

BULLETIN
OF THE
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER
No. 7
March 2025

茨城県農業総合センター研究報告

第7号

2025年3月

目 次

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

ダイズの裂皮程度の品種間差解明と QTL 解析

大越三登志・松井 匠・岩橋雅夫・岡本和之・岡野克紀・・・48

食用ハス育種のための形状評価指標と小型容器栽培での活用

永山誓史・柏木 優・平松優季・大寺宇織・葛谷真輝・石川友子・・・57

ニホンナシ‘幸水’における 1 本主枝列植仕立てと側部根域制限の効果

石川佳歩・山口貴史・加川敬祐・田中舘志都・寺門 巖・・・64

生分解性プラスチックマルチと生分解性プラスチック分解酵素「PaE」溶液の散布時期の違いが
施設夏秋トマト栽培後の資材片付け作業時間に及ぼす影響

富田和美・北本宏子・植田浩一・山下結香・竹内明彦・古矢桃子・藤田 裕・・・72

茨城県農業総合センター

茨城県笠間市安居3165-1

ハス *Nelumbo Nucifera* 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 Damaging 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成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、日本に遍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う。”（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104,400 t 収穫されていたレンコンは年々減少し、2015年には56,700 t 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（Tungmunthum 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											
	Greenhouse											

a) This table doesn't describe open field cultivation for two years called "2nenn-bori". Because not so different transplanting 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 diversa*（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. diversa* 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ュウを含む *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ュウ *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柵圃場試験を行い、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ュ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ュウは、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、本章では茨城県のア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）のアス栽培圃場 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。栽培作物はアスが主体であるが、霞ヶ浦から離れた比較的標高の高い乾田では水稲が栽培される。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、これを原因とするア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

アス細根の採集は、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アスの根を節ごと 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℃ 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℃ 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℃ 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℃2 分サイクル前の熱変性を行ったのち、94℃30 秒の熱変性、50℃30 秒のアニーリング、72℃1 分の伸長反応を 35 回繰り返し、最終伸長反応は 72℃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。

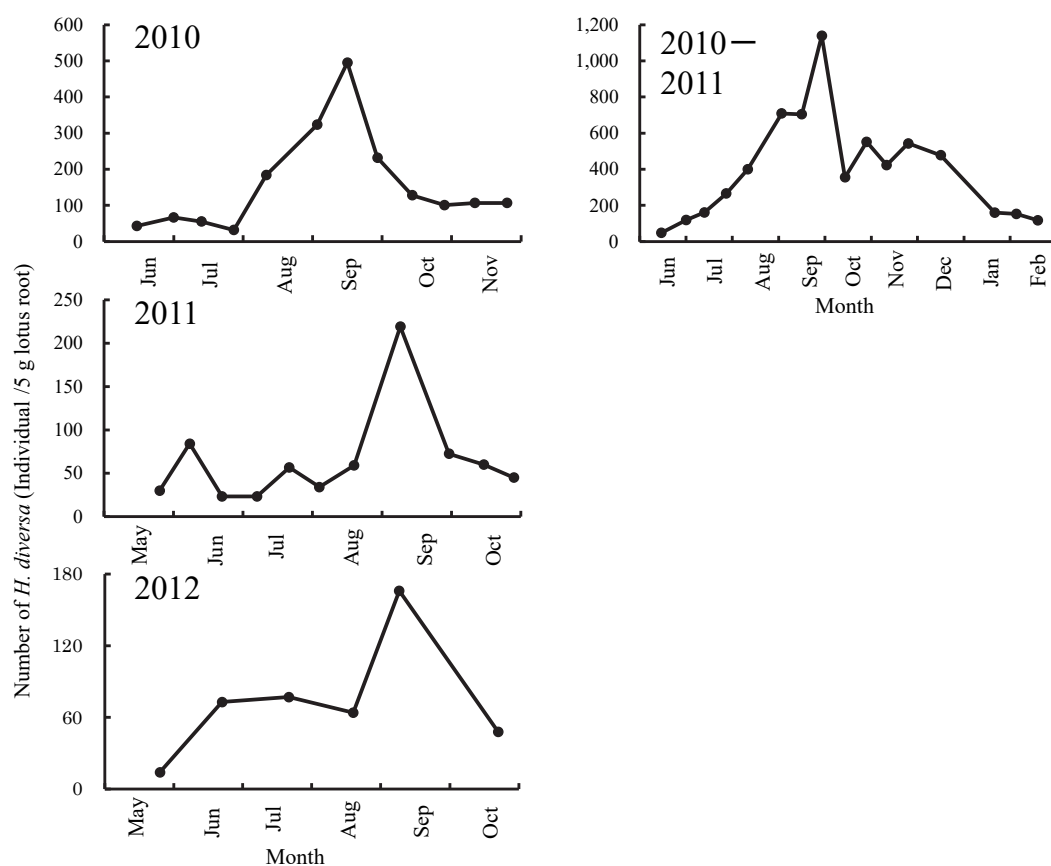


Fig. 2-1. Seasonal occurrence of *Hirschmanniella diversa* in lotus roots between 2010 and 2012 lotus cultivation seasons in field A and field B in Ibaraki Prefecture.

2. 3 結果

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

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ンネモグリの体長 (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、レンコンネモグリセンチュウとして登録されている Accession No. JX144359 と同配列が 100% 一致した。JX144359 は、2012 年にレンコン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ン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ンネモグリ個体数は、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 山形の発消長を示した (Fig. 2-1)。10 月から翌年 1 月までの期間、分離されるレンコン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。

レンコンネモグリは、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ンネモグリのステージが識別できると考えられた。

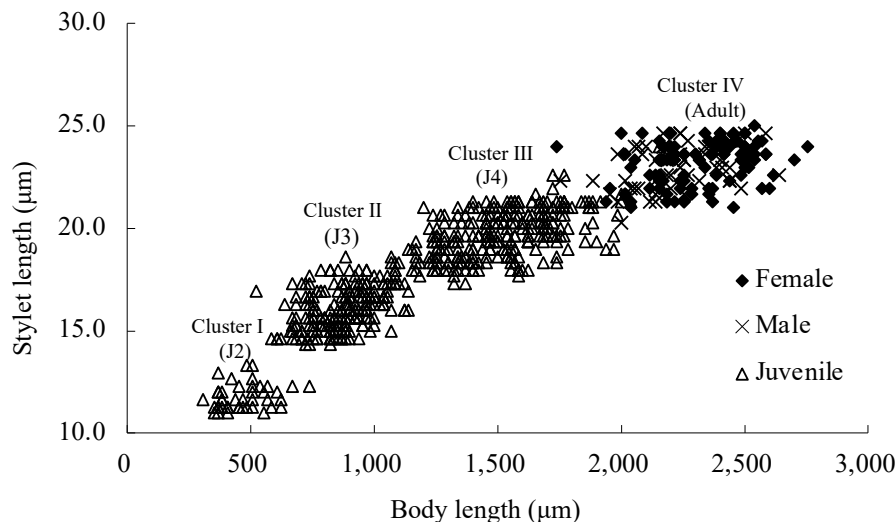


Fig. 2-2. Relationship between stylet length and body length for a population of *Hirschmanniella diversa* individuals isolated from lotus roots in 2010 survey (n=692) from field A and B.

2. 3. 2 レンコンネモグリの既交尾雌割合推移

レンコン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、レンコンネモグリは 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。

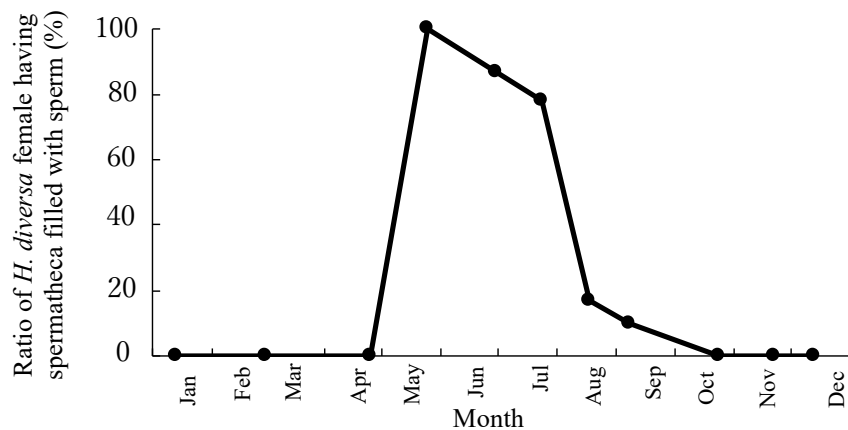


Fig. 2-3. Periodical change in the ratio of *Hirschmanniella diversa* females having spermatheca filled with sperms in 2012 study from field A and B. n=30

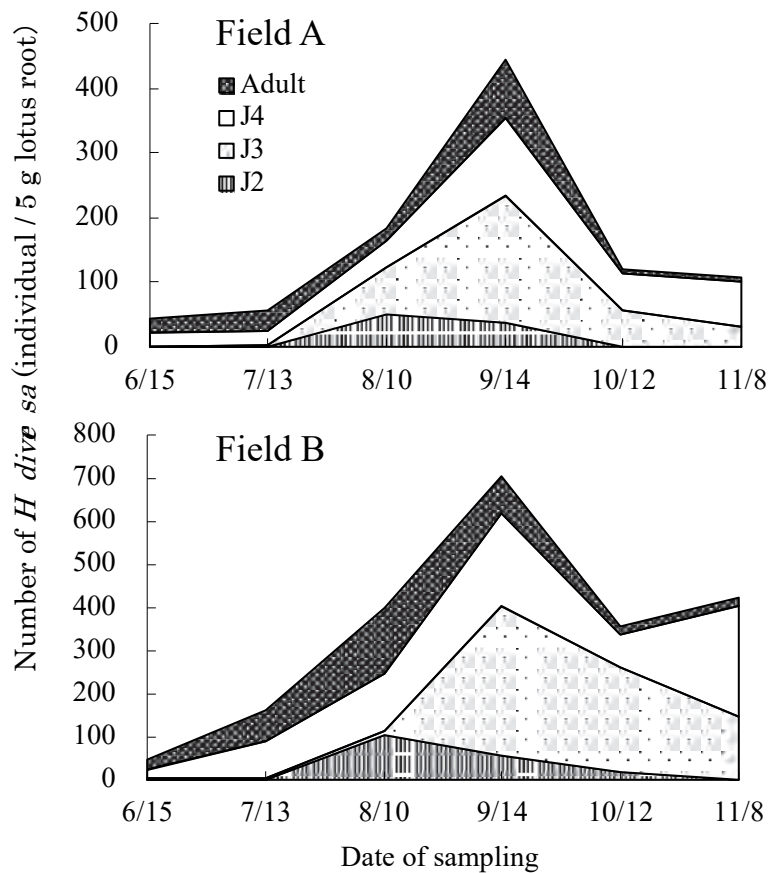


Fig. 2-4. Age structure of *Hirschmanniella diversa* individuals in lotus roots, estimated by the body and stylet lengths from fields A and B in 2010 study.

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月以降ほぼ認められず、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消長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ム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、発消長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、イマムラネモグリは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）。イマムラネモグリは、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、イマム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ム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ム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、ベ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ム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

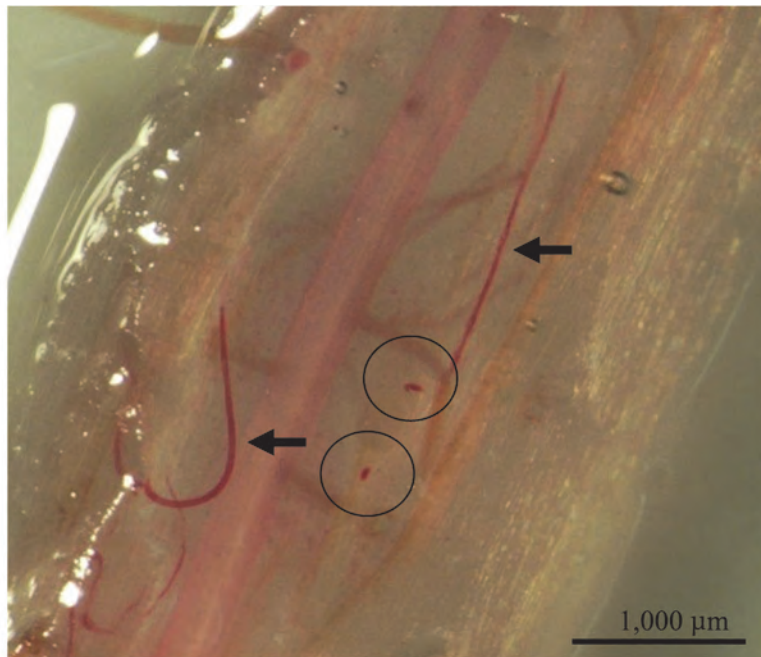


Fig 2-5. Staining of nematodes in lotus roots using the hypochlorite-acid-fuchsin method. Circles and arrows indicate eggs and vermiform nematodes of *Hirshmanniella diversa*, respectively. Scale bar represents 1,000 μm .

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つために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
		Isoxathion	MGF	3.0	1.8-2.7 kg	Hemiptera
Phenylpyrazoles	2B	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
		Acetamiprid	G	2.0	0.6-1.2 kg	Hemiptera
Avermectins and milbemycins	6	Abamectin	EC	1.8	1.5-6.06 L	Hemiptera
		Emamectin benzoate	EC	1.0	1.5-3.06 L	Lepidoptera
		Milbemectin	EC	1.0	1.5-3.06 L	Acariformes
Miscellaneous non-specific (Multisite) Inhibitor	8	Metam sodium	L	33.0	132.0-198.0 L	Nematode
		DD	EC	97.0	145.5-388.0 L	Nematode
		DCIP	G	30.0	90.0 kg	Nematode
Nereistoxin	14	Cartap hydrochloride	WP	75.0	0.8-4.5 kg	Nematode
		Tiocyclam	WP	50.0	0.8-1.5 kg	Hemiptera
Tetronic and tetramic acid derivative	23	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、加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℃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、蒸留水处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℃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。

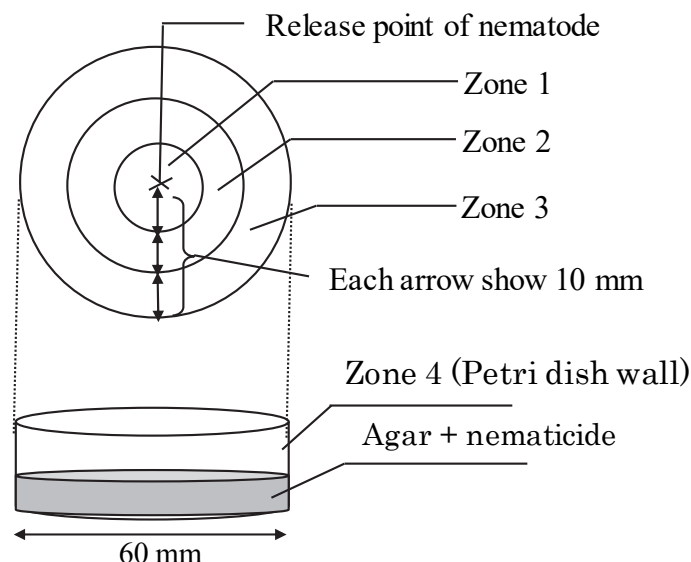


Fig. 3-1 The schema and separation of zone in the nemastatic effect experiment.
Upper is top view and lower is side view of 60 mm petri dish.

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 30 kg/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壌土（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℃48 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。

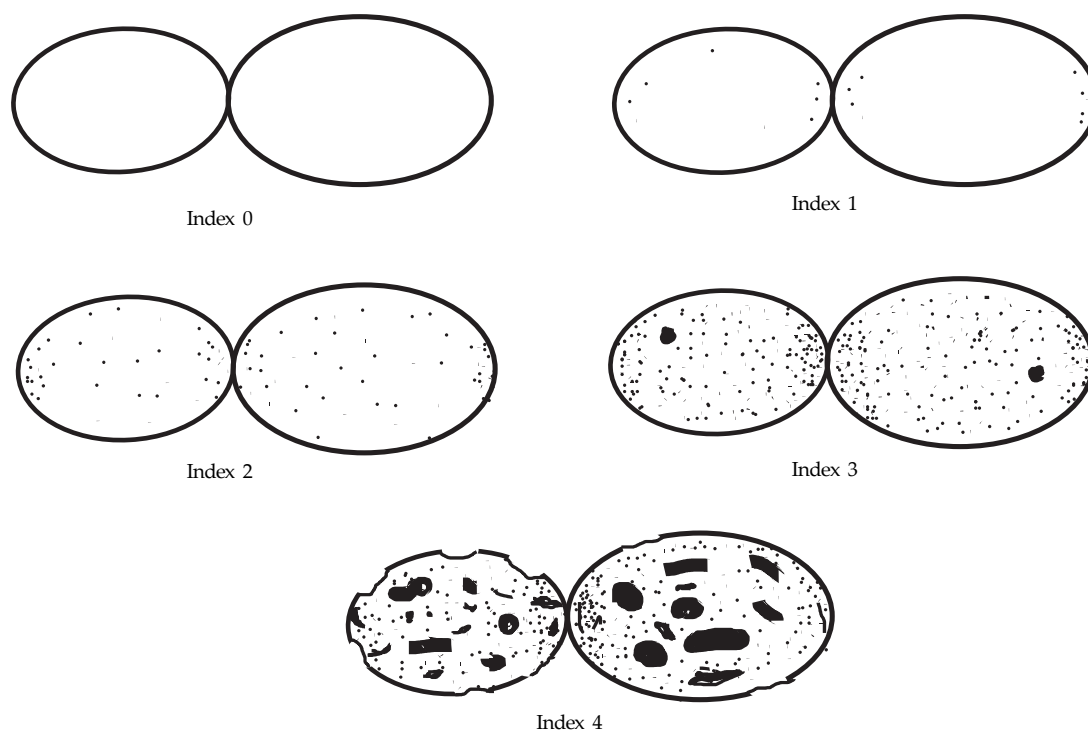


Fig. 3-2 Diagram of lotus tuber damage index 0-4. 0: Not damaged, 1: Slightly damaged, little small black spots by *H. diversa* (less than 3 mm in diameter) on the tuber surface. No effect on the commercial value, 2: Many small black spots. Decreased commercial value, 3: Many small and big black spots (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）、ネライストキシン系ではカルタップ（成分量 50–1500 µg/ml）およびチオシクロラム（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
		1	0
	Carbaryl	100	88
		1	0
	Methomyl	100	77
		10	0
	Carbosulfan	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
		1	0
	Fosthiazate	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 (µg/ml)	Corrected Mortality (%) ^{b)c)}	
Miscellaneous non-specific (Multisite) Inhibitor	Metam sodium	108	3	
	DD	72	2	
		48	0	
		24	0	
		38.8	2	
		77.6	11	
		10	4	
	DCIP	10	4	
	Nereistoxin	Cartap hydrochloride	1,500	100
		Tiocyclam	750	100
250			100	
50			81	
25			67	
8			8	
500			100	
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<0.05Tukey 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ンネモグリのうち、オキサミルとカズサホスはどの濃度でも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、レンコン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 隔離柵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 ; $P < 0.05$)。

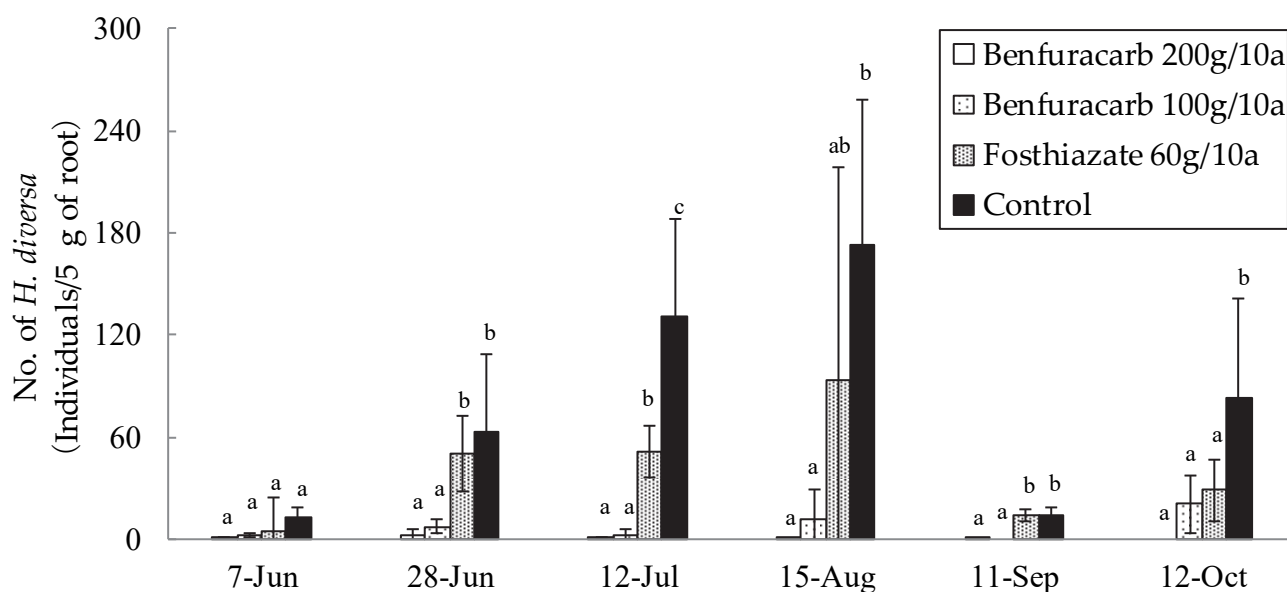


Figure 3-3. Population dynamics of *Hirschmanniella diversa* in the lotus root after treatment with different nematicides in the 2012 micro-field experiment. Bars indicate standard deviation (n = 3). Different letters in the same days indicate significant difference (Tukey HSD test; $p < 0.05$).

