

レンコンを加害するレンコンネモグリセンチュウの
生態と化学的防除法に関する研究

Investigation of ecology and chemical control methods of lotus root nematode
Hirschmanniella diversa Sher causing damage to lotus *Nelumbo nusifera* Gaerten

2020. 3

東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
生物システム応用科学専攻

高木素紀

目次

第1章	諸論	1
	1. 日本および茨城県におけるレンコン生産の位置づけ	
	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	
	3. レンコンネモグリセンチュウを含む <i>Hirschmanniella</i> 属線虫の知見	
	4. 本研究の目的	
第2章	レンコンネモグリセンチュウの発生活長と生活環	8
	緒言	
	材料および方法	
	結果	
	考察	
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	20
	緒言	
	材料および方法	
	結果	
	考察	
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	44
	緒言	
	材料および方法	
	結果	
	考察	
第5章	総合考察	63
第6章	摘要	71

謝 辞	75
引用文献	78

第1章 緒論

1. 日本および茨城県におけるレンコン生産の位置付け

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。

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、“池に生える蓮根は、比べる産地がないほど味わいを異にして、大変美味いとしかいいようがない。そればかりか、病に苦しむ者は、この沼の蓮を食べば、たちどころに治るといふ。”(鹿嶋市文化スポーツ振興事業団, 2017)と記述されており、レンコンだけでなくハスの実も食されており、薬効も信じられていた。

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

羽田ら(2018)は野菜出荷統計から、1973年には104,400t収穫されていたレンコンは年々減少し、2015年には56,700tと約半減していると報告している。その内訳を見ると、茨城県以外の産地は、腐敗病等の要因によりその生産量を減じ、1973年に対する2015年のレンコン収穫量は徳島県で30.7%、愛知

県で 31.2%、佐賀県で 39.5%、山口県で 31.0%にまで減少している。一方、茨城県は 21,000t から 29,000t と増加している。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、茨城は 1970 代以降に一早く、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。

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

また、レンコンは高収益作物であり、その収益率は 59% にも及び (茨城県調べ)、土浦市田村町の一経営体 (平均 210a) での粗収益は 2,000 万円を超える (羽田ら, 2018) ため、他の野菜よりも高収入を得やすい。そのため、1986 年から営農の始まった石川県金沢市の河北潟などの新たなレンコン産地 (川原ら, 2014) や、労働強度を下げるために土掘りから水掘りに移行する産地 (佐賀県など)、稲田をハス田に転換して新たな産地化を狙う生産者が、茨城を含めて各地に存在することなど、今後も生産拡大が見込まれる注目すべき作物

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いことなどから、若い世代も取り組みやすい作物である (羽田ら, 2018)。



Fig. 1-1 水掘りの様子

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

Month	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
Open field	■		■					■				
Type of clutivation ¹⁾												
Greenhouse		■	■	■	■	■	■					

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

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

2. レンコンの2大病害虫、レンコン腐敗病とレンコン黒皮線虫病

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

レンコン腐敗病は、好気性菌である *Fusarium* 属菌 (西門・渡辺, 1952) や *Pythium* 属菌 (米本ら, 2013) などによって引き起こされ、徳島県では *Fusarium* 属菌によるものが多い (沢田・阿部, 2017)。徳島県や愛知県など、

土壌を乾田化してから農機具を使って掘り取りを行う“土掘り” (Fig. 1-2) を行う地域では一般的に被害が大きいとされる (沢田, 2010)。

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。古くは近年になって、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”の発生である (藍澤ら, 2002; 三平・永井, 1996)。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* (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。

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.，2016）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。



Fig 1-2 土掘りの様子（愛知県，堀井学氏撮影）



Fig.1-3 レンコン黒皮症の症状

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、沖縄では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; Lahan et al., 1999; Prasad and Rao, 1984; Walia and Bhatti, 1985; Zhang and Ai, 1994)、抵抗性品種 (Randhawa et al., 1992; Ramakrishnan et al., 1984)、セสบニア *Sesbania rostrate* 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。

4. 本研究の目的

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

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

第2章 ハス根部内のレンコンネモグリセンチュウの発生活長と生活環

緒言

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, 2000; 高木ら, 2016; 高木ら, 2017; 植松ら, 2015)、防除対策等を構築するための基礎情報である発生活長や、各ステージの生活部位や越冬形態などの生活環についてはほとんど調査されていない。また、茨城では被害症状を呈するレンコンに本種が寄生するかどうかすら明らかではなかった。

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

材料および方法

1) サンプリング圃場

調査は茨城県石岡市関川地区(北緯36度14分, 東経140度32分)のハス栽培圃場2筆(各々圃場AおよびBとする。1圃場約17m×45m。)でおこなった。本地域は霞ヶ浦に近接しており、全国デジタル土壌図(農研機構, 2017)によると、土壌分類は粗粒質還元型グライ低地土に分類される。栽培作物はハスが主体であるが、霞ヶ浦から離れた比較的標高の高い乾田では水稻が栽培される。また地域全体に線虫害と疑われる黒皮症の被害が大変多く、これ

を原因とするハスの耕作放棄圃場も点在している。圃場 A および B の耕作者は異なっているが、黒皮症被害により収量が減少していることは共通している圃場である。圃場 A では 2010 年から 2012 年の 3 年間、圃場 B では 2010 年のみ調査を行った。

2) *Hirschmanniella* 属線虫のサンプリングおよび分離方法

ハス細根の採集は、圃場 A では 2010 年 6 月から 12 月まで、2011 年および 2012 年は 5 月から 10 月まで、2~4 週間に 1 回行った。圃場 B では 2010 年 6 月から 2011 年 2 月まで、同様に 2~4 週間に 1 回調査を行った。調査は 1 回につき、圃場の北側と南側からハスの根を節ごと 3 本以上採集した。採集した節付き細根は、水道水を使用してよく水洗し、付着した土壌を落とした。細根は水洗したのち節を切り離してから水を切って 5mm 程度に細断し、よく混和してから 5g を測りとりベルマン法 (Baermann, 1917) に供試した。ベルマン法は 25℃ 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。

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 (オリンパス BX-50) 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リング日ごとに雌雄成虫および幼虫に分けて計数した。

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.) 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'-TGCGAAGG AACCAGCTACTA-3') (Nunn, 1992)を用いた。PCR は Go Taq® Green Master Mix (Promega Corp.) を用いて、Bio-Rad T100™ thermocycler (Bio-Rad Laboratories Inc.) により行った。反応条件を以下に示す。94°C 2 分サイクル前の熱変性を行ったのち、94°C 30 秒の熱変性、50°C 30 秒のアニーリング、72°C 1 分の伸長反応を 35 回繰り返し、最終伸長反応は 72°C 5 分とした。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製後、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.)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.)を用いて塩基配列を解読した。塩基配列は DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd.) を用いてアSEMB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。

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 (Murray et al., 2011; Otronen et al. 1997) 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ウを分離した

6) レンコンネモグリセンチウ幼虫の齢期および齢構成の推定

センチ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、両者の関係から各発育段階を推定した。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。

結果

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

A圃場およびB圃場のハス細根から分離された*Hirschmanniella*属線虫の成虫41頭を調査したところ、体長は1,733-2,600 μm 、口針長は21.7-24.7の範囲に収まった。これらの形態的特徴は、Sher (1968)によって記載されたレンコンネモグリの体長(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ウとして登録されている、Accession No. JX144359とも配列が100%一致した。JX144359は、2012年にレンコ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山形の発生活長を示した(Fig. 2-1)。10月から翌年1月までの期間、分離されるレンコ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。

2) 形態によるレンコンネモグリの生育ステージ推定

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

m、クラスターⅢは、口針長が17.3–22.7 μ m、体長が1,083–2,150 μ mであった。この結果から齢構成を考えると、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。

3) 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。

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。

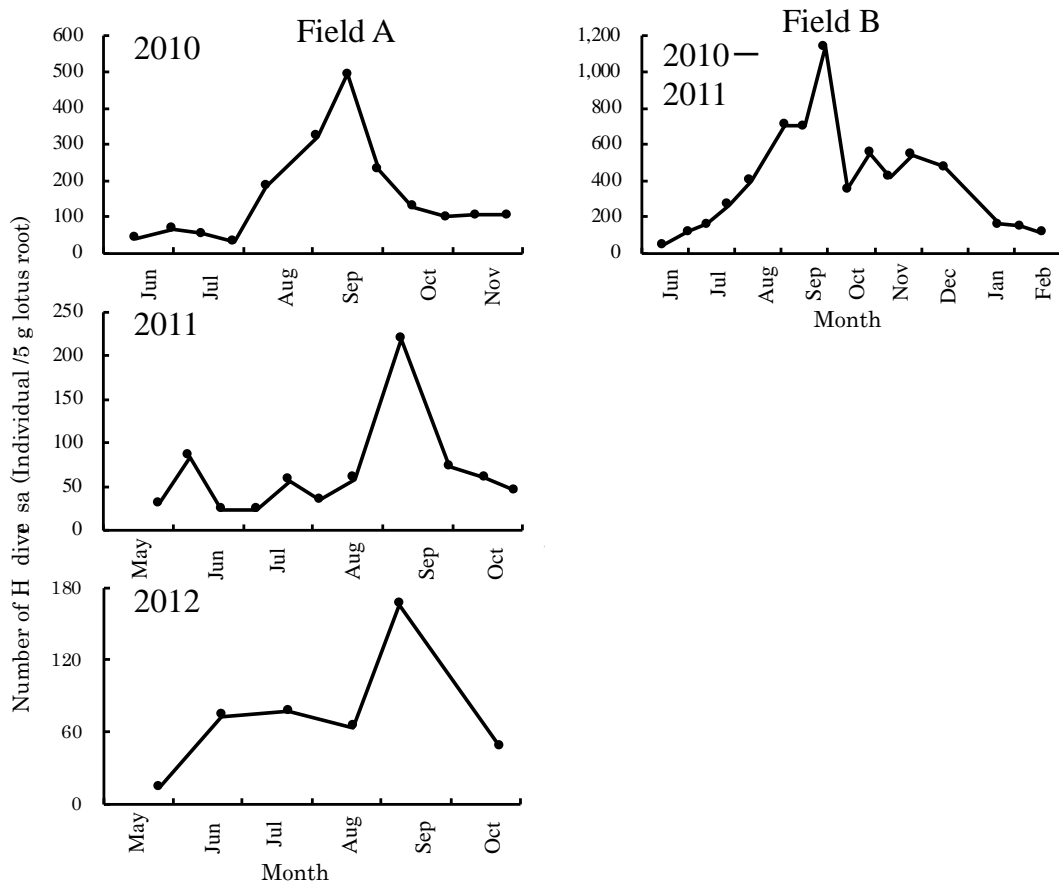


Fig. 2-1. Seasonal occurrence of *Hirschmanniella diversa* in lotus roots between 2010 and 2012 lotus cultivation seasons in field A and field B in Ibaraki Prefecture.

