

博士論文

レンコンネモグリセンチュウの
発生生態と防除に関する研究
Studies on the population occurrence
and control of *Hirschmanniella diversa*

平成 29 年 3 月

石川県立大学大学院

生物資源環境学研究科

自然人間共生科学科専攻

植松 繁

目次

I	序論	1
	1) 本研究の背景	1
	2) 本研究の目的	3
II	レンコンネモグリセンチュウの生活環の解明に関する研究	4
	1. レンコンネモグリセンチュウの発生消長の解明	4
	1) 緒言	4
	2) 材料および方法	5
	3) 結果および考察	6
	2. レンコンネモグリセンチュウの雑草への寄生状況の調査	12
	1) 緒言	12
	2) 材料および方法	12
	3) 結果および考察	13
III	レンコンネモグリセンチュウのレンコンへの感染機構の解明に関する研究	18
	1. レンコンネモグリセンチュウ感染細根の細胞学的解析	18
	1) 緒言	18
	2) 材料および方法	19
	3) 結果および考察	20
	2. レンコン塊茎における黒皮症発生部位の細胞学的解析	25
	1) 緒言	25
	2) 材料および方法	25
	3) 結果および考察	27
	3. レンコンネモグリセンチュウのレンコン肥大塊茎への侵入過程の解析	35
	1) 緒言	35
	2) 材料および方法	35
	3) 結果および考察	37
	4. レンコンネモグリセンチュウのレンコン若芽への侵入過程の解析	42
	1) 緒言	42
	2) 材料および方法	42
	3) 結果および考察	44
IV	石灰窒素を用いたレンコンネモグリセンチュウ密度低減技術の開発	55
	1) 緒言	55
	2) 材料および方法	56
	3) 結果および考察	58
V	総合考察	67

VI	謝辭	77
VII	引用文献	78
VIII	摘要	85

I 序 論

1) 本研究の背景

ハス *Nelumbo nucifera* は、日本国内に古来より在来する植物であり、「日本書紀」や「古事記」、「万葉集」などにも記載が見られる（渡辺 1994）。また、ハスは観賞価値が高い花ハスと肥大塊茎を食用とする食用ハスとに大別され（南川・田中 1958）、食用ハスはレンコンとして日本国内で広く栽培が行われている。レンコンの平成 27 年産における国内での栽培面積は 3,950ha、収穫量は 56,700t、出荷量は 47,400t にのぼり（農林水産省大臣官房統計部 2016）、国内の根菜類を代表する重要品目の一つになっている。また、石川県内においては、藩政時代には薬用植物としてレンコンが栽培されていたとされ、明治 20 年代からは食用としての栽培が本格化した（金沢市農産物ブランド協会 online）。現在では、「加賀レンコン」の名称でブランド化され、高付加価値化が図られており、「加賀野菜」を代表する最重要品目になっている。県内での主な栽培地区は、金沢市才田地区、森本地区および河北潟干拓地内であり、栽培される品種は主として「支那白花」種である。

石川県を含めた日本国内のレンコン栽培においては、以前から各種の土壌病害虫の発生が問題となっており、時折深刻な被害を及ぼしてきた。*Fusarium* 属菌や *Pythium* 属菌などによって引き起こされるレンコン腐敗病は、葉の枯死や塊茎部の褐変が生じ、収量・品質低下につながる古くからの重要病害である（南川ら 1959）。また、近年、三平・永井（1996）は、レンコンの肥大塊茎の表皮に起こる多数の黒褐色斑点症状が、植物寄生性線虫の加害によって生じることを初めて報告した。この線虫害は、「レンコン黒皮線虫病」（三平 2002）や「レンコン黒皮症」と称され（以下、「黒皮症」とする）、レンコンの商品価値を著しく低下させる要因となっている。黒皮症の発生は、生産物の落等や等外品の頻出によって、生産者の所得を低下させるため大きな問題となっている。三平（2002）は、黒皮症を引き起こす原因となる線虫がイマムラネモグリセンチュウ *Hirschmanniella immamuri* であることを接種試験によって明らかにした。しかしながら、後に徳島県や千葉県被害根茎から

分離された線虫種については、国内未確認の *H. diversa* であると同定され、その和名が「レンコンネモグリセンチュウ」と命名された（水久保 2002）。その後、黒皮症の被害は日本全国のレンコン産地で報告されるようになり（水久保 2015）、現在ではイマムラネモグリセンチュウとレンコンネモグリセンチュウの2種の *Hirschmanniella* 属線虫が黒皮症を引き起こす加害種と考えられている（Koyama et al. 2013）。

Hirschmanniella 属線虫は、多くが水田や湿地などの水生環境に適応しており、様々な水生植物の根部に寄生する（Siddipi 2000）。これまでに、全世界の *Hirschmanniella* 属線虫は35種に整理されており（Siddipi 2000, De Ley et al. 2007）、日本国内ではイネネモグリセンチュウ *H. oryzae*、イマムラネモグリセンチュウ、レンコンネモグリセンチュウの3種が報告されている（水久保 2002）。この内、イネ *Oryza sativa* に寄生し、根腐れや病害の発生を助長するなどの被害を及ぼすイネネモグリセンチュウおよびイマムラネモグリセンチュウについては、その生活環や発生活長、寄生様式などの発生活態に関する研究結果が数多く報告されており、これらに基づいた防除技術が開発、提示されてきた。一方、レンコンネモグリセンチュウについては、Sher（1968）が本種の記載を行って以降、レンコンへの加害が報告されるまでに農業害虫として認識されておらず、発生活態や防除に関する知見は非常に乏しい。このことから、レンコンの生産現場ではレンコンネモグリセンチュウへの対応に苦慮しており、発生活態の解明および防除法の開発が強く求められてきた。

これらに応えるため、日本国内ではレンコンネモグリセンチュウの防除に関する研究が開始され始めている。近年、Koyama et al.（2013）は、レンコンネモグリセンチュウの検出法として、種特異的なプライマーを開発し、リアルタイムPCRによる土壤中密度の測定結果と黒皮症被害との関係から経済的被害許容水準の推定を試みた。また、具体的な防除法としては、種レンコンの温湯消毒法（高木ら 2012）や太陽熱土壌消毒（久恒ら 2014）などが検討されている。一方で、レンコンネモグリセンチュウの発生活態については未解明な点が非常に多く、被害に対する根本的な対策を確立するためには、これらの解明が必

要不可欠であると考えられる。また、レンコン栽培では水田を利用するため、施設園芸作物や他の露地園芸作物に比べ、圃場の面積が非常に広大であることが多い。このため、太陽熱土壌消毒をはじめとして、これまでにレンコンネモグリセンチュウへの対策として検討されてきた防除技術では多大な労力とコストを要し、生産者が広く実施することは容易ではない。このことから、生産現場の実情に合った現実的な防除技術の開発が必要である。

2) 本研究の目的

本研究ではまず、レンコンネモグリセンチュウの生活環を解明するため、植物体内での発消長を明らかにするとともに、レンコン栽培圃場周辺の雑草種への寄生性を調査した(Ⅱ-1, Ⅱ-2)。

次に、レンコンネモグリセンチュウによる黒皮症の発生メカニズムおよび植物体への感染機構の解明に貢献することを目指して、レンコンの細根、肥大塊茎および若芽における本種の寄生様式を電子顕微鏡観察によって明らかにするとともに、黒皮症の発生部位を詳細に解析した(Ⅲ-1, Ⅲ-2, Ⅲ-3, Ⅲ-4)。

さらに、生産現場で実施可能かつ現実的な防除技術を開発するため、石灰窒素を利用した本圃でのレンコンネモグリセンチュウの土壌中密度低減対策について検討を行った(Ⅳ)。

最後に、今回得られた知見に基づき、レンコンネモグリセンチュウの発生生態および防除技術について総合的に論じた(Ⅴ)。

II レンコンネモグリセンチュウの生活環の解明に関する研究

1. レンコンネモグリセンチュウの発生活環の解明

1) 諸言

Hirschmanniella 属線虫の多くは、水生植物の根部に侵入し、摂食、成長、繁殖などの生活環を送っている。この内、イマムラネモグリセンチュウ、イネネモグリセンチュウ、*H. spinicaudata* は、イネを加害することが知られており (Siddipi 2000)、防除対象になる重要な種として、生態的特徴から応用的な防除法の開発まで全世界で様々な研究がなされてきた。特に、日本国内で発生するイマムラネモグリセンチュウ、イネネモグリセンチュウの2種については、1960～1970年代にかけて全国で盛んに研究がなされており、発生活環など (桑原・弥富 1970) の生態的特徴が詳細に明らかになっている (川島 1992)。これらは、防除対策を検討する際の重要な知見であり、川島 (1992) は秋耕、水田の乾田化、栽培の早期化、栽培品種の変更などが耕種的防除法として有効であると指摘している。

一方、同属に分類されるレンコンネモグリセンチュウについては、2002年に初めて国内での発生が確認されており (水久保 2002)、比較的新規の病害虫であると言える。世界的には、中国において本種のレンコンへの加害が報告されているが (Chong and Yiang 2002)、生態的側面については未解明な点が非常に多い。一方、植物寄生性線虫に対する主要な防除手段である土壌消毒や化学合成農薬を利用する際、実施適期を決定するためには発生時期や繁殖時期、経時的な齢構成などの情報が必要不可欠である。

そこで、本研究では、防除技術を開発するための基礎的知見を得るため、2014～2015年にかけてレンコンネモグリセンチュウが発生しているレンコン栽培圃場から経時的にレンコンを採集し、その根部に寄生する本種の頭数や齢構成の推移などを詳細に調査した。また、雌成虫の既交尾率・卵保有率について経時的に調査を行い、繁殖時期などについても検討を行った。

2) 材料および方法

レンコン根茎の採集および線虫の分離

レンコン根茎の採集は、被害がレンコンネモグリセンチュウによる被害が確認される石川県金沢市のレンコン栽培圃場で行った。2014年は5月7日、6月19日、7月18日、8月22日、9月29日、10月31日、12月10日の計7回(29~43日間隔)、2015年は4月22日、5月29日、7月2日、8月13日、9月11日、10月8日、11月26日の計7回(27~49日間隔)根茎の採集を行った。採集にはレンコン根茎を収穫する際に利用する水圧ポンプを用い、各調査日ごとに圃場の全体から任意の5株を採集した。採集後、根茎の節から伸長する細根を株当たり50g以上切り取り、株毎に十分に混和した。細根は流水で十分に洗浄した後、20~30mmの長さに切断した。その後、切断した細根5gを調査株ごとに25℃、72hの条件でベルマン法に供試し、細根に寄生する線虫を分離した。分離後、ウォーターバス(ALB-120, IWAKI社製)に60℃の温湯を準備し、バイアルを振とうしてから温湯に30秒間浸漬することで線虫を熱殺し、TAF液で固定した。

齢構成および寄生頭数の推移

分離した線虫のうち、任意の100頭を光学顕微鏡(MICROPHOT-FX, Nikon社製)を用いて観察し、調査日ごとの齢構成を調査することで、その経時的な変化について検討した。線虫の齢期は、体長や口針長、性器の発達程度などの特徴を総合的に勘案し、大別した。調査は2014~2015年の2ヵ年実施した。また、2015年に関しては、分離されたレンコンネモグリセンチュウの総数についても調査日ごとに光学顕微鏡下で計数し、細根に寄生する本種の頭数を調査した。

雌成虫の既交尾率および卵保有率の推移

レンコンネモグリセンチュウ雌成虫の既交尾率および卵保有率の推移を経時的に調査す

ることで、本種の繁殖時期について検討した。熱殺、TAF 固定を行った線虫のうち、任意の 30 頭の雌成虫を調査日ごとに光学顕微鏡下で観察した。既交尾率の調査では、雌成虫の貯精嚢内における精子の保持の有無によって、当該個体が既交尾か未交尾個体かを判断した。また、卵保有率の調査では、雌成虫体内の卵の保持の有無を調査した。いずれの調査も 2014～2015 年の 2 ヶ年実施した。

3) 結果および考察

レンコンネモグリセンチウの齢構成の推移は 2014 年および 2015 年で概ね同様の傾向を示した (第 1 図)。すなわち、4 月下旬～5 月上旬にかけては 3 期幼虫の占める割合が最も高く、次いで 4 期幼虫、成虫の占める割合が高くなった。5 月上旬～6 月中下旬にかけては、これらの個体の齢期が進み、4 期幼虫や成虫の割合が高まり、新世代と考えられる 2 期幼虫も初めて確認された。成虫の割合は、7 月上中旬に最も高まり、同時期に 2 期幼虫の割合も増加した。8 月中下旬になると、成虫の割合は減少に転じ、2 期幼虫が占める割合がピークに達した。9 月以降は、齢期の進行することによって 2 期幼虫の割合は減少し、再度 3 期・4 期幼虫および成虫の割合が高まっていった。細根内の個体数全体は、2015 年において 9 月上旬にピークを迎えており、本種は年 1 世代の発消長を持つ線虫種であることが明らかになった (第 2 図)。また、これは新世代である 2 期幼虫が 8 月中下旬にピークを迎えることによって、個体数全体が増加した結果であると考えられる。

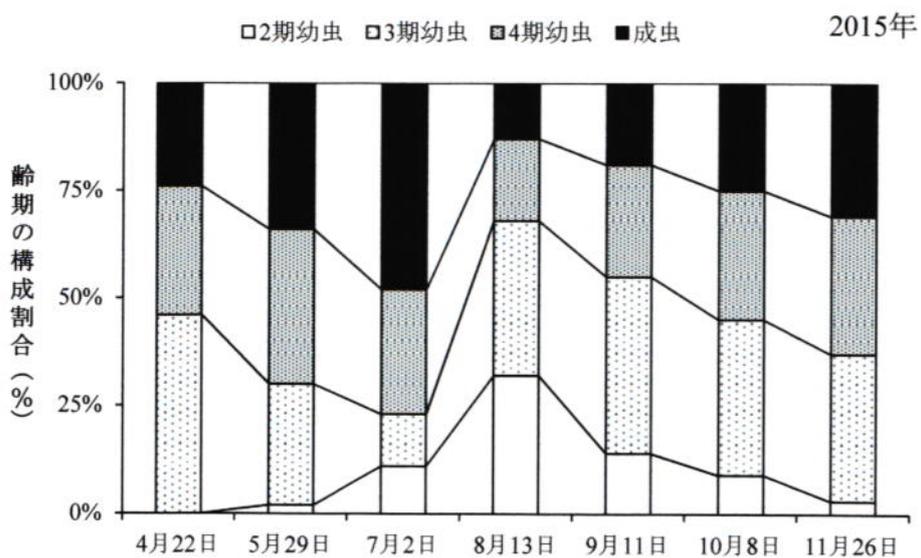
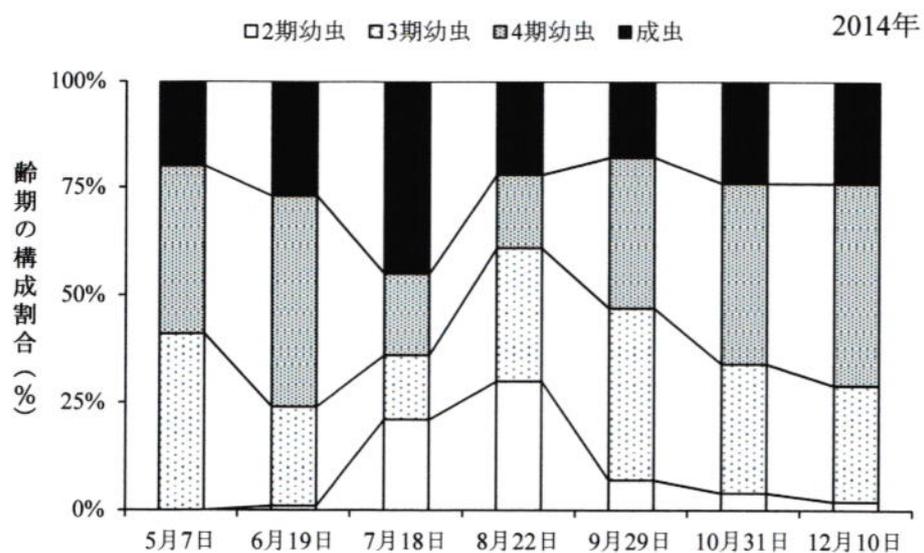
雌成虫の既交尾率および卵保有率についても、2014 年と 2015 年で概ね同様の結果となった (第 3 図)。2014 年は 5 月上旬には既交尾率が 85%を上回っており、6 月下旬および 7 月下旬には 96.7%と最も高くなった。8 月以降は経時的に低下したものの、12 月下旬でも 33.3%の雌個体が貯精嚢内に精子を保有していた。また、卵保有率は 5 月下旬には 0.0%で卵を持った個体は全く見られなかったが、6 月中下旬には 16.7%となり、7 月中下旬には 63.3%とピークを迎えた。8 月以降は減少に転じ、10 月下旬には卵を保有した個体が全く

見られなくなった。2015年については、4月下旬の既交尾率が63.3%、5月下旬は80.0%となり、春季の既交尾率は高かった。また、7月中下旬には93.3%と最も高くなった。2014年同様、8月以降は低下したものの、11月下旬においても30.0%の雌個体が貯精嚢内に精子を保有していた。卵保有率は5月下旬頃から増加に転じ、7月上旬には46.7%とピークに達した。8月以降は低下し、10月上旬には卵を保有した個体は全く見られなくなった。

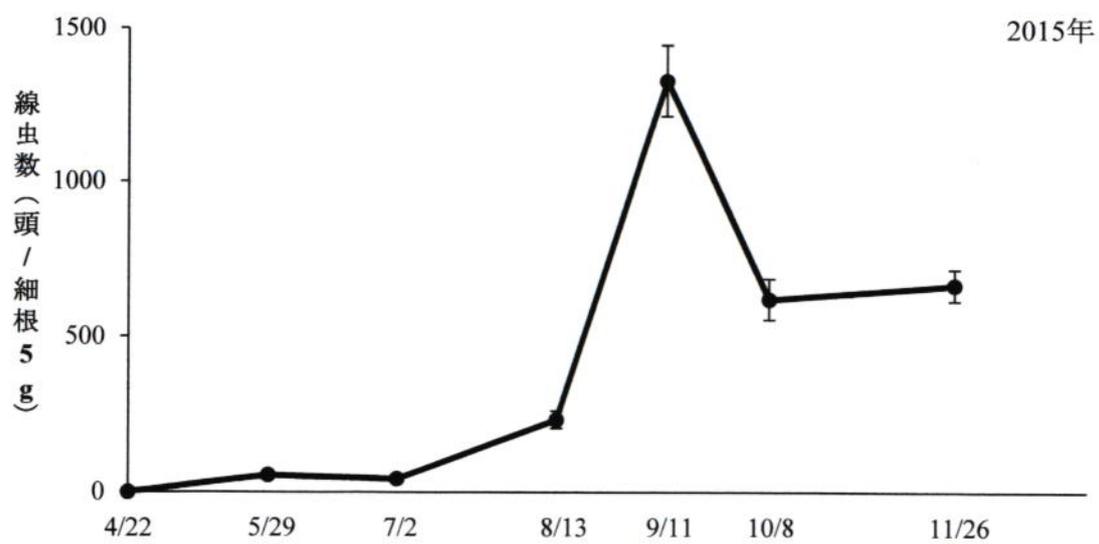
以上のことから、レンコンネモグリセンチュウの野外条件における交尾、産卵期間は比較的長く、交尾に関しては4月～7月頃、産卵に関しては5～8月頃に盛期があると考えられる。このため、野外での齢構成には一定のバラつきがあるが、主に3期、4期、成虫体で越冬を行っており、産卵による新世代2期幼虫の出現は6～9月頃である。その後、2期幼虫は主として細根内で成長し、3期、4期幼虫または成虫体となって、再度越冬すると考えられ、石川県の野外条件では年1世代の発生活消長を持つことが示唆された。

レンコンネモグリセンチュウと同属に分類されるイネネモグリセンチュウやイマムラネモグリセンチュウでは、野外条件での発生活消長等の生活環が解明されている。すなわち、イネネモグリセンチュウは老熟幼虫および成虫体で越冬を行い、8月下旬頃までに2期幼虫が出現する年1世代の発生活消長が主となるが、一部では年2世代の発生活消長となる地域も存在する(川島 1992)。また、イマムラネモグリセンチュウについては、3期、4期幼虫体で越冬を行い(川島 1992)、8月には2期幼虫の出現が終息する年1世代の発生活消長を示す(横尾 1948)。一方、レンコンネモグリセンチュウについては、齢構成や雌成虫の既交尾率、卵保有率といった個体群動態に関する詳細な検討はなされておらず、本研究が初めてとなる。本研究での結果から、野外条件におけるレンコンネモグリセンチュウの発生活消長や個体群動態はイネネモグリセンチュウやイマムラネモグリセンチュウと類似点が多いものの、交尾時期や産卵時期、2期幼虫の出現時期等の時期的な若干の違いも確認された。この点については、レンコンネモグリセンチュウの主要な寄主がハスであり、イネとは栽培様式や生育時期等が大きく異なることや各種の発育有効積算温度が異なることなど

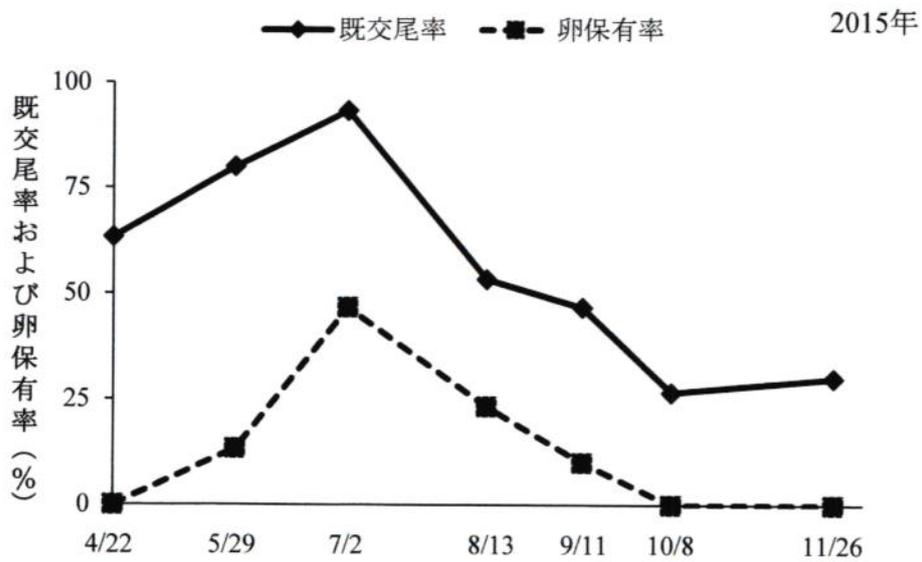
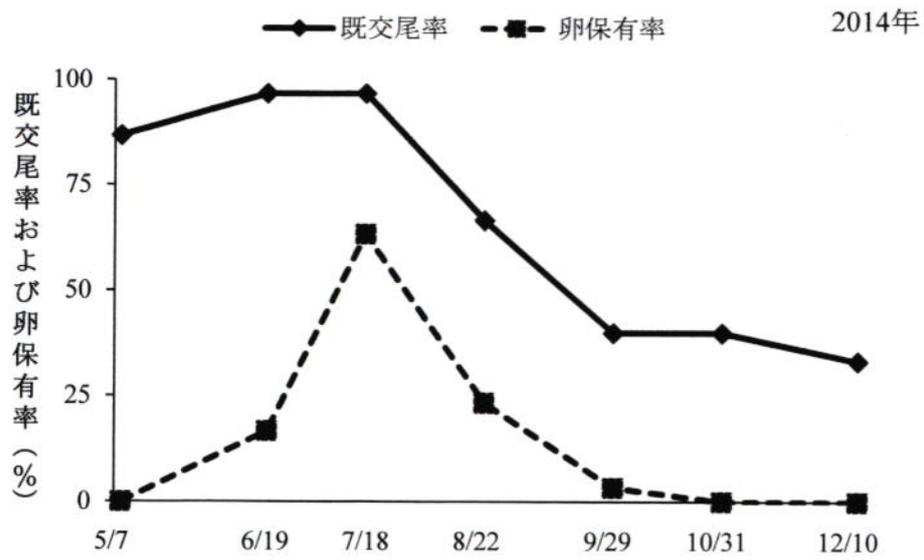
が考えられる。発育有効積算温度については、これまでにイマムラネモグリセンチュウでは発育零点が 7.7°C であり、有効積算温度が 145 日度であることが既に報告されている（後藤 1970）。また、イネネモグリセンチュウについても幼虫期間が 27 日であることが知られている（西澤・百田 1970）。一方、レンコンネモグリセンチュウについては、Bin (2003) が恒温および常温条件下において成虫が 2 世代発生したと報告しているが、この実験の温度条件については記載がなく、詳細は不明瞭なものである。このため、レンコンネモグリセンチュウの発生消長に関する基礎的な動態解明に向けては、実験室内等で温度条件を一定とした上で本種の齢構成の推移を詳細に検討するなどして有効積算温度を明らかにする必要があると考えられる。



第1図 レンコン細根内におけるレンコンネモグリセンチュウの年齢構成の推移
(上：2014年，下：2015年)



第2図 2015年におけるレンコン細根内でのレンコネモグリセンチュウの発生推移
 図中のバーは標準誤差を示す.



