

ハス *Nelumbo Nusifera* Gaertn. を加害するレンコンネモグリセンチュウ
Hirschmanniella diversa Sher (Rhabditida: Pratylenchidae) の生態および化学的
防除法に関する研究

高木素紀¹⁾

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

**Investigation of Ecology and Chemical Control Method of Lotus Root Nematode
Hirschmanniella diversa Sher (Rhabditida: Pratylenchidae)
to Damageing Indian Lotus *Nelumbo Nucifera* Gaertn.**

Motonori TAKAGI

要約

ハスおよびその収穫物であるレンコンを加害するレンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* (以下レンコンネモグリ) の防除法に資するため、本線虫に対する基礎的な生態・防除法・国内分布と系統関係を調査した。

茨城県石岡市のレンコンネモグリ発生圃場にて 2010–2013 年の 3 年間、レンコンネモグリのハス細根内発生消長を調査したところ、いずれの場合も 9 月をピークとした一山型の発生を示した。得られたレンコンネモグリの口針長と体長からその齢構成、孵化時期を、既交尾雌率の推移からその産卵時期を明らかにした。その結果、レンコンネモグリは年一化性であり、4–5 月に交尾・産卵し、8 月–9 月に孵化、11 月までに多くの個体が成虫あるいは 4 期幼虫となり、根部や土壌中で越冬すると予想された。

また、化学的防除法開発のため、レンコンネモグリに有効な薬剤の選抜を実施したところ、ベンフラカルブ、カルタップ、シアナミドの 3 成分が現実的に水系で使用できる分量で殺線虫効果を持つと考えられ、中でもベンフラカルブが制線虫効果にも優れ最も有望であった。そこで、ベンフラカルブ 120g/10a を線虫汚染圃場に施用して 2014–2017 年の 4 年間、小規模圃場試験を実施した結果、いずれの年も被害度が低下したことから、ベンフラカルブは有望な線虫剤であることが明らかとなった。

一方、日本にはいくつかレンコンの産地が存在するが、茨城、千葉、石川以外に公的なレンコンネモグリの分布記録がなかった。さらに、レンコンネモグリの被害は 1990 年代から急に被害が報告されるようになったことから、近年アジア圏から侵入した害虫であることも疑われたため、日本のレンコンネモグリの分布状況および系統解析を実施した。その結果、サンプルを採集できた 10 県 16 地点のレンコン全てからレンコンネモグリが発見され、日本に広く分布していることが示された。またその DNA を、ミトコンドリア COI を基にして解析したところ、国内で 5 つのハプロタイプが認められた。その多様性の高さから、レンコンネモグリは在来種であることが示唆された。

キーワード：蓮根黒皮線虫病、発生消長、化学的防除法、系統解析、在来種

本論文は、東京農工大学大学院生物システム応用科学府審査学位論文(2020年3月)に一部追加修正したものである。

1) 現所属：茨城県農業総合センター鹿島地帯特産指導所

本論文では、ハスおよびレンコン *Nelumbo Nucifera Gaertn.*の可食部である、商品となる部分を“レンコン”、可食部を含めた植物を“ハス”と表記する。

第1章 はじめに

1. 1 日本および茨城県におけるレンコン生産の位置付け

茨城県には古くからハスが自生しており、奈良時代（721年）に成立した「常陸国風土記」にも、茨城県鹿島市鹿島神宮周辺の水辺にハスが生育し、「蓮根は、味気太だ異にして、甘きこと、他所に絶れたり。病める者、此の沼の蓮を食べば、早く差えて験あり」と表現された。すなわち、“池に生えるレンコンは、比べる産地がないほど味わいを異にして、大変美味いとしかしいようがない。そればかりか、病に苦しむ者は、この沼の蓮を食べば、たちどころに治るといふ。”（鹿嶋市文化スポーツ振興事業団、2017）と記述されていた。また、古くから、ハスはレンコンだけでなく、ハスの実や葉なども食されており（立山、2020）、薬効も信じられてきた。

霞ヶ浦周辺でのハス栽培は、元木（1981）によると天保年間（1831–1835）には土浦藩の命により開始された。しかし、レンコンは比較的日持ちのしない重量野菜であることから、第2次世界大戦前から終戦後までは、東京、大阪および愛知などの都市近郊の低湿地での生産が大きな割合を占めていた。その後高度経済成長期を迎えると、都市化の影響により産地の変遷が進み、都市から茨城県や徳島県にレンコン生産拠点が移動した（元木、1981）。1972年には茨城県のレンコン作付面積および収穫量が全国一となり、その後他の産地に首位を奪われることなく約半世紀に渡り主産地を維持しているのは、レンコンが高価格で安定的な市場を形成しているため（羽田ら、2018）であると考えられる。

羽田ら（2018）は野菜出荷統計から、1973年には104,400t収穫されていたレンコンは年々減少し、2015年には56,700tと約半減していると報告している。その内訳を見ると、茨城県以外の産地は、腐敗病等の要因によりその生産量を減じ、1973年に対する2015年のレンコン収穫量は徳島県で30.7%、愛知県で31.2%、佐賀県で39.5%、山口県で31.0%にまで減少している。一方、茨城県は21,000tから29,000tと増加している。茨城県のこの増加の要因としては、先に述べたレンコンの高価格と、東京市場という安定的な売り先があったことに加え、1970年代以降に早くポンプを活用して水圧でレンコンを掘り取る“水掘り”（Fig. 1-1）と呼ばれる方法を用いて、大幅に労力削減を行い、なおかつ年中湛水とすることでレンコンの収穫量減少の大きな要因であるレンコン腐敗病の防除に成功したことが大きいと考えられる。



Fig. 1-1 水掘りの様子

近年はレンコンの機能性にも注目が集まっており、アレルギーに効果があるという報告（Kaneyasu et al., 2019; Wakugawa et al., 2020）や、高血圧（Hu and Skibsted, 2002）及び糖尿病（Tsuruta et al., 2012）などに対する効果が期待できるという報告もあり、このほかにもレンコンには様々な薬理作用を持つ物質が含有されている（Tungmunnithum et al., 2018）ことから、今後もレンコンの注目度合いや需要は衰えない見込みである。その一方で、茨城県のレンコン生産にも高齢化が押し寄せており、経営者の平均年齢は60歳を超えている。そのため、面積を縮小する経営体がある一方、労働力を求めて外国人研修生制度の活用や、日本人雇用など行う経営体もあり、1戸あたりの経営規模は縮小と拡大の2極化が進行し

（羽田ら、2018）、レンコン経営は新たなフェーズに移行していると言える。

また、レンコンは高収益作物であり、その収益率は59%にも及び（茨城県調べ）、土浦市田村町の一経営体（平均210a）での粗収益は2,000万円を超える（羽田ら、2018）ため、他の野菜よりも高収入を得やすい。そのため、1986年から営農の始まった石川県金沢市の河北潟などの新たなレンコン産地（川原ら、2014）や、労働強度を下げるために土掘りから水掘りに移行する産地（佐賀県など）、稲田をハス田に転換して新たな産地化を狙う生産者が各地に存在することなど、今後も生産拡大が見込まれる作物である。さらに、レンコンの収穫時期は露地栽培では8月中旬–翌年の5月までと長期間に渡り、土壌中にそのまま放置しておけば計画的に掘取を行うことができ（Table 1-1）、比較的休暇も取りやすく、若い世代も取り組みやすい作物である（羽田ら、2018）。

Table 1-1 The cropping calendar of lotus in Japan.

Month	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	
Type of cultivation ^{a) b)}	Open field	[Black line]							[Blue square]				
	Greenhouse		[Black line]				[Blue square]						

a) This table doesn't describe open field cultivation for two years called "2nenn-bori". Because not so different transeplanting and harvest period with one year openfield cultivation.

b) Black squares show transplanting period, black lines show growing period and blue square show harvest period, respectively.

1. 2 レンコンの2大病害虫、レンコン腐敗病とレンコン黒皮線虫病

レンコンは、非常に魅力的な経営が行える作物である一方、市場の求める品質のレンコンを生産できる条件（土質等）が限定されていることや、以下の病害虫の経済的被害が大きい。前述の土掘りの地域に多いレンコン腐敗病と、水掘りの地域で問題となることが多い、レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella divera*（以下レンコンネモグリ）によって引き起こされるレンコン黒皮線虫病（以下黒皮病と略）である。

レンコン腐敗病は、好気性菌である *Fusarium* 属菌（西門・渡辺、1952）や *Pythium* 属菌（米本ら、2013）などによって引き起こされ、徳島県では *Fusarium* 属菌によるものが多い（沢田・阿部、2017）。徳島県や愛知県など、土壌を乾田化してから農機具を使って掘り取りを行う”土掘り”（Fig. 1-2）を行う地域では一般的に被害が大きいとされる（沢田、2010）。



Fig.1-2 土掘りの様子(愛知県、堀井氏原図)

腐敗病の防除には古くから石灰窒素が用いられてきた（南川ら、1959）が、その防除効果は必ずしも安定しないことから、産地では有効な防除対策の構築が大きな問題となってきた。近年になって、レンコン田を夏季に落水して田面全面をビニル被覆する太陽熱土壌消毒法（沢田・阿部、2017）が開発され、高い防除効果をあげているが、大きな労力が必要かつ時期が限定されるため、より大面積への普及には機械等を用いた軽労化・効率化などが課題である。

一方、水掘りである茨城県、千葉県においては、1990年頃から新たな問題が起きるようになってきた。すなわち、レン

コンの表面部分に褐色-黒色の不定形斑点（ゴマ症状と呼ばれる）や、不規則な凹凸（ユズ肌症状と呼ばれる）が生じる（Fig. 1-3）、通称”レンコン黒皮症”である（三平・永井、1996；藍澤ら、2002）。千葉県では、レンコン黒皮症の細根部から分離されたイマムラネモグリセンチュウ *H. imamuri* Sher（以下イマムラネモグリと略す）の接種試験により、レンコン黒皮症の原因はイマムラネモグリとされ、レンコン黒皮線虫病と命名された（三平、2002）。しかし、水久保（2002）は、千葉県および徳島県のレンコン加害個体群はイマムラネモグリとは別種であり、*H. divera* Sher と同定し、レンコンネモグリセンチュウと和名を付した。本稿ではこれまでの調査結果（Takagi et al., 2023）などから、イマムラネモグリによるレンコンへの寄生・加害は限定的であるとして、基本的にレンコンを加害する線虫をレンコンネモグリに限定して述べる。詳細は第4、6章で後述する。



Fig.1-3 レンコン黒皮症の症状

その後、線虫のもつ生理的な嫌悪感による消費者の風評被害への懸念や、湛水条件での線虫防除対策の糸口が見えなかったことなどから、レンコンネモグリに関する研究は一旦途絶えた。しかし徐々に黒皮線虫病の被害は拡大し、石川県（植松ら、2015；Uematsu et al., 2020）や新潟県（日本石灰窒素工業会、2008）などでも被害の報告がされるようになったことなどから、次第に面的な広がりも見せ始めるようになってきた。また、茨城県一部地域では本病による被害により、経済的栽培が困難となり耕作放棄の一因ともなる事例が認められた（高木ら、2017）。

そこで、著者らは2010年からレンコンネモグリセンチュウについての生態・防除法に関わる研究を開始した。

1. 3 レンコンネモグリセンチウを含む *Hirschmanniella* 属線虫の知見

レンコンネモグリは、Sher (1968) によってハワイのオアフ島の非食用ハスから分離・記載された *Hirschmanniella* 属の 1 種である。レンコンネモグリによる被害は、直接的にレンコンの収量に影響することは多くないが、水掘りを行ったのちに表面の土壌を洗浄して、その白さを付加価値として出荷する、外観品質を重視する茨城県等の地域においては経済的な被害が非常に大きい (高木ら、2017)。

1960 年代から 1970 年代にかけて、日本の農業生産においては、イネ *Oryza sativa* に寄生するイネネモグリセンチウ *H. oryzae* (以下イネネモグリと略す) およびイマムラネモグリによる減収が問題視され、終戦後の食糧生産拡大期にはこの 2 種の防除法が盛んに研究されてきた (川島、1992)。この 2 種に対しては、生態解明、抵抗性品種の開発、耕種的防除法の検討の他、全国的に D-D 剤などの効果試験が行われ、一定の効果は認められたものの非常に不安定でばらつきが大きく、またコメの生産過剰に端を発する減反政策という逆風もあり、研究は潰えてしまった (川島、1992)。

他に、日本の水系の作物では、沖縄の伝統野菜であるタイモ *Colocasia esculenta* の立枯細菌病の助長要因として、イネネモグリが重要な役割を果たしている (大城ら、2013) と報告されているが、現在までのところ、本種に対する有効な防除手段は開発されていない。国外に目を移すと、水系で栽培する作物で問題となる *Hirschmanniella* 属線虫は、イネに寄生するイネネモグリおよび *H. mucronate* (Feng et al., 2016)、タイモ同様に湛水で栽培するタロイモの一種 *C. esculenta* に寄生する *H. miticausa* (Bridge et al., 2005) などが挙げられる。珍しいものでは、観賞用の水草に寄生する *H. caudacrena* の報告 (Ryss and Karnkowski, 2010) もある。イネネモグリは、ミャンマーなどのイネ二期作の地域では被害が大きい (Win et al., 2013) とされ、農薬 (Jonathan and Velayutham, 1984 ; Prasad and Rao, 1984 ; Walia and Bhatti, 1985 ; Zhang and Ai, 1994 ; Lahan et al., 1999)、抵抗性品種 (Ramakrishnan et al., 1984 ; Randhawa et al., 1992)、セスバニア *Sesbania rostrata* やナガボノウルシ *Aeschynomene afraspera* を対抗植物として用いる (Germini et al., 1985; Hendro et al., 1992 ; Prot et al., 1992) などさまざまな防除法が検討されているにもかかわらず、コストなどの問題から効果的な防除法は実用化されていない (Bridge et al., 2005)。これらの防除試験はほぼ 1980-1990 年代に行われており、それから現在に至る 20-30 年間は、防除法についての試験すらほとんど行われていないことから、これといった打開策が打てないまま栽培が続けられていると考えられる。ハスに発生するレンコンネモグリに対する対策も、同属他種線虫同様防除困難と予想され、参考になる方法がないまま白紙の状態から試験を開始した。

1. 4. 本研究の目的

本研究は、現場の問題が先行して、防除法が強く求められているにも関わらず、防除の基礎となるような生態情報や薬剤に対する感受性などがほぼ手付かずで取り残されているレンコンネモグリ問題の現状を打破し、防除対策に資するために以下を目的とした。

- 1) 茨城県のハス根部から *Hirschmanniella* 属線虫を分離し、再度レンコンネモグリであること証明すると共に、レンコン根部内のレンコンネモグリの発生消長・およびその生活環を明らかにする。
- 2) レンコンネモグリを用いて、各種殺虫剤から有効なものをスクリーニングする。その中で有望なものを用いて隔離枠圃場試験を行い、有効性を明らかにする。
- 3) 日本国内のレンコン産地からハス根部を採集し、*Hirschmanniella* 属線虫の発生状況および種を、形態学的あるいは分子生物学的に明らかにする。また、得られた線虫から DNA を抽出し、その塩基配列を調査して系統関係および出自を明らかにする。

第 2 章 ハス根部内のレンコンネモグリセンチウの発生消長と生活環

2. 1 はじめに

レンコンネモグリセンチウは、日本では 2002 年に和名が付けられた (水久保、2002)。作物に害をなす植物寄生性線虫としては、比較的最近になって発見された線虫である。寄主が世界的に見てマイナーな作物であるハスのため、ほとんど研究が進んでおらず、その生態については寄主となる植物の調査や、中国での分布を調査したものなどいくつか報告があるものの (Liu et al., 2000 ; 植松ら、2015 ; 高木ら、2016 ; 高木ら、2017)、防除対策等を構築するための基礎情報である発生消長や、各ステージの生活部位や越冬形態などの生活環についてはほとんど調査されていない。また、茨城では被害症状を呈するレンコンに本種が寄生するかどうかすら明らかで

はなかった。

そこで、本章では茨城県のハス栽培圃場から根部を採集して *Hirschmanniella* 属線虫を分離し、種同定を行ってレンコンネモグリの存在を確認した。また、分離したレンコンネモグリの発生活長および生活環、すなわち交尾、産卵、孵化および越冬形態などの生活環に関わる生態情報を明らかにすることを目的とした。

2. 2 材料および方法

2. 2. 1 サンプルング圃場

調査は茨城県石岡市関川地区（北緯 36 度 14 分、東経 140 度 32 分）のハス栽培圃場 2 筆（各々圃場 A および B とする。1 圃場約 17m×45m。）でおこなった。本地域は霞ヶ浦に近接しており、全国デジタル土壌図（農研機構、2017）によると、土壌分類は粗粒質還元型グライ低地土に分類される。栽培作物はハスが主体であるが、霞ヶ浦から離れた比較的標高の高い乾田では水稻が栽培される。また地域全体に線虫害と疑われる黒皮症の被害が大変多く、これを原因とするハスの耕作放棄圃場も点在している。圃場 A および B の耕作者は異なっているが、黒皮症被害により収量が減少していることは共通している圃場である。圃場 A では 2010 年から 2012 年の 3 年間、圃場 B では 2010 年のみ調査を行った。

2. 2. 2 *Hirschmanniella* 属線虫のサンプルングおよび分離方法

ハス細根の採集は、圃場 A では 2010 年 6 月から 12 月まで、2011 年および 2012 年は 5 月から 10 月まで、2～4 週間に 1 回行った。圃場 B では 2010 年 6 月から 2011 年 2 月まで、同様に 2～4 週間に 1 回調査を行った。調査は 1 回につき、圃場の北側と南側からハスの根を節ごと 3 本以上採集した。採集した節付き細根は、水道水を使用してよく水洗し、付着した土壌を落とした。細根は水洗したのち節を切り離してから水を切って 5mm 程度に細断し、よく混和してから 5g を測りとりベルマン法 (Baermann, 1917) に供試した。ベルマン法は 25°C の条件で 48 時間行い、線虫類を分離した。10 月から翌年 2 月までの冬期には、低温の影響による線虫類の分離率低下を防止するため、ベルマン法に供試する前に細根をビニール袋に入れて 25°C の人工気象室で 2 日ほど保温した。ベルマン法に供試したサンプルは、回収したのち計数するまで 4°C で保存した。さらに、根部内の卵を確認するため、酸性フクシン法 (McBeth et al., 1941) により根を染色した。

2. 2. 3 *Hirschmanniella* 属線虫の分離と計数

分離した線虫類は、Sher (1968) の記述を基にして、光学顕微鏡下 (BX-50, Olympus Co, Japan) で体サイズや口針などの形態的特徴から *Hirschmanniella* 属とそれ以外の線虫に分けた。その後、*Hirschmanniella* 属線虫は圃場およびサンプルング日ごとに雌雄成虫および幼虫に分けて計数した。

2. 2. 4 rRNA の 28S 領域を用いた *Hirschmanniella* 種同定

Hirschmanniella 属線虫の種を特定するため、圃場 A および B から採集した *Hirschmanniella* 属線虫の中からそれぞれ 3 個体をランダムに選び、Tanaka et al. (2012) の方法を用いて、ISOHAIR (Nippon Gene Co., Ltd., 日本) により抽出した。この DNA を鋳型として rRNA の 28S 遺伝子上の D2-D3 領域を増幅した。プライマーは D2a (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3') と D3b (5'-TGCGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Nunn, 1992) を用いた。PCR は Go Taq[®] Green Master Mix (Promega Corp., USA) を用いて、Bio-Rad T100TM thermocycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) により行った。反応条件を以下に示す。94°C 2 分サイクル前の熱変性を行ったのち、94°C 30 秒の熱変性、50°C 30 秒のアニーリング、72°C 1 分の伸長反応を 35 回繰り返し、最終伸長反応は 72°C 5 分とした。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) を用いて精製後、BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific K.K., USA) を用いてシーケンス反応を行ったあと、ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific K.K., USA) を用いて塩基配列を解読した。塩基配列は DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd., UK) を用いてアセンブルを行い、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上で 28S 遺伝子の相同性検索を行った。

2. 2. 5 既交尾雌率の調査

レンコンネモグリセンチュウの記載者である Sher (1968) は、本種の雌雄の存在を論文中で報告している。また、筆者はレンコンネモグリ雌成虫の貯精嚢が精子で満たされている様子を観察していることから、本種は両性生殖であると考えられた。両性生殖の線虫は、貯精嚢内の精子の有無を観察することにより生殖活動時期を見分けられる (Otronen et al., 1997 ; Murray et al., 2011) ことから、本種においても貯精嚢を継続して調査することにより交尾、産卵の時期が予想できると考えられたため、以下の調査を行った。2012 年の 1 月から 12 月まで、1 月 13 日、3 月 1 日、4 月 24 日、5 月 24 日、6 月 29 日、7 月 23 日、8 月 17 日、9 月 7 日、10 月 24 日、11 月 22 日および 12 月 13 日に、A 圃場のレンコン根部から分離したレンコンネモグリ雌個体それぞれ 30 頭を調査し、その貯精嚢内部の精子の有無から既交尾雌率を算出した。ただし、1 月から 4 月、11 月から 12 月はレンコン田に放棄されたレンコン根部残渣から、5 月から 10 月は栽培中のレンコン根部からレンコンネモグリセンチュウを分離した。

2. 2. 6 レンコンネモグリセンチュウ幼虫の齢期および齢構成の推定

センチュウの齢期と体長および口針長には相関があることが知られている (後藤, 1970 ; Halbrecht and Brown, 1992)。このことから、分離した *Hirschmanniella* 属の口針長と体長を計測し、両者の関係から各發育段階を推定した。2010 年の圃場 A および B の 6 月 15 日、7 月 13 日、7 月 27 日 (圃場 A のみ)、8 月 10 日、9 月 14 日、10 月 12 日および 11 月 8 日に分離したレンコンネモグリから、各調査日より一定数の個体 (A 圃場は 52、32、30、43、59、67 および 56 個体、B 圃場は 33、47、50、91、67、64 個体) をランダムに選び、合計 692 頭の口針長および体長を測定し、各齢期を推定した。なお、成虫は生殖器も確認し、雌雄を分けて測定を行った。

この調査で、レンコンネモグリの齢期推定が交尾器の有無および口針長測定により可能となったため、口針長を調査した日付における齢期推定を行い、その齢期の比率を発生消長に当て嵌めて、齢期の変動を推測した。

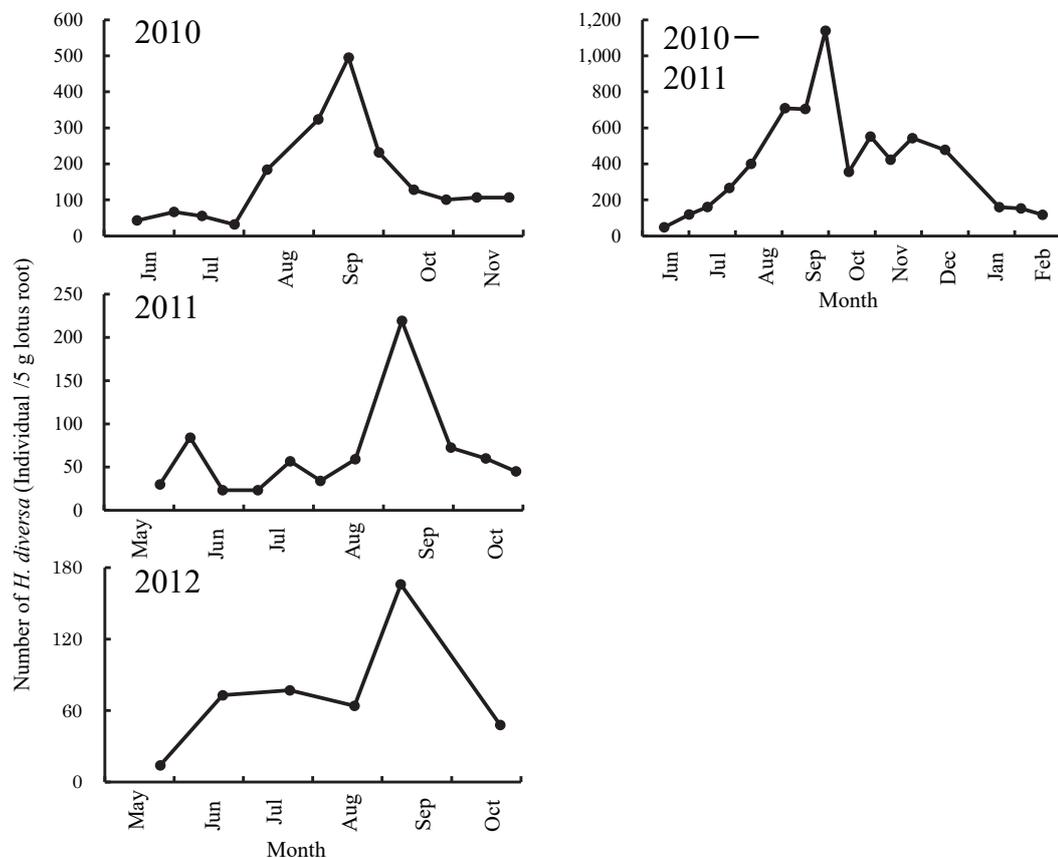


Fig. 2-1. Seasonal occurrence of *Hirschmanniella diversa* in lotus roots between 2010 and 2012 lotus cultivation seasons in field A and field B in Ibaraki Prefecture.

