

BULLETIN
OF
THE HIROSHIMA PREFECTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH CENTER

SEPTEMBER 2023

広島県立総合技術研究所 農業技術センター研究報告

イネシンガレセンチュウの個体群動態と防除に関する研究

第 97 号
令和 5 年 9 月

広島県立総合技術研究所
農業技術センター
(広島県東広島市八本松町原)

【東京大学審査学位論文】

イネシンガレセンチュウの個体群動態と防除に関する研究

キーワード:分離法, イネシンガレセンチュウ, 個体群動態, 集中分布

星野 滋

- 2023 -

目 次

第1章 はじめに	1
第2章 イネ種子からイネシガラレセンチュウを分離する方法	
2.1. 種子1粒内のイネシガラレセンチュウ数の調査法	6
2.2. 大量の種子内のイネシガラレセンチュウ数の調査法	7
第3章 水田におけるイネシガラレセンチュウの個体数変動	
3.1. 広島県のほたるいもち発生の年次的変化	14
3.2. 1圃場のほたるいもち発生の水田間の違いとその要因	14
3.3. 水田, イネ株, 穂という空間スケールにおけるイネシガラレセンチュウの空間分布と それに基づく個体群密度調査法 (多段抽出法)	21
3.4. 1圃場のイネシガラレセンチュウ個体群の年次変動	30
第4章 イネ種子内のイネシガラレセンチュウの生態	
4.1. イネ穎花に侵入したイネシガラレセンチュウと種子の生長・成熟	40
4.2. 温度と時間がイネ種子内のイネシガラレセンチュウの生存に及ぼす影響	44
4.3. イネ種子内のイネシガラレセンチュウ密度と性比の関係	48
4.4. イネ種子におけるイネシガラレセンチュウの分布パターンと死亡率	54
第5章 イネシガラレセンチュウの分散	
5.1. 水田におけるイネシガラレセンチュウの分散と繁殖の間のトレードオフ	62
5.2. 隔離されたイネにおけるイネシガラレセンチュウの分散と繁殖の間のトレードオフ	73
5.3. 育苗箱内分散に及ぼす種子内のイネシガラレセンチュウ密度の影響	84
5.4. イネシガラレセンチュウの密度依存的な定着と繁殖	87
第6章 イネシガラレセンチュウの防除	
6.1. 種子の水浸漬と風乾が種子内のイネシガラレセンチュウの生存に及ぼす影響	99
6.2. 種子の鉄コーティング処理がイネシガラレセンチュウの生存に及ぼす影響	104
6.3. 広島県の栽培品種におけるイネシガラレセンチュウの増殖	107
第7章 総合考察	111
要旨	115
謝辞	120
引用文献	121

第1章 はじめに

イネシンガレセンチュウ *Aphelenchoides besseyi* Christie はイネ *Oryza sativa* L. にイネ心枯線虫病を引き起こす。イネシンガレセンチュウが感染すると、イネの分けつ末期から穂ばらみ期ごろに葉の先端の白変という病徴を示す(吉井, 1965)。上位葉の場合、その先端が淡黄褐色～淡黄白色になり、油脂状の光沢のある病斑になる。この症状は蛍に似ているのでほたるいもち(写真1)と呼ばれている(梶原, 2016)。

我が国におけるイネ心枯線虫病は、角田(1915)によって熊本県で初めて発見され、「黒靱病」と呼ばれた。イタリアンミレット *Setaria italica* var. *maxima* でも同様の病害が九州で発見された(中野, 1916)。吉井(1946)は本病をイネ心枯線虫病と呼び、感染経路や防除手段として種子処理を研究した。横尾(1948)は、病害線虫を新種として *Aphelenchoides oryzae* Yokoo と記載し、細部の形態を記載した。Allen(1952)はアメリカと日本のイネを加害する線虫の同定を行い、Christie(1942)によって記載されたイチゴの線虫として同定され、*Aphelenchoides besseyi* と名付けた。

Yoshii & Yamamoto(1950a)、後藤・深津(1952, 1956)、深野・横山(1951)はこの病気の様々な病態を研究した。なお、初期の報告では病名をスイトウセンチュウ(田村・気賀沢, 1956, 1959)や病名を線虫心枯病(吉井, 1946)としているものもある。

イネ心枯線虫病は日本以外にも世界の水稻作地帯に広く発生している。例えば、アジアではバングラディシュ、インド、インドネシア、フィリピン、スリランカに(Feakin, 1970)、ヨーロッパではイタリア、ハンガリー、ソビエト連邦に(Vuong, 1969; Feakin, 1970; Fournier & Williams, 1975)、アフリカでは1964年以降、カメルーン、ケニア、マダガスカル、ナイジェリア、セネガル、シエラレオネを含む20か国に(Barat et al. 1969; Vuong 1969)、オセアニアではオーストラリアに(Feakin, 1970)、北米中米ではアメリカ、メキシコ、キューバ、エルサルバドルに発生している(Todd & Atkins 1958; Feakin, 1970)。

イネシンガレセンチュウに感染したイネはわい化し、栄養不足に陥り、穂は小さくなり、穂の長さや種子数が減少する(Ou, 1985)。さらに、玄米の張りを悪くして屑米を多くする、一部の玄米の腹側に縦または横に割れ目が入り、その周縁部が黒変し、黒点米となる(梶原, 2016)。

アメリカで Todd & Atkins(1958)は健全と罹病イネの穂を比較し、穂の平均長は21cmから15cmに、穂の重量は2.5gから0.7gに、穂あたり種子数は98から32に減少し、不稔の花の割合が16%から37%に増加することを示した。日本では、イネ心枯線虫病の発生した水田では収量が10%~30%減少した(Yoshii & Yamamoto, 1950a)。収量に及ぼす本病の影響はイネの品種間で異なり、減収割合は14.5%~46.7%の間でばらついた(西澤・山本, 1951)。水田の全てのイネが加害されると仮定すると、病害のない場合より、感受性品種‘銀中’では収量の減少割合が60%、抵抗性品種‘農林43号’では20%になると予測された(田村・気賀沢, 1959)。Todd & Atkins(1958)は収量の減少割合を調べ、1954年には、感受性品種の場合17%~54%、抵抗性品種の場合0%~24%、1955年と1956年には、感受性品種の場合、最大の減収割合は7%であり、年によって減収割合は異なることを示した。台湾ではHuang(1959, 1962)が穂あたり種子数が20%~55%減少すると報告している。ソ連においてKononova & Vinnichuk(1959)は1948年に減収割合が26%~61%になることを明らかにした。Tikhonava(1966)

は減収割合が41%~71%であると述べた。Vuong & Rudriguez (1970) はマダガスカルでは収量の減少割合は34%になると推定した。

イネ心枯線虫病に感染したイネの葉は通常よりも濃い緑になり、感染イネでは高位の節の新葉（葉の先端を除く）の緑色が濃くなることもある（Ou, 1985）。興味深いことに、本病に感染している全てのイネがほたるいもちを示すわけではない。Yoshii & Yamamoto (1950a) は感染したイネの3/4は病徴を示さないと報告している。Atkins & Todd (1959) は抵抗性品種では、イネシンガレセンチュウが寄生していても、茎や葉はめったに病徴を示さないと述べている。吉井 (1965) はこの病徴の程度によって、被害の多少や籾内のイネシンガレセンチュウの多少を論じてはならないと主張している。

イネシンガレセンチュウの形態は、水久保 (2006) によると、雌成虫では体長0.57mm~0.84mm（平均0.68mm）、a 値^{注1)} 39-53（平均47.7）、b 値^{注2)} 9.2~13.1（平均11.5）、c 値^{注3)} 13.8~20.4（平均17.7）、V 値^{注4)} 68.7~73.6（平均71.2）である（写真2）。雄成虫では、体長0.53mm~0.61mm（平均0.57mm）、a 値40.7-46.9（平均44.4）、b 値8.9~10.7（平均9.52）、c 値16~20（平均18）、T 値^{注5)} 28~52（平均40.6）である。唇部形態は唇部側線が張出し、それに続く食道部の体幅より広く、そのため、唇部は食道部からくびれる。口針は一般的に大変細く、口針基部の口針節球の発達は微小である。側帯の幅は体幅の1/4程度である。尾端の形状は細く突き出した突起上に3~4本の刺を生じる。雄の交接刺はバラの刺に似た形で頑丈な構造をしている。

日本では、水稻は秋に収穫され、種子は低温で貯蔵される。そして、翌春、浸種・育苗されて、本田に移植される。線虫は水稻の外部寄生者である。線虫は穂に入り、25℃下で約10日間の短い世代時間で増殖し、種子内では乾燥状態の成虫または4期幼虫で存在している（Huang & Huang, 1972; Huang et al., 1972; Huang & Chiang, 1975; Nandakumar et al., 1975; Hollis & Keoboonrueng, 1984; 千代西尾・中澤, 1988）。

イネシンガレセンチュウは、成虫または幼虫の発育段階で、感染した種子内で長期間生存する。その場合、脱水された休眠状態の生存（耐無水生存 anhydrobiosis）を示す（Huang & Huang, 1972; Huang et al., 1972; Huang & Chiang, 1975; Nandakumar et al., 1975; Hollis & Keoboonrueng, 1984）。Cralley (1949) は収穫から8か月間イネ種子内で病原イネシンガレセンチュウが生存していることを見出した。Yoshii & Yamamoto (1950b) は3年間冷蔵した玄米の中で病原イネシンガレセンチュウが生存することを明らかにした。Todd (1957) や Todd & Atkins (1958) は、イネシンガレセンチュウが23か24か月乾燥種子内で生存することを示したが、その時にはイネは発芽力を完全に失っていた。

イネ種子が水中に浸漬されると、種子中のイネシンガレセンチュウは水を吸収して活動を開始する。そのような個体は種子外に泳ぎ出て、イネの幼苗の葉間や葉と葉鞘の間に入り込む。Hashioka (1964) によれば、播種10日後以内にイネシンガレセンチュウはイネ苗に侵入するという。Yoshii & Yamamoto (1950a, b) によれば、イネシンガレセンチュウが土壌からイネ苗に侵入することは圃場ではめったにないという。Cralley (1952) は、イネシンガレセンチュウはイネ種子内で越冬し、土壌で越冬することはないと述べている。また、イネシンガレセンチュウは野外に置かれた籾や稲藁で越冬することはないと報告されている（深野, 1962）。したがって、イネシンガレセンチュウは種子伝播をして宿主に感染すると考えられる。その他の可能性として、苗の本田移植後に、水田内の水を通して、イネシンガレセンチュウが感染苗から未感染苗に移動するかもしれない。

Yoshii & Yamamoto (1950b) は、イネシガラセンチュウはイネの成長段階初期に若い葉に包まれた内側において、穂の形成後に穂に入り、そして、種子が成熟する時、穎の中にいることを見出した。脱穀後、残存している空の小穂を除いて、それ以外の部位の稲藁ではイネシガラセンチュウは見つけかいていない (Yoshii & Yamamoto, 1950b)。Todd (1952) は染色技術を使って、全てのイネシガラセンチュウの個体は植物組織の外部にいることを示した。Todd & Atkins (1958) は株の内部表面、いくつかの籾、若い芽や花の周り、葉鞘からイネシガラセンチュウの洗い出しを行い、イネシガラセンチュウがいることを確認したが、イネの組織内から発見することはできなかった。

後藤・深津 (1952) はイネの生長段階とイネシガラセンチュウのイネ体表上の分布の関係を調べ、発芽した種子内に1~7頭のイネシガラセンチュウが残存すること、育苗期には、植物体でイネシガラセンチュウを見つけることはできないこと、分けつ期にはイネシガラセンチュウは最高位の葉鞘の内側かあるいは未だ抽出しない捲葉の内部空所に生息すること、幼穂形成期には、半抽出心葉の葉舌部直上 (恐らく抽出する葉の生長部) にイネシガラセンチュウが多いが、心葉の成長とともにイネシガラセンチュウの個体数は増加し、より大きな若い葉で見つかるようになること、幼穂を水に浸漬すると、多数のイネシガラセンチュウが穎から遊ぎ出すのに対して、同枝梗部や止葉の葉鞘裏面には少数のイネシガラセンチュウしかいないことを明らかにした。これらの結果から後藤・深津 (1952) は、イネシガラセンチュウは穂に誘引されると考察した。さらに、穂ばらみ期には、イネシガラセンチュウは穂以外にはいなくなった (後藤・深津, 1952)。穂の中でもイネシガラセンチュウは中央部に多く、穂の先端部や基部には少なかった。出穂直後に、大部分のイネシガラセンチュウは穂と共に葉鞘の外に出るが、止葉葉鞘の上部になお数頭のイネシガラセンチュウが残る。穂の完熟後、穂以外にはイネシガラセンチュウはおらず (後藤・深津, 1952)。穎花の中にいることを観察した (後藤・深津, 1952)。籾の充実度との関係では、イネシガラセンチュウ数は精籾に多く、しいなには少ない (吉井, 1965)。

植物体外にいるイネシガラセンチュウは、外穎と内穎の頂点にある間隙を通して、開花前に穎花に侵入する (Huang & Huang, 1972)。そして、開花の間にもイネシガラセンチュウの穎花侵入は続く (Huang & Huang, 1972)。穎花の中のイネシガラセンチュウは、子房、おしべ、鱗皮、胚を積極的に摂食し、開花前にイネシガラセンチュウ数は大きく増加すると考えられる。深野 (1960) は籾の外側のイネシガラセンチュウ数は出穂後減少し、30日後には見つからなくなると報告している。籾の含水率が18%から15%に低下すると、2期幼虫を除いて全イネシガラセンチュウはコイル状になって脱水された休眠状態 (以下、無水状態と呼ぶ) になる (Tikhonova, 1966)。Tikhonova (1966) によれば、無水状態のイネシガラセンチュウは茎や乾いた根の周りで見つけることができる。無水状態になるまでに、イネシガラセンチュウの多糖類は加水分解されて、単糖のみになる (Kostyuk, 1967)。

西澤・山本 (1951)、西澤 (1953)、西澤ら (1953)、後藤・深津 (1956)、および Atkins & Todd (1959) は、イネ心枯線虫病に対する抵抗性品種を選抜した。西澤 (1953) は、‘農林8号’、‘東山36号’、‘農林37号’、‘農林38号’、‘農林58号’、‘南海3号’、‘朝日’、‘旭1号’、‘鹿児島旭1号’の9品種は病徴が少ないと述べている。彼は、調査した42品種のうち、‘農林6号’、‘農林37号’、‘農林39号’、‘農林糯5号’、‘西海37号’、‘中生銀坊主’は発病が少なく、24品種は中程度の感受性、9品種は高い感受性であると判定した。どの品種の抵抗性も‘朝日’から遺伝した。年間の病徴のばらつきは、

抵抗性品種より感受性品種が大きい。後藤・深津（1956）は罹病種子の籾殻を用いてイネの20品種にイネシンガレセンチュウを接種した。その結果、3年にわたって‘東山38号’は病徴を示さず、‘農林8号’、‘農林糯5号’、‘ハツシモ’は軽度の病徴を示し、‘旭1号’、‘愛知旭’、‘畿内雄町2号’は激しい病徴を示すことを明らかにした。

後藤・深津（1956）はイネシンガレセンチュウがイネ幼苗に対する正の走性を示すこと、走性の強さは品種間で異なることを見出し、抵抗性品種ではイネシンガレセンチュウの増殖率が低いと報告した。オーキシンはイネシンガレセンチュウの移動や増殖に影響することが知られており、感受性品種ではオーキシン生成量が多いので、イネシンガレセンチュウの高い集合を説明できる（Feng et al., 2014）。

日本の茨城県以南では、2007年から2016年まで、ほたるいもちの発生が報告されており、その発生面積率は平均約0.5%（最大0.7%、最低0.2%）であった（農林水産省調査データから算出）。一方、心枯線虫病の防除面積率は、毎年約20%であった（農林水産省調査データから算出）。種子消毒の可否の判断基準がないため、予防的に種子消毒が行われていることも考えられる。これに対して、イネの主要な有害昆虫では要防除水準等の設定がなされ、予防散布回数の増加を抑制してきた。これは、これまでイネの有害昆虫の個体群生態学研究が行われてきた結果である。特に、イネウンカ類についての個体群生態学的研究は古くから行われ、水田における稲ウンカ・ヨコバイ類個体群の動態に関する研究（久野, 1968）、長距離移動性イネウンカ類の発生動態および水稲被害の解析（渡邊, 1994）などの優れた研究が多い。また、線虫に関する個体群生態学的研究では、マツノマダラカミキリの個体群動態とマツ材線虫病の伝搬に関する研究（富樫, 1989）、カラフトヒゲナガカミキリの個体群動態とニセマツノザイセンチュウの伝播に関する研究（軸丸, 1996）など松枯れに関する多くの研究がある。しかしながら、イネシンガレセンチュウとイネの関係を個体群生態学的に研究した例はこれまで少ない。台湾ではHuangらのグループが、台湾の個体群を使って、イネシンガレセンチュウの増殖率や性比、繁殖様式などを明らかにしており（Huang & Huang 1972a; Huang & Huang 1972b; Huang et al., 1974）、日本国内では深野（1962）のイネ線虫心枯病の生態および防除に関する研究があり、成熟モミにおけるイネシンガレセンチュウの寄生状況やモミの充実度による寄生線虫数の差異、雌雄比は明らかにしたが、イネシンガレセンチュウの空間分布、密度反応や分散などを明らかにするまでに至っていない。このため、イネシンガレセンチュウに対する総合的な害虫管理法は構築されていない。本論文はイネシンガレセンチュウの個体群動態およびイネシンガレセンチュウとイネの相互関係について研究した。これらの成果によって、イネシンガレセンチュウの総合的害虫管理法を提示する。

本論文は7章で構成されている。序論に続く第2章では、イネ種子からイネシンガレセンチュウを分離する新手法の作成と分離効率を記した。特に断らない限り、本研究のすべてを通じてこれらの手法を使った。第3章では広島県の被害発生実態や1地域における被害発生の実態、年次変動や空間分布を明らかにし、現在のイネシンガレセンチュウの発生実態を明らかにした。第4章では、イネ種子内のイネシンガレセンチュウの生態を明らかにした。第5章では、育苗箱や水田におけるイネシンガレセンチュウの分散とそれに及ぼす密度の影響を明らかにした。第6章ではイネシンガレセンチュウとイネの関係から新しい防除方法を確立するために、殺イネシンガレセンチュウ剤等の浸漬および乾燥の効果を調査した。また、現在、広島県で一般的に栽培されている水稲品種について、イネシンガレセンチュウの増殖や死亡等について比較を行った。第7章ではイネシンガレセンチュウとイネの関

係からイネシソガレセンチュウの総合的害虫管理法の防除の方向性について論じ、総括した。

- 注) 1) a 値 体長÷最大体幅
2) b 値 体長÷頭端（唇部前縁）から食道腸間弁までの距離
3) c 値 体長÷尾長
4) T 値 精巢全長の体長に対する百分率
5) V 値 頭端から陰門までの距離の体長に対する百分率



写真1 ほたるいもち症状

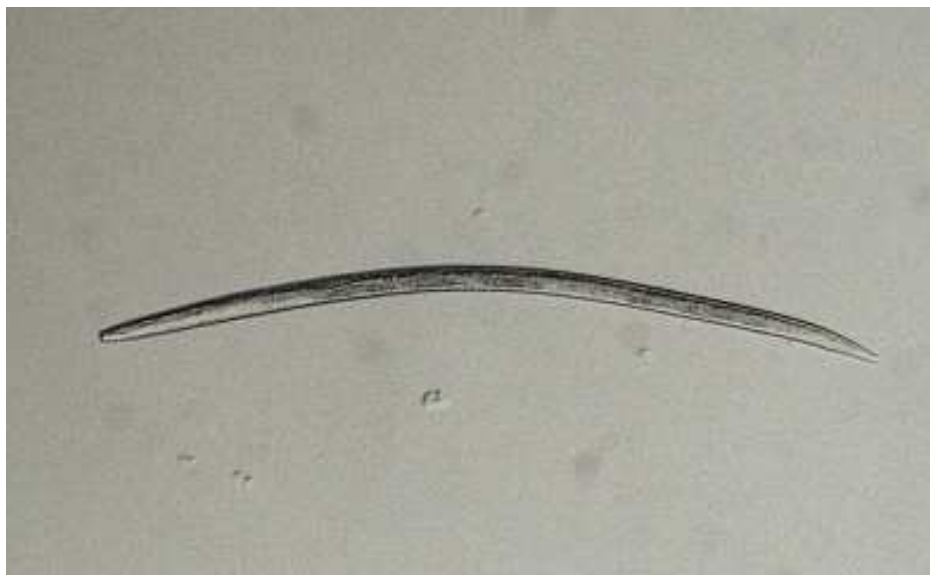


写真2 イネシソガレセンチュウ (*Aphelenchoides besseyi* Christie) 雌成虫

第2章 イネ種子からイネシンガレセンチュウを分離する方法

本研究では新しいイネシンガレセンチュウ（以下、線虫と称する）の分離方法を考案し、それを用いて個体群動態やイネとの相互関係を調べた。ここではその方法について述べる。

2.1. 種子1粒内のイネシンガレセンチュウ数の調査法

これまでの種子あたりの線虫数調査では、籾から穎を外した後にそれらを浅い水に沈め、游出した線虫を実体顕微鏡下で計数してきた(上林ら, 1974)。この方法は線虫を分離するために有効であるが、種子から穎をはずすため、労力がかかる。これに対してベルマン法は、種子を水に浸漬して、種子内の組織が吸水した後、種子から游出する線虫を分離する方法である。操作は簡単であるが、線虫が游出するまでに時間がかかる (Nandakumar et al., 1975)。線虫個体群の正確な量的評価はとても重要であるが、今まで、水稻種子1粒の線虫数を調べる方法は研究してこなかった。ここでは、1水稻種子の線虫を計数するための簡単な分離方法を確立した。その方法とベルマン法の抽出効率を比較した。

材料と方法

種子：ほたるいもち症状を呈していた線虫感染イネ‘ヒノヒカリ’の種子（以下、籾のことを種子と呼ぶ）を1998年9月24日と28日に広島県尾道市の3地域（木の庄西、浦崎、美ノ郷）で採集した。線虫分離のために使用するまでこれらの種子を5°Cで保存した。実験には十分に発育した乾燥種子を使った。