第3図 レンコン細根内におけるレンコンネモグリセンチュウ雌成虫の既交尾率および卵保有率の推移 (上: 2014年, 下: 2015年)

2. レンコンネモグリセンチュウの雑草への寄生状況の調査

1) 諸言

有害な植物寄生性線虫の多くは、被害を及ぼす農作物以外の植物種に対しても寄生可能な場合が多く（例えば、近岡 1979, 百田・後藤 1980 など）、防除対策を行う上で対象種の寄主植物を特定することは非常に重要である。これらを明らかにすることで、対象種の寄主植物を圃場内から排除し、越冬および増殖源を断つことができ、線虫密度の低減を図る耕種的な防除の実施が可能となる。また、日本国内では寄主植物でない植物種や積極的に土壤中の線虫密度を低減させる対抗植物を圃場内に混植あるいは間植するような防除対策がとられる場合もあり、生産現場において多くの線虫種でその取組みが行われている（佐野 1990, 水久保ら 2004）。

レンコンネモグリセンチュウについても、寄主植物を明らかにすることは防除対策を確立するための第一歩と位置付けられる。すなわち、レンコン以外の増殖源となる植物種を圃場内から排除するとともに、休閒時などに寄主植物でない植物種を植えることで耕種的に密度低減を図ることが可能となるためである。しかしながら、本種の寄主植物については、高木ら（2011）が2種の植物を報告しているのみであり、その他の報告事例は見当たらない。

そこで、本研究では、レンコンネモグリセンチュウの寄主植物の解明を目的として、石川県内の本種が発生しているレンコン圃場およびその周辺に自生する雑草種で本種の寄生状況を調査した。

2) 材料および方法

雑草の採集

2014年10月7日、24日および2015年7月2日、11月26日に、黒皮症の被害が見られる石川県金沢市のレンコン栽培圃場および隣接する休閒圃場（落水して休閒を行い、線虫

密度の低減を図っている圃場) で自生する雑草を採集した。レンコンネモグリセンチュウは、植物体の根部から分離されることが知られているため(水久保 2002)、根部は特に丁寧に掘り取った。採集した雑草種は、第1表に示す6科11種で、ミズアオイについては4株、他の雑草種は種毎に3株ずつ採集した。

レンコンネモグリセンチュウの分離

ベルマン法(佐野 2014)によって、雑草の根部からレンコンネモグリセンチュウを分離した。根部の表面に付着した土壌から線虫が分離されるのを防ぐため、採集した雑草の根部を流水で丁寧に洗い流し、土壌を落とした。その後、地上部から切除した根部を約20~30 mmの長さに切断して、ベルマン法(25°C, 72 h)に供試した。分離した線虫を光学顕微鏡下で観察し、レンコンネモグリセンチュウのみを計数した。

3) 結果および考察

雑草へのレンコンネモグリセンチュウの寄生状況の調査結果を第2表に示す。6科11種の雑草を調査したところ、4科7種の雑草種から本種が分離された(第2表)。寄生が確認された雑草種は、ミズアオイ *Monochoria korsakowii* (ミズアオイ科)、ミズハコベ *Callitriche palustris* (アワゴケ科)、アゼガヤ *Lepochloa chinensis*、タイヌビエ *Echinochloa oryzoides*、イヌビエ *Echinochloa crus-galli* var. *caudata* (以上、イネ科)、ヒデリコ *Fimbristylis miliacea*、タマガヤツリ *Cyperus difformis* (以上、カヤツリグサ科)であった。特に、本田内に自生するミズアオイは他の雑草種と比較して分離頭数が有意に多く、本種にとって好適な寄主植物であることが示唆された。また、各雑草種から分離された本種の発育ステージは、2~4期幼虫および成虫と様々であった。このことから、本種は雑草の根部内でも生活史を全うできることが示唆された。一方で、キク科のアメリカセンダングサ *Bidens frondosa*、セイタカアワダチソウ *Solidago canadensis* var. *scabra*、セイヨウタンポポ *Taraxacum officinale* お

よびキンポウゲ科のタガラシ *Ranunculus sceleratus* Lev.では、本種の寄生が全く認められなかった。

今回の調査で、レンコンネモグリセンチュウの寄生が確認された雑草種のうち、ミズアオイおよびイヌビエについては、高木ら（2011）によって既に寄生することが報告されている。しかし、ミズハコベ、アゼガヤ、タイヌビエ、ヒデリコ、タマガヤツリに関しては未報告で、本報告が初めてである。他方、アゼガヤ、イヌビエおよびタマガヤツリについては、近縁種のイネネモグリセンチュウでも寄生が確認されている（川島 1963）。しかし、ヒデリコとミズハコベにはレンコンネモグリセンチュウが寄生するのに対し、イネネモグリセンチュウでは寄生が確認されておらず、近縁種ながら両種の寄主植物の範囲には相違があると考えられる。さらに、ミズアオイはレンコン栽培における難防除雑草の一つであり、レンコン栽培圃場の本田に自生する最も重要な雑草種である。今回の調査で、ミズアオイでの寄生頭数が他の雑草種と比較して有意に多かったことから、レンコン栽培を行う本田内において、雑草としてはミズアオイが本種の重要な増殖源になっている可能性が高い。

一方で、生産現場において、レンコンネモグリセンチュウが多発している圃場では落水し、休閒させることで圃場内を乾燥させ、線虫密度の低減を図っている事例が日本全国で散見される。しかしながら、このような圃場内での雑草の繁茂は、本種の増殖を促している可能性がある。また、黒皮症発生圃場において除草された雑草の残渣が圃場周辺に放置されることで、被害が拡大する可能性もあり、被害圃場における雑草の適切な処分は被害拡大防止のために非常に重要であると考えられる。

本研究では、レンコン栽培圃場周辺に自生する雑草種を対象として、本種の寄生の有無を調査することで寄主植物の一端を明らかにした。一方で、本種の寄主範囲をより多くの植物種の中から特定することは、被害の拡大防止や対抗植物を利用した耕種的防除技術の開発などに向けて極めて重要である。実際に、イネに寄生し、被害を及ぼす *Hirschmanniella*

属の植物寄生性線虫の中には既にこうした取り組みがなされ、防除的な利用に応用した報告も見られる (Mohandas et.al. 1981, Rinaudo 1988, Prot et.al. 1992). このため、今後はさらに多種の植物種について検討を行う必要があると考えられる.

第1表 黒皮症発生レンコン圃場および休閒圃場で採集した雑草種

科	種	採集月日	採集場所
ミズアオイ科 Pontederiaceae	ミズアオイ <i>Monochoria korsakowii</i>	2014年10月7日	栽培圃場内
アワゴケ科 Callitrichaceae	ミズハコベ <i>Callitriche palustris</i>	2014年10月24日	栽培圃場内
イネ科 Gramineae	アゼガヤ <i>Lepochloa chinensis</i>	2014年10月7日	栽培圃場内 (畦畔際)
	タイヌビエ <i>Echinochloa oryzoides</i>	2014年10月24日	休閒圃場内
	イヌビエ <i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>caudata</i>	2014年10月24日	休閒圃場内
カヤツリグサ科 Cyperaceae	ヒデリコ <i>Fimbristylis miliacea</i>	2014年10月24日	休閒圃場内
	タマガヤツリ <i>Cyperus difformis</i>	2014年10月24日	休閒圃場内
キク科 Compositae	アメリカセンダングサ <i>Bidens frondosa</i>	2014年10月7日	栽培圃場内 (畦畔際)
	セイタカアワダチソウ <i>Solidago canadensis</i> var. <i>scabra</i>	2014年10月24日	休閒圃場内
	セイヨウタンポポ <i>Taraxacum officinale</i>	2015年7月2日	休閒圃場内
キンポウゲ科 Ranunculaceae	タガラシ <i>Ranunculus sceleratus</i> Lev.	2015年11月26日	休閒圃場内

第2表 ベルマン法で各雑草種から分離されたレンコンネモグリセンチュウの頭数

科	種	分離頭数 (頭±SE/根 5.0g)
ミズアオイ科 Pontederiaceae	ミズアオイ <i>Monochoria korsakowii</i>	63.3±11.7 a
アワゴケ科 Callitrichaceae	ミズハコベ <i>Callitriche palustris</i>	3.3±1.9 b
	アゼガヤ <i>Lepochloa chinensis</i>	3.7±2.3 b
イネ科 Gramineae	タイヌビエ <i>Echinochloa oryzoides</i>	5.0±2.3 b
	イヌビエ <i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>caudata</i>	7.3±4.4 b
カヤツリグサ科 Cyperaceae	ヒデリコ <i>Fimbristylis miliacea</i>	5.7±0.9 b
	タマガヤツリ <i>Cyperus difformis</i>	12.3±3.2 b
	アメリカセンダングサ <i>Bidens frondosa</i>	0.0±0.0 b
キク科 Compositae	セイタカアワダチソウ <i>Solidago canadensis</i> var. <i>scabra</i>	0.0±0.0 b
	セイヨウタンポポ <i>Taraxacum officinale</i>	0.0±0.0 b
キンポウゲ科 Ranunculaceae	タガラシ <i>Ranunculus sceleratus</i> Lev.	0.0±0.0 b

3株または4株調査の平均値。

表中の異なる小文字を付した平均値には5%水準で有意な差異があることを示す(Tukey-Kramer法)。

Ⅲ レンコンネモグリセンチュウのレンコンへの感染機構の解明に関する研究

1. レンコンネモグリセンチュウ感染細根の細胞学的解析

1) 諸言

農作物に対して侵入および加害を行う有害植物寄生性線虫の多くは、植物の根に寄生し、生活史を全うする。ネコブセンチュウ類やシストセンチュウ類などに代表される定住型の内部寄生性線虫は、幼虫が植物根内に侵入後、根内の一定の部位に留まり、摂食、成長、繁殖、産卵を行う。一方、ネグサレセンチュウ類などに代表される移住型の内部寄生性線虫は、植物根内に侵入後、根内を移動しながら摂食、成長し、繁殖、産卵を行う。ネモグリセンチュウ類については、①ネグサレセンチュウ類と同じ *Pratylenchidae* 科に分類されること、②これまでのイネネモグリセンチュウなどの研究事例などから後者の移住型性内部寄生線虫であると考えられ、レンコンネモグリセンチュウについても同様であると推察される。

レンコンネモグリセンチュウは、レンコン塊茎の節から伸長する細根に寄生することが経験則的に知られており、本種に関する既報においては、いずれもベルマン法を用いた細根からの分離が試みられている (Sher 1968, 水久保 2002, Koyama et. al. 2013)。しかしながら、本種の細根内での寄生様態を報告した事例はこれまでに見当たらない。すなわち、本種が細根内でどのような移住型の寄生行動を行っているのか、細根内における寄生部位はどこなのか、などの寄生様式については全く未解明である。これらの知見は黒皮症の発生メカニズムを解明する上で非常に重要である。また、細根内での寄生部位を特定することは防除手法を決定する上で極めて重要であり、特に化学的防除では浸透移行性のある化学物質が必要かを図るための重要な知見となる。

そこで、本研究ではレンコンネモグリセンチュウによる黒皮症被害が発生している圃場からレンコンの細根を採集し、本種が侵入した細根における寄生様態と寄生による細根組織の変化を光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察することで、本種の植物

体内への感染機構を解明する一助とすることを目指した。

2) 材料および方法

レンコン細根の採集

2014年4～7月に、レンコンネモグリセンチュウの発生が見られる石川県金沢市のレンコン栽培圃場からレンコンの根茎を掘り取り、根茎の節から伸長している細根を切り取った。根茎は圃場全体から合計で約30本掘り取り、それぞれの節から伸長する全ての細根を切り取り、その一部を実験に供試した。細根は流水で丁寧に洗浄し、20～30mmの長さに切断した。これを0.1%ホルマリン・1%グルタルアルデヒド水溶液（0.05%カコジル酸緩衝液 pH7.2 に溶解）に浸漬した後に、以下の実験に供試した。なお、切断した細根の一部をベルマン法（72 h, 25°C）に供試した結果、分離された線虫はいずれもレンコンネモグリセンチュウの形態的特徴を有しており、本研究での対象種がレンコンネモグリセンチュウであることが確認された。

光学顕微鏡観察

固定した細根をカミソリで縦方向あるいは横方向に切断した。切断切片の厚さは約0.4～1.0mmとした。その後、それぞれの切断切片を0.35%酸性フクシン酢酸水溶液に浸漬し、ホットプレート（IWAKI GLASS; PC-351, 日本）で沸騰直前まで加熱して染色した。染色した切片は、冷水に浸漬した後に、光学顕微鏡（Nikon; OPTIPHOT, 日本）で観察し、写真撮影を行った。なお、いずれの切断切片も約100枚観察を行った。

走査電子顕微鏡観察

光学顕微鏡観察により本種の寄生が認められ横断切片を、2.5%グルタルアルデヒド固定液（0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2 に溶解）に4°Cの条件下で24時間浸漬した。切片は同

緩衝液で洗浄後，4℃の条件下で 1%四酸化オスミウム固定液に 12 時間浸漬した．同様の緩衝液で洗浄後に，50%，70%，80%，90%および 100%エタノール溶液によって脱水し，引き続き t-ブチルアルコール（2-メチル-2-プロパノール）に置換し，凍結乾燥装置（日立;ES-2030，日本）を用いて凍結乾燥を行った．凍結乾燥後，イオンスパッタ（日立;E-1010，日本）を用いて，試料に 8 nm の厚さの白金を蒸着し，電界放射形走査電子顕微鏡（日立;S-4700，日本）で観察及び写真撮影を行った．

3) 結果および考察

レンコン細根の中心柱（第 4 図 D，第 5 図 A，B，E）は，根の伸長方向に基部から先端部まで形成されている．細根の縦断切片では，大部分の試料において，レンコンネモグリセンチュウが皮層組織内で中心柱とほぼ平行に寄生している様子が観察された（第 4 図 A）．また，一部切片では，虫体が U ターンしたように 2 つに折れ曲がっている場合があった．このことは，本種が中心柱に沿って皮層組織内を移動しながら寄生生活を送っていることを示唆している．

一方，観察された個体の長さは長短さまざまであった．また，卵も観察され，卵内には虫体が認められた（第 4 図 B）．これらの結果は，本種が産卵，発育，繁殖という生活史の大部分をレンコン細根の皮層組織内で行っていることを示している．

横断切片では，輪切り状になった虫体が観察された（第 4 図 C）．これは，縦方向に寄生している線虫が切断されたことによるとみられる．また，まれに中心柱に隣接した皮層細胞内で虫体が U ターンしている様子が観察された（第 4 図 D）．

横断切片の走査電子顕微鏡観察像には，皮層細胞内でレンコンネモグリセンチュウが認められた（第 5 図 A-D）．この結果は，本種がレンコン細根の皮層細胞を摂食し，貫通して生活する寄生行動を示す．なお，本種成虫の体長は約 2.0～2.5 mm である（水久保 2002）ことから，複数個の皮層細胞を貫通した状態で寄生しているものと考えられる．また，光

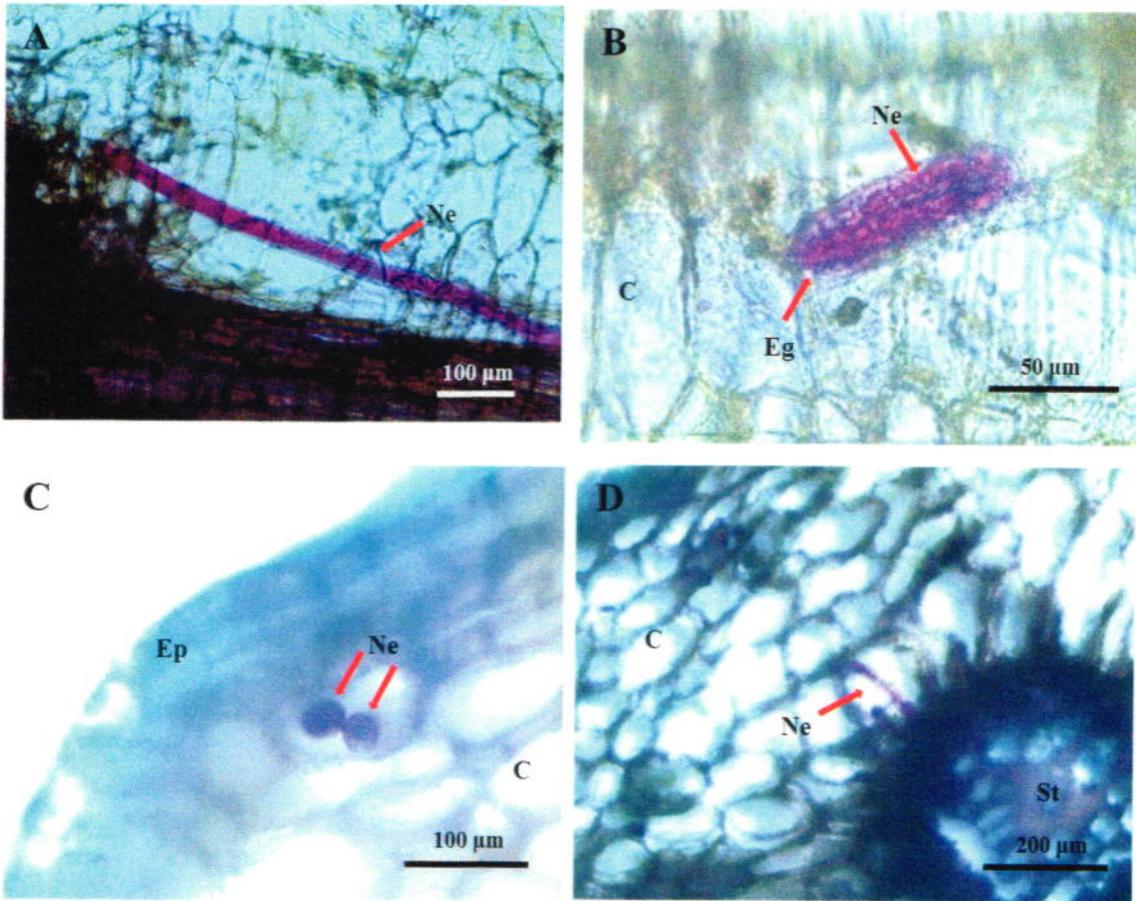
顕観察を行った横断切片では、1皮層細胞内に2虫体が観察されることがあった（第4図C）。これは第5図Bのように、線虫が皮層細胞内でUターンし、虫体が折り重なった部位を切断したためと考えられる。一部の切片では、虫体が中心柱と平行せず、垂直方向に定位し、皮層細胞間に細胞間隙が観察される場合があった（第5図E-F）。さらに、線虫の侵入によって、皮層組織の内部に空隙が生じていることも確認された。

キタネグサレセンチュウ *Pratylenchus penetrans* は、移動性内部寄生性線虫であり、皮層細胞内への侵入・摂食、細胞間の貫通・移動を行いながら寄生生活を送ることが知られている（Zunke 1990）。キタネグサレセンチュウと同じ *Pratylenchidae* 科に分類されるレンコンネモグリセンチュウについても、同様な寄生生活を送ると考えられる。

レンコンネモグリセンチュウの近縁種であるイネネモグリセンチュウでは、そのイネ根内での寄生組織について複数の観察報告がある。Van Der Vecht and Bergman (1952) は、イネネモグリセンチュウを接種したイネ実生の光学顕微鏡観察を行い、本線虫の雌雄成虫が根内に侵入することと、侵入後の寄生組織が皮層組織であることを示した。また、源馬・渋谷 (1959) は、イネネモグリセンチュウが寄生したイネ根部の光学顕微鏡観察を行い、本線虫が皮層組織の空隙中に数多く見られることを報告している。本研究においても、レンコンネモグリセンチュウの寄生部位が根の皮層組織であることが示された。皮層組織における寄生が *Hirschmanniella* 属線虫の寄生様式の特徴であることを裏付ける結果である。また、今回の観察では、根部内に卵、幼虫、成虫と様々な齢期の個体が確認されたことから、本種は生活史の大部分をレンコン細根内で過ごす可能性がある。