2. 3 結果

2. 3. 1 ハス圃場における *Hirschmanniella* 属線虫の同定と発生活長

A 圃場および B 圃場のハス細根から分離された *Hirschmanniella* 属線虫の成虫 41 頭を調査したところ、体長は 1,733–2,600 μm 、口針長は 21.7–24.7 の範囲に収まった。これらの形態的特徴は、Sher (1968) によって記載されたレンコネモグリの体長 (1740–2850 μm) および口針長 (22–25 μm) の範囲とほぼ一致した。

さらに、分離された *Hirschmanniella* 属線虫の中からシーケンスした 3 個体の D2–D3 領域の塩基配列は全て一致した。塩基配列を NCBI 上で相同性検索したところ、レンコネモグリセンチウとして登録されている Accession No. JX144359 とも配列が 100% 一致した。JX144359 は、2012 年にレンコネモグリの和名命名者である水久保によって登録された茨城県石岡市の個体である。したがって本調査を行った 2 つのハス圃場から分離された線虫はレンコネモグリであることが示された。

A 圃場および B 圃場の 2010–2012 の 3 年間の調査において、ハス細根から分離されるレンコネモグリ個体数は、B 圃場で 10–12 月にかけて他調査と比較すると個体数の減少が遅いものの、いずれの調査でも 8 月および 9 月をピークとする 1 山形の発生活長を示した (Fig. 2-1)。10 月から翌年 1 月までの期間、分離されるレンコネモグリの数は減少したが、これは気温が低下とハス地上部が枯死していることが影響していると考えられる。

レンコネモグリは、体長、口針長と生殖器の有無に基づいて、4 つのクラスターに分けられた (Fig. 2-2)。クラスター IV は生殖器が認められたことから成虫であり、口針長は 20.3–25.0 μm 、体長は 1,800–2,750 μm の範囲内に収まった。生殖器のない残りの 3 つのクラスターの測定値は、クラスター I が、口針長 11.0–13.3 μm 、体長 300–700 μm で、クラスター II は、口針長 14.3–18.7 μm 、体長 583–1,133 μm 、クラスター III は、口針長が 17.3–22.7 μm 、体長が 1,083–2,150 μm であった。この結果から年齢構成を考えると、クラスター I、II、III はそれぞれ二期、三期、四期幼虫に該当すると考えられた。クラスター III とクラスター IV は一部重複するが、成虫と四期幼虫は生殖器の有無で容易に識別が可能であることから、口針長と生殖器を顕鏡することで簡易にレンコネモグリのステージが識別できると考えられた。

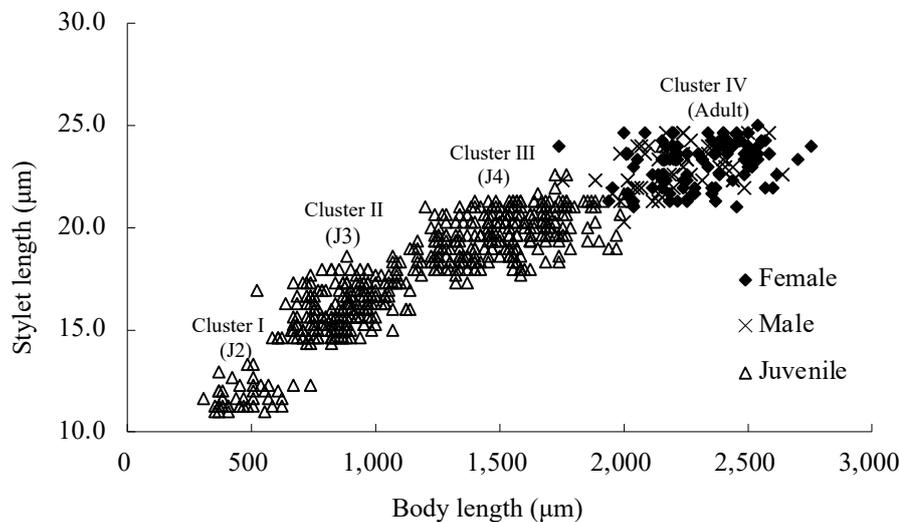


Fig. 2-2. Relationship between stylet length and body length for a population of *Hirschmanniella diversa* individuals isolated from lotus roots in 2010 survey (n=692) from field A and B.

2. 3. 2 レンコネモグリの既交尾雌割合推移

レンコネモグリ雌成虫の貯精嚢内部の精子の有無を調査した結果、5 月をピークとする一山形の曲線 (Fig. 2-3) を示した。1–4 月および 10–12 月には貯精嚢内部に精子を持つ雌成虫は全く見られなかった。このため、レンコネモグリは 4 月および 5 月に交尾を行い、主に 6 月および 7 月にかけて産卵すると考えられた。

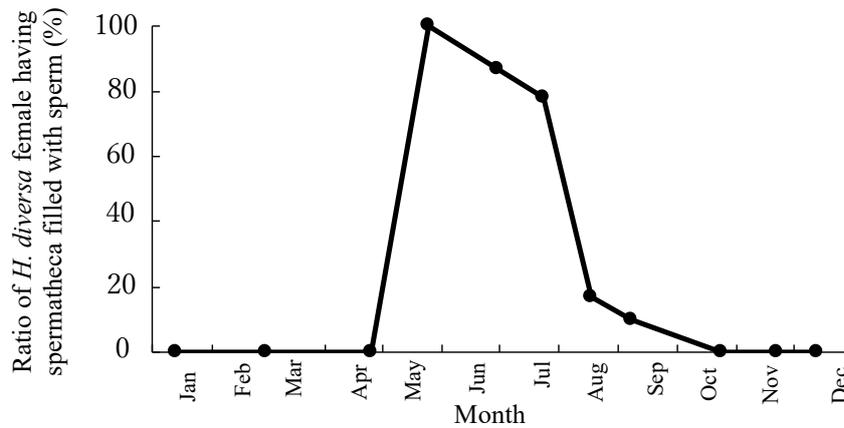


Fig. 2-3. Periodical change in the ratio of *Hirschmanniella diversa* females having spermatheca filled with sperms in 2012 study from field A and B. n=30

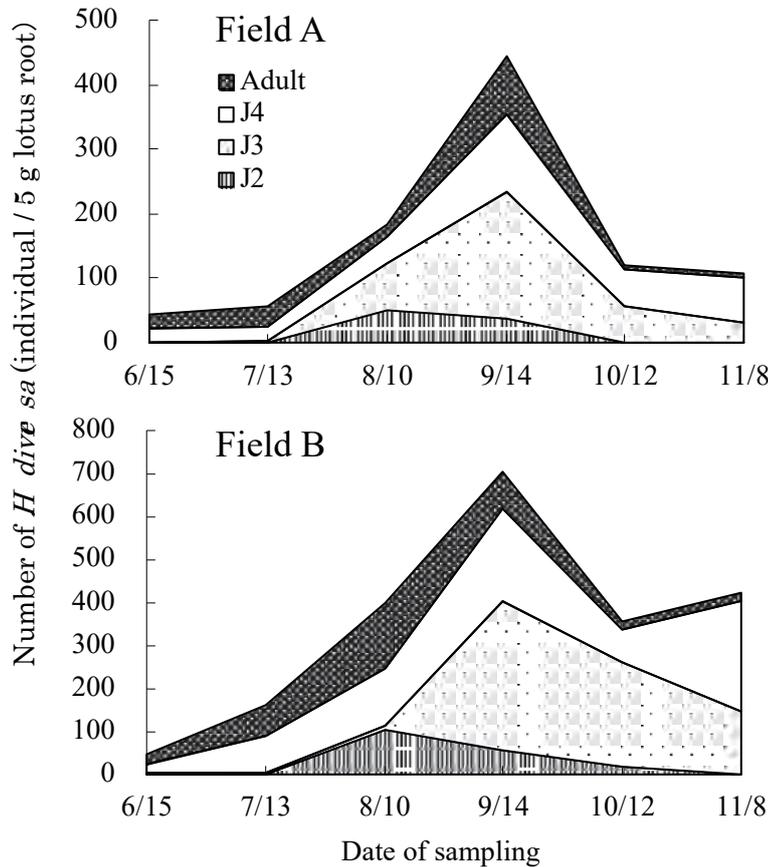


Fig. 2-4. Age structure of *Hirschmanniella diversae* individuals in lotus roots, estimated by the body and stylet lengths from fields A and B in 2010 study.

2. 3. 4 レンコンネモグリの齢構成の推移

レンコンネモグリの圃場 A および B における齢構成の推移を Fig. 2-4 に示した。6 月および 7 月は、四期幼虫および成虫が主体であったが、二期幼虫が 8 月に出現し、ピークに達し、遅れて三期幼虫が 9 月にピークを迎

えた。二期幼虫と三期幼虫のピークは1ヶ月程度ずれていた。四期幼虫および成虫数は9月にピークを迎え、その後10月に減少した。二期幼虫は10月以降は認められず、三期幼虫の割合も10月以降は低下した。一方、四期幼虫は10月から11月にかけてやや増加した。圃場Bの11月は四期幼虫の増加によりやや密度が上昇したが、両圃場での齢構成の傾向はほぼ同様であった。

2. 4 考察

茨城県石岡市のレンコン細根から分離した *Hirschmanniella* 属線虫を、Sher (1968) による形態学的手法および、rRNA の28S 領域の分子生物学的手法により同定した結果、どちらも本線虫がレンコンネモグリであることを支持した。そのため、茨城県のレンコンに被害を与える主な *Hirschmanniella* 属線虫は、レンコンネモグリであることが明らかとなった。

今回は、レンコンネモグリの発生活環および生活環を明らかにするため、レンコンネモグリと同属であり、レンコン田と混在する稲田に生息して、主に水稻に寄生するイネネモグリおよびイママラネモグリを比較対象とした。両種はイネの害虫であることから、日本で1960–1970年代にかけて多くの研究がなされており、発生活環と生活環についても調査されている(後藤, 1969; 高倉・山本, 1970; 桑原・弥富, 1970; 佐藤ら, 1970)。両種は、イネの移植が始まると活動を開始して根に侵入し、夏から秋にかけて幼虫数がピークに達する(高倉・山本, 1970)。しかし、2種間にはいくつかの生態学的な違いがあり、基本的に日本の個体群はそれぞれ、イママラネモグリは1年1化性、イネネモグリは1–2化性とされている(高倉・山本, 1970; 桑原・弥富, 1970)。イママラネモグリは、移植後すぐにイネの根に侵入し、移植後約54日までに根内に産卵し、卵を残して成虫はイネから離脱するため、根から成虫が分離される時期は短く、各齢期が分離される期間も限られる(桑原・弥富, 1970)。一方、イネネモグリは、栽培期間中は根内に止まり、どの時期にも一定数の成虫、多様な齢期の幼虫がみとめられ、1シーズンに1–2回産卵する(桑原・弥富, 1970)。レンコンネモグリは、今回の調査では1年に1化であると考えられ、どの時期にも根部内に一定数成虫および四期幼虫が生息するという、イママラネモグリともイネネモグリとも一部共通、一部異なるという独自の生活環を持っていると考えられた。イネネモグリは北海道などの寒冷地では1化性、九州などの温暖地では2化性と気候により化性が変化する(高倉・山本, 1970; 桑原・弥富, 1970) ことから、茨城以南の九州などでは年2化性となる可能性もあることから、異なる地域での調査も必要と考えられる。

また、ハスの栽培の定植前-定植直後には、四期幼虫および成虫の2ステージのみが観察されたため、レンコンネモグリはレンコンの枯死後、これらのステージでの根部内越冬が確認できた。根部以外の場所、土壌中での越冬は、高倉・山本(1970)がイネネモグリとイママラネモグリの水田土壌中での越冬を報告している。レンコンネモグリでは、AおよびB圃場共に少数ながら冬季にレンコンネモグリが土壌から分離されている(高木ら、未発表)ため、土壌中での越冬も行なっていると考えられる。さらに、レンコンネモグリはヒエ類、ミズアオイなど水田の周辺雑草にも寄生する(植松ら, 2015; 高木ら, 2016)ため、これらでも越冬すると考えられる。つまりレンコンネモグリは、四期幼虫または成虫で、周辺部雑草、土壌およびハスの残渣で越冬することが明らかになった。

レンコンネモグリの生態をまとめると、越冬したレンコンネモグリの成虫は、その貯精嚢内精子の有無から、4月から5月にかけて交尾を行い、6月から7月に卵を産むと考えられる。その後8月まで産卵された卵から二期幼虫が孵化し、それらが9月には三期幼虫となり、根部内密度がピークに達する。その後10月以降には、三期幼虫は四期幼虫あるいは成虫となり、レンコンネモグリの根部内個体数はハスの枯死により次第に減少する。先ほども述べた越冬する四期幼虫あるいは成虫は、レンコンの根にそのまま留まるか、あるいは土壌に離脱し、越冬すると考えられる。

後藤(1970)によると、イネネモグリおよびイママラネモグリの発育段階の識別は、生殖器官(生殖器原基)、口針長、および体長に基づいて行うことが可能であるとしている。本研究では、上記2種同様にレンコンネモグリの発育段階も口針長と体長および生殖器官の有無により判別できると考えられた。

本研究では、生活環を決定する上で非常に重要であるレンコンネモグリの卵については、バルマン法では卵が分離できないため調査できなかった。高倉・山本(1970)は、酸性フクシン法(McBeth et al., 1941)を使用して、イネの根の卵数を調査および定量し、イネネモグリおよびイママラネモグリの生活環を推定している。本試験でも上述のように推測した産卵期間である5月から7月にかけて、卵を確認するため採集したレンコンの細根を

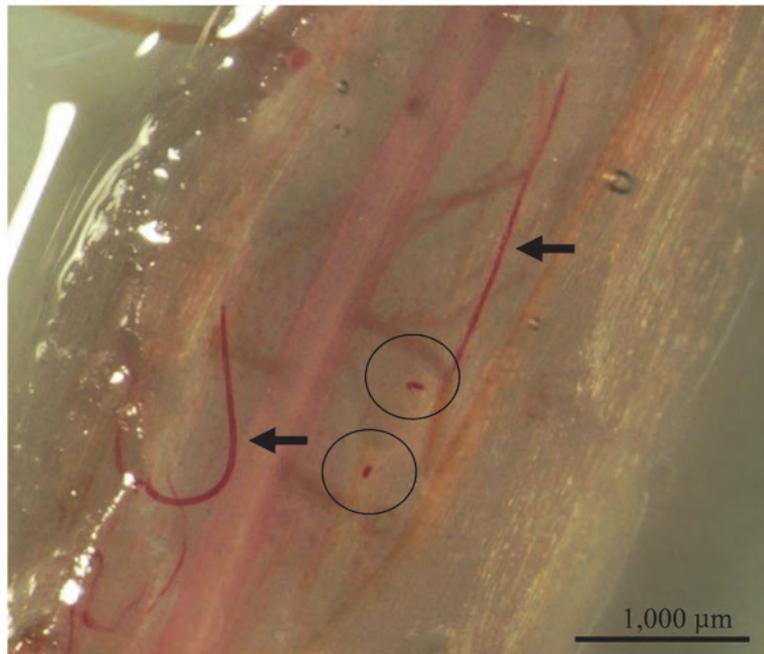


Fig 2-5. Staining of nematodes in lotus roots using the hypochlorite-acid-fuchsin method. Circles and arrows indicate eggs and vermiform nematodes of *Hirshmanniella diversa*, respectively. Scale bar represents 1,000 μm .

染色したが、観察された卵数はレンコンネモグリの高い交尾率とその後の二期幼虫の発生から予測されるよりも非常に少なかった (Fig. 2-5)。移動性の内部寄生性線虫 (ネグサレセンチュウ類 *Pratylenchus* spp. など) による産卵は、通常植物の根部組織内あるいは周囲の土壌で行われる (Mamiya, 1971)。ネグサレセンチュウ類同様に移動性の内部寄生性線虫であるレンコンネモグリも同様の産卵様式をとっている可能性が高いが、観察された卵数が少なかった理由として、ハス細根の内部ではなく細根表面、あるいは寄生可能な周辺雑草 (植松ら、2015; 高木ら、2016) や土壌中に産卵し、根部内のみを染める方法では観察できなかった可能性も考えられる。今後より詳細な調査が必要である。本来、産卵場所、産卵数、産卵期間および孵化タイミングなどの情報は、生活環を明らかにするために必要であるが、本研究ではそこを明らかにすることはできなかった。レンコンネモグリの発生消長と生活環の比較として、本研究ではイマムラネモグリおよびイネネモグリのそれら調査の結果と比較して年齢構成や化性の推定などを行なったが、実際にレンコンネモグリの生態を完全に押さえるためには、室内試験系での飼育などが必要となる。

前述の通り、レンコンネモグリは、レンコン田内部および周辺に発生する雑草にも寄生、増殖する。生命力が強く、培養方法の確立している雑草は、しばしば組織培養を用いた線虫の室内飼育系の確立に使用される (Cobb et al., 1985; Karakas, 2004; Kothari et al., 2005)。レンコンネモグリにおいては野外調査で寄生性の高かったケイヌビエ *Echinochloa crus-galli* var. *echinate* Honda は、ヒエ類の組織培養法が活用できるため、培養試験に有望であると考えられる。また、近年開発されたハスの長期室内培養系 (堀井、私信) を用いることにより、雑草よりも正確な生態が明らかにできる可能性もある。このような室内飼育系の確立により産卵数などが明らかとなり、レンコンネモグリの生態解明に貢献できると考えられる。本調査では、産卵から 2-3 ヶ月後にあたる 9 月まで二期幼虫が認められるなど、産卵および生育時期に 2 化性の可能性を完全に否定できない点などもあり、生態を明らかにするためにはよりシンプルな系での正確な情報を得る必要があると考えられた。

第 3 章 レンコンネモグリセンチュウに対する化学的防除法の検討

3. 1 はじめに

レンコンネモグリは、これまで生態に関する研究が行われて来なかったと同時に、その防除法も開発が遅れている。過去、種ハスを対象とした温湯処理法 (後藤ら、2012; 高木ら、2013; 高木ら、2014) や、太陽熱土壌消毒法 (Katan, 1981; 沢田・阿部、2017) などが検討されたものの、効果やコストなどの点からこれらの方法は現

地で活用される技術とはなっていない（高木ら、2017）。

一方、石灰窒素は、レンコンネモグリに対する一定の防除効果が明らかとなっており（柏木ら、2017）、また現状日本でレンコンネモグリに対して使用できる唯一の農薬となっている。石灰窒素は肥料的性質と農薬的性質を併せ持つ資材で、その有効成分はカルシウムシアナミドであり、分解するとアンモニア態窒素や尿素へと変化し、窒素質肥料として植物体に吸収される。石灰窒素のレンコンでの農薬登録薬量（野菜類の線虫類で登録）は50–100kg/10aであり、そのうち20–21%の窒素分を含むため、石灰窒素を施用すると1回の施用で10–21kg/10aの窒素がレンコン田内に放出される。

一方、ハスは好適な栽培条件、すなわち水源が豊富で、有機質を大量に含んだ重粘土質土壌を必要とする性質から、湖や川に近い地域で栽培される。前述したように、日本で最も大きなハスの生産地は茨城県霞ヶ浦の周辺部に位置し、約1,800haに及ぶ大きな面積を誇っている。ところが、霞ヶ浦は1970年代から水質低下が問題となり、総リンや総窒素などの高さを原因とするアオコの発生などに悩まされたため、茨城県では“霞ヶ浦環境科学センター”の設置や、関連3県で“霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画”を策定するなど、水質浄化への積極的な試みがなされている（茨城県他、2016；Soma et al., 2016）。

以上のような社会情勢の中、レンコンネモグリに対し石灰窒素を活用した防除方法のみを拡大していくのは、霞ヶ浦および海洋など周辺水系への窒素放出を招き、水質を低下させる可能性があることから、石灰窒素のみに頼らない防除法の構築が必要であると考えられる。

本研究の目的は、広範に渡る農薬の中からレンコンネモグリに対して効果を有し、かつ水系で使用することが可能であると考えられる農薬を室内試験によって選抜し、その有効性を実圃場に近い環境を用いて実証することを目的とした。

3. 2 材料および方法

3. 2. 1 供試虫および殺虫剤

本試験に使用したレンコンネモグリは、第1章で用いたものと同様に、茨城県石岡市井関町（北緯36度14分、東経140度32分）のハス栽培圃場から採集した。栽培中のハス圃場からハス根部を採集し、ベルマン法（Baermann, 1917）（25°C/48h）によりレンコンネモグリを分離した。レンコンネモグリは試験に供試するまで水道水とともにガラスバイアルに入れ、冷蔵庫（約4°C）内に保存した。

本試験に使用した殺虫剤をTable 3-1に示した。線虫類に対して日本で登録がある、もしくは海外で効果がある、と報告された薬剤を中心に用いたが、広く情報を収集するためネオニコチノイド系農薬など、線虫に対する効果の情報がほとんどない薬剤についても一部試験を実施した。

3. 2. 2 レンコンネモグリに対する室内殺線虫効果試験

冷蔵庫より試験直前にレンコンネモグリを取り出して室温におき、活動性を回復させた。供試した薬剤はTable 3-1に示した薬剤および濃度を使用した。供試濃度については、ハス田の水面から深さ30cmまで、線虫剤が均等に分散すると仮定して計算した。また、濃度については、カーバメート系、フェニルピラゾール系、ピレスロイド系、マクロライド系、ネオニコチノイド系など、線虫に対する感受性の情報があまりない剤については、他害虫への農薬登録内容を基準として濃度を決定した。薬剤は6cmプラスチックシャーレ内に10mlを注いだ。活動性を取り戻したレンコンネモグリのなかから、活動性が高く、大きさから4期幼虫あるいは成虫である成虫を選び、実体顕微鏡Olympus SZH（Olympus Co., Tokyo, Japan）下で微針を用いて生きたまま釣り上げ、シャーレ内に放飼した。シャーレ1枚につき15–30頭を使用し、試験は5連で行なった。シャーレは蓋をして周囲をパラフィルム（Bemis Co., Inc., USA）でシールし、25°Cの人工気象機内に2週間静置した。2週間後、薬液をレンコンネモグリごとガラスバイアルに移して上澄みを除き、水道水で希釈する作業を2回繰り返して薬液を除去したのち、レンコンネモグリの回復を待たために25°Cで24時間静置した。24時間後にレンコンネモグリを取り出し、実体顕微鏡下で微針により刺激して生死を確認した。微針で刺激してもほぼ反応しない苦悶虫については、死虫に含めた。得られた数値は、Abbott（1925）の式【補正死虫率（%）＝{(無処理区の生存率–処理区の生存率)／無処理区の生存率}×100】を用いて補正死虫率を算出した。