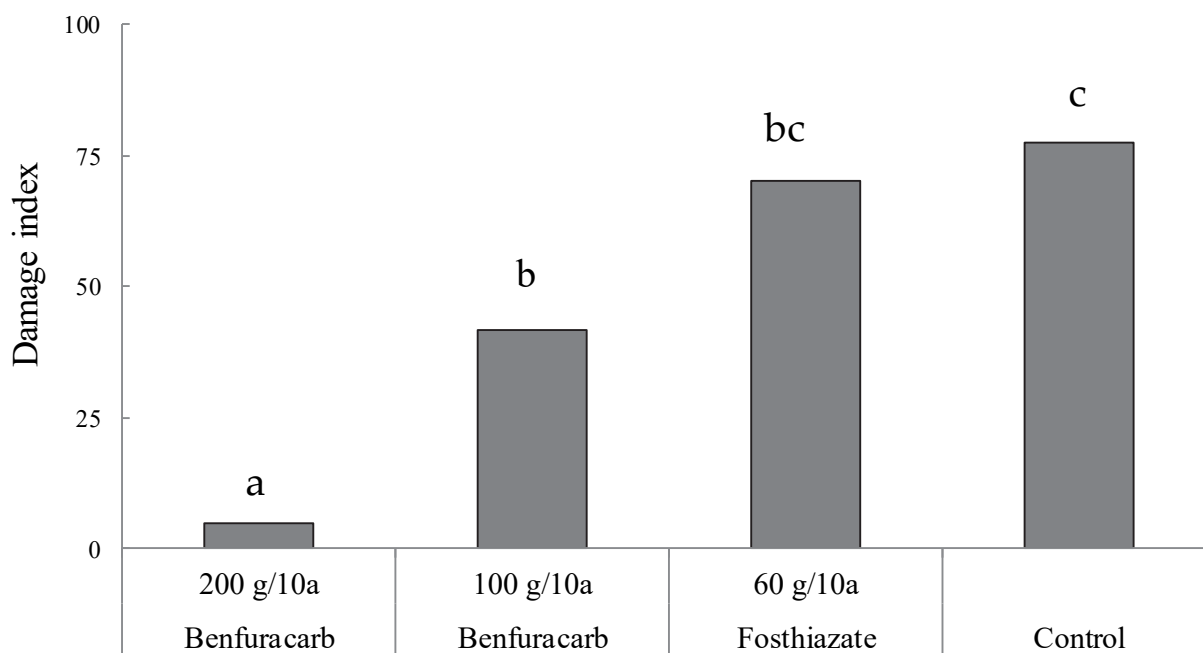


Figure 3-4. Effect of two of nematicides, benfuracarb at 100 and 200 g $10a^{-1}$ and fosthiazate at 60 g $10a^{-1}$, on damage in lotus tubers caused by *Hirschmanniella diversa* in the 2012 micro-field experiment (n=3). Benfuracarb and fosthiazate formulations were granule and the percentage a.s. were 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 隔離柵園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熏蒸剤は、殺線虫効果が期待できないと考えられたため、本研究では非土壌熏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熏蒸剤についても、カーバマナトリウム塩 (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%, チオシクロム 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 1–50 µg/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、アベルメクチン、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 LC_{50} 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、 LC_{50} 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 LC_{50} 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 LC_{90} 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 0.5–1.0 µg/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たと考えられる。

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マ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。カーバマナトリウム塩は、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、カーバマナトリウム塩が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、レンコンネモグリが残効の切れたのちに活動性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に対する殺線虫効果が高く、水稻のイネシガラセンチュウ *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(Iyatomo 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

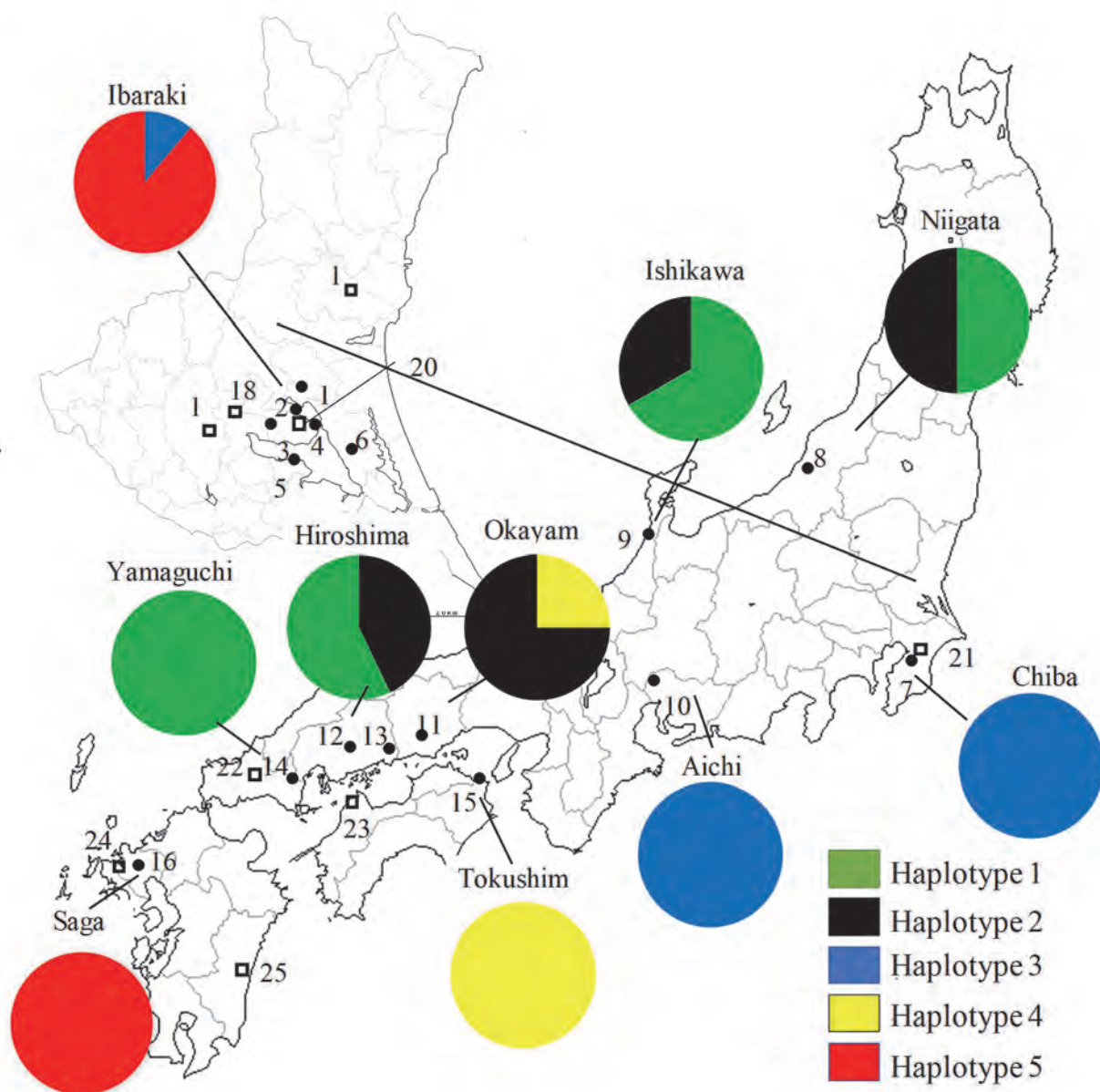
4. 1 はじめに

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℃、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℃ 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'-CATTCTTGCCAAATGCTTTTCG-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'-TTTTTGGCATCCTGAGGTTTAT-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℃ で 2 分間処理したのち、94℃ で 30 秒間の熱変性、50℃ で 30 秒間のアニーリング、72℃ で 1 分間の伸長反応を 40 サイクル行い、その後 72℃ で 5 分間最終伸長ステップを行った。*mtCOI* の増幅条件は、94℃ での 2 分間処理したのち、94℃ での 1 分間の熱変性、48℃ での 2 分間のアニーリング、68℃ での 3 分間の伸長を 35 サイクル行い、その後 72℃ 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 BigDye™ 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) でアセンブルし、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
					LC701806	
		Ishioka City	2	- ^{a)}	LC701833	LC701876
					LC701834	LC701877
					LC701835	LC701878
		Tsuchiura City	3	-	-	LC701870
		Kasumigaura City	4	-	LC701836	-
					LC701837	
		Inashiki City	5	LC701771	LC701781	LC701841
					LC701782	
					LC701783	
					LC701785	
					LC701784	
		Namegata City	6	LC701770	LC701788	LC701842
					LC701786	
					LC701787	
	Chiba	Chonan Town	7	-	LC701790	LC701869
					LC701792	LC701868
					LC701793	LC701867
					LC701789	LC701866
					LC701791	
Chubu	Niigata	Nagaoka City	8	LC701773	LC701799	LC701865
				LC701772	LC701800	LC701864
					LC701801	
	Ishikawa	Kanazawa City	9	LC701777	LC701802	LC701873
					LC701803	LC701874
					LC701804	LC701875
	Aichi	Aisai City	10	-	LC701811	LC701850
					LC701809	LC701851
					LC701810	LC701852
						LC701853
Chugoku	Okayama	Kurashiki City	11	-	-	LC701844
						LC701846
						LC701843
						LC701845
	Hiroshima	Higashihiroshima City	12	-	-	LC701854
						LC701861
						LC701860
						LC701856
						LC701855
	Fukuyama City		13	-	-	LC701859
						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)。

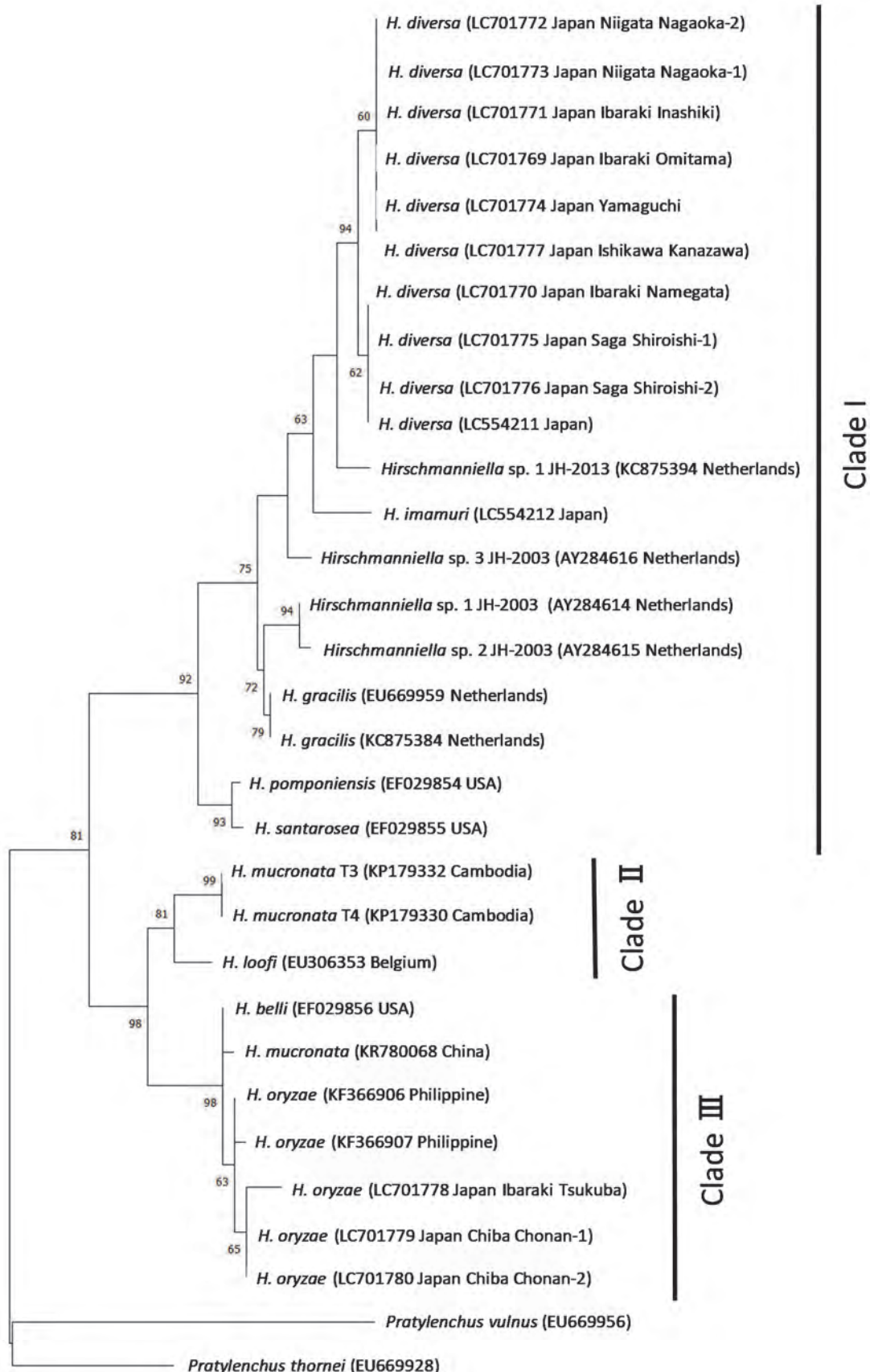


Fig. 4-2. Phylogenetic tree inferred from the 18S rDNA gene sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar represents the substitution distance.

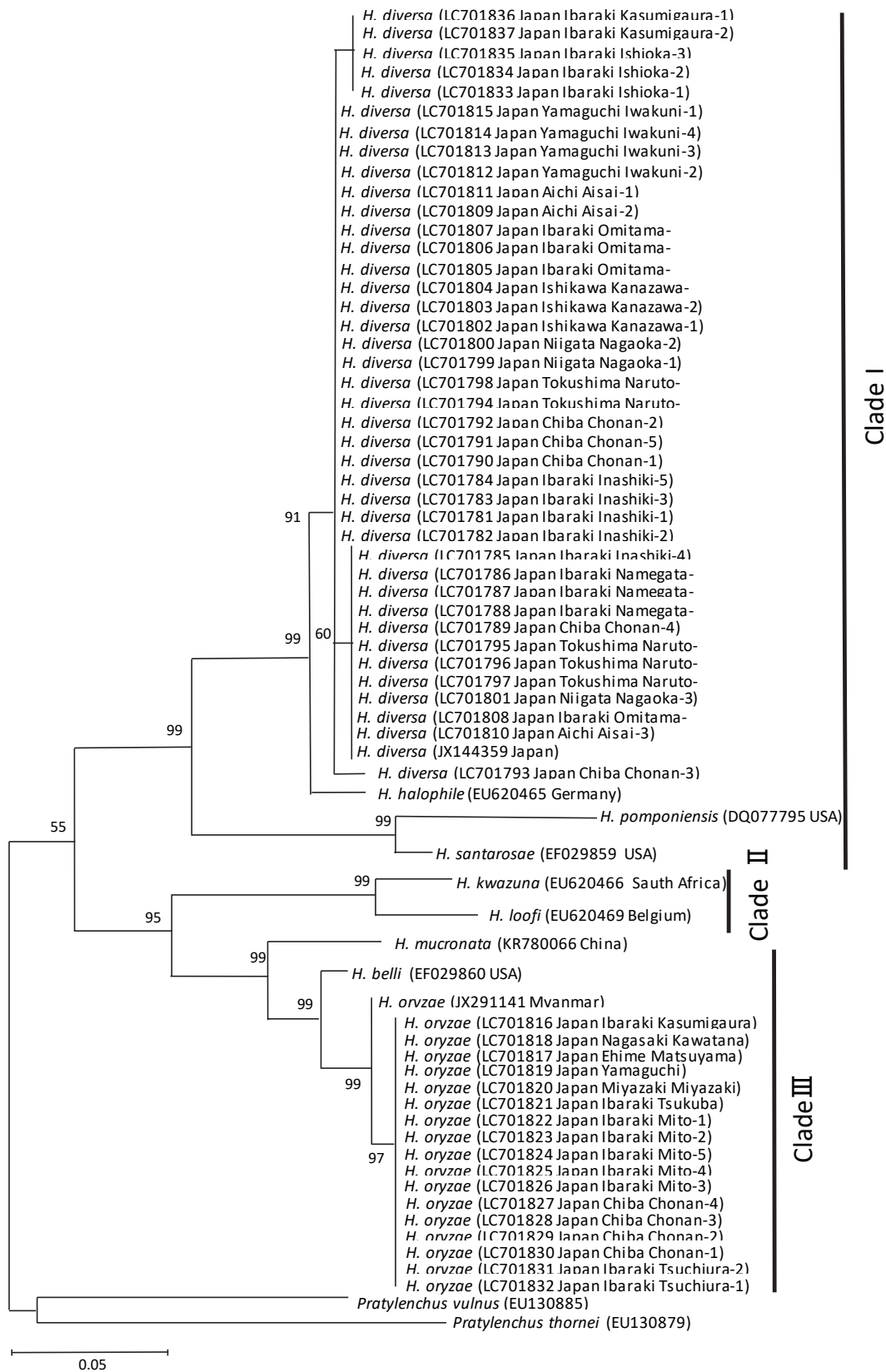


Fig. 4-3. Phylogenetic tree inferred from the D2-D3 region of 28S rDNA gene sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar represents the phylogenetic distance.

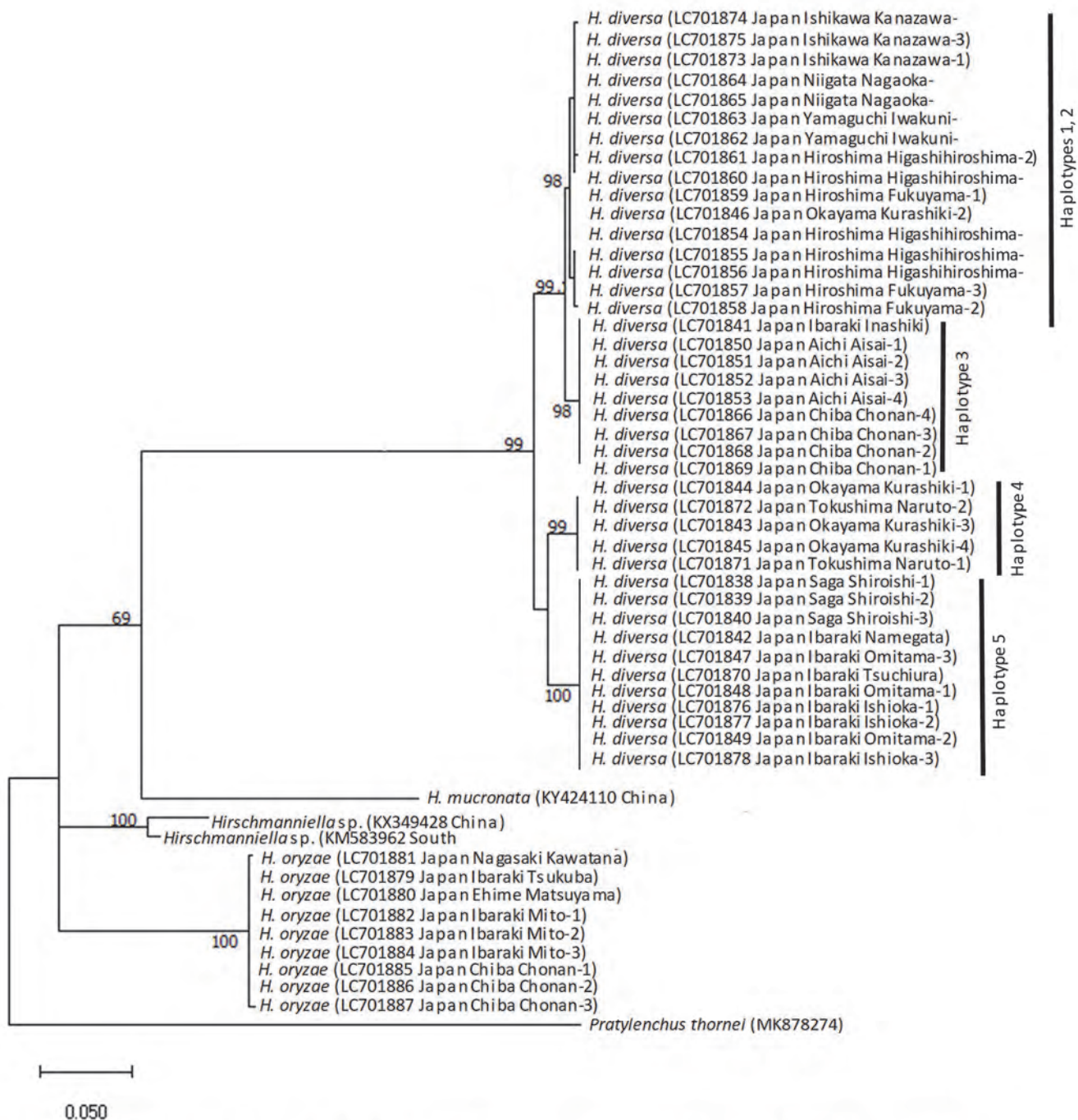


Fig. 4-4. Phylogenetic tree inferred from the *mtCOI* sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar represents the phylogenetic distance.