後藤 (1969) は、イマムラネモグリセンチュウが寄生生活において、なんらかの分泌物を放出している可能性を示唆した。レンコンネモグリセンチュウについては、このような分泌物に関する考察は見当たらない。しかし、第5図E-Fに示したように侵入組織の内部には空隙が見られ、組織の一部が消失していた。このことから、本種においても、分泌物によって細胞質等を分解しながら摂食、穿孔を行っている可能性がある。分泌物の関連に

関しては、今後、組織化学的あるいは生化学的な手法を用いたさらなる検討を行う必要があると考えられる。



第4図 レンコンネモグリセンチュウが寄生したレンコン細根の縦断面 (A, B) および横断面 (C, D) の光学顕微鏡写真

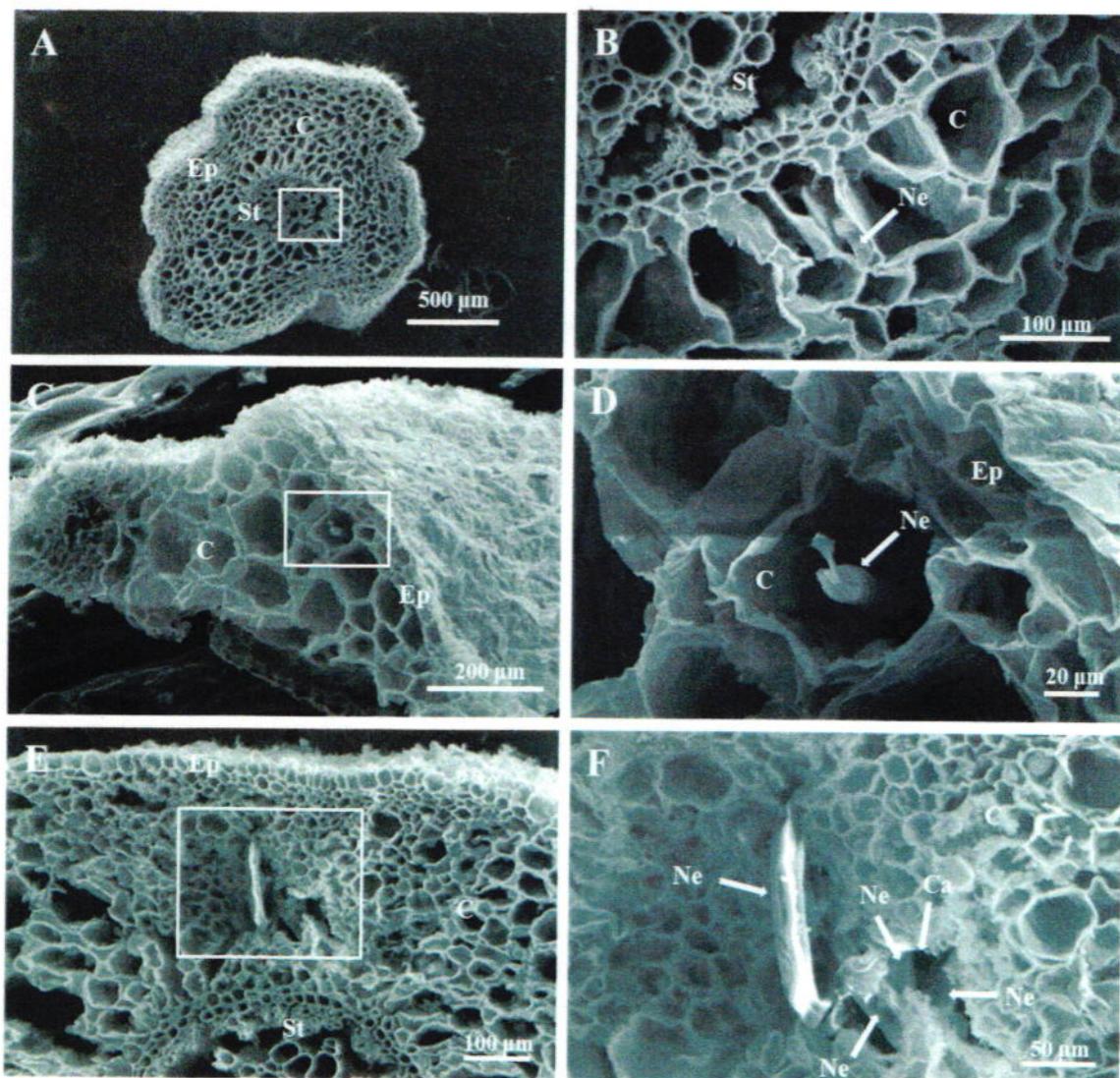
A: 皮層組織内に寄生するレンコンネモグリセンチュウ.

B: 皮層組織内に産卵されたレンコンネモグリセンチュウの卵. 卵の内部には, 第1期幼虫も見られる.

C: 表皮に近い皮層細胞内に寄生するレンコンネモグリセンチュウ.

D: 中心柱周辺の皮層細胞内に寄生するレンコンネモグリセンチュウ.

Ne, nematode (線虫); C, cortex (皮層組織); Eg, Egg (卵); St, stele (中心柱); Ep, epidermis (表皮).



第5図 レンコンネモグリセンチュウが寄生したレンコン細根の横断面の走査電子顕微鏡写真

- A : レンコン細根の横断面の全体図。細根の中心には中心柱が見られる。
- B : A の白枠内の拡大図。レンコンネモグリセンチュウは中心柱隣接した皮層細胞内で確認され、細胞内でUターンしている。
- C : 表皮に近い皮層細胞内に寄生するレンコンネモグリセンチュウ。
- D : C の白枠内の拡大図。レンコンネモグリセンチュウが完全に皮層細胞内に侵入している。
- E : 皮層組織に侵入するレンコンネモグリセンチュウ。
- F : E の白枠内の拡大図。レンコンネモグリセンチュウは皮層組織内を穿孔し、結果として、皮層組織には空隙が生じている。
- Ne, nematode (線虫) ; C, cortex cell (皮層細胞) ; St, stele (中心柱) ; Ep, epidermis (表皮) ; Ca, cavity (空隙)。

2. レンコン塊茎における黒皮症発生部位の細胞学的解析

1) 諸言

レンコンネモグリセンチュウによるレンコンの加害において、生産現場で最も問題となるのはレンコン黒皮症（以下、黒皮症）の発生である。黒皮症は、食用に供される肥大塊茎の表面に多数の黒褐色の斑点が生じる障害であり、生産物の商品価値を著しく低下させる。

第2章および前項では、レンコンネモグリセンチュウのレンコンにおける寄生部位の主体と考えられてきた細根を中心に、発生消長や寄生動態の検討を行い、その一部を明らかにした。また、レンコン以外の宿主植物についても検討し、雑草における寄生性についても明らかにした。しかしながら、実際に本種による黒皮症が生じるのはレンコンの塊茎であり、本種のレンコン細根および雑草での寄生との因果関係は判然としない。

また、これまでに黒皮症の発生メカニズムについての報告は全く見当たらない。さらに、被害部位についての細胞学的な解析は、被害発生メカニズムの解明の第一段階と考えられるが、これらについても検討された事例はない。

そこで、本研究ではレンコンネモグリセンチュウによる黒皮症が発生している圃場から被害株を採集し、黒皮症発生部位の表面構造および内部構造を実体顕微鏡、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。さらに、エネルギー分散型 X 線分析装置を用いて黒皮症発生部位の表面の元素分析を行い、黒皮症の発生メカニズム解明の一助とすることを目的とした。

2) 材料および方法

レンコン塊茎の採集

2014年4～7月および2015年9～11月に、黒皮症被害が見られる石川県金沢市のレンコン栽培圃場からレンコンの根茎を掘り取り、被害塊茎を採集した。その後、流水で丁寧に

洗浄した塊茎から、黒皮症の発生部位のみを約 1cm 四方に切り出した (第 6 図)。これを 0.1%ホルマリン・1%グルタルアルデヒド水溶液 (0.05%カコジル酸緩衝液 pH7.2 に溶解) に浸漬した後に、以下の実験に供試した。なお、採集した根茎の節から伸長する細根の一部をベルマン法 (72 h, 25°C) に供試した結果、分離された線虫はいずれもレンコンネモグリセンチュウの形態的特徴を有していたことから、本研究での対象種がレンコンネモグリセンチュウであることが確認された。

光学顕微鏡観察

固定した試料をカミソリで縦断した。切断切片の厚さは約 0.4~1.0 mm とした。切断した試料を光学顕微鏡 (Nikon; OPTIPHOT, 日本) で観察し、黒皮症発生部位の断面の写真撮影を行った。なお、いずれの切断切片も約 100 以上枚観察を行った。

走査電子顕微鏡観察

固定した試料およびカミソリで厚さ約 0.4~1.0 mm に縦方向に切断した試料を、2.5%グルタルアルデヒド固定液 (0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2 に溶解) に 4°C の条件下で 24 時間浸漬した。試料は同緩衝液で洗浄後、4°C の条件下で 1%四酸化オスミウム固定液に 12 時間浸漬した。同上の緩衝液で洗浄後に、50%、70%、80%および 100%エタノール溶液によって脱水し、引き続き t-ブチルアルコール (2-メチル-2-プロパノール) に置換し、凍結乾燥装置 (日立;ES-2030, 日本) を用いて凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、イオンスパッタ (日立;E-1010, 日本) を用いて、試料に 8 nm の厚さの白金を蒸着し、電界放射形走査電子顕微鏡 (日立;S-4700, 日本) で黒皮症発生部位の表面構造および断面構造を観察し、写真撮影を行った。

黒皮症発生部位の元素分析

走査電子顕微鏡観察を行った試料を供試し、黒皮症発生部位表面の元素分析を行った。上記のように、凍結乾燥、白金蒸着を行った試料を電顕観察用の試料台の上に乗せ、エネルギー分散型 X 線分析装置 (HORIBA;EMAX-7000, 日本) によって元素分析を行った。なお、分析は各試料の黒皮症発生部位の任意の点で計測した。

3) 結果および考察

黒皮症発生部位の断面を光学顕微鏡で観察した結果、黒皮症の発生部位では、表皮から 7~15 細胞層が黒褐色に変色しており、その深さは表皮から約 1 mm であった (第 7 図)。また、いくつかの試料では、黒皮症発生部位の表皮が植物体から剥がれ落ちているものも確認された。一方、光学顕微鏡観察では発生部位およびその周辺の組織において、レンコネモグリセンチュウの虫体が観察されることは全くなかった。

次に、黒皮症発生部位の表面構造を走査電子顕微鏡観察した結果を第 8 図に示す。発生部位では、表皮が陥没しており、表面の凹凸が激しく見られた (第 8 図 A, B)。また、陥没に伴って、発生部位には多数の亀裂が確認された (第 8 図 A)。さらに、光学顕微鏡観察の結果同様、一部の試料では表皮の剥がれが確認されるものもあり (第 8 図 B)、黒皮症の発生によって表面構造が変化し、表皮が劣化していることが示唆された。また、一部の試料では、発生部位の表面に付着物が確認される場合もあり、黒皮症の発生部位では何らかの化学物質が沈着している可能性が考えられた (第 8 図 C)。

レンコネモグリセンチュウの肥大塊茎における健全部位の内部構造 (断面) では、表皮およびその直下の表皮細胞が層を成して並んでいた (第 9 図 A)。一方で、黒皮症が発生している肥大塊茎の内部では、発生部位直下の数細胞層が変形し、完全に崩壊しており (第 9 図 B)、これらがレンコネモグリセンチュウの侵入および穿孔などによって引き起こされたことが示唆された。また、本研究においては多数の試料を観察したにも関わらず、光学顕微鏡観察同様、黒皮症発生部位およびその周辺にレンコネモグリセンチュウの虫体は全く確認されな

った。

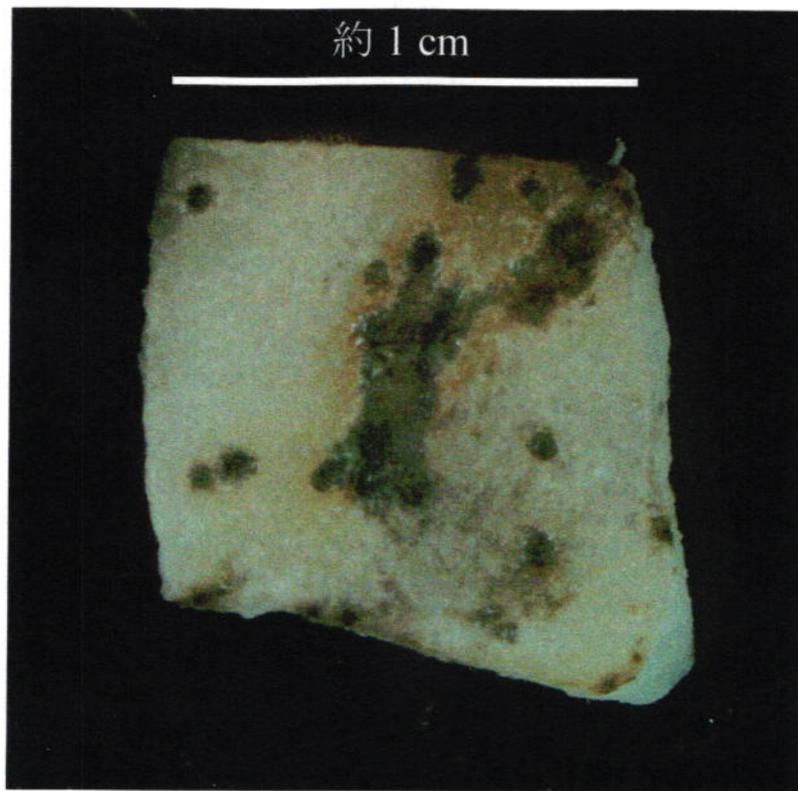
さらに、黒皮症発生部位表面に付着している化学物質等を特定するため、エネルギー分散型 X 線分析装置を用いて、健全部位および発生部位表面の元素分析を行った。分析の結果、健全部位および発生部位のいずれともオスミウム (Os) やヒ素 (As) が検出されたが、これらは電子顕微鏡観察のための固定によって付着したものであり、黒皮症の発生とは無関係である (第 10 図)。また、健全部位ではこの他に、カルシウム (Ca) やナトリウム (Na) が検出されており、これらはレンコンの肥大塊茎に普遍的に含まれるものであると考えられた (第 10 図 A)。これに対し、黒皮症の発生部位では、ケイ素 (Si) やカリウム (K)、鉄 (Fe) が健全部位と比較して多く検出された (第 10 図 B)。この内、ケイ素やカリウムは健全部位での検出量と著しい違いはなく、また、これらの元素はレンコンの栽培の施肥において投入される一般的な元素成分であり、レンコン肥大塊茎に一般的に含まれると考えられる。このため、黒皮症発生部位において特異的に検出される元素成分は鉄であり、何らかの鉄化合物が沈着していることが推察された。

本研究において、黒皮症発生部位の表面構造は健全部位と比較して大きく変化しており、黒褐色化も確認された。また、表面の元素分析では鉄が著しく検出された。一方で、内部構造の観察では、レンコンネモグリセンチュウが侵入、穿孔した痕跡が認められた。これらのことから、レンコン黒皮症ではレンコンネモグリセンチュウがレンコン塊茎に侵入、穿孔することによって植物組織に傷が形成され、その部分に鉄化合物が沈着することで発生すると考えられる。具体的な鉄化合物については本研究のみでは明らかでないが、黒皮症表面が黒褐色化していることから黒色の鉄化合物と考えられ、酸化鉄(II) (FeO) や四酸化三鉄 (Fe₃O₄) などであると推察される。また、レンコンの塊茎には中心柱に沿って多数の孔が形成されており、酸素 (O₂) が豊富に存在すると考えられる。さらに、植物では外部からの傷によって過酸化水素 (H₂O₂) が形成される。他方、レンコン栽培圃場では通年を湛水状態で管理するため、土壌は強還元状態にある。このため、土壌中の鉄はイオン (Fe²⁺)

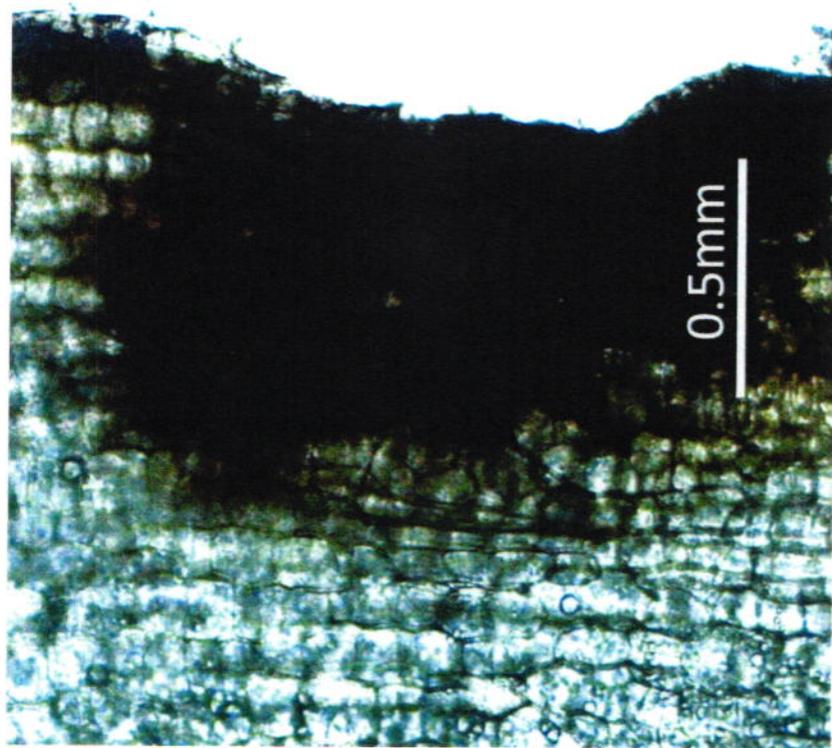
の形で存在しており、これが植物体側の酸素や過酸化水素などと結び付いて酸化鉄や四酸化三鉄となり、結果として黒褐色の黒皮症になる可能性が考えられる。

一方、本研究では黒皮症の発生部位においてレンコンネモグリセンチュウの虫体が確認されることはなかった。すなわち、塊茎の肥大が完了する成熟期には本種の侵入、穿孔が行われず、より早い生育ステージで起こっている可能性が示唆され、種レンコン定植直後から生育初期～中期の塊茎肥大前が加害時期と推察された。このように、被害が顕在化する時期の以前に加害が行われる事例は、移住型内部寄生性線虫の他種でも報告されている。ダイコンを加害するキタネグサレセンチュウでは、加害によって塊根の表面に白色の小斑点が発生し、斑点部は裂開して黒変する（近岡・片木 1964, 吉田ら 1975）。その被害は塊根の収穫期に目視で確認されるが、キタネグサレセンチュウの侵入および加害は肥大以前に起こる。レンコンネモグリセンチュウについても、本研究のこれまでの結果から移住型内部寄生性線虫であり、キタネグサレセンチュウ同様な加害および被害の発生パターンであると考えられる。

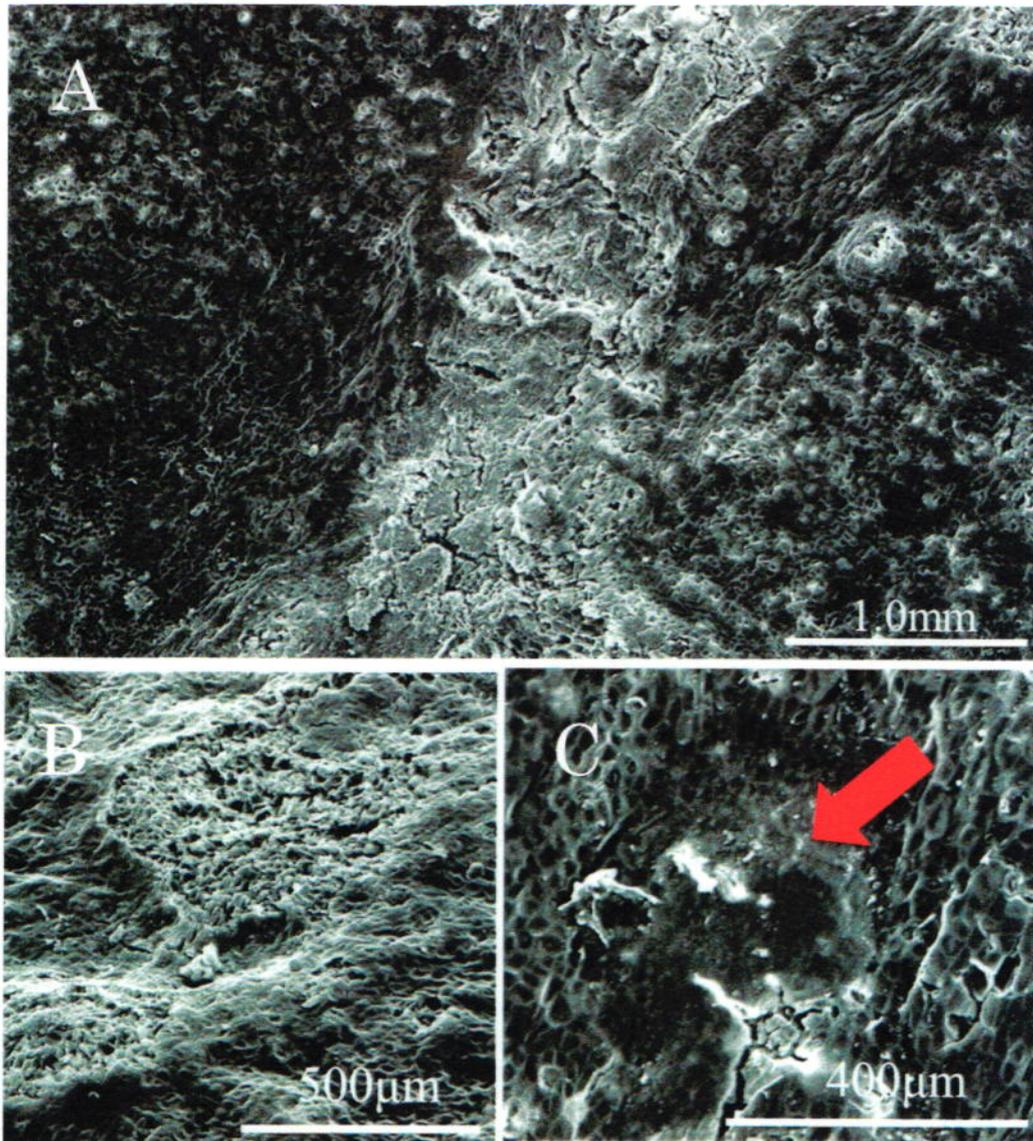
今後、レンコンネモグリセンチュウによる黒皮症の発生メカニズムをより詳細に解明するためには、より若い生育ステージの植物体を用いた加害時期の検討が必要である。また、侵入、穿孔時の行動についても同様であり、人工接種などを行い、その特徴を明らかにすることが求められる。