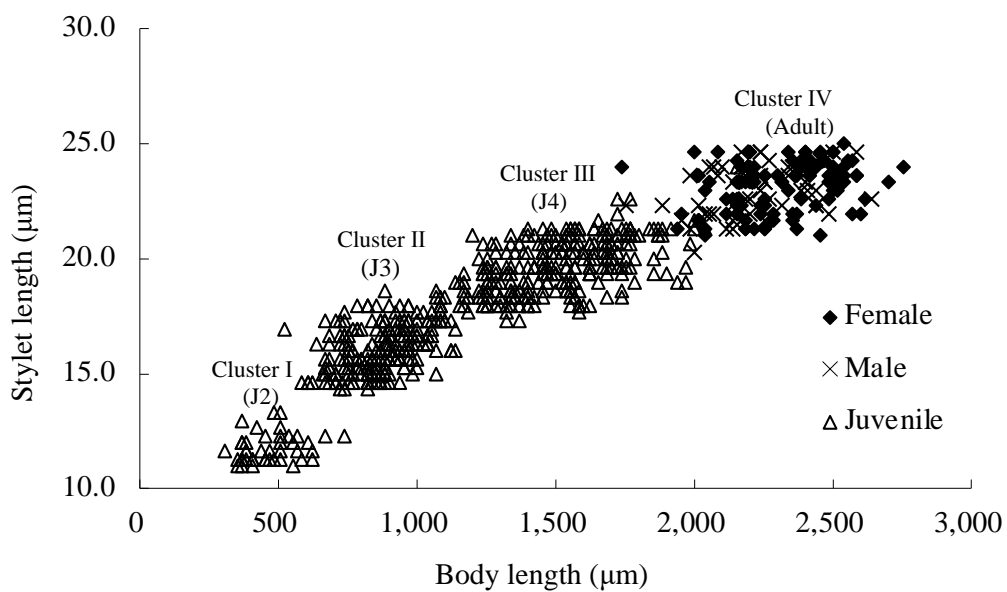


Fig. 2-2. Relationship between stylet length and body length for a population of *Hirschmanniella diversa* individuals isolated from lotus roots in 2010 survey (n=692) from field A and B.

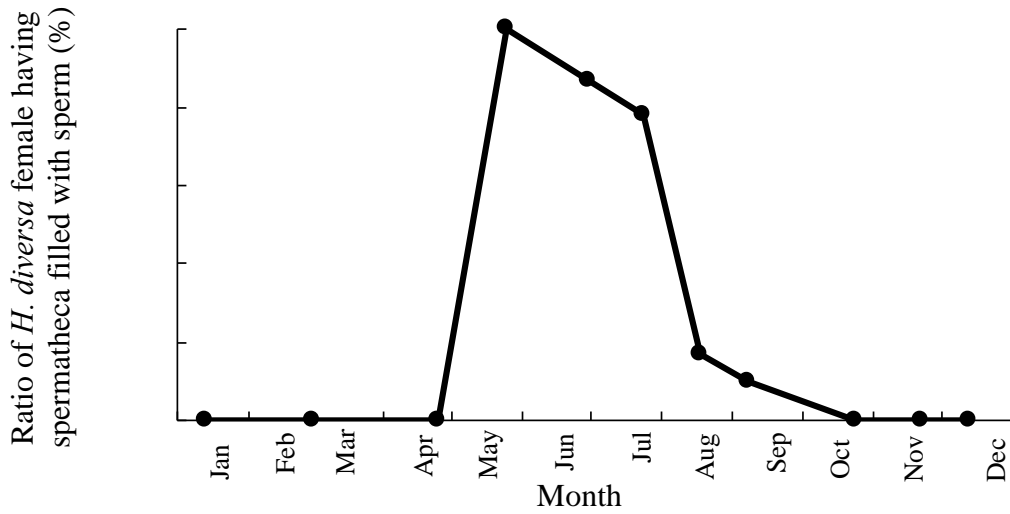


Fig. 2-3. Periodical change in the ratio of *Hirschmanniella diversa* females having spermatheca filled with sperms in 2012 study from field A and B. n=30 for each sampling date.

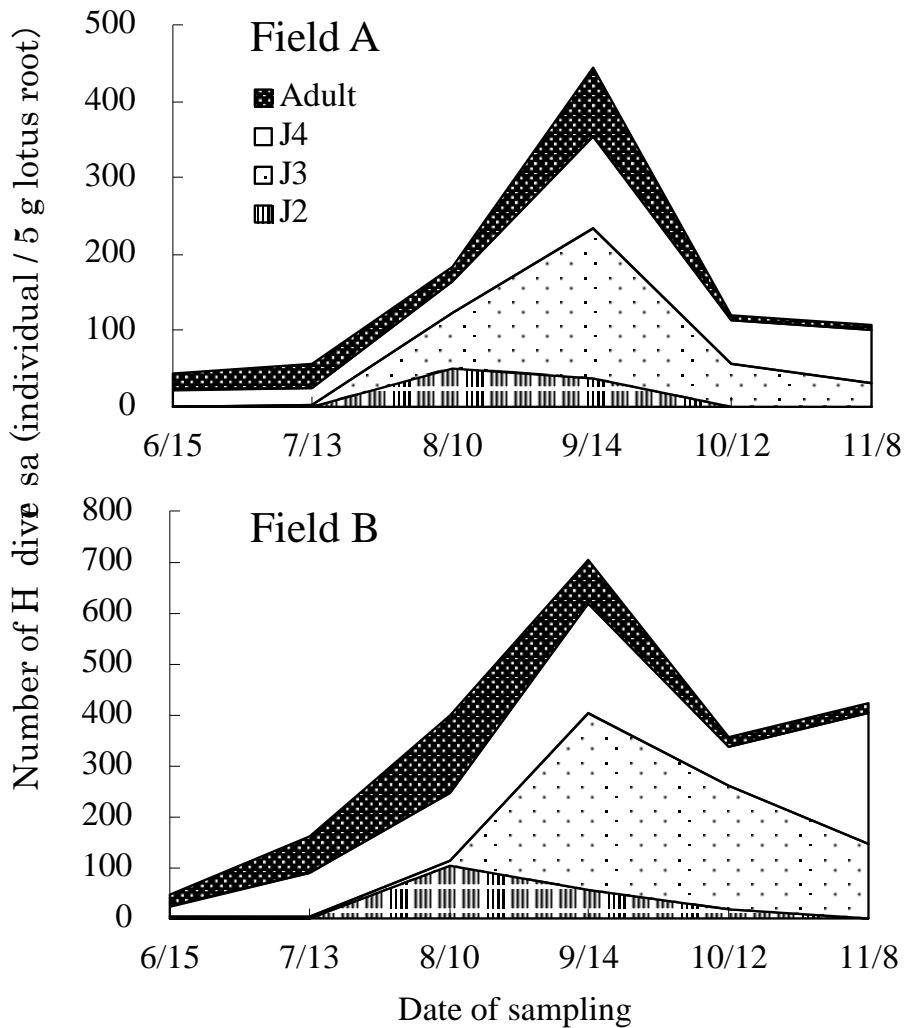


Fig. 2-4. Age structure of *Hirschmanniella diversa* individuals in lotus roots, estimated by the body and stylet lengths from fields A and B in 2010 study.