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

haplotype No.	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	T	C	G	T	A	G	C	A	G	T	T	A	A	G	C	G	C	G	A	T	A	G	C	T	A	T	C	C
2	T	T	C	G	T	A	G	C	A	G	T	T	A	A	G	C	G	C	G	A	T	A	G	T	A	T	A	C	C
3	T	T	C	G	T	A	G	C	A	G	T	T	G	G	C	C	A	G	G	A	T	A	G	T	A	T	A	C	T
4	C	T	A	C	G	G	G	A	A	C	C	A	A	A	G	T	G	T	A	G	T	G	A	C	A	A	T	T	T
5	T	T	C	G	T	A	G	T	G	A	C	A	G	A	T	T	G	T	A	G	C	G	A	C	T	G	C	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。またその被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の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の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。

レンコンネモグリの 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。

レンコンネモグリの種内変異の解析は、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、レンコンネモグリの国内個体群は 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の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、全国遍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の生態、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の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、レンコンネモグリの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、レンコンネモグリの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5.46μg/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あると考えられた。

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 vouchers 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 rostrate* 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 mucronate* and *H. oryzae* on *Sesbania rostrate*, *Aeschynomene afraspera* and rice cv. IR 58. Fund. Appli. Nematolo. 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 Agric. 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., Karpouzas, 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*). Beitrage trop. Landwirtsch. 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 transplanting of casmati 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.
- 佐藤ティ・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
- Viglierchio, 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 daveri* 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 *Xphinema 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 mitochondrial 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. imamura* 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

ダイズの裂皮程度の品種間差解明と QTL 解析

大越三登志・松井 匠¹⁾・岩橋雅夫²⁾・岡本和之³⁾・岡野克紀⁴⁾

(茨城県農業総合センター生物工学研究所)

要約

納豆加工時に問題となる蒸煮後の裂皮が発生しにくいダイズを育成するために、国内の 56 品種・系統について、生豆における裂皮及び蒸煮後の裂皮を合わせた全裂皮の程度の品種間差を調査し、‘すずかれん’や‘小粒選抜系’等は裂皮しにくいことを明らかにした。また、‘すずかれん’と裂皮しやすい系統である‘ひたち 4 号’を親品種とした組換え自殖系統 153 系統による連鎖解析を行ったところ、全長 704cM をカバーする 30 連鎖群から構成される連鎖地図を得た。また、QTL 解析により、第 6、第 10 染色体に全裂皮程度に関連するそれぞれ 1 つの QTL を検出した。いずれの QTL とも‘すずかれん’型対立遺伝子が裂皮を軽減する効果を示し、これらの寄与率は 8.7%、12.0%であった。

キーワード：ダイズ、難裂皮性、QTL 解析

1. はじめに

茨城県では、納豆用小粒ダイズの‘納豆小粒’が奨励品種に指定され、食味が優れることから県内外の納豆加工業者に長期に渡り使用されている(窪田・鯉渕、1979；茨城県農林水産部産地振興課、2024a)。2023 年の県内産では 991ha で作付けされたと推定される(茨城県農林水産部産地振興課、2024b)。

一般的に納豆はダイズを水に浸漬し、十分に吸水させてから加圧蒸煮し、その後に納豆菌を加えて容器内で発酵させるという工程を経て製造される。商業ベースの大規模生産では、効率化のため、この一連の工程が製造ライン化されているが、納豆製造業者からの聞き取りによると、ダイズに裂皮が多く発生していると、粒が潰れて製造機械の目詰まりを起こし、ラインの停止につながることもあり問題となっている。裂皮は生豆の状態でも発生が確認されるが、生豆では裂皮を目視できず、吸水や加圧蒸煮の際に新たに確認されるものも多い。これまでに、吸水後の乾燥により誘発させた裂皮の品種間差や蒸煮後の皮うきの品種間差に関する報告(村田ら、1989；平、1982)、あるいは生豆の裂皮率の QTL を検出した報告(Saruta et al., 2019)はあるが、蒸煮の影響を考慮した裂皮程度について、DNA マーカーを用いた詳細な遺伝学的解析はほとんど行われていない。

そこで、本研究では、加工過程に影響する裂皮が発生しにくい品種の育成に資するために、生豆及び蒸煮後の裂皮発生程度の品種間差を調査し、関連する QTL を探索した。

2. 材料および方法

2. 1 裂皮程度の品種間差の解明

2019 年に 66、2020 年に 60 のダイズ品種・系統を栽培し(表 1)、子実を形質評価に供試した。各 10 株を収穫・乾燥後、機械脱粒時に衝撃で裂皮が発生するのを避けるため、手で脱粒した。得られた収穫物から被害粒(虫害、病害)、奇形粒および未熟粒を取り除き、残った子実から 300 粒を無作為に抽出し、裂皮粒(生豆裂皮)については計数した後に取り除き、以降の調査からは除外した。無傷の粒から 100 粒を無作為に抽出して蒸留水で 25℃、16 時間浸漬して吸水させ、裂皮が発生した粒(吸水裂皮)と吸水せず膨らまない粒(石豆)を取り除いてオートクレーブで 121℃、40 分間蒸煮した後、発生した裂皮(蒸煮時裂皮、図 1)の状態・程度を調査し、計数した。なお、吸水及び蒸煮の温度・時間は納豆製造業者の一般的な加工方法に準じるものである。各調査とも、わずかでも種皮が裂けて子葉が目視できるもの、目視で判別しづらい場合は指で触れて皮切れが認められたものを裂皮とした。吸水裂皮と蒸煮時裂皮を合わせた総称を「蒸煮裂皮」とし、生豆裂皮と蒸煮裂皮を合わせた

1) 現 茨城県西農林事務所坂東地域農業改良普及センター 2) 現 茨城県農林水産部農業技術課

3) 現 茨城県農業総合センター農業研究所 4) 現 茨城県南農林事務所稲敷地域農業改良普及センター

ものを「全裂皮」とした。生豆裂皮率、蒸煮裂皮率、石豆率は最初に無作為に抽出した 300 粒中に占める割合に換算して算出した。なお、2019 年の蒸煮時裂皮の調査では、種皮の裂け目の長さにより 5 段階に区分して算出した「裂皮価」として評価したが、単純な裂皮の有無による裂皮率と裂皮価との相関係数は 0.975***（相関係数の右肩に付した***は $p<0.001$ 、**は $p<0.01$ を示す。以降も同様。）と極めて高かったため、以後の調査手法には労力の少ない裂皮率を採用し、裂皮価の調査はとりやめた（データ略）。また、供試した品種・系統については開花期、成熟期、百粒重も調査し、各裂皮率との相関を確認した。

表1 品種比較試験の耕種概要

試験年次	試験場所	供試品種・系統数	播種期 (月・日)	畦間 (cm)	株間 (cm)	基肥量 N:P ₂ O ₅ :K ₂ O (kg/10a)	試験区面積
2019	所内畑圃場	66	6.26、7.03	60	15	3:10:10	0.6m ² 、2区制
2020	(水戸市)	60	6.24				1.8m ² 、2区制

2. 2 裂皮程度に関する QTL 解析

2. 2. 1 解析集団の選定

解析集団の候補とするため、全裂皮率が低い品種・系統と納豆加工適性の高い品種・系統を用いて 6 組合せの交雑を実施し、単粒系統法により組換え自殖系統群 (RILs) の育成を開始した。また、両親から DNA を抽出し、全ゲノム SSR マーカーパネル (WGSP) ver.2 (Fujii et al., 2018) を構成する 352 個の DNA マーカーを用いて多型を調査した。なお、‘すずかれん’、‘ひたち 4 号’の間で多型率が最も高かったことから、これらの品種由来の RILs を解析集団として選定し、RILs 各系統の F₅ 世代 1 個体ずつを用いて連鎖地図を構築するとともに、その 1 個体に由来する F₆ 世代を用いて裂皮程度を調査した。

2. 2. 2 解析集団の裂皮程度の調査

RILs の F₆ 世代 152 系統を 2022 年に圃場で栽培した (表 2)。成熟期に達して概ね 3 日以内に各系統 5 個体 (1 系統のみ 3 個体) の地上部生育量 (主茎長、分枝数、主茎節数) を測定するとともに、子実を収穫し、収量、百粒重、タンパク質含量、油分含量、糖含量及び裂皮程度を調査した。各裂皮率等の算出方法は、概ね上記の方法に準じたが、吸水に供する粒数は省力化のため 50 粒に変更した。タンパク質含量、油分含量、糖含量は穀物用分析装置 Infratec1241 (フォス・ジャパン社) により測定した。

2. 2. 3 DNA 調製と DNA マーカーの検出

RILs の F₅ 世代 153 系統の DNA を調製するため、2022 年春に各系統 1 個体ずつ容器栽培した。DNA 溶液は、DNA すいすい-S (リーゾ社) のプロトコルに従い、RILs 各系統の未展開葉から 5mm 四方程度を採取して 400 μ L の DNA すいすい-S 中で磨砕し、上清に 100 μ L のイソプロパノールを加えて沈殿させ、70%エタノールで洗浄した後、0.1 $\times$ TE に溶解して調製した。PCR は、片側の 5' 末端に M13 配列 (CACGACGTTGTAACGAC) を付加したプライマー 6~8 対を 1 グループとし、蛍光標識した M13 配列プライマーを混合して (Oetting et al., 1995) Multiplex PCR Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。蛍光標識プライマーは受託合成サービス (ThermoFisherScientific 社) を利用して 6-FAM、NED、PET、VIC を用いた 4 種を作成し、プライマーのグループごとにそのいずれかを使用した。サーマルサイクラーは ProFlex PCR System (ThermoFisherScientific 社) を使用した。反応条件は 95 $^{\circ}$ C15 分の後、95 $^{\circ}$ C30 秒、50 $^{\circ}$ C90 秒、60 $^{\circ}$ C90 秒を 35 サイクル、その後 60 $^{\circ}$ C30 分とした。反応後は、4 種の蛍光色の産物を混合し、断片長を 3500XL ジェネティックアナライザ (ThermoFisherScientific 社) を用いて確認した。

2. 2. 4 連鎖地図の構築と QTL 解析

RILs の F₅ 世代 153 系統に対して、WGSP ver.2 (Fujii et al., 2018) の DNA マーカーのうち多型が認められた 180 個から増幅断片長の差が小さく判別の困難な 12 個を除いた 168 個を用いて遺伝子型を判別した。このうち、良好に判別できた 141 個の多型のパターンから、統計ソフトウェア R ver.4.3.1 (R Core Team, 2023) の onemap パッケージ ver 3.0.0 (Margarido et al., 2007) を用いて連鎖地図を作成した。連鎖群は WGSP ver.2 (Fujii et al., 2018) を参考に染色体との対応を確認した。

得られた全裂皮率と連鎖地図データから、R ver.4.3.1 の qtl パッケージ ver 1.60 (Broman et al., 2003) を用いて EM アルゴリズムに基づく IM 法により QTL 解析を実施した。QTL 検出の閾値は、1000 回並べ替え、有意水準 5%での permutation test により算出した。

表2 ‘すずかれん’と‘ひたち4号’を親品種としたRILs (F₆) の耕種概要

試験年次	試験場所	供試品種 ・系統数	播種期 (月・日)	畦間 (cm)	株間 (cm)	基肥量 N:P ₂ O ₅ :K ₂ O (kg/10a)	試験区面積
2022	所内畑圃場 (水戸市)	152	6.28	60	15	3:10:10	1.8m ² 、1区制

3. 結果

3. 1 裂皮程度の品種間差の解明

2019 年の生豆裂皮率の範囲は 1~75%、蒸煮裂皮率は 10~76%、全裂皮率は 13~95%、2020 年の生豆裂皮率は 0~94%、蒸煮裂皮率は 4~89%、全裂皮率は 12~99%であり、品種間で大きな差が認められた (表 3)。2 年とも供試できた 56 品種・系統について、生豆裂皮率、蒸煮裂皮率、全裂皮率の年次間の相関を確認したところ、全裂皮率の相関係数は 0.715*** と高かった (図 2)。生豆裂皮率と蒸煮裂皮率についてはそれぞれ 0.404**、0.449*** とそれより低かったことから、全裂皮率が難裂皮性の指標としてより適していると考え、QTL 解析に用いることとした。なお、年次ごとに、供試した全ての品種・系統の生豆裂皮率、全裂皮率と開花期、成熟期、百粒重との相関係数を確認したが、2019 年の全裂皮率と百粒重で 0.351**、2020 年の生豆裂皮率と百粒重で 0.425***であった他は $|r| > 0.3$ の相関は認められなかった (データ略)。

全裂皮率の 2 カ年平均が最も低かったのは‘すずかれん’の 12%であり、次いで低い順に‘生研 14 号’、‘小粒選抜系’、‘すずおとめ’、‘すずろまん’、‘すずこまち’であった。‘納豆小粒’は 60%、‘ひたち 4 号’は 74%であった。

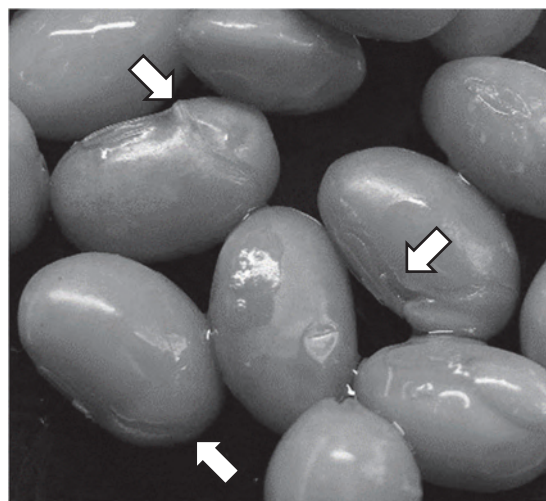


図1 蒸煮時裂皮 (矢印)

中心の粒にへこみが認められるが、これは蒸煮後の取扱い時についたものであり、種皮は切れていない。

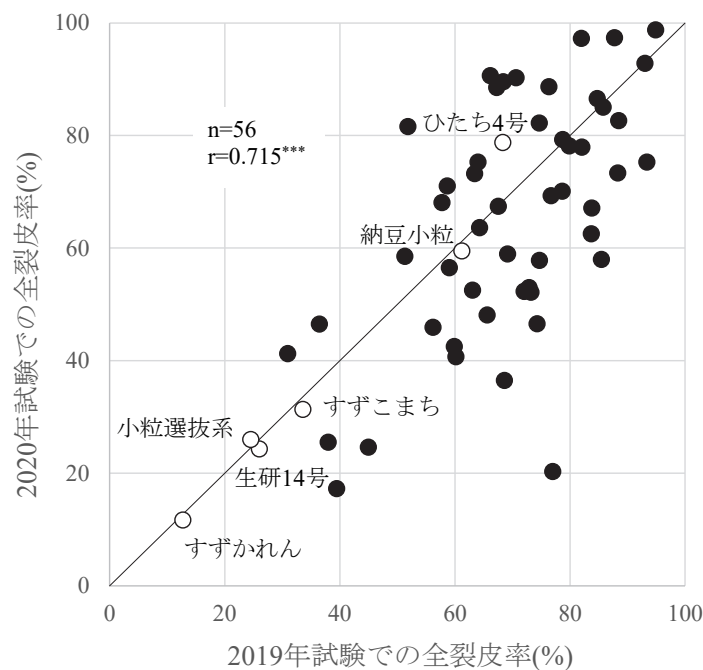
表3 供試品種・系統の裂皮率

品種・系統名	2019				2020				2年平均 全 裂皮率 (A+B)
	生豆 裂皮率 (A)	石豆率 (B)	全 裂皮率 (A+B)	全 裂皮率 (A+B)	生豆 裂皮率 (A)	石豆率 (B)	全 裂皮率 (A+B)	全 裂皮率 (A+B)	
すずかれん	3	0	10	13	4	0	8	12	12
生研14号	6	0	20	26	3	0	21	24	25
小粒選抜系	2	2	23	25	1	0	25	26	25
くろこじろう	2	1	25	27	-	-	-	-	27
すずおとめ	17	2	22	39	3	0	15	17	28
すずろまん	6	0	32	38	2	0	24	26	32
すずこまち	18	0	16	34	10	0	22	31	32
エンレイ	2	2	43	45	11	2	13	25	35
すずかおり	3	0	28	31	22	0	20	41	36
鈴の音	1	4	36	36	9	2	37	47	41
スズマル	6	19	41	47	-	-	-	-	47
ひたち3号	10	0	38	48	-	-	-	-	48
目黒	26	1	51	77	4	2	16	20	49
花嫁茨城1号	23	0	37	60	7	0	33	41	50
生研17号	16	0	40	56	2	0	44	46	51
兄	7	1	53	60	23	3	19	43	51
水潜	13	8	56	69	15	2	21	37	53
生研4号	13	1	38	51	14	0	45	59	55
生娘茨城1号	12	0	54	66	9	0	39	48	57
タチスズナリ	2	3	57	59	22	2	34	57	58
タチナガハ	16	1	47	63	14	0	39	53	58
福井白	3	28	56	59	-	-	-	-	59
納豆小粒	31	0	31	61	10	0	50	60	60
タママサリ	22	0	52	74	1	0	46	47	60
里のほほえみ	7	0	65	72	3	0	50	52	62
生研2号	46	1	27	73	2	0	50	52	63
生研18号	2	0	56	58	3	0	65	68	63
ボンミノリ	40	0	33	73	22	0	31	53	63
四粒黄	8	0	56	64	4	0	59	64	64
極小外国・水戸市	48	0	21	69	13	0	46	59	64
ハタユタカ	12	0	47	59	47	1	24	71	65
Darc	37	0	38	75	8	0	50	58	66
KLS805-3	12	0	39	52	26	0	55	82	67

品種・系統名	2019				2020				2年平均 全 裂皮率 (A+B)
	生豆 裂皮率 (A)	石豆率 (B)	全 裂皮率 (A+B)	全 裂皮率 (A+B)	生豆 裂皮率 (A)	石豆率 (B)	全 裂皮率 (A+B)	全 裂皮率 (A+B)	
サチユタカ	39	0	29	67	40	0	28	67	67
すずほのか	4	2	60	63	4	2	69	73	68
コスズ	32	0	32	64	35	0	40	75	70
極小金砂郷・水戸市	19	0	66	85	9	0	49	58	72
ROSS	75	-	-	-	36	1	37	73	73
晩越後8号	17	4	60	77	29	5	41	69	73
青豆	31	1	42	73	-	-	-	-	73
シンメジロ	32	0	52	84	28	0	35	63	73
ひたち4号	35	0	33	68	18	0	60	79	74
あやみどり	6	0	67	74	-	-	-	-	74
PI416937	3	0	76	79	0	1	70	70	74
生研15号	44	0	40	84	3	0	64	67	75
リュウホウ	26	9	50	76	-	-	-	-	76
小白	6	0	61	67	71	1	17	89	78
キヨミドリ	31	1	47	78	-	-	-	-	78
裸3号	26	0	40	66	64	0	27	91	78
本種赤茨37号	25	0	49	75	23	1	60	82	78
旭60号	7	7	61	68	63	3	27	90	79
ひたち1号	15	3	64	79	23	1	56	79	79
生研10号	12	0	68	80	1	0	77	78	79
フクユタカ	64	0	18	82	55	2	23	78	80
赤茨2号	42	1	28	71	74	0	16	90	80
Jackson	49	0	39	88	22	0	52	73	81
青柳	18	0	58	76	66	0	23	89	82
5002T	45	0	37	83	-	-	-	-	83
東秋	33	1	60	93	31	0	44	75	84
地塚茨城1号	16	0	70	86	56	0	29	85	85
生研6号	32	1	56	88	17	1	65	83	86
生研16号	49	0	36	85	16	0	71	87	86
金大豆	14	0	68	82	9	0	89	97	90
Essex	63	0	25	88	91	0	6	97	93
Stressland	22	0	71	93	45	0	48	93	93
花魁	57	0	38	95	94	0	4	99	97