また、濃度を5段階以上設けて試験を行なったベンフラカルブ、カルタップおよびシアナミドについては、プロビット法によりLC₅₀を算出した。

Table 3-1. Nematicides used and their mode of action and registered application rates in Japan

Mode of action ^(a)	IRAC code	Common name of active substance (a.s.)	Formulation ^(b)	a.s. percentage (%)	Registered concentration of a.s. (kg or L ha ⁻¹) in Japan ^(c)	Target pest ^(d)
Carbamete	1A	Benfuracarb	G	8.0	4 g/5 L rice nursery soil	Nematode
		Alanycarb	WP	40.0	1.5-1.6 kg	Lepidoptera
		Carbaryl	G	5.0	1.5-3.0 kg	Lepidoptera
		Methomyl	WP	45.0	0.7-2.7 kg	Lepidoptera
		Carbosulfan	G	3.0	1.5-9 kg	Nematode
		Oxamyl	G	0.8	0.5-4.0 kg	Nematode
Organophosphate	1B	Fenthion	G	5.0	1.0-2.0 kg	Coleoptera
		Fenitrothion	WP	40.0	1.0-1.5 kg	Hemiptera
		Trichlorfon	EC	50.0	1.3-3.0 L	Lepidoptera
		Imicyafos	G	1.5	2.3-7.5 kg	Nematode
		Fosthiazate	G	1.5	1.5-4.5 kg	Nematode
		Acephate	G	5.0	1.5-6.0 kg	Lepidoptera
Phenylpyrazoles	2B	Isoxathion	MGF	3.0	1.8-2.7 kg	Hemiptera
		Fipronil	FL	5.0	0.05-0.08 L	Hemiptera
Pyrethroid	3A	Pyrethrins	EC	3.0	0.06-0.09 L	Lepidoptera
		Etofenprox	G	1.5	0.3-1.4 kg	Coleoptera
		Silafluofen	WP	20.0	0.3 kg	Hemiptera
Neonicotinoid	4A	Tiamethoxam	G	0.5	0.2-0.5 kg	Hemiptera
		Imidacloprid	WP	10.0	0.2-0.3 kg	Hemiptera
		Dinotefuran	G	1.0	0.3-2.0 kg	Hemiptera
		Clothianidin	G	0.5	0.2-0.5 kg	Hemiptera
		Thiacloprid	WP	30.0	0.2-0.5 kg	Hemiptera
		Nitenpyram	WP	10.0	0.1-0.2 kg	Hemiptera
Avermectins and milbemycins	6	Acetamiprid	G	2.0	0.6-1.2 kg	Hemiptera
		Abamectin	EC	1.8	1.5-6.06 L	Hemiptera
		Emamectin benzoate	EC	1.0	1.5-3.06 L	Lepidoptera
Miscellaneous non-specific (Multisite) Inhibitor	8	Milbemectin	EC	1.0	1.5-3.06 L	Acariformes
		Metam sodium	L	33.0	132.0-198.0 L	Nematode
		DD	EC	97.0	145.5-388.0 L	Nematode
Nereistoxin	14	DCIP	G	30.0	90.0 kg	Nematode
		Cartap hydrochloride	WP	75.0	0.8-4.5 kg	Nematode
Tetronic and tetramic acid derivative	23	Tiocyclam	WP	50.0	0.8-1.5 kg	Hemiptera
		Spirotetramat	FL	22.4	0.2-1.3 L	Hemiptera
		Spiromesifen	FL	30.0	0.2-1.8 L	Spider mite
Uncategorized	-	Fluopyram	G	0.5	1.0 kg	Nematode
		Lime nitrogen	G, D	27.5	200-1,000 kg	Nematode
		Morantel tartrate	L	12.5	13.8-162.5 ml/pine wood	Nematode

a) Subgroups defined by Insecticide Resistant Action Committee (IRAC). Uncategorized pesticides are specifically not defined by IRAC

b) G: Granule, WP: wettable powder, L: liquid formulation, EC: emulsifiable concentrate, FL: flowable, MGF: microgranule fine, D: dust formulation

c) Registered rate during (2010-2011) which this study was performed. Benfuracarb and morantel tartrate registrations were not kg/ha exceptionally.

d) 5 Targeted agriculturally important pests by the specific pesticide. In the case where the pesticide is effective against multiple pests including the nematodes, nematode is listed ahead.

3. 2. 3 レンコンネモグリに対する室内制線虫効果試験

線虫剤の効果として、直接の殺線虫効果と、線虫の行動を抑制する制線虫効果の2つが挙げられる。ハス田は栽培中湛水条件であり、水位の調整や降水などで線虫剤の土中濃度が容易に変化すると考えられる。また、第1

章で述べたようにレンコンがレンコンネモグリに被害される時期は限られるため、被害時期のみ制線虫効果を発揮させるような使用方法も想定できることから、制線虫効果の持続性とそこから活動性を回復するかどうかの2点が重要である。そこで室内で制線虫効果試験を行った。

3. 2. 2と同様に、保存していたレンコンネモグリの活動性を回復させた後試験に供試した。試験には直径6cmのプラスチックシャーレを使用した。Table 3-2に示した濃度となるように、所定濃度の薬液を含む1%寒天培地を作製し、10mlプラスチックシャーレに分注した。無処理区には薬液の代わりに蒸留水を用いて寒天培地を作製した。そして、2)と同様に活動性が高い4期幼虫あるいは成虫を選び、実体顕微鏡下で微針を用いてシャーレ内の中心部 (Fig. 3-1、X部分) に約50頭放飼した。放飼後は25°C全暗の条件で管理した。試験は5反復で行なった。

調査は、6cmシャーレをFig. 3-1のように4つのゾーンに分け、放飼後36時間後に実体顕微鏡下で各ゾーンに分布するレンコンネモグリ数を計数し、ゾーンごとの割合を算出した。さらに、線虫の制線虫状態からの回復を観察するため、蒸留水処理を除く薬剤処理区で、放飼7日後にゾーン4(外壁)を除く寒天培地内のセンチウを無作為に30~40頭微針で釣り上げて蒸留水中に放飼し、25°C暗黒条件下に静置した。ゾーン4の外壁に分布する線虫は乾燥のため全て死亡していたが、再活動しているものとみなした。放飼24時間後に微針で刺激して生死を判別し、再活動率を算出した。

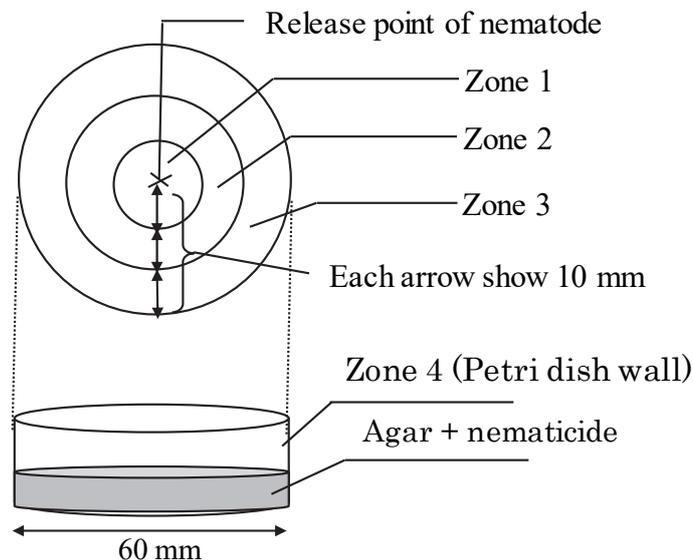


Fig. 3-1 The schema and separation of zone in the nemastatic effect experiment. Upper is top view and lower is side view of 60 mm petri dish.

3. 2. 4 隔離枠圃場を用いたベンフラカルブの防除効果試験 -2012年-

殺線虫効果、制線虫効果および環境毒性などを考慮し、有望な殺線虫剤としてベンフラカルブを選択し、より現場に近い野外の隔離圃場条件で以下の試験を行なった。隔離枠圃場には1.62m×1.02m×高さ1.2m(面積約1.65m²)プラスチック製コンテナを用いた。内部には2012年5月8日および24日に、茨城県土浦市田村町(北緯36度04分、東経140度14分)の水路等から採集した土壌を高さ約70cmまで充填し、レンコンネモグリを採集した圃場から採集したハスの残渣(細根や茎など)を30kg/コンテナ投入して汚染土壌を作製した。採集した土壌はシルト質埴壤土(Silty Clay)(假屋、私信)であり、粒径の細かい粘土が多く、ベルマン法による土壌中のレンコンネモグリ密度調査を行うことができなかったが、なるべく汚染程度が同様となるように投入量などを調節した。2012年以降は、同じコンテナを同一処理に用いないようにローテーションを行い、前年被害の少なかった場所には汚染ハスを投入した。

薬剤は、ベンフラカルブを100g/10a(ベンフラカルブ5%粒剤20kg/10a相当量、ベンフラカルブとして16.5g/

コンテナ) および 200g/10a (ベンフラカルブ 5%粒剤 40kg/10a 相当量、33.0g/コンテナ) を施用した。さらに、対照薬剤としてホスチアゼートを 60g/10a (ホスチアゼート 1.5%粒剤 40kg/10a 相当量、9.9g/コンテナ) 施用区および無処理区を設定した。薬剤は 2012 年 5 月 31 日、湛水 (水深約 5cm) したコンテナに各薬剤を規定量散布し、手で混和した。その後、所内圃場から掘り取ったレンコンネモグリ非汚染ハス (品種:「福だるま」) を 1 コンテナ当たり 6-8 本定植した。定植後は 6 月 7 日、6 月 28 日、7 月 12 日、8 月 15 日、9 月 11 日および 10 月 12 日にハス細根を 1 コンテナから 15g 以上採集し、水洗したのちに 5mm 程度にハサミで細断してよく攪拌した後、5g を 3 連でベルマン法 (25°C48 時間) に供試し、根部内のレンコンネモグリを分離・計数した。

また、10 月 12 日、レンコンの掘り取りを行い、各節ごとに 0-4 の 5 段階で被害度を付し (0:被害なし、1:軽微な被害、2: B 品となる被害、3: B 品と等外の境の被害、4: 等外となる被害) (Fig. 3-2)、以下の式により被害指数を算出した。被害指数 = Σ (被害度 × 被害度ごとの節数) / 調査節数 × 100。

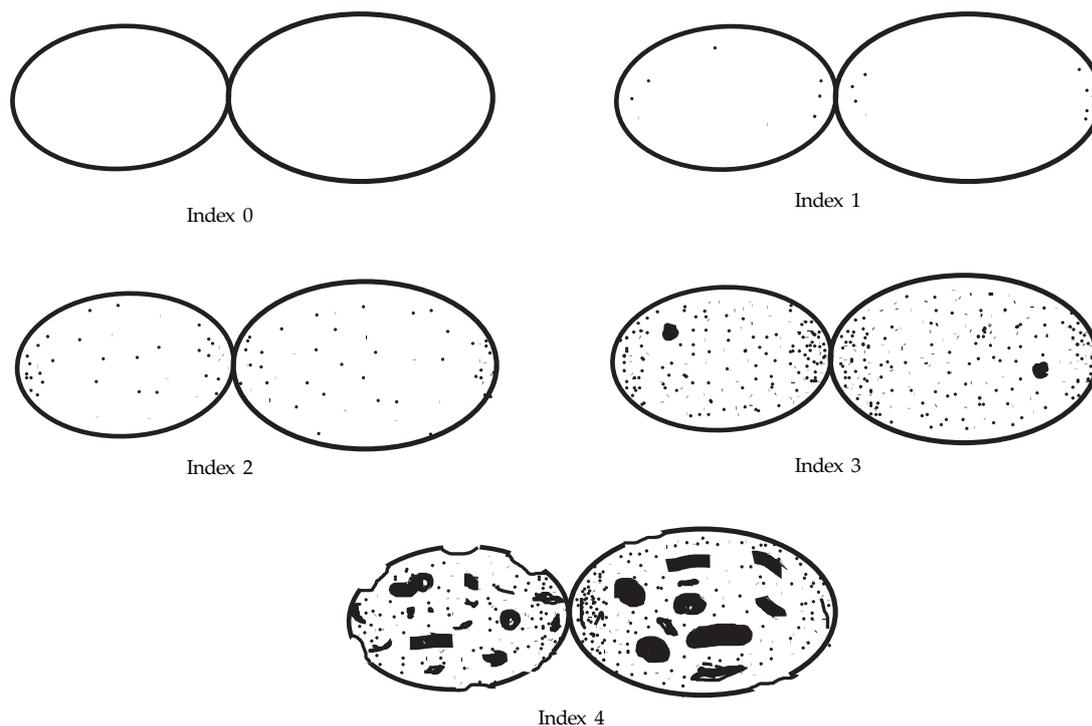


Fig. 3-2 Diagram of lotus tuber damage index 0-4. 0: Not damaged, 1: Slightly damaged, little small black spots by *H. diversa* (less than 3 mm in diameter) on the tuber surface. No effect on the commercial value, 2: Many small black spots. Decreased commercial value, 3: Many small and big black spots (more than 3 mm in diameter). Deformed tuber surfaces, 20% reduction in marketable quality. 4: Critical damage to tubers. Highly deformed, many big black spots, >95% reduction in marketable quality.

3. 2. 5 隔離枠圃場を用いたベンフラカルブの防除効果試験 -2014-2017 年-

2014-2017 年の 4 年間は、ハス田での使用を考慮して、成分含有量が高くハンドリングに優れ、土壌への沈降性に優れたベンフラカルブ 8% 粒剤を用いて試験を行なった。処理量は、5%粒剤 20kg 施用量 (成分量 100g/10a) よりやや多い 15kg/10a (成分量 120g/10a、19.8g/コンテナ) とした。薬剤処理および定植は Table 3-3 に示すように行った。また、Table 3-3 に示す日付にレンコンを掘り取り、2012 年と同様に被害度の調査を行って被害指数を算出した。

3. 2. 6 統計処理

制線虫効果試験は各薬剤ごとに Tukey-HSD 法、圃場試験の線虫数は各サンプリング日毎に Tukey-HSD 法、2012 年のレンコンの被害度は各処理毎に Kruskal-Wallis 法および 2014-2017 年のレンコンの被害度は、各年ごとに Mann-Whitney U 検定で統計処理を行った。また、制線虫試験の死亡率の結果から、Probit 法を用いてベンフラカルブ、カルタップおよびシアナミドを用いて LC50 を求めた。統計処理は、R (R Core Team, 2019) Ver. 3.6.1 および R のグラフィカルインターフェースである EZR (Kanda, 2013) を用いた。

3. 3 結果

3. 3. 1 レンコンネモグリに対する室内殺線虫効果

殺線虫効果試験の結果を Table 3-2 に示した。フェニルピラゾール系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系、テトロン酸およびテトラミン酸誘導体系および多作用点阻害剤は、補正死虫率 70%以下と殺線虫効果が低かった。それ以外の剤ではカーバメート系、有機リン系およびネライストキシシン系剤の多くが高い殺線虫効果を有した。カーバメート系ではベンフラカルブ（成分量 10-100 µg/ml、アラニカルブ（成分量 100 µg/ml）、カルバリル（成分量 100 µg/ml）、カルボスルファン（成分量 10 µg/ml）およびオキサミル（成分量 100 µg/ml）が、有機リン系ではフェンチオン（成分量 1-100 µg/ml）、フェニトロチオン（成分量 100 µg/ml）、トリクロルフォン（成分量 100 µg/ml AI）およびイミシアホス（成分量 100 µg/ml）、ネライストキシシン系ではカルタップ（成分量 50-1500 µg/ml）およびチオシクラム（成分量 500-1,000 µg/ml）、その他系統では石灰窒素の有効成分であるシアナミド（成分量 180-450 µg/ml）が、80-100%と高い殺線虫効果を示した。

LC₅₀ 値は、ベンフラカルブが 5.46 µg/ml、カルタップが 20.83 µg/ml およびシアナミドが 89 µg/ml であった (Probit analysis, P<0.05)。

Table 3-2. Nematicidal effect of pesticides on *Hirschmanniella diversa* in the nematode dipping method

Mode of action ^{a)}	Pesticide	Concentration of pesticide (µg/ml)	Corrected Mortality (%) ^{b)c)}
Carbamete	Benfuracarb	100	100
		20	98
		10	100
		5	49
		1	17
		0.1	2
	Alanycarb	100	100
		10	0
	Carbaryl	1	0
		100	88
	Methomyl	1	0
		100	77
	Carbosulfan	10	0
		10	100
Oxamyl	100	83	
	1	24	

a) Subgroups defined by Insecticide Resistant Action Committee (IRAC) without uncategorized. Uncategorized pesticides not defined by IRAC.

b) Corrected Mortality was calculated using Abbott's formula (Abbott, 1925).

c) Nematodes have been dipped for two weeks (n=5).

Table 3-2. Continued.

Mode of action ^{a)}	Pesticide	Concentration of	Corrected Mortality (%) ^{b)c)}	
Organophosphate	Fenthion	100	100	
		10	100	
		1	82	
	Fenitrothion	100	100	
		10	13	
		1	5	
	Trichlorfon	100	100	
		Imicyafos	100	83
			10	69
	Fosthiazate	100	1	0
			100	71
		1	0	
Acephate	10	13		
	Isoxathion	2.21	10	
Phenylpyrazoles	Fipronil	22	2	
Pyrethroid	Pyrethrins	60	52	
	Etofenprox	0.15	0	
	Silafluofen	100	0	
Neonicotinoid	Tiamethoxam	0.1	16	
	Imidacloprid	100	0	
	Dinotefuran	0.2	0	
	Clothianidin	0.1	0	
	Thiacloprid	150	3	
	Nitenpyram	100	0	
	Acetamiprid	0.4	0	
Avermectins and milbemycins	Abamectin	36	20	
	Emamectin benzoate	5	69	
	Milbemectin	10	40	

a) Subgroups defined by Insecticide Resistant Action Committee (IRAC) without uncategorized. Uncategorized pesticides not defined by IRAC.

b) Corrected Mortality was calculated using Abbott's formula (Abbott, 1925).

c) Nematodes have been dipped for two weeks (n=5).

Table 3-2. Continued.

Mode of action ^{a)}	Pesticide	Concentration of pesticide ($\mu\text{g/ml}$)	Corrected Mortality (%) ^{b)c)}
Miscellaneous non-specific (Multisite) Inhibitor	Metam sodium	108	3
		72	2
		48	0
		24	0
	DD	38.8	2
		77.6	11
	DCIP	10	4
Nereistoxin	Cartap hydrochloride	1,500	100
		750	100
		250	100
		50	81
		25	67
		8	8
	Tiocyclam	1,000	98
Tetronic and tetramic acid derivative	Spirotetramat	11.2	17
	Spiromesifen	600	11
		150	5
Uncategorized	Fluopyram	0.2	4
	Cyanamide	450	100
		360	100
		225	98
		180	89
		90	39
		45	18
	Morantel tartrate	100	55
		10	0

a) Subgroups defined by Insecticide Resistant Action Committee (IRAC) without uncategorized. Uncategorized pesticides not defined by IRAC.

b) Corrected Mortality was calculated using Abbott's formula (Abbott, 1925).

c) Nematodes have been dipped for two weeks (n=5).

3. 3. 2 レンコンネモグリに対する室内制線虫効果試験

制線虫効果の結果を Table 3-3 および Table 3-4 に示した。カルタップを除き、高濃度および中間濃度では 90% 以上の個体が Zone 1 に留まった (Table 3-3)。同様に、低濃度においてもカルタップ以外の剤では 50% 以上のレンコンネモグリが Zone1 に留まり、対照と比較して有意差が認められた ($P < 0.05$ Tukey HSD test)。

薬液中で活動性を失った後、蒸留水中に移したレンコネモグリのうち、オキサミルとカズサホスほどの濃度でも85%以上が活動性を回復した (Table 3-4)。カルタップ、ホスチアゼートおよびイミシアホスは、濃度が低くなるに従って活動性を回復する率が上昇した (Table 3-4)。一方、唯一ベンフラカルブは高濃度、中間濃度 (それぞれ 100, 10 μ g/ml) でも活動性が回復せず、制線虫効果と殺線虫効果を発揮する濃度が近接していると考えられた。すなわち、レンコネモグリに対してベンフラカルブは、殺線虫および制線虫効果を発揮できると考えられた。

Table 3-3. Nemastatic effect of nematicide on *Hirschmanniella diversa* in the agar plate method

Nematicide	Concentration of AI (μ g/ml)	Total No. of tested <i>H. diversa</i>	Abundance ratio of <i>H. diversa</i> (%) ^{a)}			
			Zone 1 \pm SD ^{b)}	Zone 2 \pm SD ^{b)}	Zone 3 \pm SD ^{b)}	Zone 4 \pm SD ^{b)}
Benfuracarb	100	230	100.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	10	227	99.5 \pm 1.0 a	0.5 \pm 1.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	1	272	74.3 \pm 6.8 b	11.5 \pm 3.6 b	12.3 \pm 3.7 b	1.9 \pm 2.7 a
Control	-	329	14.3 \pm 10.9 c	19.8 \pm 7.5 c	0.0 \pm 0.0 a	66.0 \pm 17.1b
Cartap	2,500	358	99.3 \pm 1.0 a	0.7 \pm 1.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	250	223	63.5 \pm 10.2 b	20.7 \pm 6.2 b	15.7 \pm 9.6 b	0.0 \pm 0.0 a
	25	255	24.8 \pm 6.2 c	18.8 \pm 6.3 b	18.6 \pm 7.4 b	37.8 \pm 15.3 b
Control	-	329	14.3 \pm 10.9 c	19.8 \pm 7.5 b	0.0 \pm 0.0 a	66.0 \pm 17.1c
Fosthiazate	600	249	100.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	60	239	92.7 \pm 3.6 a	3.4 \pm 2.5 a	3.8 \pm 1.9 b	0.0 \pm 0.0 a
	6	215	66.5 \pm 6.9 b	22.4 \pm 6.9 b	9.6 \pm 1.7 c	1.5 \pm 1.1a
Control	-	329	14.3 \pm 10.9 c	19.8 \pm 7.5 b	0.0 \pm 0.0 a	66.0 \pm 17.1b
Oxamyl	100	253	100.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	10	221	99.1 \pm 1.2 a	0.9 \pm 1.2 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	1	186	85.6 \pm 4.8 b	12.2 \pm 5.4 b	1.1 \pm 1.5 b	1.0 \pm 2.3 a
Control	-	245	10.2 \pm 6.9 c	3.9 \pm 3.6 a	4.1 \pm 2.8 b	81.8 \pm 8.8 b
Cadusafos	100	186	97.0 \pm 3.2 a	3.0 \pm 3.2 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	10	196	90.5 \pm 7.5 a	8.4 \pm 5.6 a	1.1 \pm 2.4 a	0.0 \pm 0.0 a
	1	192	55.4 \pm 9.3 b	28.3 \pm 11.8 b	13.2 \pm 7.4 b	3.1 \pm 2.0 a
Control	-	245	10.2 \pm 6.9 c	3.9 \pm 3.6 a	4.1 \pm 2.8 a	81.8 \pm 8.8 b
Imicyafos	3,000	236	100.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	600	217	99.4 \pm 1.3 a	0.6 \pm 1.3 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a
	60	220	96.5 \pm 5.5 ab	0.0 \pm 0.0 a	0.9 \pm 1.2 ab	2.6 \pm 5.8 a
	6	229	91.9 \pm 3.8 b	3.8 \pm 1.5 b	4.3 \pm 4.6 b	0.0 \pm 0.0 a
Control	-	236	5.6 \pm 4.1 c	6.9 \pm 2.9 b	4.6 \pm 3.3 b	82.8 \pm 4.7 b

a) Individuals of *H. diversa* were released onto agar medium with difference concentrations of nematicide and abundance ratio was evaluated after 48 h. Abundance ratio = numbers of *H. diversa* found in each zone to total numbers of released *H. diversa*.

b) Each zone designed in the plastic plate is described at Fig. 3-1.

c) Different letters within the same column and the same nematicide tests including control are significantly different (Tukey HSD test; P<0.05).