新しい分離法：各種子を小さな剪定ばさみを使って縦に2分し、プラスチック製のピペットチップ（長さ7cm, 先端1.0mm, 底部7.4mm）(QPS #111, translucent blue, Quality Scientific Plastics Petaluma, CA, USA)に入れた。6.5ml容の管瓶に25°Cの水5mlを入れ、切断した種子を入れたチップを1本ずつ垂直に立てた（図2.1）。線虫の分離効率を明らかにするため、2時間、4時間、8時間および24時間後に、水を入れた新しい菅ビンにチップを移した。分離された線虫はシラキース皿に移し、生死別に計数した。針で突いて動かない線虫を死亡と判断した。24時間後に種子を解剖して種子内に残る線虫を数えた。同時に生物顕微鏡下でピペットチップ内壁の線虫を計数した。繰り返しは2であった。

ベルマン法：50種子を個々に縦に切り、和紙（級17番 平和紙業、大阪、日本）を篩とする径9cmのベルマン漏斗に入れ、それらを水に浸漬した。24時間浸漬し、漏斗の底や漏斗の壁、イネ種子から分離された生存線虫および死亡線虫を計数した。繰り返しは2であった。線虫の分離は25°C暗条件で行った。この温度は浸漬した種子から線虫を分離するのに適した温度範囲の中にある（田村・気賀沢, 1957）。

統計解析：2方法間の分離効率を比較するために、Mann-Whitney 順位和検定（Mann, Henry B & Whitney, Donald R., 1947）を使用した。

結果と考察

新しく作成した線虫の分離法はベルマン法より分離効率は高かった（Mann-Whitney 順位和検定

U=12.0, $p<0.05$) (表 2.1)。分離効率の違いは、浸漬された種子から分離用容器の底まで線虫が移動する距離の違いなのかもしれない。ベルマン法の場合、線虫は紙の篩を通らなければならない。そのうえ、一部の線虫は漏斗の壁に残存している。ベルマン法で線虫の死亡率がより高くなった理由は不明である。

Kondo & Ishibashi (1986) はティッシュペーパーを篩として用いたピペットチップによって、土壌と昆虫の糞の混合物から *Steinernema* 属の線虫の分離を行った。しかしながら、ティッシュペーパーの線虫の分離効率は検討していない。新しい分離法には篩を使わなかった。

新しい分離法を用いて、全ての生存している線虫が 8 時間以内に分離された (表 2.1)。また、全ての線虫の約 97% が種子サンプル (A, B1, C1, D1) から最初の 2 時間で分離された。死亡した線虫の多くは玄米に残っていた。しかし、死亡した線虫の約 12% もまた分離された。以上の内容は Hoshino & Togashi (1999) として公表した。高い線虫分離効率や分離装置の簡単な装置から、新しい方法は線虫個体群研究や線虫に対するイネ品種の感受性検定に適用されるだろう。今後、本論文では、新しい方法を Hoshino & Togashi 法と呼ぶこととする。

2.2. 大量の種子内のイネシンガレセンチュウ数の調査法

2.1 節で上述した Hoshino & Togashi 法は 25°C, 4 時間で、全ての生存した線虫を分離することができるため、とても効率が良い。しかしながら、水稻種子間で線虫は集中分布を示すため (深野, 1962; Togashi & Hoshino, 2001, 2003; Yoshii & Yamamoto, 1950b), 線虫が圃場で極く低密度であったとき、一定の精度で密度推定をするためには、極めて多数の種子を調査する必要がある。したがって、Hoshino & Togashi 法では線虫密度が低いとき、多くの労力と時間がかかる。そこで、多数のイネ種子から同時に線虫の分離を行う簡単な方法を開発した。

材料と方法

種子：線虫の感染した種子を得るために、1999 年 9 月 24 日、広島県広島市安芸区中野の 7 月に全株でほたるいもち症状がみられた水田で、イネ ‘ヒノヒカリ’ の 6 株を採集した。6 株の 100 粒の種子を使い、Hoshino & Togashi 法によって推定された種子あたりの線虫密度は、生存虫 2.8 頭、死亡虫 0.5 頭であった。一方、非感染種子を得るために、広島県東広島市八本松町の 2000 年 7 月の調査によってほたるいもちの発生がなかった 1 水田で、2000 年 9 月 27 日、イネ 6 株をランダムに収穫した。6 株から得られた 100 粒の種子を使い、Hoshino & Togashi 法で種子あたりの線虫数を調べたところ、どの種子からも線虫は得られなかった。収穫後、6 株のイネは 33 日間、雨よけハウスで乾燥し、全ての種子を採集し、実験に使用するまで暗条件 5°C で保存した。

大量分離法：線虫の大量分離法の実験効率を Hoshino & Togashi 法のそれと比較するために、ほたるいもち発生水田の種子と無発生水田由来の種子を 7:3 の比率で混ぜ合わせた。例えば、前者の種子 14 種子と後者の 6 種子を混ぜ合わせ、20 種子を 1 バッチとした (平均種子重量 \pm S.D. = 0.42 ± 0.03 g)。

大量分離のために混合した種子 20, 50, 100, 150 粒のバッチの各種子を小型の剪定鋏で縦に切断し、ステンレス製金網 (直径 8cm, 深さ 1.4cm, 網目 1.5mm の 44 メッシュ) に置いた (図 2.2)。1,000ml の

ビーカーに 350ml の蒸留水を入れて、そこにステンレス製金網を直径 0.9mm の針金で吊り下げ、種子を浸漬した。暗条件、 $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ の条件下で 4 時間おいた後、ビーカー内の水を 440 メッシュ (20 μm 目) の篩に通し、線虫を分離した (図 2.2)。

20 粒, 50 粒のバッチでは、線虫数が少なかったため、これらの線虫は直接シラキウス皿に移した。100 粒と 150 粒のバッチの場合、多数の線虫が分離されたため、メスフラスコに移して、水を加えて 25ml とし、1ml の線虫浮遊液を 5 回採り、生存線虫数と死亡線虫数を調査した。さらに、切断した種子を金網からシラキウス皿に移して水中で分解し、玄米の表面、内穎と外穎の内壁に残る線虫を計数した。大量分離は 20 粒, 50 粒, 100 粒, 150 粒の種子のバッチを使って、大量分離を 6 回繰り返した。針で突いて動かない線虫を死亡したと判断した。生存線虫の分離効率 = 分離された線虫数 / 種子から分離された線虫と種子に残った線虫の合計数 によって算出した。

Hoshino & Togashi 法を用いて 20 種子を含むバッチ内の各種子から線虫を分離して、その効率を調査した。種子あたりの線虫数を測定するため、この方法を 3 回繰り返した。

Hoshino & Togashi 法と本法で得られた線虫密度を比較するため、Kruskal-wallis 検定を使用した。

結果と考察

大量分離法を用いた場合、20 粒, 50 粒, 100 粒, 150 粒の種子の 4 種類のバッチ間で、種子あたりの分離した生存線虫数に有意な差はみられなかった ($H=7.001, p=0.072$) (表 2.2)。さらに、Hoshino & Togashi 法と大量分離法の間でも分離生存線虫数に有意な差はなかった ($H=7.696, p=0.103$) (表 2.2)。これは分離した死亡線虫数と全線虫数でも同様であった。

種子のバッチサイズに関係なく、大量分離法による生存線虫の分離効率はほぼあるいは完全に 100% であった ($H=4.153, p=0.245$) (表 2.3)。それらの値は Hoshino & Togashi 法の分離効率と差はなかった。大量分離法の死亡線虫の分離効率でも 4 つの種子量のバッチ間で有意な差はなかった。しかしながら、Hoshino & Togashi 法は大量分離法よりも死亡線虫の分離効率は低かった (表 2.3)。Hoshino & Togashi 法の分離効率が低かったのは種子内の死亡線虫が極めて少なかったこと (表 2.2) によって、起こったのかもしれない。大量分離法と Hoshino & Togashi 法の間で生存と死亡線虫を含む全ての線虫の分離効率に有意な違いはなかった。

Griesbach et al. (1999) はベントグラス *Agrostis tenuis* Sibth. とオーチャードグラス *Dactylis glomerata* L. の商業用芝種子をつぶし、水を混ぜることによって、種子伝播性植物寄生性線虫の *Anguina agrotis* (Steinbuch) Filipjev の高い分離効率を示した。彼らの分離効率は種子 5g あるいは 50g から回収に成功した場合の割合によって分離効率を示した。そのため、線虫の検出限界の線虫密度を示すことができなかった。一方、ここで提示した方法では、150 種子を使用して、分離効率 0.992 で、種子あたりの生存線虫 0.007 頭を検出できることを示した。実際、線虫密度が 0.007 頭であるとき、線虫の集中度に依存して水稻種子の必要なサンプルサイズは 150 粒より大きくなるだろう。なぜなら、線虫が種子間で集中分布を示すからである (深野, 1962; Togashi & Hoshino, 2001; Yoshii & Yamamoto, 1950b)。以上の内容は Hoshino & Togashi (2002) として発表した。

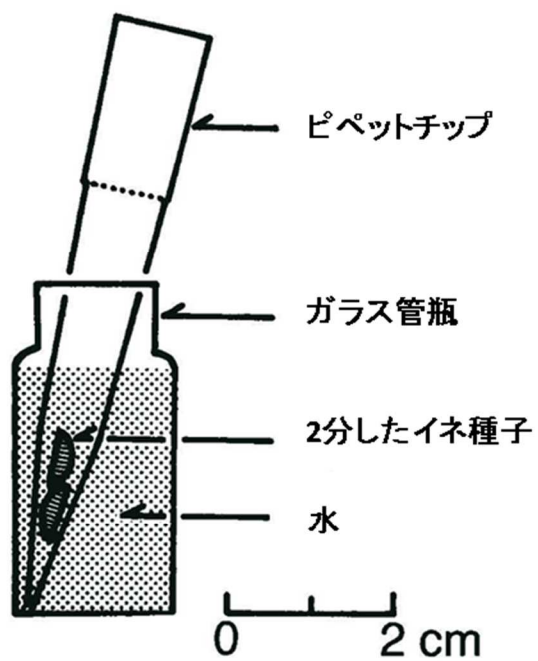


図2.1. イネ種子からイネシンガレセンチウを分離するための簡単な方法.

表2.1. イネ種子のイネシンガレセンチュウ感染レベルを測定するための分離方法の比較

調査 種子 数	分離または観察された生存線虫数(死亡線虫数)						ピペットま たはロー 壁上		分離 効率
	a	b	c	計	種子内	計			
サンプル	0-2時間	2-4時間	4-8時間	8-24時間	紙上	種子内	計		
1)種子から分離する方法									
サンプル A	67	22 (0) ^a	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	23 (2)	0.92
サンプル B1	50	31 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (15)	0 (0)	31 (17)	0.69
サンプル C1	50	28 (1)	1 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (21)	0 (0)	30 (22)	0.60
サンプル D1	50	43 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (4)	0 (0)	44 (6)	0.92
計	217	124 (3)	3 (2)	1 (0)	0 (0)	0 (42)	0 (0)	128 (47)	0.76
ベルマン法									
サンプル B2	50	- ^b	- (-)	- (-)	1 (0)	0 (1)	0 (1)	12 (38)	0.02
サンプル C2	50	- (-)	- (-)	- (-)	1 (0)	0 (36)	0 (0)	1 (36)	0.03
サンプル D2	50	- (-)	- (-)	- (-)	10 (1)	1 (20)	1 (0)	12 (21)	0.33
計	150	- (-)	- (-)	- (-)	12 (1)	12 (93)	1 (1)	25 (95)	0.11

^a 異なる英小文字は異なる水田から採集されたサンプルを示す。

^b ベルマン法に用いた紙の調査または種子の分解は分離開始の24時間後に行った。

^c 未測定

^d 未測定分離効率は、分離した線虫数/計で算出した

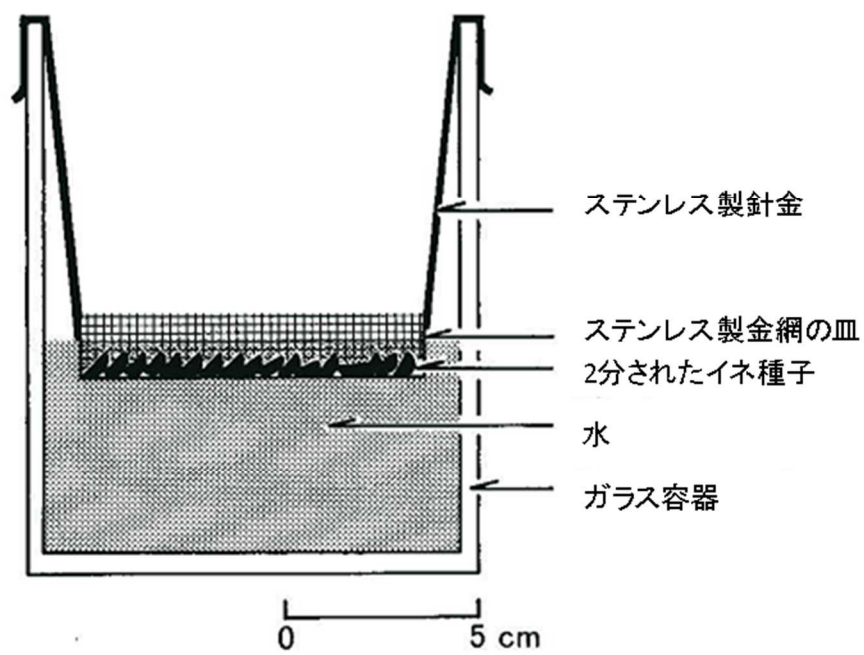


図 2.2. 大量のイネ種子からイネシンガレセンチュウを分離する装置(大量分離)

表2.2. 大量のイネ種子または1種子だけからイネシシガレセンチュウを分離した時の種子あたり生存個体数と死亡個体数の比較

方法	大量のイネ種子から分離				1種子から分離
	20	50	100	150	20
1回に供試した種子数	20	50	100	150	20
繰り返し数	6	6	6	6	3
種子から分離された線虫数					
生存	2.73 ± 0.34a	1.93 ± 0.66a	2.48 ± 0.87a	2.06 ± 0.54a	2.12 ± 0.52a
死亡	0.35 ± 0.20a	0.25 ± 0.05a	0.63 ± 0.48a	0.55 ± 0.13a	0.36 ± 0.23a
小計	3.08 ± 0.38a	2.18 ± 0.66a	3.11 ± 1.18a	2.61 ± 0.52a	2.48 ± 0.58a
種子に残った線虫数					
生存	0.03 ± 0.03a	0.00 ± 0.00a	0.01 ± 0.01a	0.01 ± 0.02a	0.00 ± 0.00a
死亡	0.00 ± 0.00a	0.01 ± 0.02ab	0.01 ± 0.01ab	0.01 ± 0.02ab	0.17 ± 0.10b
小計	0.03 ± 0.03a	0.01 ± 0.02a	0.01 ± 0.02a	0.03 ± 0.05a	0.17 ± 0.10a
総計	3.10 ± 0.37a	2.19 ± 0.65a	3.11 ± 1.17a	2.64 ± 0.51a	2.65 ± 0.56a

* 平均値±S.D. 各列で同じ文字を有する平均値はKruskal-Wallis 検定によって5%有意水準で差がないことを示す。

表 2.3. 大量のイネ種子または1種子だけからイネシンガレセンチュウを分離する効率の比較

方法	分離に用いた 種子数	繰り返し 数	分離効率 (%)*		
			生存線虫数	死亡線虫数	合計
大量の種子から の分離	20	6	99.1±1.1a	100±0.0a	99.1±1.0a
	50	6	100±0.0a	96.7±5.5ab	99.4±1.2a
	100	6	99.7±0.3a	94.9±7.3ab	99.3±0.8a
	150	6	99.2±1.4a	98.3±3.1ab	98.9±1.8a
1種子からの分離	20	3	100±0.0a	66.4±15.6b	93.5±3.8a

* 平均±S.D. 各列で同じ文字を存する平均値はKruskal-Wallis検定によって5%有意水準で差がないことを示す。

第3章 水田におけるイネシガラレセンチュウの個体数変動

3.1. 広島県のほたるいもち発生の年次的変化

広島県のイネ心枯線虫病の発生量は、病害虫発生予察事業の中で、ほたるいもちの発生量によって調査している。7月下旬に水田巡回調査を行い、ほたるいもちの発生程度を無（発生株率0%）、少（1～20%）、中（21～40%）、多（41～80%）、甚（80%以上）に区分して調査し、このデータが各年の発生状況とされている。

広島県におけるほたるいもちの発生は、1980年代後半まで10～20%の発生面積率で推移し、発生程度「中」以上の発生を認めている。1990年代前半に南部地域の主な水稻栽培品種が‘中生新千本’から‘ヒノヒカリ’に替わると種子更新がすすみ、発生面積率は減少して数%となり、発生程度「中」の発生はなくなった（図3.1, 図3.2）。1995年以降、発生程度「中」以上の被害が発生し、1998年には発生程度「中」以上の面積率が3.5%と広島県瀬戸内沿岸部を中心に多発した（図3.1, 図3.2）。1999年以降、広島県内の農業協同組合などの育苗センターでは、線虫防除用薬剤を使った種子消毒が導入されたため、発生程度「中」以上の発生は2016年まで認めていない。しかし、発生がなくなることなく、少発生ではあるが、発生面積率は5～25%で推移している（図3.1, 図3.2）。

3.2. ほたるいもち発生の水田間の違いとその要因

日本の農家では線虫を防除するために、フェンチオン乳剤（商品名バイジット乳剤）（現在、登録失効）やフェニトロチオン乳剤（商品名スミチオン乳剤）を種子消毒用殺虫剤として利用し、種モミをこの薬液に浸漬して播種に用いてきた。また、農家は定期的に無感染種子を購入して更新するなどの対策を行っている。農家それぞれの防除や種子更新の頻度の違いによって、本田での線虫の発生量は異なると考えられる。ここでは、ほたるいもちが多発した広島県尾道市美ノ郷町本郷下地区と広島県広島市安芸区中野において、ほたるいもちの空間的発生分布を調査することにより、線虫被害の発生に及ぼす水の流れと水田の位置について解析した。

調査地と方法

1998年8月31日から9月2日までの3日間に尾道市美ノ郷町本郷下地区の41圃場の水田において、イネ‘ヒノヒカリ’のほたるいもちの発生程度を調査した。発生程度を、無：0%、少：1%以上30%未満、中：31%以上60%未満、多：61%以上に分けた。1999年5月23日に本地域の水田の代かき中に、水系と水路などを含めた灌漑水の流れを調査した。

1999年7月4日に広島市安芸区中野の水田17圃場で、‘ヒノヒカリ’におけるほたるいもちの発生程度を調査した。発生程度は、尾道市の調査と同じ区分を用いた。2002年8月20日に同地区の水系と水路などを含めた灌漑水の流れを調査した。

結果

尾道市美ノ郷町のほたるいもち調査では、発生程度「無」は28圃場（水田1枚を圃場と呼ぶ）、発生程度「少」は1圃場、発生程度「多」は9圃場であった。また、発生程度「多」の水田に隣接する水田12圃場が無発生であり、5圃場の発生程度が「多」であった（図3.3）。

ほたるいもち多発圃場に隣接した圃場では、隣接する圃場のほたるいもちの発生程度と灌漑水の流れの方向に関係なくほたるいもちが多発した。また、多発水田の下流の隣接圃場でも発生程度「無」の圃場が4事例あることから、多発圃場からの水の流れで発生は助長していない。同一栽培者が複数の水田を持つ場合、発生程度「多」の圃場を持つ栽培者は6名おり、発生程度「多」のみの圃場を持つ生産者は3名であった。発生程度「多」の圃場と発生程度「無」の圃場を持つ生産者は3名であった（表3.1）。

広島市安芸区中野では、ほたるいもちの発生程度「無」は4圃場、発生程度「少」は7圃場、発生程度「中」は0圃場、発生程度「多」は6圃場であった。発生程度「多」の水田に隣接する水田では、それぞれ、1圃場が無発生で、3圃場が発生程度「少」であった（図3.4）。

ほたるいもち多発水田の下流の水田の発生程度は「少」であった。多発水田から流出した水が流れこむ水田では少発生であった。複数の多発圃場を持つ栽培者が3名おり、それらの栽培者は1996年に種子購入後、その種子を育苗してイネを栽培し、収穫した種子の一部を用いて、栽培を行っていた（表3.2）。すなわち、自家採種した種子を用いた圃場で多発していた。

考察

水稻種子に寄生した線虫は、水浸漬後に種子から游出する（田村・気賀沢，1957）。水稻種子の水浸漬後、游出した線虫は種子から出た芽に侵入し、そこで増殖する（田村・気賀沢，1958）。

水稻種子は水浸漬後、育苗箱に播種され、約21日間育苗されて、水田に移植される。育苗箱において線虫は増殖すると考えられている（池田ら，1977）。育苗箱で増殖した線虫は苗の移植とともに水田に持ち込まれ、水田では線虫が寄生したイネを中心に、線虫は近くのイネに分散し、水田でのほたるいもちの発生が広がると考えられる。

圃場間の移動については、水を媒介にして、多発水田から線虫は移動する（浅見ら，1978）とされてきた。本研究では、ほたるいもちが多発した水田に隣接した水田では、ほたるいもちの発生が無い或少なかった。浅見ら（1958）は多発させた耕作者の水田7筆からの排水が全て流れ込む下流の水田での発生は多かったと報告している。本研究の場合、ほたるいもちの多発した水田を保有する栽培者は、その他の栽培者の所有する水田と入り混じって点在している（表3-1、表3-2）。また、耕作者ごとに多発圃場が集中していた（表3.1、表3.2）。

水田の水中の線虫密度は浅見らのそれよりも低かったと推定される。このことから、水田の灌漑水の流れによって起こる線虫の圃場間移動の頻度は通常低いと考えられる。栽培者毎に育苗に使用する水稻種子に潜む線虫数が異なること、また、水稻育苗の環境やその育苗の過程の違いなどが、ほたるいもちの発生程度に大きく影響すると考えられる。

