ化させた二期幼虫数を調査. 1 ~ 4 区は全深度とも発生を認めず.

Ⅲ. 主要な成果

1. 成果の内容

- 1) ナス科対抗植物の短期栽培によるジャガイモシストセンチュウ密度低減技術の開発

北海道の線虫汚染圃場にトマト野生種またはハリナスビの種子 1 kg/10a 相当を 6 月中旬～7 月上旬に播種し、休閒緑肥として 60～80 日間栽培すると、卵密度は栽培前の 20%以下に低減した。線虫発生程度が中密度程度であれば要防除水準以下まで減少効果が期待できる。(p14～15)

- 2) 馬鈴しょ抵抗性品種の複数回栽培による根絶可能性の提示

スタート時に高密度圃場であっても、抵抗性品種 3 作以上と非寄主作物を組み合わせた輪作、あるいは抵抗性品種の 4 連作によって、圃場内土壌から次世代線虫の増殖が確認されず、根絶の可能性が示された (p30～31、39～40)。

- 3) 高精度な生存線虫検出法の確立

土壌中から分離したシストにふ化促進物質を加えふ化した線虫を検出するふ化促進物質法と、次世代増殖能力のある線虫を検出するカップ検診法を組み合わせることで、精度の高い生存線虫の検出が可能になり、根絶を判断する際に利用できる (p54～57)。

- 4) 労力の軽減と検出精度の維持を両立したサンプリング法の実証

1ha あたり 100 点の土壌をジグザグにサンプリングする「ジグザグ法」は、北海道において標準のサンプリング法とされている「八歩幅法」と比較し、1/3～1/4 の労力で同等の検出精度が維持されることを実証した (p46～47、50～51、55～58)。

2. 成果の活用

- 1) ナス科対抗植物は種苗メーカー等を通じて購入可能であり、一部の農家では試験栽培が開始されている。本成果は、平成 26 年度の北海道農業試験会議における指導参考事項、及び農研機構における主要普及成果に採択されたことから、今後のいっそうの普及が期待される。

- 2) 北海道における馬鈴しょ抵抗性品種の普及割合は現在約 20%程度である。感受性品種を栽培せず、抵抗性品種を 3 作以上栽培すれば根絶の可能性が示されるなど、抵抗性品種の優位性が広く認識されたことから、北海道は抵抗性品種の普及割合を、平成 34 年度にまでに 50%とすることを決定した (平成 24 年度)。

Ⅳ. 論文、特許等の実績及び推進会議の開催状況等

別紙のとおり

別添

論文、特許等の実績及び研究推進会議開催状況等

試験研究課題名	ジャガイモシストセンチュウの根絶を目指した防除技術の開発と防除モデルの策定												
---------	---------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

課題 番号	(1) 行政が 活用しう る成果の 有無	(2)学術論文数		(3)口頭発表回数		(4) 出版 図書数	(5)国内特許権等数		(6)国際特許権等数		(7) 報道 件数	(8) 物品購 入の有 無	(9) 研究推 進会議 等開催 回数
		和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得			
2407	有	2	0	18	2	2	0	0	0	0	1	有	6

※以下、(1)～(9)において、下線は平成26年度の実績

(1)行政が活用しうる成果

区分:①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況	機関名
②	ナス科対抗植物の短期間栽培によるジャガイモシストセンチュウ密度低減技術	ジャガイモシストセンチュウ発生圃場における線虫防除、被害軽減	平成27年度の北海道病害虫防除ガイドに盛り込まれる予定、北海道および農研機構のHPに技術内容が掲載予定	農研機構北海道農研、雪印種苗(株)

(2)学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
ジャガイモシストセンチュウふ化促進物質の化学合成 ―環境調和型シストセンチュウ駆除剤への期待―、谷野圭持、農林水産技術研究ジャーナル、Vol. 35, No. 5, 45-48 (2012.05)	北海道大学
ハリナスビの短期間栽培によるジャガイモシストセンチュウ密度低減効果、伊藤賢治、奈良部孝、北日本病害虫研究会報、63, 157-159, (2012.12)	農研機構北海道農業研究センター