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。

レンコンネモグリの発生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(*Hirschmanniella*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センチュウ *Hirschmanniella oryzae*(以下イネネモグリ) 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、発生消長と生活環についても調査されている(後藤, 1969; 桑原・弥富, 1970; 佐藤ら, 1970; 高倉・山本, 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(桑原・弥富, 1970; 高倉・山本, 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(桑原・弥富, 1970; 高倉・山本, 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, 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（高木ら, 2016; 植松ら, 2015）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（高木ら, 2016; 植松ら, 2015）。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。

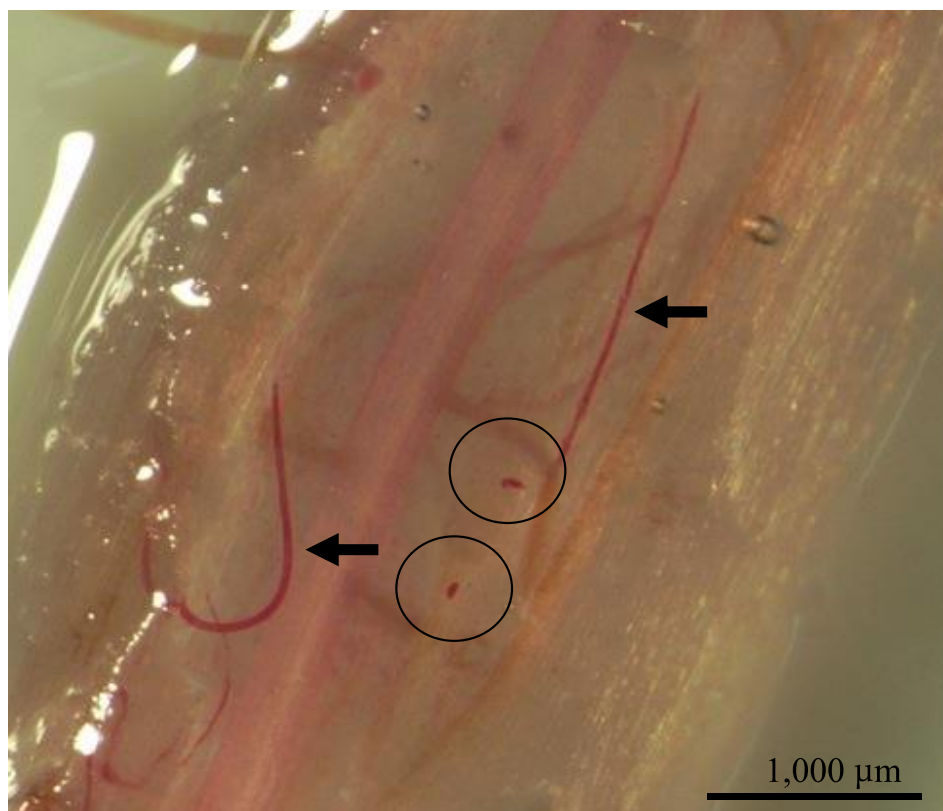


Fig 2-5. Staining of nematodes in lotus roots using the hypochlorite-acid-fuchsin method. Circles and arrows indicate eggs and vermiform nematodes of *Hirshmanniella diversa*, respectively. Scale bar represents 1,000 μm .

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 緒言

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; 高木ら, 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 50-100 kg/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。

材料および方法

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°C48h）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。

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.) 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.) でシールし、25℃の人工気象機内に 2 週間静置した。2 週間後、薬液をセンチウ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℃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。

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加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。

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。表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、蒸留水処理を除く薬剤処理区で、放飼7日後にゾーン4 (外壁) を除く寒天培地内のセンチウを無作為に30~40頭微針で釣り上げて蒸留水中に放飼し、25℃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。

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 1.65 m²)の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 (36°04'N, 140°14'E) 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壤土(Silty Clay)(假屋, 私信)であり、粒径の細かい粘土が多く、ベルマン法による土壌中のレンコンネモグリ密度調査を行うことができなかったが、なるべく汚染程度が同様となるように投入量を調節した。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/10 a (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/10 a (ベンフラカルブ 5% 粒剤 40 kg/10a 相当量, 33.0 g/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 40 kg/10 a 相当量, 9.9 g/コンテナ) 施用区および無処理区を設定した。薬剤は 2012年5月31日、湛水(水深約 5cm)したコンテナに各薬剤を規定量散布し、手で混和した。その後、所内圃場から掘り取ったレンコンネモグリ非汚染ハス(品種:「福だるま」)

を1コンテナ当たり6-8本定植した。定植後は6月7日、6月28日、7月12日、8月15日、9月11日および10月12日にハス細根を1コンテナから15g以上採集し、水洗したのちに5mm程度にハサミで細断してよく攪拌した後、5gを3連でベルマン法(25°C48時間)に供試し、根部内のレンコンネモグリを分離・計数した。

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

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年から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。

6) 統計処理

全ての統計処理は、R (Ihaka and Gentleman, 1996) Ver. 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, Ver. 3.6.1)のグラフィカルインターフェースであるEZR (Kanda, 2013) (Saitama Medical

Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いて行った。

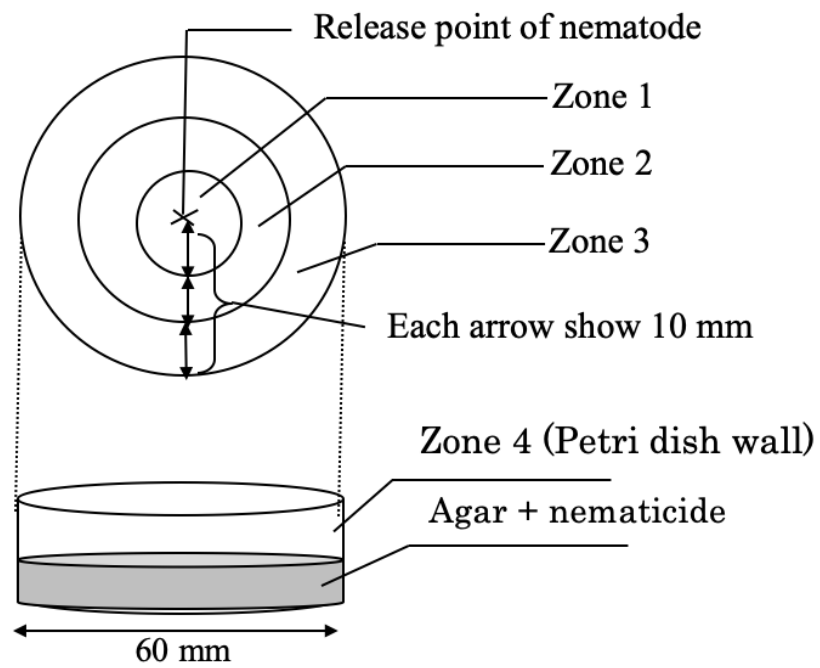


Fig. 3-1 The schema and separation of zone in the nemastatic effect experiment. Upper is top view and lower is side view of 60 mm petri dish.

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/ha or L/ha) 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	Lepidoptera
		Carbaryl	G	5.0	1.5-3.0	Lepidoptera
		Methomyl	WP	45.0	0.7-2.7	Lepidoptera
		Carbosulfan	G	3.0	1.5-9	Nematode
		Oxamyl	G	0.8	0.5-4.0	Nematode
Organophosphate	1B	Fenthion	G	5.0	1.0-2.0	Coleoptera
		Fenitrothion	WP	40.0	1.0-1.5	Hemiptera
		Trichlorfon	EC	50.0	1.3-3.0*	Lepidoptera
		Imicyafos	G	1.5	2.3-7.5	Nematode
		Fosthiazate	G	1.5	1.5-4.5	Nematode
		Acephate	G	5.0	1.5-6.0	Lepidoptera
Phenylpyrazoles	2B	Isoxathion	MGF	3.0	1.8-2.7	Hemiptera
		Fipronil	FL	5.0	0.05-0.08*	Hemiptera
Pyrethroid	3A	Pyrethrins	EC	3.0	0.06-0.09*	Lepidoptera
		Etofenprox	G	1.5	0.3-1.4	Coleoptera
		Silafluofen	WP	20.0	0.3	Hemiptera
Neonicotinoid	4A	Tiamethoxam	G	0.5	0.2-0.5	Hemiptera
		Imidacloprid	WP	10.0	0.2-0.3	Hemiptera
		Dinotefuran	G	1.0	0.3-2.0	Hemiptera
		Clothianidin	G	0.5	0.2-0.5	Hemiptera
		Thiacloprid	WP	30.0	0.2-0.5	Hemiptera
		Nitenpyram	WP	10.0	0.1-0.2	Hemiptera
Avermectins and milbemycins	6	Acetamiprid	G	2.0	0.6-1.2	Hemiptera
		Abamectin	EC	1.8	1.5-6.06*	Hemiptera
		Emamectin benzoate	EC	1.0	1.5-3.06*	Lepidoptera
Miscellaneous non-specific (Multisite) Inhibitor	8	Milbemectin	EC	1.0	1.5-3.06*	Acariformes
		Metam sodium	L	33.0	132.0-198.0*	Nematode
		DD	EC	97.0	145.5-388.0*	Nematode
Nereistoxin	14	DCIP	G	30.0	90.0	Nematode
		Cartap hydrochlorid	WP	75.0	0.8-4.5	Nematode
Tetronic and tetramic acid derivative	23	Tiocyclam	WP	50.0	0.8-1.5	Hemiptera
		Spirotetramat	FL	22.4	0.2-1.3*	Hemiptera
Uncategorized	-	Spiromesifen	FL	30.0	0.2-1.8*	Spider mite
		Fluopyram	G	0.5	1.0	Nematode
		Lime nitrogen	G, D	27.5	200-1,000*	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.