Table 3-4. Rate of *Hirschmanniella diversa* individuals that resumed their activities in distilled water after treated with different concentrations of nematicides.

Nematicide	Concentration of AI ($\mu\text{g/ml}$)	Total number of tested <i>H. diversa</i> (individuals)	Rate of individuals that resumed their activity \pm SD (%) ^{a,b)}
Benfuracarb	100	200	0.0 \pm 0.0 a
	10	200	0.0 \pm 0.0 a
	1	139	97.9 \pm 2.3 b
Cartap	2,500	159	0.0 \pm 0.0 a
	250	106	22.4 \pm 11.2 b
	25	67	83.9 \pm 15.5 c
Fosthiazate	600	216	1.0 \pm 1.4 a
	60	150	73.2 \pm 3.8 b
	6	118	100.0 \pm 0.0 c
Oxyamil	100	111	96.5 \pm 3.5 a
	10	140	99.0 \pm 2.3a
	1	121	100.0 \pm 0.0 b
Cadusafos	100	130	88.3 \pm 7.6 a
	10	159	90.5 \pm 4.4 a
	1	110	100.0 \pm 0.0 b
Imisyafos	3,000	207	1.6 \pm 2.3 a
	600	214	4.3 \pm 2.6 a
	60	203	15.9 \pm 12.7 a
	6	184	85.9 \pm 11.5 b

a) Rate (%) = number of individuals that resumed their activities to total number of tested *H. diversa*

b) Different letters in the same nematicides indicate significant difference (Tukey HSD test; $P < 0.05$)

3. 3. 3 隔離枠圃場を用いたベンフラカルブの防除効果試験 -2012年-

各処理区の根部内線虫の密度推移を Fig. 3-3 に示した。無処理区の根部内の線虫密度は、無処理およびホスチアゼート 200g/10a の 2 区で 8 月 16 日をピークとし、9 月 13 日に減少して 10 月 11 日にやや増加するパターンを示し、第 2 章の露地圃場の発消長と類似した。このため、コンテナ内の線虫密度推移は、容器や体積等の影響を大きく受けていないと考えられた。無処理区およびホスチアゼート区は、6 月 7 日および 10 月 12 日以外有意差が認められなかった ($P < 0.05$; Tukey HSD test)。一方、ベンフラカルブ区は 1.0kg/10a および 2.0kg/10a 施用ともに線虫数が減少し、6 月 7 日以外無処理と比較して有意差が認められた ($P < 0.05$; Tukey HSD test)。

また被害指数は、ベンフラカルブは 1.0kg/10a および 2.0 kg/10a 施用ともに対象区と比較して有意に低かった (Fig. 3-3, Kruskal-Wallis test; $P < 0.05$)。無処理区とホスチアゼート区の間には差が認められなかった (Fig. 3-3, Kruskal-Wallis test; $P < 0.05$)。

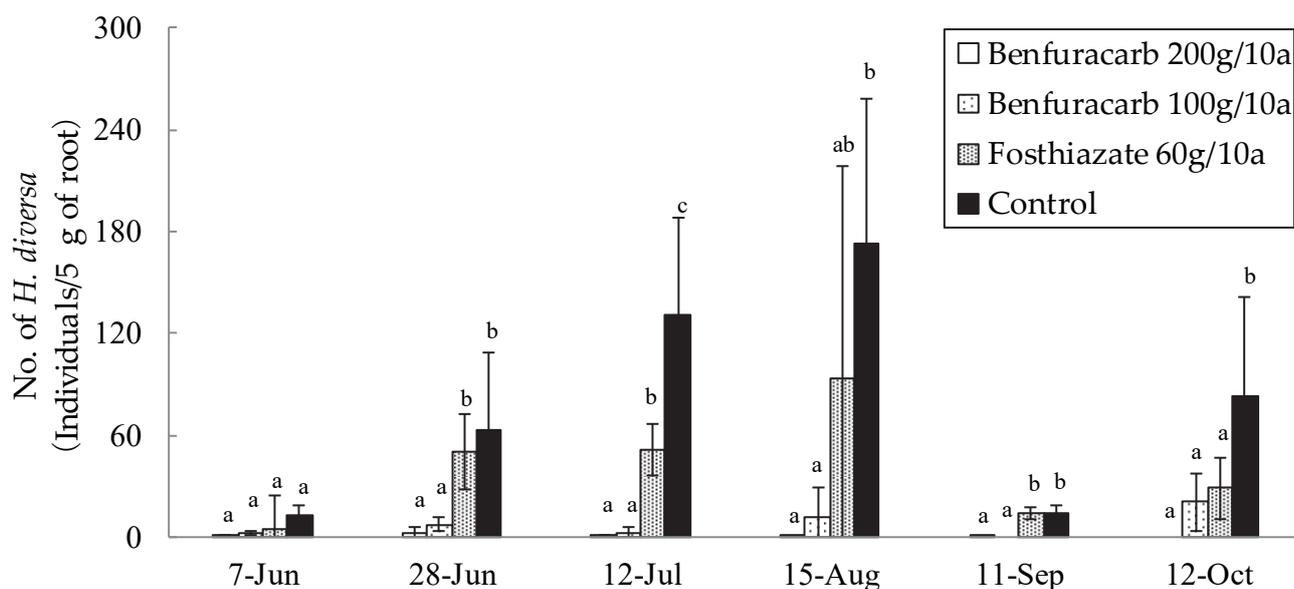


Figure 3-3. Population dynamics of *Hirschmanniella diversa* in the lotus root after treatment with different nematicides in the 2012 micro-field experiment. Bars indicate standard deviation (n = 3). Different letters in the same days indicate significant difference (Tukey HSD test; $p < 0.05$).

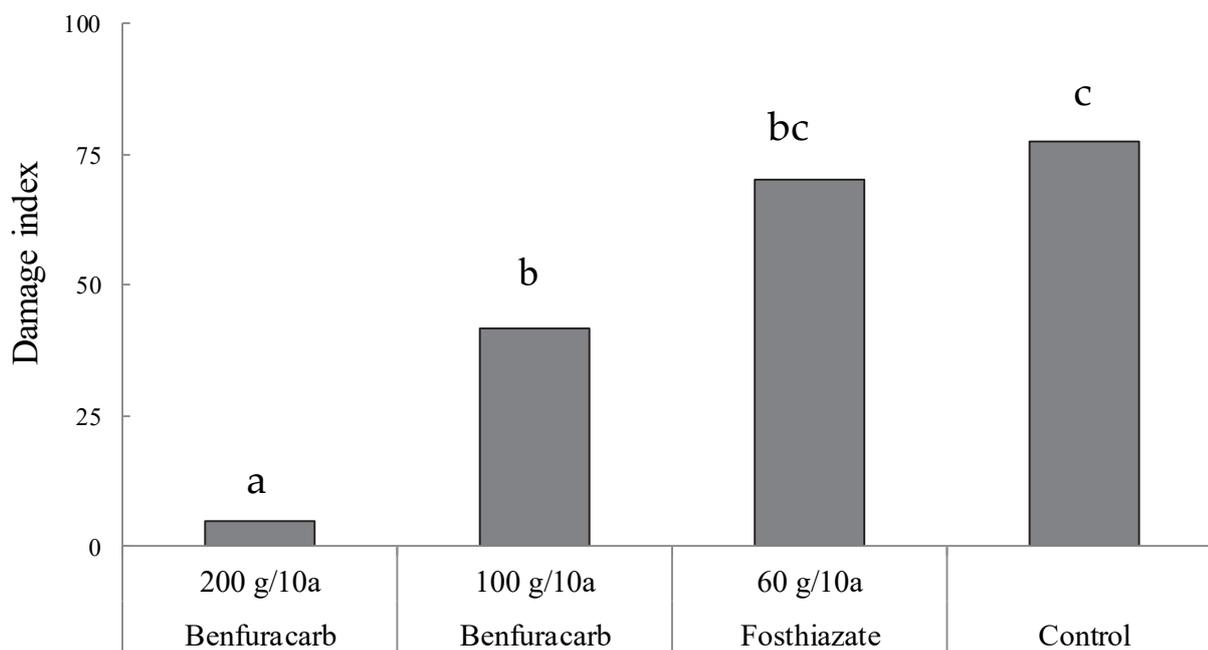


Figure 3-4. Effect of two of nematicides, benfuracarb at 100 and 200 g 10a⁻¹ and fosthiazate at 60 g 10a⁻¹, on damage in lotus tubers caused by *Hirschmanniella diversa* in the 2012 micro-field experiment (n=3). Benfuracarb and fosthiazate formulations were granule and the percentage a.s. were 5% and 1.5%, respectively. The damage index was evaluated based on Table 5. Different letters indicate significant difference among the treatments (Kruskal-Wallis test; $p < 0.05$).

3. 3. 4 隔離枠圃場を用いたベンフラカルブの防除効果試験 -2014-2017年-

2014-2017年までのベンフラカルブ 8%粒剤 1.2kg/10a 施用の被害指数を Table 3-5 に示した。ベンフラカルブ 粒剤施用区は、全て無処理よりも有意に被害度が低下した (Mann-Whitney U test; $P < 0.05$)。

Table 3-5. Effect of benfuracarb on damage to lotus tubers caused by *Hirschmanniella diversa* in microfield experiments

Year	Nematicide ^{a)}	Application date	Survey date	No. of investigated lotus tubers	No. of tubers in each damage index ^{b)}					Damage index ^{c)}
					0	1	2	3	4	
2014	Benfuracarb	12th June	15th October	42	5	22	12	3	0	32.7a
	Control	-		123	0	15	93	15	0	50.0b
2015	Benfuracarb	8th May	29th September	28	13	11	3	1	0	17.9a
	Control	-		30	1	8	8	13	0	52.5b
2016	Benfuracarb	20th June	20th September	37	31	6	0	0	0	4.1a
	Control	-		36	17	8	11	0	0	20.8b
2017	Benfuracarb	25th May	5th October	55	34	15	6	0	0	12.3a
	Control	-		61	11	17	18	14	1	40.6b

a) Benfuracarb formulation was 8% granule. The applied amount of a.s. was 120g/10a

b) Damage index: 0: Not damaged, 1: slightly damaged, little small black spots by *H. diversa* (less than 3 mm in diameter) on the tuber surface. No effect on the commercial value, 2: Many small black spot. Decreased commercial value, 3: Many small and big black spots (more than 3 mm in diameter). Deformed tuber surfaces. Border of no commercial value, 4: Critical damage to tubers. Highly deformed, many big c) $(A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4) / (4 \times N) \times 100$. A, B, C, and D: No. of tubers with the damage level 0, 1, 2, 3, and 4, respectively. Different letters after damage index in the same years indicate significant difference (Mann-Whitney U test; $P < 0.05$)

3. 4 考察

これまで、イネネモグリなどのイネに寄生する *Hirschmanniella* 属線虫に対しては、カルボフランの根部浸漬処理 (Eissa et al, 1986 ; Lahan et al., 1999 ; Prasad and Rao, 1984) や、乾田化しての DD 剤等 (Iyatomi and Nishizawa, 1970) の使用が検討されている。しかしながら、ハスでの線虫防除の取り組みは過去に全く事例がない。常時湛水条件のハス田では、DD などのガス化して効果を発揮するタイプのいわゆる土壌薫蒸剤は、殺線虫効果が期待できないと考えられたため、本研究では非土壌薫蒸剤を中心に検討した。殺線虫効果については、線虫剤としての使用がされていないピレスロイド、ネオニコチノイドを含め、多くの系統の剤で検討を行なった。また、前述のように水系での使用は想定されていない土壌薫蒸剤についても、カーバメート系 (metam sodium) については水溶液での効果が期待できる (府賀、私信) とのことから、DD を含めて一部濃度で試験を行った。

殺線虫効果試験において、約 1–10 µg/ml (ただしネライストキシンは剤の有効成分濃度がカルタップ 75%、チオシラム 50%と他剤と比較して高いが、施用量は他剤と変わらないため、実用的濃度 1–50µg/ml とした) のある程度実用化が期待できる濃度で補正死虫率が 70%以上認められた薬剤は、いくつかの系統に限られた。すなわち、IRAC (2019) で定義された中ではカーバメート系、有機リン系、ネライストキシン系およびその他系統のシアナミドである。一方、アバメクチン、ミルベマイシン系であるアバメクチンは、高濃度 (36 µg/ml) においても 20%と低い死虫率を示した。アバメクチンの LC₅₀ は、サツマイモネコブセンチュウ *Meloidoyne incognita* の 2 期幼虫およびニセフクロセンチュウ *Rotylenchulus reniformis* (試験ではステージが統一されていない) ではそれぞれ 1.56 µg/ml と 32.9 µg/ml と報告されている (Faske and Starr, 2006)。本試験と Faske and Starr の試験は、浸漬時間がそれぞれ 2 週間および 24 時間であることなど、LC₅₀ の単純な比較はできないが、2 週間浸漬の方が死虫率は高くなることが予想されるため、少なくともこの LC₅₀ は過小評価ではないと考えられることから、レンコンネモグリは両種と比較して感受性が低いと考えられた。アバメクチンは日本国外では殺線虫剤として登録があり、市販もされている (Deuner et al., 2019) が、レンコンネモグリには実用的な効果が期待できないと考えられた。さらに、日本を含む多くの国でネコブセンチュウ類、ネグサレセンチュウ類およびシストセンチュウ類に対して殺線虫剤として活用されている、有機リン系であるイミシアホス、ホスチアゼートでも試験を行なった。小柳ら (1998) は、ホスチアゼートの線虫類に対する LC₉₀ 値 (ネコブセンチュウ類、ネグサレセンチュウ類を示していると思われる) は 0.5–1.0µg/ml としている。農薬登録の量から、イミシアホス剤でも類似した値になると考えられる。しかし、レンコンネモグリでは、これらの剤の高濃度帯 (100 µg/ml) においても死虫

率が71%–83%であり、感受性が低いと考えられた。これらの剤については、昆虫の場合、接触毒性のみでなく経口毒性も殺虫効果に関与しており、両者を分けて評価する必要があるが、本試験は虫体浸漬を2週間続けており、経皮のみならず経口でも薬剤を吸収していると考えられ、両者とも評価ができていていると考えられる。

ピレスロイド系やネオニコチノイド系農薬はそれぞれ神経系に作用し、ピレスロイド系農薬は神経伝達を司るNaチャンネルに作用して異常興奮を起こさせるが、線虫にはNaチャンネルが存在しないことから(笹倉・森、2013)、本系統の効果が低いと考えられた。また、ネオニコチノイド系農薬は、神経伝達物質であるアセチルコリンのニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に結合し、異常興奮を引き起こす。種によってnAChRの構造が異なり、ネオニコチノイド系剤の親和性が異なることから、感受性の差異が生じる。ネオニコチノイド系剤は昆虫類に特異的なnAChRと結合するため、脊椎動物では昆虫と比較し感受性が低いとされる(Tomizawa and Caside, 2004)。線虫と昆虫でも同様の選択毒性が働いているものと考えられる。

土壌燻蒸剤であるカーバムナトリウム塩およびDDについては、ガス化しない水中での効果は低かった。カーバムナトリウム塩は、水溶液であれば有効成分であるメチルイソチオシアネート(MITC)に分解され、殺線虫効果が得られるとの情報があったが、カーバムナトリウム塩がMITCに変化するためには土壌の存在が必要である(日本植物防疫協会、2016)ことから、本試験系では正確に評価できなかった可能性がある。いずれにしても、土壌燻蒸剤は水系ではガス化しないうえ、水系に流出した場合の毒性が高いことから、ハスでの使用は困難が伴うことが予想される。現在最も効果が高く、安定している土壌燻蒸剤が使用できないということは、レンコンネモグリの防除が困難である原因の大きな理由の一つである。これを払拭するためには、湿田を乾田化して、碎土した上で土壌燻蒸剤を使用する必要がある。このためには大規模な土地改良事業や基盤整備事業など、大きな設備投資を行う必要があるうえ、乾田化で発病が多くなると言われる腐敗病への対策を同時に研究していく必要がある。

また、線虫に対して効果があると報告されているスピロテトラマトも効果が低かった。これはスピロテトラマトが線虫の卵や幼虫に対して効果が高いことや、植物体内に入りスピロテトラマトエノール代謝されると効果が高まる(Shirley et al., 2019; Vang et al., 2016)ことなどが関係していると考えられたことから、殺卵効果や植物体を介しての効果などを別途評価する必要があると考えられた。

フェンチオンは1 μ g/mlの濃度でも82.0%と高い殺線虫効果を示した。しかし、フェンチオンは水棲無脊椎動物および鳥類に対する毒性が強く(Extension Toxicology Network, 1996)、日本では2011年に水稻を含め多くの作物での登録が抹消された。2010年の殺線虫効果試験時には登録の可能性があったものの、ハス栽培は同じ水系で行われていることから、湖等への流入等を考えると登録可能性が低いと判断し、フェンチオンはその後の試験から除外した。今後同様の化学構造を持ち、より他の生物に対して毒性の低い線虫剤の登場が期待される。

Table 3-2 から算出したLC₅₀をそれぞれの剤の施用量として換算すると、ベンフラカルブ粒剤(成分含量8%)で30.1 kg/10a、カルタップ水和剤(成分含量75%)で8.4 kg/10a、シアナミド粒剤(成分含量27.5%)で100 kg/10aとなった。カルタップ水和剤を通常水田で使用されているカルタップ粒剤(成分含量4.4%)で換算すると1,565 kg/10aとなり、この量はコストや労力的に現実性が薄く、カルタップは有望な剤からは除外した。

シアナミド(石灰窒素)は最も効果が高い剤の一つであるが、日本での農薬登録の上限は100 kg/10aであり、ハス田にこの量を投入すると理論値では400 μ g/mlとなり、規制値である水濁PEC 670 μ g/mlに近い値になってしまう(環境省、2010)ことから、法律上これ以上の登録拡大は不可能である。

ハスの栽培は長期間に渡り、露地栽培では最短で定植後120日、長いものでは300日以上在圃している。一方、線虫剤が施用可能なタイミングは定植前に限られることから、レンコンネモグリの残効の切れたのちに活動を再開するかどうかは重要である。そのため、本試験では殺線虫効果と制線虫効果を同様に検討した。制線虫効果を比較した剤として、ベンフラカルブおよびカルタップはレンコンネモグリの殺線虫効果が高く、水稻のイネシンガレセンチュウ *Aphelenchoides besseyi* に既に登録を有していることから選抜した。他に、オキサミル、カズサホス、ホスチアゼートおよびイミシアホスを、日本でよく使用されている線虫剤として選抜し、試験に用いた。その結果、カルタップは制線虫効果が最も低かった。オキサミル、カズサホスおよびホスチアゼートは、制線虫効果は高かったものの線虫の効果が切れると活動性を取り戻した。また、カルタップおよびイミシアホスも上記3剤よりも回復率は低かったものの、濃度に依存して活動性を取り戻した。ベンフラカルブは最も活動再開率が低く、致死効果が高いと考えられたことから、本試験では有効な線虫剤であると考えられた。制線虫効果のみが高い薬剤については、ハスに対するレンコンネモグリの加害時期が明らかとなり、その期間が短期

間であった場合に、保護剤としてその時期のみ使用することでレンコンネモグリの被害を低減できる可能性がある。

以上の研究から、ベンフラカルブは殺線虫効果、制線虫効果を併せもち、隔離枠圃場試験についても、成分投下量 1.0kg/10a および 2.0kg/10a 施用で線虫数を減少させ、かつ被害度を抑制できた。また、剤形を変えての成分投下量 1.2kg/10a 施用においても、4 年間に渡って安定した防除効果を発揮したことから、実圃場においても有効性が期待できる農薬である。今後は水位の変動や作土の浅深のある実圃場を用いた試験を行い、線虫および被害度に対する防除効果を調査する予定である。

既に使用されているシアナミドに加え、ベンフラカルブが使用できるようになったとしても、ベンフラカルブおよびその代謝産物であるカルボフランの残留基準値はレンコンで 0.01ppm と非常に低い案が示されており、低残留基準を満たすために収穫前日数が 180 日と他の作物に比較して長期にわたっている(厚生労働省、2020)。また、1.2kg/10a という施用量は、水稻での標準施用量 80g/10 a (10a あたり育苗箱 20 枚を使用したと想定) と比較して桁違いに多く、越水等による残留や環境への流出リスクなどは段違いに高くなることから、生産者には保水対策などを万全にして慎重に使用すること求められ、適正指導も大きな課題となる。また、これら線虫剤の連用による薬剤分解性の微生物層の発達(Karpouzias et al., 2005; Pantelelis et al., 2006) や抵抗性の発達(Viglierchio and Brown, 1989; Yamashita and Viglierchi, 1987) 等により、これらが効果を失う可能性があることから、近縁のイネネモグリセンチュウで開発されているような抵抗性品種の選抜(Ramakrishnan et al, 1984)、乾田化後に土壌燻蒸を行う(Iyatomi and Nishizawa, 1970) などの耕種的防除法や、生物的防除法(蔵下ら、2018) など、IPM の考え方に従ってより多様な防除方法を検討していく必要があると考えられる。