第6図 約1 cm 四方に切り出した黒皮症発生部位の試料



第7図 黒皮症発生部位の断面の光学顕微鏡写真

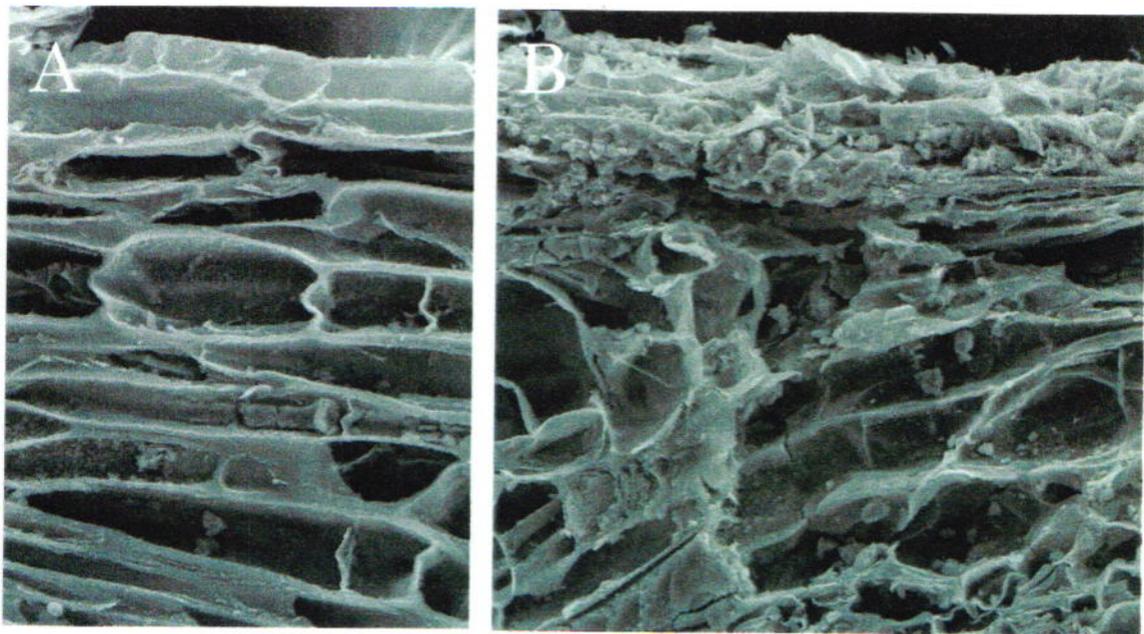


第8図 黒皮症発生部位の表面構造の走査電子顕微鏡写真

A：黒皮症発生部位の表面構造。発生部位では表面に亀裂が見られ、凹凸も激しくなっている。

B：表皮の剥がれを伴った黒皮症の発生部位。

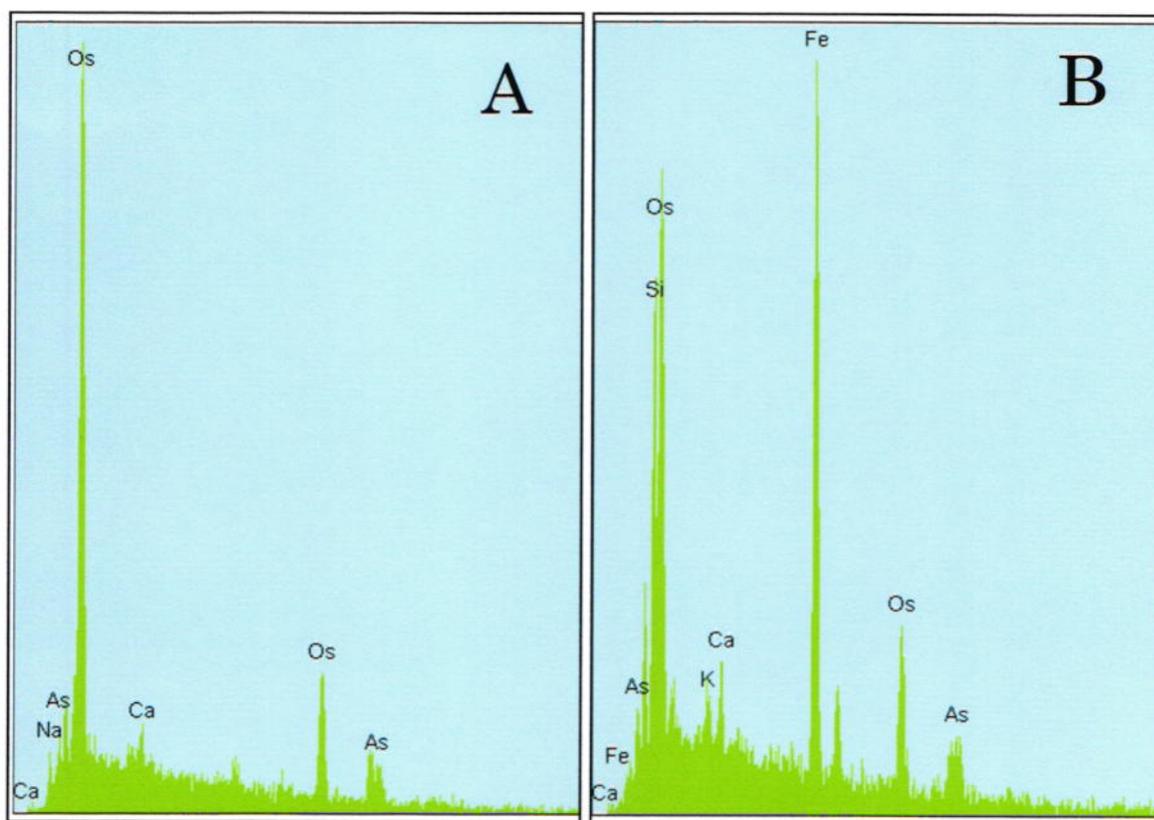
C:黒皮症発生部位で確認された沈着物。矢印は沈着物を示す。



第9図 黒皮症発生部位の内部構造（断面）の走査電子顕微鏡写真

A：健全部位の内部の走査電子顕微鏡写真.

B：黒皮症発生部位の内部の走査電子顕微鏡写真.



第10図 エネルギー分散型X線分析装置による肥大塊茎表面の元素分析結果

A：健全部位の分析結果.

B：黒皮症発生部位の分析結果.

3. レンコンネモグリセンチュウのレンコン肥大塊茎への侵入過程の解析

1) 諸言

前項の研究において、黒皮症の発生にはレンコンネモグリセンチュウのレンコン塊茎部への侵入、穿孔行動が関与していることが示唆された。しかしながら、観察に用いた肥大塊茎では本種の虫体が全く確認されなかった。

黒皮症の発生メカニズムを解明する上において、本種の植物体への侵入、穿孔行動やそれによる宿主の組織変化を明らかにすることは必須と言える。また、植物寄生性線虫の植物体への侵入行動や組織内での穿孔行動の特徴を明らかにすることは、単に対象種の生態的な側面の解明だけでなく、防除技術を開発する上でも重要な知見となる。

一般的に、植物寄生性線虫では植物体への侵入や寄生の頻度に経時的な変化があり、これが発生活消長とも関与している。すなわち、侵入や穿孔行動は、線虫の発生と植物の生育との間で密接に関連しており、自然発生条件下の試料を用いて、これらを観察することは極めて困難と考えられる。

そこで、本研究では、黒皮症の発生メカニズムの解明およびレンコンネモグリセンチュウのレンコン肥大塊茎への寄生の初期行動を明らかにするため、本種を肥大塊茎に対して人工接種し、侵入・穿孔行動の過程を実体顕微鏡、走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。

2) 材料および方法

肥大塊茎の採集

レンコンネモグリセンチュウおよび黒皮症の発生が見られない石川県金沢市のレンコン栽培圃場からレンコンの根茎を掘り取り、肥大塊茎を採集した。その後、肥大塊茎を流水で十分に洗浄し、節ごとに切り分けて実験に供試した。

レンコンネモグリセンチュウ（接種源）の収集

レンコンネモグリセンチュウの発生が見られる石川県金沢市のレンコン栽培圃場からレンコン根茎を採集し、節から伸長する細根を切り取った。細根は、流水で十分に洗浄した後、1.0～2.0 cm の長さに裁断した。これを 25 °C の条件下で、72 時間のベルマン法に供試し、レンコンネモグリセンチュウを分離、収集した。なお、分離した複数の線虫を光学顕微鏡観察したところ、いずれもレンコンネモグリセンチュウの形態的特徴を有しており、接種源がレンコンネモグリセンチュウであることを確認した。

肥大塊茎へのレンコンネモグリセンチュウの接種

レンコンネモグリセンチュウの接種は、肥大塊茎を置いた寒天培地上に線虫懸濁液を注ぎ込むことによって行った（第 1 1 図）。直径 8.5 cm のペトリ皿に、50 ml の 0.4% 寒天液を注ぎ込み、寒天培地を作成した。肥大塊茎の切り口が培地と触れないようにして、培地中央に肥大塊茎を挿入した（第 1 1 図 A）。その後、300～500 頭が接種されるように調整した線虫懸濁液を肥大塊茎の周囲に注ぎ込み（第 1 1 図 B）、ペトリ皿の上部にパラフィルムをかけ、蓋をした。接種終了後、暗所にペトリ皿を室温で静置した。接種 48 時間後（第 1 1 図 C）に線虫を接種した肥大塊茎をペトリ皿から取り出し、各顕微鏡によって線虫による侵入を受けた肥大塊茎を観察した（第 1 1 図 D）。

実体顕微鏡観察

レンコンネモグリセンチュウを接種した肥大塊茎を 0.35% 酸性フクシン酢酸水溶液に浸漬し、ホットプレート（IWAKI GLASS; PC-351, 日本）で沸騰直前まで加熱して染色した。その後、肥大塊茎を冷水に浸漬し、実体顕微鏡（Leica; MZ16F, オーストラリア）で観察し、写真撮影を行った。なお、観察は 10 本以上の肥大塊茎で行った。

走査電子顕微鏡観察

レンコンネモグリセンチュウを接種した肥大塊茎を、2.5%グルタルアルデヒド固定液(0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2 に溶解)に4°Cの条件下で12~24時間浸漬した。試料は同緩衝液で洗浄後、4°Cの条件下で1%四酸化オスミウム固定液に12時間浸漬した。同上の緩衝液で洗浄後に、50%、70%、80%、90%および100%エタノール溶液によって脱水し、引き続きt-ブチルアルコール(2-メチル-2-プロパノール)に置換し、凍結乾燥装置(日立; ES-2030, 日本)を用いて凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、イオンスパッタ(日立; E-1010, 日本)を用いて、試料に8 nmの厚さの白金を蒸着し、電界放射形走査電子顕微鏡(日立; S-4700, 日本)で線虫侵入組織の観察および写真撮影を行った。

3) 結果および考察

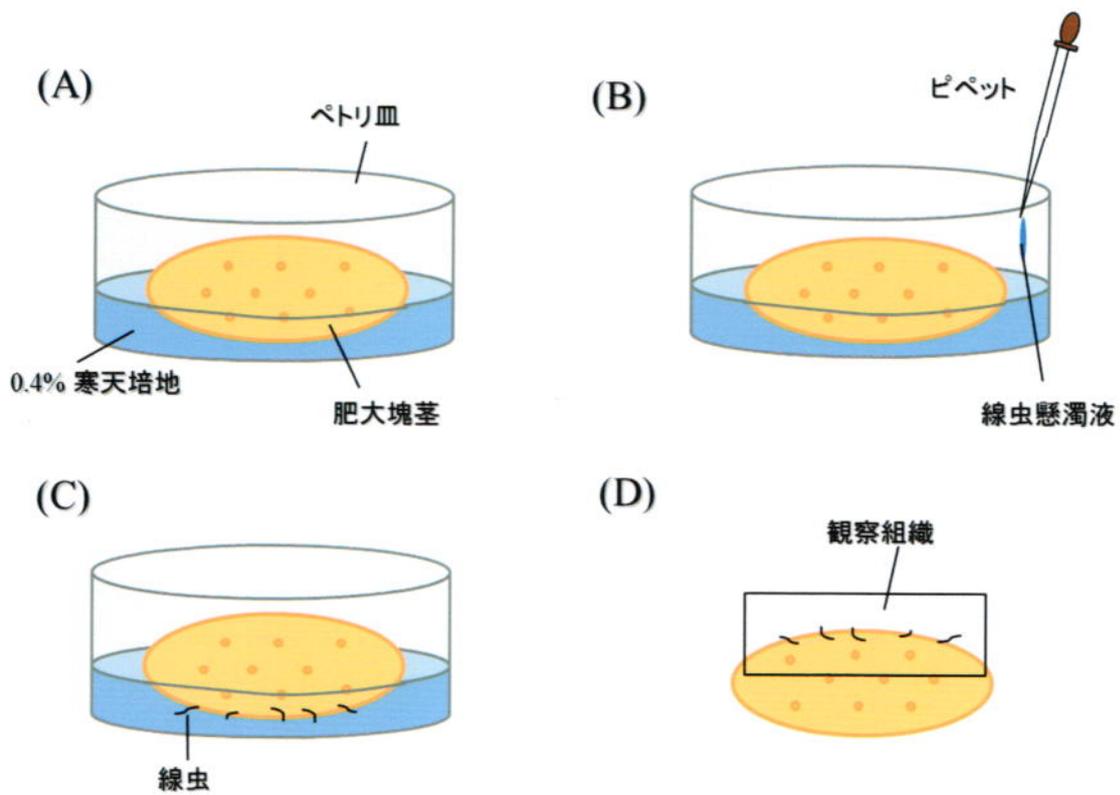
レンコンネモグリセンチュウを人工接種したレンコン肥大塊茎を実体顕微鏡によって観察し、写真撮影を行った。その結果、レンコンネモグリセンチュウが、肥大塊茎に生じた傷(開口部)から組織内へと侵入している様子が観察された(第12図)。この際、線虫は頭部を傷口のほうに向けて侵入を試みていたが、虫体の中程から尾部にかけては、植物組織外に出ている状態であり、肥大塊茎の組織に対する侵入の深度はそれほど深くないと推察された。また、本研究では多くの肥大塊茎に対して接種を行い、接種後の肥大塊茎はその全面を実体顕微鏡観察したが、第12図のように組織内へと侵入している個体が観察されたのは極めて稀であった。このことから、レンコンネモグリセンチュウが肥大塊茎に侵入する頻度は決して高くはないと考えられる。

さらに、レンコンネモグリセンチュウが侵入した肥大塊茎の表面構造を走査電子顕微鏡によって観察し、写真撮影を行った。その結果、実体顕微鏡での観察結果同様に、レンコンネモグリセンチュウは肥大塊茎に生じた傷口から組織内に侵入しており、特に、表皮に剥がれが生じている部分ではその傾向が顕著であった(第13図)。このような部分では、

線虫は表皮組織にのみ侵入しており、その直下に存在する皮層組織や柔組織への侵入は全く観察されなかった。このことから、実体顕微鏡観察での結果同様に、肥大塊茎に対するレンコンネモグリセンチュウの侵入の深度は、表面から約 100 μm 以内と深くはないと考えられる。

これら二つの観察結果から、①レンコンネモグリセンチュウの肥大塊茎に対する侵入頻度は高くないこと、②侵入が起こった場合でも深度は深くないことが明らかになった。本研究では、直径 8.5 cm という非常に小さな空間スケール内に、300~500 頭という自然条件下よりも遥かに高濃度の線虫を接種したにも関わらず、侵入深度は極めて浅かった。このことから、レンコンネモグリセンチュウにとって肥大塊茎は好適な寄生部位ではないと推察される。また、実際の黒皮症では黒褐色斑点が無数に生じていることから、多くの線虫が侵入を試みていると考えられ、この点についても今回の結果とは適合しない。さらに、前項の研究結果によって黒皮症の発生部位では表皮から約 1.0 mm 程度が黒褐色化しており、この部位に対して線虫が侵入した形跡と考えられるが、本研究において線虫は肥大塊茎の深部まで侵入することはなかった。

以上のことから、レンコンが肥大塊茎となる成熟期以降のレンコンネモグリセンチュウの侵入が、黒皮症の発生に関与する可能性は極めて低いと考えられる。肥大塊茎はレンコンネモグリセンチュウにとって好適な寄生部位と考えられる細根と比較して、組織の硬度が高く、線虫にとっては侵入に要する物理的なハードルが高い。一方で、黒皮症が本種の侵入、穿孔行動によって生じている可能性は高い。これらのことから、線虫の塊茎に対する侵入が、組織の肥大および硬化前のより早いレンコンの生育ステージで起きている可能性が考えられる。



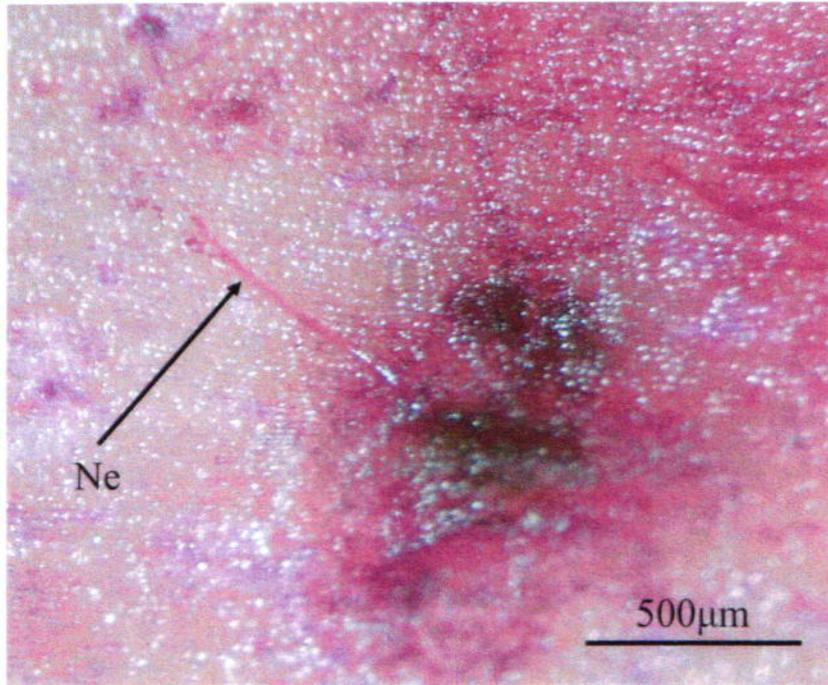
第 11 図 レンコン肥大塊茎へのレンコンネモグリセンチュウの人工接種方法

A : レンコンの肥大塊茎を 0.4%寒天液 50 ml を注ぎ込んだ直径 8.5 cm のペトリ皿の中央に置く。

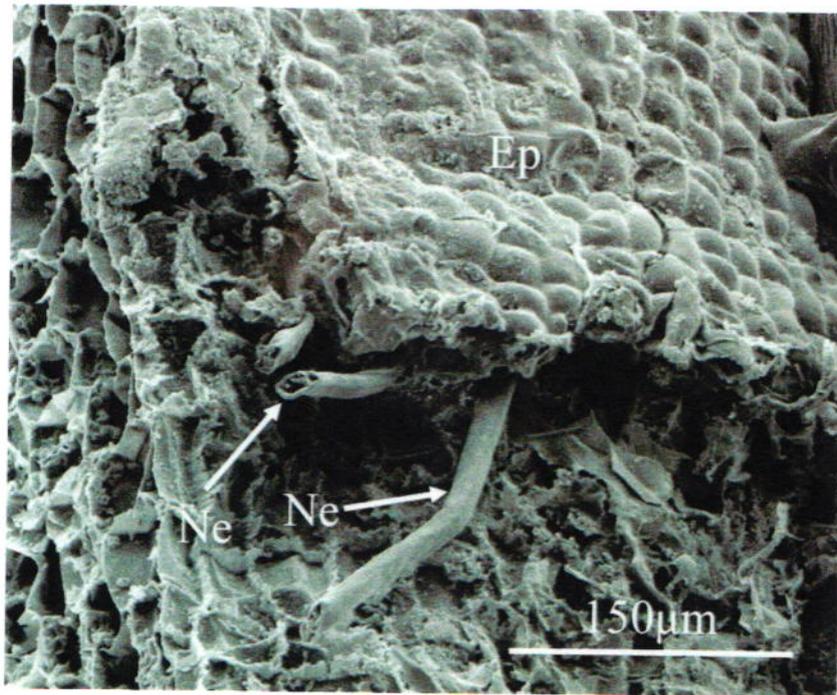
B : 約 300~500 頭が接種されるように調整した線虫懸濁液ペトリ皿内に注ぎ込む。

C : 接種 48 時間後にペトリ皿から肥大塊茎を取り出す。

D : 線虫が侵入した組織 (黒枠内) を実体顕微鏡, 走査電子顕微鏡観察に供試する。



第12図 レンコンネモグリセンチュウを接種した肥大塊茎表面の実体顕微鏡写真
Ne;Nematode (線虫).



第13図 レンコンネモグリセンチュウの侵入を受けた肥大塊茎表層の走査電子顕微鏡写真

Ne; Nematode (線虫), Ep; Epidermis (表皮).