全品種・系統平均 ^{a)}	21.9	0.8	44.4	66.2	23.3	0.5	39.1	62.3	64.3
標準偏差 ^{a)}	17.0	1.6	16.4	18.8	24.3	1.0	19.6	22.9	19.3

a)2カ年を通して測定できた56品種のみを用いて算出した。

図2 2カ年の全裂皮率の相関
実線はy=xを示す。

3. 2 裂皮程度に関する QTL 解析

3. 2. 1 解析集団の選定

全裂皮率が低かった‘すずかれん’、‘すずこまち’、‘生研 14 号’と納豆加工適性の高い‘納豆小粒’、‘ひたち 4 号’の間の多型率を比較した結果、‘すずかれん’と‘ひたち 4 号’の組合せにおいて最も多型率が高く、全裂皮率の差も大きかった（表 4）ことから、‘すずかれん’、‘ひたち 4 号’を両親とする RILs を QTL 解析に用いた。なお、‘ひたち 4 号’は戻し交雑により‘納豆小粒’にダイズシストセンチュウ抵抗性およびダイズモザイクウイルス抵抗性を導入した系統である。

表 4 解析集団候補の両親間の多型率および蒸煮裂皮率の差

種子親	花粉親	供試 マーカー数	多型 マーカー数	多型率 (%)	全裂皮率 (%)の差 ^{a)}
すずかれん	納豆小粒	352	176	50	48
すずこまち	納豆小粒	352	105	30	28
生研 14 号	納豆小粒	352	85	24	35
すずかれん	ひたち 4 号	352	180	51	61
すずこまち	ひたち 4 号	352	118	34	41
小粒選抜系	ひたち 4 号	352	140	40	48

a)2019, 2020 年調査結果の平均

3. 2. 2 解析集団の裂皮程度の調査

RILs の各系統の全裂皮率は 0～99%と大きな差が認められ、解析に適した集団であることが確認された（図 3）。また、生豆裂皮率、全裂皮率と地上部生育量、開花期、成熟期、収量、百粒重、タンパク質含量、油分含量、糖含量との相関係数を確認したところ、生豆裂皮率と百粒重で 0.392***、全裂皮率と開花期で -0.367***であった他は $|r| > 0.3$ の相関は認められなかった（データ略）。

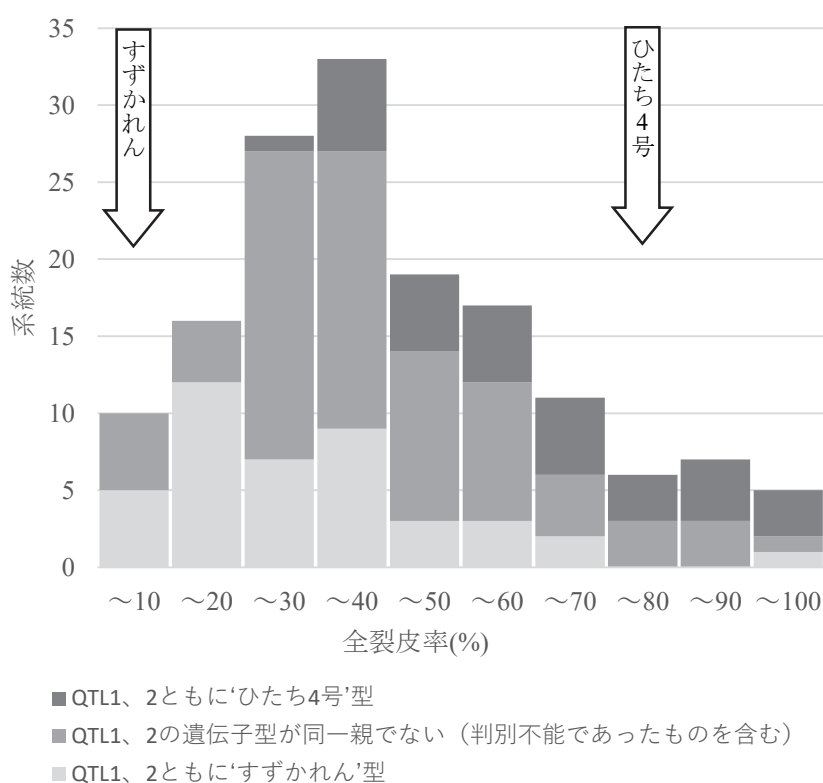


図 3 RILs における全裂皮率の分布

3. 2. 3 連鎖地図の構築

‘すずかれん’と‘ひたち4号’との組合せのRILsについて141個のマーカーの連鎖解析を行った結果、連鎖しなかった20個を除いた121個のマーカーが30の連鎖群に位置付けられた。また、これらの連鎖群はFujii et al. (2018)を参考に染色体番号順に配列した。得られた連鎖地図の全長は704cMとなり、Fujii et al. (2018)の連鎖地図を参考とした場合、全ゲノムの約25%に対応した。さらに、マーカー間の平均遺伝距離は7.7cMであった。

3. 2. 4 QTL解析

QTL解析の結果、第6染色体及び第10染色体に位置付けられたDNAマーカーSatt100、GMES4019の近傍にQTLが検出され、それぞれQTL1、QTL2とした(図4)。これら2つのQTLの遺伝子型がともに‘すずかれん’型であった系統の全裂皮率は0%から91%まで分布し、平均値は27%、‘ひたち4号’型であった系統は24%から99%まで分布し、平均値は57%であった(図3)。QTL1および2の寄与率はそれぞれ8.7%、12.0%であり、‘ひたち4号’型に対する‘すずかれん’型の相加効果は、正の値の時に裂皮を低減すると定義した場合、それぞれ7.4、8.0であった(表5)。

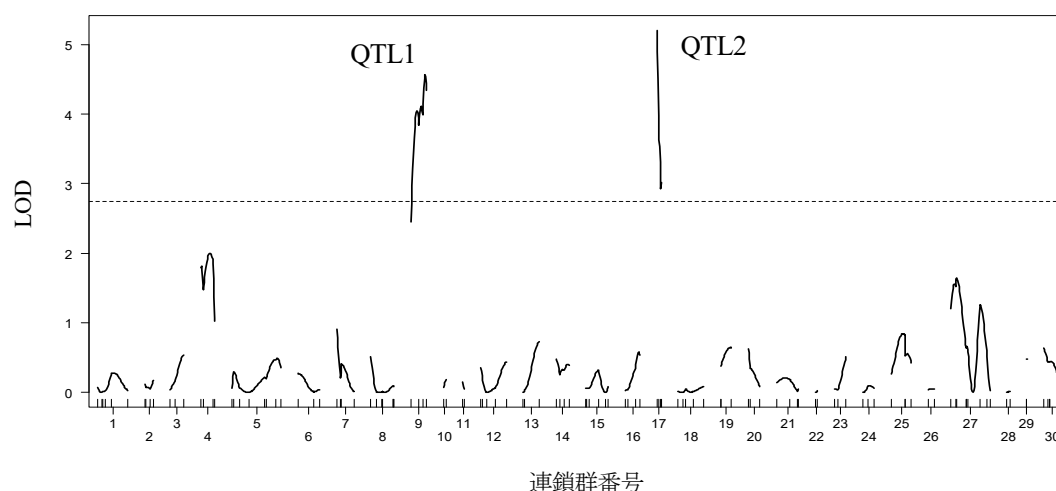


図4 QTL解析の結果

点線はLODの閾値を示す。

横軸から上側に伸びた目盛は各連鎖群に割り当てられたマーカーの位置を示す。

目盛の間隔は推定されたマーカー間距離を表す。

連鎖群はWGSP ver.2 (Fujii et al., 2018)を参考に染色体番号順に配置した。

表5 蒸煮裂皮に関連するQTL

QTL	連鎖群(染色体 ^{a)})	近傍マーカー	LOD	寄与率 ^{b)} (%)	相加効果 ^{c)}
1	9(6)	Satt100	4.6	8.7	7.4
2	17(10)	GMES4019	5.2	12.0	8.0

a)WGSP ver.2 (Fujii et al., 2018) から推測される、連鎖群が座上する染色体番号。

b)QTLがどの程度表現型分散を説明できるかを示す指標。QTL分散/全分散。

c)‘ひたち4号’型に対する‘すずかれん’型の効果で、正の値のときに蒸煮裂皮率(%)を低減すると定義した。

4. 考察

4. 1 裂皮程度の品種間差の解明

ダイズの裂皮の検出方法について、本研究では、ダイズ加工製造業者の一般的な加工方法に準じて行った。村田ら(1989)は吸水後に乾燥させて裂皮を誘発する評価方法により‘エンレイ’の裂皮発生が少ないことを報告しており、今回の結果でも‘すずこまち’に次いで裂皮率が低くなっていることから、概ね共通の傾向が認められた。

ダイズの裂皮については遺伝率が高いとされており(岡部・異儀田、1987)、本研究においても全裂皮率は2カ年の相関が高かったことから、遺伝的要因の影響を受けていることが示唆された。また、生豆裂皮率と蒸煮裂皮率については2カ年の相関が低かったことから、全裂皮率が裂皮の指標としてより適していると考えられた。全裂皮率の2カ年の相関が比較的高かった要因としては、生豆裂皮調査時に目視では確認できなかった微細な裂皮や潜在的な種皮の損傷・脆弱性が、吸水・蒸煮により顕在化し、品種・系統の本来の裂皮しやすさが把握できたことによる可能性がある。一方、‘目黒’、‘水潜’など、全裂皮率の方が2カ年のばらつきが大きい品種もあり、これらは、例えば栽培環境や収穫・調製・保管等の外部要因の変動の影響を受けやすい品種特性があり、そのために他の品種と異なる傾向を示した可能性がある。環境条件による裂皮の発生については、開花期の低温処理により誘発される裂皮粒に品種間差があることについて報告されている(原ら、1993)。

今回の試験で安定して生豆裂皮率及び全裂皮率が低かった‘すずかれん’、‘小粒選抜系’、‘すずこまち’はそれぞれの育成地でも生豆の裂皮が少ないとされており(高橋ら、2013; 樫村ら、1994; 坂元ら、2002)、本研究と評価が一致した。しかし、それらの報告では、‘すずかれん’、‘小粒選抜系’は納豆加工後の硬度がそれぞれの標準品種の‘スズマル’、‘納豆小粒’より硬いと評価されている(高橋ら、2013; 樫村ら、1994)。また、‘すずこまち’は煮豆の硬さは‘納豆小粒’よりやや硬いが、納豆は軟らかかった(坂元ら、2002)。加工適性は品種の普及に大きな影響があり、実際に‘小粒選抜系’は硬さが原因で広く普及しなかったため、裂皮の難易と加工適性の関連については今後、詳細に確認していく必要がある。

4. 2 裂皮程度に関する QTL 解析

4. 2. 1 解析集団の選定

‘すずかれん’の種子親は‘納豆小粒’を種子親として育成されており、また、‘すずこまち’は‘納豆小粒’を種子親にして、‘ひたち4号’は‘納豆小粒’と‘スズヒメ’との交雑後代に‘納豆小粒’を3回戻し交雑した系統と、‘納豆小粒’と‘すずろまん’との交雑後代に‘納豆小粒’を6回戻し交雑した系統を両親として育成されている。‘小粒選抜系’は茨城県北部の在来種から選抜された品種であるが、同様に在来種から選抜された‘納豆小粒’と産地が至近であることから、遺伝的にも近似である可能性がある。‘生研14号’は‘小粒選抜系’を種子親にした後代であり、供試した品種・系統の遺伝的背景が近かったことが、多型率の低さに影響したと考えられた。

4. 2. 2 解析系統の裂皮程度の調査

先行の研究では、開花期前後の温度が生豆の裂皮に影響するとの報告があり(原ら、1993)、全裂皮率と開花期に低いながらも相関がみられた今回の結果(生豆裂皮率と開花期の相関係数は -0.277^{***})と傾向は一致した。百粒重については先行の研究で裂皮との相関が認められたとする報告(朝日ら、1981)がある一方、認められなかったとする報告(中山ら、2018)もあるが、今回は生豆裂皮率と百粒重に低い相関が認められた。

今回は煮豆や納豆製品の硬度は調査しなかったが、今後、これらと裂皮の関係性を確認する必要がある。

4. 2. 3 連鎖地図の構築

今回の解析で得られた連鎖群数は30であり、ダイズの染色体数20に収束しなかった。また、先行のダイズ連鎖地図の例として、Fujii et al.(2018)は181系統の‘納豆小粒’と‘タチナガバ’の組合せによるRILsに対して多型を示した221のDNAマーカーを用いて2,824.3cMの連鎖地図を作成しているが、それと比較して今回得られた連鎖地図は704cMとかなり短かった。今回、解析に用いたRILsの両親の遺伝的背景に‘納豆小粒’由来の領域が多いことにより、多型を示すマーカーが少なくなったことが、詳細な連鎖地図の作成に至らなかった主要因と考えられた。

4. 2. 4 QTL 解析

2つのQTLが検出され、DNAマーカーによる難裂皮性系統選抜の可能性が示された。ただし、どちらのQTLも連鎖群の末端に位置付けられたDNAマーカーの近傍に位置していたために明瞭なLODのピークを得ることはできなかった。これらのことから、より詳細な解析のためには、今回多型が認められなかった領域や、より染色体末端部に近い領域において有効なDNAマーカーを探索する必要がある。また、QTL2は、Saruta et al. (2019) による裂皮率に関する解析で検出されたQTLの一つと同じく、DNAマーカーGMES4019の近傍に位置しており、これらは同じ遺伝子座の可能性もあるが、Saruta et al. (2019) はこのQTLについて、2カ年の調査のうち1年でのみ検出されたことから、裂皮に関連するQTLとは位置付けていない。今回検出されたQTLについても複数年の解析による確認が必要と考える。

生豆裂皮や蒸煮裂皮の発生については、種皮の厚み・強度や成分、粒形など多くの要因が関与していることが示唆されており、例えば種皮の厚さや引張り強度には品種間差が認められている(伊藤ら、1993; 林ら、1996b)。このうち引張り強度に関しては、裂皮性との関連が示唆されている。また、低温により誘発される裂皮と高温により誘発される裂皮の発生様式が異なる可能性が大きいとの報告もある(林ら、1996a) 他、裂皮の形状によっても発生機構が異なるという報告もあり(平井ら、2011)、裂皮の発生機構は非常に複雑であると考えられる。今回検出したQTLは寄与率、効果とも大きくなかったが、今後、これらの知見を参考に裂皮の検出方法を改めて検討することにより、より効果的なQTLを同定できる可能性があると考えられた。

引用文献

- 朝日幸光・井口武夫・財津昌幸(1981) ダイズ品種の種皮の亀裂について. 九州農業研究 43 : 41.
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S. and Churchill, G.A. (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19 : 889-890.
- Fujii, K., Sayama, T., Takagi, K., Kosuge, K., Okano, K., Kaga, A. and Ishimoto, M. (2018) Identification and dissection of single seed weight QTLs by analysis of seed yield components in soybean. *Breeding Science* 68 : 177-187.
- 原 正紀・林 高見・鈴木健策(1993) 開花期の低温処理による大豆裂皮粒の多発とその品種間差異. 東北農業研究 46 : 135-136.
- 林 高見・鈴木健策・村田吉平・原 正紀(1996a) 異なる温度条件で発生した大豆裂皮粒の粒重の分布. 東北農業研究 49 : 85-86.
- 林 高見・鈴木健策・佐々木 陽・原 正紀(1996b) 裂皮性の異なる大豆品種の種子最大期における種皮の引張り強度. 東北農業研究 49 : 87-88.
- 平井儀彦・津島 洋・津田 誠(2011) 開花期の追肥と登熟期の環境条件が異なる形状のダイズ裂皮粒発生に及ぼす影響. 日本作物学会紀事 80 : 183-189.
- 茨城県農林水産部産地振興課 (2024a) 奨励品種一覧.
https://www.pref.ibaraki.jp/nourinsuisan/sansin/nosan/documents/hinshu_ichiran.pdf (2024年11月2日アクセス).
- 茨城県農林水産部産地振興課 (2024b) 令和6年産大豆生産振興方針.
https://www.pref.ibaraki.jp/soshiki/nourinsuisan/sansin/documents/2_r6_daizu.pdf (2024年11月2日アクセス).
- 伊藤美環子・中村茂樹・高橋浩司(1993) 大豆品種の種皮の厚さ. 日本作物学会東北支部会報 36 : 75-77.
- 檜村英一・窪田 満・中川悦男・石原正敏(1994) 大豆準奨励品種「小粒選抜系」(仮称) について. 茨城県農業総合センター農業研究所研究報告 1 : 35-44.
- 窪田 満・鯉淵 登(1979) 極小粒ダイズ「納豆小粒」について. 茨城県農業試験場研究報告 19 : 19-24.
- Margarido, G. R. A., Souza, A. P. and Garcia, A. A. F. (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* 144 (3) : 78-79.
- 村田吉平・菊池彰夫・酒井真次(1989) ダイズの裂皮粒発生機作に関する一考察. 日本作物学会東北支部会報 32 : 89-90.
- 中山則和・山本 亮・細野達夫(2018) ダイズ品種「里のほほえみ」における裂皮粒の発生に及ぼす播種時期の影響. 日本作物学会紀事 87 : 183-191.

- Oetting, W. S., Lee, H. K., Flanders, D. J., Wiesner, G. L., Sellers, T. A. and King, R. A. (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30 : 450-458
- 岡部昭典・異儀田和典 (1987) ダイズの裂皮性に関する研究 第2報 選抜効果について. 日本作物学会東北支部会報 30 : 73-75.
- R Core Team (2023) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 坂元秀彦・高松光生・山田直弘・矢ヶ崎和弘 (2002) ダイズ新品種「すずこまち」の育成. 北陸作物学会報 37 : 82-84.
- Saruta, M., Takada, Y., Yamashita, K., Sayama, T. and Komatsu, K. (2019) A QTL associated with high seed coat cracking rate of a leading Japanese soybean variety. *Breeding Science* 69 : 665-671.
- 平 春枝 (1982) 国産大豆の品質 (1). 食品総合研究所研究報告 40 : 35-54.
- 高橋将一・高橋 幹・大木信彦・小松邦彦・中澤芳則・松永亮一・羽鹿牧太 (2013) ダイズ新品種「すずかれん」の育成とその特性. 九州沖縄農業研究センター報告 59 : 1-22.

付記

‘すずかおり’は(国研)農研機構東北農業研究センターより、‘すずおとめ’、‘すずかれん’は(国研)農研機構九州沖縄農業研究センターより提供いただいた。

本研究は文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業補助金試験研究課題「病虫害抵抗性を付与した難裂皮性「納豆小粒」の育成」(H31～R5)の中で実施した。

Clarification of Varietal Differences in the Degree of Soybean Seed Coat Cracking and QTL Analysis

Satoshi OKOSHI¹, Takumi MATSUI, Masao IWAHASHI,
Kazuyuki OKAMOTO and Katsunori OKANO

Summary

In order to breed soybeans that are less susceptible to seed coat cracking caused by steaming, which is a problem that occurs during natto processing, we investigated the varietal differences in the degree of seed coat cracking, including in raw and steamed states, for 56 domestic soybean cultivars and lines, and revealed that some cultivars such as ‘Suzukaren’ or ‘Shoryusenbatsukei’ are less susceptible to seed coat cracking. In addition, a linkage map was constructed using a population of 153 recombinant inbred lines derived from a cross between ‘Suzukaren’ and ‘Hitachi4’, a line which is highly prone to seed coat cracking; the resulting linkage map consisted of 30 linkage groups and covered 704cM in genetic distance. Furthermore, QTL analysis was performed and we detected two QTLs that are presumed to be related to the degree of total seed coat cracking. For both QTLs, the ‘Suzukaren’ genotype reduced seed coat cracking, with contribution rates of 8.7% and 12.0%, and they were estimated to be located on chromosomes 6 and 10, respectively.