第 4 章 レンコンネモグリセンチュウの全国的分布状況と系統関係

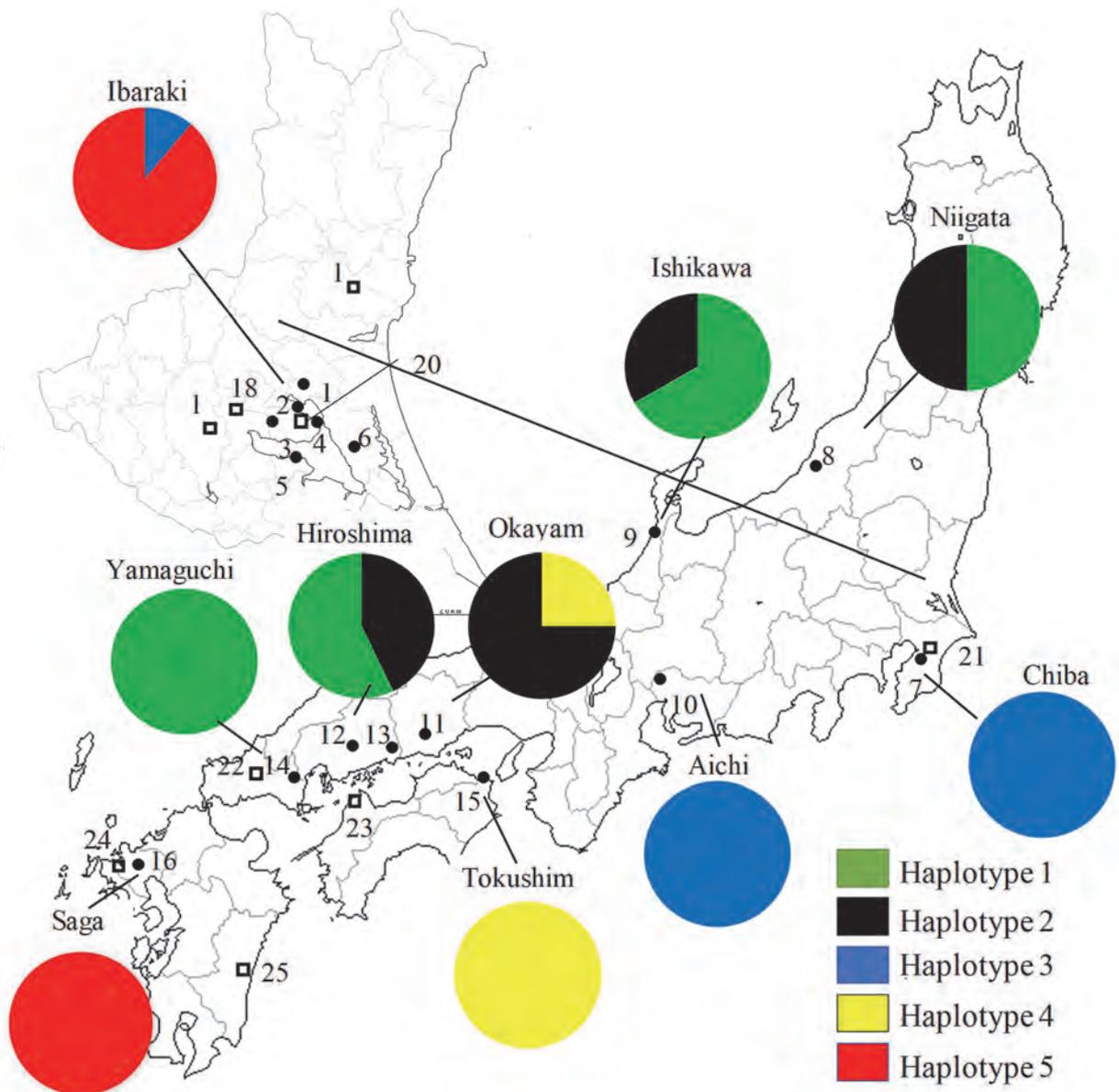
4. 1 はじめに

前章までは、茨城県内のレンコンネモグリを用いて研究を行ってきたが、レンコンネモグリのレンコン産地における分布の状況は、茨城県の他には徳島県(Koyama et al., 2013)、石川県(植松ら、2015) および新潟県(Kurashita et al., 2021b) でしか調査されていない。

千葉県でのハスへの *Hirschmanniella* 属線虫の寄生・加害報告はあるものの、その線虫種はイマムラネモグリとされ、病名登録も行われている(三平・永井、1996; 三平、2002)。しかし、レンコンに寄生する *Hirschmanniella* 属線虫は、茨城、徳島および千葉ではレンコンネモグリが主体であるとする水久保(2002)の主張とは食い違っている。そもそも、三平・永井(1996)のハスに寄生するイマムラネモグリの論文では、レンコンネモグリは日本未発見で和名が無く、論文に記載された口針長などの計測値もレンコンネモグリに近い(本章で後述)ことから、当時同定した線虫がレンコンネモグリの誤同定であった可能性もある。一方、これまでの茨城県での高木ら(2017)、石川県での植松ら(2015)の調査では、調査した *Hirschmanniella* 属線虫はレンコンネモグリであり、イマムラネモグリセンチュウのハス圃場での発生は認められていない。一方、Koyama et al. (2013) および Kurashita et al. (2021b) は、徳島および新潟のハス田圃場をリアルタイム PCR 法で調査し、少数ながらイマムラネモグリセンチュウの存在を確認している。よって、イマムラネモグリセンチュウがハスに寄生するのか、地域によってはハスで優占しているのかなどは明らかとなっていない。

また、レンコン生産において黒皮線虫病が問題となってきたのは 1990 年以降(三平・永井、1996)であり、それ以前の文献・記録には黒皮病の記載が見られない。水掘りが一般に普及したのは、前述(第 1 章)のとおり 1970 年代(牧山、2010; 羽田ら、2018)であったことから、綺麗に泥を洗い落とした“白いレンコン”という品質の差別化は黒皮病が問題になる以前から認識されており、少なくとも 1970 年から 1990 年までの 20 年の間、線虫被害は問題とならず、“白いレンコン”は急激に増加したと予想される。関東で栽培の盛んである“金澄系”と呼ばれる系統群は、1985 年の金澄 1 号の品種登録(金坂、2010; 篠原ら、2016)以降その栽培面積を急激に拡大し、茨城県では作付けの半数以上を占める系統群となっている(茨城県県南農林事務所 経営・普及部門調べ)。ハスはこれまで民間育種家が品種育成を牽引し、また種苗会社を通さず直接種ハス(種苗となる地下茎)の遣り取りを行うことから、品種の動きを追うことが困難である。さらに種ハスが乾燥を嫌うことから、根および泥が付着したまま地域間を移動し、土壌を介した病害虫の移動リスクも高い。よって日本の一部地域で発生していたレンコンネモグリが種レンコンに便乗して広がった可能性や、育種時に導入された中国や台湾などの他国からの品種(篠原ら、2016)に混入し、その際に日本に侵入した可能性も考えられる。

そこで、本研究では全国各地のハスからネモグリセンチュウ類 *Hirschmanniella* 属のセンチュウをサンプリングし、形態学および分子生物学的手法による同定を行い、レンコンネモグリの国内での分布状況およびイママラネモグリのハスへの寄生の有無を明らかにすることを旨とする。さらに、採集したレンコンネモグリのDNAをシーケンスして rRNA および *mtCOI* の塩基配列を決定し、国内でのレンコンネモグリセンチュウの系統関係を明らかにする。加えて、ハスと地理的な重なりを持つ稲田に生息し、本研究でも生態等の比較対象として用いているイネネモグリ、イママラネモグリを各地のイネから採集して比較することで、同属他種との比較を行い、レンコンネモグリの時間・空間的拡大を明らかにすることを旨とする。



4. 2 材料および方法

4. 2. 1 *Hirschmanniella* spp.のサンプリングと分離法

Hirschmanniella 属線虫（レンコンネモグリ、イママラネモグリ）を分離するために、10 県 16 地点からレンコンを採取した。同様に、イネネモグリを分離するために、6 県 9 地点からイネ *O. sativa* の根を採取した。（Fig. 4-1、Table 4-1、Table 4-3）。各地点ではレンコン、イネを各々3 個体以上供試した。レンコンは節間の細根を水

道水でよく洗浄して、土を除去した後、各地点ごとに根をまとめて混ぜ合わせ、ハサミを用いて 5mm に裁断して供試した。分離はベルマン漏斗法 (Baermann, 1917) を用い、インキュベーター内で 25°C、48 時間行った。イネの根についても同様の手順で行った。

4. 2. 2 *Hirschmanniella* spp.の形態学的解析

レンコンあるいは水稻から分離した線虫は、変形しないように 60°C でゆるやかに熱殺し (水久保・二井, 2014)、光学顕微鏡 BX-50 (Olympus Corp., Tokyo, Japan) を用いて、形態的特徴に基づいて *Hirschmanniella* 属線虫と他の線虫を分けた。さらに、*Hirschmanniella* 属の雌成虫を各地点 12-20 個体選び、その口針長を測定し、Sher (1968) および三平・永井 (1996) が示したレンコンネモグリ、イマムラネモグリおよびイネネモグリの値と比較し、種を同定した (Table 4-3)。

4. 2. 3 DNA 抽出、PCR および塩基配列の決定

各地点から分離した *Hirschmanniella* spp. のうち 3-5 個体をサンプリングし、市販の DNA 抽出キット、ISOHAIR (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて Tanaka et al. (2012) の方法を用いて DNA 抽出を行った。また、以下のプライマーを用いて、rRNA の 18S 領域 (以下 18S)、rRNA の 28S 内 D2-D3 領域 (以下 D2-D3)、ミトコンドリアシトクロム c 酸化酵素サブユニット I (*mtCOI*) 遺伝子を増幅した。rRNA の 18S 領域については、プライマー F7 (5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3') および R26 (5'-CATTCTTGCAAATGCTTTCG-3') (Floyd et al., 2002) を用いた。rRNA の 28S 内の D2-D3 領域については、プライマー-D2a (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3') および D3b (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Nunn, 1992) を用いた。*mtCOI* については、プライマー-JB3 (5'-TTTTTGGCCTCCTGAGGTTTAT-3') および JB5 (5'-AGCACCTAAACTTAAAACATAATGAAAATG-3') (Derycke et al., 2010)。PCR 反応は Go Taq[®] Green Master Mix (Promega, Wisconsin, USA) または KOD-PLUS-Ver.2 (Toyobo Co. Ltd, Osaka, Japan) を用いて Bio-Rad T100TM Thermal Cycler (BIORAD, California, USA) または TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (TaKaRa Bio., Shiga, Japan) にて行った。18S と D2-D3 の増幅条件は、94°C で 2 分間処理したのち、94°C で 30 秒間の熱変性、50°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 40 サイクル行い、その後 72°C で 5 分間最終伸長ステップを行った。*mtCOI* の増幅条件は、94°C での 2 分間処理したのち、94°C での 1 分間の熱変性、48°C での 2 分間のアニーリング、68°C での 3 分間の伸長を 35 サイクル行い、その後 72°C で 5 分間最終伸長を行った。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いて精製し、精製した PCR 産物は ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) と BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を用いて配列を決定した。

4. 2. 4 系統解析

得られた配列は、DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd, UK) でアSEMBルし、MEGA ver. X (Kumar et al., 2018) のデフォルトパラメータを用いて MUSCLE (Edgar, 2004) を用いてアラインメントを行った。アラインメント後は、MEGA ver. X の最尤法を用いて解析した。18S には、Kimura-2、D2-D3 には Kimura-2+G、*mtCOI* には General Time Reversible+I のパラメータモデルを適用した。得られた系統樹で示されるグループピングの信頼性を検証するために、1,000 回の反復によるブートストラップ解析を実施した。また、各系統樹の外群は、*Hirschmanniella* 属と *Pratylenchus* 属の既報データを用いた (De Ley et al., 2005 ; Tandingan De Ley et al., 2007 ; Bert et al., 2008 ; den Berg et al., 2009 ; Majd Taheri et al., 2013 ; Feng et al., 2016 ; Araya et al., 2016 ; Liu et al., 2017 ; Kuroda et al., 2021)。

Table 4-1. Location in Japan of *Hirschmanniella diversa* collected from lotus roots and accession number of obtained sequences in this study.

Region	Prefecture	Location	Code	Accession No. of sequence obtained in this study			
				18S rDNA	D2-D3 of 28S rDNA	<i>mtCOI</i>	
Kanto	Ibaraki	Omitama City	1	LC701769	LC701808	LC701848	
					LC701805	LC701849	
					LC701807	LC701847	
		Ishioka City	2	-	- ^{a)}	LC701806	
						LC701833	LC701876
						LC701834	LC701877
		Tsuchiura City	3	-	-	LC701835	LC701878
						LC701870	
		Kasumigaura City	4	-	-	LC701836	-
						LC701837	
		Inashiki City	5	-	-	LC701771	LC701781
						LC701782	LC701841
						LC701783	
LC701785							
LC701784							
Namegata City	6	-	-	LC701770	LC701788		
				LC701786	LC701842		
				LC701787			
Chiba	Chonan Town	7	-	-	LC701790	LC701869	
					LC701792	LC701868	
					LC701793	LC701867	
					LC701789	LC701866	
					LC701791		
Chubu	Niigata	Nagaoka City	8	LC701773	LC701799	LC701865	
					LC701772	LC701864	
					LC701801		
	Ishikawa	Kanazawa City	9	-	LC701777	LC701802	LC701873
						LC701803	LC701874
						LC701804	LC701875
Aichi	Aisai City	10	-	-	LC701811	LC701850	
					LC701809	LC701851	
					LC701810	LC701852	
Chugoku	Okayama	Kurashiki City	11	-	-	LC701844	
					LC701846		
					LC701843	LC701845	
	Hiroshima	Higashihiroshima City	12	-	-	LC701854	LC701854
						LC701861	LC701860
Fukuyama City	13	-	-	-	LC701856	LC701855	
					LC701855	LC701859	
					LC701858	LC701858	
					LC701857		

a) - Data not available.

Table 4-1. (Continued)

Region	Prefecture	Location	Code	Accession No. of sequence obtained in this study		
				18S rDNA	D2-D3 of 28S rDNA	<i>mtCOI</i>
	Yamaguchi	Iwakuni City	14	LC701774	LC701815 LC701812 LC701813 LC701814	LC701863 LC701862
Shikoku	Tokushima	Naruto City	15	- ^{a)}	LC701795 LC701797 LC701794 LC701796 LC701798	LC701871 LC701872
Kyushu	Saga	Siroishi Town	16	LC701775 LC701776	-	LC701838 LC701839 LC701840
Total				9	40	41

a) - Data not available.

Table 4-2. Location in Japan of *Hirschmanniella oryzae* collected from rice roots and accession number of obtained sequences in this study.

Region	Prefecture	Location	Code	Accession No. of sequence obtained in this study		
				18S rRNA	D2-D3 of 28S rRNA	<i>mtCOI</i>
Kanto	Ibaraki	Mito City	17	- ^{a)}	LC701822 LC701823 LC701826 LC701825 LC701824	LC701882 LC701883 LC701884
		Tsuchiura City	18	-	LC701832 LC701831	-
		Tsukuba City	19	LC701778	LC701821	LC701879
		Kasumigaura City	20	-	LC701816	-
	Chiba	Chonan Town	21	LC701779 LC701780	LC701830 LC701829 LC701828 LC701827	LC701885 LC701886 LC701887
Chugoku	Yamaguchi	-	22	-	LC701819	-
Shikoku	Ehime	Matsuyama City	23	-	LC701817	LC701880
Kyushu	Nagasaki	Kawatana Town	24	-	LC701818	LC701881
	Miyazaki	Miyazaki City	25	-	LC701820	-
Total				3	17	9

a) Data not available.

Table 4-3. Female stylet length of *Hirschmanniella diversa* isolated from lotus roots in Japan and comparison with that of other *Hirschmanniella* species.

Species	Resion	Prefecture	Location	Code	Number of measured individuals	Average (Min.-Max.) stylet length (μm)	
<i>H. diversa</i>	Kanto	Ibaraki	Omitama City	1	20	24.1 (22.3-25.8)	
			Ishioka City	2	20	22.7 (20.4-25.5)	
			Tsuchiura City	3	20	22.9 (21.1-24.7)	
			Kasumigaura City	4	20	23.5 (22.0-25.8)	
			Inashiki City	5	20	23.5 (22.1-25.3)	
			Namegata City	6	19	23.7 (22.0-25.9)	
	Chubu	Chiba	Chonan Town	7	20	24.2 (22.2-25.8)	
			Niigata	Nagaoka City	8	12	22.9 (20.7-24.9)
			Ishikawa	Kanazawa City	9	20	24.1 (22.0-25.6)
			Aichi	Aisai City	10	20	23.6 (20.2-25.7)
	Chugoku	Okayama	Kurashiki City	11	18	22.0 (20.3-24.9)	
			Hiroshima	Higashihiroshima City	12	20	23.8 (21.1-25.8)
				Fukuyama City	13	20	23.7 (21.7-25.3)
			Yamaguchi	Iwakuni City	14	17	23.5 (21.8-26.1)
	Shikoku	Tokushima	Naruto City	15	20	23.2 (20.3-25.5)	
	Kyushu	Saga	Shiroishi Town	16	19	24.0 (22.0-25.8)	
<i>H. diversa</i> ^{a)}	-	-	-	-	20	24.0 (23.0-25.0)	
<i>H. imamuri</i> ^{a)}	-	-	-	-	15	30.0 (29.0-32.0)	
<i>H. oryzae</i> ^{a)}	-	-	-	-	17	17.0 (16.0-19.0)	
<i>H. imamuri</i> ^{b)}	-	Chiba	Chonan Town	-	25	25.6 (23.8-30.0)	

a) Sher (1968)

b) Mihira & Nagai (1996)

4. 3 結果

4. 3. 1 ハスから分離された *Hirschmanniella* spp.の形態学的同定

ハス産地 10 県から採集した *Hirschmanniella* 属の雌成虫の口針長は、最小-最大値が 20.2~26.1μm であった (Table 4-3)。この値は、Sher (1968) が報告したレンコンネモグリの雌の口針長 (23-25μm) とほぼ一致し、Sher (1968) が報告したイマムラネモグリの雌の口針長 (29-32μm) とは明らかに異なった。したがって、ハスから分離された *Hirschmanniella* 属線虫の全個体はレンコンネモグリと同定された。

4. 3. 2 レンコンネモグリおよびイネネモグリの系統樹

4. 3. 2. (1) rRNA の 18S 領域の系統樹

レンコンネモグリの新規配列 9 件およびイネネモグリの新規配列 3 件を含む、29 種の *Hirschmanniella* 属線虫の配列を用い、18S の系統樹を作成した (Fig. 4-2)。イマムラネモグリについては、日本のイネから分離された既報の個体 (Accession No. LC554212) (Kuroda et al., 2021) の登録配列 1 件のみを用いた。本研究でシーケンスしたレンコンおよびイネから分離した *Hirschmanniella* 属線虫にイマムラネモグリの配列は認められなかった。レンコンネモグリの 18S 配列の種内変異は 0-0.3% (0-2bp) であり、イネネモグリは 0-0.75% (0-5bp) であった。Khun et al. (2015) の分類に従い、*Hirschmanniella* 属線虫を 3 つのクレードに分類したところ、レンコンネモグリおよびイマムラネモグリは Clade I に、イネネモグリは Clade III に属した。

4. 3. 2. (2) rRNA の 28S、D2-D3 領域の系統樹

レンコンネモグリの新配列 40 件およびイネネモグリの新配列 17 件を含む 66 件の *Hirschmanniella* 属線虫の配列を用いて、D2-D3 についての系統樹を作成した (Fig. 4-3)。レンコンネモグリの種内配列変異は 0-0.4% (0-2bp) であり、イネネモグりは 17 件全て同一配列であった。18S と同様に Khun et al. (2015) の分類に従い、*Hirschmanniella* 属線虫を 3 つのクレードに分類したところ、レンコンネモグリおよびイネネモグりは、それぞれ Clade I と Clade III に属した。

4. 3. 2. (3) *mtCOI* 遺伝子の系統樹

レンコンネモグリの新配列 41 件とイネネモグリの新配列 9 件を含む 53 件の *Hirschmanniella* 属の配列を用いて、*mtCOI* の系統樹を作成した (Fig. 4-4)。*mtCOI* の種内変異は、レンコンネモグリでは 0.2-5.3% (1-21bp)、イネネモグりは配列が完全に一致した (0bp)。イネネモグリとレンコンネモグリは異なるブランチに分けられた。レンコンネモグリの種内系統樹は、4 つのクレードと 5 つのハプロタイプが認められた (Fig. 4-4)。5 つのハプロタイプの配列を比較すると、29 の配列に変異が認められた (Table 4-4)。また、配列には挿入や欠失は見られなかった。レンコンネモグリとイネネモグリの種間配列変異は 24.7-25.7% (91-95 bp) と大きかった (Table 4-5)。

レンコンネモグリの *mtCOI* に基づく 5 つのハプロタイプのうちのうち、ハプロタイプ 1 は山口県、広島県、新潟県、石川県から、ハプロタイプ 2 は岡山県、広島県、新潟県、石川県から、ハプロタイプ 3 は茨城県 (稲敷市のみ)、千葉県、愛知県から、ハプロタイプ 4 は岡山県、徳島県、ハプロタイプ 5 は茨城県 (稲敷市除く) と佐賀県のサンプルから検出された (Fig. 4-1、Table 4-5)。

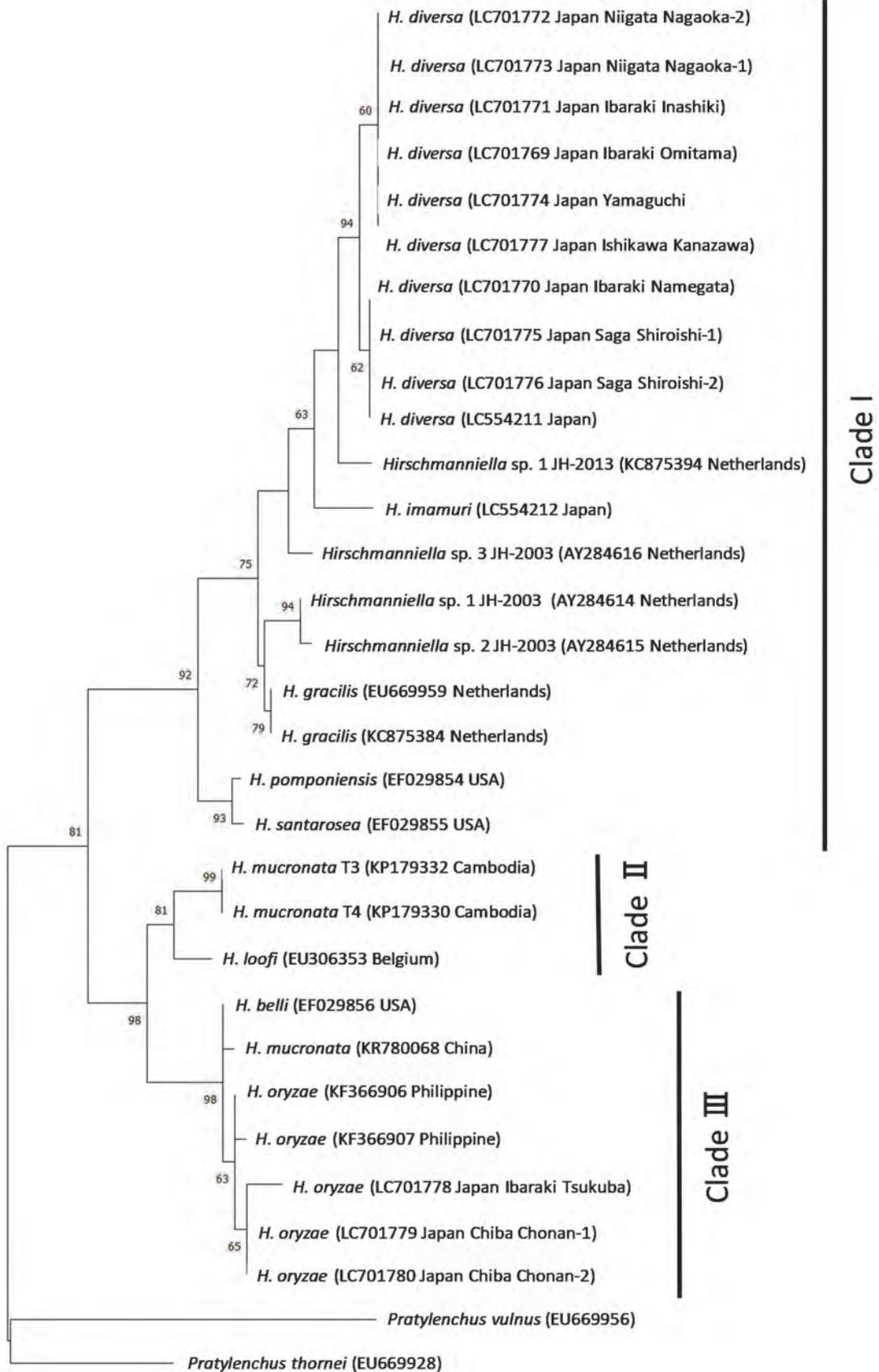


Fig. 4-2. Phylogenetic tree inferred from the 18S rDNA gene sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar