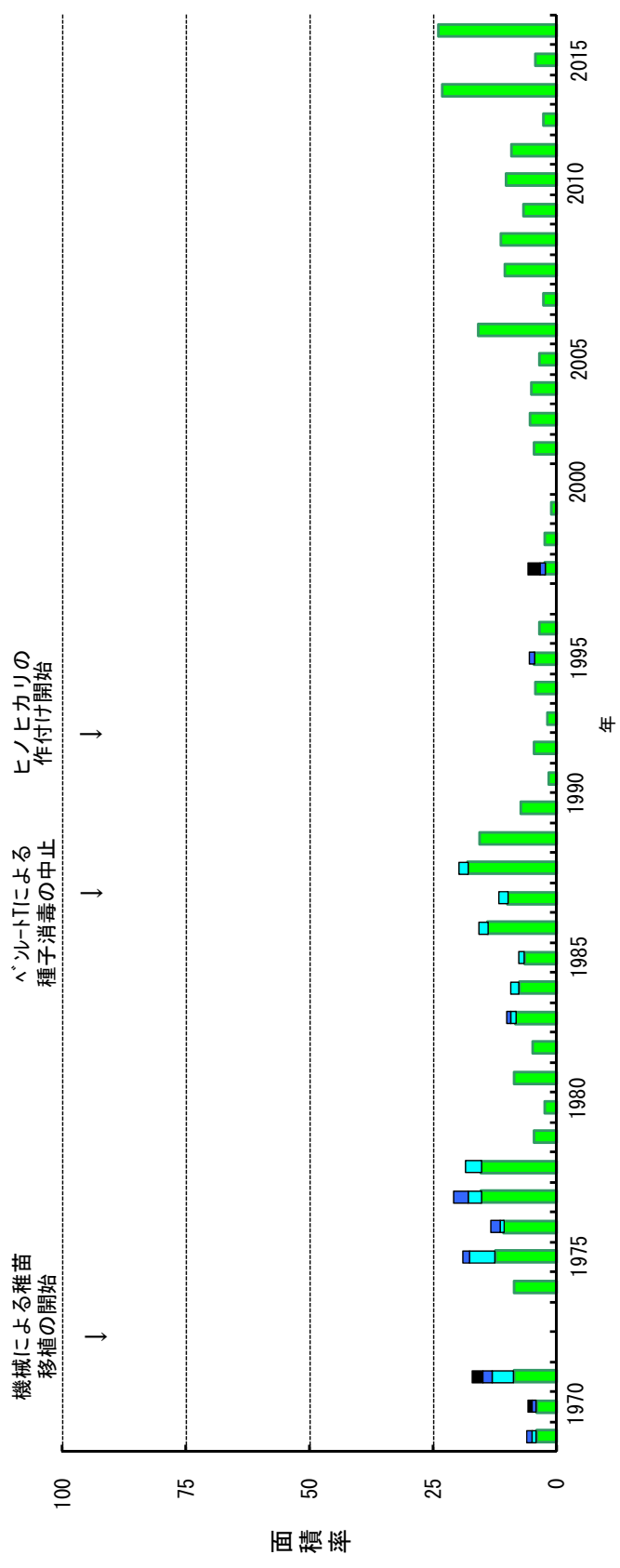


図3.1. 広島県における「ほたるいもち」の発生面積率の年次変動

面積率は「ほたるいもち」の発生株率によって区分した。

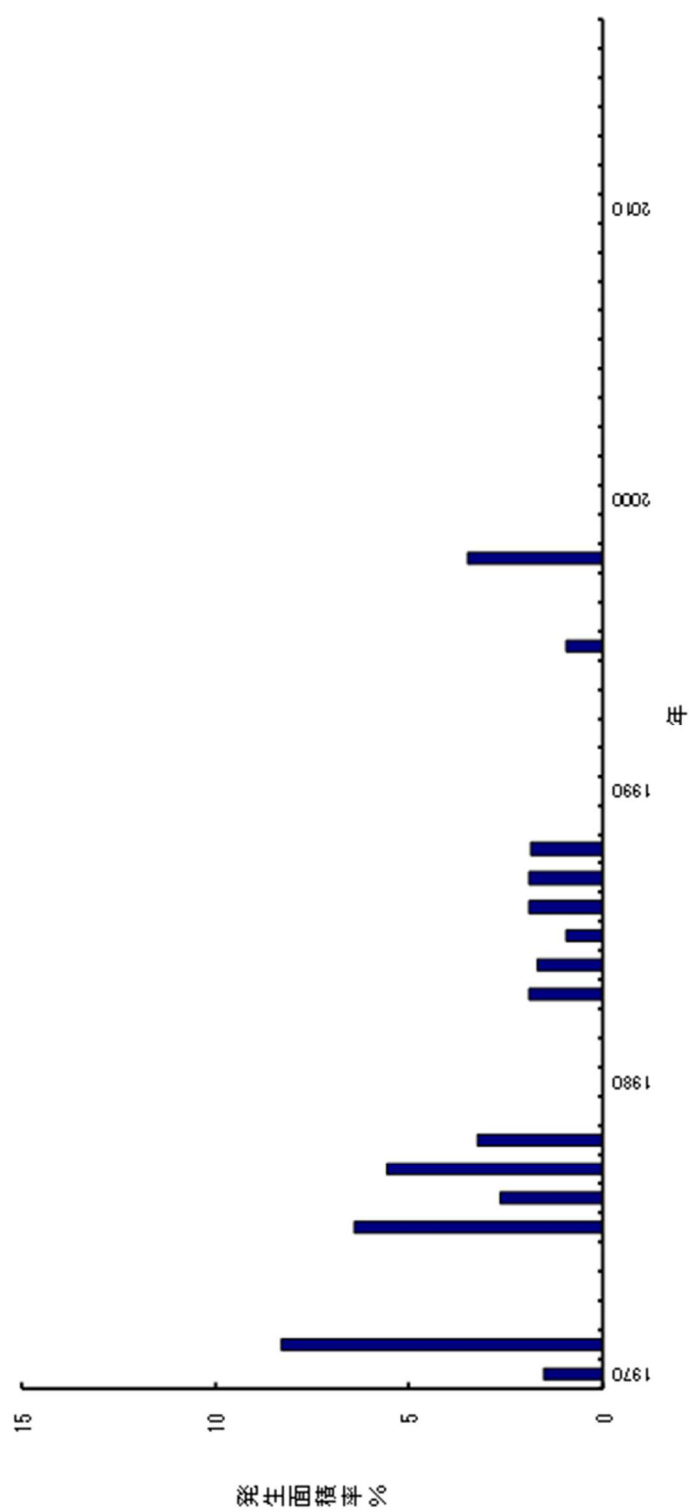


図3.2. 広島県におけるはたるいもちの発生が中程度以上であった水田面積率の年次変動

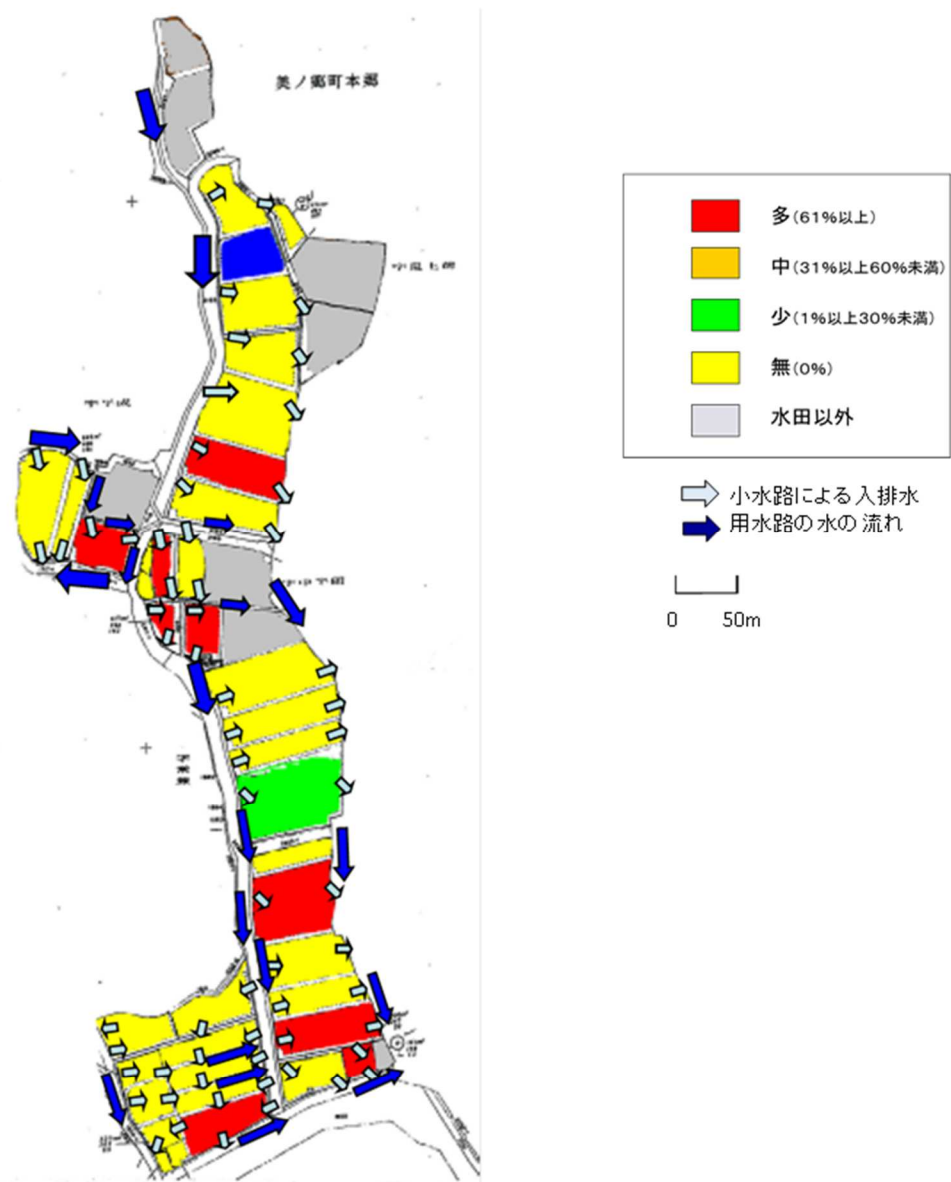


図3.3. 尾道市美の郷町本郷下組地区におけるほたるいもちの発生状況と水の流れの関係

表3.1 尾道市美の郷町における農家別
ほたるいもち発生程度

農家名	圃場数	ほたるいもち発生程度			
		無	少	中	多
A	3	3			
B	1				1
C	1	1			
D	1	1			
E	1	1			
F	4	3			1
G	5	2			3
H	2	2			
I	2	2			
J	1				
K	1		1		
L	2				
M	1	1			
N	1	1			
O	1	1			
P	1				1
Q	1	1			
R	1	1			
S	1	1			1
T	1	1			
U	1	1			
V	1	1			
W	1	1			
X	1	1			
Y	1	1			
Z	2	1			
a	2				2
合計	41	28	1	0	9

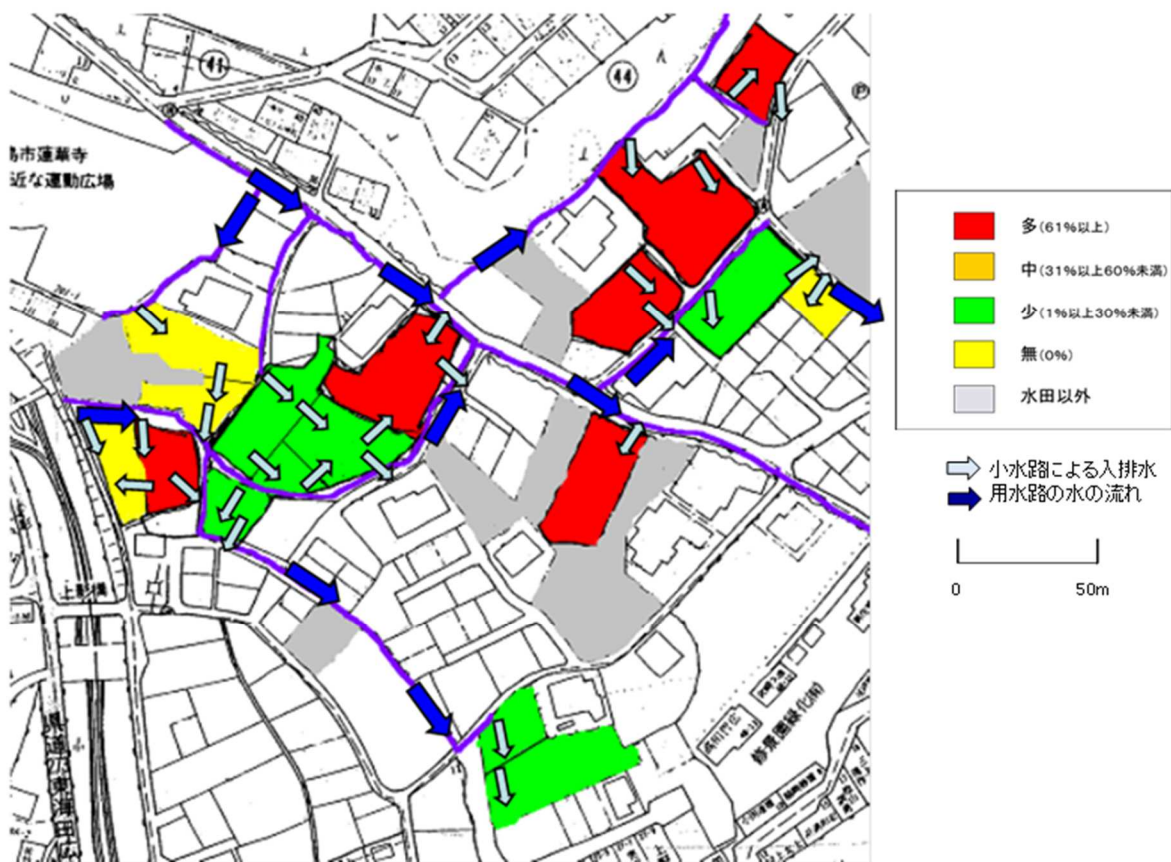


図3.4. 広島市安芸区中野におけるほたるいもちの発生状況と水の流れの関係

表3.2 広島市安芸区中野における農家別
ほたるいもち発生程度

農家名	圃場数	ほたるいもち発生程度			
		無	少	中	多
A	4	1	1	0	2
B	3	0	0	0	3
C	2	1	0	0	1
D	2	0	2	0	0
E	2	2	0	0	0
F	4	0	4	0	0
合計	17	4	7	0	6

3.3. 水田、イネ株、穂という空間スケールにおけるイネシガラセンチュウの空間分布とそれに基づく個体群密度調査法（多段抽出法）

日本のいろいろな地域で、農業協同組合や農家がさまざまな水田でイネ種子を収穫し、水田でイネを生産するための移植用の苗を生産している（全国米麦改良協会，2008）。通常，そのような組織や農家はコンバインを使い 250～2,000L のイネ種子を同時に収穫している。そして，乾燥機によって水分含率を 16%に減少させる。その結果として，異なる水田で収穫した種子を混ぜ合わせることになる。たった一つの水田で線虫が発生したとき，これらの集団栽培の収穫体系ではイネ苗の感染確率を増加させる。実際，それぞれの水田での種子あたりの線虫密度の情報があれば，非感染水田由来苗に対して，線虫混入の可能性を減少させることができるかもしれない。

生物の空間的分布はその生態を理解するための重要な形質であり，あるレベルの正確さで密度推定のサンプリング法を作ることは重要である。線虫は種子間で集中分布を示す（Yoshii & Yamamoto, 1950b；深野, 1962；Togashi & Hoshino, 2001, 2003）。生物が均一分布よりも集中分布を示すとき，正確に密度を推定するためには，十分なサンプル数が必要である（Kuno, 1976；San Martino et al., 2008）。さらに，イネ株には多数の穂があり，各穂には多数の種子がある。生物個体群の自然の生息場所が空間的に複雑な構造を示す時，密度の推定にはより複雑な標本抽出法が単純なランダムな標本抽出法より推奨される（Kuno, 1976）。そのような場合，多段抽出法（multi-stage sampling）がもっとも広く適用可能のようであり，時間，労力，費用を節約するのに役立つ（Kuno, 1976）。多段抽出法には各標本抽出段階の空間分布パターンの情報が必要であるが，線虫の分布パターンは穂，株，水田の各スケールで研究されたことがなかった。

ここでは，イネ株内の穂間，水田内のイネ株間，激害の 8 圃場間で，イネ種子当たりの線虫密度の違いを比較した。さらに，穂，株，水田のスケールで線虫の存在する種子割合（prevalence）と感染種子あたりの線虫密度（intensity）の間の関係を比較した。最後に，穂内，株内，水田間の種子あたりの線虫数の空間分布パターンを明らかにし，3 段抽出法を提案した。

材料と方法

水田とサンプリング法：広島県広島市安芸区中野で 1999 年にほたるいもちの激害の 8 水田をランダムに選んだ。これらの激害水田では全てのイネ株がほたるいもち症状を呈していた。水田には 4,360 株から 15,321 株（平均値±標準偏差：10,957±4,104）の‘ヒノヒカリ’が植えられており，1 株は通常 3 本の苗から生育していた。1999 年 9 月 24 日に水田を 6 つの区画に分け，各区画の中央部からイネ 1 株を収穫した。イネ株は株ごとに 35 日間日光で乾燥した。そして，各イネ株からランダムに 5 穂を抽出した。次に，各穂から種子をはずし，そこからランダムに 20 種子を抽出した。その結果，本研究では計 4,800 種子を調査した。

線虫の個体数調査：Hoshino & Togashi 法によって，游出した線虫および種子内に残存した全ての線虫を計数し，種子内の線虫個体数とした。穂，株，水田というスケールで種子あたりの線虫密度の違いを明らかにするために，種子内の生存線虫数を対数変換[$\log_{10}(x + 1)$]し，統計ソフト Systat 8.0（Systat Software, IL）を用いて nested ANOVA によって解析した。

種子割合 prevalence は寄生者に寄生された宿主の割合である (e.g., Anderson, 1981)。3つの空間スケールについて、線虫の寄生する種子の割合と種子あたりの線虫密度の関係について回帰分析を行った。

イネ種子間の線虫の空間分布と線虫密度推定のための3段階抽出法: Kuno (1976) は生物個体群の平均密度を推定するために3段階抽出法を提案した。そこでは第2段階抽出単位 (SSU) あたり第3段階抽出単位 (TSU) は無限にあること、第1段階抽出 (PSU) あたり第2段階抽出単位は無限にあることが仮定されたが、その仮定は自然の生息地ではめったに満されない。有限の個体群の分散は無限大の個体群のそれと異なっている (e.g., San Martino et al., 2008; Yano, 1983)。そのため、Yano (1983) は久野の方法を有限の個体群に拡張した。Wang et al. (2006) は平均密度を推定するための3段階抽出法を提案した。その場合、サンプリングエラーを一定にして調査費用を最小にするか、または調査費用を一定にして調査費用を最小にするという基準を設定した。ここでは、矢野の方法 (1983)、つまり Kuno (1976) の改良法を選択した。なぜなら、その方法は空間分布の2つのパラメーターを含み、それらは空間分布の単位 (個体または集団) とその単位の分布パターンを示すからである。

線虫の空間分布パターンは、平均密度 (m) に対する平均こみあい度 (m^*) の直線回帰、 $m^* = \alpha + \beta m$ 、を使って解析された。平均こみあい度は個体あたり区画あたりの同種他個体の平均個体数である ($m^* = m + \sigma^2/m - 1$, σ^2 は分散を表す) (Lloyd, 1967)。

以上の手法によりこの式の α は基本的な個体群の単位の測度であり、基本集合度指標と呼ばれ、 β は基本的な単位の分布パターンを示す測度であり、密度—集合度係数と名づけられている (Iwao, 1968; Iwao & Kuno, 1971)。 β 値が1未満、1に等しい、1以上の場合、それぞれ、個体群の基本的単位が均等分布、ランダム分布、集中分布を示す。線虫の空間分布パターンを3つの空間スケール (穂、イネ株、水田) で調べた。Kuno (1976) に従って、種子あたりの生存線虫の平均密度と平均こみあい度は、240穂 (各20種子) のそれぞれ、48株のそれぞれ (各100)、8水田のそれぞれ (各600) について計算した。

Kuno (1976) の方法と表示法に従って種子の標本抽出を考えると、水田 (全域) は L 株からなり、各株は K 穂を有し、各穂は Q 種子から構成される。抽出において、最初に抽出単位 (PSU) として l 株を選択し、次に PSU から第2次抽出単位 (SSU) として k 穂を選び、最後に SSU から第3次抽出単位 (TSU) として q 種子を選んだ。Kuno (1976) は、共通の y -切片の有する $m^* - m$ の直線関係、 $m^* = \alpha + \beta_1 m$ 、

$m_i^* = \alpha + \beta_2 m_i$ 、 $m_{ij}^* = \alpha + \beta_3 m_{ij}$ が、全範囲にわたる区画当りの個体の分布 (TSU) (全体の分布) と PSU 内の分布、SSU 内の分布において、維持されると仮定した。ここで i と j は第 i 番目の株と第 j 番目の穂を表す。 $\beta_1 > \beta_2 > \beta_3$ の関係が通常成り立つ。

平均密度 (\hat{m}) とその分散 (d^2) の推定値は以下のとおりである (Yano 1983)。

$$\hat{m} = \bar{x} = \frac{1}{lkq} \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^k \sum_{k=1}^q x_{ijk} \quad (1)$$

$$d^2 = \frac{m^2}{l} \left[\left(1 - \frac{l}{L}\right) \frac{\beta_1 - \beta_2}{\beta_2} + \frac{1}{k} \left(1 - \frac{k}{K}\right) \left(\frac{\beta_1 - \beta_3}{\beta_3} - \frac{\beta_1 - \beta_2}{\beta_2} \right) + \frac{1}{kq} \left(1 - \frac{q}{Q}\right) \left\{ \frac{\alpha + 1}{m} + \frac{\beta_1(\beta_3 - 1)}{\beta_3} \right\} \right] \quad (2)$$

k と q をそれぞれ k_0 と q_0 に固定した場合，標本抽出に必要な PSU

$$l = \frac{\frac{\beta_1 - \beta_2}{\beta_2} + \frac{1}{k_0} \left(1 - \frac{k_0}{K}\right) \left(\frac{\beta_1 - \beta_3}{\beta_3} - \frac{\beta_1 - \beta_2}{\beta_2} \right) + \frac{1}{k_0 q_0} \left(1 - \frac{q_0}{Q}\right) \left\{ \frac{\alpha + 1}{m} + \frac{\beta_1(\beta_3 - 1)}{\beta_3} \right\}}{D_0^2 + \frac{1}{L} \left(\frac{\beta_1 - \beta_2}{\beta_2} \right)} \text{ の数 } l \text{ は,} \quad (3)$$