Keywords: soybean, tolerance to seed coat cracking, QTL analysis

¹ Address: Agricultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3402 Kamikuniichou, Mito, Ibaraki 311-4203, Japan

食用ハス育種のための形状評価指標と小型容器栽培での活用

永山誓史¹⁾・柏木 優・平松優季²⁾・大寺宇織³⁾・葛谷真輝⁴⁾・石川友子

(茨城県農業総合センター生物工学研究所)

要約

国内で生産される食用ハス (*Nelumbo nucifera*) の形状を評価するため、23 品種・系統の第 2 節間の肥大茎を形状解析ソフト「SHAPE」を用いて主成分分析した。その結果、第一主成分は寄与率が 95.2%と極めて高いこと、根茎肥大指数 (肥大茎の最大直径/節間長) と高い相関関係 ($r^2=0.99$) を示すことを明らかにした。さらに、3 つの肥大茎形状 (短・中・長節) に分類される 4 系統を円形 21L 及び 105L の小型容器で栽培し、第 2 節間の根茎肥大指数を現地栽培食用ハスの指数と比較した結果、いずれの容器を用いても現地栽培と同等の系統間差を示すことが示唆された。以上より、21L 及び 105L 小型容器で栽培することで、第 2 節間の形状の特徴を根茎肥大指数によって示すことが可能である。

キーワード: 食用ハス、育種、根茎肥大指数、主成分分析、小型容器

1. はじめに

茨城県はハス (*Nelumbo nucifera*) のうち食用ハス (以下、「レンコン」という。) の生産量が日本一 (農林水産省、2023: 令和 4 年産野菜生産出荷統計) であり、霞ヶ浦の周囲に広範に広がる大産地を有している。県内の産地では、「金澄 36 号」、「ひたちたから」、「パワー」など、千葉県や茨城県の民間育種家が選抜・育種した品種や系統が栽培されている。レンコン育種は、肥大茎の形状、収量性、土壌中の肥大茎形成位置、病害抵抗性等の形質を勘案して行われており (金坂、2010)、このうち、商品価値に関わる重要な形質であるレンコンの肥大茎形状は、地域によって好まれる形が異なることから、各消費地のニーズに合わせた育種が求められている。育種における肥大茎の形状選抜は、節間長の長短や「肩張り」と呼ばれる節部付近の肥大程度等について、生産者の主観により目視で行われており、客観的な指標は確立されていない。

農作物の定量的な形状評価手法については、楕円フーリエ解析と主成分分析を組み合わせる形状評価を行うソフトウェア「SHAPE」が開発されており (Iwata and Ukai, 2002)、本手法では、主成分として抽出された形状特徴を網羅的に数値化し、そのスコアを形状特徴の計測値として解析・評価に供することができる。このため、これまで達観評価がなされていたレンコンの肥大茎の長短や肩張り形状、あるいはこれまで認識されていなかった形状特徴を客観的に評価できる可能性がある。実際に、カキ (*Diospyros kaki*) やキュウリ (*Cucumis sativus* L.) の果実形状を本手法により定量的に評価し、遺伝解析や育種に活用されている (Maeda et al., 2019; Shimomura et al., 2016)。篠原ら (2016) は国内で栽培される主要 15 品種・系統の肥大茎を用い、先端から数えて第 1~3 節間の形状を測定し、肥大茎の長さ等に系統間差があったことを報告している。しかしながら肥大茎は、第 1 節間が最も短く、第 2 節間が第 1 節間に次いで短く最も肥大し、第 3 節間はやや長く、第 4 節間は細く流れた形をしている (尾崎、2013)。このことから、形状を簡易にかつ正確に評価できる部位は現在までに明らかになっていない。

レンコンの育種は、①育種目標の設定、②遺伝資源の探索・収集、③交配した次世代交配集団の育成、④優良系統の選抜⑤品種登録により行われている (霞、2003; 江頭ら、2007; 篠原ら、2021)。レンコンは、肥大茎形成において地下茎が年間 7~8 メートルほど伸長するため、広大な圃場、労力、管理費を必要とすることが指摘

-
- 1) 現 茨城県県民生活環境部環境対策課
 - 2) 現 茨城県農業総合センター農業研究所
 - 3) 現 茨城県農業総合センター
 - 4) 現 茨城県農林水産部農業経営課

されており（霞ら、2000）、このことがレンコンの生産者育種を効率的に行えない要因と考えられる。一方、レンコンを小規模に栽培した事例として、500L、1,000L、1,700L の強化プラスチック容器を用いた遺伝資源の保存（霞ら、2000）や、0.4a 区画栽培による優良系統選抜（堀井ら、2016）は行われているが、交配育種では目的形質を有する系統を選抜するために多数の特性を評価しなければならないため、栽培容器をさらに小型化し、評価個体数を確保する必要がある。このため本研究では、多数の系統を栽培できる円形 21L 及び 105L を用いて、形状の異なるレンコン 4 系統を栽培し、最も肥大するとされる第 2 節間について、現地栽培よりも簡易な形状評価が可能か検討した。

なお、本稿においてハスのうち食用に供するものを「レンコン」、レンコンの可食部位を「肥大茎」と称する。

2. 材料及び方法

2. 1 画像解析技術を用いた第 2 節間の客観的評価手法の検討

2. 1. 1 供試品種・系統

2020 年及び 2021 年に国内の各産地で生産されたレンコン 23 品種・系統（以下品種・系統を「系統」という）のうち各肥大茎 3 本を供試した（表 1）。

表 1 肥大茎の客観的評価手法の検討に供試した系統一覧

系統名	由 来	産 地	産 年	収集数 ^{f)}
加賀レンコン	中国種（支那白花系） ^{a)}	石川県	2020	11
オオジロ	中国種（支那白花系） ^{a)}	徳島県	2021	3
ロータス	中国種（支那白花系） ^{a)}	徳島県	2021	10
阿波白秀*	「オオジロ」×「ロータス」 ^{b)}	徳島県	2021	7
連島レンコン	中国種（支那白花系） ^{a)}	岡山県	2020	5
岩国レンコン	中国種（支那白花系） ^{a)}	山口県	2020	6
タマミノリ*	「中国」変異株 ^{c)}	茨城県	2021	10
だるま	中国種選抜 ^{a)}	新潟県	2020	4
備中	備中種 ^{a)}	徳島県	2022	5
みらい選抜	茨城民間育成 ^{d)}	茨城県	2021	6
パワー	茨城民間育成 ^{d)}	茨城県	2020	10
湖北の光	茨城民間育成 ^{d)}	茨城県	2021	6
ひたちたから*	茨城民間育成 ^{d)}	茨城県	2020	8
福ダルマ	茨城民間育成 ^{d)}	広島県	2020	3
金澄 34 号	金澄系 ^{c)}	茨城県	2021	6
金澄 39 号	金澄系 ^{d)}	千葉県	2021	7
金澄系系統	金澄系 ^{d)}	千葉県	2021	3
金澄 20 号	金澄系 ^{c)}	新潟県	2020	4
五泉美人	金澄系と新潟在来 ^{a)} の交雑 ^{a)}	新潟県	2020	4
エノモト*	台湾実生選抜 ^{c)}	新潟県	2020	6
吉田種	不明	茨城県	2021	6
早生種	不明	広島県	2020	4
サカモト	不明	広島県	2020	9

a)澤田（2013）より。 b)篠原ら（2021）より。 c)農林水産省品種登録データ検索（2024）より。 d)茨城県調べ。

e)金坂（2010）より。

f)同じ系統の各肥大茎について、同一株からの採取かは未確認だが、Rad-seq 解析により、供試した肥大茎が同一系統であることを確認済み（データ省略）。

*は登録品種（育成者権が消滅したものを含む）を示す

2. 1. 2 肥大茎の調製と画像データの取得

各系統から第 2 節間の肥大茎を採取し、透過型強化ガラスステージ（XY テーブル F3 微調整付：株式会社エス・エフ・シー）上に置き、下から LED 照明を照射して逆光になるように撮影し、第 2 節間の輪郭を明瞭にした画像を取得した。

2. 1. 3 第2節間の根茎肥大指数の測定及び輪郭形状の主成分分析

取得した画像から、画像解析ソフト「Image J」(<https://imagej.net/ij/>)を用いて、各系統の第2節間の最大直径と節間長を測定し(図1)、根茎肥大指数(最大直径/節間長)(Masuda et al., 2006)を算出した。

また、撮影画像は形状解析ソフト「SHAPE」(Iwata and Ukai, 2002)を用いて、楕円フーリエ記述子により、肥大形状の主成分分析を行った。このとき、楕円フーリエ記述子の数は20とし、計80個の展開係数で形状を記述した。

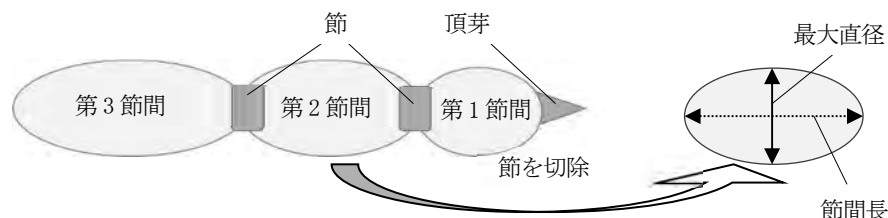


図1 レンコンの根茎肥大指数の算出部位

2. 2 小型容器の活用による第2節間形状の評価

2. 2. 1 供試系統

後述する3.1の結果に基づき、短節間系統として主に茨城県で栽培される‘みらい選抜’及び‘パワー’、中節間系統として主に新潟県で栽培される‘だるま’、長節間系統として主に徳島県で栽培される‘備中’をそれぞれ供試した。

2. 2. 2 小型容器栽培による第2節間形状の比較

2023年4月下旬に、生物工学研究所内の屋外圃場に、円柱形21L容器(直径305mm×深さ295mm)及び105L容器(直径646mm×深さ320mm)を設置し、容量の約8割の用土を詰め、茨城県野菜栽培基準(令和4年3月)のレンコン露地栽培基準量に従って基肥を施肥後湛水し、種ハス1本(全長30cm程度で節数3~4本、芽数は3~4芽(備中においては節数2~3本、芽数は2~3芽))を定植した。湛水状態を維持して栽培管理を行い、6月下旬に前述の基準に従って追肥した。収穫は11月下旬から12月上旬に行い、得られたレンコン全ての第2節間を全て調査した。試験は各系統1区10反復で行った。

対照は、現地圃場での慣行栽培で第1から3節間までが30cm以上となったレンコン(同一圃場で生産)とし、‘パワー’、‘だるま’、‘備中’についてはそれぞれ茨城県土浦市、新潟県長岡市、徳島県鳴門市の2023年作、‘みらい選抜’については茨城県土浦市の2022年作とした。

各区において、第2節間の根茎肥大指数を、試験2.1.2の手法により調製し画像データを取得した後、試験2.1.3の手法により算出した。

各試験区で収穫した第2節間は、試験2.1.2の手法により調製し画像データを取得した後、試験2.1.3の手法により根茎肥大指数を算出した。各系統の根茎肥大指数は、EZR version1.68(Kanda, 2013)を用いて、Steel-Dwassによる多重比較を行った。

3. 結果及び考察

3. 1 画像解析技術を用いた第2節間形状の客観的評価手法の検討

レンコン23系統の第2節間形状を主成分分析した結果、第一、第二主成分の寄与率はそれぞれ95.2%、1.0%となり、第一主成分で形状の殆どが決定できることが示された(図2)。

各系統の根茎肥大指数は0.40~0.86の範囲で広く分布し(表2)、各系統の根茎肥大指数は形状の第一主成分と高い相関($r^2=0.993$)を示した。各系統の根茎肥大指数について、得られた指数の平均値の最小値(0.4)、最大値(0.86)の範囲を3分割し、0.55未満を長節間系統、0.55以上~0.70未満を中節間系統、0.70以上を短節間系統として分類した。篠原ら(2016)は、レンコンを由来別(‘備中種’、‘中国種’、‘金澄系’、‘その他’)に分類し、その肥大指数を比較すると、‘備中種’が小さく、‘金澄系’と‘その他’が大きく、‘中国種’は

その中間であることを報告している。筆者らの分類においては、中国種である‘ロータス’が長節間系統に分類されたものの、それ以外の系統については同様の傾向が得られた。

第2節間の根茎肥大指数はその形状に対する寄与率が高いだけでなく、算出が容易であることから、レンコン育種の形状評価において有効な手法と考えられる。一方で、これまで数値化した評価が困難だった肩張りについては、その決定に関わる主成分は検出されなかった。

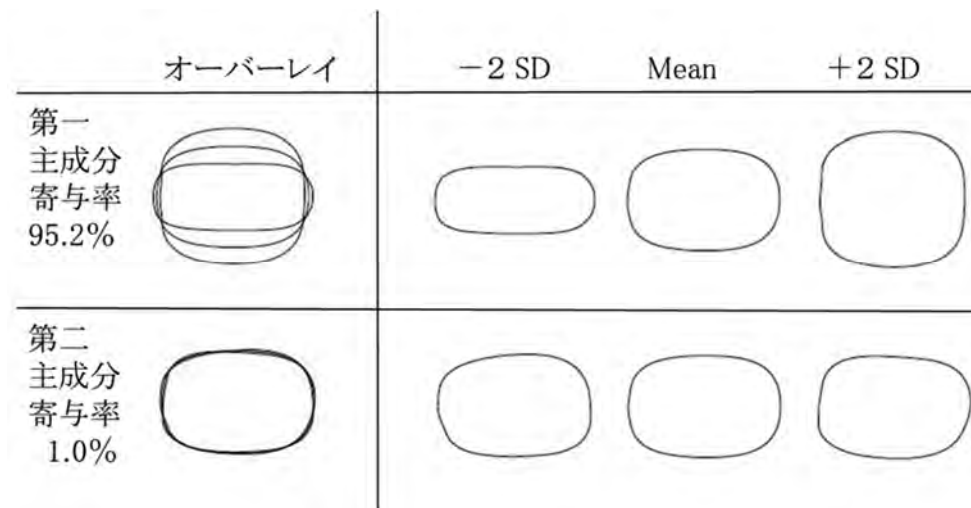


図2 形状解析ソフト「SHAPE」により抽出された第2節間形状に係る主成分とその形状

形状解析ソフト「SHAPE」により主成分として抽出された形状特徴を、楕円フーリエ記述子により再計算し、視覚化したもの。各主成分について、Mean は第一主成分が0に当たる形状を表し、 $\pm 2SD$ (標準偏差) は Mean (平均値) と標準偏差の2倍の和 (または差) の主成分値に相当する形状を示している。

表2 供試系統の第2節間の根茎肥大指数

系統名	根茎肥大指数 $\pm SD$	形状 分類	系統名	根茎肥大指数 $\pm SD$	形状 分類
加賀レンコン	0.60 ± 0.008	中節間	ひたちたから	0.73 ± 0.078	短節間
オオジロ	0.55 ± 0.034	中節間	福ダルマ	0.67 ± 0.007	中節間
ロータス	0.50 ± 0.056	長節間	金澄34号	0.78 ± 0.091	短節間
阿波白秀	0.59 ± 0.029	中節間	金澄39号	0.80 ± 0.023	短節間
連島レンコン	0.61 ± 0.010	中節間	金澄系系統	0.86 ± 0.033	短節間
岩国レンコン	0.58 ± 0.044	中節間	金澄20号	0.73 ± 0.053	短節間
タマミノリ	0.79 ± 0.071	短節間	五泉美人	0.62 ± 0.033	中節間
だるま	0.58 ± 0.020	中節間	エノモト	0.78 ± 0.007	短節間
備中	0.40 ± 0.029	長節間	吉田種	0.66 ± 0.015	中節間
みらい選抜	0.78 ± 0.086	短節間	早生種	0.72 ± 0.055	短節間
パワー	0.71 ± 0.031	短節間	サカモト	0.79 ± 0.068	短節間
湖北の光	0.64 ± 0.048	中節間			

表中の根茎肥大指数及びSD (標準偏差) の値は、それぞれ供試した各系統3本の指数の平均値及びそのSD (標準偏差)。第2節間の分類は、0.55未満を長節間系統、0.55以上～0.70未満を中節間系統、0.70以上を短節間系統として分類した。

3. 2 小型容器の活用による第2節間形状の評価

第2節間の形状が異なる供試4系統について、現地栽培における根茎肥大指数を比較した結果、短節間系統の‘パワー’及び‘みらい選抜’、中節間系統の‘だるま’、長節間系統の‘備中’グループ間で5%水準の有意差が検出された (図3)。円形21L及び105Lの小型容器栽培で栽培した供試4系統についても同様に、根茎肥大指数を比較した結果、短節間系統の‘パワー’及び‘みらい選抜’についてはそれぞれ0.64～1.08及び0.76～1.11、中節間系統の‘だるま’については0.55～0.75、長節間系統の‘備中’については0.35～0.50とグループ間で5%水準の有意差が検出され、現地栽培の傾向と同様の結果を示した。このことから、小型容器を用いた栽培により、各系統の第2節間を短節間、中節間、長節間の形状別に分けることができると推察された。

一方、円形 105L 容器で栽培した‘パワー’は根茎肥大指数のばらつきが大きく (0.64~1.05)、円形 21L 容器で栽培した‘みらい選抜’は現地栽培の根茎肥大指数 (0.71~0.79 (外れ値を除く)) よりも大きい値 (0.87~1.11 (外れ値を除く)) となった。この要因として、生育中に容器の縁に沿うようにしてランナーが伸長するため、小型容器栽培によって形成されたレンコンの形状が全体的に湾曲してしまうこと、現地栽培では物理的な障壁がないためストレスなく肥大できることが考えられる。以上のように、小型容器栽培では形状のばらつきが現地栽培に比べて大きくなる傾向にあるため、実際の育種においては、1 次選抜等の系統選抜の早い段階において活用することが有用と考えられる。

江頭ら (2007) は、レンコン‘さが白祥’育成の際に形状評価を行う 1 次選抜として、直径 60cm×深さ 35cm の容器による栽培を行っているが、これまでレンコンの容器サイズによる肥大茎形状の変化については報告が無かった。本試験により、形状評価に適する容器サイズが明らかとなり、効率的な育種選抜に資すると考えられる。また、現地と小型容器は系統間において同様な節間の傾向を示したが、小型容器のばらつきが大きいことを根茎肥大指数により客観的に表すことができた。節間形状の数値化が図れたことで、従来の主観的な指数評価では難しかったばらつきの把握や形状データの蓄積が容易となり、より詳細な節間形状の比較や統計処理が可能となった。

本研究は、第 2 節間の肥大茎を用いてその形状の定量的評価手法を開発するとともに、本評価手法を用いて小型容器で栽培した肥大茎を比較することにより、現地栽培よりも簡易に短、中、長の形状を評価できることを示した。これらの評価手法を用いて、レンコン育種を効率化することにより、消費者ニーズに即した選抜を行うことが可能である。

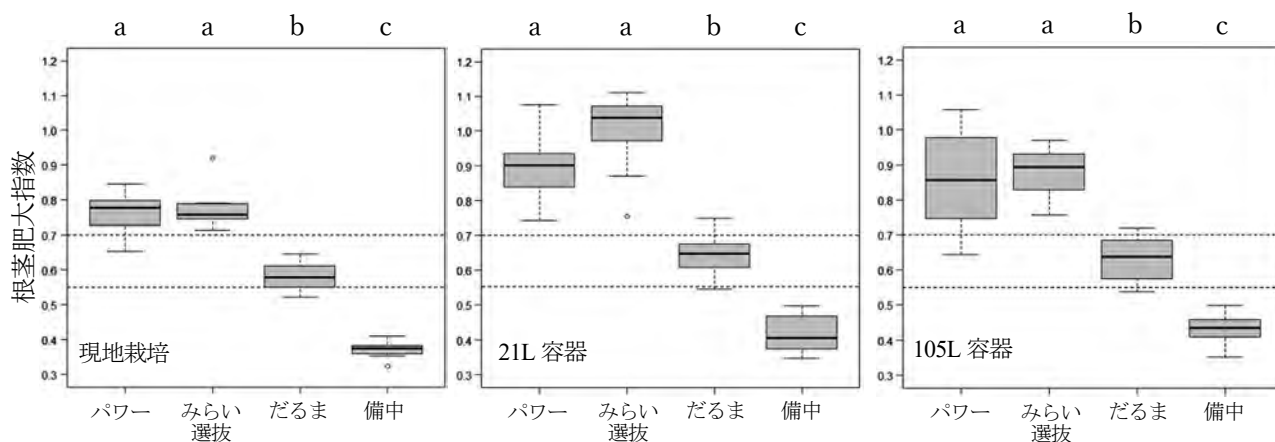


図3 現地栽培及び小型容器栽培における系統別肥大茎第2節間の根茎肥大指数の比較

サンプル数について、現地栽培の‘みらい選抜’は7、21L 容器の‘だるま’は9、その他はすべて10である。箱ひげ図中の中央太線は中央値、箱の上端は第三四分位、下端は第一四分位を示す。ひげの長さは四分位範囲 (IQR) の 1.5 倍 (上限=第三四分位数+1.5×IQR、下限=第一四分位数-1.5×IQR) とし、外れ値は○で示した。Steel-Dwass の多重比較により異なる小文字アルファベット間で5%水準の有意差があることを示す。