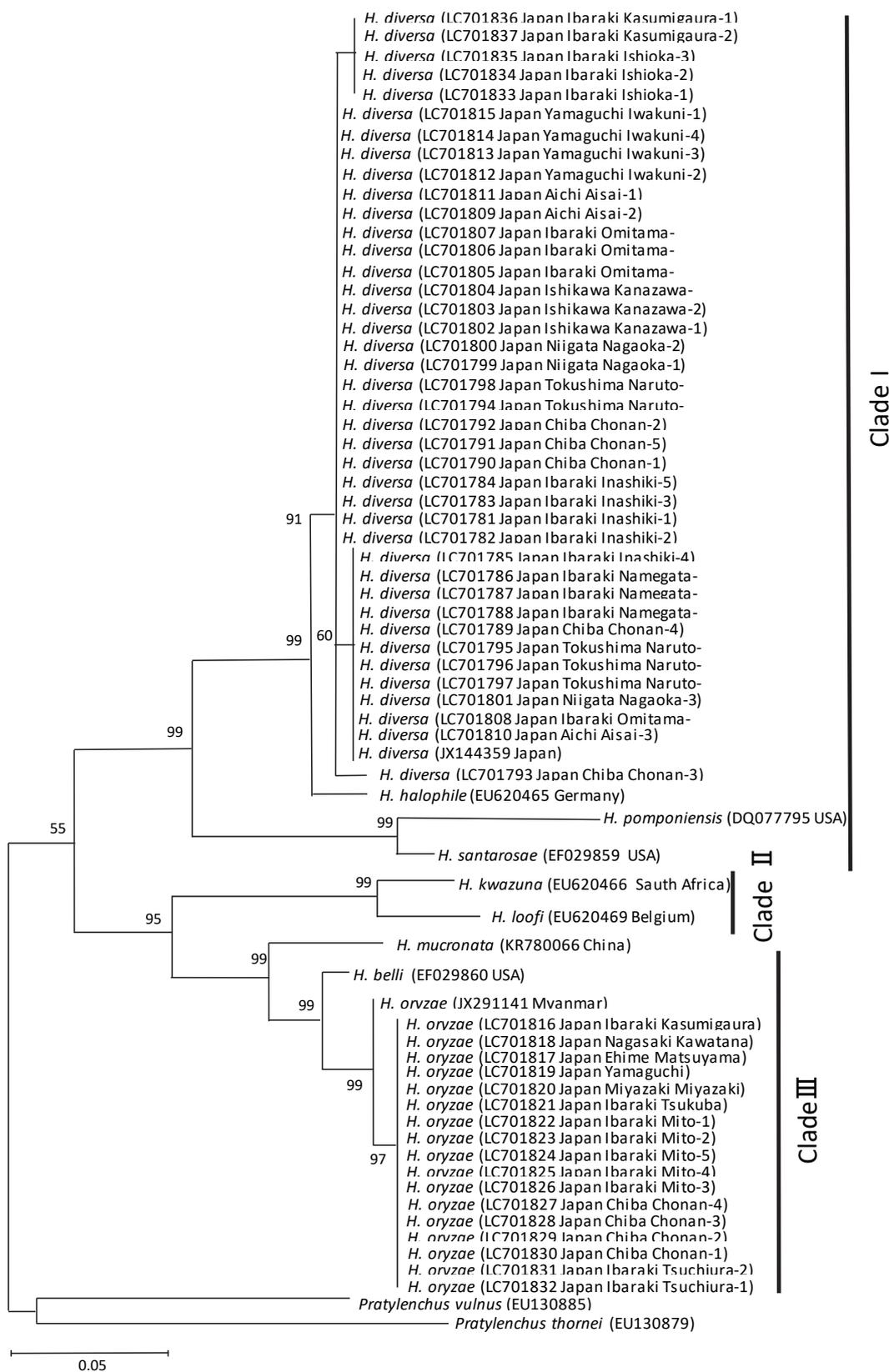


Fig. 4-3. Phylogenetic tree inferred from the D2-D3 region of 28S rDNA gene sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar represents the phylogenetic distance.

Table 4-4. Variable nucleotides of *Hirschmanniella diversa* among haplotypes based on the *mtCOI*.

Haplotype No.	Various position (bp)																												
	9	12	24	25	27	28	54	56	63	69	72	81	88	126	147	150	156	180	186	222	231	237	260	261	264	266	267	312	315
1	T	C	G	T	A	G	C	A	G	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G	A	A	A	G	G	C	T	A	T	C
2	T	C	G	T	A	G	C	A	G	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G	A	T	A	G	G	T	A	T	A	C
3	T	C	G	T	A	A	C	A	G	T	T	G	G	G	C	A	A	C	G	A	T	A	G	T	T	A	T	A	C
4	C	T	A	C	G	G	C	A	A	T	C	A	A	G	T	G	T	A	T	A	G	T	G	A	C	A	A	T	T
5	T	C	G	T	A	G	T	G	A	T	C	A	A	A	T	T	G	T	A	G	G	T	G	A	C	T	G	C	T

4. 4 考察

国内のレンコンから分離された *Hirschmanniella* 属線虫 305 個体を、形態学的な特徴、すなわち口針長により同定したところ、すべてレンコンネモグリであった。さらに、レンコンから分離された 56 個体をシーケンスしたところ、rRNA および *mtCOI* 上の塩基配列から全てレンコンネモグリ同定された。Koyama et al. (2013)、蔵下ら (2018) および Kurashita et al. (2021b) は、ハス田に生息する *Hirschmanniella* 属をリアルタイム PCR 法により調査しているが、その大半はレンコンネモグリであり、イマムラネモグリはまれであると報告している。これらの結果から、日本のレンコンに寄生する *Hirschmanniella* 属は、レンコンネモグリが優占していると結論づけられた。後藤 (1969) や桑原・弥富 (1970) の水田内の調査によると、イマムラネモグリはイネの生育初期にのみ寄生し、7 月に老齢幼虫や成虫が根から土壌へと移動するため、8 月以降には根からの分離はできないとされている。本研究では、*Hirschmanniella* 属線虫の分離源として 8 月以降に形成されたレンコン節間の細根をもちいたため、イマムラネモグリを分離するにはサンプリング時期が遅かった可能性も想定された。しかしながら、*Hirschmanniella* 属線虫によるハスへの被害は、7 月以降のハス塊茎の成長段階で観察され始めることから (高木ら、2017)、イマムラネモグリによるレンコンへの被害は、レンコンネモグリによる被害に比べて相対的に低いと予想された。

三平・永井 (1996) は千葉県の手賀池から *Hirschmanniella* 属を分離し、イマムラネモグリと同定した。本研究では、三平・永井 (1996) と同じ圃場から *Hirschmanniella* 属個体を採取し、形態学および分子生物学的にレンコンネモグリと同定した。形態学および分子生物学的解析ではイマムラネモグリは検出されなかった。三平・永井 (1996) はイマムラネモグリの雌成虫の口針長を 25.6 (23.8–30.0) μm と報告している。これは Sher (1968) の記載したレンコンネモグリ (24.0 (Max.–Min.: 23.0–25.0) μm) に近く、イマムラネモグリ (30.0 (Max.–Min. 29.0–32.0) μm) よりも短い (Sher, 1968)。したがって、三平・永井 (1996) が報告した個体のほとんどはレンコンネモグリであったと考えられた。

レンコンネモグリは 10 県 16 地点でサンプリングしたレンコンの全サンプルから検出された。この 10 県におけるレンコンの生産量は、日本の全生産量の 90% を超えている (農林水産省、2020 年)。このため、レンコンネモグリセンチュウは日本の主要なハス栽培地域に普遍的に分布していることが明らかになった。

今回作成した *Hirschmanniella* 属の系統樹から、レンコンネモグリはイネネモグリとは遺伝的に離れており、それぞれクレード I とクレード III であることが示された。一方、イマムラネモグリについては、GenBank に登録されている 18S rDNA 配列 LC554212 (Kuroda et al. 2021) の塩基配列から、レンコンネモグリとイマムラネモグリは同じクレード I に属した。*Hirschmanniella* 属線虫は元来形態学的特徴が乏しい (Anonymous, 2009 ; Sher, 1968) ことで知られ、今回調査したレンコンネモグリ、イマムラネモグリ、イネネモグリの 3 種は、口針長の長さ以外の形態学的特徴は類似または重複していた (Sher, 1968) が、塩基配列はイネネモグリと、レンコンネモグリおよびイマムラネモグリとの間では大きな違いが認められた。

本調査では、レンコンネモグリの rRNA18S 領域、rRNA28S、D2–D3 領域および *mtCOI* において程度は異なるものの種内変異が観察された。Vovlas et al. (2015) や Sekimoto et al. (2017) は、シストセンチュウの *Heterodera* 属では、rRNA よりも *mtCOI* に種内変異の多様性を認め、種内の配列比較には *mtCOI* が優れていると述べている。レンコンネモグリにおいても種内配列変異は、18S rRNA と 28S rRNA の D2–D3 領域では 1% 未満と低い一方、*mtCOI* では 0.2–5.3% の変異が認められたことから、*mtCOI* は種内比較の対象として優れていることが示唆された。また、イネネモグリでは rRNA および *mtCOI* でも種内配列変異は非常に小さかった (<1%)。

レンコンネモグリでは 28S rRNA の D2–D3 に基づくハプロタイプが 4 タイプ、*mtCOI* に基づ

くハプロタイプが5タイプ観察された。D2-D3と $mtCOI$ の塩基配列には関係性は認められなかった。また、D2-D3の変異はごくわずか(0-2 bp, 0-0.4%)であったため、前パラグラフで記述したように種内変異比較には $mtCOI$ が優れていると考えられたため、ここでは $mtCOI$ のハプロタイプについてのみ述べる。基本的には、同じハプロタイプが近接した地域に分布していた(表4-3)。ハプロタイプ1と2は中部地方(コード8,9)から中国地方(コード11-14)まで広く分布していたが、ハプロタイプ5は関東地方(コード1-4,6)と九州地方(コード16)に分布していた。ハプロタイプ3は関東地方(コード5,7)と愛知県(コード10)に分布していた。ハプロタイプ4は岡山県(コード11)と徳島県(コード15)にのみ分布していた。ハプロタイプ1と2は広島県(コード12,13)、石川県(コード9)、新潟県(コード8)で共存し、ハプロタイプ2と4は岡山県(コード11)で共存していた。

Table 4-5. Sequence variation and nucleotide difference of *Hirschmanniella* spp. based on $mtCOI$ gene.^{a)}

Species, haplotype No.	1	2	3	4	5	6
<i>H. diversa</i>	-	-	-	-	-	-
1. Haplotype 1	-	0.2	1.5	4.3	4.6	25.5
2. Haplotype 2	1	-	1.3	4.6	4.8	25.2
3. Haplotype 3	6	5	-	5.3	5.1	25.7
4. Haplotype 4	17	18	21	-	3.8	24.7
5. Haplotype 5	18	19	20	15	-	25.2
6. <i>H. oryzae</i>	94	93	95	91	93	-

a) Above diagonal shows the % of nucleotide variation and below diagonal shows the number of nucleotide differences. Box shows *H. diversa* intra-specific variations.

ハスの塊茎は苗から3年以上かけて品種特性を発現し(南川・齋藤, 1962)、1株は20m²以上に広がる(南川・齋藤, 1962)。ハスの育種には広大な面積と膨大な労働力が必要なため、種苗会社や政府が育種に関与することはほとんどない。日本で最も多く栽培されている‘金澄’の品種群は、もともと千葉県金坂氏という育種家によって育成されたもので、‘金澄1号’(金坂, 2010)が唯一の登録品種である。‘金澄1号’から‘金澄39号’まで、さまざまな品種や系統を交配して育成された(金坂, 2010)。茨城県で栽培されているその他の品種は、‘ひたちたから’、‘パワー’、‘エノモト’、‘味よし’、‘幸祝’などである。これらの品種は農家によってのみ栽培、増殖、販売が行われている。またこれら品種や系統は、地域間を主に農家によって移動し、互いに交配されている(篠原ら, 2016)。このような背景から、ハスの品種や系統の起源を追跡することは困難である。

ハプロタイプ5は、地理的に離れている佐賀県(コード16、品種は‘金澄’系統から育成された‘さが白祥’)と茨城県(コード1-4,6)という地理的に離れた場所で分離された。この結果は、レンコンネモグリが寄生した種ハスが地域間を移動した可能性を示している。レンコンネモグリのハプロタイプの分布は地理的に近接した場所に同じタイプが分布していることが多かった。また、レンコンネモグリの5ハプロタイプの多様性はイネネモグリと比較して非常に高かった。しかしながら、日本におけるハプロタイプの地域的偏りを考慮すると、諸言で述べたような過去30~40年という間での侵入種ではないことが示された。現在のレンコン品種は、1876年に中国から導入された中国群の系統(農商務省, 1891)に由来するものが多いが、1876年の侵入を仮定したとしても本研究で観察されたハプロタイプの多様性を説明することは困難である。したがって、レンコンネモグリは在来種としての可能性が高いことが示唆された。

レンコンネモグリが地域間をどのように移動するのかという問題はまだ完全に解明されていない。今後の研究では、ハスの品種や系統の移動についてさらに詳しい調査を進める必要がある。また、日本では城のお堀や湖沼などにハスが観賞用として植栽されることが多いが、これらのハスは長年遺伝子の出入りがないと想定されることから、これらのハスに寄生する線虫を調査する必要がある。また、日本の品種育成の遺伝資源として導入

された中国や台湾のハスからレンコンネモグリを分離・解析し、日本のレンコンネモグリと比較することでこれらの来歴が明らかになる可能性もあると考えられる。

また、イネネモグリの塩基配列は、レンコンネモグリの塩基配列と比較して調査した配列の多様性が低いことが明らかになった。イネの種子は乾燥した状態で地域間を移動するため、イネの種子に便乗してイネネモグリやイマムラネモグリが生息域を広げることはない。そのため 2 種とも長距離の素早い拡大は困難と考えられ、むしろ土壌や水の移動を通じて比較的ゆっくりと広がっていくと考えられる。自然条件下では、イネに寄生する 2 種は地域的に隔離される可能性が高く、多様性が高そうに予想されるが、塊茎に寄生して容易に長距離移動を行うレンコンネモグリよりもイネネモグリの種内多様性が低いことは興味深い。

第 5 章. 総合考察

ハスは日本の伝統的な農作物であると同時に、仏教では宗教的なシンボルとしての意味合いを持ち合わせていることから、花や葉は寺院などで生のものや造形物が使用されている。また、ハスの花はその美しさから古くから鑑賞の対象となり、花色や花卉の枚数の異なる多くの観賞用品種が育成され、また万葉集などでも詩歌の題材などとしても用いられており（渡辺、1994 など）、文化的な背景もあって日本人の精神的な部分にも根差している。また、近年はレンコンの機能性成分への発見・注目（Nishibori et al., 2012 他）もあり、その高収益性と需要の安定性（羽田ら、2018 など）から、今後も伸びが期待される作物である。

茨城県は 1970 年代から、腐敗病の防除と労働生産性の改善のために年中湛水および水掘りという生産体系をいち早く導入し、反収と生産面積を拡大してきた（羽田ら、2018；牧山、2010）。しかし、水掘りおよびその後の収穫物の洗浄により、白くて傷がないという外観品質に付加価値が与えられた。そのために外観品質の重要性が向上し、現在までのところ土掘りの地域ではそれほど大きな問題となっていないレンコン黒皮線虫病が、特に茨城県で経済的影響を大きく持つという事態に皮肉にも繋がってしまった。今後、国内では減少していく消費者のために付加価値がより重要化することや、土掘りの産地が労働生産性の向上や東京市場への出荷を増やすために徐々に水掘りへと変わりつつある状況から、黒皮病に対する防除対策のニーズは増加していくものと考えられ、本研究はそのための基礎となるものと考えられる。

2 章では、茨城県におけるレンコンネモグリのハス根部内における発生活消長を調査し、かつその幼虫、成虫の齢構成や交尾率から生活環を推察した。まずは茨城県のレンコンネモグリ多発地域である石岡市の圃場で、ハスから分離された *Hirschmanniella* 属線虫がレンコンネモグリであることを形態的、分子生物学的に証明した。また、複数圃場で複数年に渡り発生活消長を調査し、その動態が類似することを示した。交尾は線虫が休眠から明け、ハスが定植される前後にあたる 4 月-5 月にかけて行われることを示した。さらに、口針長と生殖器の有無よりレンコンネモグリの齢期が測定できることを示した。さらにレンコンネモグリは、畑作物で問題となるサツマイモネコブセンチュウ *M. incognita* などとは異なり、寄主植物や気温などの条件さえ整えばいつでも繁殖できるわけではなく、年一回の発生（1 化性）であることが明らかになった。越冬は四期幼虫あるいは成虫で行われるが、これは水稻に寄生する *Hirschmanniella* 属の 2 種、イネネモグリおよびイマムラネモグリの越冬形態（高倉・山本、1970）と同様であった。彼らの生活環をまとめると、ハス露地栽培の 4-5 月、種ハスが定植されると越冬虫は 2 週間程度で速やかにレンコンの根部内に進入し（高木、未発表）、同時期に交尾を行う。その後 6-7 月にかけてハスの根部内などに産卵を行ったのち、7-8 月にかけて産下された卵が孵化し、8 月になると孵化した二期幼虫で根部内の密度はピークに達する。その後 9 月になると二期幼虫が成長して三期幼虫となり、10 月-11 月にかけて徐々に三期幼虫の割合が少なくなり、四期幼虫と成虫が主体となる。ハスが枯死するとレンコンネモグリは徐々に土壤中に脱出し、一部はそのままレンコンの残渣内で、一部はケイヌビエなどの水田雑草（植松ら、2015；高木ら、2016）および土壤中越冬すると考えられる。

本線虫がレンコンに黒皮病を引き起こすメカニズムは不明な点が多いが、本研究（Takagi et al., 2019）、植松ら（2016）、Uematsu et al. (2020)、蔵下ら（2018）および Kurashita et al. (2021b) の研究から、以下のように考えられる。レンコンネモグリは通常ハスの細根を餌源とし、その組織内を摂食しながら移動している（植松ら、2016）。レンコンネモグリはレンコンの若芽も加害し、その表面組織に短時間で深さ約 1mm まで潜行する。表面組織には分解酵素の影響と考えられる溶解が認められる（Uematsu et al., 2020）。実際被害地域では、若芽やその近辺の肥大途中のレンコンには、既にレンコンネモグリによる加害痕が認められることから（高木ら、未発表）、レンコンネモグリによるレンコンの加害は肥大早期の若芽の時期に起こっており、摂食によって崩壊した

レンコン組織と、その周辺部分の生育量ギャップが“ユズ肌症状”の原因である表皮の凹凸となると考えられる。またその加害痕に二次的に鉄細菌などから成る細菌層が形成されてバイオフィルムを生じ、ビビアナイト $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ などの着色物質が沈着する（蔵下ら、2018 ; Kurashita et al., 2021a）ことがわかっており、これら色素により表面が黒変する”ゴマ症状”を生じると考えられる。

これらの生態情報から、様々なレンコンネモグリに対する防除法のヒントが得られ、一部はすでに防除体系の中（高木ら、2017 ; 高木ら、2020）に、休耕中の水田雑草防除および残渣処理の重要性などとして取り入れられている。また、年1化で8月に二期幼虫が出現して根部内密度が上昇することなどから、8月以前に掘り取りを行って残渣を処理することにより、密度を増加させない対策などが想定できる。今後は、異なる地域における発生消長および生活環の調査、雑草やレンコンの培養系などを用いた飼育試験による産卵数、産卵場所の解明などの生態情報収集と共に、実圃場レベルでの生態情報を活用した防除試験などを展開していく必要がある。

第3章では、現場で最も強く求められる防除法の一つである化学的防除法、すなわち農薬について検討を行った。ハスは基本的に湛水された状態で作業が行われ、水を切って収穫を行う土掘りの地域でも、収穫以外の作業は全て湛水された状態で行う。また、ハス田は湖、川および海などの水系に直結し、施用される農薬についてはその魚毒性や環境への影響について特段の配慮をする必要がある。特に茨城県はハス田の多くが湖沼面積日本第2位の霞ヶ浦周辺に存在し、ハス田は流出窒素などが霞ヶ浦の水質汚染の一因として挙げられることから、行政も霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画（第7期）（茨城県他、2016）などを策定し、水質向上に積極的である。そのような状況の中、現在唯一ハスに使用できる線虫剤が石灰窒素である。しかし、石灰窒素は殺虫成分であるシアナミドに窒素を含み、殺虫殺菌殺草剤であると同時に、窒素を約20%含む窒素質肥料としてはたらくことから、多用することは霞ヶ浦の水質低下に与すると考えられる。

また、石灰窒素の100kg/10a処理のみではレンコンネモグリを完全に防除するには至らないと考えられる（柏木ら、2017）ことから、湛水時にも施用可能であると考えられる非薫蒸剤タイプの線虫剤およびイネ等水系作物に農薬登録のある剤を中心としてレンコンネモグリに対して効果の高い農薬を選抜した。選抜には、単純な浸漬処理を用いた殺線虫効果試験とともに、線虫を不動化させハス根部への侵入を抑制する“制線虫効果”も検討した。さらに選抜した剤を、レンコンネモグリで汚染された土壌を充填した隔離プラスチック枠を用いた半野外系の試験でその防除効果を検討した。

室内でのスクリーニングにより、カーバメート系、有機リン系、ネライストキシン系の薬剤が殺線虫効果に優れていた。また、制線虫効果はネライストキシン系以外の薬剤で高かったが、ベンフラカルブ以外の薬剤は活動性を回復する割合も大きかった。以上のレンコンネモグリに対する効果と、剤の環境中での許容範囲を相互に考慮し、ベンフラカルブ粒剤を有効薬剤として選抜した。ベンフラカルブを2.0 kg/10aあるいは1.0kg/10a相当量、ハス植え付け前に全面処理土壌混和して植え付けしたところ、無処理および対象のホスチアゼート0.6kg/10a相当量と比較してレンコンネモグリの虫数および被害度が低く抑えられ、被害度も低かった。同様に、ベンフラカルブを1.2kg/10a相当量を植付前全面処理し、被害度を無処理と4年間にわたり比較したところ、全ての年で被害度が低く抑えられ、防除効果が認められた。このことから、ベンフラカルブによるレンコンネモグリへの防除効果が示された。

レンコンネモグリ並びに *Hirschmanniella* 属線虫は、イネ *O. sativa* やタロイモ *C. esculenta* など湿地帯の植物を好み（Jeger, 2018）、農作物の中ではイネへのイネネモグリセンチュウ類（*H. oryzae* だけでなく *H. imamuri*、*H. mucronata* など複数種がイネには寄生する）の被害が最も大きいとされているが、深刻な被害は熱帯の2期作地域など発展途上国で発生するため、主に経済的な理由から本属に対する化学的防除手段は実用化されていない（Bridge et al., 2005）。今回の試験により、日本ですでに農薬登録を取得しているベンフラカルブについて、レンコンネモグリに対する有効性が明らかになったことから、レンコンでのネモグリセンチュウ類に対する農薬登録について手続きが進行しており、内閣府消費安全委員会が農薬評価書（案）が示されたところである（内閣府食品安全委員会、2019）。1.2kg/10aの施用量は、経済的には十分に生産者に受け入れられるレベルである。しかしながら、ベンフラカルブ1.2 kg/10aの施用量は、到達深度を30cmとした際のレンコンネモグリのLD₅₀値よりも小さい値であり、ベンフラカルブのみでレンコンネモグリを完全に防除することは不可能である。

そのため、これまでにレンコンネモグリに使用実績のある石灰窒素とベンフラカルブを組み合わせた処理により化学的防除法を補強するとともに、他の耕種的、物理的防除法（高木ら、2017）を適切に組み合わせ、レンコンネモグリを経済的被害許容水準以下に抑制するという総合防除法（IPM）の推進が強く求められる（高木ら、