となる。ここで、 D_0 は前もって決められた正確度であり，正確度は $D = d/\hat{m}$ （標準誤差/平均値）によって表される。境界線は，それ以上になると正確度が望ましい正確度 D_0 を満たすことを示す。 D_0 を満たす推定密度を得るため，逐次サンプリング法における境界線は，サンプルサイズ $n (=l_0 k_0 q_0)$ と累積的な抽出個体数 Tn を両軸に持つ平面上に描くことができる。境界線は次式によって与えられる。

$$Tn = \left(1 - \frac{q_0}{Q}\right) \frac{\alpha + 1}{D_0^2 + \frac{1}{L} \left(\frac{\beta_1 - \beta_2}{\beta_2} \right) - \frac{1}{n} \left\{ \left(1 - \frac{q_0}{Q}\right) \frac{\beta_1(\beta_3 - 1)}{\beta_3} + \left(1 - \frac{k_0}{K}\right) \frac{\beta_1(\beta_2 - \beta_3)}{\beta_2 \beta_3} q_0 + \frac{\beta_1 - \beta_2}{\beta_2} k_0 q_0 \right\}} \quad (4)$$

結果

穂，株および水田の間の平均線虫密度（頭/種子）の違いと線虫密度と関係する線虫の線虫存在率

平均線虫密度（頭/種子）は0頭から106頭まで大きく異なった。調査した4800種子のうち，ある1粒に106頭の線虫が，他の1粒には48頭の線虫がいた。種子あたりの線虫の平均密度は240穂間で0.00頭から10.80頭まで，48株間では0.03頭から5.82頭まで，8水田間では0.34頭から3.82頭まで異なった（図3.5）。Nested ANOVAはイネ株における穂間や水田におけるイネ株間，8水田間で有意な差があることを示した（表3.3）。全てのイネがほたるいもち症状を示しても，平均線虫密度（頭/種子）は水田間で大きく異なった。

平均線虫密度（頭/種子）（x）が増加するにつれて，線虫存在率（y）（生存線虫の存在する種子の割合，prevalence）が増加し，穂のスケールで約80%の上限に近づくようであった（図3.5A）。このことは，一次式 $y=12.84+7.76x$ ($R^2=0.651$) よりも双曲線 $y=48.87/(1+0.69x)$ ($R^2=0.790$) に適合することから確かめることができた。一方，線虫存在率と種子あたり線虫密度の関係はイネ株と水田のスケールにおいては双曲線よりも直線によって表された（それぞれ，イネ株における直線と双曲線および水田における直線と双曲線の R^2 値はそれぞれ0.806, 0.801, 0.924, 0.890であった）。

生存と死亡線虫を併せた場合，種子あたりの線虫密度（x）に対する線虫存在率（y）また穂のスケールで双曲線 $y=39.68/(1+0.52x)$ ($R^2=0.802$) として回帰された。一方，株のスケールや水田のスケールでは，それぞれ， $y=10.06+9.00x$ ($R^2=0.808$) と $y=9.77+9.12x$ ($R^2=0.907$) の直線として回帰された。

イネ種子間の線虫の空間分布と線虫密度推定のための3段抽出法

穂における平均線虫密度（頭/種子）と平均こみあい度（度）の関係によって線虫は平均3.4頭（ α 値+1）

のコロニーを形成し、それらのコロニーは穂内の種子間で集中分布を示すことがわかった(図 3.6A)。これはイネ株や水田のスケールでもそうであった(図 3.6 B, C)。Kuno (1976) の方法に従って、4 つの空間分布のパラメーター値 $\alpha=2.3537, \beta_1=3.9356, \beta_2=3.3039$, および $\beta_3=2.5432$ を得た(図 3.6)。式 (3) とパラメーターの値によって、平均線虫密度(頭/種子)の減少につれてサンプリングに必要なイネ株の必要数が急激に増加することが示された(図 3.7)。 $D_0=0.2, L=\infty, K=10, Q=100$ のとき、平均線虫密度(頭/種子)が 0.1 以上の場合、イネ株の必要数は、2 穂の各々から 50 種子を抽出するよりも、5 穂の各々から 20 種子を抽出する方が少なくなる(図 3.7)。 $D_0=0.2, k_0=5, L=\infty, K=10, Q=100$ の場合、調査種子数(q_0)を 10 から 50 個に増加すると株の必要数(l)は減少したが、1 以上の平均線虫密度の種子では l 値の違いはとて小かった(図 3.7)。

式 4 は、種子あたり生存線虫密度を推定するための逐次抽出の境界線を与える(図 3.8)。この境界線の右側は望まれた正確度が達成される領域である。サンプリング(標本抽出)された全種子を調べても、指定された正確度で平均線虫密度が推定されない閾値があることを双曲線の境界は意味している。なぜなら、種子あたりの平均線虫密度は原点を通る直線の傾きによって表されるからである。さらに、抽出されるべきイネ株数(l)は 1 穂から抽出された種子数(q_0)とその 1 株から抽出された穂数(k_0)の組み合わせに依存して、変化することが示された。その結果、調査されるべき種子の必要数(lk_0q_0)が変化した。例えば、正確度 $D_0=0.2$ の下で 1 株から 5 穂($k_0=5$)を抽出する場合、1 穂から抽出される種子数が 10 から 50 に増加すると、等しい線虫密度を推定するためには必要種子数は増加する(図 3.8)。株(k_0q_0)あたり 100 種子が調査される場合、種子あたり 0.08 頭以上の平均線虫密度の時に調査されるべき必要種子数は $k_0=2, q_0=50$ よりも $k_0=5, q_0=20$ の方で少なくなった。一方、0.08 頭以下の平均線虫密度では、必要な種子数は $k_0=5, q_0=20$ で多くなった(図 3.8)。

考察

本研究によって、全てのイネが葉に「ほたるいもち」症状を呈していても、イネ種子あたり平均生存線虫個体数は、水田間、水田内の株間、イネ株内の穂間で、有意に異なることが示された。さらに、生存線虫は穂、株、水田の 3 つの空間スケールにおいて種子間で集中分布を示した。このことは種子内の線虫数と生存率の間の正の相関に関係するのかもしれない(アリー効果)(Huang & Huang, 1974 ; Togashi & Hoshino, 2003 ; Hoshino & Togashi, 2009)。

集中分布は線虫に寄生された種子の割合(prevalence)に反映された。種子あたりの平均線虫密度が増加するにつれて、それぞれの穂の中で生存線虫が寄生する種子の割合は増加し、その上限に近づいた。種子内の生存線虫と死亡線虫を併せた場合、線虫寄生種子の割合の上限 $76.3\%[y=39.68x/(1+0.52x)]$ の回帰曲線から推定された値]は、種子内の生存線虫についての上限値 $66.2\%[y=45.87x/(1+0.69)]$ からの推定値]より大きかった。このことは個々の種子内の少数の線虫の死亡によって引き起こされた(Huang & Huang, 1974 ; Togashi & Hoshino, 2003 ; Hoshino & Togashi, 2009)。線虫感染種子の割合の上限は、高い感染下で線虫に寄生されていない種子の存在を意味し、イネ個体群の存続に寄与するであろう。対照的に、株と水田の空間スケールにおいて線虫寄生種子の割合と平均線虫密度の間で直線関係は観察された。おそらくそれは線虫寄生種子の割合の低い最大値と線虫密度のためであろう。

本研究では、天日で乾燥したイネ種子(含水率 16%)から線虫を分離した。興味深いことに、玄米

の含水率が開花の 30 日後に 20%に減少し、開花の約 40 日後の収穫時まで一定である (Hoshikawa, 1989)。通常、収穫した種子を天日や乾燥機で乾燥すると含水率は 16%に減少する (Hoshikawa, 1989)。このため、種子からの線虫分離は開花 30 日後に行うことができる。収穫は開花 40 日後頃されるので、水田内の種子あたりの線虫密度は収穫前に推定できる。つまり、移植のための苗生産において線虫個体群の管理に役立つ。

本研究はまた、Kuno (1976) と Yano (1983) にならい、線虫密度を推定するための 3 段階抽出法を提示した。これは水田内の種子あたりの線虫の密度推定に適した有用な技術であろう、なぜなら、異なる標本抽出段階のサンプルサイズは、サンプリングのための誤差とコストに影響するからである (Wang et al., 2006)。例えば、2 段階抽出では、多数の第 1 段階抽出単位 (PSUs) のおのおのから少数の第 2 段階抽出単位 (SSUs) を取って調べることは、通常サンプリングエラーを減らして、サンプリング費用を増大させるだろう (Wang et al., 2006)。反対に、少数の第 1 段階抽出単位の各々から多数の第 2 段階抽出数を取って調べることは、サンプリング費用を減らして、サンプリングエラーを増加させるだろう。線虫の場合、抽出された株から穂を抽出したり、抽出された穂から種子を抽出するより、水田からイネ株を抽出する方が大きい労力を要するであろう。それゆえ、少数の種子を用いた予備的な調査によって、種子あたりの平均線虫密度のおおまかな推定値を得ることができるならば、その値はサンプリングされるべき株、穂、種子の必要数を決めるのに役立つであろう (図 3.7)。その結果、種子あたりの線虫平均密度とイネ株の必要標本抽出数の関係、調査種子数と累積線虫捕獲数の関係、および各抽出段階の費用を用いて、調査種子数と費用を最小にできるであろう (図 3.8)。

平均密度が極端に低いとき、種子の必要サンプル数は莫大になるだろう (図 3.8)。そのような場合は、2.2 節で述べた 50 あるいは 100 種子から同時に線虫を分離する方法 (Hoshino & Togashi, 2002 ; Rajan & Lal, 2006) が役立つかもしれない。

表3.3. 水田、イネ株、穂がイネ種子内のイネシンガレセンチュウの生存個体数に及ぼす影響を示すためのnested ANOVA表
ANOVAを行う前に、線虫数をLog変換 ($\text{Log}_{10}(x+1)$)した。

変動要因	偏差の平方和	自由度	平均平方	F 値	P 値
水田	80	7	11369	95.59	<0.001
水田内株	18	40	0.438	3.68	<0.001
株内の穂	92	192	0.477	4.01	<0.001
誤差	542	4560	0.119		

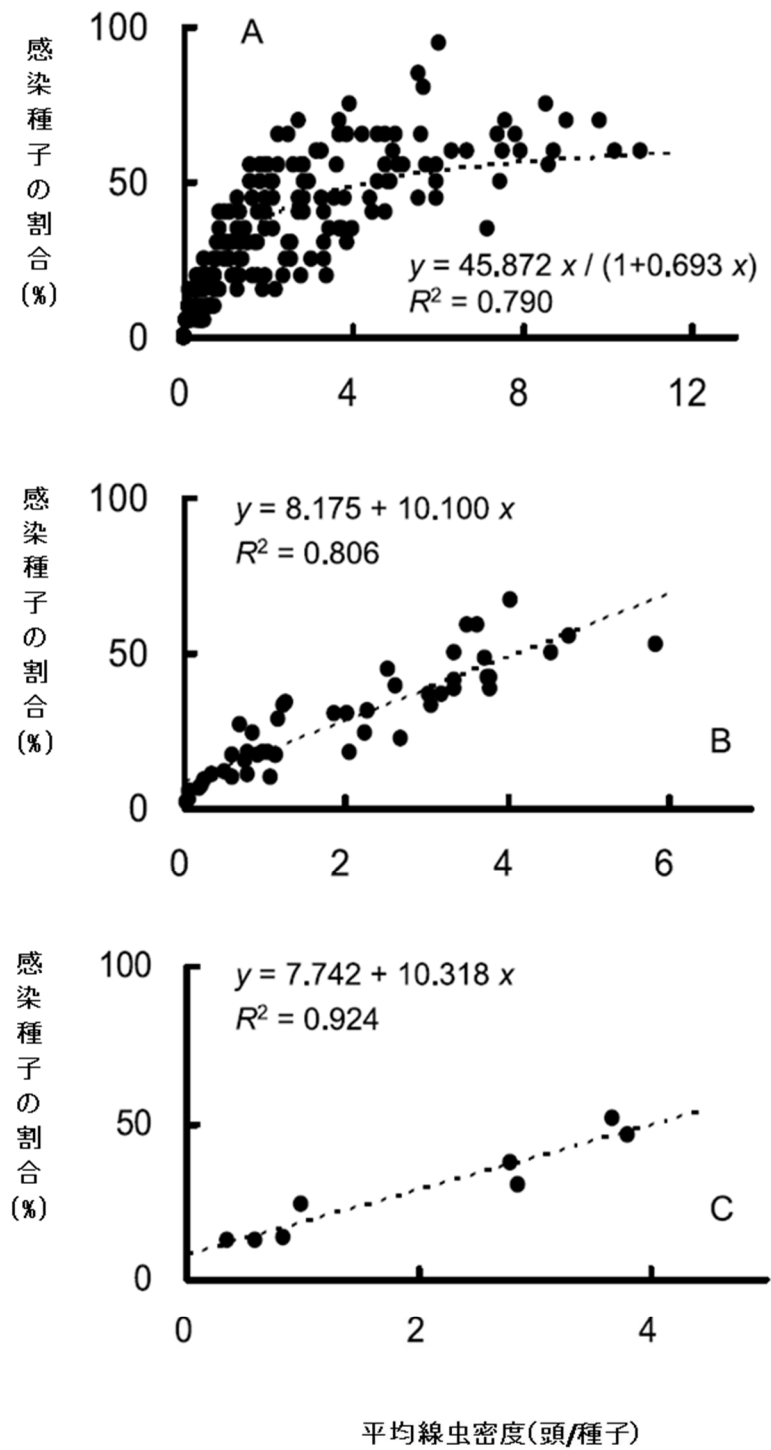


図3.5. 異なる空間スケール、イネの小穂(A)、株(B)、水田(C)における種子あたりイネシンガレセンチュウ密度と感染種子割合(%)の関係。感染種子の割合は生存線虫のいる種子の割合である。小穂のスケールでは直線よりも双曲線の適合が良かった。

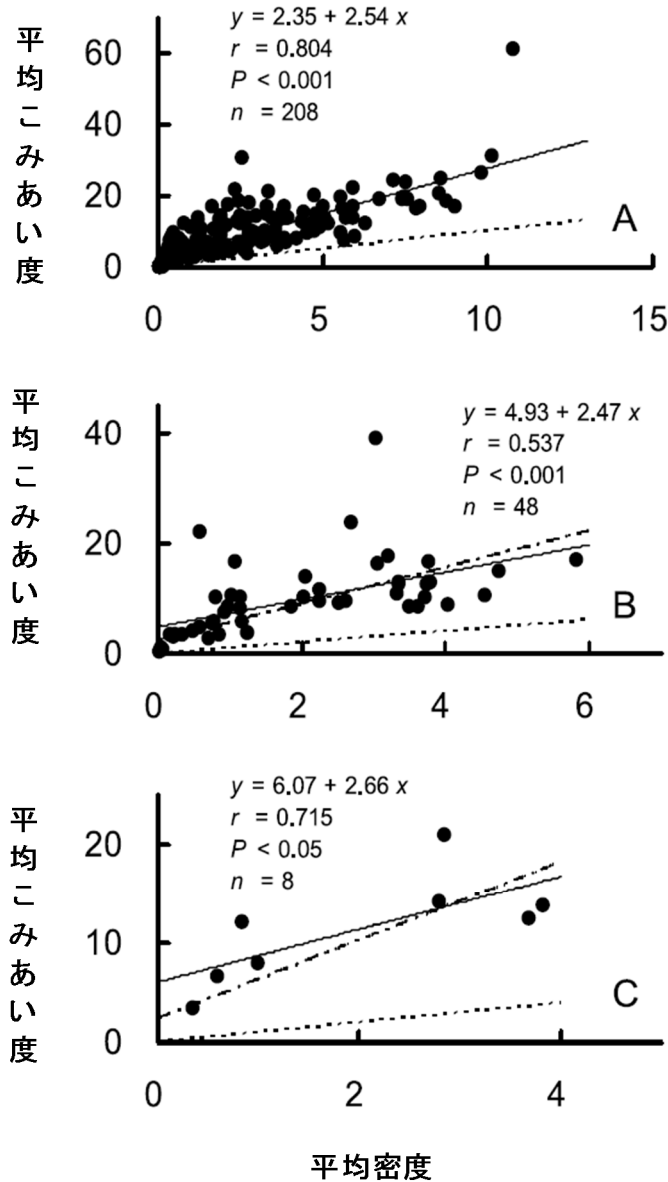


図3.6. 異なる空間スケール、イネの小穂(A)、株(B)、水田(C)における種子あたりイネシンガレセンチュウの生存個体の平均密度と平均こみあい度の関係。

平均こみあい度は種子あたり生存線虫あたりの共存他個体数の平均値である。実線は平均密度に対する平均こみあい度の回帰直線である。 y 切片(α)の値は分布の単位(個体単位で分布する場合 $\alpha=0$, コロニー単位で分布する場合 $\alpha>0$)を示し、傾き(β)は分布単位の分布パターンを示す($\beta<1$, $\beta=1$, $\beta>1$ はそれぞれ一様分布, ランダム分布, 集中分布を示す)。

破線はポアソン分布の期待値を表し、ランダム分布を示す($\alpha=0$, $\beta=0$)。株と水田スケールにおける一点鎖線は小穂スケールにおける回帰直線の y 切片の値をもつ、回帰直線を示す。株と水田スケールにおける回帰直線の傾きはそれぞれ β_2 と β_1 を表す(Kuno, 1976)。

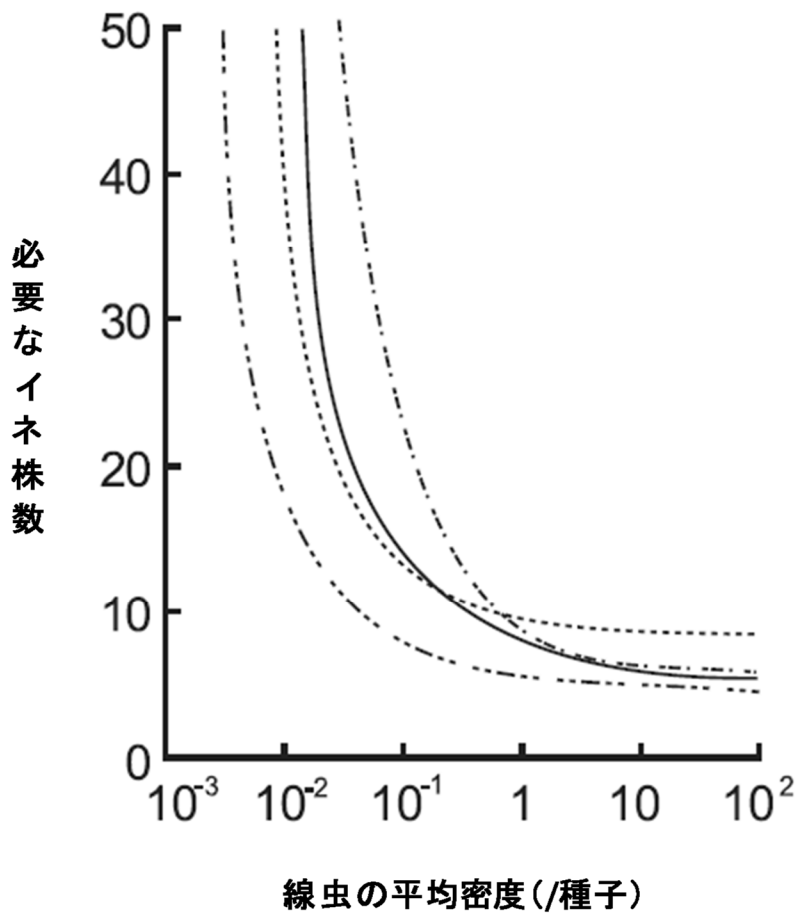


図3.7. イネ種子あたりのイネシンガレセンチウの生存個体の平均密度を推定するために4種類の3段抽出計画におけるイネ株の必要数, 水田あたりの株数 $L = \infty$, 株あたりの小穂数 $K = 10$, 小穂あたり種子数 $Q = 100$ を仮定して計算を行った。実線は正確度 $D_0 = 0.2$, 1株から抽出される小穂数 $k_0 = 5$, 小穂当たりの抽出される種子数 $q_0 = 20$ に対する関係を示す。破線は $D_0 = 0.2$, $k_0 = 2$, $q_0 = 50$ に対する, 一点鎖線は $D_0 = 0.2$, $k_0 = 5$, $q_0 = 10$ に対する, 二点鎖線は $D_0 = 0.2$, $k_0 = 5$, $q_0 = 50$ に対する関係を示す。

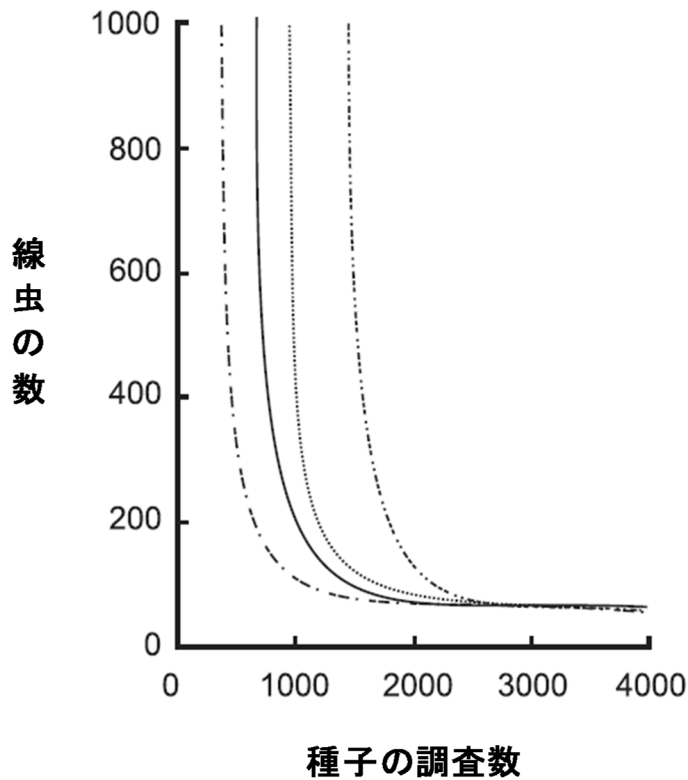


図3.8. イネの調査種子数 ($=lk_0q_0$) と得られたイネシンガレセンチュウ数の関係。図中の線は1種子中の生存線虫数の連続的サンプリングに対する境界を示す。水田あたりの株数 $L=\infty$, 株あたり小穂数 $k=10$, 小穂あたりの種子数 $Q=100$ を仮定して計算を行った。実線は正確度 $D_0=0.2$, 1株から抽出される小穂数 $k_0=5$, 1小穂から抽出される種子数 $q_0=20$ に対する, 破線は $D_0=0.2$, $k_0=2$, $q_0=50$ に対する, 一点鎖線は $D_0=0.2$, $k_0=5$, $q_0=10$ に対する, 二点鎖線は $D_0=0.2$, $k_0=5$, $q_0=50$ に対する関係を示す。