図中の破線は、第2節間の形状分類の境界を示し、0.55未満を長節間系統、0.55以上~0.70未満を中節間系統、0.70以上を短節間系統として分類した。

謝辞

土浦市レンコン生産者の橘氏、徳島県立農林水産総合技術支援センターの篠原氏及びJA えちご中越の長谷川氏には本研究における肥大茎サンプルの提供にご協力いただきました。また、県南農林事務所経営・普及部門、農業総合センター園芸研究所、生物工学研究所の皆さまにはサンプル収集のための連絡調整やレンコンのサンプル調製にご尽力いただきました。ここに感謝申し上げます。

付記

本研究は、文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業補助金」により実施した。

引用文献

- 江頭淳二・甲斐田健史・山口史子・尾崎行生・森 欣也(2007)レンコン新品種「さが白祥」の育成. 佐賀農セ研報 34 : 29-40.
- 堀井 学・八城和敏・島本桂介・貝塚隆史・金子賢一・石井亮二 (2016) 茨城県における年内掘りに適したレンコン優良系統の選抜. 茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告 15 : 41-51.
- 茨城県農業総合センター (2022) 茨城県野菜栽培基準 (III根菜類、10 レンコン) : 172-175.
- Iwata, H., Ukai, Y. (2002) SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors, *Journal of Heredity* 93:384-385.
- 金坂孝澄 (2010) レンコン品種, 金澄 20 号・34 号・36 号の育成. 農林水産研究ジャーナル 33 : 16-19.
- Kanda, Y. (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics, *Bone Marrow Transplantation* 48:452-458.
- 霞 正一・八城和敏・佐久間文雄・林 幹夫 (2000) 繊維強化プラスチック製大型容器を用いた食用ハス遺伝資源の簡易保存と交配育種への利用. 茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告 3 : 59-65.
- 霞 正一 (2003) 食用ハスの交配育種法. 茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告 6 : 31-42.
- Maeda, H., Akagi, T., Onoue, N., Kono, A. and Tao, R. (2019) Evolution of Lineage-Specific Gene Networks Underlying the Considerable Fruit Shape Diversity in Persimmon, *Plant Cell Physiology* 60:2464-2477.
- Masuda, J., Urakawa, T., Ozaki, Y and Okubo, H. (2006) Short photoperiod induces dormancy in Lotus (*Nelumbo nucifera*), *Annals of Botany* 97:39-45.
- 農林水産省(2023) 令和 4 年産野菜生産出荷統計 (http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/nougyou_sansyutu/index.html) (2024 年 10 月 30 日アクセス)
- 農林水産省(2024) 品種登録データ検索 (<https://www.hinshu2.maff.go.jp/vips/cmm/apCMM110.aspx?MOSS=1>) (2024 年 10 月 30 日アクセス)
- 尾崎行生 (2013): レンコン基礎編レンコン＝植物としての特性. 農業技術大系野菜編, 農文協 (東京), 10.追録. 38 号 : 3-6.
- 澤田英司 (2013): レンコン基礎編レンコン＝植物としての特性. 農業技術大系野菜編, 農文協 (東京), 10.追録. 38 号 : 25-32.
- Shimomura, K., Horie, H., Sugiyama, M., Kawazu, Y., Yoshioka, Y. (2016) Quantitative evaluation of cucumber fruit texture and shape traits reveals extensive diversity and differentiation, *Scientia Horticulturae* 199:133-141.
- 篠原啓子・山本真也・佐藤章裕・津田毅彦・吉原 均・佐藤泰三・沢田英司・板東一宏・村井恒治(2021) レンコン新品種「阿波白秀」の育成とその特性. 徳島県立農林水産総合技術支援センター 研究報告 8 : 9-16.
- 篠原啓子・圓藤勝義・澤田英司・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. 徳島県立農林水産総合技術支援センター 研究報告 3 : 7-13.

Establishment of Shape Evaluation Indices for Edible Lotus Breeding and Their Application in Small Container Cultivation

**Chikashi NAGAYAMA¹,Yuu KASHIWAGI,Yuki HIRAMATSU,Takaori ODERA,
Maki KUZUYA and Tomoko ISHIKAWA**

Summary

To evaluate the shape of domestically-produced edible lotus (*Nelumbo nucifera*), the second internodes of enlarged stems from 23 varieties and lines were analyzed using “SHAPE”, a piece of shape analysis software, through principal component analysis. The results revealed that the first principal component had an extremely high contribution rate of 95.2% and showed a strong correlation ($r^2=0.99$) with the rhizome enlargement index (maximum diameter of the enlarged stem/internode length).

Furthermore, four lines classified into three enlarged stem shapes (short, medium, and long internodes) were cultivated in small circular containers of 21 L and 105 L, and the rhizome enlargement index of the second internode was compared with that of field-grown edible lotus. The results suggested that the differences among lines observed in field cultivation could also be evaluated using either of the small containers.

These findings indicate that the shape of the enlarged stem in the second internode can be estimated using the rhizome enlargement index, calculated from the maximum diameter and internode length, based on plants cultivated in small containers holding 21 L and 105 L.

Keywords: lotus root, breeding, rhizome enlargement index, principal component analysis, small container

¹ Address: Environmental Management Division,Department of Residential and Environmental Affairs, 978-6 Kasahara-cho, Mito, Ibaraki 310-8555, Japan

ニホンナシ ‘幸水’ における 1 本主枝列植仕立てと側部根域制限の効果

石川佳歩・山口貴史¹⁾・加川敬祐²⁾・田中館志都・寺門 巖

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

要約

ニホンナシ栽培においては改植後の苗木の生育が抑制されず、早期に収量を確保できる改植技術が求められている。早期成園化効果が認められている樹体ジョイント仕立ては、育苗やジョイント作業の手間が課題となっているため、より簡便な方法を検証した。本研究では 1 年生苗を株間 1.0m 間隔で栽植して 1 本主枝仕立てにすると、定植 5 年目に 2.0t/10a の換算収量を得ることができ、早期収量確保が可能な技術として期待できることを明らかにした。ただし、側枝の養成や配枝、着果数の調整に留意する必要がある。また、側部の根域を遮根シートにより制限すると、一般的な根域制限と同様の影響がみられるとともに、水源の確保が困難なほ場における改植技術として有効な可能性がある。

キーワード：ニホンナシ、早期多収、果実品質、根域制限

1. はじめに

茨城県におけるナシ生産は、主要品種の ‘幸水’ を中心に高齢樹化による収量低下が顕著であり、改植が必要となっている。ナシの改植は前作樹の跡地に再定植することが多く、いや地現象や白紋羽病発生等により苗木の生育が劣ることで樹冠拡大が進みにくく、改植後の収量が計画通りに回復しない事例が散見される。また、本県の慣行栽培は、折衷式肋骨型の 3 本主枝仕立てが主流で、枝の強弱をふまえた樹冠拡大や冬季剪定時における結果母枝の配枝等に高度な技術を必要とするうえ成園化までに長期間を要し、管理作業の省力化・効率化が困難であるため規模拡大を妨げる要因となっている。

一方で、神奈川県が開発した樹体ジョイント仕立ては「樹と樹をつなげる」栽培方法であり、樹の主枝の先端を隣接した樹の主幹部の近いところに接ぐ仕立て法である（柴田・川嶋、2012）。この仕立て法は樹冠拡大に高度な技術を必要とせず、人工授粉、摘果や剪定等の管理作業の導線が一定方向になり作業時間が大幅に短縮できることに加えて、早期成園化の効果が確認されていることからこれまでの課題であった規模拡大や新規参入を可能とする技術である（農林水産省、2024；角脇、2019）。しかし、本県において樹体ジョイント仕立ては、大苗育苗や接ぎ木作業等に手間がかかることが導入を阻む要因の一つになっている。

また、白紋羽病防除技術方法として温水点滴処理が開発されているが、処理後に再感染する事例が確認されており、より効果的な対策が求められている。定植苗木の根域を罹病土壌と隔離することで白紋羽病発生リスクの低減が期待できるが、根域の水平・垂直方向とも制限する栽培方法は、灌水を必須とすることが取り組みの障壁となっている。そこで、大苗育苗や接ぎ木を必要としない列状密植栽培法、かつ、側部のみの根域制限がナシ樹へ与える影響について検討し、早期収量確保を可能とする改植技術を開発することを目的とした。

2. 材料および方法

2. 1 栽植方法

側部根域制限処理区は、定植前に油圧ショベルを用いて幅 70cm、深さ 100cm の溝を掘り、埋め戻す前に溝の両側に遮根シートを設置して側部の根域を制限することで周囲の土壌から隔離し、土を埋め戻した後に高温水点滴処理（滴下温度 60℃に設定）を行った。土壌処理を行った後、2018 年 12 月に ‘幸水’ 1 年生苗を株間 1.0m（10 本/試験区）と株間 1.5m（7 本/試験区）でそれぞれ定植した。1 本主枝列植 1.0m 区は、定植後に長さ 330cm ～350cm 程度の 1 年生苗を約 200cm で切り戻して、主幹・主枝とした。1 本主枝列植 1.5m 区は、定植後に長さ

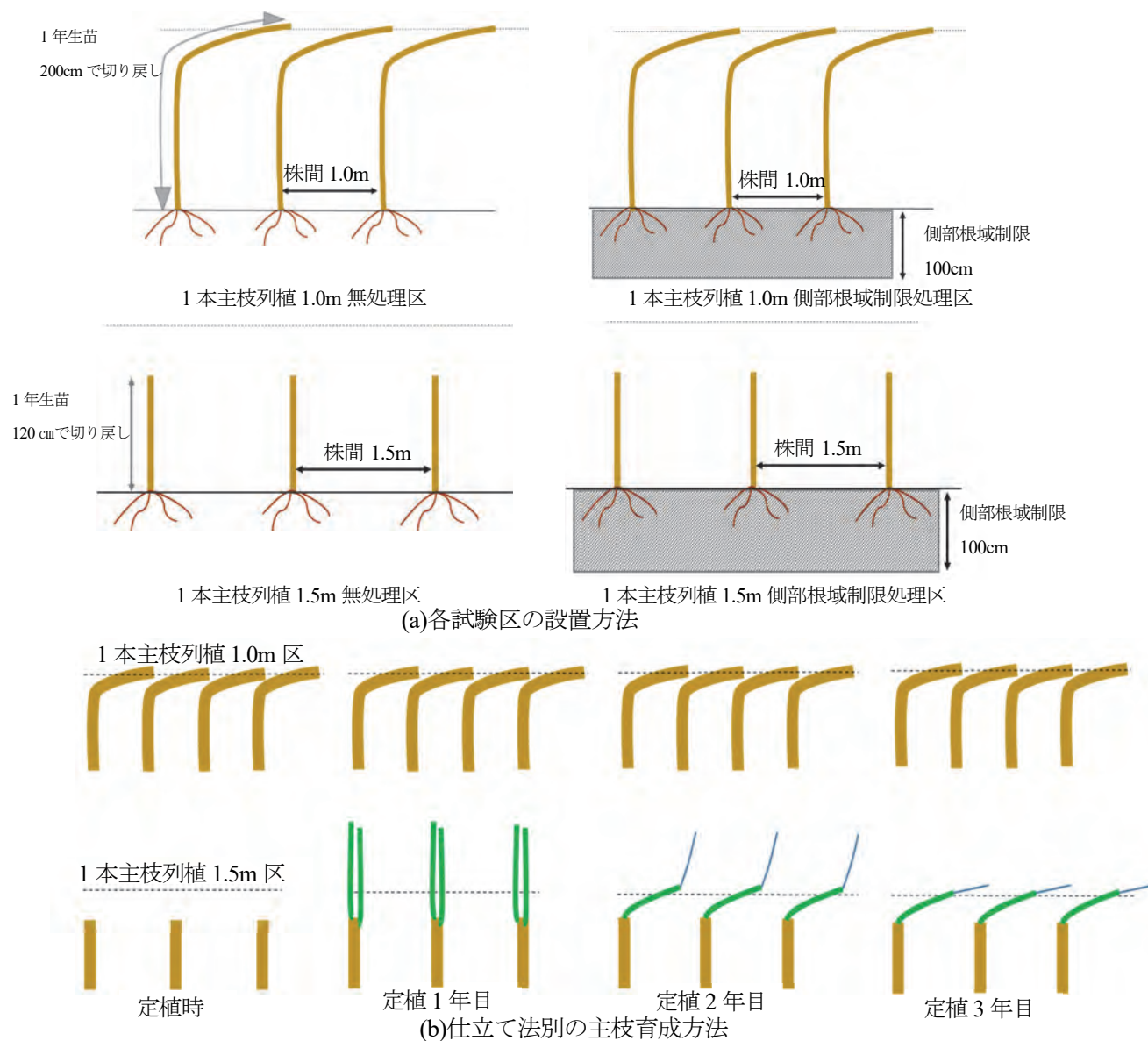
1) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究部門作物デザイン研究領域作物デザイン開発グループ

2) 茨城農業総合センター農業大学校

120cm で切り戻した（図 1-a）。1 本主枝列植 1.5m 区では、切り戻しにより発生した強い新梢 2 本を主枝候補として 1 年間育成し、定植 1 年目の冬季に生育の良い新梢を選び主枝とした。定植 2 年目は、1 本主枝列植 1.0m 区では側枝の先端以外の芽から発生した新梢を 5 月下旬に摘心し、再伸長した新梢を 7 月下旬に約 45 度に誘引した。1 本主枝列植 1.5m 区では、主枝延長枝の伸長状況にあわせて支柱へ誘引した（図 1-b）。定植 3 年目以降は、満開後 20 日以内を目安に 1 果そう 1 果に摘果し（予備摘果）、満開後 40 日以内を目安に 3 果そう 1 果に摘果（本摘果）を行った。また、側枝上や予備枝上に発生した新梢を 6 月上旬、7 月上旬の計 2 回摘心した。定植 5 年目の試験樹の状況を図 2 に示した。なお、栽培管理については茨城県の果樹栽培基準を参考にし、防除は茨城県の露地赤ナシ無袋栽培病害虫参考防除例に準じて行った。

収穫方法は、2021 年（定植 3 年目）および 2022 年（定植 4 年目）は、試験区別の満開後 120 日で一斉に行い、2023 年（定植 5 年目）はニホンナシ（地色）カラーチャート値 2.5～3.0 を目安に適期収穫を行った。果実の品質調査は、全果実の 1 果重、青果物非破壊糖度計（クボタ社製）を用いて赤道面 2 か所の糖度（° Brix）を測定した。

生育調査は落葉後に新梢発生数、総新梢長、側枝数および側枝長を測定した。根群調査は 2024 年 7 月に根を掘り取り、根の長さや分布について調査を行った。



注) 側枝を省略し、主枝または主枝候補枝のみ描画。また、点線はナシ棚を示している

図 1 各試験区の設置方法(a)および 1 本主枝列植樹形の主枝育成方法(b)



注) 図の矢印は、主幹・主枝の方向を示している

図2 1本主枝列植樹形定植5年目の状況(写真:令和5年6月)

3. 結果

3.1 仕立て法と側部根域制限処理が樹体生育に及ぼす影響

生育調査の結果を表1に示した。側枝数について仕立て法による影響を比較すると、1本主枝列植1.0m区は定植2年目で側枝が確保できたが、1本主枝列植1.5m区では定植3年目からの確保となり、前者よりも1年遅れた。

10aあたりの総側枝長について仕立て法による影響を比較すると、定植3年目および定植4年目において1本主枝列植1.0m区が有意に長い結果となったが、定植5年目において1本主枝列植1.0m区と1本主枝列植1.5m区間の有意な差は認められなかった。一方側部根域制限による影響を比較すると、1本主枝列植1.0m区ではいずれの年も無処理区の方が長かったが、1本主枝列植1.5m区では定植3年目は側部根域制限処理区の方が長く、定植4年目以降は無処理区の方が長かった。

平均新梢長については、仕立て法による有意差は認められなかった。側部根域制限処理による影響を比較すると、定植3年目および5年目は無処理区が有意に長かった。

総新梢長について仕立て法による影響を比較すると、定植2年目は1本主枝列植1.0m無処理区で1182cmと有意に長かったが、定植3年目以降は有意差が認められなかった。側部根域制限処理による影響を比較すると、1本主枝列植1.0m区ではいずれの年も無処理区の方が長かったが、1本主枝列植1.5m区では定植2年目は側部根域制限処理区の方が長く、定植3年目から4年目の総側枝長および定植2年目の新梢長については、交互作用の有意性が認められた。

表1 仕立て法と側部根域制限処理が定植2年目から5年目‘幸水’の生育に及ぼす影響

	栽植	根域制限	定植2年目	定植3年目	定植4年目	定植5年目
側枝数(本/樹)	1本主枝列植1.0m	無処理	2.7	6.9	7.7	5.8
		側部根域制限	3.2	4.8	5.6	5.8
	1本主枝列植1.5m	無処理	0	3.0	6.5	8.0
		側部根域制限	0	3.1	5.9	7.4
	有意差 ²⁾	仕立て法	***	n.s.	n.s.	***
		根域制限	n.s.	***	**	n.s.
		交互作用	n.s.	*	n.s.	n.s.
総側枝長(m/10a) ¹⁾	1本主枝列植1.0m	無処理	770	2174	2822	2452
		側部根域制限	500	1251	1707	1829
	1本主枝列植1.5m	無処理	0	352	1027	1796
		側部根域制限	0	468	951	1704
	有意差	仕立て法	***	***	***	n.s.
		根域制限	n.s.	*	**	*
		交互作用	n.s.	**	*	n.s.
平均新梢長(cm)	1本主枝列植1.0m	無処理	70	81.9	- ⁴⁾	81.7
		側部根域制限	49	42.5	-	70.4
	1本主枝列植1.5m	無処理	96	99.3	-	84.2
		側部根域制限	76	89.7	-	73.7
	有意差	仕立て法	n.s.	n.s.	-	n.s.
		根域制限	n.s.	***	-	***
		交互作用	n.s.	n.s.	-	n.s.
総新梢長(cm/樹)	1本主枝列植1.0m	無処理	1182	1269	-	2846
		側部根域制限	613	523	-	1845
	1本主枝列植1.5m	無処理	598 ³⁾	827	-	3138
		側部根域制限	686	761	-	2201
	有意差	仕立て法	*	n.s.	-	n.s.
		根域制限	**	***	-	**
		交互作用	**	n.s.	-	n.s.