4. レンコンネモグリセンチュウのレンコン若芽への侵入過程の解析

1) 諸言

ここまでの研究において、①黒皮症の発生にはレンコンネモグリセンチュウのレンコン塊茎内部への侵入、穿孔行動が関与していること、②これらの行動がより早いレンコンの生育ステージで起こっている可能性が示唆された。そのため、黒皮症の発生メカニズムを解明するためには、若い生育ステージの植物を用いた検討が必要である。

他方、レンコンの根茎では、生育期に塊茎先端部の若芽が伸長するが、その先端部は皮層が剥がれやすく、傷つきやすい状態にある。また、伸長終了後の若芽は、肥大し、成熟期には食用に供される肥大塊茎となる。これらのことから、レンコンネモグリセンチュウは若芽の伸長期あるいは肥大期に塊茎部への侵入や組織内部の穿孔を行っているのではないかと考えられる。

そこで、本研究では、黒皮症の発生メカニズムの解明およびレンコンネモグリセンチュウのレンコン塊茎への寄生の初期行動、さらに寄生による宿主組織の構造変化を明らかにするため、本種を若芽に対して人工接種し、侵入・穿孔行動の過程を走査電子顕微鏡、透過電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。

2) 材料および方法

レンコン若芽の採集

レンコンネモグリセンチュウおよび黒皮症の発生が見られない石川県金沢市のレンコン栽培圃場からレンコンの根茎を掘り取り、塊茎を採集した。その後、塊茎を流水で十分に洗浄し、先端に伸長する若芽を約 1.0 cm の長さで、カミソリを用いて切り取り、以下の実験に供試した。

レンコンネモグリセンチュウ（接種源）の収集

レンコンネモグリセンチュウの発生が見られる石川県金沢市のレンコン栽培圃場からレンコン根茎を採集し、節から伸長する細根を切り取った。細根は、流水で十分に洗浄した後、1.0～2.0 cmの長さに裁断した。これを25℃の条件下で、72時間のベルマン法に供試し、レンコンネモグリセンチュウを分離、収集した。なお、分離した複数の線虫を光学顕微鏡観察したところ、いずれもレンコンネモグリセンチュウの形態的特徴を有しており、接種源がレンコンネモグリセンチュウであることを確認した。

若芽へのレンコンネモグリセンチュウの接種

レンコンネモグリセンチュウの接種は、若芽を立てた寒天培地上に線虫懸濁液を注ぎ込むことによって行った（第14図）。直径3.0 cmのペトリ皿に、4.0 mlの0.4%寒天液を注ぎ込み、寒天培地を作成した。若芽の先端部がペトリ皿の底面側になるように、培地中央に若芽を挿入した（第14図A）。その後、100～300頭が接種されるように調整した線虫懸濁液を若芽の周囲に注ぎ込み、ペトリ皿の上部にパラフィルムをかけ、蓋をした（第14図B）。接種終了後、暗所にペトリ皿を室温で静置した。接種4.5時間後または24時間後に線虫を接種した若芽をペトリ皿とともに瞬間的に凍結した（第14図C）。液体窒素を用いて瞬間的に凍結を行った理由は、線虫の若芽からの離脱、逃亡を避けるためである。自然解凍後、実体顕微鏡によって若芽が線虫による侵入を受けている状況を観察した（第14図D）。

走査電子顕微鏡観察

レンコンネモグリセンチュウを接種した若芽を、2.5%グルタルアルデヒド固定液（0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2 に溶解）に4℃の条件下で12～24時間浸漬した。試料は同緩衝液で洗浄後、4℃の条件下で1%四酸化オスミウム固定液に12時間浸漬した。同上の緩衝液で洗浄後に、50%、70%、80%、90%および100%エタノール溶液によって脱水し、引き続

き t-ブチルアルコール (2-メチル-2-プロパノール) に置換し、凍結乾燥装置 (日立;ES-2030, 日本) を用いて凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、イオンスパッタ (日立;E-1010, 日本) を用いて、試料に 8 nm の厚さの白金を蒸着し、電界放射形走査電子顕微鏡 (日立;S-4700, 日本) で線虫侵入組織の観察および写真撮影を行った。

透過電子顕微鏡観察

レンコンネモグリセンチュウを接種した若芽を、2.5%グルタルアルデヒド固定液 (0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2 に溶解) に 4°C の条件下で 12~24 時間浸漬した。試料は同緩衝液で洗浄後、4°C の条件下で 1%四酸化オスミウム固定液に 12 時間浸漬した。その後、試料を蒸留水で 10 分間洗浄し、50%、70%、80%、90%および 100%エタノール溶液によって脱水し、QY-1 浸漬後に、Quetol 651 樹脂溶液 (日産 EM, 日本) で包埋した。硬化後に、ダイヤモンドナイフを使ったマイクローム (Leica; EM UC6, オーストラリア) によって、厚さ 80~90 nm の切片を切り出し、透過電子顕微鏡 (日立;H-7650, 日本) で線虫侵入組織の観察および写真撮影を行った。

3) 結果および考察

レンコンネモグリセンチュウ接種の所定時間後に、レンコン若芽を液体窒素によって瞬間的に凍結した。その結果、非常に多数の線虫が若芽先端部の表面に付着している様子が確認され、本研究で実施した接種法は適切な手法であったと考えられた (第 15 図)。これまでに、塊茎や塊根のような大きな植物組織に植物寄生性線虫を接種するような手法ほとんど見られない。本研究では、塊茎の若芽を約 1.0 cm に切除し、さらに液体窒素を用いた瞬間的な凍結によって線虫の植物組織からの離脱、逃亡を防ぐことができたために、このような植物組織への侵入状況の観察を可能にしたと考えられる。このような接種および固定法はこれまで報告がなく、塊茎や塊根といった植物組織への植物寄生性線虫の接種と固

定に有効であり、さらに多くの植物、線虫種に適応可能であると考えられる。

また、若芽への線虫の侵入は、接種 4.5 時間後という比較的早い段階から観察された（第 16 図 A）。この段階では、線虫は若芽の表皮が剥がれ落ちた部分からもぐり込むように組織内へと侵入していた（第 16 図 B）。さらに、同段階では、線虫が若芽の表皮に生じた 100~300 μm 程の亀裂から組織に侵入している様子も確認され、この事例では多くの線虫が同じ亀裂から組織内へと侵入していた（第 16 図 C）。若芽組織内への侵入は、接種 24 時間後の観察においても確認され（第 16 図 D）、この場合も侵入は表皮の剥がれた部分から起こっており、侵入部には約 1 mm の亀裂が生じていた（第 16 図 E）。また、接種 4.5 時間後に観察されたのと同様、多数の線虫が同じ亀裂から組織内へと侵入している様子が確認された（第 16 図 F）。さらに、この時侵入組織の一部が消失しているのが認められた。

次に、線虫の侵入による内部構造の変化を確認するため、試料を縦方向に切断し、その断面を走査電子顕微鏡で観察した。この観察において、線虫は若芽先端部から侵入しており、先端から約 1 mm の組織でも線虫の虫体が確認された（第 17 図 A）。また、先端部および内部を詳細に観察した結果、先端部では多数の線虫が同じ侵入部位から組織内へと侵入しており、その直下の組織は完全に消失していた（第 17 図 B）。同様に、先端部から約 1 mm 内部の侵入部位についても、組織の消失が見られた（第 17 図 C）。

さらに、線虫の侵入行動および宿主組織の変化を細胞レベルで確認するため、透過電子顕微鏡観察を行った（第 18 図）。線虫の侵入が見られない組織では、表皮および柔組織ともに細胞の構造変化などは確認されなかった（第 18 図 A, B）。これに対し、線虫が侵入した組織では、表皮や柔組織の構造が大きく変化しており、表皮細胞では細胞自体が変形、崩壊あるいは消失していた（第 18 図 C）。また、柔組織ではデンプン粒を含んだ細胞内に線虫が入り込み、細胞が大きく変形している様子も確認された（第 18 図 D）。さらに、線虫が複数の細胞にまたがって侵入することで細胞壁が破壊されている様子も確認され（第 18 図 E）。

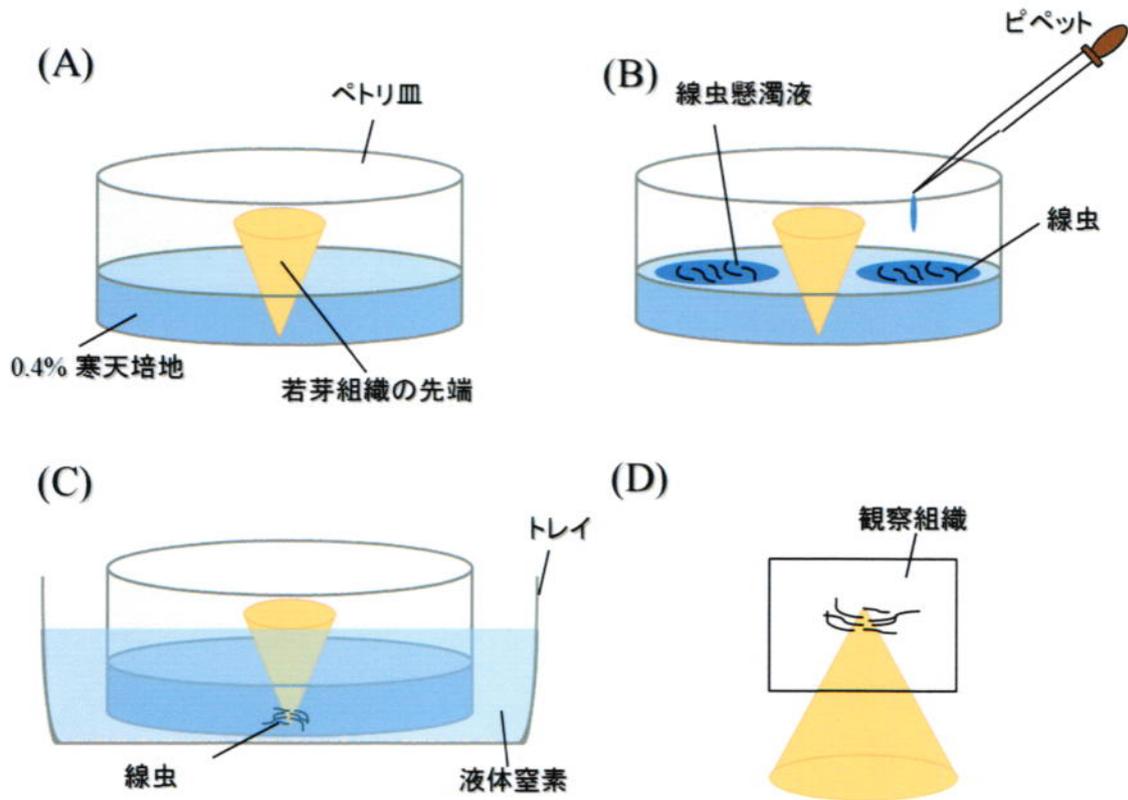
透過電子顕微鏡によって、侵入した個体の周囲を詳細に観察して結果、侵入組織の細胞層は直線的に消失し（第19図A）、細胞壁は粒状に分解されていた（第19図B）。加えて、虫体の周囲には線虫が放出したと推察される顆粒状の物質が集積していた（第19図C）。

レンコンネモグリセンチュウでは、細根への侵入がよく知られており、これまでの研究事例の多くで細根からの分離が行われている（例えば、Sher 1968 や水久保 2002 など）。一方、塊茎部への侵入の可否については未解明であったが、本研究の結果から本種が肥大前の若芽に対しても侵入行動を示すことが明らかになった。このことは、塊茎における黒皮症の発生が線虫の侵入で形成される傷に起因する可能性を示唆している。さらに、Van Der Vecht・Bergman（1952）は、本種の近縁種であるイネネモグリセンチュウのイネ根部への侵入行動について光学顕微鏡観察しており、多数の個体が同じ開口部から根内へと侵入したと報告している。今回の観察においても、レンコンネモグリセンチュウは若芽の表皮が剥がれた部分や傷のできた部分などから組織内へと侵入しており、多数の個体と同じ開口部から侵入していた。これは、開口部から放出される植物組織の成分などを線虫が認識し、誘引された結果であると考えられる。また、実際のレンコン栽培圃場においては、砂や小石との接触、塊茎の肥大などによってこのような開口部は多数形成されていると考えられ、そこに多数のレンコンネモグリセンチュウが侵入し、開口部の拡張などが起こることが黒皮症の発生に関与しているのではないかと考えられた。

また、透過電子顕微鏡観察では、レンコンネモグリセンチュウが組織内への侵入によって、表皮細胞あるいは表皮細胞層を変形、崩壊、消失させることが確認され、侵入が複数の細胞にまたがって行われる場合には、細胞壁が完全に破壊されていた。特に、表皮細胞層は直線的に破壊され、消失していた。これらの現象が、線虫の侵入による物理的な作用のみで起こっている場合、直線的な構造変化や組織の消失は見られないと考えられる。そのため、線虫が何らかの化学的作用によって組織および細胞の変化をもたらしていること

が示唆された。また、実際に、侵入虫体の周辺を高倍率で観察したところ、顆粒状物質の集積が確認された。

植物寄生性線虫が分解酵素を分泌することは既によく知られている。1998年、ジャガイモシストセンチュウ *Globodera rostochiensis* およびダイズシストセンチュウ *Heterodera glycines* において、植物寄生性線虫では初めて4つの β -1,4-グルカナーゼ遺伝子を持つことが明らかになり、細胞壁分解酵素を持つことが示された (Smant et al. 1998)。また、植物寄生性線虫の細胞壁分解酵素については、日本国内のみならず、全世界で農作物被害が発生しているサツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* でも報告がなされている (Popeijus et al. 2000, Abad et al. 2008)。加えて、Shinya et al., (2013) は、松枯病の原因線虫であるマツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* が細胞壁の分解や栄養摂取、宿主応答からの回避などに関する1,515のタンパクを分泌していることを明らかにした。レンコンネモグリセンチュウが分類される *Hirschmaniella* 属線虫においても、イマムラネモグリセンチュウが穿孔中に分泌物を放出している可能性が報告されている (後藤 1969)。今回の観察で確認されたレンコンネモグリセンチュウ周囲の物質を特定することは本研究内では困難であるが、細胞壁の分解が見られたことや線虫がデンプン粒を含んだ柔細胞内に寄生していたことなどから、他の植物寄生性線虫で報告されている細胞壁やデンプンなどの分解酵素である可能性が考えられる。これらの点については、今後、分子生物学的な検討や生化学的なアプローチが必要と考えられる。



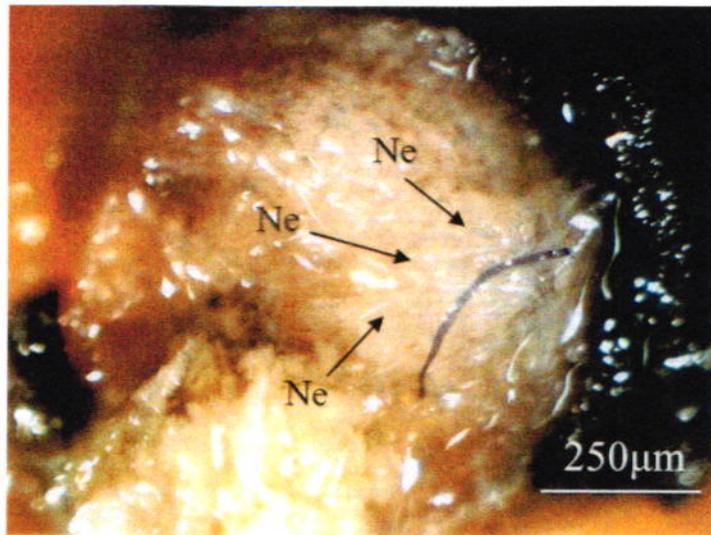
第14図 レンコン若芽へのレンコネモグリセンチュウの人工接種方法

A: レンコン若芽の先端部を約 1.0 cm に切除し, 0.4%寒天液を 4.0 ml 注ぎ込んだ直径 3.0 cm のペトリ皿の中央に立てて置く。

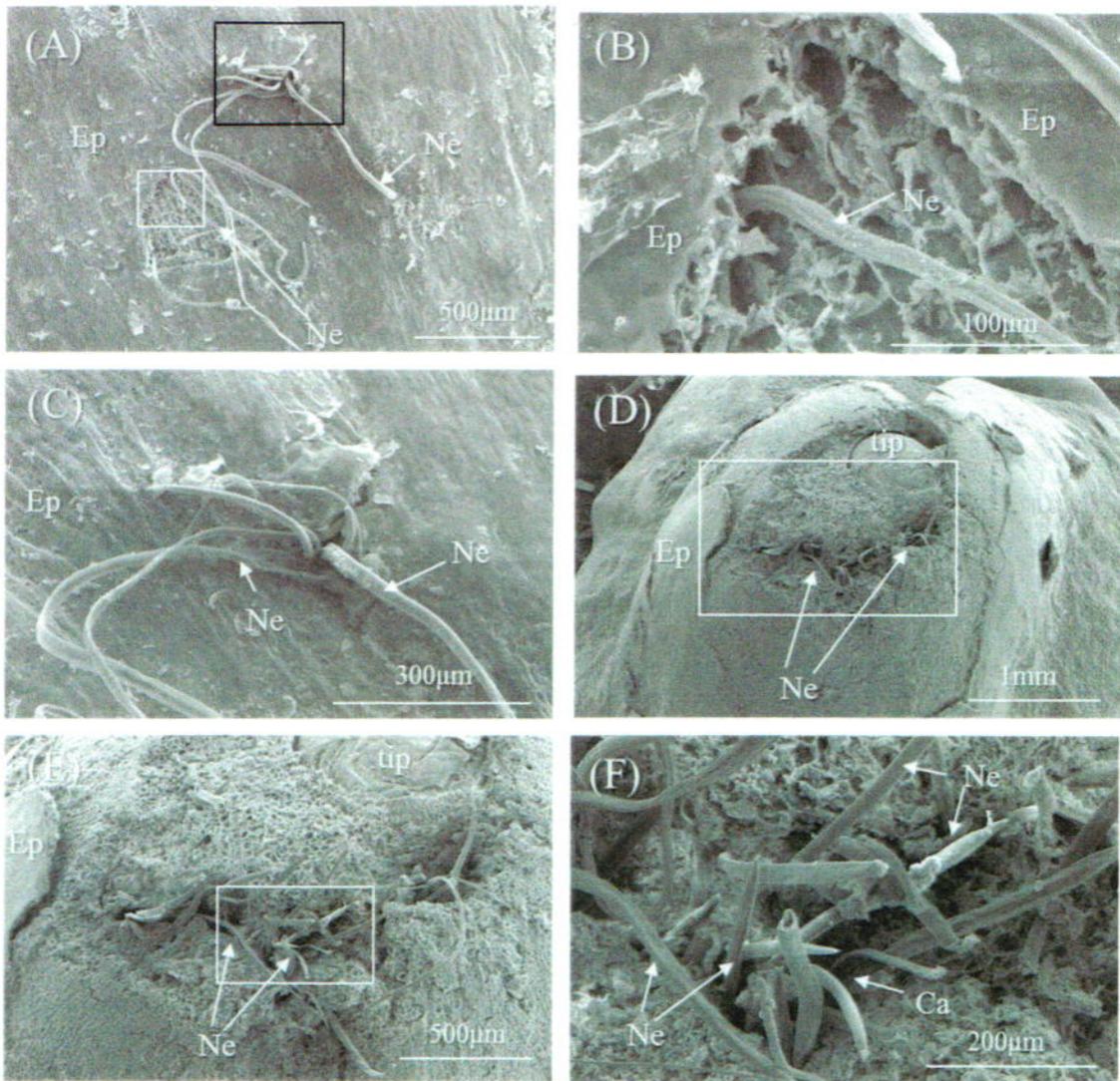
B: 約 100~300 頭の線虫が接種されるように調整した線虫懸濁液を若芽の周囲に注ぎ込む。

C: 接種の 4.5 時間後あるいは 24 時間後, 72 時間後に液体窒素を用いて, 試料を瞬間的に凍結する。

D: 自然解凍後, 線虫による侵入を受けた組織 (黒枠内) を実体顕微鏡で観察する。



第15図 レンコンネモグリセンチュウを接種した若芽の実体顕微鏡写真
Ne; Nematode (線虫).