3.4. 1 圃場のイネシンガレセンチュウ個体群の年次変動

日本では農家が新しく購入した種子を用いてイネを栽培した場合、この線虫はほとんど発生しない。しかし、その収穫物を使って栽培を繰り返すと、新しい種子を購入してから2~3年で線虫の大発生が起りやすい (Hoshino & Togashi, 未発表)。そのため、農家は新しく線虫感染率の低い種子を購入する。また、農家は栽培品種を変えることがある。このように、水田内のイネと線虫の相互作用は農家の意志によって突然に終わる。このため、イネと線虫の長期にわたる相互作用が両種にどのような進化的結果をもたらすか分かっていない。

そこで、本研究では14年間に渡って同じイネ個体群を栽培し、2種間の生態学的性質の変化を調べた。

材料と方法

線虫: 広島産の線虫個体群を使用した。2001年9月13日に三次市(旧双三郡作木村(北緯 34°86'926", 東経 132°72'12"))でイネ株を収穫した。2001年10月20日まで網室でそれらを乾燥した。イネ株から穂を採集し、線虫個体群の存在する種子を集めて、暗黒条件下、気温5°C、湿度30%で保存した。

2002年2月10日に大量分離法 (Hoshino & Togashi, 2002) で60種子から20頭の線虫を分離した。オオムギに灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) を培養した糸状菌マットで線虫を増殖した。

感染源となるイネ種子の作成: 2002年4月28日に、発芽のために、線虫無感染水稻種子(品種ヒノヒカリ) 300粒を水に浸漬した。4日後に殺菌土壌を充填したプラスチック容器(育苗箱)に水稻種子を播種し、4日間30°Cに保ち、苗を成長させた。その後、苗を通風ハウスに移した。10個の1/5,000aのワグネルポットに3.3Lの土壌をそれぞれ充填し、深さが3cmとなるよう水を張った。広島県東広島市の広島県立農業技術センター(現、広島県立総合技術研究所農業技術センター)の圃場で、2002年6月12日に線虫に無感染のイネ‘ヒノヒカリ’の苗を面積200cm²のワグネルポットに1本移植した。

同じ日に上記の方法で1ヵ月培養した線虫成虫および幼虫の懸濁液10ml(3,000頭、濃度300頭/ml)をワグネルポット1個の水の中に入れた。

肥料は3回施用した。各ポット当たり農家と同様の方法で窒素14%、リン酸14%、カリ14%の構成の化学肥料(アラジン444) 0.43gを2002年6月6日、同じ肥料0.20gを2002年7月10日に、窒素17%、カリ17%の構成の化学肥料(あきみのり2号)を2002年7月30日にそれぞれ施用した。

2002年10月15日にイネ6株を収穫し、2002年11月5日までにそれらをハウスで乾燥した。その後、乾燥した種子を集めて、使用まで暗黒下5°Cで保存した。

水稻の栽培: 2003年に行った水稻栽培には、線虫感染種子の割合によって初期線虫密度を低く設定するため、2002年に収穫された5,830粒の線虫無感染‘ヒノヒカリ’種子に、前述の2002年に線虫3,000頭を接種して栽培した線虫感染‘ヒノヒカリ’種子20粒を混合して用いた。なお、感染種子は、種子あたり生存線虫数4.37±6.09頭、種子あたり死亡線虫数0.30±0.69頭、種子あたり合計線虫数4.67±6.15頭であった。混合種子を水に浸漬し、催芽して育苗箱に2003年5月6日に播種し育苗した。2003年5月27日に株間18cm、条間30cmとなるように、水田200m²に移植した。2003年10月6日に収穫し、2003年11月8日までイネ株を通風ハウスで高さ1.5mにつるして乾燥した。乾燥後穂から

種子を分離して、翌年の水浸漬まで暗黒条件下、5°Cで保存した。

2004年から2016年までの水稻栽培は、育苗箱で育てたイネ苗を5月下旬から6月上旬に水田に移植し、10月上旬に収穫し、約3週間乾燥した。暗黒条件下5°Cに保存し、その種子の一部を翌年の種もみとして用いた。各年、肥料は3回施用した。農家と同様の方法で窒素14%、リン酸14%、カリ14%の構成の肥料の0.86kgを6月中旬に、窒素17%、カリ17%の構成の肥料の0.42kgを7月下旬、0.42kgを8月中旬にそれぞれ施用した。

ほたるいもち調査：2003年から2016年までの各年の幼穂形成期（7月下旬～8月上旬）に水稻50株の茎数とほたるいもちが発生している茎数を記録し、ほたるいもち発生茎率を算出した。

線虫個体数調査：毎年、イネの収穫期に、水田を6等分して6区画をつくり、各区画からイネ1株を採集した。上と同じように、イネ株を乾燥した後、各株から3穂を選択し、1穂から20種子をランダムに抽出した（Togashi & Hoshino, 2010）。Hoshino & Togashi法に従い、抽出した種子内の線虫個体数を生死別に調査し、種子内に残存した線虫も計数した。

解析：種子間の線虫の分布集中度を明らかにするために、 I_{δ} 値を計算し、ランダム分布からの有意差をF値で検定した（Morisita, 1959）。 I_{δ} 指数は、次の数式で定義される。

$$I_{\delta} = \frac{q \sum_{i=1}^q n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

$$N = \sum_{i=1}^q n_i,$$

q : 区画数

n_i : i 番目の区画内の個体数

ここではランダムにサンプリングした q 個の種子の第 i 番目の種子にいる線虫数を n_i とした。 I_{δ} の値は分布集中度を示す。すなわち、 $I_{\delta} > 1$ のとき集中分布を、 $I_{\delta} = 1$ のときポアソン分布を、 $I_{\delta} < 1$ のとき一様分布を示す。

個体数変動を2つの生活場所の個体数変動に分け、1年間の個体数変動に及ぼす種子内の個体数変化と種子外のその効果を明らかにするために、 k 値を用いた。 k 値は、特定の期間の個体数の減少と増加の大きさを表す。すなわち、第 t 年に収穫された種子内の最大線虫数（生存線虫と死亡線虫の合計数）を $d_b(t)$ （種子内最大線虫密度）、浸漬された種子内の生存線虫数を $d_a(t)$ （種子内終期線虫密度）とすると、 k_1 値と k_2 値は次のように計算された。

$$k_1(t) = \log d_b(t) - \log d_a(t)$$

$$k_2(t+1) = \log d_a(t) - \log d_b(t+1)$$

k_1 は種子内の線虫死亡の大きさを、 k_2 は種子から游出した個体群がイネの成熟までに示した個体数増加の大きさを表す。

結果

線虫密度の年次変動は2004年と2008年、2012年、2014年、2016年にピークを持つ減衰振動を示した（図3.9）。2004年から2007年までの間と2008年から2012年までの間に線虫密度（対数表示）

は直線的に減少した、つまり同じ率で減少したことが示された (図 3.9)。その後、2013 年から 2016 年まで、線虫密度は 1 年毎に増減を繰り返した (図 3.9)。

連続する 2 カ年の線虫密度の関係をみると、密度が 0.15 から 0.82 までの場合、翌年の密度は増加した。密度が 1.04 から 2.94 までの場合、その後の密度の増加率は急激に低下し、種子内の線虫の平均密度が前年より減少することが示された (図 3.10)。

1 年間の個体数変動に及ぼす種子内の個体数変化と種子外のその効果を分けた。まず、種子内終期線虫密度 (種子内生存線虫数) が高くなるにつれて、種子から水田で種子内最大線虫密度 (種子内の生存線虫と死亡線虫の合計数) に達するまでの増殖 (k_2 値) は減少することが示された ($k_2 = -0.535d_a + 0.909$, $r = -0.694$, $n = 14$, $p = 0.0059$) (図 3.11)。これに対して、種子内では、種子内最大線虫密度が高いほど、種子内の死亡は大きくなった ($k_1 = 0.020d_b + 0.088$, $r = 0.446$, $n = 14$, $p = 0.096$) となった (図 3.11)。

種子内の線虫最大密度と種子内死亡率 (k_1 値) の関係は、線虫密度のピーク年かそうでないかに依存して、種子内の線虫数と死亡率の関係は異なった (図 3.11)。線虫密度がピークに達した 2004 年、2008 年および 2012 年には、種子内最大線虫密度に無関係に、死亡率は一定であった (2004 年, $r = 0.170$, $n = 35$, $p = 0.321$; 2008 年, $r = 0.062$, $n = 32$, $p = 0.734$; 2012 年, $r = -0.101$, $n = 24$, $p = 0.639$) (図 3.12)。それ以外の年では、種子内最大線虫密度と死亡率の間に負の相関またはその傾向が認められた (図 3.12)。

種子内の線虫終期密度が 1.4 になるまで増加するにつれて、線虫のいる種子の割合 (y) は低くなり、種子内で共存する線虫は少なくなる ($y = 0.0812 d_a^2 - 0.2395 d_a + 0.3311$, $R^2 = 0.2704$, $n = 14$) (図 3.13)。これに対して、種子内の線虫終期密度が 1.4 を超えて増加すると、線虫の存在する種子の割合は高くなり、種子内で多数の線虫が共存することを示した。

2003 年から 2016 年までの全ての年で線虫は種子間で集中分布を示した ($I_b > 1$, $F > 1.360$)。2011 年から 2014 年までは年次を経るにしたがって、 I_b 値は低下していく傾向を示した。しかし、2015 年には I_b 値は 44.8 と急激に上昇し、2016 年には再び低下した (図 3.14)。このように、線虫密度がピークとなった 2004 年、2008 年、2012 年、2014 年、2016 年には I_b 値は低下した。

種子内の線虫密度を最大密度の時期と終期密度の時期にわけると、種子内の全線虫の I_b 値 (y) が大きくなると、線虫のいる種子の割合 (x) は減少した ($y = 1.487x^{-0.952}$, $n = 14$, $R^2 = 0.9665$) (図 3.15)。種子内の全線虫数 (x) が増加すると、線虫のいる種子の割合 (y) は高くなり ($y = 0.0902x + 0.0459$, $r = 0.878$, $n = 14$, $p = 0.000$)、分布集中度は減少した ($y = -4.7525x + 19.72$, $r = -0.641$, $n = 14$, $p = 0.013$) (図 3.15)。

種子内の終期密度 (生存線虫) の分布集中度 (I_b 値) (x) が高くなるにつれて、生存線虫のいる種子の割合 (y) は低くなった ($y = 1.389x^{-0.832}$, $R^2 = 0.9542$, $n = 14$) (図 3.16)。種子内の生存線虫数 (x) が増えるにつれて、生存線虫のいる種子の割合 (y) は増加し ($y = 0.1196x + 0.0278$, $r = 0.837$, $n = 14$, $p = 0.0002$)、生存線虫の分布集中度 (I_b 値) は減少した ($y = -11.389x + 28.498$, $r = -0.545$, $n = 14$, $p = 0.0437$) (図 3.16)。

種子内の線虫終期密度 (d_a) が高くなるにつれて、それらの種子が成長したイネのほたるいもち茎率 (病徴を示す茎の割合) (y) は大きくなった ($y = 0.061 d_a + 0.1706$, $r = 0.466$, $n = 14$, $p = 0.094$) (図 3.17)。

考察

種子あたり線虫密度は、2004 年と 2008 年、2012 年にピークを持つ減衰振動を示し、2012 年以降は 1 年毎に増減を繰り返した。そして、2012 年以後の線虫の密度の変動は小さくなり、2004 年ほどの線

虫の大発生が起こらないようになった。このことは、線虫とイネの種間の長い相互作用が系の安定化をもたらしたと考えられる。

線虫個体群密度の減衰振動は、連続する2年間の種子内線虫密度の関係から理解できる。すなわち、種子内線虫密度が0から1まで増加するにつれて、1年間の増加率は1より大きいものの、密度の増加とともに増加率は減少した。種子内線虫密度が1を超えると1年間の増加率は1より小さくなり、翌年の密度が減少すること、そして、線虫密度の増加とともに増殖率がだんだん低下することが示された。つまり、線虫密度と増加率の間には臨界的な密度があり、それを境に増殖パターンが変わることが示された。

2003年から2012年までの10年間にわたる線虫密度と空間分布の関係をみると、種子内線虫数が多くなると、線虫のいる種子の割合が増加し、分布集中度は低下した。

種子内線虫について逆密度依存的な死亡が2004年、2008年、2012年、2013年以外の9ヵ年でみられた。これらの9年は線虫密度のピーク年の後の年であり、種子内線虫数はそれほど高くなかった。そのような状況で逆密度依存的な死亡が起こると、種子内終期線虫密度の分布集中度は最大密度の時期より高くなる。Yamamura (1989) は個体群密度が高すぎない場合、分布集中度は個体群密度および平衡密度レベルを一般に低下させると報告している。Yamamura (1989) の報告と同様、本線虫も高い分布集中度を持つ場合、個体群密度を低下させると考えられた。日本にいる線虫は両性生殖であるため、低密度では分布の集中度が増す（種子内の平均こみあい度が高くなる）ことによって、雌成虫の交尾率の低下を防ぐと考えられた。

Huang & Huang (1974) は、スライドグラス上に線虫成虫を大きな集団 (5.7×10^4 頭) で置くと、小集団 (1.5×10^4 頭) で置くより休眠個体の割合が高くなること、および集団表面の線虫より集合中心部の線虫の生存率が高いことを示した。集団が大きいほど、集団中心部の乾燥速度は遅くなり、休眠に入るための時間を確保できる。これに対して、急速な乾燥は線虫の死亡を引き起こす。イネの乾燥種子内の線虫は休眠している。そのため、種子内線虫密度が高いほど、種子内の乾燥速度が遅くなるように線虫が宿主操作をしているのかもしれない。種子内の線虫密度は Huang & Huang (1974) よりかなり低かった。このため、彼らの示した機構によってイネ種子内の密度逆依存的死亡の年次による違いを説明することは難しい。

線虫は感染した花のめしべやおしべの基部に分布し、種子の基底部分が発達すると、糊（外穎と内穎）の内側の表面と種子の外皮の間の空間に分布する (Huang & Huang, 1974)。イネは開花から7~8日後に含水率が最大となる。乾物重増加とともに含水率が減少する (星川, 1975)。受精11日後には胚の細胞分裂増殖がほとんど行われなくなる。胚の完成は受精の25日後である (星川, 1975)。胚乳細胞の分裂増殖は受精後9~10日に終了する。それ以降、胚乳細胞が肥大生長することによって胚乳が大きくなる (星川, 1975)。これらのことから、胚細胞と胚乳細胞の細胞分裂期、それ以降の胚乳細胞および胚細胞の肥大期に線虫が増殖することになる。そして、胚細胞や胚乳細胞の肥大が完了してから、線虫の死亡および減少が起こると考えられる。線虫の存在により胚乳細胞の細胞分裂や肥大が制御され、線虫に感染した種子は胚乳が小さくなったり、比重が軽くなったりするかもしれない。少ない胚乳細胞が肥大していない場合、水分の減少は通常より急激となるかもしれない。急激な水分減少は線虫の死亡率を高める (Hoshino & Togashi, 2000)。一方、線虫の死亡率を高めるような物質の生成など

が考えられる。また、年によって、線虫の存在する種子の割合が変動する要因が何かはわかっていない。線虫の存在する種子の割合を左右する機構は非常に興味深い。これらを解明することが、イネの線虫に対する抵抗性等を解明する糸口になると考えられる。