1) 10aあたりの総側枝長は、樹冠面積占有率を8割程度とし、1本主枝列植1.0m区は222本植え(栽植間隔1.0m×3.6m)、1本主枝列植1.5m区は148本植え(栽植間隔1.5m×3.6m)としたうえで、各試験区の1樹当たり側枝長より換算

2) 二元配置分散分析により*は5%、**は1%、***は0.1%水準で有意差あり、n.s.は有意差なし

3) 供試樹7樹のうち1樹で新梢伸長が劣っており、他の供試樹より主枝育成に時間を要した

4) -で示している箇所は未測定のため、データ無し

3. 2 仕立て法と側部根域制限処理が定植3年目から定植5年目の果実品質に及ぼす影響

着果数について仕立て法による影響を比較すると、定植3年目および定植4年目では1本主枝列植1.0m区の方が有意に多かったが、定植5年目には試験区間で着果数の有意差は認められなかった(表2)。1果重について、定植3年目はいずれの試験区でも300g未満であり有意差がなく、定植4年目には1本主枝列植1.0m区で300g未満、1本主枝列植1.5m区では300g以上となったものの有意差はなかった。定植5年目にはいずれの仕立てでも300g以上となり、1本主枝列植1.0m区で384gと有意に大きかった。

同じ仕立て間において側部根域制限の有無で比較すると、定植 5 年目の 1 本主枝列植 1.5m 区を除いて、側部根域制限処理区の方が無処理区と比較し 1 果重が小さくなる傾向が見られたが有意差はなかった。また糖度については、果実を一斉収穫した定植 3 年目と定植 4 年目では側部根域制限処理を行うと高くなる結果が得られた。一方で地色カラーチャート値による適期収穫を行った定植 5 年目においては、無処理区の方が有意に高かった。

表 2 仕立て法と側部根域制限処理が定植 3 年目から 5 年目「幸水」の果実品質に及ぼす影響

試験区		1果重 ¹⁾			着果数(個/m ²)			糖度 (° Brix) ²⁾		
栽植	根域制限	定植3年目	定植4年目	定植5年目	定植3年目	定植4年目	定植5年目	定植3年目	定植4年目	定植5年目
1本主枝列植1.0m	無処理	244	299	384	7.7	6.4	6.5	12.1	11.7	14.0
	側部根域制限	230	286	330	5.1	4.9	6.5	13.1	12.0	13.5
1本主枝列植1.5m	無処理	249	343	314	1.1	1.6	4.8	12.4	12.5	13.7
	側部根域制限	237	304	367	1.1	2.2	3.7	13.0	13.0	13.3
有意差 ³⁾	仕立て法	n.s.	n.s.	*	***	**	n.s.	*	***	n.s.
	根域制限	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	*
	交互作用	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

1) 1 果重は、各試験区で収穫した果実の合計の重量を個数で割った値であり、試験区のすべての果実の平均値

2) 定植 3 年目・4 年目は満開後 120 日で一斉収穫、定植 5 年目は地色カラーチャート値 2.5～3.0 目安で適期収穫

3) 二元配置分散分析により、*は 5%、**は 1%、***は 0.1%水準で有意差あり、n.s.は有意差なし

3. 3 仕立て法と側部根域制限処理が定植 2 年目から定植 5 年目の収量に及ぼす影響

定植 2 年目では、1 本主枝列植 1.0m 区のみで収量が得られた (表 3)。定植 3 年目以降の換算収量は、1 本主枝列植 1.0m 無処理区で最も多く推移した。対して、1 本主枝列植 1.5m 区は、1 本主枝列植 1.0m 区より主枝の生育に 1 年長くかかり、棚付けが 1 年遅れている。そのため、定植 3 年目と 4 年目は 1.0t/10a 未満で推移し、定植 5 年目で 1.0t/10a を超える結果となった。

側部根域制限処理の有無による有意差は、単年の収量では認められなかったが、4 年間の累積換算収量では認められた。また、定植 2 年目から定植 5 年目の累積換算収量は、1 本主枝列植 1.0m 無処理区で 5.2t/10a となり、最も多い結果となった。

表 3 仕立て法と側部根域制限処理が定植 2 年目から 5 年目「幸水」の収量に及ぼす影響

栽植		根域制限	樹数(本)	定植2年目	定植3年目	定植4年目	定植5年目	累積収量
1本主枝列植1.0m		無処理	10	0.1	1.5	1.6	2.0	5.2
		側部根域制限	10	0.1	0.9	1.1	1.7	3.9
1) 1本主枝列植1.5m		無処理	7	0	0.3	0.5	1.2	2.0
		側部根域制限	7	0	0.2	0.7	1.1	1.9
有意差 ²⁾		仕立て法	-	n.s.	***	***	***	**
		根域制限	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***
		交互作用	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

1) 10a あたりの換算収量は、樹冠面積占有率を 8 割程度とし、1 本主枝列植 1.0m 区は 222 本植え (栽植間隔 1.0m×3.6m)、1 本主枝列植 1.5m 区は 148 本植え (栽植間隔 1.5m×3.6m) としたうえで、各試験区の 1 樹当たり収量より換算

2) 二元配置分散分析により、*は 5%、**は 1%、***は 0.1%水準で有意差あり、n.s.は有意差なし

3. 4 側部根域制限処理が根に及ぼす影響

1 本主枝列植 1.0m 区において、側部根域制限処理の有無での根の状態について比較をした (図 3)。側部根域制限処理区の根については、直下根があり、細根が表面 (表層近く) に多く根密度が高い様子が見られた (図 3-a)。無処理区の根については、横に広がる長い根が多く、前者と比較して細根が少ない様子が確認できた (図 3-b)。



(a)側部根域制限処理区での根の様子



(b)無処理区での根の様子

図3 側部根域制限の有無による根の違い

4. 考察

4. 1 仕立て法の違いが及ぼす影響について

苗木定植と同時に主枝骨格が完成した1本主枝列植1.0m区は、定植2年目から側枝を確保でき、定植5年目には換算収量2.0t/10aを得ることができた。これは、予備枝として使用できる短い新梢が定植1年目から安定して発生し（データ省略）、側枝の養成や更新を計画的に行うことができたことに起因していると考えられる。このことは定植3、4年目の側枝に関するデータ（側枝数および総側枝長）における仕立て法と根域制限処理におけるデータ間の交互作用にも現れている。すなわち、1本主枝列植1.5m区では、無処理区においても3、4年目における新梢生育が十分でなく、根域制限による生育抑制効果がマスクされていることを示している。また、定植5年目までの累積換算収量は、同じほ場条件でジョイント仕立てにした場合と同等の収量であった。1果重は定植3年目および定植4年目に300g未満となり、県の栽培基準で目標値としている350gを下回ったが、定植5年目には同様の着果数で1果重が384gとなっているため、定植3年目および4年目では樹齢に対して着果数調整を行うことで、収量を維持しつつ1果重が目標値に近づく可能性がある。

一方で、1本主枝列植1.5m区は、定植4年目まで着果数が2個/m²以下と安定せず、定植5年目までの累積換算収量は、1本主枝列植1.0m区と比較して少なかった。これは、苗木定植後3年目まで主枝の育成を続けたことで、早期に十分な側枝が確保できなかったうえに、新梢生育に養分が配分され着果数が少なくても果実肥大が劣る傾向にあったことに起因すると考えられる。株間1.5mにする場合は2年生の大苗を供試し、定植時に主枝骨格が完成することで、早期に十分な収量を得られた可能性がある。

これらのことから、1年生苗を株間1.0mで列植して1本主枝仕立てとする栽培方法は、早い段階で枝が確保でき早期収量確保が可能な技術であると考えられる。さらに、樹体ジョイント栽培で必要とされている大苗育苗の必要がなく、接ぎ木作業も必要としないため、導入を阻む要因が少ない改植技術であると考えられる。ただし、定植4年目までの若樹齢期に成木と同様の着果負担をかけると、1果重が小さくなる傾向にあるため、各樹齢における着果量を考慮して着果管理をする必要がある。

4. 2 側部根域制限処理が及ぼす影響について

1本主枝列植1.0m区と1本主枝列植1.5m区それぞれにおいて側部根域制限処理の有無で比較すると、1果重に関して有意差は認められないものの、定植5年目の1本主枝列植1.5m区を除いて処理区の方が小さい傾向になり、また糖度は、一斉収穫した定植3年目・定植4年目では側部根域制限処理区の方が高い傾向になった。果樹栽培において根域制限を行うと、果実は小さい傾向になるが、糖度は高くなるとされており（茨城県園芸研究所 プロジェクト研究チームナシグループ、2008a；松本ら、2006）、今回の結果と矛盾していない。一方で、定植5年目に地色を基準として適期収穫を行ったところ、糖度は無処理区の方が有意に高くなったが、側部根域

制限処理区は無処理区より地色の変化が早く進み、収穫最盛期は側部根域制限処理を行った試験区の方が 2 日早くなった（データ省略）。これらのことから、側部根域制限処理によって単に糖度が高くなるのではなく、果実の成熟期が前進することで、一斉収穫した場合には平均糖度が高くなる可能性が示唆された。

側部根域制限処理による生育の影響に関して、総側枝長、総新梢長および平均新梢長において側部根域制限処理を行った試験区の方が有意に短かった。この結果は、根域制限により新梢長が短くなるという既往報告（茨城県園芸研究所 プロジェクト研究チームナシグループ、2008b）と矛盾しておらず、側部根域制限処理を行うと生育が抑制されていると考えられる。

根域制限処理を行うと、根や地上部の成長が抑制され地上部に比べ根の乾物割合が高く、細根の比率が増加し、根密度も高くなる（児玉ら、2015）。定植 6 年目の時点で側部根域制限処理区と無処理区の根を比較すると、前者は太い直下根があり、地上近くに細根が広がっていたのに対して、後者は地上近くに長い根を張っており、細根はあまり見られなかった。これらのことから今回は側部のみの根域制限であったが、果実品質、生育および根の発育に従来の根域制限で報告されたものと同様の影響を及ぼすことが明らかになった。また、根底を含めた完全な根域制限では灌水が必要となるが、今回の試験中には灌水を行っておらず、2024 年のような 7 月の降水量が平年を大幅に下回る年においても生育不良にならなかったため、側部のみの根域制限は水源の確保が困難なほ場でも栽培が可能であることが示唆された。また、白紋羽病発生ほ場では側部根域制限と客土を組み合わせることにより白紋羽病の感染を遅らせ、収量確保につながるという成果報告があり（茨城県園芸研究所研究成果、2024）、難改植ほ場においても側部根域制限技術を活用できる可能性があると考えられる。しかし、側部根域制限処理を行うと 1 果重が小さくなる傾向がみられるため、着果管理に留意する必要がある。

引用文献

- 茨城県園芸研究所、プロジェクト研究チームナシグループ（2008a）成果報告。「ナシの根域容量を小さくすると果実の糖度及び硬度は高くなり生育は抑制される」
- 茨城県園芸研究所、プロジェクト研究チームナシグループ（2008b）成果報告。「ナシ高畝マルチ栽培における底部根域制限が果実糖度及び収穫期に及ぼす効果」
- 茨城県園芸研究所、果樹研究室（2024）研究報告。「白紋羽病発生跡地におけるナシの根域管理技術の効果」
- 角脇俊彦（2019）日本ナシのジョイント栽培による県育成新品種の生産拡大. 果実日本 74（1）：55-58
- 児玉龍彦・加藤 恵・福田浩幸（2015）ニホンナシ「幸水」の根域制限栽培における根群分布. 佐賀県研究成果情報
- 柴田健一郎・川嶋幸喜（2012）樹木の樹体ジョイント仕立て法. 特許第 4895249 号.
- 農林水産省（2024）果樹をめぐる情勢【別冊】省力樹形に関する資料.
- 松本和紀・矢羽田第二郎・牛島孝策・栗原 実. 2006. ワセウンシュウの高うねマルチ栽培における根域制限方法と生育、収量、果実品質. 福岡総農試研報. 25: 65-70

Effects of Single-Branch Row Planting and Lateral Root Zone Restriction on ‘Kosui’ Variety of Japanese Pear

**Kaho ISHIKAWA, Takafumi YAMAGUCHI, Keisuke KAGAWA, Sizu TANAKADATE
and Iwao TERAOKADO**

Summary

In Japanese pear cultivation, there is a need for a new planting technique that does not inhibit growth after seedlings are replanted and that can ensure early yield. Since the raising and jointing of seedlings is time-consuming, a simpler method was verified. In this study, when first-year plants were planted at 1.0 m spacing with a single main branch, a converted yield of 2.0 t/10a was obtained in the fifth year after planting, indicating that this technology can be expected to ensure an early yield. However, attention must be paid to the training of lateral branches, branch distribution, and adjustment of the number of fruits produced set. In addition, when the lateral root zone is restricted by a root barrier sheet, the same effects as those of general root zone restriction are observed, and it is possible to obtain yields in fields where it is difficult to secure irrigation.

Keywords: Japanese pear, early yield, fruit quality, root zone limitation

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

生分解性プラスチックマルチと生分解性プラスチック分解酵素「PaE」溶液の 散布時期の違いが施設夏秋トマト栽培後の資材片付け作業時間に及ぼす影響

富田和美・北本宏子¹⁾・植田浩一¹⁾・山下結香¹⁾・竹内明彦¹⁾・古矢桃子・藤田 裕

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

要約

長期間マルチを被覆して栽培する施設夏秋トマトを対象として、生分解性マルチの利用と PaE（生分解性プラスチック分解酵素）溶液の散布時期の違いが、栽培後の資材片付け作業時間の短縮に及ぼす効果を検証した。

PaE 溶液を散布した生分解性マルチと無処理の生分解性マルチおよび慣行のポリエチレン製マルチについて、マルチと灌水資材の回収作業にかかる時間を比較したところ、全体の作業時間が最も短かったのは、無処理の生分解性マルチであった。栽培期間中であるトマト定植 1 か月後のハウス内日平均気温が 30~40℃の時に PaE 溶液を散布すると、生分解性マルチが急速に劣化し、灌水資材の回収作業時間が最も短くなった。しかし、PaE 溶液の散布処理作業時間が加わったため、全体の作業時間は無処理の生分解性マルチより長くなった。

生分解性マルチを利用することで、慣行のポリエチレン製マルチと比較して、マルチと灌水資材片付け作業の省力化が可能となり、PaE 溶液の散布処理作業時間を短縮する手法が開発されれば、さらなる作業の省力化が見込めることを明らかにした。

キーワード：施設栽培、トマト、生分解性プラスチックマルチ、生分解性プラスチック分解酵素

1. はじめに

茨城県内の総農家数は、2020 年農林業センサス（農林水産省、2020）によると 71,761 戸で、2015 年に比べ 18.2%減少した。中でも基幹的農業従事者数は年々減少しており、平均年齢も 2020 年は 67.5 歳と、高齢化が進行している。その対策として、作業の省力化と規模拡大が可能な畑作物生産技術が求められている。

作業の省力化技術の一つとして、生分解性プラスチックマルチ（以下、生分解性マルチ）の利用が挙げられる。生分解性マルチは、農作物の栽培が終わった後に圃場の土壌にすき込むことで、土壌の中にいる微生物の働きによって水と二酸化炭素に分解されてなくなる農業用マルチである（ABA 農業用生分解性資材普及会、2023）。そのため、マルチ片付け作業の省力化が期待できることに加え、廃棄物を削減し環境への負荷を軽減することができる。

茨城県における生分解性マルチの利用は、主に露地野菜において進んでいる。しかし、生分解性マルチは気象条件や土壌条件によって分解程度が異なり、耐久性の高い生分解性マルチは利便性が高い反面、使用後の分解が遅くなる（Kitamoto et al., 2023）。このように、生分解性マルチは分解程度が予測しにくいいため、耐久性の高い生分解性マルチでの被覆および栽培後にマルチ下に設置した灌水資材の片付け作業を必要とする長期施設栽培においては、連続で使用した場合のすき込み後の分解や片付け作業の省力効果に対する懸念の声が多く、導入が進んでいない。

一方、北本ら（2017）は、イネなどの植物常在真菌である *Pseudozyma antarctica* と呼ばれる酵母が作る生分解性プラスチック分解酵素「PaE」が、生分解性マルチを急速に分解することを明らかにした。さらに、畑に展開した生分解性マルチの表面に PaE 溶液を散布する処理方法において、マルチフィルムの分解が加速されることを明らかにした（Kitamoto et al., 2023）。

そこで、長期間マルチを被覆して栽培する施設夏秋トマトを対象として、生分解性マルチの利用と PaE 溶液の散布時期の違いが、生分解性マルチの分解程度および栽培後の資材片付け作業時間の短縮に及ぼす効果を検討した。

1) 農研機構 農業環境研究部門

2. 材料および方法

2. 1 試験場所と栽培の概要

試験は、2023年7月5日から2023年11月27日まで、茨城県桜川市農家圃場において、東西方向に建てられた間口4.5m、長さ85mの農業用パイプハウスで実施した。パイプハウスの被覆資材は、農POフィルム（厚さ0.1mm、M社製、UVカット加工無し）を使用した。栽培品目はトマト（品種名‘夏和恋’、台木‘TTM-158’）を用いた。施肥は、7月5日に堆肥（N-P₂O₅-K₂O=5.7%-5.6%-2.9%）を46.8kg/10a、硫酸カリウム（N-P₂O₅-K₂O=0%-0%-50%）を52kg/10a、石こうを52kg/10a 圃場全面に施用した。追肥として、8月中旬と9月上旬に、液肥（N-P₂O₅-K₂O=10%-5%-8%）を600倍に希釈し、10L/10a 施用した。また、8月下旬に、微生物液体資材（N-P₂O₅-K₂O=0.05%-0.01%-0.01%）を1L/10a、灌水と同時に施用した。7月6日に幅95cmの畝を立て、畝の中央に灌水チューブ（折形58mm、水平散水、S社製）を配置し、その上にマルチを展開した。畝立て、灌水チューブ設置、マルチ展開は畝立て同時マルチ機を使用し、同時に行った。定植は7月8日に行い、株間45cmの2条植えとした。栽培は、1株2本仕立てで直立誘引とした。わき芽は、随時除去し圃場外に持ち出した。収穫は、9月1日～11月7日まで行った。栽培期間のハウス内気温は、日中30℃、夜間15℃を目安に管理した。灌水は、7月8日～9月22日まで、3～4日ごとに1回、10,000L/10aを目安に実施した。病害虫防除は、5～7日ごとに1回の目安で農薬（100L/10a）を散布した。収穫後のマルチおよび灌水資材の片付け作業は11月27日に行った。

2. 2 マルチフィルム試験区の概要

生分解性マルチ区は、Aマルチ（厚さ0.02mm、幅135cm、表面が白で裏面が黒の2層フィルム、A社製）を用いた。慣行区は、ポリエチレン製マルチ（厚さ0.025mm、幅150cm、表面が白で裏面が黒の2層フィルム、M社製）を用いた。1区1列82m、反復なしとした。

2. 3 酵素散布の処理方法

生分解性マルチに散布するPaE溶液の濃度や量はKitamoto et al. (2023)の方法に従った。すなわち、PaE溶液と超微粒子重質炭酸カルシウム（ソフトン）粉末溶液を混合し、最終濃度がPaE 6U、超微粒子重質炭酸カルシウム2%となるように水道水で希釈し、これを生分解性マルチ1m²あたり120mL散布した。PaE溶液の散布処理（以下、PaE処理）区は、Shinozaki et al. (2013)の室内実験で得られたPaEに適した温度条件である30～40℃にハウス内日平均気温に近い栽培期間中処理区と、収穫終了後処理区および無処理区の3処理区を設定した。栽培期間中処理区は、定植1ヶ月後の8月8日10時（ハウス内気温31.8℃）に散布した。収穫終了後処理区は、11月24日11時30分（ハウス内気温33.5℃）に散布した。散布は、背負い式動力噴霧器（霧太郎、丸山製作所製）にノズル（NN-SL-10S 人力用新広角1頭口S型、ヤマホ工業社製）を装着して用い、1区77.9m²（1畝分0.95m×82m）のAマルチ表面全体に均一に散布した。

2. 4 調査項目と方法

栽培期間は7月8日の定植日から11月7日の収穫終了日までとした。マルチ展開期間は、マルチを展開した7月6日から収穫後のマルチおよび灌水資材の片付け作業を行った11月27日までとした。

マルチ展開期間中のハウス内気温は、温度データロガー（TR-71U、T&D社製）を用い、ハウス内中央付近の地表からの高さ100cmの気温を1時間毎に測定した。

各試験区の地温は、温度データロガー（TR-71U、T&D社製）を用いて、マルチ下10cmの地温を1時間毎に測定した。

マルチ展開期間中のマルチ表面に照射された紫外線強度は、照度UVレコーダー（TR-71i、T&D社製）を用い、畝の中央部分のマルチ表面に照度紫外線センサー（ISA-3151、T&D社製）を設置して、1時間毎に測定した。測定された紫外線強度に照射時間（60分）を掛けて積算紫外線照射量（積算光量）を求めた。日照時間は、気象庁の地域気象観測所下館（筑西市西石田）のアメダスによる観測値を用いた。

PaE処理後のマルチ分解程度は、PaE処理前日、翌日および片付け作業前に、各試験区内の0.95m×1m（3ヶ所）について、亀裂の有無や程度を目視により調査した。

栽培後に行われる片付け作業のうち、利用するマルチの種類によって差が生じる「マルチをはがして回収する作業」と「灌水チューブを巻き取り回収する作業」について、作業開始から終了までの時間を計測した。マルチと灌水資材の片付け作業にかかる時間の測定は、作業者を現地生産者1名として11月27日に実施した。また、PaE処理作業についても同じく作業開始から終了までの時間を計測した。

3. 結果

3. 1 生分解性マルチの分解に影響を及ぼす環境要因

マルチ展張期間中のハウス内の日平均気温および各試験区のマルチ下 10cm の日平均地温の推移を図 1 に示す。マルチ下 10cm の日平均地温はいずれの試験区も同等に推移した。ハウス内の日平均気温は、マルチ展張後 2 ヶ月間は 25℃以上の日が続いた。9 月下旬から 25℃を下回りはじめ、その後は徐々に下降し、11 月中旬以降は 10～15℃の間で推移した。マルチ展張期間中のハウス内の平均気温は 23.5℃、平均地温は生分解・栽培期間中処理区で 25.4℃、生分解・収穫終了後処理区および生分解・無処理区で 25.1℃、ポリエチレン製・慣行区での平均地温は 25.2℃であった。

栽培期間中のマルチ表面の日平均紫外線強度の推移と筑西市の日合計日照時間を図 2 に示す。マルチ展張期間中の各生分解性マルチ表面への日平均紫外線強度は、収穫後処理区の方が、栽培期間中処理区と比べて高く推移した。各試験区の日平均紫外線強度は、マルチ展張期間中を通して、筑西市の一日の日照時間が長いと高い傾向がみられた。7 月 30 日頃からいずれの試験区も日平均紫外線強度が低下し、9 月 10 日以降においては、栽培期間中処理区で 0.01～0.04mW/cm²/day、収穫後処理区で 0.01～0.08mW/cm²/day の間で推移した。各試験区の日平均紫外線強度の平均値は、7 月 7 日から 9 月 9 日までの期間においては、栽培期間中処理区で 0.10mW/cm²/day、収穫後処理区で 0.16mW/cm²/day、9 月 10 日から 11 月 27 日までの期間においては、栽培期間中処理区で 0.02mW/cm²/day、収穫後処理区で 0.04mW/cm²/day であった。筑西市の日合計日照時間の平均は、7 月 7 日から 9 月 9 日までは 8.3 時間、9 月 10 日から 11 月 27 日までは 5.9 時間であった。マルチ展張期間中の積算光量および平均紫外線強度は、収穫後処理区が栽培期間中処理区と比較して高かった（表 1）。