第16図 レンコンネモグリセンチュウの侵入を受けた若芽表皮の走査電子顕微鏡写真

A: レンコン若芽の表皮に侵入するレンコンネモグリセンチュウ (接種 4.5 時間後)

B: A の白枠内の拡大図。線虫は表皮の一部が剥がれた部分からもぐり込むように侵入している。

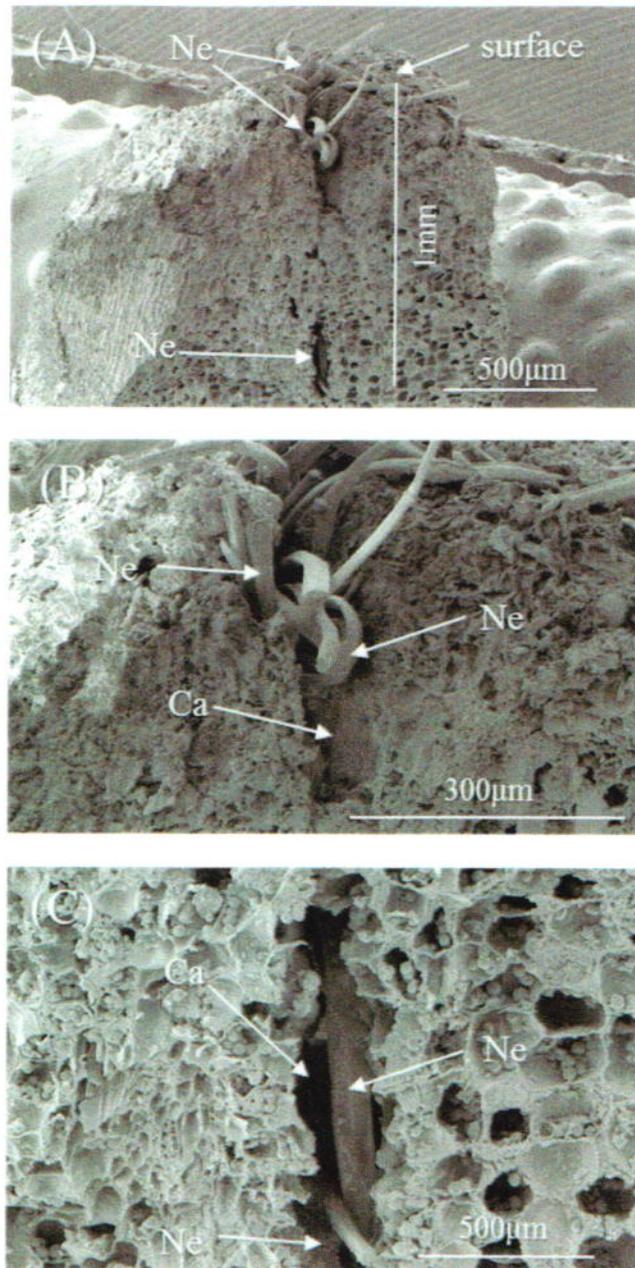
C: A の黒枠内の拡大図。複数個体が表皮に生じた亀裂から組織内へと侵入している。

D: 線虫による侵入を受けた若芽の先端部 (接種 24 時間後)。

E: D の白枠内の拡大図。無数の線虫が表皮の剥がれた部分から組織内へと侵入している。

F: E の白枠内の拡大図。無数の線虫が同じ侵入孔から侵入を試みており、侵入孔周辺の組織は消失している。

Ne; Nematode (線虫), Ep; Epidermis (表皮), Ca; Cavity (空隙)。



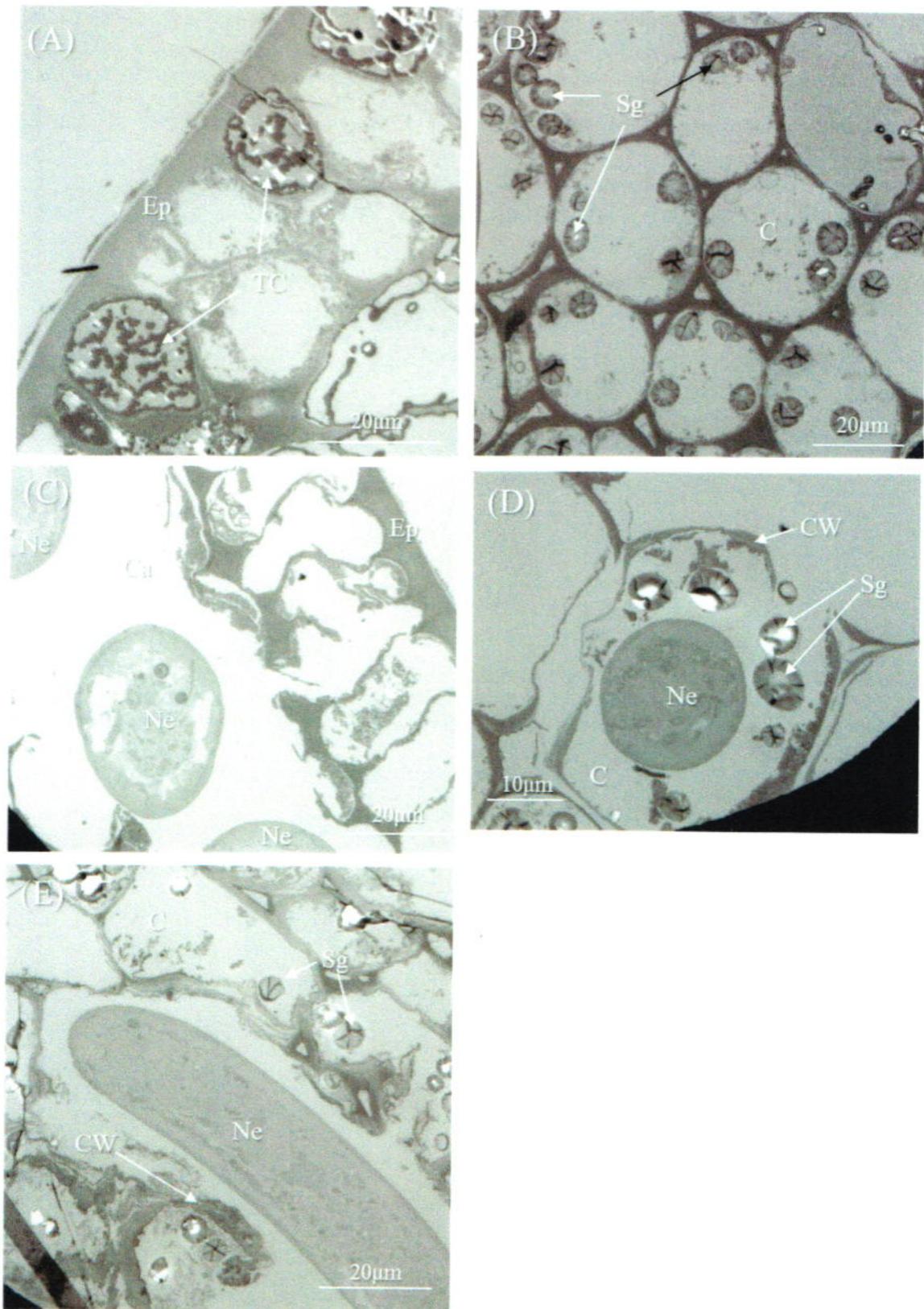
第17図 レンコンネモグリセンチュウの侵入を受けた若芽の走査電子顕微鏡写真（接種24時間後）

A：レンコンネモグリセンチュウによる侵入を受けた組織の断面図。線虫は表面から深さ約1 mmの組織においても確認される。

B：侵入点周辺の拡大図。多数の線虫が同じ侵入孔から侵入を行っている。

C：表面から深さ約1 mmの組織に侵入した線虫と宿主組織の拡大図。線虫周辺の宿主組織は消失している。

Ne; Nematode（線虫），Ca; Cavity（空隙）。



第18図 レンコンネモグリセンチュウの侵入を受けた若芽の透過電子顕微鏡写真 (接種24時間後)

A : 健全組織の表皮 (対照).

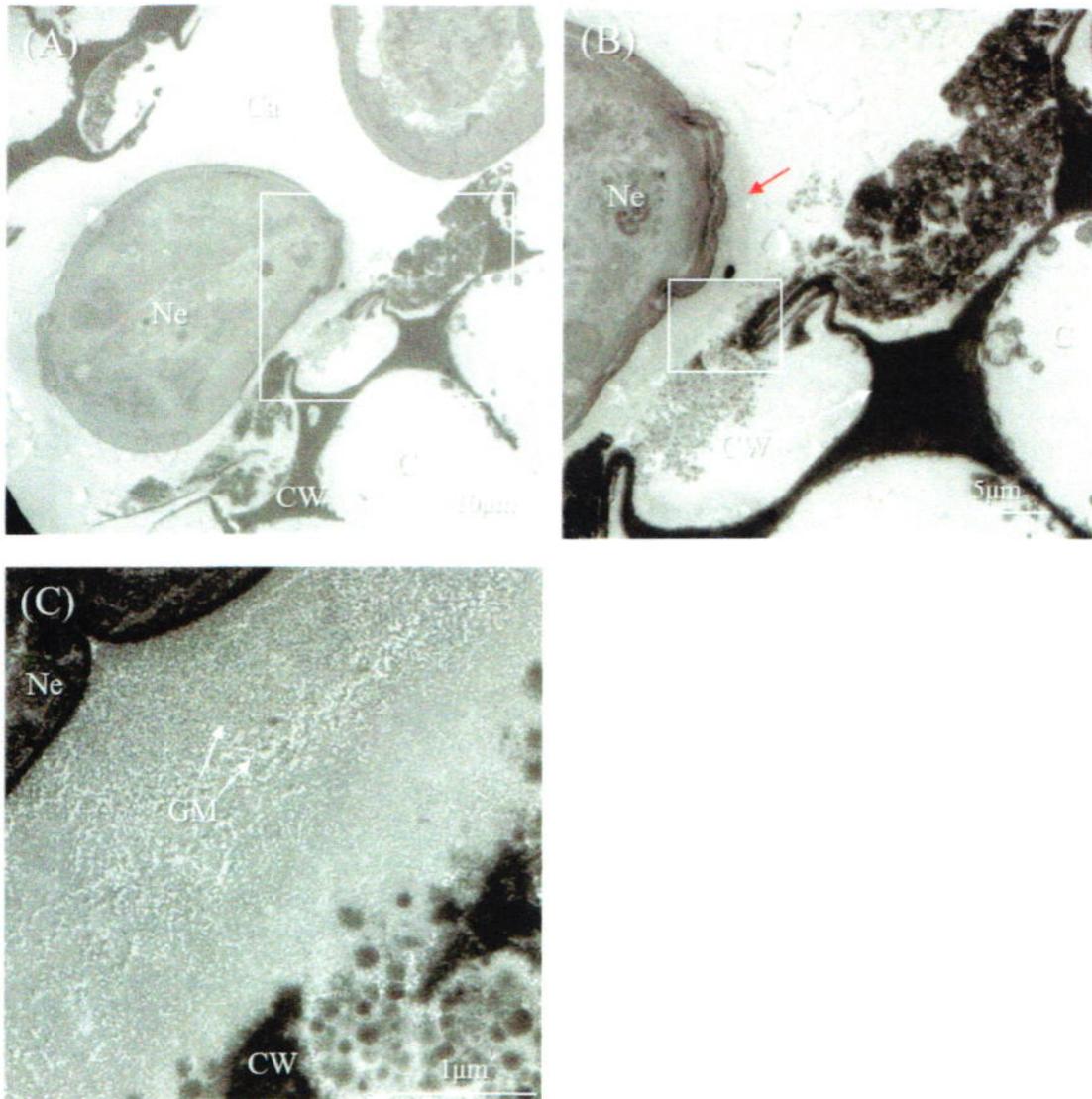
B : 健全組織の皮層細胞 (対照).

C : 表皮に侵入したレンコネモグリセンチウ. 表皮直下の細胞層は線虫の侵入により完全に消失している.

D : 皮層細胞内に侵入した線虫. 線虫は, デンプン粒を含む細胞内に侵入し, 細胞壁の一部を崩壊している.

E : 複数の皮層細胞にまたがって侵入する線虫. 線虫の侵入によって細胞壁は著しく崩壊している.

Ne; Nematode (線虫), C; Cortex cell (皮層細胞), Ep; Epidermis (表皮細胞), Ca; Cavity (空隙), TC; Tannin Cell (タンニン細胞), CW; Cell Wall (細胞壁), Sg; Starch grains (デンプン粒).



第19図 レンコネモグリセンチュウの周囲で観察された顆粒状物質の透過電子顕微鏡写真（接種24時間後）

A: レンコネモグリセンチュウによる侵入を受けた若芽の表皮周辺の低倍図。侵入を受けた細胞層は直線的に消失している。

B: Aの白枠内の拡大図。顆粒状物質（赤色矢印）が線虫体の下部を取り囲むように存在していることから、この物質は線虫から分泌されている可能性が高い。

C: Bの白枠内の拡大図。線虫が放出したと考えられる顆粒状物質の集積が見られる。

Ne; Nematode（線虫）， C; Cortex cell（皮層細胞）， Ep; Epidermis（表皮細胞）， Ca; Cavity（空隙）， CW; Cell Wall（細胞壁）， GM; Granular Materials（顆粒状物質）。

IV 石灰窒素を用いたレンコンネモグリセンチュウ密度低減技術の開発

1) 諸言

レンコンネモグリセンチュウでは、これまでにいくつかの防除技術の開発が試みられてきた。後藤ら(2011)は、本種に対して有効な化学合成農薬のスクリーニングを行い、有機リン系薬剤、カーバメート系薬剤が高い致死率を示したとしている。また、高木ら(2012, 2013)は、種レンコンを介した被害拡大を防ぐために温湯処理法を開発し、47°C20分の処理が有効であることを明らかにした。なお、47°C20分の温湯消毒は、石川県内の個体群にも有効であるが、石川県内のレンコンの栽培品種では高温障害が多発することが実証試験で明らかになっている(植松 未発表)。

さらに、本圃での密度低減を目指した防除法としては、各地で太陽熱土壤消毒法の開発が進められている(久恒ら 2014)。これは、夏季にフィルムでレンコン栽培圃場を被覆することで地温上昇を促し、レンコン腐敗病の病原菌であるフザリウム菌やピシウム菌、土壤線虫類などを死滅させる防除法である(徳島県水産総合技術支援センター 2015)。しかしながら、太陽熱土壤消毒法の石川県での実施については、①レンコン圃場を湛水状態で管理するため、地温上昇が容易ではないこと、②作土深が他県より深いため、線虫の局在部位まで地温上昇が及ばない可能性が高いこと、③圃場の区画が広く、田面がぬかるんでいるため、フィルム被覆などの作業が容易ではないこと、などから現実的ではないと考えられており、生産現場で実施可能な本圃の密度低減対策が求められている。

主要な農作物において、土壤線虫類の密度低減技術として最も用いられるのは、農薬を用いた土壤消毒や粒剤散布を中心とした化学的防除である。しかし、レンコンでは、レンコンネモグリセンチュウに有効な薬剤が農薬登録されていないのが現状である。一方で、石灰窒素は「野菜類」の「線虫類」に対して農薬登録を所持しており、生産現場での即時使用が可能である。

そこで、本研究では、石灰窒素のレンコンネモグリセンチュウに対する密度抑制効果を

ポット試験において検証した。さらに、本種は比較的耐乾燥性の低い線虫種であり（高木ら 2015）、雑草への寄生性も見られることから、圃場試験においては、乾田化（休作）と圃場内雑草の除草、石灰窒素の散布を組み合わせた体系の密度低減効果の検証を行った。

2) 材料および方法

(1) ポット試験による密度低減効果の検証

供試土壌の採集

2016年10月26日に、黒皮症被害が見られる石川県金沢市のレンコン栽培圃場から土壌を採集し、以下の実験に供試した。土壌は、圃場内に複数設置した任意の地点から、移植ごてを用いて採集した。

試験区および石灰窒素の施用方法

2016年10月26日に、現地圃場から採集した土壌を1/5000 a ワグネルポットに入れ、各処理を行った。処理は3水準とし、200kg/10 a 相当を施用する試験区、100kg/10 a 相当を施用する試験区、無処理区を設置した。石灰窒素の施用は、所定量をワグネルポット内に手撒きすることで行い、施用直後に移植ごてで土壌を十分に攪拌した。ワグネルポットはガラス温室内で管理し、乾燥による線虫の死滅を防ぐため、定期的に適量の灌水を行った。なお、本試験の連制は3反復で実施した。

試験期間中の温度推移の計測

ワグネルポットを管理したガラス温室内の温度推移は、データロガーを用いて計測した。データロガーは、ガラス温室内の番線に括り付けて設置した。また、計測の高さは、ワグネルポット上部の高さと一致するように設置した。

線虫密度の調査方法

処理直前の10月26日および処理20日後の11月15日に移植ごてを用いて、各ポットから土壌200gを採集した。採集した土壌からウェットシービング法（水久保 2014）およびベルマン法を用いて線虫を分離し、光学顕微鏡下でレンコネモグリセンチュウの頭数のみを計数した。

(2) 圃場での密度低減効果の検証

試験場所および調査期間

圃場レベルでの密度低減効果の検証は、石川県金沢市の現地レンコン栽培圃場で実施した。調査期間は、2016年6月28日～11月15日とした。また、試験圃場では、2015年までにレンコネモグリセンチュウの発生および黒皮症被害が頻出していたため、2016年春季の作付けを実施しておらず、実質的な休作状態であった。

試験区の概要

試験区には、石灰窒素の施用を軸に線虫密度の低減を図る実証区、石灰窒素を施用しない対照区の2つを設けた。各区の概要を第3表に示す。

実証区では、2016年は作付けを行わず実質的な休作状態であり、圃場内を落水して乾田化を図った。また、雑草での線虫増殖を防ぐため、定期的に除草剤や機械除草によって雑草を管理した結果、圃場内で雑草等の繁茂は見られなかった。石灰窒素は、田面が乾燥状態になった2016年8月6日に粒状石灰窒素を200kg/10a相当施用し、施用直後にロータリー耕起を行い、土壌混和した。

一方、対照区についても、2016年は作付けを実施しておらず休作状態ではあったが、湛水状態を維持しており、常に田面から5cm以上は水が張ってある状態であった。除草管理については、目視で確認された場合に徒手で抜き取りを行ったが、圃場内の一部で雑草や

前年掘り残したレンコンの繁茂が見られた。石灰窒素の施用は実施せず、ロータリー耕起も行わなかった。

なお、両区とも1圃場の全体を試験区として用いており、試験面積は各区とも50a、連制は1反復とし、以下の調査は各区5箇所で行った。

線虫密度の調査方法

2016年6月28日、8月4日、9月6日、11月16日に土壌の採取を行い、線虫密度を調査した。実証区では、ハンドオーガーを用いて、0～60 cmおよび60～100 cmの2層の土壌を採集した。一方、対照区では圃場内が湛水状態であり、ハンドオーガーの使用が不可能であったことから、上層(約0～25 cm)および下層(約25～50 cm)の土壌を徒手で採集した。採集した土壌は、ウェットシービング法およびベルマン法にかけて線虫を分離し、光学顕微鏡下でレンコンネモグリセンチュウの頭数のみを計数した。

3) 結果および考察

ポット試験を実施したガラス温室内の試験期間中の平均気温は14.7℃、最高気温は25.4℃、最低気温は5.6℃となり(第20図)、石川県金沢市の4月中下旬頃あるいは10月中下旬頃の野外気温の温度推移と類似した条件下での試験となった。ポット試験において、無処理区の処理前の線虫密度は平均で8.0頭/土壌200g、100kg/10a区で6.0頭/土壌200g、200kg/10a区で6.7頭/土壌200gとなり、各区で若干の差異が見られたものの、いずれも少～中発生土壌での試験となった(第4表)。これに対し、処理20日後の線虫密度は無処理区で4.3頭/土壌200gとなったが、石灰窒素を処理した100kg/10a区および200kg/10a区ではレンコンネモグリセンチュウはいずれも分離されず(0.0頭/10a)、石灰窒素による高い線虫密度の抑制効果が確認された(第4表)。なお、本試験では無処理区においても密度の減少が見られたが、これはポット内に線虫の寄主となる植物が全くない状態であり、線虫

が栄養摂取等を行えなかったためと考えられる。

石灰窒素は、農薬としての有効成分としてカルシウムシアナミドを保持しており、これが水と接触することで加水分解し、シアナミドとなる。シアナミドは高い殺線虫効果を持っている。石灰窒素による植物寄生性線虫への密度抑制効果は多数の種で報告があり（高橋・嶋崎 1986）、太陽熱土壌消毒との併用についても研究がなされているが（高井ら 2003）、レンコンネモグリセンチュウに対する効果は不明であった。本試験において、レンコンネモグリセンチュウの土壌中密度の顕著な抑制効果が確認されたことから、シアナミドおよび石灰窒素は本種に対しても有効であり、圃場での現実的な防除対策の一つになり得ると考えられた。

さらに、圃場試験における上層および下層毎の線虫密度の推移を第21図、第22図に示した。休作を行ったものの、通年を湛水状態で管理し、徒手で雑草を抜き取りし、石灰窒素の施用を実施しなかった対照区では、6月28日の土壌中密度が上層で20.7頭/土壌200g、下層で25.0頭/土壌200gだったが、8月4日には上層で23.5頭/土壌200g、下層で33.5頭/土壌200gとなり、密度増加が確認された（第21図）。その後、9月6日、11月15日には密度の減少が見られたものの、11月15日においても土壌中の密度は上層で6.0頭/土壌200g、下層で15.5頭/土壌200gとなり、比較的密度は高い状態で推移した。一方で、休作を行った上で、落水によって乾田状態で管理し、除草剤散布および機械除草で雑草管理を行い、石灰窒素の施用および土壌混和を実施した実証区では、6月28日の密度が0～60 cmの深さで23.0頭/土壌200g、60～100 cmの深さで8.0頭/土壌200gだったが、8月4日には0～60 cmの深さで15.0頭/土壌200g、60～100 cmの深さで2.0頭/土壌200gとなり、密度の減少が確認された（第22図）。さらに、石灰窒素の施用および土壌混和後の9月6日、11月15日にはさらに密度が減少しており、11月15日時点での密度は0～60 cmの深さで0.5頭/土壌200g、60～100 cmの深さで1.0頭/土壌200gとなった。この11月15日の密度は、調査開始時である6月28日の密度の2.2%（0～60 cm）あるいは12.5%（60～100 cm）で

あり、実証区では顕著な密度抑制効果が確認された。

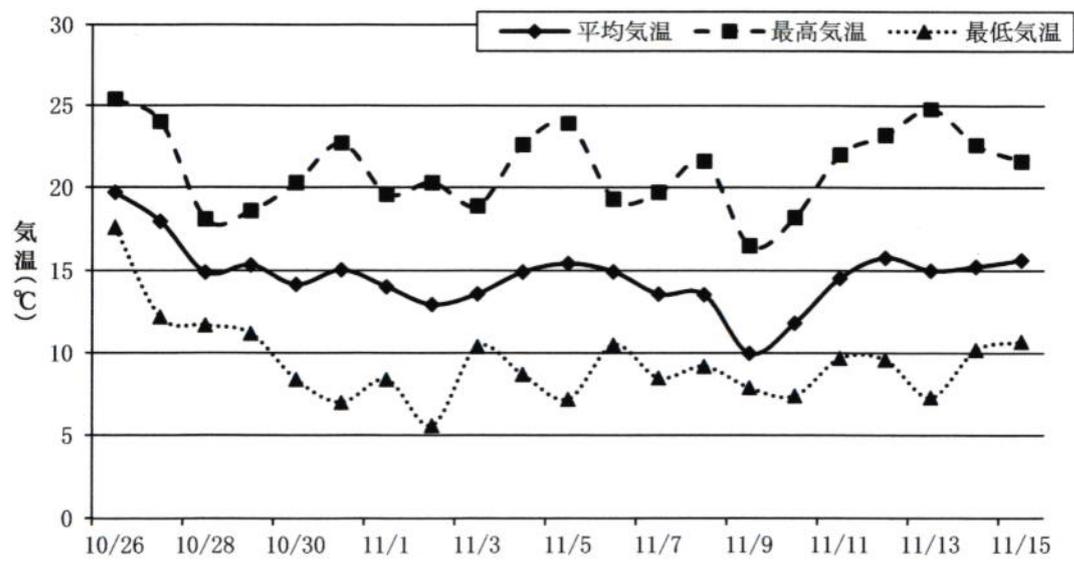
高木ら（2015）は、レンコンネモグリセンチュウは耐乾燥性の低い線虫種であり、残渣の乾燥や圃場の乾田化は防除に有効であるとしている。また、本研究の第2章において、本種がレンコン栽培圃場内の雑草に寄生し、増殖している可能性を明らかにしている。本試験において、湛水状態を維持し、除草管理が十分でなかった対照区では、本種の増殖期に当たる6月28から8月4日にかけて密度の増殖が認められたのに対し、乾田化を実施し、除草剤や機械除草によって徹底的に雑草管理した実証区では、同時期に密度低下が認められた。このことから、乾田化および圃場内の雑草の除去は線虫密度の低下に向けて、圃場レベルでも非常に重要であることが明らかになった。さらに、石灰窒素の施用を行わなかった対照区では8月4日から9月6日の密度変化がわずかであったのに対し、石灰窒素の施用および土壌混和を行った実証区では、同時期においても密度低下が認められている。このことから、石灰窒素の施用は圃場レベルでも有効と考えられる。また、圃場での効果については単にシアナミドによる殺線虫効果のみでなく、石灰窒素の持つ腐熟促進効果によって、土壌中の植物残渣が分解され、線虫の餌資源が減少したことも関与したのではないかと推察される。また、本試験において最後に土壌の採集を行った11月15日の密度は、対照区でも9月6日から減少していたが、これは、①休作によって餌資源がなくなったこと、②そもそも同時期は線虫の密度低下が起こる時期である（第2章の発消長の調査より）こと、が影響していると考えられる。しかしながら、11月15日の密度は、実証区では対照区と比較して顕著に低くなっていた。以上のことから、今回の試験で検証した「休作」、「乾田化」、「圃場内雑草の徹底管理」、「石灰窒素の施用および土壌混和」を組み合わせた総合的な防除体系の線虫密度抑制効果は非常に高いことが明らかになった。さらに、対照区での密度変化との比較から、これら各対策のいずれかを実施しなかった場合には、線虫密度が低下しない可能性があるため、対策の実施には4つの技術を総合的に組み合わせる必要があると考えられる。なお、今回の防除体系は、他の地域で実施されている太陽熱