2020)。

今後は、土壌を入れた条件でカーバマナトリウム塩液剤の殺虫効果測定を行うなど、剤の特性に合わせて更に有効薬剤をスクリーニングし、化学的防除手段の多様化を進めるとともに、抵抗性素材の探索や、乾田化など耕種的・物理的防除手段にも注力して研究を進めてく必要がある。その際に、霞ヶ浦等水系への影響も勘案しながら、生産と環境との調和を図りながら実用化を推進しなければならない (Takagi et al., 2019)。

第4章では、レンコンネモグリは茨城県、千葉県および石川県などの一部地域では発生が確認されているものの、その他産地での分布状況が不明であった。また、過去に千葉でレンコンに黒皮病を引き起こすのはイマムラネモグリである (三平、2002) との報告もされていることから、全国からハスを収集してレンコンネモグリおよびイマムラネモグリ分布状況を調査した。あわせて、各地域から収集したレンコンネモグリ塩基配列を決定してその系統樹を作成し、イネネモグリおよびイマムラネモグリなどの近縁種との比較や、レンコンネモグリ種内の系統関係の比較を行った。

本調査では、10県16圃場のハスから *Hirschmanniella* 属線虫を分離し、形態学的手法で305個体、分子生物学的手法で56個体の同定を行ったが、全てレンコンネモグリであった。三平・永井 (1996) がレンコンに寄生するのはイマムラネモグリである、と報告した圃場から分離した *Hirschmanniella* 属線虫も、本調査では全てレンコンネモグリと同定された。そのため、1996年に調査された個体も、多くはレンコンネモグリであったと考えられた。以上より、国内のハスにはどの地域でも *Hirschmanniella* 属線虫が寄生しており、レンコンネモグリが優占しているということが明らかになった。

レンコンネモグリは rDNA の 18S (18S と略す)、28S 上の D2-D3 領域 (D2-D3 と略す) および mtDNA 上の COI 領域 (*mtCOI* と略す) の塩基配列を決定し、近縁種間あるいは種内での変異を解析した。いずれの領域についてもレンコンネモグリはイネネモグリとは異なるクレード (18S、D2-D3 ではそれぞれクレード I および III (Khun et al., 2015)。*mtCOI* ではクレード I および II) に属し、両種は *Hirschmanniella* 属の中でも比較的離れた関係にあることが明らかになった。イマムラネモグリは既報の 18S しか塩基配列ができなかったが、レンコンネモグリと同じクレード I に属した。

レンコンネモグリは種内変異の解析は、rRNA よりも変異の大きい *mtCOI* を比較するのが最も適していると考えられた。*mtCOI* の比較により、レンコンネモグリは国内個体群は4つのクレードを形成し、5つのハプロタイプが認められた。種内の塩基相違は1-21塩基であった。1つのハプロタイプが地理的に離れた場所にも出現することもあり、種ハスの行き来がレンコンネモグリに分散に寄与していることが推察された。また、近縁種のイネネモグリと比較すると変異の多様性が非常に大きく、全国に広く分布が認められることから、レンコンネモグリは近年に侵入した外来種ではなく、古くから日本に分布していた在来種である可能性が高い。一方、ハスは国外から遺伝資源を積極的に導入して育種が行われていたことから、複数回に渡り、異なる産地からレンコンネモグリが導入された可能性も低いながら考えられるため、今後海外の個体群を含めての調査が必要と考えられた (Takagi et al., 2023)。

以上のように、本研究ではレンコンネモグリは生態、防除法および分布・来歴について一連の研究を行った。*Hirschmanniella* 属は、植物寄生性線虫の中でも比較的マイナーな部類に入る線虫であり、研究が比較的なされているものはイネに寄生するイネネモグリである。しかし、日本ではイネに対するイネネモグリは収量に対する影響が他の病害虫よりも比較的小さく、またその研究例の多くは東南アジア等の発展途上国での報告であり、化学的防除法が経済的理由から導入困難であるという理由から、*Hirschmanniella* 属への研究は他の線虫類と比較して下火になっている。

しかしながら、レンコンネモグリは日本のレンコンの生産上非常に大きな脅威となる線虫であり、生産者の高齢化や、労働強度の低減を理由として、今後水掘りの地域が全国的に増加し、レンコンネモグリは被害が茨城県以外の産地でも顕在化する可能性があるため、早急に対処すべき植物寄生性線虫の筆頭であると考えられる。ただし、前述のとおり、ハス田は水系と直接的に影響し合い、特に茨城県の霞ヶ浦は農業生産と環境の交錯する最前線である。ハスと環境との両立には、ハス田からの窒素・リン酸等肥料物質の流出 (黒田ら、2010; 北村ら、2013; Manuel, 2014) や、防鳥ネットへの野鳥の罹網問題 (明日香ら、2011) など様々な面からの課題解決が必要であり、ハス田への線虫剤の施用ももちろん例外ではない。

一方で、レンコンネモグリは被害は主に外観品質の低下という点に絞られ、海外ではほとんど問題とならず、また国内でも水掘りの盛んな関東近郊でのレンコン生産で最も影響が大きく、土掘りの産地では現状それほど

問題となっていない。そのため、過剰な外観品質への付加価値化を抑制し、レンコン市場がレンコンネモグリの被害をある程度許容することで、不要な農薬等のコストをかけずとも生産できることから、生産者および流通段階への意識改革も極めて重要な意味を持つと考えられる。

第6章 摘要

6. 1 はじめに

レンコン *Nelumbo Nucifera* を加害するレンコンネモグリセンチュウ（以下レンコンネモグリ） *Hirschmanniella diversa* は、可食部であるレンコン肥大茎の表皮を加害して商品価値を低下させる。その被害は経済的に非常に大きなインパクトを持ち、被害の大きな圃場では収穫したレンコン肥大茎のほぼ全てが販売不可品となり、耕作意欲の低下や耕作放棄の原因ともなっている。しかしながら、レンコンネモグリによる被害が問題となってきたのが2010年代であり、本線虫の研究に対する歴史は浅く、多くの部分が不明である。

一方、レンコンは茨城県にとって大変重要な農作物であり、その生産面積、収穫量はそれぞれ1,630ha、29,500t（平成29年）である。この数値は、全国のレンコン生産の約50%に相当し、茨城県で東日本のレンコン消費量をほぼ賄っている。レンコンは栽培可能な土地が限られるため価格も安定し、収益率が高く、新規就農者も多い作物である。そのため、レンコンネモグリに対する防除手段は多くの生産者から求められている。

そこで、本研究ではレンコンネモグリの防除対策に資するため、①本線虫のレンコン根部内での発生活長、生活環を調査し、②線虫の防除手段として最も省力的で広く使用されている、農薬による化学的防除を行うための薬剤選抜試験を行い、剤の有効性を調査した。さらに、③茨城県ではレンコンネモグリが大きな問題となっているが、日本の他のレンコン産地ではどのように分布しているか、またその分子生物学的な配列のバリエーションを調査することにより、どのように拡大したのか、また在来種なのか外来種なのかを検証した。

6. 2 レンコンネモグリの発生活長、生活環の調査。

2010年から2012年にかけての3年間、茨城県石岡市の2つのレンコン栽培田で以下の調査を行った。2筆のレンコン田から、レンコンネモグリの寄生部位であるレンコン細根を定期的に採集し、線虫を分離したのち形態学的な同定を行い、根部内の密度、交尾率、口針の長さおよび体長を調査し、発生活長および生活環を予測した。その結果、分離された線虫はレンコンネモグリが主であった。根部内密度は、8月下旬から9月上旬にかけてピークを迎え、その後冬季にかけて徐々に減少した。また、交尾率は4月-5月にかけて0%-100%となり、その後減少した。口針長と体長からステージの予測が可能であると考えられたため、発生活長にステージ予測を組み入れると個体数が急増する8月から9月にかけて2期-3期幼虫の比率が多くなり、その後4期-成虫の割合が増加した。以上から、レンコンネモグリは越冬した成虫が4-5月に交尾・産卵し、8-9月に孵化、11月までに多くの個体が成虫あるいは4期幼虫となり、根部や土壌中で越冬すると予想された。

6. 2 レンコンネモグリに対して有効な薬剤の選抜と圃場での効果

茨城県のレンコン田由来のレンコンネモグリ、四期幼虫および成虫を用いて試験を行った。日本で使用できる殺虫剤37剤を供試してレンコンネモグリに対する殺線虫効果を調査した。さらに制線虫効果を、薬液を含んだ寒天培地にレンコンネモグリを放飼することで調査した。その結果、候補剤としてベンフラカルブのLD50が5.46 μ g/ml (P<0.05)と、最も現実的な施用量で殺線虫効果を発揮した。そこで、ベンフラカルブを候補としてプラスチックコンテナを用いた実圃場に近い環境でのレンコンネモグリ防除試験を行った。2012年にベンフラカルブの100 g/10 aおよび200 g/10 a 植付前全面施用土壌混和による施用試験を行ったところ、無防除と比較して線虫数およびレンコン肥大茎への被害を有意に低下させることができた。また、2014年から4年間にわたり、5%粒剤から剤型を変え湛水田で使用しやすい8%粒剤により120g/10a処理の試験を行ったところ、全ての試験で無処理よりも有意に被害度を低下させることができた。したがって、ベンフラカルブはレンコンネモグリの防除にとって有効な防除手段となりうることを示された。

6. 3 レンコンネモグリの日本における分布とその系統樹

レンコンネモグリによる被害はここ10年ほどで表面化してきたため、日本での発生状況は調査されていない。さらに、その由来についても不明な点が多い。そこで、日本の主たるレンコン産地、すなわち茨城県（小美玉、

石岡、土浦、かすみがうら、稲敷、行方)、千葉県、新潟県、石川県、愛知県、岡山県、広島県(東広島、福山)、山口県、徳島県および佐賀県の10県16ヶ所のレンコンから線虫を分離し、形態学および分子生物学的に同定を行なった。すなわち口針長を測定するとともに、rDNAの18S領域(18Sと略)、28SのD2-D3領域(D2-D3と略)およびミトコンドリアDNAのCOI領域(*mtCOI*)をシーケンスして種同定し、系統樹を作成した。その結果、16ヶ所のレンコンからは全て *Hirschmanniella* 属線虫が分離され、同定した結果は形態学的手法、分子生物学的手法ともに全てレンコンネモグリであった。系統樹を作成しイネネモグリセンチュウと比較したところ、レンコンネモグリの18SおよびD2-D3領域は変異が少なく、*mtCOI*領域が比較的多様性が確保されているため比較に適すると考えられた。*mtCOI*の配列相違から、国内のレンコンネモグリは4つのクレードに分けられ、5つのハプロタイプが認められた。一方、イネネモグリは配列がほぼ同じであり、ハプロタイプが認められなかった。つまり、レンコンネモグリは近縁のイネネモグリと比較して種内変異が大きく、また地域間でハプロタイプが異なることや、全国的にハスに普遍的に存在していることから、近年侵入した外来種ではない可能性が強く示唆された。しかし古来から複数回海外からの侵入の可能性があるため、国外のレンコンネモグリの調査や、ハスの来歴などの情報を収集する必要が考えられた。

これら一連の研究によって得られた知見から、レンコンネモグリの生態、防除法および分布の状況などが一部明らかになった。これらの知見は、今後のレンコンネモグリの基礎研究および防除法に資する礎となると考えられる。今後はレンコンネモグリの産卵数、発育速度などの生態情報、有効性の明らかになったベンフラカルブの農薬登録の取得、石灰窒素とベンフラカルブとの相乗防除効果、海外のレンコンネモグリの発生状況と日本の個体群との系統関係など、残された基本的な課題は数多く存在するため、それらを一つ一つクリアしていくことが望まれる。

謝辞

本研究を行うにあたり多くの方々に貴重なご指導、ご助言、ご協力を賜り、深い感謝の意を表します。まず、本研究にあたって御指導を賜った東京農工大学豊田剛己教授に著者の指導教官としてご懇切な研究指導とご校閲を賜りました。そして、お忙しい時間を割いてアドバイスして下さるなど、常に著者へのご配慮とご激励を賜りました。また、University of Hertfordshire, Professor Roland N. Perry には、論文に関する重要で貴重なアドバイスをいただきました。謹んで感謝の意を表します。

また、本論文をお忙しい中審査していただきました東京農工大学生物システム応用科学府の橋本洋平准教授、鈴木丈詞特任准教授、佐藤令一教授、同じく農学府の本林隆准教授には、深く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、JA 新ひたちの生産者の皆様、JA 水郷つくばの生産者の皆様をはじめとした、茨城県のレンコン生産者の方々には大変お世話になりました。特に見崎彰様には無償で多くのレンコンサンプルを提供して頂きました。石川県職員の植松繁博士、藪 哲男様、新潟県職員の松澤清二郎様、徳島県職員の沢田英司博士、圓藤勝義様、阿部成人博士、佐藤泰三様、米本謙悟博士、愛知県職員の日比野好晃様、山口県職員の常兼久美子様、佐賀県職員の國枝栄二様、千葉県職員の三平東作様、千葉県の金坂昭宏様、茨城県生物工学研究所の堀井学博士、茨城県農業研究所(現茨城県農業総合センター)の杉山恵乃様、茨城県園芸研究所の假屋哲朗様、千葉県(現北海道)井関 崇様には、サンプルの提供や産地の情報など、様々な点でお世話になりました。ありがとうございました。OAT アグリオ(株)の赤坂達也様を中心とした皆様には、薬剤試験に対するアドバイスや薬剤サンプルの提供など、レンコンの農薬登録取得のために前向きなご意見をいただきました。

(国研)中央農研(当時)の、水久保隆之博士(現 丸和バイオケミカル)には、依頼研究員制度を活用してレンコンネモグリの系統解析をテーマとして研修した際に、懇切丁寧に一からご指導賜った上、論文校閲など様々なサポートを頂きました。同じく、中央農研(当時)の関本茂行博士(現 横浜植物防疫所)には、分子生物学的な実験および解析手法について、親切にご指導賜りました。また、中央農研(現中日本農研)の植原健人博士、立石 靖博士、(国研)森林総研の秋庭満輝博士にも様々なサポートを頂きました。大変感謝しております。

また、共同研究者として私とフィールドおよび研究所で共にデータ採取のために額に汗した後藤万紀様、齋藤望奈様、河崎昌義様、久恒和雅様、武藤久仁男様、田崎 孝様、綿引良雄様、柳原正之様、伏木俊雄様や、宮本拓也博士、柏木優様、小田部祐博士、加藤敏亮様を始めとした各地域普及センターのレンコン担当者(当時)の皆様にも大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。茨城県農業総合センター園芸研究所病虫研究室およ

び管理部の皆様には圃場作製や様々なサポート・助言を賜り、ご迷惑などをおかけしたにも関わらず、いつも精力的に活躍していただき感謝致します。

最後に、博士取得に対して躊躇していた私の背中を押す切っ掛けを作って頂いた茨城県園芸研究所(現 日本植物防疫協会専務理事) 富田恭範博士、同じく茨城県園芸研究所の小河原孝司様、未だ人生の目標である実父高木恒平様、私という人間の基礎を作っていただいた祖母の故佐々木ミヨ様には、最後の精神的な柱として支えていただきました。実母、高木康子様にはいつも心身を気遣っていただきました。最後に、博士課程を修了するための経済的、時間的負担にも関わらず快く許可を頂きました家族、高木早苗様、高木 穰様にここに篤く感謝の意を示させていただきます。

引用文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 18: 265–267. DOI: 10.1093/jee/18.2.265a
- 藍澤 亨・水久保隆之・伊藤賢治・中野昭雄 (2002) 徳島県のレンコンから分離されたネモグリセンチュウ (*Hirschmanniella* sp.) の形態と計測値. 応動昆大会講要 46: 32.
- Anonymous (2009) *Hirschmanniella* spp. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 39: 369–375.
- 明日香治彦・池野 進・渡辺朝一 (2011) 茨城県下のハス田における防鳥ネットによる野鳥羅網被害の状況. *J. Field Ornithol.* 27: 113–124.
- Araya, T. Z., Padilla, W. P., Archidona–Yuste, A., Cantalapiedra–Navarrete, C., Liébanas, G., Palomares–Rius, J. E. and Castillo, P. (2016) Root–lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda; Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezi* and *P. panamaensis* topotypes. *Euro. J. Plant Pathol.* 145 (4) : 973–998. DOI: 10.1007/s10658–016–0884–z
- Baermann, G. (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomum* (nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned–Indië* 57: 131–137.
- Bert, W., Leliaert, F., Vierstraete, A. R., Vanfleteren, J. R. and Borgonie, G. (2008) Molecular phylogeny of the *Tylenchina* and evolution of the female gonoduct (Nematoda; Rhabditida). *Mol. Phylogenet. Evol.* 48(2): 728–744. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.04.011
- Bridge, J., Luc, M. and Plowright, R. A. (2005) Nematode parasites of rice. In: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture 2nd Edition*; Luc M., Sikora A. R. and Bridge J.; CABI Publishing: Wallingford, UK: pp 87–130.
- Cobb, B. G., Vanderzee, D., Loescher, W. H. and Kennedy, R. A. (1985) Evidence for plantlet regeneration via somatic embryogenesis in the grasses *Echinochloa muricata* and *E. crus–galli* var. *Oryzicola*. *Plant Sci.* 40: 121–127. DOI: 10.1016/0168–9452(85)90052–4
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T. and Moens, T. (2010) Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free–living marine nematodes. *Plos One* 5(10): e13716. DOI: 10.1371/journal.pone.0013716
- De Ley, P., De Ley, I. T., Morris, K., Abebe, E., Mundo–Ocampo, M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha–Olivares, A., Jay Burr, A. H. and Baldwin, J. G. and Thomas, W. K. (2005) An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci.* 360 (1462): 1945–1958. DOI: 10.1098/rstb.2005.1726
- Deuner, C. C., Kovalesski, M. and Ebone, L. A. (2019) Nematicides: history, mode, and mechanism action. *Plant Sci. Today* 6(2): 92–97. DOI: 10.14719/pst.2019.6.2.468
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340
- Eissa, M. F., Bary, N. A., Yassin, M. Y. and Youssef, M. M. A. (1986) Efficacy of carbofuran field application on the rice root nematode, *Hirschmanniella oryzae* and rice yield in Northern Nile–Delta. *Bull. Fac. Agric. Cairo Univ.* 17: 1075–1084.
- Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles (1996) Fenthion. <http://extoxnet.orst.edu/pips/fenthion.htm> (accessed on 30th November 2019).
- Faske, T. R. and Starr J. L. (2006) Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to abamectin. *J. Nematolo.* 38: 240–244.

- Feng, H., Wei, L., Chen, H. and Zhou, Y. (2016) Morphological and molecular characterization of the rice root nematode, *Hirschmanniella mucronata*, from Jiangsu, China. *Acta Phytopathol. Sinica* 46: 474–484. (in Chinese) DOI: 10.13926/j.cnki.apps.2016.04.006
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A. and Blaxter, M. (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* 11: 839–850. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x
- Germini, G., Reversat, G. and Luc, M. (1985) Effect of *Sesbania rostrata* on *Hirschmanniella oryzae* in flooded Rice. *J. Nematol.* 15(2): 269–271.
- 後藤万紀・高木素紀・鹿島哲郎 (2012) レンコンを加害するレンコンネモグリセンチュウに対する温湯処理の防除効果と温湯処理がレンコン生育に及ぼす影響. *茨病研報*. 51: 25–28.
- 後藤三千代 (1969) 庄内地方におけるイネネモグリセンチュウ *Hirschmanniella imamuri* S. A. Sher の生態学的研究. *山形農林學會報* 26:43–51.
- 後藤三千代 (1970) 庄内地方におけるイネネモグリセンチュウ *Hirschmanniella imamuri* S. A. Sher と *H. oryzae* S. A. Sher の生態学的研究. 両種の令期の区別と卵発生について. *山形農林學會報* 27: 22–28.
- Halbrendt, J. M. and Brown, D. J. F. (1992) Morphometric evidence for three juvenile stages in some species of *Xiphinema americanum* sensu lato. *J. Nematol.* 24: 305–309.
- 羽田司・周宇放・渡辺隼矢・佐藤壮太・張楠 楠・市川康夫 (2018) 大規模レンコン生産地域における販売戦略と農地集積: 土浦市田村地区を事例に. *地域研究年報* 40(4): 121–147.
- Hendro, M. E., Prot, J. C. and Madamba, C. P. (1992) Population dynamics of *Hirschmanniella mucronata* and *H. oryzae* on *Sesbania rostrata*, *Aeschynomene afraspera* and rice cv. IR 58. *Fund. Appli. Nematol.* 15(2): 167–172.
- Hu, M. and Skibsted, L. H. (2002) Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo Nucifera*). *Food Chem.* 76: 327–333. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00280-1
- 茨城県・栃木県・神奈川県(2016) 霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画 (第7期).
<https://www.pref.ibaraki.jp/seikatsukankyo/kantai/kasumigaura/lake/kasumi-plan7.html> (2019.12.28 閲覧)
- IRAC (2019) IRAC Mode of Action Classification Scheme Issued, June 2019 Version 9.3 (2020年1月1日閲覧)
- Iyatomi, K. and Nishizawa, T. (1970) growth response of rice to soil fumigation. *Root Diseases and Soil-borne Pathogens*, 226. University of California press, Berkeley, USA.
- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D. Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Grégoire, J., Anton, J., Miret, J., MacLeod, A., Navajas, N. M., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., Van, B. A., Van der, W. W., West, J., Winter, S., Kaluski, T. and Niere, B. (2018) Pest categorisation of *Hirschmanniella* spp. *EFSA Journal* 16(6): 5297 DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5297
- Jonathan, E. I. and Velayutham, B. (1984) Nursery application of carbofuran for control of rice root nematode. *International Rice Res. Inst. Newsletter* 16(2): 25.
- Kanda, Y. (2013) Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZ R” (Easy R) for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48: 452–458. DOI: 10.1038/bmt.2012.244
- 金坂考澄 (2010) レンコン品種, 金澄20号・34号・36号の育成. *農林水産ジャーナル* 3(2): 16–19.
- Kaneyasu, M., Nagata, M., Ikeda, H., Ohnuki, K. and Shimizu, K. (2019) Anti-allergic activity of lotus root (*Nelumbo Nucifera*) powder in TDI-sensitized nasal allergy model mice. *Food Agricul. Immuno.* 30(1): 968–978. DOI: 10.1080/09540105.2019.1651255
- 環境省 (2010) 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料 カルシウムシアナミド (石灰窒素)・シアナミド https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/s18_cyanamide.pdf. (2020年1月1日閲覧)
- Karakas, M. (2004) Life cycle and mating behavior of *Hirschmanniella oryzae* (Nematoda: Pratylenchidae) on excised *Oryza sativa* roots. *Fen. Bilimleri. Dergisi.* 25: 1–6.
- Karpouzias, D. G., Fotopoulou, A., Menkissoglu-Spiroudi, U. and Singh, B. K. (2005) Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 369–378.
 DOI: 10.1016/j.femsec.2005.01.012.
- 鹿嶋市文化スポーツ振興事業団 (2017) 図説鹿嶋市の歴史 原始・古代編. pp.1-148