3. 2 PaE 処理後の生分解性マルチの表面の様子と、マルチおよび灌水資材の回収作業時間

PaE 処理による各試験区の生分解性マルチ表面の様子は、栽培期間中処理区においては処理前には亀裂がほとんど見られなかったが、処理翌日にはマルチ表面の一部に大きな亀裂が見られ、さらに片付け作業時にはマルチ下に設置した灌水チューブが一部露出した状態であった。収穫後処理区においては処理前にはマルチ表面に小さな亀裂が多数見られたが、処理後は亀裂がほとんど増加せず、片付け作業時は、灌水チューブはほとんど露出していなかった。無処理区は、片付け作業時にはマルチ表面に小さな亀裂が多数見られたが、灌水チューブはほとんど露出していなかった（図 3）。

マルチの片付けと灌水資材の回収に要した時間について、1 人で作業した場合の 10a 当たりの作業時間を表 2 に示す。生分解・栽培期間中処理区および生分解・収穫後処理区において、PaE 処理作業に要した時間は 0.9 時間であった。生分解・無処理区およびポリエチレン製・慣行区では、PaE 処理を行わなかったため 0 時間とした。マルチの回収作業に要した時間は、ポリエチレン製・慣行区では 0.8 時間であった。生分解の各試験区では、マルチの回収作業は必要ないため 0 時間とした。灌水チューブの回収作業に要した時間は、生分解・栽培期間中処理区が 0.2 時間で最も短く、次いでポリエチレン製・慣行区で 0.3 時間であり、生分解・収穫後処理区と生分解・無処理区は 0.5 時間であった。PaE 処理、マルチ回収、灌水チューブ回収の作業時間の合計は、生分解・栽培期間中処理区がポリエチレン製・慣行区と同じ 1.1 時間であった。最も短かったのは、生分解・無処理区の 0.5 時間であった。

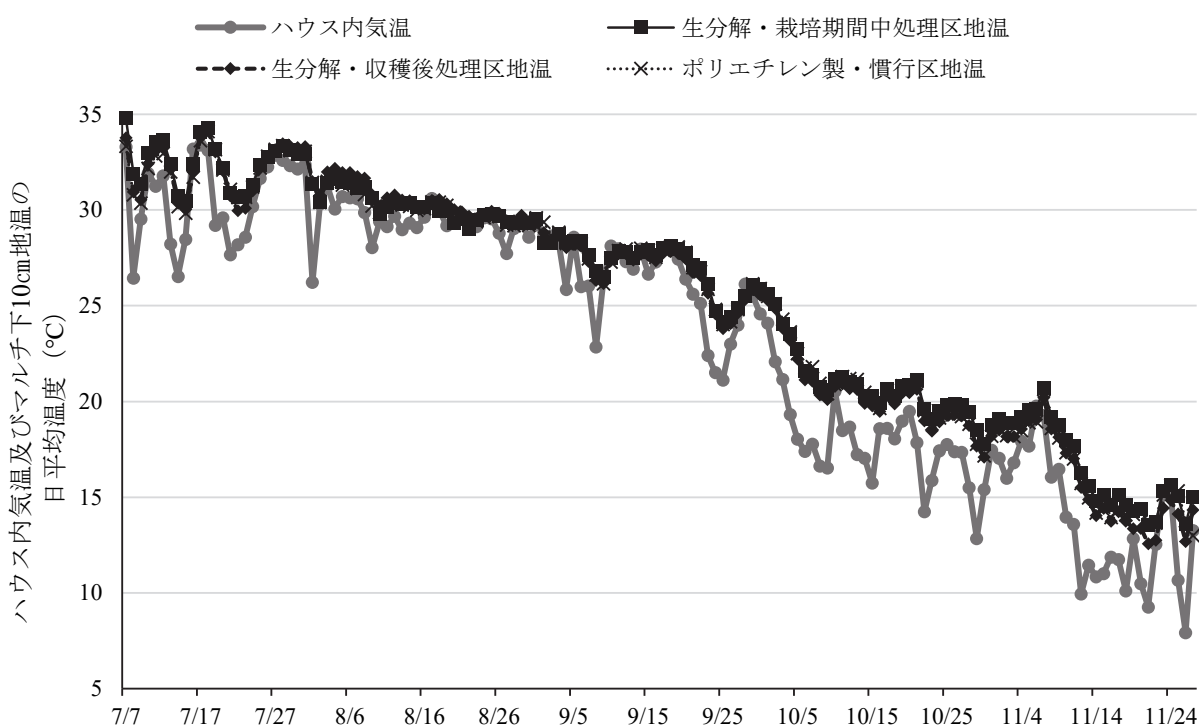


図1 マルチ展張期間中のハウス内の日平均気温および各試験区のマルチ下 10cm の日平均地温の推移

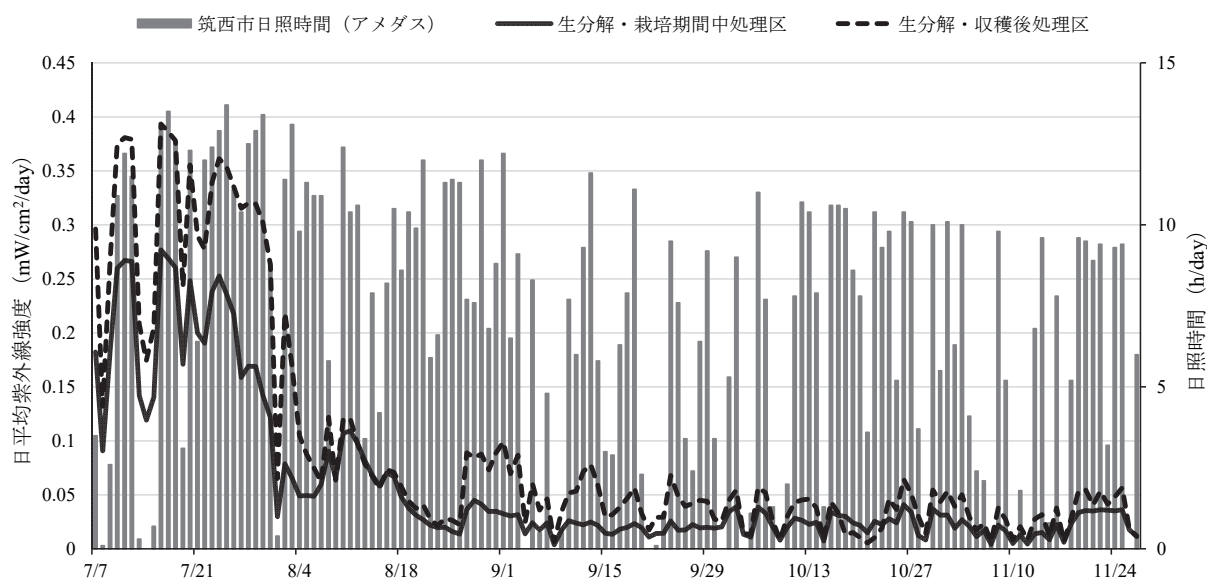


図2 栽培期間中の各試験区の生分解性マルチ表面への日平均紫外線強度の推移と筑西市の日合計日照時間

表1 栽培期間中の各試験区の生分解性マルチ表面への積算光量と平均紫外線強度

試験区	積算光量 (J/cm ²)	平均紫外線強度 (mW/cm ²)
生分解・栽培期間中処理区	727	0.059
生分解・収穫後処理区	1,132	0.091

試験区	PaE処理前日	PaE処理翌日	片付け作業時
栽培期間中処理区			
収穫後処理区		—	
無処理区	—	—	

図3 PaE 処理前日、PaE 翌日および片付け作業時の生分解性マルチの様子

表2 マルチの違いおよび PaE 処理がマルチおよび灌水チューブ回収時間に及ぼす影響^{a)}

試験区	PaE 処理	マルチ 回収	灌水チューブ 回収	合計
		(h/10a)		
生分解・栽培期間中処理区	0.9	0	0.2	1.1
生分解・収穫後処理区	0.9	0	0.5	1.4
生分解・無処理区	0	0	0.5	0.5
ポリエチレン製・慣行区	0	0.8	0.3	1.1

a) 作業者を現地生産者1名とした

4. 考察

4. 1 環境要因が生分解性マルチの分解及び PaE の生分解性マルチ分解能力に与える影響

生分解性マルチは、水分や温度等の環境要因による加水分解と微生物による生分解によって、最終的に水と二酸化炭素に分解される。加水分解は、一般的な栽培環境の温度帯において、温度が高い方が進みやすい。佐藤ら(2003)は、室内土壌埋設試験において、温度が高く土壌水分が多いと生分解性マルチの引張強さ伸び率が低下し、穴あきが見られ強度維持が困難になり、分解度が高まることを明らかにしている。本試験において、片付け作業時のマルチ表面は、栽培期間中処理区が収穫後処理区よりも亀裂が多く、劣化していた。PaE 処理時のハウス内気温と PaE 処理後から片付け作業までの日数を比較してみると、いずれの試験区も PaE 処理時のハウス内

気温は30℃を超えていたが、栽培期間中処理区ではPaE処理後もハウス内日平均気温が25℃以上の日が続いており、PaE処理後から片付け作業までの日数は111日であった。一方、収穫後処理区はPaE処理後のハウス内日平均気温が15℃以下で、PaE処理後から片付け作業までの日数が3日であった。これらのことから、PaE処理後のハウス内日平均気温が高く片付け作業までの日数が長い方が、生分解性マルチの分解が促進すると考えられる。

また、Kitamoto et al. (2023) は、黒く着色された生分解性マルチを用いて野菜を育てずに露地に展張のみ行った試験において、PaE処理翌日の分解促進効果は、初夏(27℃)と晩秋(14℃)の気温の影響に関係なく再現性があるとしている。本試験におけるPaE処理日までのマルチの展張期間は、栽培期間中処理区では32日間で、Kitamoto et al. (2023) の試験に近い条件であった。一方、収穫後処理区では140日間であった。温度と土壌水分以外の生分解性マルチの分解程度に影響を及ぼす環境要因として、紫外線の照射が挙げられる。一般的に有機高分子が光劣化を起こすことは知られている。牧ら(2002)は、ガラスハウス内では4ヶ月にわたって延性の低下が認められなかった生分解性マルチが、紫外線の照射により延性が低下することを明らかにしている。本試験においては、マルチ展張期間中の各試験区の紫外線強度について、7月30日頃からいずれの試験区でも日平均紫外線強度が低下した。これは、栽培しているトマトの植物体が成長し、葉が繁茂することによってマルチ表面に影ができたためと考えられる。また、栽培期間中の積算光量および平均紫外線強度については、栽培期間中処理区を東西方向のハウスの北側に、収穫後処理区をハウスの南側に設置したため、収穫後処理区が栽培期間中処理区と比較して高かったと考えられる。そして、積算光量が多かった収穫後処理区は、PaE処理前までに紫外線によるマルチの分解が進んでいた可能性がある。

栽培期間中処理区ではPaE処理後にマルチ表面の亀裂が増えたことに対して、収穫後処理区では亀裂がほとんど増加しなかった。その理由として、収穫後処理区ではPaE処理日までの展張期間が長く、温度や紫外線等の環境要因により生分解性マルチの分解が進んでいたため、PaEの効果が判然としなかった可能性が考えられる。

4. 2 生分解性マルチの利用および生分解性マルチの分解程度が片付け作業時間に与える影響

PaE処理、マルチ回収および灌水チューブ回収時間は、ポリエチレン製・慣行区と比較すると生分解・無処理区が短かった。このことから、施設夏秋トマト栽培において生分解性マルチを利用すると、PaE処理を行わなくても片付け作業が省力化されることが明らかとなった。馬場(2023)は、露地栽培における生分解性マルチを利用した2作1回施肥栽培において、2作目のブロッコリーの残渣処理とマルチの剥ぎ取りが不要になることで、栽培終了後の片付けに要する作業の省力化が可能であることを明らかにしている。

しかし、灌水チューブ回収作業時間をみると栽培期間中処理区が最も短かった。収穫後処理区および無処理区における片付け作業時の生分解性マルチでは小さな亀裂が多数見られたが、灌水チューブはほとんど露出していなかった。そして、マルチと灌水チューブが密着しており、畝端から灌水チューブを引き抜くことができなかった。そのため、まず灌水チューブをマルチ下から通路に引き出し、その後畝端から灌水チューブを巻き取った。一方、栽培期間中処理区においては、灌水チューブの露出が一部で確認できるほど、マルチに亀裂が多く発生していた。そのため、マルチを剥がさずマルチ下の灌水チューブを畝端から巻き取ることができ、作業時間の短縮につながった。PaE処理作業時間を含めると、PaE無処理区の方が作業全体の時間は短い、PaE処理作業時間を短縮する手法が開発されれば、栽培期間中処理区の方が無処理区に比べて省力効果が高くなる可能性がある。

4. 3 まとめ

本研究では、マルチ下に灌水チューブ等の灌水資材を設置する施設夏秋トマト栽培において、生分解性マルチを利用すると慣行ポリエチレン製マルチと比較してマルチと灌水資材の回収作業を省力化できることを明らかにした。さらに、生分解性マルチを利用した場合、トマト定植1ヶ月後のハウス内日平均気温が30~40℃のときにPaE溶液をマルチ表面に散布処理することで、マルチ下の灌水チューブ回収作業時間を短縮できることを明らかにした。

しかし、栽培後の土壌へのすき込みにかかる時間や、ポリマルチの運搬等廃棄処分にかかる時間については詳細な検討を行っていない。また、栽培期間中のトマトの生育や収量、雑草の発生程度については、試験農家から慣行ポリエチレン製マルチ区と生分解性マルチ区で同程度であったことを確認しているが、生分解性マルチを連続で使った場合のすき込み後の土壌中でのマルチの分解程度やトマトの生育に与える影響は未検討である。施設夏秋トマト栽培において、生分解性マルチの利用とPaE処理を組み合わせた栽培技術確立するためには、

これらについての検討が必要である。

今後、様々な栽培様式や品目において、作業の省力化等につながる生分解性マルチの利用方法および PaE 処理技術が開発され、生分解性マルチの普及が一層進むことを期待する。

付記

本研究は、生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」(JPJ007097) の支援を受けて行った。

引用文献

- ABA 農業用生分解性資材普及会編 (2023) 生分解性マルチハンドブック普及の手引き. ABA 農業用生分解性資材普及会、東京、pp.7
- 馬場久美子 (2023) 野菜の同一マルチ 2 作 1 回施肥栽培に対する生分解性マルチの適用性. 山梨県総合農業技術センター研究成果情報 令和 5 年度
https://www.pref.yamanashi.jp/documents/112835/r5_7_seibunkai2saku.pdf (2024 年 7 月 12 日アクセス)
- Kitamoto H, Koitabashi M, Sameshima-Yamashita Y, Ueda H, Takeuchi A, Watanabe T, Sato S, Saika A and Fukuoka T(2023) Accelerated degradation of plastic products via yeast enzyme treatment. Scientific Reports. 13, 2386
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-29414-1> (2024 年 7 月 12 日アクセス)
- 北本宏子・鈴木 健・佐藤 俊 (2017) 植物常在真菌の酵素が生分解性プラスチックを急速に崩壊させる仕組み. 農研機構農業環境変動研究センター研究成果情報
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/niaes/2017/niaes17_s17.html (2024 年 7 月 12 日アクセス)
- 牧 浩之・岩田 均・大塩哲視 (2002) 気象要因による生分解性プラスチックフィルムの崩壊特性. 兵庫県立農林水産技術総合センター研試験研究報告「農業編」50 : 29-32
- 農林水産省 (2020) 農業センサス 確報 第 1 巻 都道府県別統計書 (茨城県)
- 佐藤勲征・赤間鉄宏・矢口 仁 (2003) 生分解性プラスチックの分解性制御に関する研究. 平成 14 年度宮城県産業技術総合センター研究報告 No.1 : 6-9
- Shinozaki Y, Morita T, Xiao-hong Cao, Yoshida S, Koitabashi M, Watanabe T, Suzuki K, Sameshima-Yamashita Y, Nakajima-Kambe T, Fujii T and Kitamoto H(2013) Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization. Appl. Microbiol. Biot. 97(7), 2951–2959.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4188-8> (2024 年 7 月 12 日アクセス)

The Effect of Using Biodegradable Plastic Mulch and Different Spraying Times of “PaE” Biodegradable Plastic-Degrading Enzyme Solution on the Time Required for Material Cleanup after Summer/Autumn Tomato Cultivation in Greenhouses

Kazumi TOMITA, Hiroko KITAMOTO¹, Hirokazu UEDA¹, Yuka YAMASHITA¹, Akihiko TAKEUCHI¹, Momoko FURUYA and Yutaka FUJITA

Summary

We examined the effects of using biodegradable mulch and different spraying times for PaE solution (a biodegradable plastic-degrading enzyme) on shortening the time required to clean up materials after summer/autumn tomato cultivation in greenhouses, which typically uses mulch for a long period of time.

When the time required to recover irrigation materials was compared between biodegradable mulch sprayed with PaE solution, untreated biodegradable mulch, and conventional polyethylene mulch, the untreated biodegradable mulch required the shortest total work time. When the PaE solution was sprayed one month after tomato planting when the average daily temperature inside the greenhouse was 30-40°C, the mulch rapidly deteriorated and the time required to recover the irrigation materials was the shortest. However, due to the addition of the PaE solution spraying process, the overall working time was longer than that of untreated biodegradable mulch.

Compared to conventional polyethylene mulch, the use of biodegradable mulch makes it possible to save labor in cleaning up the mulch and irrigation materials, and further improvements can be anticipated if a method is developed to shorten the time required to spray PaE solution.

Keywords: greenhouse cultivation, tomato, biodegradable plastic mulch, biodegradable plastic-degrading enzyme

¹ Address : Institute for Agro-Environmental Sciences, National Agriculture and Food Research Organization(NARO),3-1-3 Kannondai,Tsukuba,Ibaraki,305-8604 Japan

本誌に掲載された記事に関しては「茨城県農業総合センター」ホームページ
<https://www.pref.ibaraki.jp/nourinsuisan/nosose/cont/> にてPDFを掲載しております。

編集委員

副センター長兼企画情報部長（総括）	田場 昭男
農業研究所所長（編集委員長）	草野 謙三
生物工学研究所所長（副編集委員長）	石井 亮二
園芸研究所所長（副編集委員長）	神原 幸雄
山間地帯特産指導所所長	助川 修
鹿島地帯特産指導所所長	小川 孝之
研究管理監	宮本 勝
専門技術指導員室長	鈴木 成夫
企画調整課係長	大寺 宇織

各研究所の連絡先

生物工学研究所	笠間市安居 3165-1	0299-45-8330
園芸研究所	笠間市安居 3165-1	0299-45-8340
農業研究所	水戸市上国井町 3402	029-239-7211
山間地帯特産指導所	大子町頃藤 6690-1	0295-74-0821
鹿島地帯特産指導所	神栖市息栖 2815	0299-92-3637

茨城県農業総合センター研究報告 第7号

2025年3月21日発行

発行者 茨城県農業総合センター

〒319-0292 茨城県笠間市安居3165-1

電話 0299-45-8321

FAX 0299-45-8350

印刷者 株式会社佐藤印刷

〒310-0043 茨城県水戸市松が丘2-3-23

電話 029-251-1212

FAX 029-251-1047

本誌に掲載された論文の著作権は、当センターに帰属するものとする

BULLETIN
OF THE
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER
No. 7
March 2025

Contents

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 1

Clarification of Varietal Differences in the Degree of Soybean Seed Coat Cracking and QTL Analysis

Satoshi OKOSHII, Takumi MATSUI, Masao IWAHASHI, Kazuyuki OKAMOTO

and Katsunori OKANO 48

Establishment of Shape Evaluation Indices for Edible Lotus Breeding and Their Application in Small Container Cultivation

Chikashi NAGAYAMA, Yuu KASHIWAG, Yuki HIRAMATS, Takaori ODERA,

Maki KUZUYA and Tomoko ISHIKAWA 57

Effects of Single-Branch Row Planting and Lateral Root Zone Restriction on ‘Kosui’ Variety of Japanese Pear

Kaho ISHIKAWA, Takafumi YAMAGUCHI, Keisuke KAGAWA, Sizu TANAKADATE

and Iwao TERAKADO 64

The Effect of Using Biodegradable Plastic Mulch and Different Spraying Times of “PaE” Biodegradable Plastic-Degrading Enzyme Solution on the Time Required for Material Cleanup after Summer/Autumn Tomato Cultivation in Greenhouses

Kazumi TOMITA, Hiroko KITAMOTO, Hirokazu UEDA, Yuka YAMASHITA,

Akihiko TAKEUCHI, Momoko FURUYA and Yutaka FUJITA 72

Ibaraki Agricultural Center
3165-1, Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292, JAPAN