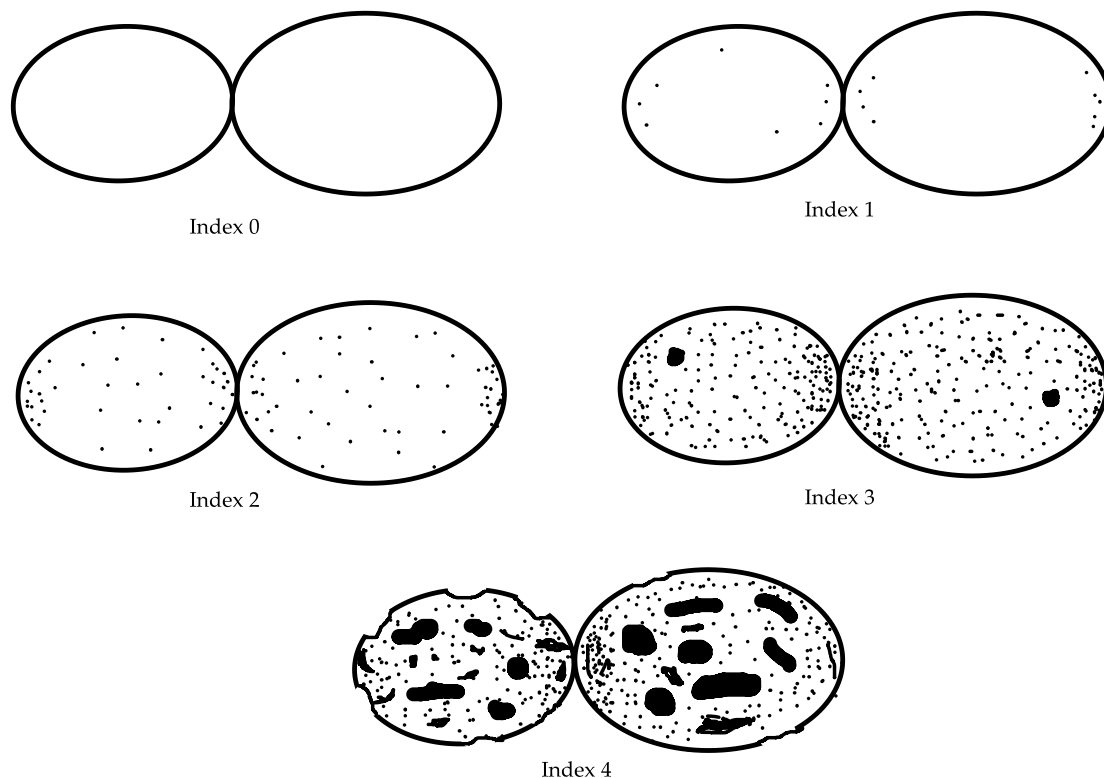


Fig. 3-2 Diagram of lotus tuber damage index 0-4. 0: Not damaged, 1: Slightly damaged, little small black spots by *H. diversa* (less than 3 mm in diameter) on the tuber surface. No effect on the commercial value, 2: Many small black spots. Decreased commercial value, 3: Many small and big black spots (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.

結果

1) レンコンネモグリに対する室内殺線虫効果

殺線虫効果試験の結果を Table 3-2 に示した。フェニルピラゾール系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系、テトロン酸およびテトラミン酸誘導体系および多作用点阻害剤は、補正死虫率 70% 以下と殺線虫効果が低かった。それ以外の剤ではカーバメート系、有機リン系およびネライストキシシン系剤の多くが高い殺線虫効果を有した。カーバメート系ではベンフラカルブ (成分量 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、アラニカルブ (成分量 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、カルバリル (成分量 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、カルボスルファン (成分量 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) およびオキサミル (成分量 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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、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
	Fosthiazate	10	69
		1	0
	Acephate	100	71
		1	0
Isoxathion	10	13	
	2.21	10	
Phenylpyrazoles	Fipronil	22	2
Pyrethroid	Pyrethrins	60	52
	Etofenprox	0.15	0
	Silafluofen	100	0
Neonicotinoid	Tiamethoxam	0.1	16
	Imidacloprid	100	0
	Dinotefuran	0.2	0
	Clothianidin	0.1	0
	Thiacloprid	150	3
	Nitenpyram	100	0
	Acetamiprid	0.4	0
Avermectins and milbemycins	Abamectin	36	20
	Emamectin benzoate	5	69
	Milbemectin	10	40

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

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

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

Table 3-2. Continued.

Mode of action ^{a)}	Pesticide	Concentration of pesticide ($\mu\text{g/ml}$)	Corrected Mortality (%) ^{b)c)}	
Miscellaneous non-specific (Multisite) Inhibitor	Metam sodium	108	3	
		72	2	
		48	0	
	DD	24	0	
		38.8	2	
		77.6	11	
		DCIP	10	4
Nereistoxin	Cartap hydrochloride	1,500	100	
		750	100	
		250	100	
	Tiocyclam	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
	Morantel tartrate	360	100	
		225	98	
		180	89	
		90	39	
		45	18	
		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).

2) レンコンネモグリに対する室内制線虫効果試験

制線虫効果の結果を Table 3-3 および Table 3-4 に示した。カルタップ

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

薬液中で活動性を失った後、蒸留水中に移したレンコンネモグリのうち、オキサミルとカズサホスほどの濃度でも 85%以上が活動性を回復した (Table 3-4)。カルタップ、ホスチアゼートおよびイミシアホスは、濃度が低くなるに従って活動性を回復する率が上昇した (Table 3-4)。一方、唯一ベンフラカルブは高濃度、中間濃度 (それぞれ 100, 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$)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 (µg/ml)	Total No. of tested <i>H. diversa</i>	Abundance ratio of <i>H. diversa</i> (%) ^{a)}			
			Zone 1 ± SD ^{b)}	Zone 2 ± SD ^{b)}	Zone 3 ± SD ^{b)}	Zone 4 ± SD ^{b)}
Benfuracarb	100	230	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	10	227	99.5 ± 1.0 a	0.5 ± 1.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	1	272	74.3 ± 6.8 b	11.5 ± 3.6 b	12.3 ± 3.7 b	1.9 ± 2.7 a
Control	-	329	14.3 ± 10.9 c	19.8 ± 7.5 c	0.0 ± 0.0 a	66.0 ± 17.1b
Cartap	2,500	358	99.3 ± 1.0 a	0.7 ± 1.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	250	223	63.5 ± 10.2 b	20.7 ± 6.2 b	15.7 ± 9.6 b	0.0 ± 0.0 a
	25	255	24.8 ± 6.2 c	18.8 ± 6.3 b	18.6 ± 7.4 b	37.8 ± 15.3 b
Control	-	329	14.3 ± 10.9 c	19.8 ± 7.5 b	0.0 ± 0.0 a	66.0 ± 17.1c
Fosthiazate	600	249	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	60	239	92.7 ± 3.6 a	3.4 ± 2.5 a	3.8 ± 1.9 b	0.0 ± 0.0 a
	6	215	66.5 ± 6.9 b	22.4 ± 6.9 b	9.6 ± 1.7 c	1.5 ± 1.1a
Control	-	329	14.3 ± 10.9 c	19.8 ± 7.5 b	0.0 ± 0.0 a	66.0 ± 17.1b
Oxamyl	100	253	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	10	221	99.1 ± 1.2 a	0.9 ± 1.2 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	1	186	85.6 ± 4.8 b	12.2 ± 5.4 b	1.1 ± 1.5 b	1.0 ± 2.3 a
Control	-	245	10.2 ± 6.9 c	3.9 ± 3.6 a	4.1 ± 2.8 b	81.8 ± 8.8 b
Cadusafos	100	186	97.0 ± 3.2 a	3.0 ± 3.2 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	10	196	90.5 ± 7.5 a	8.4 ± 5.6 a	1.1 ± 2.4 a	0.0 ± 0.0 a
	1	192	55.4 ± 9.3 b	28.3 ± 11.8 b	13.2 ± 7.4 b	3.1 ± 2.0 a
Control	-	245	10.2 ± 6.9 c	3.9 ± 3.6 a	4.1 ± 2.8 a	81.8 ± 8.8 b
Imicyafos	3,000	236	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	600	217	99.4 ± 1.3 a	0.6 ± 1.3 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
	60	220	96.5 ± 5.5 ab	0.0 ± 0.0 a	0.9 ± 1.2 ab	2.6 ± 5.8 a
	6	229	91.9 ± 3.8 b	3.8 ± 1.5 b	4.3 ± 4.6 b	0.0 ± 0.0 a
Control	-	236	5.6 ± 4.1 c	6.9 ± 2.9 b	4.6 ± 3.3 b	82.8 ± 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. 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; $P < 0.05$)

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-

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 章の露地圃場の発生消長と類似した。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 1.0 kg/10 a および 2.0 kg/10 a 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 1.0 kg/10 a 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; $P < 0.05$)。

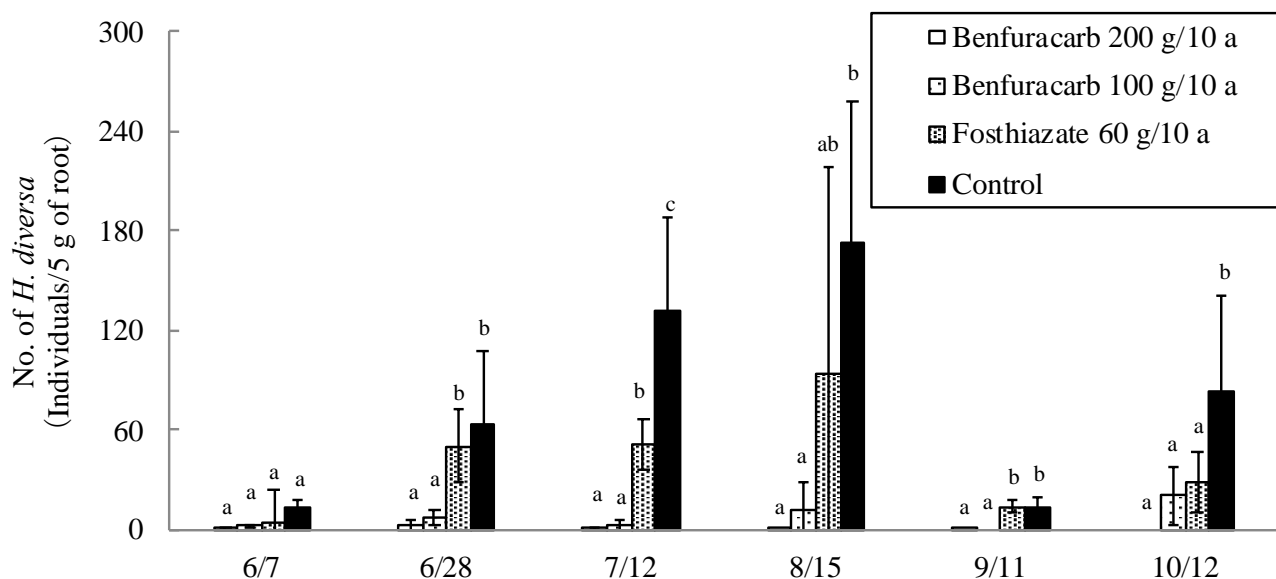


Fig. 3-3 Population dynamics of *Hirschmanniella diversifica* in the lotus root applied with different nematicides in the 2012 microfield experiment. Bars indicate standard deviation. Benfuracarb and fosthiazate formulations were granule and the active ingredient percentages were 5% and 1.5%, respectively. Different letters in the same days indicate significant difference (Tukey HSD test; $P < 0.05$).