(3)口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
ジャガイモシストセンチュウ検診のための土壌サンプリング法の検討 ○古川勝弘1・伊藤 舞2・今野敏文2 (1道総研北見農試・2網走農改) 2012 年度日本線虫学会大会 (第20回大会) 2012年9月18-20日	道総研北見農試
土壌害虫防除資材の高機能化に及ぼす多孔特性の検討、○執行達弘1、野村隆文1、赤澤敏之1、奈良部孝2、桂川尚彦3 (1道総研工試・2北農研・3雪印種苗)、化学工学・粉体工学研究発表会、2013年2月1-2日、函館	道総研工業試験場、農研機構北海道農研、雪印種苗(株)
孵化促進物質によるジャガイモシストセンチュウ防除、奈良部孝、2012 年度日本線虫学会大会 (第20回大会) 2012年9月18-20日	農研機構北海道農業研究センター
今後普及が期待される最新の防除技術―ふ化促進物質と対抗植物―、奈良部孝、北海道農業研究センターシンポジウム、2013.2.26, 網走	農研機構北海道農業研究センター
化学の力でジャガイモを救う: 農薬でない農薬の開発研究、谷野圭持、北海道大学オープンキャンパス 理学部公開講座、2012. 8.5-6, 札幌.	北海道大学
社会に役立つ「ものづくり」としての多段階合成を求めて:シストセンチュウふ化促進物質の全合成、谷野圭持、「有機合成化学を起点とするものづくり戦略」第2回ミニシンポジウム, 2012. 9.28, 札幌.	北海道大学
社会に役立つ有機合成を求めて:シストセンチュウふ化促進物質の全合成、谷野圭持、平成24年度関学化学フォーラム「有機合成化学を究める」, 2013. 1.28, 三田.	北海道大学
Control of potato cyst nematode by application of hatching factors, T. Narabu, 2012 Korea-Japan Joint Symposium on Nematology, 2012.10.12, Jeju, Korea.	農研機構北海道農業研究センター
ジャガイモシストセンチュウ卵の生死判別ツールとしてのふ化促進物質の利用、○奈良部孝1・谷野圭持2・副島洋3 (1農研機構北海道農研・2北大院理・3雪印種苗(株))、2013 年度日本線虫学会大会 (第21回大会) 2013年9月6日	農研機構北海道農業研究センター、北海道大学、雪印種苗(株)

Control of potato cyst nematode by resistant cultivars, trap crops and hatching factors, T. Narabu, 2013 International Symposium on Parasitic Nematodes in Korea, 2013.10.8, Cheongju, Korea	農研機構北海道農業研究センター
量産したふ化促進物質資材によるジャガイモシストセンチュウ密度低減効果の現地実証、○奈良部孝1・伊藤賢治1・副島洋2・執行達弘3・野村隆文3(1農研機構北海道農研・2雪印種苗・3道総研工業試験場)、第58回日本応用動物昆虫学会大会, 2014年3月27日	農研機構北海道農業研究センター、雪印種苗(株)、道総研工業試験場
シストセンチュウふ化促進物質の不斉全合成、谷野圭持、 新学術領域研究「生合成マシナリー:生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御」第5回公開シンポジウム, 2013. 6.16, 札幌.	北海道大学
合成ふ化促進物質Solanoeclepin A による土壌中のジャガイモシストセンチュウ密度低減効果、○奈良部孝1・谷野圭持2(1農研機構北海道農研・2北大院理)平成26年度日本植物病理学会大会、2014年6月4日	農研機構北海道農業研究センター、北海道大学
現地圃場における合成ふ化促進物質Solanoeclepin A のジャガイモシストセンチュウ密度低減効果、○奈良部孝1・岩倉優2・谷野圭持2(1農研機構北海道農研・2北大院理)第59回日本応用動物昆虫学会大会、2015年3月28日	農研機構北海道農業研究センター、北海道大学
ジャガイモシストセンチュウ密度低減のためのトマト野生種Solanum peruvianumの実用的短期間栽培技術、○伊藤賢治1・奈良部孝1・佐久間太2・臼木一英1・相場聡1・小野寺鶴将3(1農研機構北海道農研・2雪印種苗・3道総研北見農試)第59回日本応用動物昆虫学会大会、2015年3月28日	農研機構北海道農業研究センター、雪印種苗(株)、道総研北見農試
化学の力でジャガイモを救う:農薬でない農薬の開発研究、谷野圭持、 北海道大学化学系への二日体験入学 特別講義, 2014. 8.5, 札幌.	北海道大学
社会に役立つ有機合成を求めて:シストセンチュウふ化促進物質の全合成、谷野圭持、 有機合成夏期セミナー「明日の有機合成化学」, 2014. 8.29, 大阪.	北海道大学
シストセンチュウふ化促進物質ソラノエクレピンAの不斉全合成、谷野圭持、 大塚有機合成シンポジウム2014, 2014. 9.16-17, 徳島.	北海道大学
ジャガイモシストセンチュウ土壌検診のためのサンプリング法、○小野寺鶴将1・古川勝弘1・伊藤 舞2・真鍋照彦2(1道総研北見農試・2網走農改)、2014 年度日本線虫学会大会(第22回大会) 2014年9月16日	道総研北見農試
凍結融解試験を応用した土壌害虫防除資材の崩壊性の評価、○執行達弘1、野村隆文1、奈良部孝2、眞木祐子3、副島洋3(1道総研工試・2北農研・3雪印種苗)、産業技術連携推進会議(第49回セラミックス技術担当者会議)、2014年12月11日、名古屋	道総研工業試験場、農研機構北海道農研、雪印種苗(株)

(4) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
②	いも類振興情報、トマト由来孵化促進物質の資材化とジャガイモシストセンチュウ被害回避への利用、奈良部孝、(一財)いも類振興会、2014年1月	農研機構北海道農業研究センター
②	あぐりぽーと、抵抗性品種栽培のメリットについて、奈良部孝、ホクレン農業協同組合連合会、2014年10月	農研機構北海道農業研究センター

(5) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(6)国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考
②	ジャガイモシストセンチュウ新防除法を 開発ーふ化促進資材まき餓死へー	日本農業新聞	平成25年6月19日	農研機構北海道農業研究セ ンター	朝刊16面