- 柏木 優・高木素紀・久恒和雅・鹿島哲郎 (2017) 石灰窒素施用時の量と温度がレンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* の死亡率に及ぼす影響. 茨病研報 56: 30–33.
- Katan, J. (1981) Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. Annu. Rev. Phytopathol. 19: 211–236. DOI: 10.1146/annurev.py.19.090181.001235
- 川原奈苗・番匠尚子・高橋 久 (2014) 河北潟干拓地農業の抱える問題と将来展望 –営農者対象アンケート調査から–. 河北潟総合研究 17: 17–30.
- 川島嘉内 (1992) イネネモグリセンチュウ. 中園和年編, 線虫研究のあゆみ, 日本線虫研究会, 茨城. pp. 159–163.
- Khun, K., Decraemer, W., Couvreur, M., Karssen, G., Steel, H. and Bert, W. (2015) Deceptive morphological variation in *Hirschmanniella mucronata* (Nematoda: Pratylenchidae) and a polytomous key to the genus. Nematology 17: 377–400. DOI: 10.1163/15685411-00002867
- 北村立実・吉尾卓宏・山本麻美子・塚本 威・黒田久雄 (2013) 河川から灌漑する霞ヶ浦湖岸ハス団地帯からの流出負荷特性. 農業農村工学会論文集 286: 471–477. DOI: 10.11408/jsidre.81.293
- Kothari, S. L., Kumar, S., Vishnoi, R. K., Kothari, A. and Watanabe, K. N. (2005) Applications of biotechnology for improvement of millet crops: Review of progress and future prospects. Plant Biotechnol. 22: 81–88. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.22.81
- 厚生労働省 (2020) 残留基準値 ベンフラカルブ (案) <https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000598806.pdf>. (2020年3月1日閲覧)
- Koyama, Y., Thar, S. P., Kizaki, C., Toyota, K., Sawada, E. and Abe, N. (2013) Development of specific primers to *Hirschmanniella* spp. causing damage to lotus and their economic threshold level in Tokushima prefecture in Japan. Nematology 15: 851–858. DOI: 10.1163/15685411-00002723
- 小柳 徹・今井 修・吉田潔充 (1998) 殺線虫剤ホスチアゼートの開発. J. Pesticide Sci. 23(2). DOI:10.1584/jpestics.23.174
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018) Mol. Biol. Evol. 35:1547–1549
- 蔵下はづき・平片悠河・高木素紀・幡本将史・牧 慎也・山口隆司・青井 透・黒田恭平 (2018) 連作障害の生じたレンコン栽培土壌の分子生物学的解析および有用微生物優占化土壌改良資材の施肥効果の評価. 土木学会論文集 G (環境) (環境工学研究論文集第 55 巻), 74(7): 255–264. DOI: 10.2208/jscejer.74.III_255
- Kurashita, H., Kuroda, K., Maki, S., Sato, T., Takagi, M., Goto, M., Kariya, T., Hatamoto, M., Yamaguchi, Takashi., Tomita, S. and Narihiro, T. (2021a) Chemical and Microbial Characteristics of Blackening Disease in Lotus (*Nelumbo Nucifera* Gaertn.) Caused by *Hirschmanniella diversa* Sher. Agronomy: 11(12). DOI:10.3390/agronomy11122517
- Kurashita, H., Kuroda, K., Narihiro, T., Takagi, M., Goto, M., Ikeda, S., Hirakata, Y., Hatamoto, M., Maki, S., Yamaguchi, T. and Aoi, T. (2021b) Accurate evaluation of blackening disease in lotus (*Nelumbo Nucifera* Gaertn.) using a quantitative PCR-based assay for *Hirschmanniella diversa* Sher and *H. imamuri* Sher. Crop Prot. 139. DOI:10.1016/j.cropro.2020.105380
- 黒田 久・加藤 亮・中曾根 英 (2010) ハス田群からの流出負荷量調査について. 農業農村工学会論文集 78(1): 47–53. DOI: 10.11408/jsidre.78.47
- Kuroda, K., Kurashita, H., Takagi, M., Narihiro, T., Hatamoto, M. and Yamaguchi, T. (2021) Phylogenetic analyses of the lotus root parasitic nematodes *Hirschmanniella diversa* and *H. imamuri* based on the 18S ribosomal RNA (rRNA) gene and 5.8S rRNA gene/internal transcribed spacer region. Nematol. Res. 51(1): 5–9. DOI: 10.3725/jjn.51.5
- 桑原雅彦・弥富喜三 (1970) イネネモグリセンチュウの生態, とくに生活史と発生消長について. 応動昆 14:117–121. DOI: 10.1303/jjaez.14.117
- Lahan, K. K., Sinha, A. K. and Das, P. (1999) Evaluation of chemicals as bare root-dip against rice root nematode, *Hirschmanniella oryzae*. Indian J. Nematol. 29: 8–12.
- Liu, C., Li, W., Xie, K. and Li, B. (2000) Studies on *Hirschmanniella diversa* morphology identification and hibernacle observation parasitic on *Nelumbo Nucifera* Gaertn. J. Nanchang Univ. (Nat. Sci.) 24: 290–294 (in Chinese).
- Liu, X., Wang, H., Lin, B., Tao, Y., Zhuo, K. and Liao, J. (2017) Loop-mediated isothermal amplification based on the mitochondrial COI region to detect *Pratylenchus zae*. Euro. J. Plant Pathol. 148: 435–446. DOI:

10.1007/s10658-016-1102-8

- Majd Taheri, Z., Tanha Maafi, Z., Subbotin, S. A., Pourjam, E. and Eskandari, A. (2013) Molecular and phylogenetic studies on Pratylenchidae from Iran with additional data on *Pratylenchus delattrei*, *Pratylenchoides alkani* and two unknown species of *Hirschmanniella* and *Pratylenchus*. *Nematology* 15(6): 633–651. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685411-00002707>
- Mamiya, Y. (1971) Effect of temperature on the life cycle of *Pratylenchus penetrans* on *Cryptomeria* seedlings and observations on its reproduction. *Nematologica* 17: 82–89.
- Manuel, J. (2014) Nutrient pollution: a persistent threat to waterways. *Environ. Health Perspect.* 122(11): A304–309. DOI: 10.1289/ehp.122-A304
- McBeth, C.W., Taylor, A. L. and Smith, A. L. (1941) Note on staining nematodes in root tissues. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 8: 26.
- 三平東作 (2002) イマムラネモグリセンチュウの寄生によるレンコン黒皮線虫病 (新称) の発生. 千葉農総研セ研報. 1: 121–124.
- 三平東作・永井充明 (1996) レンコン黒皮症の発生とイマムラネモグリセンチュウの寄生性. 関東病虫研報 43: 261–263. DOI:10.11337/ktpps1954.1996.261
- 南川勝次・西沢正洋・斎藤久男 (1959) 食用蓮に関する研究 (第2報) 蓮根腐敗病の防除について. 園芸雑 28(4): 241–256. DOI:10.2503/jjshs.28.241
- 南川勝次・斎藤久男 (1962) 食用蓮に関する研究 第4報 生育過程について. 九州農業研究 24: 34–36.
- 水久保隆之 (2002) 植物防疫基礎講座: 線虫の見分け方 (3) ネグサレセンチュウおよびネモグリセンチュウ. 植物防疫 56: 531–536.
- 水久保隆之・二井一禎 編 (2014) 線虫学実験. 京都大学出版, 京都. pp. 346.
- 牧山正男 (2010) レンコン主要産地における収穫方法とその変遷. 農業農村工学会 2010 年度講要 546–547.
- 元木 靖 (1981) 蓮根栽培地域考-霞ヶ浦湖岸定理の事例に即して-. 埼玉大学紀要社会科学篇 29: 15–37.
- Murray, R. L., Kozłowska, J. L. and Cutter, A. D. (2011) Heritable determinants of male fertilization success in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Evol. Biol.* 11: 99. DOI: 10.1186/1471-2148-11-99
- 内閣府食品安全委員会 (2019) (案)農薬評価書 ベンフラカルブ http://www.fsc.go.jp/iken-bosyu/pc3_no_benfuracarb_011225.data/pc3_no_benfuracarb_011225.pdf. (2020 年 1 月 25 日閲覧)
- 日本石灰窒素工業会 (2008) 石灰窒素の動力散布で「黒皮症」「柚肌症」を防除. 石灰窒素だより, 143.
- 日本植物防疫協会 (2016) 農薬ハンドブック 2016 年版. 日本植物防疫協会, 東京, pp. 230–231.
- Nishibori, N., Sagara, T., Hiroi, T., Kishibuchi, R., Sawaguchi, M., Itoh, M., Morita, K. and Her, S. (2012) Inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) by aqueous extracts prepared from edible and non-edible parts of lotus root. *Phytopharmacology* 3: 309–318.
- 西門義一・渡辺清志 (1952) 蓮根腐敗病について. 日植病報 16 (3–4): 158. (講要) DOI: 10.3186/jjphytopath.16.154
- 農研機構 (2017) 日本土壌インベントリ. <https://soil-inventory.dc.affrc.go.jp/> (2019 年 12 月 6 日閲覧).
- 農林水産省 (2020) 第 95 次農林水産省統計表 <https://www.maff.go.jp/j/tokei/kikaku/nenji/95nenji/index.html>. (2023 年 10 月 3 日閲覧)
- 農商務省 (1891) 大日本農史 蓮根 2, 大日本農史・今世, pp. 211–212.
- Nunn, G. B. (1992) Nematode molecular evolution. Ph.D dissertation, University of Nottingham, UK.
- 大城篤・田部井大介・河野伸二 (2013) タイモ立枯細菌病の発生要因. 植物防疫 67(11): 637–641.
- Otronen, M., Reguera, P. and Ward, P. I. (1997) Sperm storage in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*: Identifying the sperm of competing males in separate female spermathecae. *Ethology* 103: 844–854. DOI: 10.1111/j.1439-0310.1997.tb00125.x
- Pantelidis, I., Karpouzias, G. D., Menkissoglu-Spiroudi, U. and Tsiropoulos, N. (2006) Influence of Soil Physicochemical and Biological Properties on the Degradation and Adsorption of the Nematicide Fosthiazate. *J. Agri. Food Chem.* 54(18): 6783–6789. DOI:10.1021/jf061098p.
- Prasad, J. S. and Rao, Y. S. (1984) The status of root nematodes (*Hirschmanniella* sp.) as pests of rice (*Oryza sativa*). *Beitrag trop. Landwirtschaft. Veterinarmed.* 22(3): 281–284

- Prot, J. C., Soriano, I. R. S., Matias, D. M. and Savary, S. (1992) Use of green manure crops in control of *Hirschmanniella mucronate* and *H. oryzae* in irrigated rice. *J. Nematol.* 24(1): 127–132.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. (2019年12月6日閲覧)
- Ramakrishnan, S., Varadharajan, G. and Sutharsan, P.D. (1984) TKM9 is resistant to rice-root nematode. *Int. Rice Res. Newsl.* 9: 20.
- Randhawa, N., Singh I., Sakhuja, P. K. and Malhi, S. S. (1992) Effect of date of transeplanting of casmiati rice cultivars and spacing in the population buildup of rice-root nematode *Hirschmanniella oryzae*. *Indian J. Nematol.* 22(1): 4–8.
- Ryss, A. Y. and Karnkowski, W. (2010) *Hirschmanniella caudacrena* Sher, 1968 intercepted in aquarium plants imported to Poland. *EPPO Bulletin* 40: 204–210.
- 笹倉寛之・森郁 恵 (2013) 線虫 *C. elegans* におけるモノアミンによる神経制御. *生体の科学* 64(4): 354–359. DOI: 10.11477/mf.2425101470.
- 佐藤テイ・湖山利篤・腰原達雄 (1970) イネネモグリセンチュウの寄生と水稻の栽培条件との関係. *東北農研報* 39: 207–219.
- 沢田英司 (2010) 新特産シリーズ レンコン: 栽培から加工・販売まで. 農文協. 東京 pp 1–171.
- 沢田英司・阿部成人 (2017) 徳島県のレンコン栽培における病害虫の発生状況と対策. *植物防疫* 71(12): 755–759.
- Sekimoto, S., Uehara, T. and Mizukubo, T. (2017) Characterisation of populations of *Heterodera trifolii* Goffart, 1932 (Nematoda: Heteroderidae) in Japan and their phylogenetic relationships with closely related species. *Nematology* 19(5): 1–16. DOI: 10.1163/15685411-00003067
- Sher, S. A. (1968) Revision of the genus *Hirschmanniella* Luc & Goodey, (1963) (Nematoda: Tylenchoidea). *Nematologica* 14: 243–275. DOI: 10.1163/187529268X00471
- 篠原啓子・圓藤勝義・沢田英司・永峰賢一・水口博之・福井裕行 (2016) 食用ハス (*Nelumbo Nucifera*) における肥大根茎 (レンコン) の形状の品種・系統間差 徳島農技セ研報 3: 7–13.
- Shirley, A. M., Noe, J. P., Nyczepir, A. P., Brannen, P. M., Shirley, B. J. and Jagdale, G. B. (2019) Effect of spirotetramat and fluensulfone on population densities of *Mesocriconema xenoplax* and *Meloidogyne incognita* on peach. *J. Nematol.* 51: 1–10. DOI: 10.21307/jofnem-2019-012
- Soma, K., Kitamura, T., Ouchi, T., Nemezawa, T. and Kashimura, H. (2016) Proceeding 15th world lake conference. Efforts to improve water quality in Lake Kasumigaura by the Ibaraki Prefectural government. https://www.pref.ibaraki.jp/soshiki/seikatsukankyo/kasumigauraesc/04_kenkyu/kaigi/documents/kosyou/16/2016wlc_soma.pdf. (2020年1月4日閲覧)
- 高木素紀・後藤万紀・斎藤望奈・田村克明・村田和昭・川島誠蔵・宮本拓也・鹿島哲郎 (2013) レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* に対する温湯処理法の検討第2報 試作機を用いた防除効果とレンコン 生育への影響. *茨病虫研報* 52: 51–56
- Takagi, M., Goto, M., Wari, D., Kashima, T. and Toyota, K. (2019) Seasonal occurrence and life cycle of lotus root nematode *Hirschmanniella diversa* (Tylenchida: Pratylenchidae) in lotus roots in paddy fields. *Appl. Entomol. Zool.* 54(4): 465–471. DOI:10.1007/s13355-019-00644-
- Takagi, M., Goto, M., Wari, D., Saito, M., Perry, R., & Toyota, K. (2020) Screening of Nematicides against the Lotus Root Nematode, *Hirschmanniella diversa* Sher (Tylenchida: Pratylenchidae) and the Efficacy of a Selected Nematicide under Lotus Micro-Field Conditions. *Agronomy* 10 (3). DOI: 10.3390/agronomy10030373.
- 高木素紀・久恒和雅・河崎昌義・後藤万紀・斎藤望奈・鹿島哲郎 (2014) レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* に対する温湯処理法の検討 第3報 温湯処理が可能な時期の検討. *茨病研報* 53: 31–35.
- 高木素紀・後藤万紀・久恒和雅・鹿島哲郎 (2016) 茨城県のハス田内部および周縁部における雑草や野良生えハス *Nelumbo Nucifera* へのレンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* の寄生と増殖の可能性について. *関東病虫研報* 63: 98–101.
- 高木素紀・宮本拓也・鹿島哲郎・後藤万紀・久恒和雅・柏木 優・豊田剛己 (2017) 茨城県のレンコン生産におけるレンコンネモグリセンチュウ防除対策の取り組み. *植物防疫* 71(12): 760–766.

- 高木素紀・小河原孝司・豊田剛己 (2020) グランドオンコル粒剤を組み込んだ新たなレンコンネモグリセンチュウの総合防除法. 植物防疫 74(12): 700–704.
- Takagi, M., Sekimoto, S., Mizukubo, T., Wari, D., Akiba, M., Perry, R. N. and Toyota, K. (2023) Geographical distribution and phylogenetic relationships of *Hirschmanniella diversa* Sher (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan. *Nematology* 25(1): 45–58. DOI: 10.1163/15685411-bja10202
- 高倉重義・山本忠志 (1970) イネネモグリセンチュウに関する研究 第1報 北海道における発生消長. 北日本病虫研報 21: 27–31.
- Tandingan De Ley, I., Mundo-Ocampo, M., Yoder, M. and De Ley, P. (2007) Nematodes from vernal pools in the Santa Rosa Plateau Ecological Reserve, California I. *Hirschmanniella santarosae* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae), a cryptic sibling species of *H. pomponiensis* Abdel-Rahman & Maggenti, 1987. *Nematology* 9(3): 405–429. DOI: <https://doi.org/10.1163/156854107781352052>
- Tanaka, R., Kikuchi, T., Aikawa, T. and Kanzaki, N. (2012) Simple and quick methods for nematode DNA preparation. *Appl. Entomol. Zool.* 47: 291–294. DOI: 10.1007/s13355-012-0115-9
- 立山千草 (2020) ハスの来歴と部位別の特性 新潟県生活文化研究会: 9–12.
- Tsuruta, Y., Nagao, K., Shirouchi, B., Nomura, S., Tsuge, K., Koganemaru, K. and, Yanagita, T. (2012) Effects of lotus root (the edible rhizome of *Nelumbo Nucifera*) on the development of non-alcoholic fatty liver disease in obese diabetic db/db mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 462–466. DOI: 10.1271/bbb.110745
- Tomizawa, M. and Casida, J. E. (2004) NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (1): 247–268. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930
- Tungmunthum, D., Pinthong, D. and Hano, C. (2018) Flavonoids from *Nelumbo Nucifera* Gaertn., a Medicinal Plant: Uses in Traditional Medicine, Phytochemistry and Pharmacological Activities. *Medicines (Basel)*. 5(127): 1–13. DOI:10.3390/medicines5040127
- 植松 繁・藪 哲男・八尾充陸・古賀博則 (2015) レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* の雑草への寄生状況. 北陸病虫研報 64: 15–18.
- 植松 繁・藪 哲男・八尾充陸・栗原孝・古賀博 (2016) レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* の侵入した レンコン細根の光顕及び走査電顕観察. 日線虫誌 46(2): 79–82. DOI: 10.3725/jjn.46.79
- Uematsu, S., Yabu, T., Yao, M., Kurihara, T. and Koga, H. (2020) Ultrastructure of *Hirschmanniella diversa* early-stage infection in browning rhizomes of Indian lotus. *J Nematol.* 52: 1–9. DOI:10.21307/jofnem-2020-055
- Van den Berg, E., Subbotin, S. A., Handoo, Z. A. and Tiedt, L. R. (2009) *Hirschmanniella kwazuna* sp. n. from South Africa with notes on a new record of *H. spinicaudata* (Schuurmans Stekhoven, 1944) Luc & Goodey, 1964 (Nematoda: Pratylenchidae) and on the molecular phylogeny of *Hirschmanniella* Luc & Goodey, 1964. *Nematology* 11(4): 523–540. DOI: <https://doi.org/10.1163/138855409X12465362560430>
- Vang, E. L., Opperman, H. C., Schwarz, R. M. and Davis, L. E. (2016) Spirotetramat causes an arrest of nematode juvenile development. *Nematology* 18, 121–131. DOI:10.1163/15685411-00002948
- Vigliierchio, R. D. and Brown, M. S. (1989) In vitro testing for nonfumigant-nematicide resistance in *Heterodera schachtii*. *Revue Nématol.* 12(2): 139–143.
- Vovlas, N., Vovlas, A., Leonetti, P., Liébanas, G., Castillo, P., Subbotin, A. S. and Palomares, E. R. J. (2015) Parasitism effects on white clover by root-knot and cyst nematodes and molecular separation of *Heterodera daverti* from *H. trifolii*. *Eur. J. Plant Pathol.* 143 (4) , 833–845. DOI:10.1007/s10658-015-0735-3
- Wakugawa, T., Nagamine, K., Hiramatsu, M., Takeda, M., Kawata, C., Kashiwada, Y., Shinohara, K., Sawada, Eiji, Yabumoto, Masami., Fujino, Hiromichi., Kitamura, Yoshiaki., Fukui, H., Takeda, N. and Mizuguchi, H. (2020) Identification and characterisation of the anti-allergic compound from lotus root. *Tradit. Kampo Med.* 7(2): 85–95. DOI:10.1002/tkm2.1249
- Walia, R. K. and Bhatti, S. D. (1985) Effect of carbofuran on paddy infected with rice root nematode, *Hirschmanniella oryzae*. *Haryana Agric. Univ. J. Res.* 3: 350–352.
- 渡辺達三 (1994) ハス観照の歴史的変遷について. 造園雑 57(5): 19–24.
- Win, P. P., Kyi, P. P., Maung, Z. T. Z. and De Waele, D. (2013) Population dynamics of *Meloidogyne graminicola* and *Hirschmanniella oryzae* in a double rice-cropping sequence in the lowlands of Myanmar. *Nematology* 15(7): 795–807.

DOI:10.1163/15685411-00002719

Yamashita, T. T. and Viglierchio, R. D. (1987) Field resistance to nonfumigant nematicides in *Xiphinema index* and *Meloidogyne incognita*. *Revue Nématol.* 10(3), 327–332.

米本謙悟・佐藤泰三・豊田剛己・兒山裕貴・東條元昭・Lorien E. R.・高瀬元希・沢田英司 (2013) *Pythium helicoides* によるハス(レンコン)腐敗病の発生(病原追加). *日植病報* 79(3): 183. (講要) DOI: 10.3186/jjphytopath.79.159

Zhang, S. S. and Ai, H. M. (1994) Effect of different chemical control times on the control effectiveness of rice root nematode (*Hirschmanniella* spp.). *J. Fujian Agri. Univ.* 23(4): 426–428. DOI: 10.1371/journal.pone.0013716

Investigation of Ecology and Chemical Control Method of Lotus Root Nematode *Hirschmanniella diversa* Sher (Rhabditida: Pratylenchidae) to Damaging Indian Lotus *Nelumbo Nucifera* Gaertn.

Motonori TAKAGI¹

Summary

The lotus root nematode *Hirschmanniella diversa* causes damage to lotus *Nelumbo nucifera* tubers and thereby decreases the latter's economic value. The impact of damage by *H. diversa* can be so high that farmers are forced to halt lotus cultivation in heavily infested fields. Few studies have elucidated the life cycle of *H. diversa*, which is essential to optimizing control methods.

This thesis consists of three themes: 1. Seasonal occurrence of *H. diversa* and its life cycle in the lotus root, mainly the part parasitized by *H. diversa*; 2. Sensitivity of pesticides and determination of control potential of the benfuracarb selected as an effective nematicide in lotus micro-field conditions; 3. Geographical distribution of *H. diversa* in different lotus cultivated regions in Japan and their phylogenetic relationship.

1. *H. diversa* were collected from lotus roots between 2010 and 2012 in Ibaraki Prefecture. Periodical observation of individuals and their spermatids showed that overwintered adult *H. diversa* mated between April and May, and second-stage juveniles emerged at the beginning of August and continued developing thereafter. The results suggest that *H. diversa* females may lay eggs around June and fourth-stage juveniles or adults overwinter in the lotus roots, weed roots, or soil.

2. Fourth-stage juveniles and adults of *H. diversa* sampled from a lotus paddy field in Ibaraki Prefecture were tested for in-vitro nematicidal and nematostatic effect against different pesticides. Benfuracarb was effective against *H. diversa* at the registered dosages and implemented in micro-field tests for 5 years. As a result, benfuracarb consistently decreased the damage levels of lotus tubers every year. Benfuracarb is thus a useful nematicide to control *H. diversa* in lotus production.

3. The geographical distribution in Japan and source of *H. diversa* has not been investigated. Therefore *H. diversa* were isolated from the lotus roots collected from the main lotus tuber cultivation areas in Japan and sequenced in the D2–D3 region of rRNA and COI region of mitochondrion DNA (*mtCOI*). Nematodes belonging to the *Hirschmanniella* genus were isolated from all collected areas and 97% were *H. diversa*. Intraspecific differences were higher than those in closely related species (*H. imamurai* and *H. oryzae*) and different variations were observed in *H. diversa* from each area, suggesting that *H. diversa* widely distributed in Japan has evolved locally. The results indicated that *H. diversa* did not qualify as an invasive species..

Keyword : Renkon–Kurokawa–Sentyu–Byou, seasonal occurrence, chemical control, phylogenetic analysis, native species.

¹ Address : Horticultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3165–1 Ago, Kasama, Ibaraki 319–0292, Japan