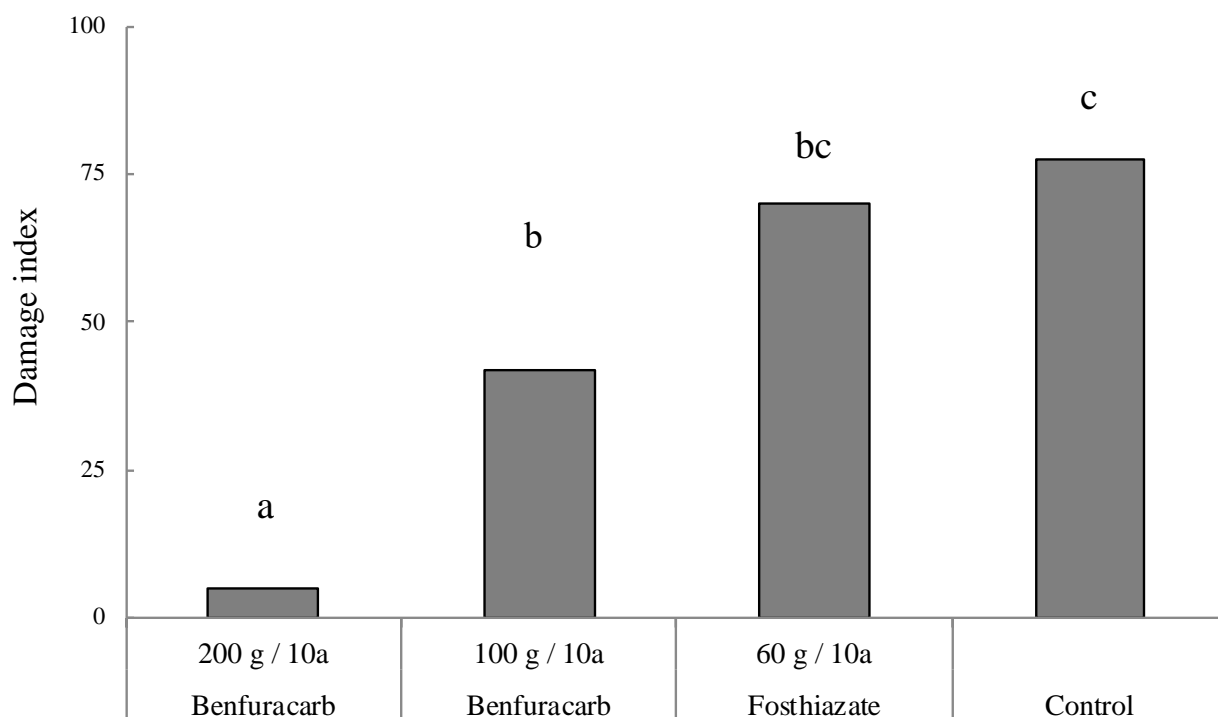


Fig. 3-4 Effect of two kinds of nematicides on damage index in lotus tubers in the 2012 microfield experiment. Damage index was evaluated based on Table 5. Benfuracarb and fosthiazate formulations were granule and the active ingredient percentages were 5% and 1.5%, respectively. Different letters above columns indicate significant difference (Kruskall-Wallis test; $P < 0.05$).

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年から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 was 150 kg/ha.

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 black spots, no commercial value.

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; $P < 0.05$)

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 et al, 1984) や、乾田化しての DD 剤等 (Iyatomi and Nishizawa, 1970) の使用が検討されている。しかしながら、ハスでの線虫防除の取り組みは過去に全く事例がない。常時湛水条件のハス田では、DD などのガス化して効果を発揮するタイプのいわゆる土壌薫蒸剤は、殺線虫効果が期待できないと考えられたため、本研究では非土壌薫蒸剤を中心に検討した。殺線虫効果については、線虫剤としての使用がされていないピレスロイド、ネオニコチノイドなどを含め、多くの系統の剤で検討を行なった。また、前述のように水系での使用は想定されていない土壌薫蒸剤についても、カーバムナトリウム塩 (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 $\mu\text{g/ml}$ (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%, チオシクラム 50% と他剤と比

較して高いが、施用量は他剤と変わらないため、実用的濃度 1-50 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$) 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 $\mu\text{g/ml}$ and 32.9 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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、レンコネモグリでは、これらの剤の高濃度帯 (100 $\mu\text{g/ml}$) 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ると考えられる。

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

土壌燻蒸剤であるカーバムナトリウム塩および DD については、ガス化しない水中での効果は低かった。カーバムナトリウム塩は、水溶液であれば有効成分であるチルイソチオシアネート（MITC）に分解され、殺線虫効果が得られるとの情報があったが、カーバムナトリウム塩が MITC に変化するためには土壌の存在が必要である（日本植物防疫協会, 2016）ことから、本試験系では正確に評価できなかった可能性がある。いずれにしても、土壌燻蒸剤は水系ではガス化しないうえ、水系に流出した場合の毒性が高いことから、ハスでの使用は困難が伴うことが予想される。現在最も効果が高く、安定している土壌燻蒸剤

が使用できないということは、レンコンネモグリの防除が困難である原因の大きな理由の一つである。これを払拭するためには、湿田を乾田化して、砕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 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 LC_{50} 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 $30.1\text{ kg}/10\text{a}$ 、カルタップ水和剤 (成分含量 75%) で $8.4\text{ kg}/10\text{a}$ 、シアナミド粒剤 (成分含量 27.5%) で $100\text{ kg}/10\text{a}$ 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 µg/ml となり、規制値である水濁 PEC 670 µg/ml に近い値となってしまう(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、水稻のイネシンガレセンチュウ

Aphelenchoides besseyi に既に登録を有していることから選抜した。他に、オキサミル、カズサホス、ホスチアゼートおよびイミシアホスを、日本でよく使用されている線虫剤として選抜し、試験に用いた。その結果、カルタップは制線虫効果が最も低かった。オキサミル、カズサホスおよびホスチアゼートは、制線虫効果は高かったものの線虫の効果が切れると活動性を取り戻した。また、カルタップおよびイミシアホスも上記 3 剤よりも回復率は低かったものの、濃度に依存して活動性を取り戻した。ベンフラカルブは最も活動再開率が低く、致死効果が高いと考えられたことから、本試験では有効な線虫剤であると考えられた。制線虫効果のみが高い薬剤については、ハスに対するレンコンネモグリの加害時期が明らかとなり、その期間が短期間であった場

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

以上の研究から、ベンフラカルブは殺線虫効果、制線虫効果を併せもち、隔離柵圃場試験についても、成分投下量 1.0 kg/10a および 2.0 kg/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 1.2 kg/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、1.2 kg/10a という施用量は、水稻での標準施用量 80 g/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（Karpouzas et al., 2005; Pantelelis et al., 2006）や抵抗性の発達（Viglierchio and Brown, 1989; Yamashita and Viglierchi, 1987）等により、これらが効果を失う可能性があることから、近縁のイネネモグリセンチュウで開発されているような抵抗性品種の選抜（Ramakrishnan et al, 1984）、乾田化後に土壌燻蒸を行う（Iyatomi and

Nishizawa, 1970) などの耕種的防除法や、生物的防除法(蔵下ら, 2018) など、IPM の考え方に従ってより多様な防除方法を検討していく必要があると考えられる。

第4章 レンコンネモグリセンチウの全国的分布状況と系統関係

緒言

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 *Hirschmannella* 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時点では、レンコンネモグリには和名が無く、イマムラのネモグリの口針長など、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、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、その際に日本に導入され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ム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目指す。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、イマム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目指す。

材料および方法

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、イマムラネモグリ）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*Oryzae sativa*の根を採取した。（Fig. 4-1、Table 4-1～4-3）。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。

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（OM Digital Solutions Corp., 東京, 日本）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）。

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（ニッポンジーン, 富山, 日本）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（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'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCG-3') (Floyd et al., 2002)を用いた。rRNAの28S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, 大阪, 日本) を用いて Bio-Rad T100[™] Thermal Cycler (BIORAD, California, USA) または TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ, 滋賀, 日本) にて行った。18SとD2-D3の増幅条件は、94°Cで2分間処理したのち、94°Cで30秒間の熱変性、50°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで1分間の伸長反応を40サイクル行い、その後72°Cで5分間最終伸長ステップを行った。*mtCOI*の増幅条件は、94°Cでの2分間処理したのち、94°Cでの1分間の熱変性、48°Cでの2分間のアニーリング、68°Cでの3分間の伸長を35サイクル行い、その後72°Cで5分間最終伸長を行った。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 東京, 日本) を用いて精製し、精製したPCR産物はABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, 東京, 日本) と BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies Japan, 東京, 日本) を用いて配列を決定した。

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(Araya et al., 2016; Bert et al., 2008; De Ley et al., 2005; Feng et al., 2016; Kuroda et al., 2021; Liu et al., 2017; Majd Taheri et al., 2013; Tandingan De Ley et al., 2007; Van den Berg et al., 2009)。