土壌消毒法などの土壌消毒技術に比べ、労力面から容易に取り組むことが可能であり、生産現場で実施可能な線虫密度低減対策として、技術普及が求められる。

本試験では休作を前提とし、試験を実施した。しかし、休作を行うことは生産者所得の低下につながる。このため、今後は作付けを行いながら、線虫密度の低下あるいは黒皮症被害の発生防止を可能とする防除技術が必要であり、これらについてはさらなる検討が必要である。

第3表 現地試験における各区の概要

試験区	栽培	水管理	除草管理	石灰窒素の施用	耕起
実証区	作付けなし (休作)	落水状態 (乾田化)	除草剤および 機械除草 (随時)	200kg/10 a (8月6日)	石灰窒素施用 直後に実施
対照区	作付けなし (休作)	湛水状態	徒手で抜き取り (随時)	施用なし	実施なし

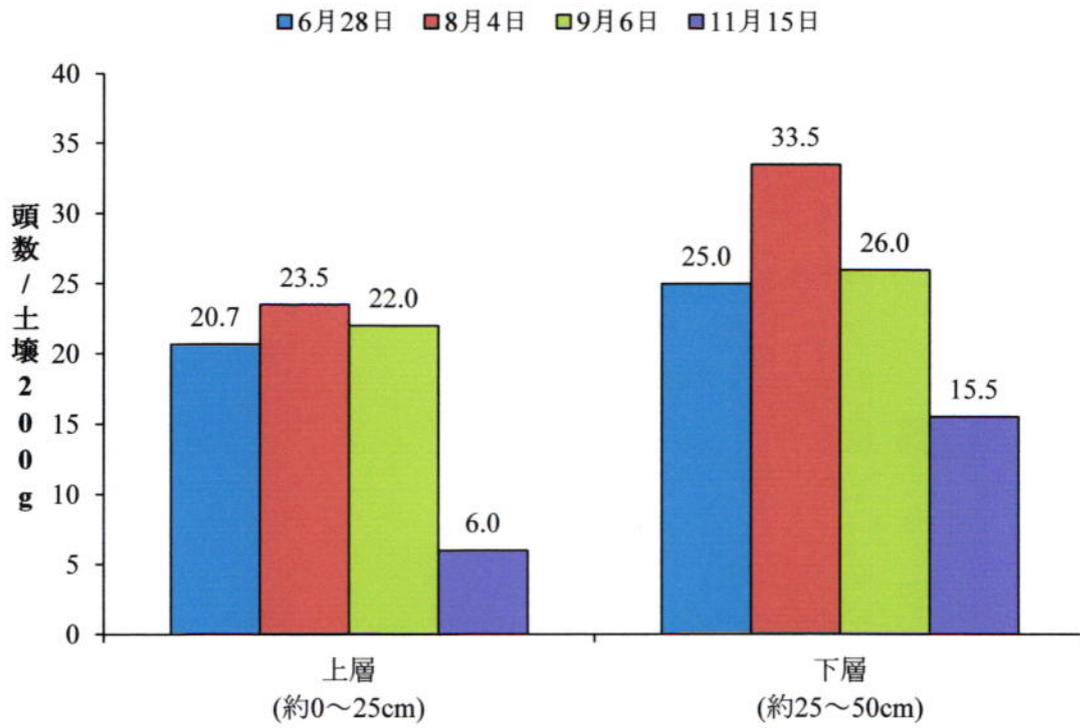


第20図 ポット試験実施期間中の試験温室内の気温の推移

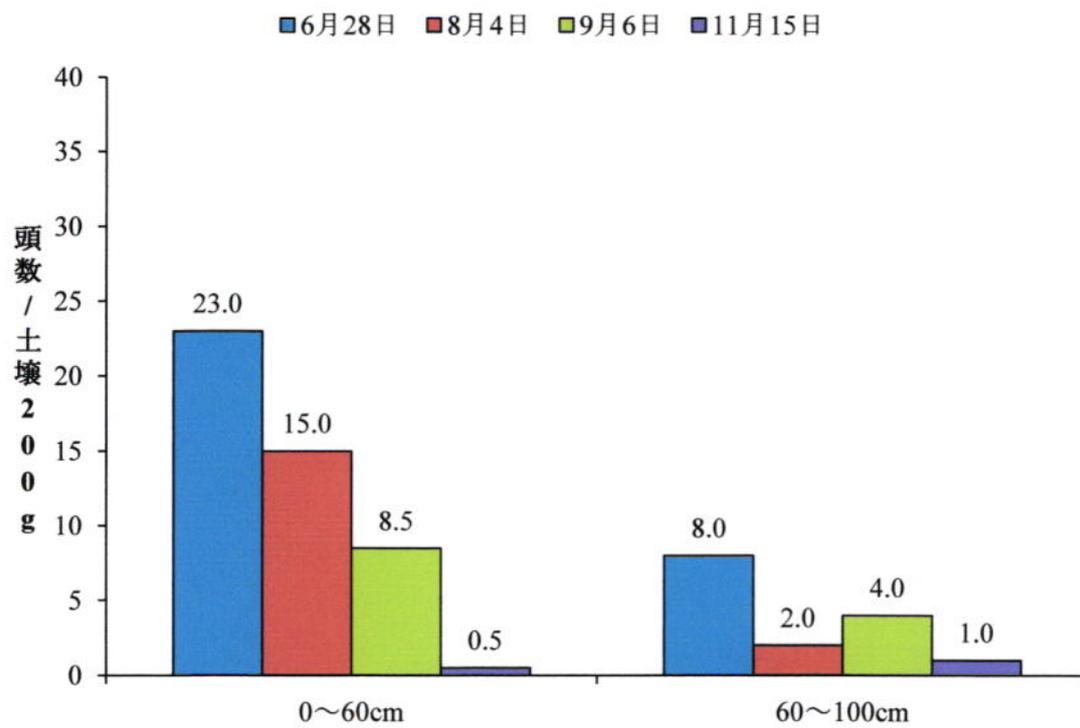
第4表 石灰窒素施用がレンコネモグリセンチュウ密度に及ぼす影響（ポット試験）

試験区	反復	線虫密度(頭/土壌 200g)		補正密度指数
		処理前 (10/26)	処理 20 日後 (11/15)	
無処理	i	10	5	100.0
	ii	6	5	
	iii	8	3	
	平均	8.0	4.3	
100kg/10 a	i	4	0	0.0
	ii	6	0	
	iii	8	0	
	平均	6.0	0.0	
200kg/10 a	i	11	0	0.0
	ii	5	0	
	iii	4	0	
	平均	6.7	0.0	

補正密度指数 = (試験区の処理後密度/試験区の処理前密度) × (無処理区の処理前密度/無処理区の処理後密度) × 100



第21図 圃場試験における対照区での線虫密度の推移



第 2 2 図 圃場試験における実証区での線虫密度の推移

V 総合考察

本研究では、レンコンネモグリセンチュウの生活環や植物体に対する感染機構などの発生生態に関する基礎的研究を行うことで、防除技術の開発に資するとともに、石灰窒素の施用を中心としたレンコンネモグリセンチュウの密度低減技術を開発し、生産現場における迅速かつ実用的な防除の実現という視点から研究を行った。

第Ⅱ章の1では、レンコンの節に伸長する細根を経時的に採集し、線虫の分離、光学顕微鏡下での詳細な観察を行うことで、これまで全く未解明であったレンコンネモグリセンチュウのレンコン内での発生消長について検討した。その結果、レンコンネモグリセンチュウは、3期あるいは4期幼虫、成虫体で越冬を行っており、新世代である2期幼虫の出現時期は6~9月頃であることが明らかになった。また、その後、2期幼虫は主としてレンコンの細根内で成長し、3期、4期幼虫、成虫体となって再度越冬を行うため、本種は石川県内の野外条件では年1回の発生と考えられた。最近、高木ら(2016)は、レンコン栽培における重要雑草であるケイヌビエ *Echinochloa crus-galli* var. *echinata* 根部での本種の発生消長について調査し、新世代幼虫が出現、増加する8~9月が発生ピークであり、茨城県内では年1回の発生であることを報告している。これらは、本研究の結果と極めて類似しており、レンコンネモグリセンチュウは日本国内の多くの地域において、夏季に発生ピークを持つ、年1回発生の線虫種である可能性が高いと考えられる。徳島県等の西日本のレンコン産地においても本種の発生が確認されているが(水久保 2015, 奈良部 2017)、これらの地域での発生消長は未検討なため、今後は日本国内の他の地域でのさらなる検討を行い、発生消長の地域変動等についても明らかにする必要がある。

第Ⅱ章の2では、レンコン栽培圃場およびその周囲に自生する雑草種でレンコンネモグリセンチュウの寄生状況を調査することで、本種の寄主植物の解明を試みた。その結果、レンコンネモグリセンチュウは、ミズアオイ *Monochoria korsakowii* (ミズアオイ科)、ミズハコベ *Callitriche palustris* (アワゴケ科)、アゼガヤ *Lepochloa chinensis*、タイヌビエ

Echinochloa oryzoides, イヌビエ *Echinochloa crus-galli* var. *caudata* (以上, イネ科), ヒデリコ *Fimbristylis miliacea*, タマガヤツリ *Cyperus difformis* (以上, カヤツリグサ科) という 4 科 11 種の雑草種の根部で寄生が認められ, 寄主範囲は極めて広いと考えられた (植松ら 2015). 圃場周辺雑草に対する寄生性については, その後, 高木ら (2016) も茨城県内での調査結果を報告しており, 新たなにケイヌビエやキシユウスズメノヒエ *Paspalum distichum*, ガマ *Typha latifolia*, チョウジタデ *Ludwigia ephilobioides*, キツネノボタン *Ranunculus silerifolius* で寄生が確認された. これらの多くは, 石川県内のレンコン栽培圃場周辺ではほとんど見られない雑草種である. このことから, 本種が利用している寄主植物は地域によって異なり, さらなる継続的な調査が必要と考えられる. また, こうした雑草種は本種にとって, 休閒時などのレンコンが圃場内に存在しない時の重要な代替餌であり, その防除は密度低減にも大きく影響を及ぼす. このことから, 本研究において, 石川県内の個体群が利用する雑草種を解明したことは, 防除対策を確立する上でも非常に重要な知見となった.

第Ⅲ章の 1 では, レンコンネモグリセンチュウのレンコンに対する感染機構を解明するための第一段階として, 細根における本種の寄生様態と寄生による細根組織の変化を光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察した. その結果, レンコンネモグリセンチュウは細根の皮層細胞内に寄生しており, 卵~成虫までの様々な齢期の個体が観察されたことから, 生活史の大部分を細根内で過ごすことが示唆された. さらに, 侵入を受けた組織の一部には空隙が認められ, 本種の侵入による物理的あるいは化学的な作用によって, 宿主組織の消失などの変化が生じることが明らかになった (植松ら 2016). 線虫感染根の組織学的研究は, 植物寄生性線虫の寄生動態を理解するのに必要不可欠であり, それ故, 農業生産上重要な線虫種では, これらの取組みが数多く行われてきた (Wyss 1984, Wyss and Zunke 1986, Zunke 1990, Miyashita et al. 2014). 一方で, レンコンネモグリセンチュウについてはこのような報告は見当たらず, 本研究が初めての報告となる. 本種にとって重要

な寄生部位である細根での寄生動態を解明することは、防除技術の開発を行う上でも非常に重要な知見であり、今後、細根の皮層細胞内にまで到達するような浸透移行性の高い新規防除薬剤の開発などが期待される。

第Ⅲ章の2では、黒皮症の発生メカニズムの解明の一助とするため、黒皮症発生部位を実体顕微鏡、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察し、エネルギー分散型X線分析装置を用いて黒皮症発生部位の表面の元素分析を行った。その結果、黒皮症の発生部位では表皮から約1 mm、約7~15細胞層が黒褐色に変色しており、表面構造は陥没や凹凸が生じるなどの劣化が見られた。また、内部構造についても発生部位直下の数細胞層が変形、崩壊しており、レンコンネモグリセンチュウの侵入した痕跡であると考えられた。さらに、エネルギー分散型X線分析装置による元素分析では、黒皮症発生部位において鉄(Fe)が特異的に検出された。一方で、本種の虫体はいずれの観察でも確認されず、本種の加害時期が塊茎肥大以前の生育期初期~中期ではないかと推察された。このように、生育の初期から侵入、加害が起こることは、移住型内部寄生性線虫を代表するネグサレセンチュウ類で知られているが(鳥越 2008)、この点についてはさらなる検討が必要と考えられた。

第Ⅲ章の3では、レンコンの肥大塊茎に対してレンコンネモグリセンチュウを人工接種することで、塊茎部への侵入の初期行動を観察し、黒皮症の発生メカニズムの解明を試みた。しかしながら、本実験では自然条件下よりもはるかに高濃度の接種を行ったにもかかわらず、本種が肥大塊茎に侵入することは極めて稀であり、侵入が起こった場合もその侵入深度は浅かった。これらのことから、成熟期以降の肥大塊茎に対する本種の侵入や加害が黒皮症の発生に関与する可能性を低いと考えられ、さらに若い生育ステージの植物体を用いた検討が求められた。

そこで、第Ⅲ章の4では、後に伸長、肥大し、肥大塊茎となるレンコンの若芽に対して人工接種を行い、侵入・穿孔行動の過程を走査電子顕微鏡、透過電子顕微鏡を用いて詳細

に観察することで、黒皮症の発生メカニズムおよびレンコンネモグリセンチュウのレンコン塊茎への寄生の初期行動、さらに寄生による宿主組織の構造変化の解明を目指した。この際、本種の侵入時の行動を瞬間的に捉えるため、新たな線虫接種法および固定手法を考案した。この手法ではまず、比較的大きな植物組織に対する接種法として、若芽の先端部を約 1.0 cm に切除することで、直径 3.0 cm という小スケール内に高濃度の線虫を接種することを可能とした。さらに、試料を液体窒素で凍結することで、線虫の植物体内からの逃亡、離脱を回避し、侵入時の行動を瞬間的に観察することが可能となった。この手法を用いた結果、多数のレンコンネモグリセンチュウが同一の侵入孔から若芽内へと侵入することが明らかになり、この侵入行動が黒皮症の発生に強く関与していることが示唆された。また、本種の若芽に対する侵入は比較的深部にまで至っており、その深さは約 1 mm だった。侵入部位の透過電子顕微鏡観察では宿主細胞の消失や崩壊が観察され、本種が植物体内で分泌物を放出している可能性も示唆された。これらの知見は、これまでのレンコンネモグリセンチュウの研究では全く明らかになっておらず、本研究の中でも最も重要な成果であると言える。また、そもそも植物寄生性線虫の植物体への侵入や寄生、摂食等の行動等を走査電子顕微鏡で観察した事例は多くなく、特にネコブセンチュウ類 (Wergin and Orion 1981, Miyashita et al. 2014, 一柳ら 2016) 以外の報告例ほとんど見られない。こうした側面からも、本研究で得られた知見は極めて重要なものであると考えられる。

また、第Ⅲ章では、細根、肥大塊茎、若芽というレンコンの各部位に対する感染機構を解明することで、黒皮症の発生メカニズムの一端が明らかになった。ここでは、第 2 3 図および第 2 4 図を用い、この点について考察を行いたい。まず、本研究での感染細根の観察結果や細根からの分離頭数が他の部位と比較して特異的で多いという事実(植松 未発表)などから、レンコンネモグリセンチュウにとって最も好適な寄生部位が細根であることに疑いの余地は無く、本種は生活史の大部分を細根への寄生に依存していると考えられる。

一方で、レンコンの栽培圃場では、収穫作業などの物理的な作用によって細根内のレン

コンネモグリセンチュウが受動的に土壤中に放出されることや終齢幼虫あるいは成虫が新たな寄主を求めて能動的に土壤中に移動することなどは頻繁に起こっていると考えられる。実際に、季節による量的変動はあるものの、黒皮症発生圃場の土壤中からは常時多数の線虫が分離される(植松 未発表)。このようにして土壤中に移動した線虫は、新たな寄主を探索し、宿主に向かって遊走する。

本研究において、レンコンネモグリセンチュウは肥大塊茎でなく、若芽に対して積極的な侵入行動を見せたことから、春季に行われる種レンコンの定植以後の若芽の伸長時期(概ね4月下旬頃~7月下旬頃)に本種が若芽に対して侵入、加害し、多数の侵入孔が形成され、侵入を受けた細胞層は変形、崩壊すると考えられる(第23図)。この際の侵入の深度は、接種圧が高かった人工接種実験では約1 mmだったが、これと比較して低密度の自然条件下ではかなり浅いと考えられる。このことは、野外圃場で採集した肥大塊茎の黒皮症発生部位の黒褐色化が表皮からわずか7~15細胞層に留まっていたことから裏付けられる。また、黒皮症の発生した肥大塊茎から本種虫体が全く確認されないことから、侵入に成功した個体が長期間にわたって塊茎内を穿孔する可能性は極めて低く、短期間で離脱するものと考えられる。

人工接種実験の結果などから、レンコンネモグリセンチュウ侵入時の侵入孔は数百 μm であると考えられるが、収穫期に観察される肥大塊茎の黒皮症の病斑は数 mm である。これは、侵入以降の若芽の伸長や肥大に伴い、本種によって形成された侵入孔が拡大した結果である。また、レンコンの栽培圃場では通年を湛水状態で管理するために、土壌は強い還元状態にある(第24図)。このため、土壌中の鉄はイオンの形(Fe^{2+})で存在していると考えられる。他方、レンコンネモグリセンチュウによって形成された侵入孔からは、植物体中の酸素(O_2)や過酸化水素(H_2O_2)などの活性酸素群が放出される。これらが土壌中の鉄イオンと時間をかけて反応、結合し、侵入孔には酸化鉄が沈着すると考えられる。本研究の結果のみでは、この鉄化合物の特定は困難であるが、エネルギー分散型X線分析

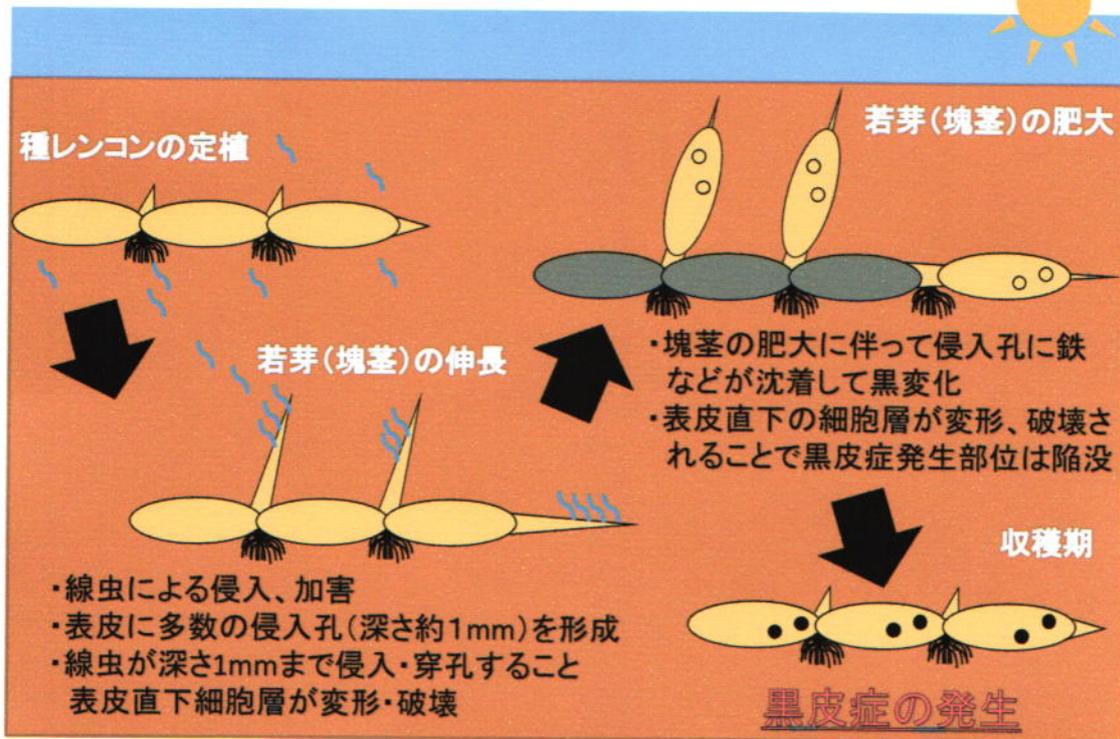
装置による解析では黒皮症の発生部位に鉄の沈着が認められている。このような過程を経ることで、収穫期には黒皮症が顕在化すると考えられ、本研究によって被害の発生メカニズムの一部が明らかになった。これらの仮説を実証するためには、若芽に対して人工的にレンコンネモグリセンチュウによる侵入孔を形成し、その生育や鉄の沈着などを経時的に観察する必要がある。しかしながら、レンコンを肥大塊茎へと生育させるには大面積が必要であり、また、室内試験で非常に小さな侵入孔を経時的に観察することは現実的ではない。こうしたことから、被害発生メカニズムの実証には、被害発生が認められる圃場で経時的に塊茎を採集し、侵入孔の変化を観察するという地道な調査を行うことが必要であるが、これらは今後の課題としたい。一方で、被害発生の過程を明らかにしたことで、本種の新たな防除技術が考えられる。すなわち、土壤中の線虫は若芽の伸長時期に宿主の探索を行うため、同時期に本種の探索行動を攪乱するような物質（例えば、レンコンの抽出液など）を圃場内に散布することで、宿主への定位を防ぐことができると考えられる。これらの実用化には、行動阻害物質の選抜、効果の行動学的解析、*in vitro* および小規模土壌内での効果の確認、圃場レベルでの防除効果の解明等が必要になるが、今後のさらなる研究に期待したい。