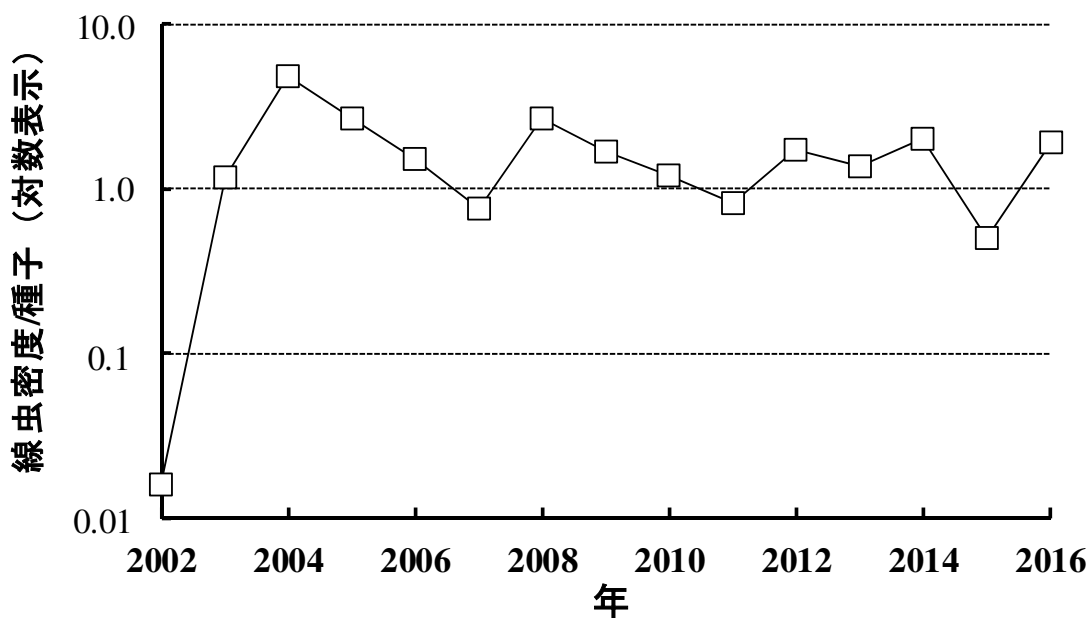


図3.9. 種子当たりの平均密度の年次変動

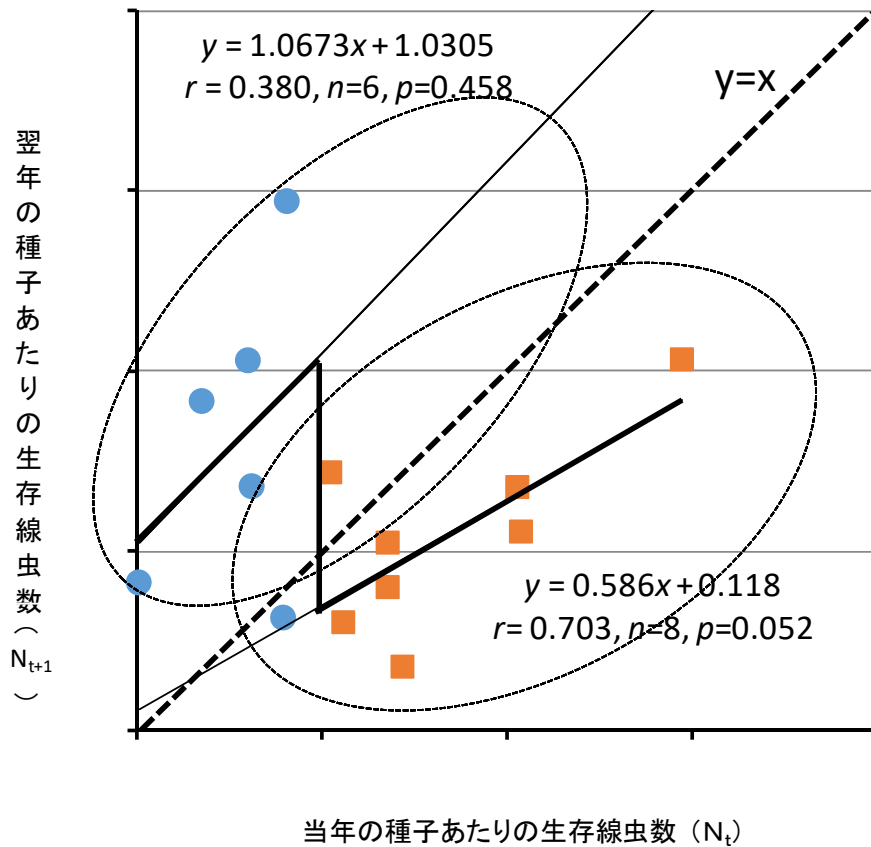


図 3.10. 連続する2年間のイネ種子内イネシンガレセンチュウ密度の関係
 N_t はt年あたりの生存線虫数

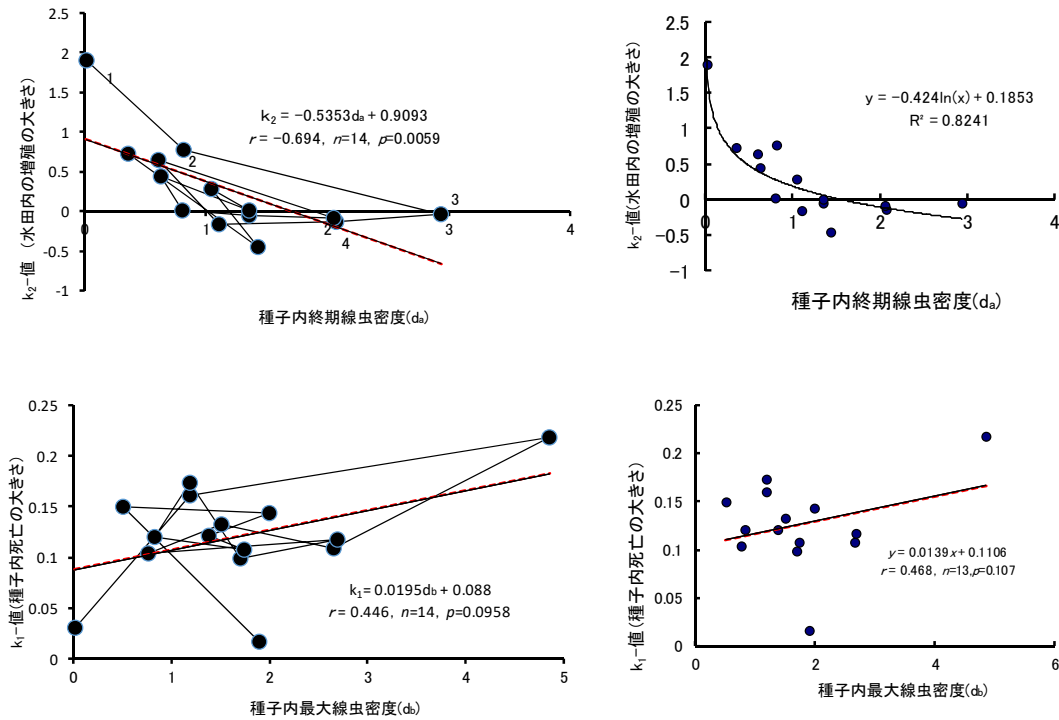


図3.11. イネシンガレセンチュウの種子内最大線虫密度および種子内終期線虫密度とk-値との関係

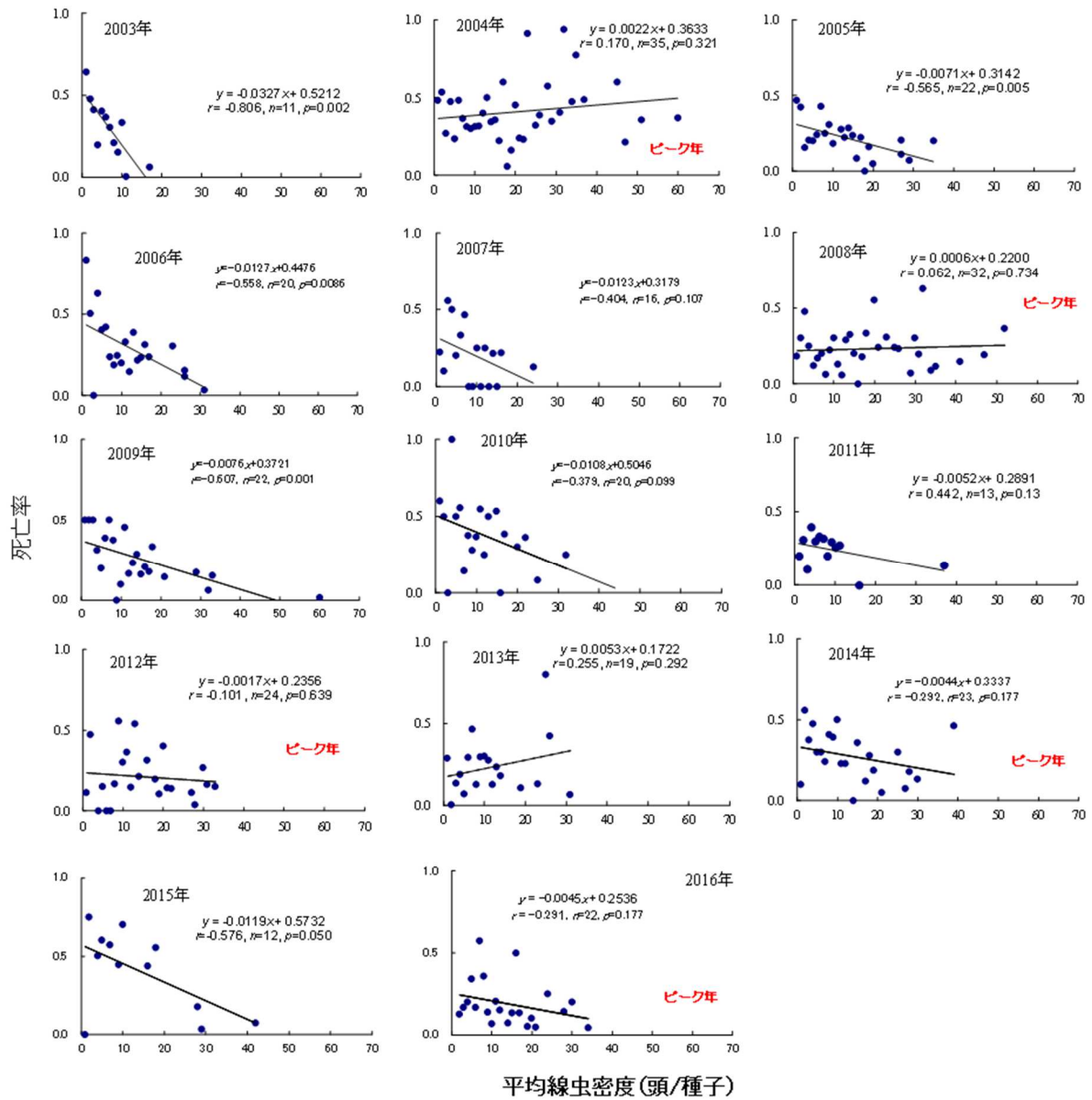


図3.12. イネシンガレセンチュウ平均線虫密度と死亡率の年次的変化

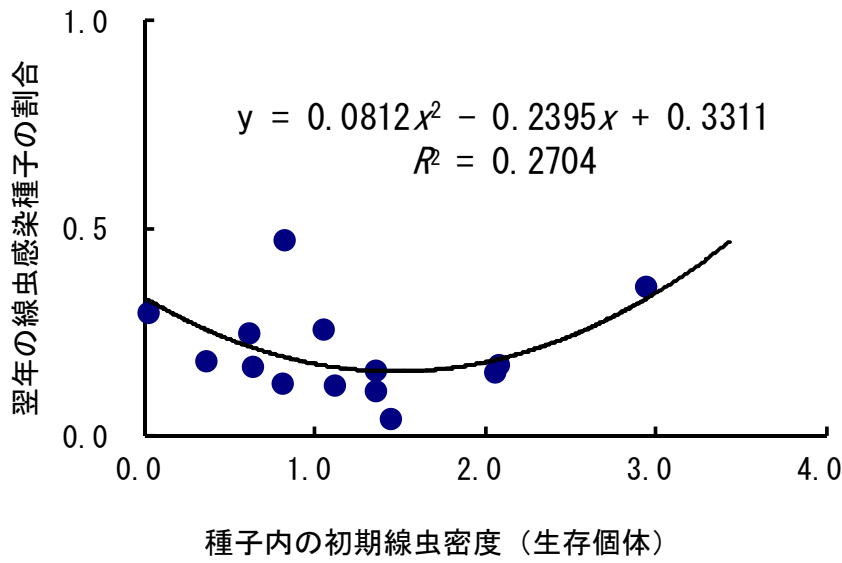


図3.13. イネ種子内のイネシンガレセンチュウ生存個体数と翌年の線虫感染種子の割合の関係

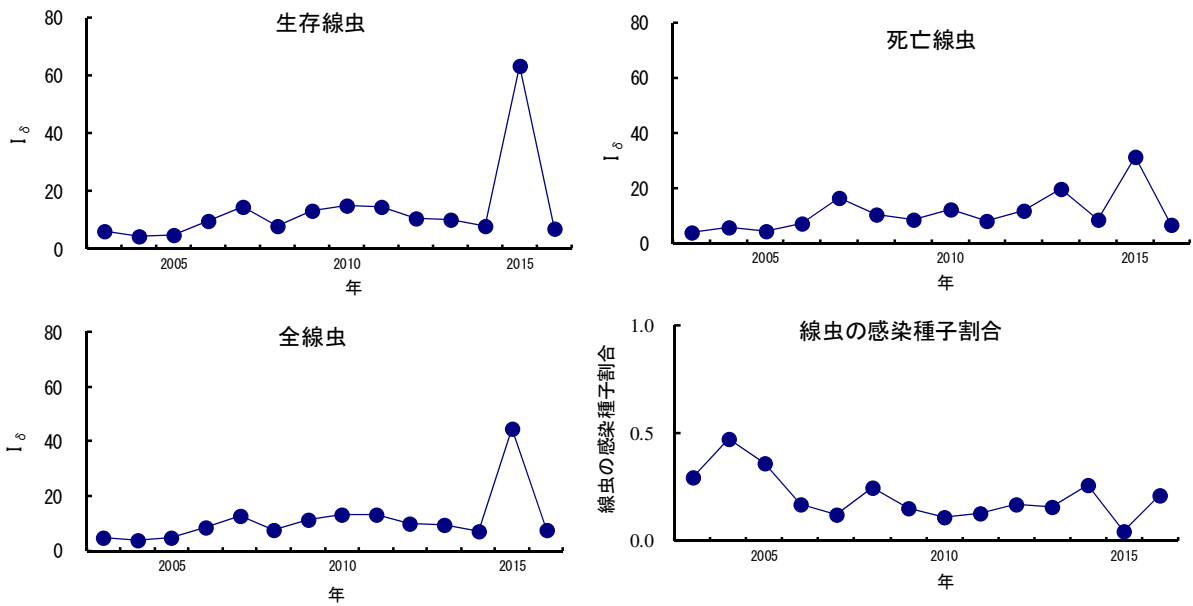


図3.14. イネ種子間のイネシンガレセンチュウの分布集中度(I_d)と線虫感染種子割合の年次変動

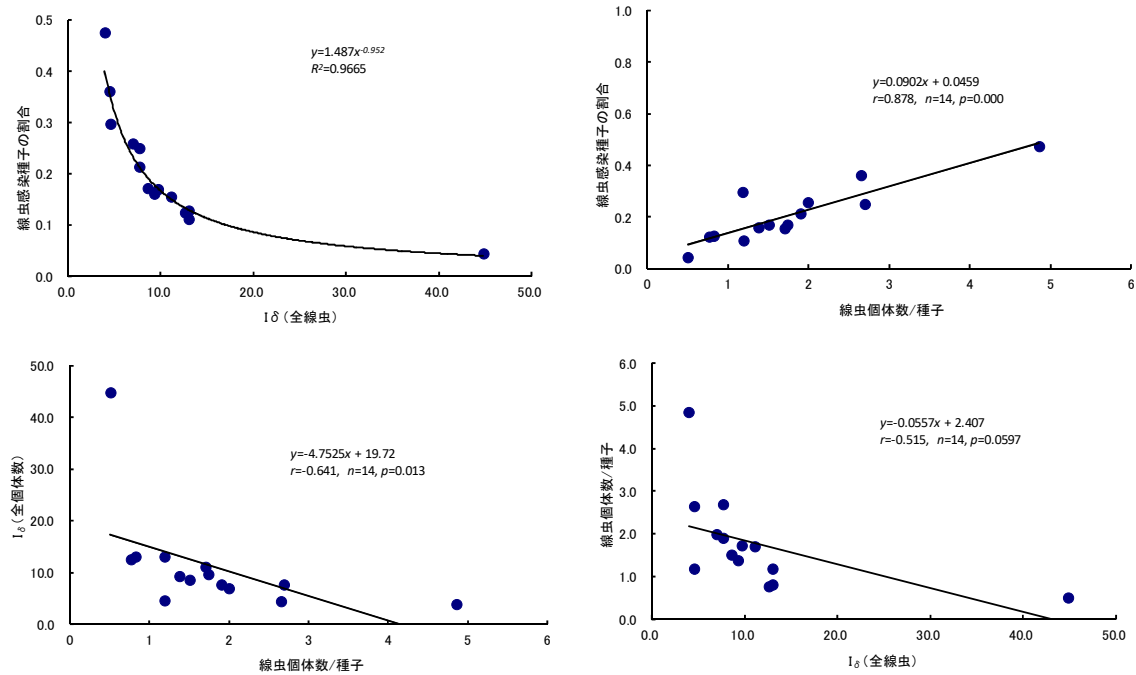


図3.15. イネ種子当たりのイネシンガレセンチュウの生存個体数, 全線虫の分布集中度(I_{δ})および線虫感染種子割合の関係

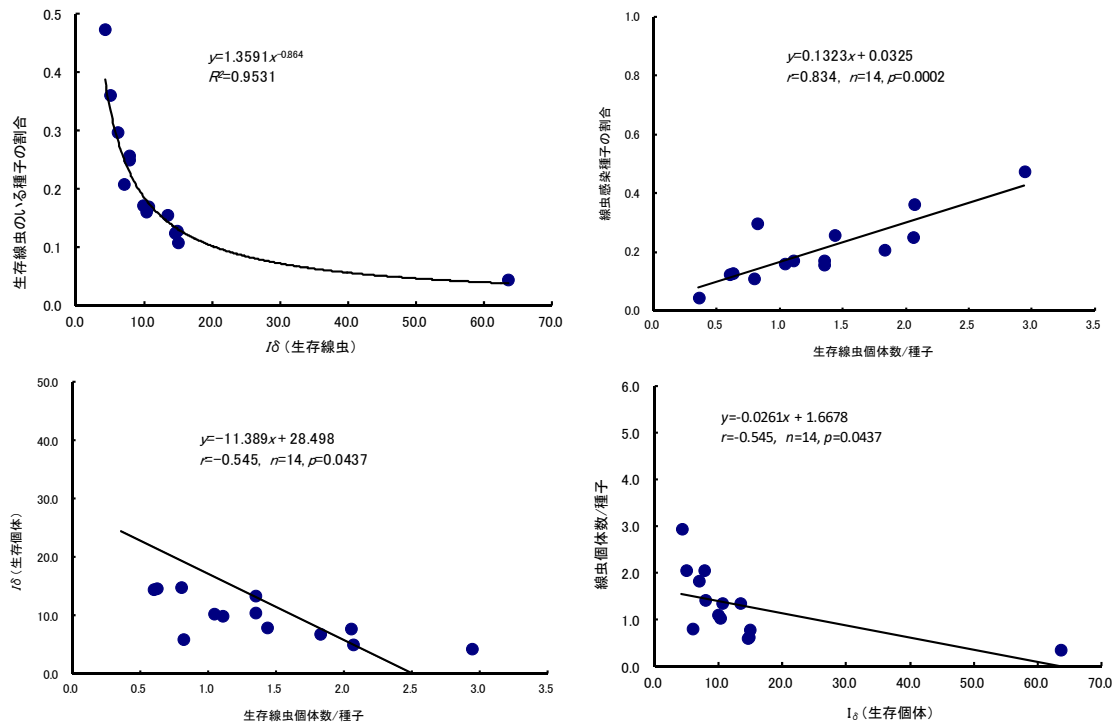


図3.16. イネ種子当たりイネシンガレセンチュウの生存個体の分布集中度(I_{δ})および生存個体の存在する種子割合の関係

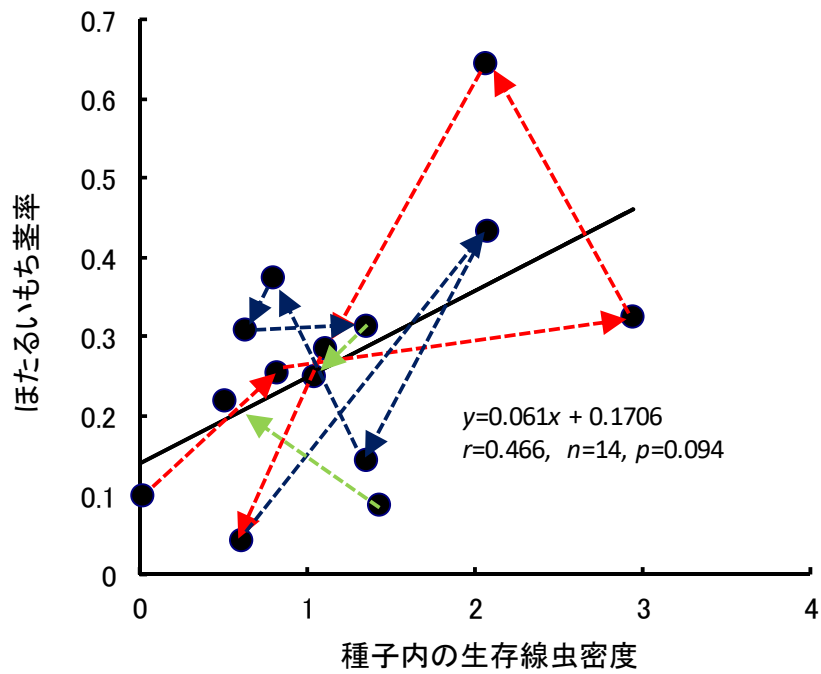


図3.17. イネ種子当たりのイネシンガレセンチュウ密度と翌年のほたるいもち茎率の関係
 実線は全体の回帰直線を表す。矢印は年次変化を示す。

第4章 イネ種子内のイネシンガレセンチュウの生態

日本の線虫個体群の生活はイネの栽培と関係し、イネ種子内での増殖、種子内での越冬、水に浸漬された種子からの移出、育苗箱と水田における分散、栄養成長期のイネの摂食、開花前の花への侵入というように、1年のサイクルを持つ。本章では、イネ種子内の線虫の生存と種子の生長・成熟や非生物的環境の関係を実験的に解析し、線虫とイネの種間関係を明らかにした。

4.1. イネ穎花に侵入したイネシンガレセンチュウと種子の生長・成熟

線虫がイネに感染すると、イネの葉は濃緑となり、葉長は短くなり、葉の先端が通常縮れ、穂の長さは短くなり、種子数は少なくなり、玄米は薄くなり、黒点米の割合が多くなる。種子内の線虫数が少ないと、種子の充実度（種子の胚乳量の指標）は低下するが、種子内の線虫密度が高いと、種子充実度は高くなる（Togashi & Hoshino, 2001, 4.4 節参照）。水田では、ほたるいもちの被害が大きくなるほど種子の平均充実度は小さいが、中～多発圃場では多数の線虫が寄生する種子の充実度は高い（Togashi & Hoshino, 2001）。しかし、このような現象を引き起こすメカニズムは不明である。また、イネの穎花に侵入した線虫が種子内で種子の充実にどのような影響を与えているのかについても明らかになっていない。

本研究の目的は、線虫が水稻種子の胚乳の発達に与える影響を明らかにすることである。このため、上位3葉を切除し、光合成産物の穂への転流を変えることによって、種子の肥大を変化させる条件を作出し、その条件下での種子内の線虫数と種子重量の関係を検討した。

材料と方法

イネ：線虫無感染水稻種子‘ヒノヒカリ’50粒を2005年5月18日に発芽のために水に浸漬した。苗を育てるため、殺菌した土壌を入れたプラスチック製の育苗箱に発芽4日後の種子を播種し、25℃で3日間保ち、それから、広島県東広島市の広島県立農業技術センターのビニルハウスに移した。

2005年6月15日に、センターの圃場において、面積200cm²のワグネルポット33個に、2.6葉期の苗（第1葉および第2葉は完全に伸張し、伸長中の第3葉が60%の長さになっている苗）を1本ずつ移植した。

肥料は6月20日に窒素14%、リン酸14%、カリ14%を含む肥料（アラジン444）を1ポット当たり0.43gを施用した。

線虫：広島県作木村（現、三次市作木）（北緯34°51'53.1"，東経132°43'8.2"）で2001年9月中旬に「ほたるいもち」多発圃場の水稻‘コシヒカリ’から種子を採集した。これらの種子は使用するまで全暗条件の5℃、湿度30%で保存した。

2003年12月5日にこれらの種子50粒から大量分離法（2.2節）によって線虫を分離した。そして、これらの線虫から無作為に選んだ30頭の線虫を無菌的にアイソレート（系統）とし、2005年4月7日にこの系統の一部を三角コルベン内の大麥上の*Botrytis cinerea* 菌そうに移し、暗条件の25℃で増殖した。その後実験に使用するまで5℃で保存した。

線虫接種：2005年8月24日に供試したイネの第4葉，第5葉を全て切除した。さらに，穎花に転流する栄養を段階的に変えるために，3段階の処理を葉に施した。すなわち，1) 止葉，第2葉，第3葉の切除，2) 止葉，第2葉，第3葉のそれぞれを葉長の1/2で切除，3) 切除無しという3段階の処理を行った。それぞれ反復は11茎とした。

線虫を30mlの水に入れて線虫浮遊液を作成し，それを50ml容の管瓶に入れて，管瓶を60℃の温湯に30秒間漬けて線虫を熱殺した。流水で冷却後，水20 μ lあたり100頭となるように調整して，死亡線虫浮遊液を作成した。また，生存線虫の100頭/20 μ lの浮遊液を作成した。

2005年8月24日から2005年8月31日までの間にイネは出穂した。一次枝梗の中ほどに開花直後の3穎花を含む茎を選び，各茎の1穎花に生存線虫100頭（浮遊液20 μ l）を，他の1穎花に死亡線虫100頭（浮遊液20 μ l）を，残りの1穎花に滅菌水20 μ lを，それぞれマイクロピペッター（エッペンドルフリファレンス）で接種した。その後すぐに，当該の茎の未接種の穎花や種子を全て切除した（1穂に各処理をした1種子ずつ計3種子ある状態）。1ポットあたり5から6茎についてその作業を行った。

イネ種子を2005年10月1日に収穫し，2005年10月28日までビニルハウス内で乾燥した。乾燥した種子は種子重量の測定と線虫調査を行うまで5℃の暗条件で保存した。

線虫調査：電子天秤（type EB-330 Shimadzu Corporation Kyoto Japan）を用いて，種子の重量を計測した。Hoshino & Togashi 法を使って線虫を分離し，生存線虫と死亡線虫を計数の後，種子に残存した線虫についても計数した。

統計処理：二元配置分散分析を用いて，切葉レベルと線虫接種がイネの種子重量に及ぼす影響を比較した。収穫期に回収された種子あたりの生存または死亡線虫数と種子重量の関係を切葉レベルごとに直線回帰分析を行った。

結果

イネの種子重量は，接種源と切葉レベルによって影響を受けたが，それらの交互作用による影響は受けなかった（二元配置分散分析，接種源，F2, 481=28.3, $p<0.001$ ；切葉レベル F2, 481=5.58, $p=0.04$ ；交互作用 F4, 481=1.21, $p>0.05$ ）。平均種子重量は，水接種，死亡線虫接種，生存線虫接種の順に減少した（表 4.1）。また，平均種子重量は，葉の無切除のイネ株より止葉，第2葉および第3葉を全て切除したイネ株で有意に軽かった（表 4.1）。

生存線虫を接種した場合，葉の無切除と全葉切除において，種子あたりの分離線虫数と種子重量の間に正の相関がみられたが，他の実験条件下では有意な相関はみられなかった（図 4.1）。すなわち，生存線虫を接種した場合，止葉，第2葉および第3葉を切除していないイネ株の種子では，分離された線虫数と種子重量の間に有意な相関が認められた $y=0.3800x + 12.687$ ($r=0.390$, $n=59$, $p=0.0023$, y : 種子重量, x : 分離線虫数) (図 4.1)。また，止葉，第2葉および第3葉を全て切除したイネ株では，分離された線虫数と種子重量の間に $y=0.3356x+11.569$ ($r=0.397$, $n=57$, $p=0.0023$, y : 種子重量, x : 分離線虫数) の関係が認められた（図 4.1）。また，生存線虫を接種した場合，切葉のレベルでの分離線虫数には有意な差はなかった（Tukey 検定, $p=0.600$ ）（表 4.2）。

考察

全葉切除によって、平均種子重量は有意に減少した。このことは、出穂以降、止葉、第2葉および第3葉が穂に物質の転流を行うという知見（村山ら、1986）と一致した。また、水接種に比べて生存線虫の接種は平均種子重量を有意に小さくした。このことは、種子に蓄積される貯蔵物質が線虫の生存（と増殖）に利用されたことを示している。死亡線虫の接種も水接種より平均種子重量が小さくなった。このことは線虫の死体とそれを資源として増殖した微生物の影響を示すのかもしれない。