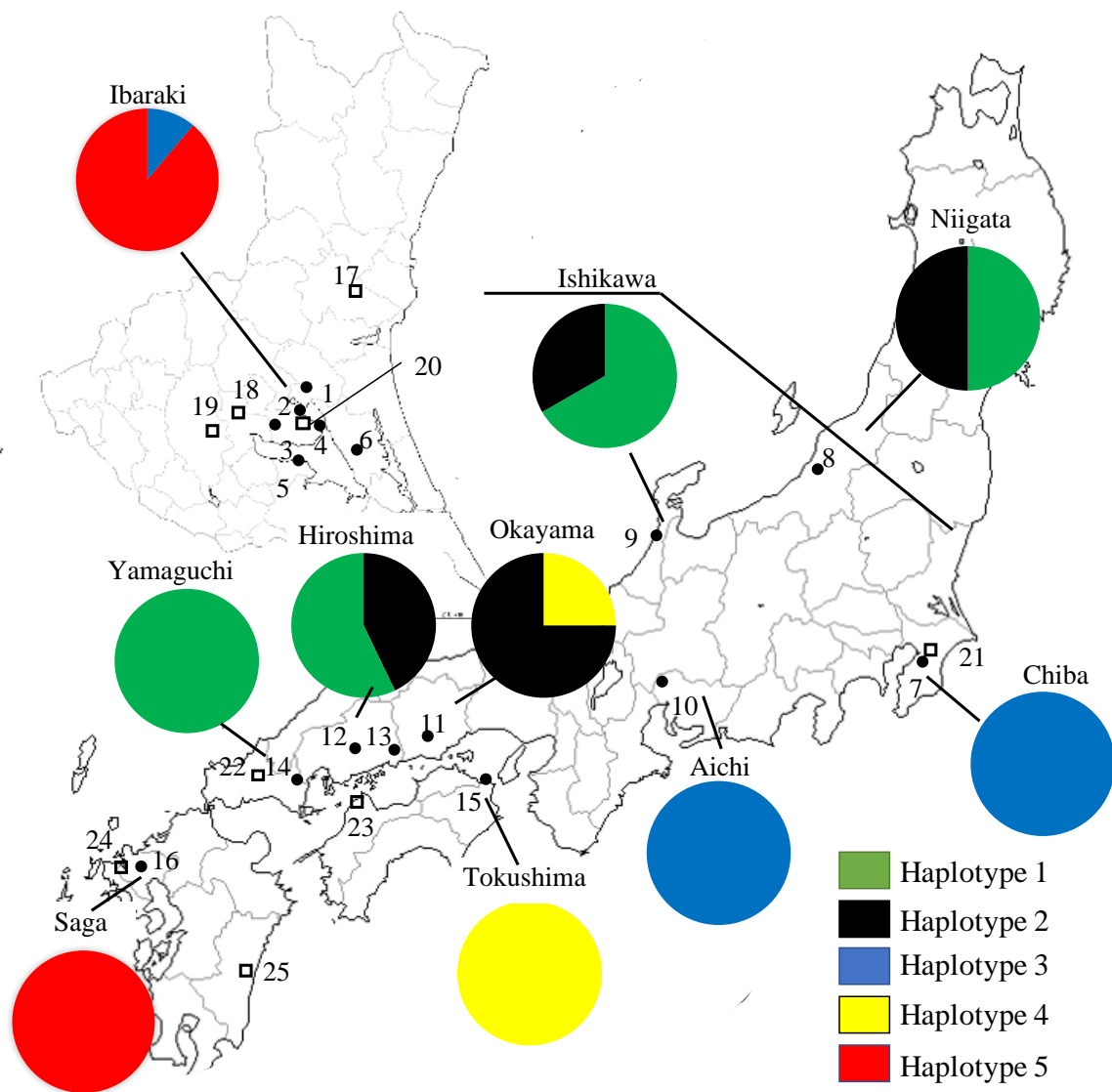


Fig. 1. Location of *Hirschmanniella diversae* and *H. oryzae* from lotus and rice root in Japan, respectively. Numbers correspond to Table 1, 2 and 3. Closed black circles with number are lotus sampling places and open squares with number are rice sampling places. Pie-Chart graph represent haplotype proportion of *H. diversae* based on *mtCOI* in each Prefecture. Color of haplotype 1 was green; haplotype 2 was black; haplotype 3 was blue; haplotype 4 was yellow; haplotype 5 was red. Map was cited by CraftMAP (<http://www.craftmap.box-i.net/>)

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	- ¹	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	
	Yamaguchi	Iwakuni City	14	LC701774	LC701815	LC701863	
					LC701812	LC701862	
					LC701813		
					LC701814		
Shikoku	Tokushima	Naruto City	15	-	LC701795	LC701871	
					LC701797	LC701872	
					LC701794		
					LC701796		
					LC701798		
Kyushu	Saga	Siroishi Town	16	LC701775	-	LC701838	
				LC701776		LC701839	
						LC701840	
Total				9	40	41	

¹ - 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	- ¹	LC701822	LC701882
				LC701823	LC701883	
				LC701826	LC701884	
				LC701825		
				LC701824		
		Tsuchiura City	18	-	LC701832	-
					LC701831	
		Tsukuba City	19	LC701778	LC701821	LC701879
		Kasumigaura City	20	-	LC701816	-
	Chiba	Chonan Town	21	LC701779 LC701780	LC701830	LC701885
LC701829					LC701886	
LC701828					LC701887	
LC701827						
LC701819					-	
Chugoku	Yamaguchi	-	22	-		
Shikoku	Ehime	Matsuyama City	23	-	LC701817	LC701880
Kyushu	Nagasaki	Kawatana Town	24	-	LC701818	LC701881
	Miyazaki	Miyazaki City	25	-	LC701820	-
Total				3	17	9

¹- 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	Region	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> ¹	-	-	-	-	20	24.0 (23.0-25.0)	
<i>H. imamuri</i> ¹	-	-	-	-	15	30.0 (29.0-32.0)	
<i>H. oryzae</i> ¹	-	-	-	-	17	17.0 (16.0-19.0)	
<i>H. imamuri</i> ²		Chiba	Chonan Town	-	25	25.6 (23.8-30.0)	

¹Sher (1968)

²Mihira & Nagai (1996)

結果

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 20.2~26.1 μm 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 (23-25 μm) 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 (29-32 μm) 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。

2) レンコンネモグリおよびイネネモグリの系統樹

(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 0.0~0.3% (0~2bp) であり、イネネモグリは 0.0~0.75% (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。

(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 0.0~0.4% (0~2bp) であ

り、イネネモグリは 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リは、それぞれ **Clade I** と **Clade III** に属した。

(3) ミトコンドリア *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)、イネネモグリ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)。

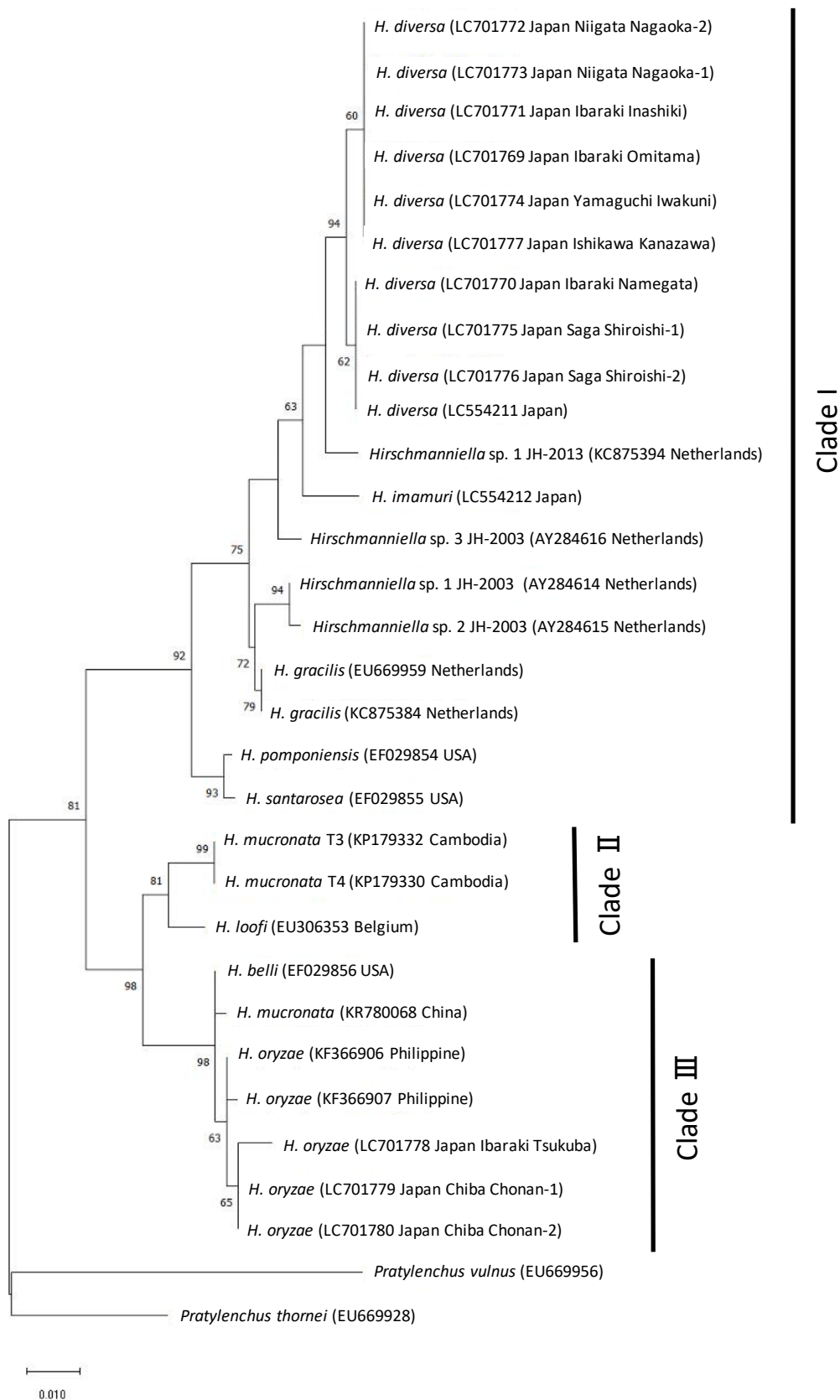


Fig. 4-2. Phylogenetic tree inferred from the 18S rDNA gene sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar represents the phylogenetic distance.