これらと対照的に、レンコンネモグリセンチュウの被害発生は、生産現場にとって喫緊の課題であったことから、本研究の第IV章では迅速かつ実用的な防除技術の開発を目指し、石灰窒素を利用した密度低減技術について検討を行った。石灰窒素は、野菜類の線虫類に対して農薬登録を持っていることから、生産現場での即時の利用ができるほか、本種の代替餌に成り得る植物残渣の腐熟促進を狙うことも可能である。そこで、防除技術の開発に向けての第一段階として、まずはポット試験においてその効果を確認した結果、石灰窒素の土壌混和はレンコンネモグリセンチュウに対して高い密度低減効果を持つことが明らかになった。さらに、圃場レベルでの実用化に向けては、石灰窒素の土壌混和に加え、乾田化(休作)、除草を組み合わせた総合的な防除体系の効果を現地圃場で実証した。その結果、

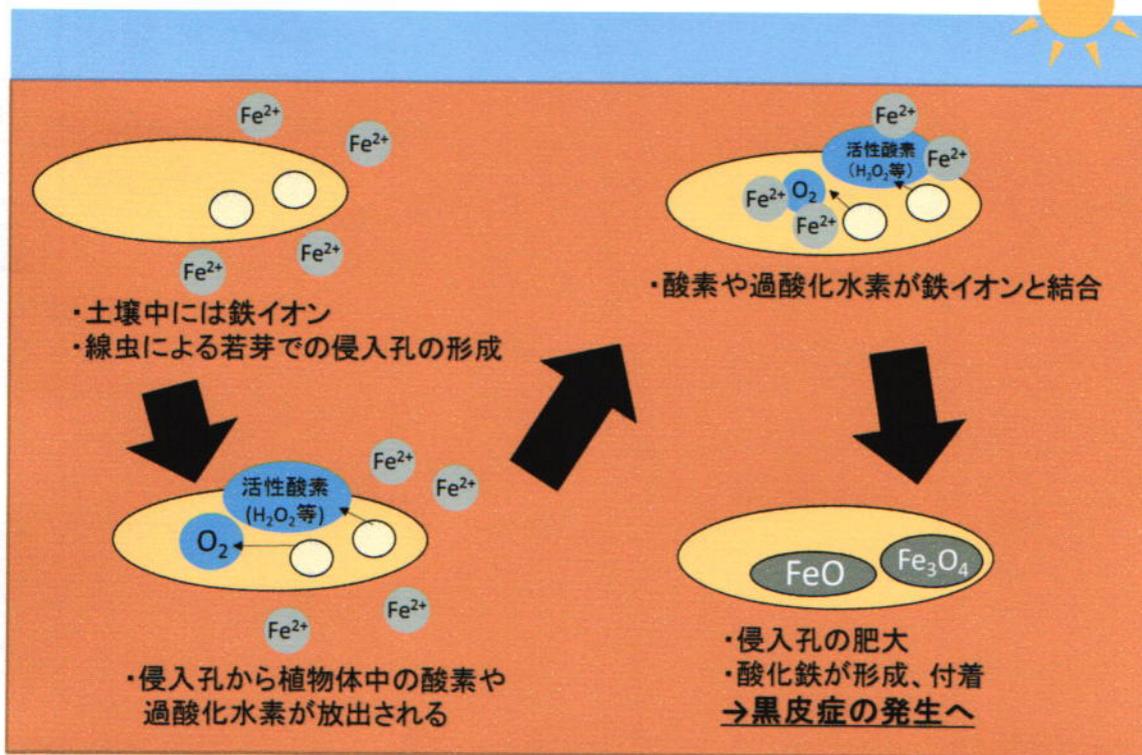
実証圃場では線虫密度が試験開始前の 2.2%~12.5%にまで低下し、高い密度低減効果が確認された。今回の圃場試験では、3 つの技術を組み合わせているために、どの技術が密度低減に関与しているかは判然としない部分も多い。しかしながら、乾田化および除草のみを行った期間（石灰窒素施用前）においても、密度低減が見られていることから、乾田化や除草については効果が高かったと推察される。なお、これらの個別技術の防除効果については、ポット試験等でさらに検討する余地がある。また、石灰窒素についても、ポット試験の結果から密度低減効果は高く、本試験においても密度低減に関与したと推察される。これまで、レンコネモグリセンチュウが発生した場合、徳島県などで実施されている太陽熱土壤消毒(徳島県水産総合技術支援センター 2015)以外に本圃での対策が無かったが、太陽熱土壤消毒には多大な労力とコストが必要なため、石川県での実施には困難であった。一方、本研究で開発した石灰窒素等による本圃での総合的防除体系は、生産者が即時に取り組むことが可能であり、密度低減や地域からの根絶への道筋を大きく開いた。こうした側面から、今後、石川県内のみならず全国的な技術普及が求められるとともに、本研究が生産現場レベルでも重要な成果を残したと言える。

1996 年の日本国内におけるレンコン黒皮症の初報告(三平・永井 1996)および 2002 年のレンコネモグリセンチュウの初報告(水久保 2002)以降、本種による黒皮症被害の増加は後を絶たない。これには単に特定の産地内での発生増加だけでなく、日本全国の産地への被害の拡大も含まれる。植物寄生性線虫は土壤病害虫であるため、飛翔性の害虫種や風媒あるいは虫媒伝染する病原菌のように、能動的に分布域を拡大したとは考えにくく、土壤あるいは種レンコンの移動とともに被害が広がっていったと推察される。こうした背景から、今後も発生が増加していくことは否定できず、本種の被害はレンコン栽培において重要な問題になり続けていくと考えられる。本研究では、これらの問題を解決するため、本種の基礎的な発生生態の解明および応用的な防除技術の開発を行い、多くの研究成果を得た。このことを通じて、本研究は日本国内のレンコンの安定生産、生産者の所得安定に

大きく貢献した。一方で、ネコブセンチュウ類やシストセンチュウ類、ネグサレセンチュウ類などに代表される主要な植物寄生性線虫と比較して、レンコネモグリセンチュウに関する知見がまだまだ乏しいことも事実である。こうしたことから、レンコネモグリセンチュウへの対策については、本研究を持って初めてスタートラインに立ったと言えるだろう。本研究で得られた知見や開発された技術をさらにブラッシュアップするためには、研究の進展が極めて重要であり、今後のさらなる成果が期待される。



第23図 レンコン黒皮症の発生メカニズム



第24図 レンコンネモグリセンチュウ加害後の塊茎部の反応

VI 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました、石川県立大学生物資源環境学部 古賀博則教授に深謝の意を表するとともに御礼の言葉を申し上げます。

また、本論文をご精読いただきました、石川県立大学生物資源環境学部 村上賢治教授、高原浩之准教授に深謝致します。

本研究の透過電子顕微鏡観察を行うにあたり、試料の作製にご協力いただきました、元金沢医科大学 栗原孝行博士に心から感謝申し上げます。また、レンコネモグリセンチュウの発生生態の解明や防除技術の開発にあたり、現地圃場での調査にご協力いただきました、石川県農林総合研究センター農業試験場 八尾充睦主任研究員、藪哲男主任研究員（現在：石川県農林水産部生産流通課）、上垣陽平主任技師（現在：石川県農林水産部農業政策課）、卜部裕之技師、札木克則技師、田中友美研究嘱託員に心から感謝申し上げます。

本論文作成の機会を与えていただきました、石川県農林総合研究センター 島田義明所長に心から感謝致します。また、レンコネモグリセンチュウの形態的特徴およびその分離・同定法についてご指導いただいた、農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センターの水久保隆之博士（現在：丸和バイオケミカル株式会社）、本種の発生生態について有益なご助言をいただいた、茨城県農業総合センター園芸研究所の高木素紀主任研究員、久恒和雅研究嘱託員に心から感謝申し上げます。

最後に、研究を進めていく上で、ご助言やご協力をいただきました、石川県立大学生産科学科植物保護学研究室の皆様、植物生産基礎系の皆様、石川県農林総合研究センター農業試験場の皆様にお礼申し上げます。

VII 引用文献

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V. C., Caillaud, M. C., Coutinho, P. M., Dasilva, C., Luca, F. De, Deau, F., Esquibet, M., Flutre, T., Goldstone, J. V., Hamamouch, N., Hewezi, T., Aillon, O., Jubin, C., Leonetti, P., Magliano, M., Maier, T. R., Markov, G. V., McVeigh, P., Pesole, G., Poulain, J., Robinson-Rechavi, M., Sallet, E., Ségurens, B., Steinbach, D., Tytgat, T., Ugarte, E., Ghelder, C. Van, Veronico, P., Baum, T. J., Blaxter, M., Bleve-Zacheo, T., Davis, E. L., Ewbank, J. J., Favery, B., Grenier, E., Henrissat, B., Jones, J. T., Laudet, V., Maule, A. G., Quesneville, H., Rosso, M. N., Schiex, T., Smant, G., Weissenbach, J. and Wincker, P. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26:909-915.
- 荒城雅昭. 2014. 4. ラクトフェノール置換法. 水久保隆之・二井一禎編, 線虫学実験, 京都大学学術出版会, 京都, 192-193.
- Chong-bin, L. I. U. and Yiang-fan, Y. U. 2002. Scanning electron microscopy about the *Hirschmanniella* in *nelumbo nucifern* Gaertn. *Journal of Jinggangshan Normal College (Natural Sciences)* 23:22-24.
- Chong-bin, L. I. U. 2003. Study on the dynamic growth of *Hirschmanniella diversa* in field. *Journal of Jinggangshan Normal College (Natural Sciences)* 24:14-18.
- De Ley, I. T., 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* 9:405-429.
- 源馬琢磨・渋谷紀起. 1959. 山形県田川地方における水稻の根の皮層に寄生する線虫について. *山形農林学会報* 14:11-14.

- 後藤万紀・高木素紀・鹿島哲郎. 2011. レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* に対する有効薬剤のスクリーニング (講要). *Nematological Research* 41:52-53.
- 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. 山形農林学会報 26:43-49.
- 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(第2報): 両種の令期の区別と卵の発生について. 山形農林学会報 27:22-28.
- 久恒和雅・高木素紀・豊田剛己・鹿島哲郎. 2014. 茨城県のレンコン田におけるレンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* に対する太陽熱土壌消毒の防除効果 (講要). *Nematological Research* 44:55.
- 一柳友祐・宮下奈緒・藪哲男・古賀博則. 2016. イチジク根に寄生したサツマイモネコブセンチュウの卵のう形成の光学顕微鏡および走査電子顕微鏡観察. 北陸病害虫研究会報 65:15-20.
- 金沢市農産物ブランド協会. 発行年不明. 加賀レンコン: 加賀野菜 (知る). <http://www.kanazawa-kagayasai.com/kagayasai/renkon/> (参照:2017-2-12).
- 川島嘉内. 1963. *Hirschmannia oryzae* に関する研究 (II) 雑草に対する寄生性について. 日本病害虫研報 14:112-113.
- 川島嘉内. 1992. IV. 植物寄生性線虫—発生生態と加害性 イネネモグリセンチュウ. 線虫研究の歩み 日本線虫研究会創立 20 周年記念誌, 日本線虫学会, 159-163.
- 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.
- 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. 関東東山病害虫研報 43:261-263.
- 南川勝次・田中誠. 1958. 食用蓮に関する研究（第1報）栽培の来歴と品種の分化名並びにその分布. 佐賀県農試研報 2:17-25.
- 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. 園芸学会雑誌 28:241-256.
- Miyashita, N., Yabu, T., Kurihara, T. and Koga, H. 2014. The feeding behavior of adult root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) in rose balsam and tomato. Journal of Nematology 46:296-301.
- 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・ネモグリセンチュウ. 植物防疫 56:531-536.
- 水久保隆之. 2004. 各論2 ネグサレセンチュウ・ネモグリセンチュウ -*Pratylenchus* 属・*Hirschmanniella* 属-.植物防疫特別増刊号 (No.8) 線虫の見分け方, 日本植物防疫協会, 東京, 17-22.
- 水久保隆之・清水啓・相場聡・伊藤賢治・奈良部孝. 2004. サツマイモネコブセンチュウ防除に及ぼす市販線虫対抗植物の持続効果並びに対抗植物と線虫天敵細菌 *Pasteuria penetrans* との組み合わせ効果の検討. 中央農研研報 4:1-16.
- 水久保隆之. 2014. 第2章 分類・同定のための形態観察 1.2 土壌からの線虫抽出-ふるい分け法 (ウェットシービング法). 水久保隆之・二井一禎編, 線虫学実験, 京都大学学術出版会, 京都, 24-27.
- 水久保隆之. 2015. 日本の線虫防除研究と防除研究の動向 -日本線虫学会 20周年記念事業:線虫防除に関するアンケート (1999~2011年度) の集計-. Nematological Research 45:63-76.
- Mohandas, C., Rao, Y. S. and Sahu, S. C. 1981. Cultural control of rice root nematodes

(*Hirschmanniella* spp.) with *Sphenoclea zeylanica*. *Animal Sciences* 90: 373-376.

百田洋二・後藤昭. 1980. ジャワネコブセンチュウの各種作物に対する寄生性. 関東東山病害虫研報 27:165-166.

奈良部孝. 2017. 土壌線虫害～H28年の発生状況と防除対策～. 植物防疫年刊 2017, 日本植物防疫協会, 東京, 68-69.

西沢務・百田洋二. 1970. イネネモグリセンチュウ 2種の生態について (講要). 日本応用動物昆虫学会大会講演要旨集 14:46.

農林水産総合技術支援センター. 2015. レンコン田での太陽熱消毒マニュアル.

http://www.pref.tokushima.jp/shien/naruto_aizumi/docs/2015090100200/files/taiyou.pdf

農林水産省大臣官房統計部. 2016. 平成 27 年産指定野菜 (秋冬野菜等) 及び指定野菜に準ずる野菜の作付面積、収穫量及び出荷量.

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/attach/pdf/index-1.pdf

Popeijus, H., Overmars, H., Jones, J., Blok, V., Goverse, A., Helder, J., Schots, A., Bakker, J. and Smant, G. 2000. Enzymology: degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature* 406:36-37.

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

Rinaudo, A. P. et G. 1988. Etude des interactions entre *Sesbania rostrate*, *Hirschmanniella oryzae* et les rendements du riz. *Revue Nematol.* 11:83-87.

佐野善一. 1990. 対抗植物による線虫防除. 植物防疫 44:531-534.

Sher, S.A. 1968. Revision of the genus *Hirschmanniella* Luc & Goodey, 1963 (Nematoda: Tylenchoidea). *Nematologica* 14:243-275.

Shinya, R., Morisaka, H., Kikuchi, T., Takeuchi, Y., Ueda, M. and Futai, K. 2013. Secretome

- analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals the tangled roots of parasitism and its potential for molecular mimicry. 2013. PLoS ONE 8 (6):e67377.
- Siddiqi, M. R. 2000. Tylenchida parasites of plant and insects, 2nd edition. Wallingford, UK, CAB International.
- Smant, G., Stokkermans, J. P., Yan, Y., De Boer, J. M. de, Baum, T. J., Wang, X., Hussey, R. S., Gommers, F. J., Henrissat, B., Davis, E. L., Helder, J., Schots, A. and Bakker, J. 1998. Endogenous cellulases in animals: Isolation of β -1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. Proceedings of the National Academy of Sciences 95:4906-4911.
- 高木素紀・後藤万紀・鹿島哲郎. 2011. レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* の圃場周辺雑草及び水田作物への寄生について (講要) . Nematological Research 41:53.
- 高木素紀・後藤万紀・齋藤望奈・田村克明・川島誠蔵・宮本拓也・鹿島哲郎. 2012. 温湯処理によるレンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* の防除効果と温湯処理がレンコンの生育に及ぼす影響 (講要) . Nematological Research 42:43.
- 高木素紀・久恒和雅・後藤万紀・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 (講要) . Nematological Research 43:40.
- 高木素紀・久恒和雅・鹿島哲郎. 2015. レンコンネモグリセンチュウ *Hirschmanniella diversa* の耐乾燥性と乾燥を利用した防除の可能性について (講要) . Nematological Research 45:128.
- 高木素紀・後藤万紀・久恒和雅・鹿島哲郎. 2016. 茨城県のアス田内部および周縁部における雑草や野良生えアス *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. 関東東山病虫害研報 63:98-101.

- 高橋兼一・嶋崎豊. 1986. サツマイモネコブセンチュウに対する高濃度 D-D および石灰窒素の防除効果. 関東東山病害虫研報 33:231-232.
- 高井啓・西和文・田口義広・渡辺秀樹・勝山直樹・窪田昌春. 2003. キュウリ栽培施設における熱水および土壌還元消毒の効果と土壌 pH, EC, およびキュウリの生育に及ぼす影響. 関西病害虫研報 45:99-100.
- 近岡一郎・片木尚寿. 1964. ダイコンのネグサレセンチュウの季節的消長ならびに防除効果. 関東東山病害虫研報 11:103-104.
- 近岡一郎. 1979. キタネグサレセンチュウ(*Pratylenchus penetrans*)の寄主植物. 日本線虫研究会誌 9:49-53.
- 鳥越博明. 2008. サトイモを加害するミナミネグサレセンチュウの発生生態と防除に関する研究. 鹿児島県農業開発総合センター研究報告 耕種部門 2:53-159.
- 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. 北陸病害虫研究会報 64:15-18.
- 植松繁・藪哲男・八尾充睦・栗原孝行・古賀博則. 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. Nematological Research 46:印刷中.
- Van der Vecht, J. and Bergman, B. H. H. 1952. Studies on the nematode *Radopholus oryzae* (Van Breda de Haan) thorne and its influence on the growth of the rice plant. Pemberitaan Balai Besar Penyelidikan Pertanian Bogor, Indonesia No 131.
- 渡辺達三. 1994. ハスの観照の歴史的変遷について. 造園雑誌 57:19-24.
- Wergin, W. P. and Orion, D. 1981. Scanning electron microscope study of the root-knot nematode (*Meloidagyne incognita*) on tomato root. Journal of Nematology 13:358-367.
- Wyss, U. 1984. Ultrastructure of feeding sites of the cyst nematode *Heterodera schachtii* Schmidt in roots of susceptible and resistant *Raphanus sativus* L. var *oleiformis* Pers. Cultivars.

Physiological Plant Pathology 25:21-37.

Wyss, U. and Zunke, U. 1986. Observation on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue Nematol.* 9:153-165.

横尾多美男. 1948. 稻の心枯線蟲 (*Aphelenchoides oryzae* YOKOO n. sp.) に就いて. 日本植物病理学会報 13:40-43.

吉田睦敏・北村平次郎・小林義明. 1975. 静岡県に発生したネグサレセンチュウによるダイコンの被害とその防除. 関東東山病害虫研報 22:132.

Zunke, U. 1990. Observations on the invasion and endoparasitic behavior of the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology* 22:309-320.

VIII 摘要

ハスの根茎であるレンコンは、国内の根菜類を代表する重要品目である。しかしながら、近年全国のレンコン産地において、レンコンネモグリセンチュウによるレンコン黒皮症が発生し、深刻な被害が出ている。そこで、本研究ではレンコンネモグリセンチュウの生活環や植物体に対する感染機構などの発生生態を明らかにするとともに、石灰窒素の施用を中心としたレンコンネモグリセンチュウの密度低減技術の開発を目指した。

これまでに、レンコンネモグリセンチュウでは野外での発消長や繁殖時期などが明らかにされておらず、生態的な情報は極めて乏しかった。このため、植物体内での発生頭数や年齢構成、交尾率、雌の卵保有率を経時的に調査した結果、本種は3期あるいは4期幼虫、成虫体で越冬を行い、新世代の2期幼虫が6~9月頃に出現する年1化性の線虫種であることが明らかになった。また、本種の対策を取る上で寄主植物の範囲を明らかにし、被害拡大を防止することが重要であることから、レンコン栽培圃場およびその周囲に自生する雑草種で本種の寄生状況を調査した結果、4科11種の雑草種で寄生が認められ、寄主範囲は比較的広いと考えられた。

さらに、黒皮症の発生メカニズムを解明するため、レンコンネモグリセンチュウの植物体への感染機構および感染した植物種の形態変化などについて検討を行った。その結果、本種のレンコンでの主要な寄生部位は、節に伸長する細根の皮層組織の細胞内であることが明らかになった。一方、レンコン根茎への人工接種によって、黒皮症が発生する肥大塊茎では皮層組織への侵入は起こらないが、若芽では侵入が起こることを明らかにした。さらに、本種は若芽の皮層組織の約1mmの深さまで侵入したが、それ以上の深さには侵入しなかった。この結果は、黒皮症の発症部位の深さとよく一致していた。また、黒皮症発症部位の電子顕微鏡観察やXマイクロアナライザでの元素分析によって、発症部位の微細構造の変化や鉄の沈着が生じていることなどを解明し、これらのことから黒皮症の発生メカニズムについて新たな提案を行った。

一方、生産現場からは迅速かつ実用的な防除技術の開発が望まれていたことから、野菜類の線虫類に対して農薬登録を持ち、即時利用可能な石灰窒素を用いた防除技術について検討を行った。石灰窒素はシアナミドを殺線虫成分として有しており、閉鎖系のポット試験で高い殺線虫効果が確認された。また、開放系である実際の圃場では、乾田化、寄主植物の除草などと石灰窒素の施用を組み合わせた総合的な対策によって、線虫密度の低減が確認され、生産現場で実施可能な防除体系として、非常に有効であると考えられた。

以上のように、本研究はこれまで未解明であったレンコンネモグリセンチュウの発生生態を明らかにし、防除技術を確立することでレンコンの安定生産、品質向上に寄与した。本種による黒皮症の被害は、現在も拡大の一途を辿っており、今後、本研究の成果が広く活用されることが期待される。一方で、ネコブセンチュウ類などの主要な植物寄生性線虫と比較して、本種に関する知見がまだまだ乏しいことも事実であり、さらなる研究の進展が望まれる。