穎花に接種された線虫の増加は種子ごとに大きくばらついた。興味深いことに、種子が熟した後、種子内の線虫数が多いほど種子重量は重くなった。この関係は葉の切除量に関係なくみられ、しかも、葉の切除レベルの違いによる線虫数の違いはないことから、寄生者による宿主操作の結果であると考えられた。

表4.1. イネの葉の切除とイネシンガレセンチュウのイネ花への接種が種子重量に及ぼす影響

接種剤	生存線虫100頭接種 ¹⁾	死亡線虫100頭接種 ²⁾	水接種 ²⁾	平均 ²⁾
全葉切除	12.91±5.49a (56) ³⁾	17.00±7.41a (52)	18.09±8.64a (55)	15.96±7.58b
半葉切除	15.30±6.51b (53)	17.31±6.88a (49)	19.46±8.06ab (50)	17.32±7.33ab
無切除	14.54±4.78ab (59)	18.76±7.05a (58)	22.24±6.86b (58)	18.49±7.39a
平均 ¹⁾	14.24±5.66c	17.74±7.12b	19.99±8.01a	17.29±7.37

種子重量の平均値±SD(mg)を示す

二元配置分散分析の結果、切葉処理と線虫接種に交互作用がなかったため(p>0.05)、それぞれの要因で解析した。

1)異なる英小文字はクラスカルワリス検定5%水準で有意差あり

2)異なる英小文字はTukey検定5%水準で有意差あり

3)()に内数は反復数を示す。

表4.2. イネの葉の切除と生存線虫100頭のイネ花への接種が収穫後の種子あたり線虫数に及ぼす影響

接種剤	生存線虫100頭接種
全葉切除	3.96±6.25a (56)
半葉切除	3.98±5.47a (53)
無切除	4.88±4.90a (59)

1)異なる英小文字はTukey検定5%水準で有意差あり

2)()に内数は反復数を示す。

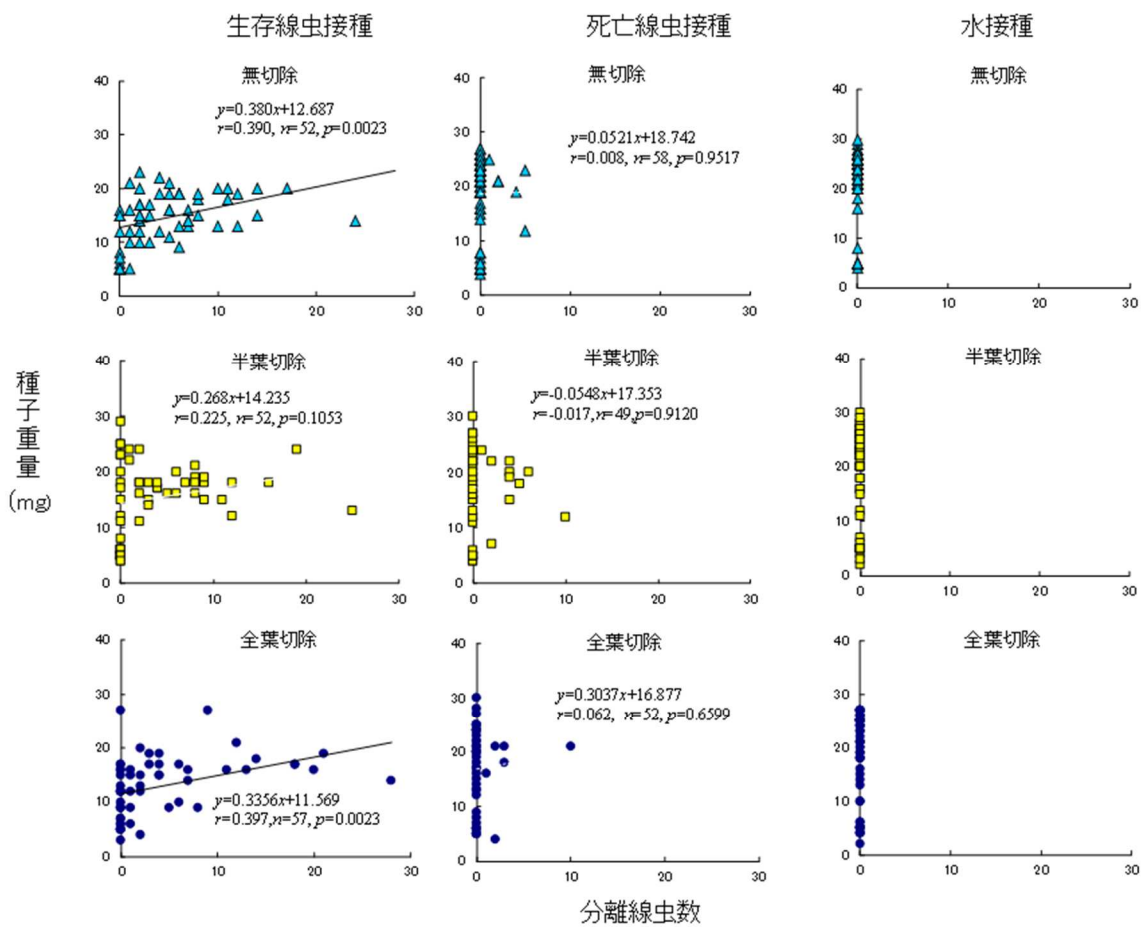


図 4.1 イネシンガレセンチュウの生存個体, 死亡個体, 水をそれぞれ接種したイネ花が種子になった時に分離される線虫数(死亡個体を含む)と種子重量の関係
 △, □, ●は種子を表す。

4.2. 温度と時間がイネ種子内の線虫の生存に及ぼす影響

日本では、水稻は秋に収穫され、種子は低温で貯蔵される。そして、翌春、浸種・育苗されて、本田に移植される。線虫は水稻の外部寄生者である。線虫は穂に入り、25℃下で約10日間の短い世代時間で増殖し、種子内では乾燥状態の成虫または4期幼虫で存在している (Huang & Huang, 1972; Huang et al., 1972; Huang & Chiang, 1975; Nandakumar et al., 1975; Hollis & Keoboonrueng, 1984; 千代西尾・中澤, 1988)。

Yoshii & Yamamoto (1950b) は、種子を3年間保存した後でも線虫が高い生存率を維持することを報告した。深野 (1962) はイネ収穫後の秋から翌年の夏まで高い生存率を保ったと述べている。収穫から翌春までのイネ種子の保存状態と線虫の死亡率の関係は翌春の初期密度に影響すると考えられる。また、日本では低温・乾燥条件でイネ種子は長期間保存されているが、保存温度と保存期間が線虫の生存に及ぼす影響は明らかにされていない。

そこで、越冬期の温度が線虫生存率に及ぼす影響と種子の低温保存期間が線虫生存率に及ぼす影響を調べた。

材料と方法

越冬時の温度が線虫の生存に及ぼす影響 (実験1)

1999年9月26日広島県広島市安芸区中野のほたるいもち多発水田のイネ‘ヒノヒカリ’6株をサンプリングした。サンプリング後、すぐに種子を分離し、1999年10月14日まで種子を乾燥した。10月14日に、100種子について、Hoshino & Togashi 法 (1999) を使って生存線虫数と死亡線虫数を調べた。残りの種子を-5±1℃, 5±1℃, 10±1℃, 20±1℃, 25±1℃の恒温器に暗条件で入れ、2000年4月21日 (190日後) まで保存した。対照の種子は、ビニール袋に入れて雨水が入らないようにし、直射日光の当たらない屋外に同じ期間置いた。Hoshino & Togashi 法により、種子内の生存線虫数および死亡線虫数を調べ、生存率を算出した。

温度5℃の種子保存期間が線虫の生存に与える影響 (実験2)

用いたイネ種子は実験1と同じである。1999年10月14日まで乾燥した種子を5±1℃の恒温器に入れて、暗条件で保存した。190日後, 285日後, 382日後, 933日後, 1,313日後, 2,644日後, 3,497日後および4,687日後に種子を取り出し、Hoshino & Togashi 法により、種子内の生存線虫数および死亡線虫数を調べ、生存率を算出した。

温度-30℃の種子保存が線虫の生存に与える影響 (実験3)

2001年10月5日に広島県御調町のほたるいもち多発水田のイネ‘あきろまん’6株をサンプリングした。サンプリング後、イネ株を2001年11月15日まで乾燥してから種子を分離した。種子を5±1℃の条件の恒温器で2002年1月18日まで保管した。これらの種子を2002年1月18日に2群に分け、1群の種子を5±1℃に戻し、もう1群の種子を-30℃の恒温器に入れた (暗条件)。それらの種子を2006年12月6日 (1,783日後) および2012年10月26日 (3,937日後) まで保存し、Hoshino & Togashi 法により、種子内の生存線虫数および死亡線虫数を調べ、生存率を算出した。

統計的検定：実験1の温度条件の比較には2×7直交表検定、実験2の保存期間の比較には2×9直

交表検定、実験3の保存期間の比較には2×3直交表検定を用いた。いずれも、分析は有意差が検出されたとき、ペアワイズの比較はBonferroni補正によって2×2直交表検定を行った(山村, 1993)。

結果

実験1の開始から190日後、種子の保存温度10℃、5℃および-5℃の線虫生存率は保存温度25℃と20℃よりも有意に高かった(2×7直交表検定Bonferroni補正 $H=87.12$, $p=0.000$) (表4.3)。また、冬季の変動温度より5℃の定温は線虫の生存に適することが示された。

実験2では、実験開始前の線虫生存率と5℃で種子を保存してから190日後、285日後、382日後、933日後、1,313日後、2,644日後、3,497日後および4,687日後の線虫生存率の間に有意な差は認められなかった(2×9直交表検定Bonferroni補正 $H=12.54$, $p=0.129$) (表4.4)。

実験3では、種子の保存温度-30℃で1,783日間保存した場合、線虫生存率は48.7%であり、保存前より低下した。-30℃に移して1,783日後から3,937日後までの間に、生存率は有意に低下しなかった(2×3直交表検定Bonferroni補正 $H=11.89$, $p=0.003$) (表4.5)。

考察

実験1の結果から、乾燥条件下で種子を10℃から-5℃までの一定温度で保存すると、秋から翌春までの約半年の間で種子内の線虫の生存率は低下しないと考えられた。深野(1962)は、種子内の線虫の生存率は、秋に収穫してから181日後に74.3%、273日後60.1%、456日後0%と報告した。深野(1962)は保存前の線虫生存率を調べていない。しかしながら、越冬直後(収穫の181日後)の生存率は70%以上と高く、本研究の結果と一致すると考えられる。

日本の西南暖地の冬の平均気温は10℃以下である。農家は納屋などでイネ種子を保存する。実験1では、種子保存温度が10℃、5℃および-5℃である場合、線虫生存率が低下せず、冬季の屋外の変温条件下の線虫生存率が62%であった。このため、日本の西南暖地の農家の納屋では、線虫の越冬は可能である。

イネ種子を25℃または30℃の一定温度に置くと、933日後の線虫生存率は0%となる(星野・富樫, 未発表)。これに対して、5℃で保存すると、4,687日後でも線虫生存率は低下しなかった。通常、種子は5℃以下で長期に保存されている。そのため、種子の長期保存によって線虫は死滅することはないであろう。種子を-30℃で1,783日間保存した場合、保存前と比較して有意な線虫生存率の低下があった。しかしながら、その値は49.0%であり、かなり高く、3,937日後では58.9%と保存前と有意な差はなかった。

貯蔵されたイネ種子の発芽率を90%に保つためには、温度5℃、含水率13.7%以下の場合、4年1ヵ月が、貯蔵温度0℃、含水率15.4%以下の場合、4年1ヵ月が限度であるが(加藤ら, 1966)、日本では発芽率の維持のために、イネ種子の5℃以下の低温貯蔵が一般的に行われている。また、長期貯蔵のために氷温保存も行われている。本研究は、種子の低温保存の間に線虫は死滅しないことを示した。このため、保存前の種子の線虫感染率の測定および温湯浸漬や薬剤による保存後の種子の殺線虫が推奨される

Aphelenchoides ritzemabos は-5℃の土壤中で15ヵ月生存していた(French & Barraclough, 1962)。

Aphelenchoides fragariae は-80℃の低温でも耐性があった (Jagdale & Grewal, 2006)。このように、*Aphelenchoides* 属の種では低温に対する耐性を持つものがあることが明らかになっている。

野生イネは熱帯性の多年生植物である。そのイネは、過去 12,800 年前のヤンガー・ドリラス期に、中国の揚子江流域で 10℃以下の低温の環境におかれ、現在の一年草に進化したと考えられている (甲元, 2001)。インドでも種子内で脱水状態の線虫休眠個体がみられる。通常、休眠個体は乾燥とともに低温に対する耐性を持つ。そのため、中国に移入する前の線虫は低温に対して前適応があったと考えることが合理的である。線虫は中国から日本に一年生のイネとともに伝来したと考えられる。イネ以外の寄主としては、エノコログサ、メヒシバ、カヤツリグサがあるが、冬季はほとんどいなくなる (吉井, 1951)。畑状態で土中ではわずかながら越冬するが、乾燥稲中の線虫数の方が多数の線虫が越冬する (吉井, 1951)。このことから、線虫は日本に伝来して以来、イネとともに生きてきたと考えられる。

熱帯地域の線虫個体群の低温耐性の程度とばらつきを調査し、形質の分化の程度を明らかにすることは興味深い。

表4.3. 越冬時の温度条件がイネ種子内のイネシンガレセンチュウの生存率に及ぼす影響

保存条件	調査種子数	生存線虫数	死亡線虫数	生存率(%)*
越冬前	100	234	61	79.3 a
25℃	100	81	76	51.6 b
20℃	100	66	78	45.8 b
10℃	100	110	40	73.3 ac
5℃	100	124	27	82.1 a
-5℃	100	71	37	65.7 ab
屋外	100	109	67	61.9 bc

*異なる文字を有する生存率は2×7直交表検定5%水準で有意差あることを示す (ボンフェローニ法)

表4.4. イネシンガレセンチュウに感染したイネ種子の5℃での保存期間と線虫の生存率の関係

調査日	保存期間(日)	調査種子数	生存線虫数	死亡線虫数	生存率(%)*
保存前 (1999年10月14日)	0	100	234	61	79.3 a
2000年 4月21日	190	100	124	27	82.1 a
2000年 7月25日	285	100	263	70	79.0 a
2000年10月30日	382	100	344	115	74.9 a
2002年 5月 4日	933	100	323	123	73.5 a
2003年 5月19日	1313	70	85	32	72.6 a
2007年 1月 9日	2644	50	117	44	72.7 a
2009年 5月11日	3497	50	102	38	72.9 a
2012年 8月13日	4687	30	76	28	73.1 a

*同一の文字を有する生存率は2×9直交表検定で有意差がないことを示す

表4.5. イネシンガレセンチュウに感染したイネ種子の-30°Cでの保存期間
と線虫の生存率の関係

調査日	保存期間(日)	調査種子数	生存線虫数	死亡線虫数	生存率(%)*
2002年 1月18日	0日	60	149	92	61.8 a
2006年12月 6日	1783日	100	204	212	49.0 b
2012年10月29日	3937日	60	73	51	58.9 ab

*異なる文字を有する生存率は2×3直交表検定5%水準で有意差あることを示す(ボンフェローニ法)

4.3. イネ種子内のイネシンガレセンチュウ密度と性比の関係

線虫の生殖様式として、ロシアで両性生殖が報告され (Sudakova & Stoyakov, 1967), 台湾では単為生殖が報告された (Huang et al., 1979)。深野 (1962) は本種の雄比が 3~8.1% であり, 雌が雄に比べ極めて多いと報告した。Huang et al. (1979) は雄比が 22.7% であると報告した。日本の個体群の雄比は台湾の個体群と比較して低い。しかしながら, 日本の個体群の生殖様式の報告はこれまでない。性比と生殖様式を明らかにすることは, 線虫の個体群の性質を明らかにするために重要である。また, 線虫の個体群管理のためには性発現についての理解が必要である (Triantaphyllou, 1973)。このため, 日本の線虫の個体群管理を考えるうえでも, 性比を知ることは重要であると考えられる。そこで, 広島県の個体群の性比および生殖様式を明らかにした。

材料と方法

線虫の採集: 2001 年 9 月 13 日に広島県三次市作木 (旧広島県双三郡作木村) のほたるいもち多発圃場 (‘コシヒカリ’) を 6 区画に分割し, 各区画から 1 株を無作為に抽出して, 株元から切り, その後, ガラス室内でハサ掛けにして 2001 年 10 月 20 日まで乾燥させた。その後, 種子を採取して, 気温 5°C, 湿度 22.4%, 全暗の条件で保存した。

線虫の分離: 線虫は各株から無作為に 3 穂を選び, 各穂から 20 粒の種子をランダムに抽出して, Hoshino & Togashi 法によって, 各種子から線虫を分離し, 生死別, 性, 発育ステージを記録した。生死については, 線虫を針で突いても動かない場合, その個体が死亡していると判断した。

線虫の飼育: 径 3.5cm のプラスチックシャーレ上の PDA 培地で *Botritis cineria* を培養した。25°C で *B. cineria* の径 3.5cm の菌そうができた後, それを線虫の餌とした。前述の種子から游出した線虫から幼虫または雌成虫を 1 頭ずつ取り上げ, 菌そうに接種した。幼虫個体飼育 3 反復, 雌成虫個体飼育 3 反復, 雄成虫が分離された種子にいた雌成虫個体飼育 2 反復, 雌成虫複数飼育 8 反復 (雌成虫の 2 頭飼育 1 反復, 4 頭飼育 3 反復, 5 頭飼育 2 反復, 8 頭飼育 2 反復), 雄成虫 1 頭と雌成虫 1 頭の混合飼育 3 反復を作成した。飼育は 25°C で行った。約 3 週間後に増殖したかどうかを調査した。

室内個体群の幼虫の飼育: 広島産の線虫室内個体群から 65 頭の幼虫をランダムに取り出し, 1 頭ずつ *B. cineria* 菌そう (3.5mm 直径のシャーレ) に接種した。その後, 25°C におき, 約 3 週間後に線虫の性と数を調査した。

結果

無作為に抽出した種子 360 粒から 1,106 頭の線虫が分離された。そのうちの一部は死んでいた。種子あたりの線虫密度は 6.92 頭であった。その雄比は, 生存成虫で 0.164, 死亡成虫で 0.222, 生存成虫と死亡成虫を込みにした場合 0.184 であった (表 4.6)。

死亡が起こる前の種子内線虫数 (=生存個体数+死亡個体数) が成虫の雌, 雄の死亡に及ぼす影響は認められなかったが, 幼虫の死亡については弱い相関があった (雄 $r=0.0504$, $n=25$, $p=0.796$, 雌 $r=-0.214$, $n=25$, $p=0.305$, 幼虫 $r=-0.336$, $n=24$, $p=0.100$) (図 4.2)。

種子内の生存個体と死亡個体の合計数と成虫の雄比の間に有意な相関はなかった ($r=0.138$, $n=25$,

$p=0.511$) (図 4.3)。死亡が起こる前の種子内の線虫密度に関係なく、雄成虫の割合は 0.18 であった (表 4.5)。

種子内の生存個体数と生存成虫の雄比の間に有意な正の相関があった ($y=0.0571x+0.1197$, $r=0.438$, $n=19$, $p=0.038$, y : 雄比, x : 種子あたり生存個体数) (図 4.4)。種子内で死亡が起こった後では、性比は種子内の線虫密度に依存して 0.12 から 0.25 まで増加した (図 4.3)。

種子から分離された幼虫は個体飼育しても増殖しなかった (表 4.6)。これに対して、雌成虫の個体飼育では、同一種子から雄成虫と一緒に分離された場合でも分離されなかった場合でも、増殖する場合があった (表 4.6)。雄成虫と一緒に雌成虫を飼育した場合、すべてのシャーレで増殖が見られた (表 4.6)。

実験個体群から分離した 65 頭の幼虫の個体飼育は、全く増殖を示さなかった (表 4.7)。

考察

雌成虫が雄成虫と一緒に種子から分離されてもされなくても、分離後に増殖する場合が見られた。雄が分離された種子では種子から分離している間に (個体飼育されるまでに) 雌成虫は雄と交尾を行った可能性があった。しかしながら、雄成虫が分離されなかった種子から得られた雌成虫が増殖したことから単為生殖の可能性を考慮する必要がある。それに対して幼虫の個体飼育の結果は単為生殖を否定した。したがって、雌成虫は休眠前に交尾を行い、休眠後に体内の受精囊の精子を使って繁殖を行ったと推測される。これらの結果から本個体群は、両性生殖すると考えられた。

Huang et al. (1979) は、線虫の飼育すると、その雄比は 1~8 週の間約 7% から 40% に増加すると報告した。しかしながら、彼らは飼育の初期密度を記さなかった。表 4.7 の雌単独飼育の場合に極めて低い雄比が示された。その理由として 2 つ考えられる。1 つは、雌成虫が子供の性比を調節して産む場合である。この実験では他の雌がない時、雌は雄の子を極めて少なく産んだことが考えられる。もう 1 つは、十分な餌条件の下で雄から雌への性転換が起こる場合である。線虫では、性転換が起こるかどうかは不明である。

種子内の生存線虫数と生存成虫の雄比の間に正の相関があった (図 4.3)。線虫はイネの穎花に入り、急速に増殖し、それから種子の乾燥につれて、内穎と外穎の内側の表面の種子の基部に成虫と 4 期幼虫で無水状態となって休眠する (Huang & Huang, 1972, 1974 ; Nandakumar et al., 1975 ; Hollis & Keoboonrueng, 1984 ; 千代西尾・中澤, 1988)。また、出穂直後には止葉葉鞘の上部に数頭の線虫が残っているのが見られるが、穂の完熟後では穂以外に線虫はいない (後藤・深津, 1952) ので、一旦、穎花に侵入した線虫は種子内部で増殖し、他の種子に移動しないと考えられる。したがって、種子毎に雄比が決まると考えられる。このため、イチジクコバチ (*Blasophaga psenes*) など重複感染する動物のように線虫の雄比が低く抑制されているのは、種子内での線虫の局所的配偶者競争 (Hamilton, 1967) の存在の可能性が示唆される。

線虫には両性生殖の個体群だけでなく、ロシアには単為生殖の個体群も存在する (Sudakova & Stoyakov, 1967)。今後、繁殖様式の異なる個体群間の比較を行い、線虫における性比と雌雄の適応度、個体群の増殖率の関係を明らかにする必要がある。