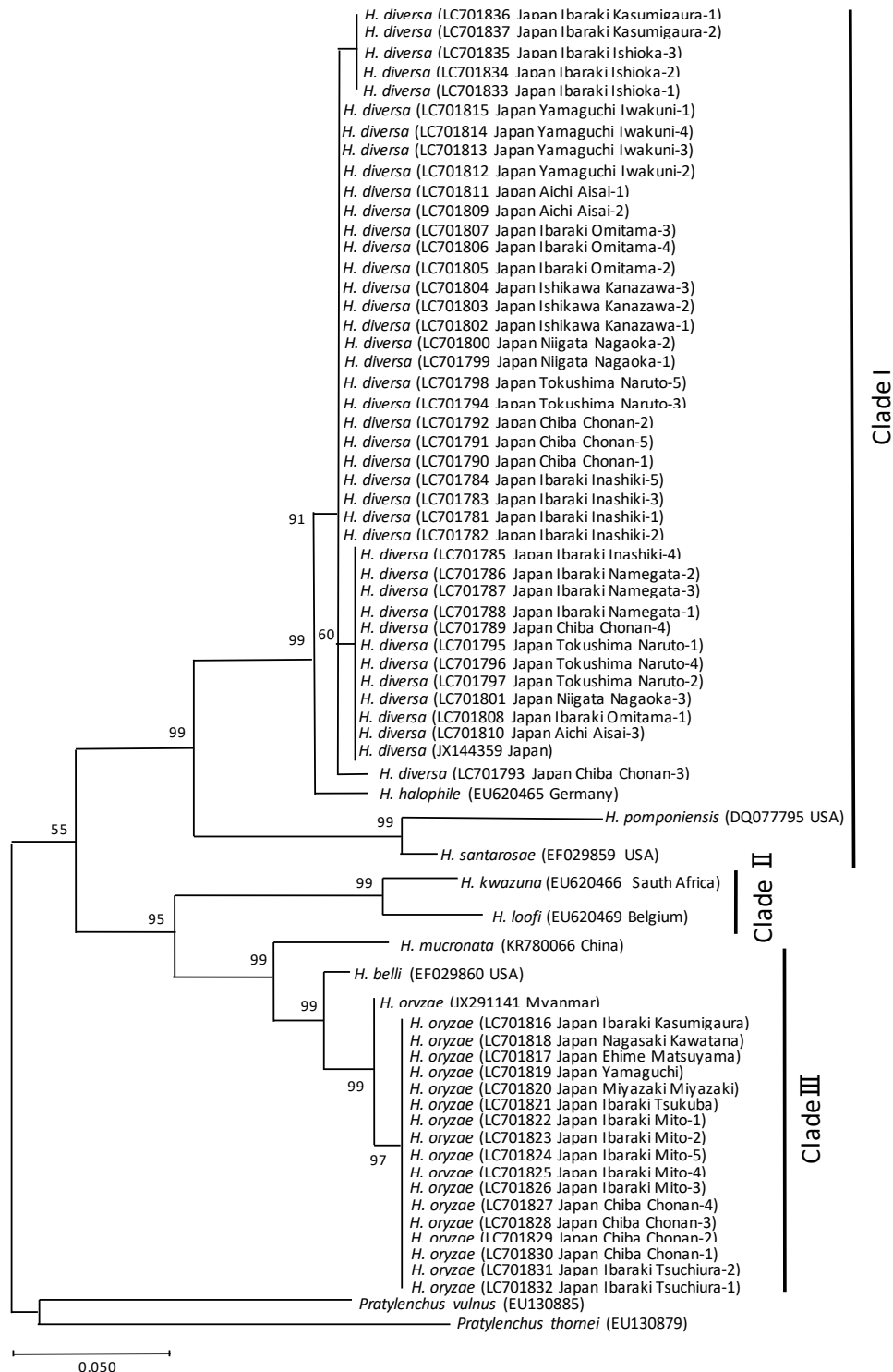


Fig. 4-3. Phylogenetic tree inferred from the D2-D3 region of 28S rDNA gene sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar represents the phylogenetic distance.

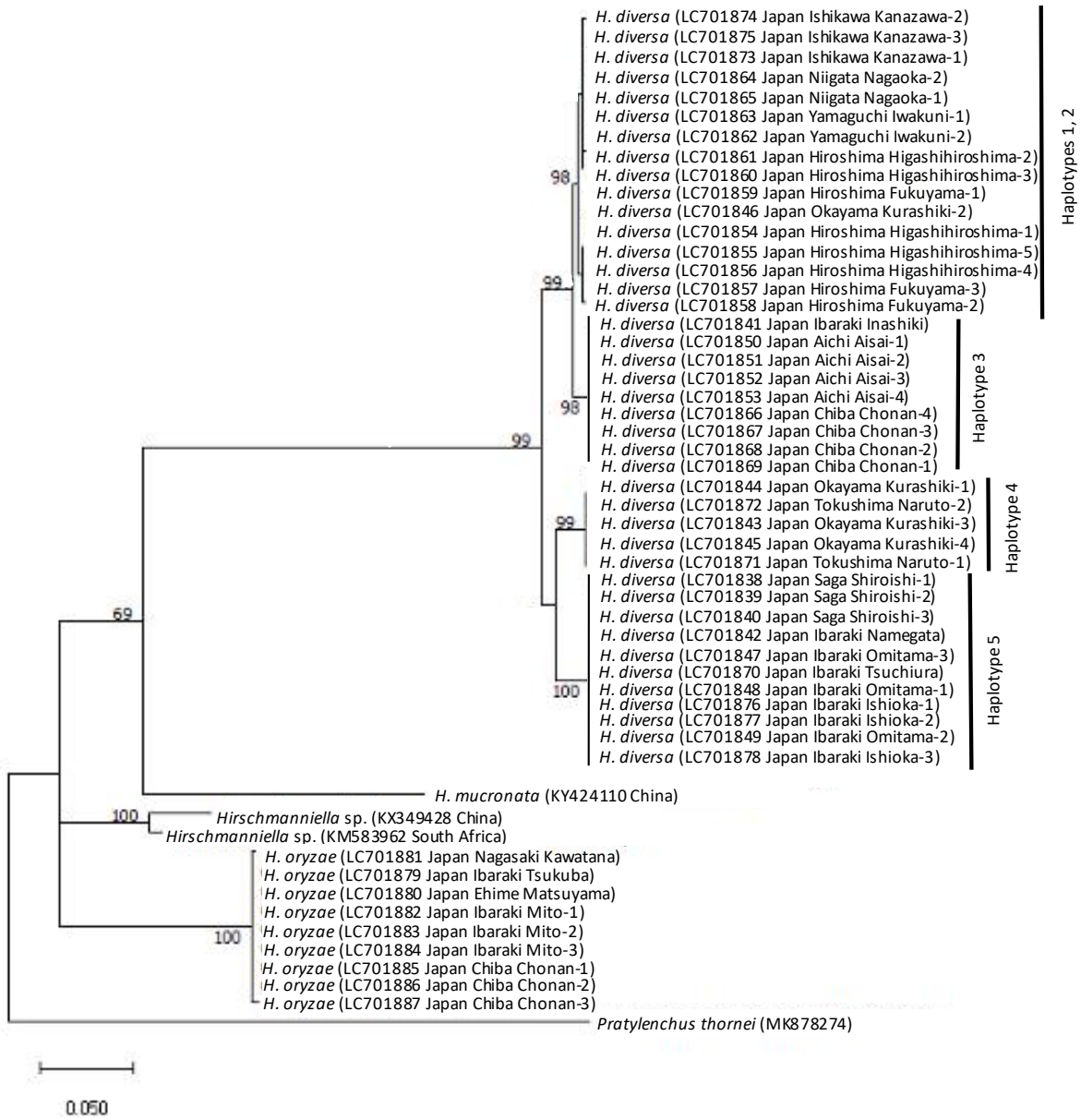


Fig. 4-4. Phylogenetic tree inferred from the *mtCOI* sequences of *Hirschmanniella* spp. by the maximum likelihood method. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) of 1,000 replicates. The bar represents the phylogenetic distance.

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

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

Table 4-5. Sequence variation and nucleotide difference of *Hirschmanniella* spp. based on *mtCOI* gene.¹

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	-

¹ Above diagonal shows the % of nucleotide variation and below diagonal shows the number of nucleotide differences. Box shows *H. diversa* intra-specific variations.

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. (2021) 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・彌富(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)と同じ手賀池から *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のを 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個体から検出された。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%)。

*H. diversa*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。

ハスの塊茎は苗から3年以上かけて品種特性を発現し(南川・齋藤, 1962)、1株は20m²以上に広がる(南川・齋藤, 1962)。ハスの育種には広大な面積と

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

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

レンコンネモグリが地域間をどのように移動するのかという問題は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付与された。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より付加価値が重要になってくることや、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。

第 2 章では、茨城県におけるレンコンネモグリのハス根部内における発生活長を調査し、かつその幼虫、成虫の齢構成や交尾率から生活環を推察した。まずは茨城県のレンコンネモグリ多発地域である石岡市の圃場で、ハスから分離された *Hirschmanniella* 属線虫がレンコンネモグリであることを形態的、分子生物学的に証明した。また、複数圃場で複数年に渡り発生活長を調査し、傾向が同様

となることを示した。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 *Meloidogyne 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。4月-5月(Fig. 1-2、露地栽培の場合)、レンコンが定植されると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月-7月にかけてハスの根部内などに産卵を行ったのち、7月-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) および土壤中で越冬すると予想される。

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、本性(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、その表皮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)。若芽やその近辺の肥大途中のレンコンには、既にレンコンネモグリによる加害痕が認められることから

(高木ら, 未発表)、レンコンネモグリによるレンコンの加害は肥大早期の若芽の時期に起こっており、摂食によって崩壊したレンコン組織と、その周辺部分の生育量ギャップが“ユズ肌症状”の原因である表皮の凹凸となると考えられる。またその加害痕に二次的に鉄細菌などから成る細菌層が形成されてバイオフィルムを生じ、ビビアナイト $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ などの着色物質が沈着することにより、表面が黒変する“ゴマ症状”を生じると考えられる (蔵下ら, 2018; Kurashita et al., 2021a)。

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

第3章では、現場で最も強く求められる防除法の一つである化学的防除法、すなわち農薬について検討を行った。ハスは基本的に湛水された状態で作業が行われ、水を切って収穫を行う土掘りの地域でも、収穫以外の作業は全て湛水された状態で行う。また、ハス田は湖、川および海などの水系に直結し、施用される農薬についてはその魚毒性や環境への影響について特段の配慮をする必要がある。特に茨城県はハス田の多くが湖沼面積日本第2位の霞ヶ浦周辺に存在し、ハス田は流出窒素などが霞ヶ浦の水質汚染の一因として挙げられることから、行政も霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画(第7期) (茨城県ほか, 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, 2015）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 2.0kg/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

Colocasia 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で農薬評価書(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 1.2kg/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ム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。

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。

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度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

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賅っている。レンコンは栽培可能な土地に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。

① 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。

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100g/10aおよび200g/10a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が示された。

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* と略)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ので、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。先生方、ありがとうございました。

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、宮本拓也様、柏木優様、小田部祐様、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., Cantalapedra-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. gutierrezii* and *P. panamaensis* topotypes. *Euro. J. Plant Pathol.* 145(4): 973-998. DOI: 10.1007/s10658-016-0884-z
- Baermann, G. (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned-Indië* 57: 131-137.
- Bert, W., Leliaert, F., Vierstraete, A. R., Vanfleteren, J. R. and Borgonie, G. (2008) Molecular phylogeny of the Tylenchina and evolution of the female gonoduct (Nematoda: Rhabditida). *Mol. Phylogenet. Evol.* 48(2): 728-744. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.04.011
- Bridge, J., Luc, M. and Plowright, R. A. (2005) Nematode parasites of rice. In: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture 2nd Edition*; Luc M., Sikora A. R. and Bridge J.; CABI Publishing: Wallingford, UK: pp 87-130.
- Cobb, B. G., Vanderzee, D., Loescher, W. H. and Kennedy, R. A. (1985) Evidence for plantlet regeneration via somatic embryogenesis in the grasses *Echinochloa muricata* and *E. crus-galli* var. *Oryzicola*. *Plant Sci.* 40: 121-127. DOI: 10.1016/0168-9452(85)90052-4
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T. and Moens, T. (2010) Exploring the use of

- cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *Plos One* 5 (10): e13716. DOI: 10.1371/journal.pone.0013716
- De Ley, P., De Ley, I. T., Morris, K., Abebe, E., Mundo-Ocampo, M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha-Olivares, A., Jay Burr, A. H. and Baldwin, J. G. and Thomas, W. K. (2005) An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci.* 360(1462): 1945-1958. DOI: 10.1098/rstb.2005.1726
- Deuner, C. C., Kovalesski, M. and Ebone, L. A. (2019) Nematicides: history, mode, and mechanism action. *Plant Sci. Today* 6(2): 92-97. DOI: 10.14719/pst.2019.6.2.468
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340
- Eissa, M. F., Bary, N. A., Yassin, M. Y. and Youssef, M. M. A. (1986) Efficacy of carbofuran field application on the rice root nematode, *Hirschmanniella oryzae* and rice yield in Northern Nile-Delta. *Bull. Fac. Agric. Cairo Univ.* 17: 1075–1084.
- Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles (1996) Fenthion. <http://extoxnet.orst.edu/pips/fenthion.htm> (accessed on 30th November 2019).
- Faske, T. R. and Starr J. L. (2006) Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to abamectin. *J. Nematolo.* 38: 240-244.
- Feng, H., Wei, L., Chen, H. & Zhou, Y. (2016). Morphological and molecular characterization of the rice root nematode, *Hirschmanniella mucronata*, from Jiangsu, China. *Acta Phytopathol. Sinica* 46: 474-484. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.2016.04.006 (in Chinese)
- 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. Nematolo. 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)

Ihaka, R., and Gentleman, R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. J. Comp. Graph. Stat. 5:299-314. Available via <http://www.R-project.org>.

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 “EZR” (Easy R) for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48: 452-458. DOI: 10.1038/bmt.2012.244
- 金坂考澄 (2010) レンコン品種, 金澄20号・34号・36号の育成. *農林水産ジャーナル*. 3 (2): 16-19.
- Kaneyasu M., Nagata M., Ikeda H., Ohnuki K. and Shimizu K. (2019) Anti-allergic activity of lotus root (*Nelumbo nucifera*) powder in TDI-sensitized nasal allergy model mice. *Food Agricul. Immuno.* 30 (1): 968-978. DOI: 10.1080/09540105.2019.1651255
- 環境省 (2010) 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料 カルシウムシアナミド (石灰窒素)・シアナミド https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/s18_cyanamide.pdf. (2020年1月1日閲覧)
- Karakas, M. (2004) Life cycle and mating behavior of *Hirschmanniella oryzae* (Nematoda: Pratylenchidae) on excised *Oryza sativa* roots. *Fen. Bilimleri. Dergisi.* 25: 1-6.
- Karpouzias, D. G., Fotopoulou, A., Menkissoglu-Spirodi, 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. 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・中曽根英 (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 zaeae*. 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. PhD 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

Pantelalis, 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. Landwirtschaft. Veterinarmed. 22 (3): 281-284

Prot, J. C., Soriano, I. R. S., Matias, D. M. and Savary, S. (1992) Use of green manure crops in control of *Hirschmanniella mucronate* and *H. oryzae* in irrigated rice. J. Nematolo. 24 (1): 127-132.

Ramakrishnan, S., Varadharajan, G. and Sutharsan, PD. (1984) TKM9 is resistant to rice-root nematode. Int. Rice Res. Newsl. 9: 20.

Randhawa, N., Singh I., Sakhuja, P. K. and Malhi, S. S. (1992) Effect of date of transeplanting of casmiati rice cultivars and spacing in the population buildup of rice-root nematode *Hirschmanniella oryzae*. Indian J. Nematol. 22 (1): 4-8.

Ryss, A. Y. and Karnkowski, W. (2010) *Hirschmanniella caudacrena* Sher, 1968 intercepted in aquarium plants imported to Poland. EPPO Bulletin 40: 204-210.

- 笹倉寛之・森郁恵. (2013) 線虫 *C. elegans* におけるモノアミンによる神経制御. 生体の科学 64(4): 354-359. DOI: 10.11477/mf.2425101470.
- 佐藤テイ・湖山利篤・腰原達雄 (1970) イネネモグリセンチュウの寄生と水稻の栽培条件との関係. 東北農研報 39: 207-219.
- 沢田英司 (2010) 新特産シリーズ レンコン: 栽培から加工・販売まで. 農文協. 東京 pp 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・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/docme

nts/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・宮本拓哉・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-y
- 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-
bj10202
- 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. *Appli. Entomol. Zool.* 47: 291–294. DOI: 10.1007/s13355-012-0115-9
- 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
- Tungmunnithum, 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・八尾充睦・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・八尾充睦・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 daverti* from *H. trifolii*. *Eur. J. Plant Pathol.* 143(4), 833-845. DOI:10.1007/s10658-015-0735-3
- Wakugawa, T., Nagamine, K., Hiramatsu, M., Takeda, M., Kawata, C., Kashiwada, Y., Shinohara, K., Sawada, Eiji, Yabumoto, Masami., Fujino, Hiromichi., Kitamura, Yoshiaki., Fukui, H., Takeda, N. and Mizuguchi, H. (2020) Identification and characterisation of the anti-allergic compound from lotus root. *Tradit. Kampo Med.* 7(2): 85-95. DOI:10.1002/tkm2.1249
- Walia, R. K. and Bhatti, S. D. (1985) Effect of carbofuran on paddy infected with rice root nematode, *Hirschmanniella oryzae*. *Haryana Agric. Univ. J. Res.* 3: 350-352.
- 渡辺達三 (1994) ハス観照の歴史的変遷について. *造園雑* 57(5): 19-24.
- Win, P. P., Kyi, P. P., Maung, Z. T. Z. and De Waele, D. (2013) Population dynamics of

Meloidogyne graminicola and *Hirschmanniella oryzae* in a double rice-cropping sequence in the lowlands of Myanmar. *Nematology* 15 (7): 795-807. DOI:10.1163/15685411-00002719

Yamashita, T. T. and Viglierchio, R. D. (1987) Field resistance to nonfumigant nematicides in *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・澤田英司 (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 (*Hirchmanniella* spp.). *J. Fujian Agri. Univ.* 23 (4): 426-428. DOI: 10.1371/journal.pone.0013716