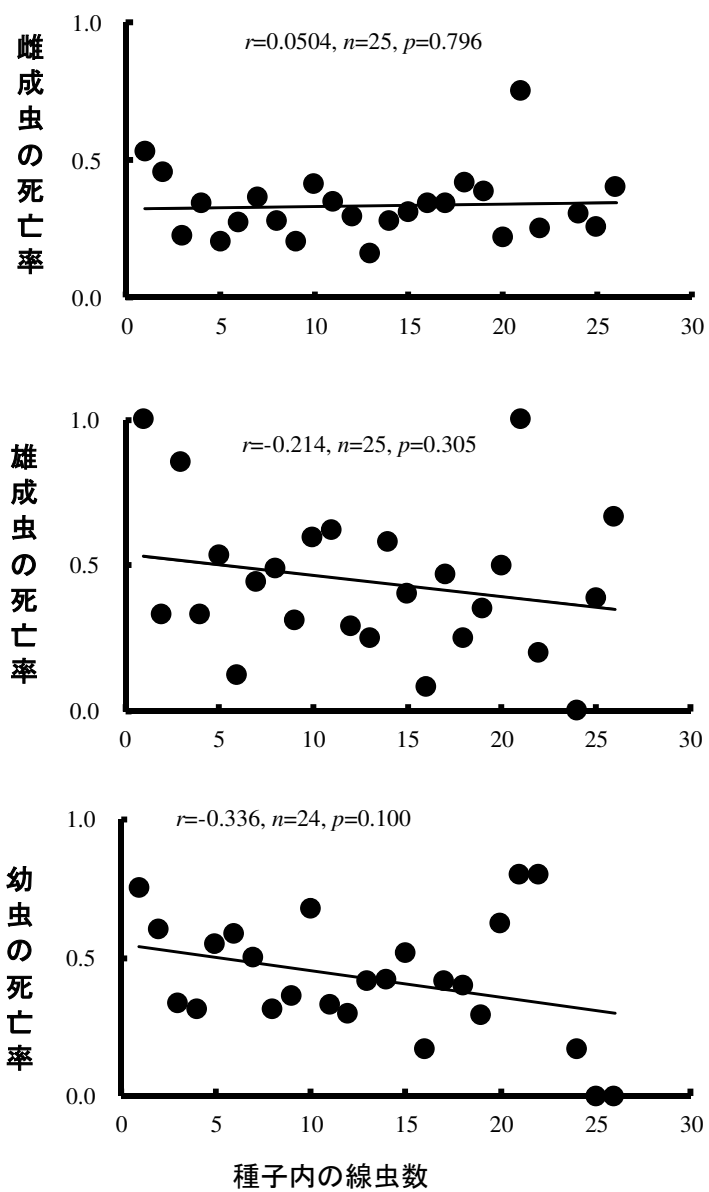


図4.2. イネ種子内のイネシンガレセンチュウの個体数と発育ステージ別の死亡率の関係

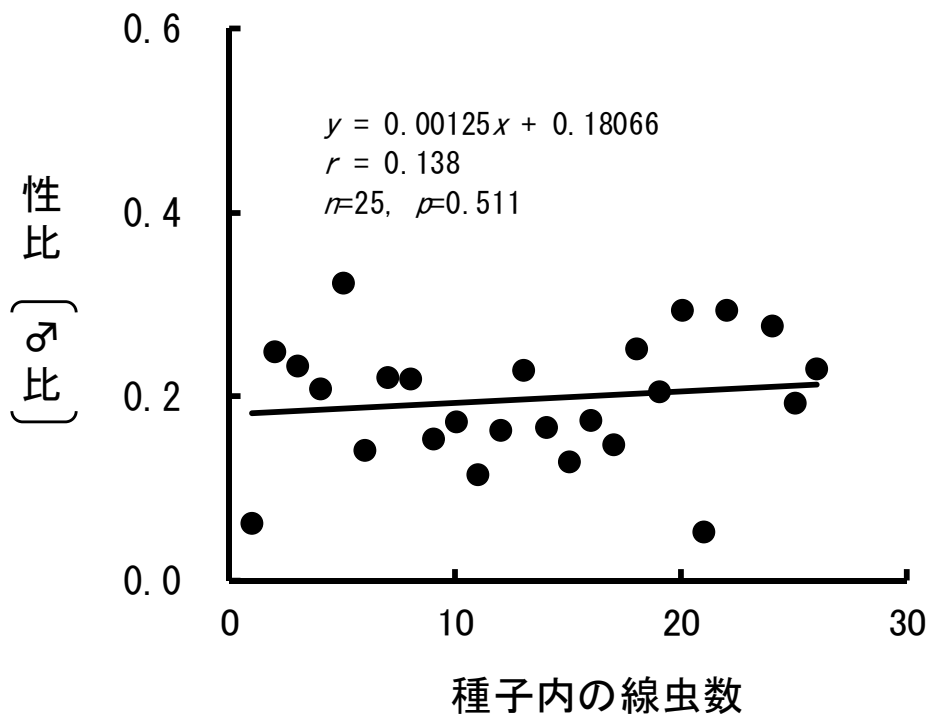


図4.3.イネ種子内のイネシンガレセンチュウ
 個体数と性比の関係

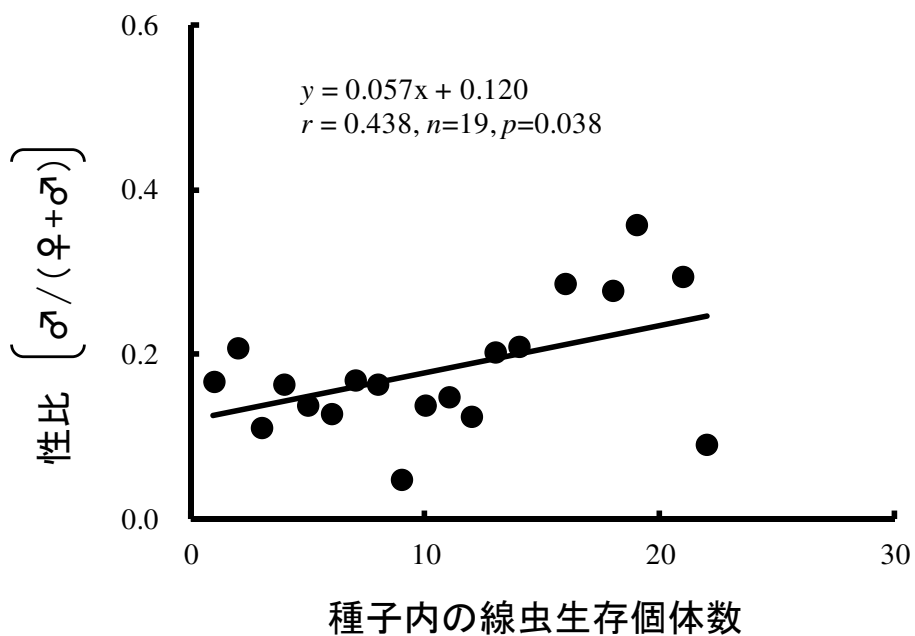


図4.4. イネ種子内のイネシンガレセンチュウの生存個体数
 と性比の関係

表4.6. イネシンガレセンチュウの性比と線虫個体数の関係

発育段階別/ 性比	イネ種子内の線虫数*		
	生存個体	死亡個体	計
雌成虫	3.07±3.46	1.54±2.34	4.61±4.76
雄成虫	0.60±1.09	0.44±0.89	1.04±1.49
幼虫	0.69±1.17	0.58±1.12	1.27±1.86
合計	4.37±4.61	2.55±3.18	6.92±6.43
成虫の性比 [§]	0.164 (145/882)	0.222 (105/474)	0.184 (250/1106)

§性比は成虫における雄の割合である。

*平均値±S.D

表4.7. イネ種子から分離したイネシンガレセンチュウの雌成虫の増殖

と種子内の雌成虫の関係

発育 ステ ージ	個体数 /シャーレ	条件	供試 数	増殖 した 数	増殖した 線虫の雌 の割合	増殖 した 割合
幼虫	1	—	3	0	0.00	0.00
雌成虫	1	雄成虫のいない 種子から分離	3	2	0.50	0.67
雌成虫	1	雄成虫のいた種子 から分離	2	1	1.00	0.50
雌成虫	2-8	—	8	8	0.50	1.00
雌成虫	1	雄成虫と飼育	3	3	0.00	1.00

飼育開始2001/11/30, 飼育終了:2001/12/23。

表4.8. イネシンガレセンチュウ雌成虫と幼虫
の個体飼育と増殖の関係

発育 ステ ージ	供試 数	増殖 した 数	増殖 した 割合	性比*
幼虫	65	0	0.0	0.0000
雌成虫	40	32	0.8	0.0015 (♂2/♀1298)

飼育開始2002/11/1,飼育終了2002/12/17。

*性比は成虫における雄の割合である。

4.4. イネ種子におけるイネシンガレセンチュウの分布パターンと死亡率

種子内の線虫数は種子毎に大きく異なる (Yoshii & Yamamoto, 1950b; 深野, 1962)。つまり、線虫はイネ種子間で集中分布を示す。宿主個体におけるの集中分布は動物の直接寄生者 (中間宿主のいない寄生者)、例えば *Necator americanus* (Anderson, 1980), *Ascari lumbricoides* (Croll et al., 1982), *Schistosoma mansoni* (Morand et al., 1993) で観察されている。そのような寄生者は宿主個体群の中で安定的に存続する。数学的な研究から、宿主個体群内での寄生者の集中分布は寄生者の安定的存続に重要な役割を果たすことが示されている (Anderson, 1981)。特に、寄生者の高い分布集中度は交尾確率を高める。その結果、宿主あたりの寄生者の平均密度が低くても、寄生者個体群の絶滅はおこりにくい。線虫の場合、その個体群の存続に及ぼす集中分布の効果に焦点を当てた研究はなかった。水田内の線虫個体群密度が増加するにつれて、種子の平均重量が減少するが (Yoshii & Yamamoto, 1950a; 深野, 1962), 種子内の線虫数と線虫死亡率の関係は研究されることがなかった。

この節の目的は水田レベルにおけるほたるいもちの発生率、イネ種子の平均的大きさ、種子あたりの平均線虫密度の関係を明らかにし、感染イネの種子間の線虫の分布パターンの特徴を記載することである。さらに、種子レベルにおける、種子あたりの線虫密度、線虫のいる種子の大きさ、線虫の死亡率の関係を明らかにすることである。

材料と方法

イネ種子と線虫調査：1998年に12圃場を広島県尾道市の6地域で選んだ。各圃場のほたるいもちの発生程度は広島県の旧甲山農業改良普及センター尾道支所によって、1998年9月1日と2日に調査され、発生程度 (IL) はほたるいもちの病徴を示したイネ株の割合によって4段階に分けられた。無発生 $IL=0\%$ 、少発生 $0 < IL \leq 30\%$ 、中発生 $30\% < IL \leq 60\%$ 、多発生 $60\% < IL$ 。12圃場はそれぞれ少発生5圃場、中発生2圃場、多発生5圃場であった。1998年9月1日と2日に各圃場からのイネ ('ヒノヒカリ') 1, 2株をランダムに採取した。1998年9月24日と29日には穂が乾燥していたので、各株から1穂をランダムに選んで採り、ポリ袋に入れた。そして、穂をすぐに4°Cの恒温器に入れた。この方法は種子生産者や農家の行う方法とほぼ同じであった。ただし、彼らは収穫後に2~3週間天日でイネを乾燥する。

9月24日に採集した穂の場合、採集の65~82日後に、9月29日に採集した穂の場合、採集の30~63日後に各穂から種子を分離した。種子を5°Cで4,687日間保存しても線虫の死亡率は増加しない(4.2節)ので、調査時の線虫の死亡率は採集時の死亡率とみなした。各穂から得られた全ての種子、あるいはランダムに抽出された50粒について、種子充実度を調査した。種子充実度を5段階に分け、胚乳の発達程度をあらわした (図4.4)。すなわち、種子充実度1の種子はわずかに膨れているが、内部は中空である。種子充実度2の種子は少し膨れ、内部には薄い層状の胚乳を含む。種子充実度3の種子はかなり膨らむが、胚乳の発達が悪い。種子充実度4の種子は十分に膨らみ、よく発達した胚乳を有する。種子充実度5の種子は、胚乳が発達しすぎて内穎と外穎のふちが少し開いてその隙間から胚乳がはみ出す。各種子内の線虫の生死とその計数には Hoshino & Togashi 法を使用した。

ほたるいもちの発生レベル、種子の平均充実度、種子あたり平均線虫数の関係：水田のほたるいも

ちの発生レベルについて線虫個体群とイネ種子個体群の特徴を明らかにするために、発生レベルごとに複数の水田のデータをまとめた。そして、種子充実度と種子あたりの線虫数をほたるいもち発生の3レベル間で比較した。

各水田は灌漑のために畦で囲まれている。そのため、水田は、線虫の感染に対して互いに独立している。水田レベルにおける線虫とイネの関係を明らかにするために、各水田の平均種子充実度、種子あたり平均線虫数（密度）および種子内の線虫死亡率を算出した。種子内の線虫死亡率は各水田の全死亡線虫数を全線虫数（生存と死亡）で割って求めた。

種子あたりの線虫数、線虫死亡率と種子充実度の関係：種子内の線虫数と宿主生存率および種子内線虫数と線虫死亡率のそれぞれの関係を明らかにするため、ほたるいもちの中発生と多発生の水田から得られたデータを種子あたりの線虫数と組み合わせて、各線虫密度について平均種子充実度と線虫死亡率を算出した。線虫死亡率は、特定数の線虫がいる種子内の全死亡線虫数をそれらの中の全線虫数（生存と死亡）で割ることにより算出した。

種子間の線虫の分布解析：Lloyd (1967) は平均こみあい度 m^* ($m^* = \sigma^2 / m + m - 1$) を方形区（コドラート）内の個体あたりの平均他個体数として定義した。平均密度に対する平均こみあい度の比率 (m^*/m) は個体の空間分布の特長を表す。即ち、 $m^*/m > 1$ は集中分布を、 $m^*/m = 1$ はランダム分布を、 $m^*/m < 1$ は均一分布を示す (Lloyd, 1967)。Iwao (1968) と Iwao & Kuno (1971) は多数の自然個体群と理論個体群において平均こみあい度と平均密度の間に直線関係が存在することを示した ($m^* = \alpha + \beta m$)。 α は基本集合度係数、 β は密度—集合度係数である。 $\beta > 1$ は集中分布を、 $\beta = 1$ はランダム分布を、 $\beta < 1$ は均一分布を表す。各水田における種子間の線虫の分布を平均こみあい度と平均密度を測定して分析した。この場合、各種子を方形区と見なした。

解析方法：種子充実度、種子あたりの線虫数、線虫死亡率をほたるいもちの異なる発生レベルの3段階間で比較するために、Kruskal-wallis 検定と平均値の多重比較を行った。一元分散分析と Tukey-Kramer の多重比較によって、水田における平均種子充実度と種子あたりの平均線虫数はほたるいもち発生レベルの3段階の間で比較された。種子あたりの平均線虫数と種子充実度の関係、種子あたりの線虫数と線虫死亡率の関係、および種子あたりの線虫の平均こみあい度と平均線虫密度の関係に対して直線回帰分析を行った。2変量間の関係を示すために、Pearson の相関係数を用いた。

結果

水田におけるほたるいもちの発生レベル、種子の平均充実度、種子あたりの平均線虫数の関係

種子充実度は、圃場のほたるいもち発生レベルとは無関係に、大きくばらついた。とほたるいもちの、胚乳のよく発達した種子（種子充実度 4）が優占していた（図 4.5）。このことは1つの穂でさえ見られた。平均種子充実度はほたるいもちの少発生圃場よりも多発生圃場で有意に小さかった（Kruskal-wallis 検定、 $H=29.8$, $p<0.05$ ）（図 4.5）。ほたるいもちの中発生圃場の平均種子充実度は少発生圃場や多発生圃場のそれらと有意な違いはなかった（Kruskal-wallis 検定、 $H=29.8$, $p\geq 0.05$ ）（図 4.5）。

ほたるいもちの中発生あるいは多発生の7圃場で採集した10穂それぞれの種子あたりの線虫数にも大きな変異があった（図 4.6）。しかしながら、ほたるいもち少発生の5圃場から採集した8穂の計613種子にはいずれも線虫はいなかった（図 4.6）。種子あたりの平均線虫数はほたるいもち少発生圃

場と中発生圃場よりも多発生圃場で有意に多かった (Kruskal-wallis 検定, $H=202.4$, $p<0.05$)。もっとも、少発生圃場と中発生圃場の間の差は有意ではなかった (図 4.6)。

水田のレベルでは、水田のほたるいもち発生レベルが増加すると、平均種子充実度は減少し、種子あたりの平均線虫数は増加した (図 4.7)。その結果、圃場レベルで種子あたり平均線虫数と平均種子充実度との間に有意な負の相関が生じた ($r=-0.705$, $p\leq 0.05$) (図 4.8)。ほたるいもちの中発生圃場 (平均値 \pm S.D.= $16.9\pm 4.4\%$) と多発生圃場 (平均値 \pm S.D.= $23.9\pm 15.6\%$) の間で種子内の線虫死亡率に有意な差は無かった (Kruskal-wallis 検定, $H=0.60$, $p\geq 0.4$)。

種子あたりの線虫数、線虫死亡率、種子の充実度との関係

密度逆依存的死亡が種子あたり線虫数 1~29 頭の範囲でみられた ($r=-0.601$, $p<0.01$) (図 4.9)。種子内の線虫数が 13 頭以上である場合、種子あたりの線虫数が増加するにつれて、イネの平均種子充実度は、種子充実度 4 まで増加する傾向にあった ($r=0.524$, $p<0.01$) (図 4.10)。

水稻種子間の線虫の分布パターン

種子あたりの平均線虫数 (密度) と平均こみあい度を各水田について計算した。平均密度 (m) と平均こみあい度 (m^*) の関係からは線虫は種子間で顕著な集中分布を示すことが分かった。このことは、ランダム分布を示すポアソン線の上方に全てのデータポイントが存在することから示された (図 4.11)。データのポイントは回帰直線 $m^*=3.28+5.00m$ ($r=0.427$, $p=0.339$) の回りに広く分散した (図 4.11)。これは、線虫が小さなグループ ($1+\alpha$) を形成し、そのようなグループが複数種子内に分布することを示すようであった。

考察

本節では、圃場のほたるいもちの発生レベルが高くなるにつれて、水稻の平均種子充実度は低下することを示した (図 4.5, 図 4.7)。また、ほたるいもちの圃場発生レベルが増加すると種子あたりの線虫の平均個体数が増加した (図 4.6, 図 4.7)。さらに、調査した全水田に渡って、全圃場の平均種子充実度と種子あたり平均線虫数の間に有意な負の相関が示された (図 4.8)。これらの事実は、水田で線虫が発生すると平均種子重量や種子のサイズが減少するという既往の報告と一致した (Yoshii & Yamamoto, 1950a ; Todd & Atkins, 1958 ; 深野, 1962)。

一方、各種子について、種子内の線虫数が増加するにつれて、平均種子充実度が増加し、十分に発達したサイズに達した (図 4.10)。線虫は開花前に内穎と外穎先端部の間隙 (直径 $30\mu\text{m}$) 通って花に侵入する (Huang & Huang, 1972)。線虫の増殖は花の中で始まり、開花するまで継続し、その後増殖は低下する。Huang & Huang (1972) が 3,000 頭の線虫をポット栽培のイネに接種したときでさえ、線虫の個体数は花間で異なり、感染した花数は穂によって異なることを報告した。開花後に胚乳の発達が始まるので、種子レベルにおける種子あたりの線虫数と平均種子充実度との間の正の相関が生じる仮説が 2 つ考えられた。第一は、大きな種子に発達するであろう穎花に線虫がより多く選好的に侵入して、穎花内で増殖する場合である。第二は、線虫の増殖失敗が種子の発達を阻害する場合である。

この研究での興味深い発見は、種子内での線虫の密度逆依存的死亡であった (図 4.9)。Huang & Huang (1974) は線虫成虫を集団にして、ガラス上においた場合、大きな集団は小さな集団より乾燥に耐えることを示した。彼らは線虫数 1.5×10^4 と 5.7×10^4 の集団間で生存率を比較した。集団の表面の線虫の

生存率より、集団の中心部の線虫の生存率が高いため、小集団より大集団の線虫の高い生存率が起こると推測した。本研究のイネ種子内の線虫数は、Huang & Huang (1974) がイネ体外の実験で使った数よりもずっと少ない。したがって、彼らの研究結果に基づいて、本研究で示した線虫の密度逆依存的死亡を説明することは難しい。Huang & Huang (1974) はまた小さい集団内の乾燥は早く、しかも乾燥度合いが高くなることを示した。彼らは、線虫の飢餓が乾燥による死亡率を高めることを示した。線虫は穎花の子房の周囲やおしべの基部に分布する。発達中の種子の中で、線虫は外穎と内穎の内側表面と種子外皮 (epicarp) の間、特に種子の基部に分布する (Huang & Huang, 1972)。発達の悪い種子内の線虫の飢餓と同様に、種子内の線虫数と種子充実度の相関は、種子充実度の低い種子でのきびしい乾燥度と早い乾燥速度を示唆するかもしれない。これからの研究ではこの点を明らかにする必要がある。

イネ種子は、多数の種子から離れて単独で発芽するかもしれない。そのような場合、もし、線虫が種子や苗に致命的な傷害を与えた場合、線虫は個体群として存続しないかもしれない。しかしながら、各種子に多数の線虫がいる場合、平均種子充実度は減少しない (図 4.10)。このことは種子内に線虫が多数いることが宿主の生存に影響しないため、結果として、線虫はイネを利用して存続することを示唆する。さらに、種子内の線虫の性比が雌に偏ること (雄の割合が 14%以下) (Huang & Huang, 1972; Nandakumar et al., 1975) と種子内の密度逆依存的死亡が線虫個体群の存続に寄与するであろう。それ故、多数の線虫に寄生されたイネ種子が多数の無感染種子とともに播種されると、新しく発芽したイネ個体群の定着が容易に起こる。イネの発芽に及ぼす線虫数の影響をはっきりさせる必要はあるが、このように考えると、種子間の線虫の集中分布を通じて、イネ個体群における線虫の絶滅は起こりにくいであろう。



図4.5. イネ種子の充実度のグレード。数字は充実の程度を示す。

- 1: 胚乳のないしいな; 2: 胚乳が板状の種子; 3: かなり充実した胚乳を有する種子;
- 4: 十分に発達した胚乳を有する正常種子; 5: 過剰に発達した胚乳のため外穎と内穎のつなぎ目が部分的に壊れた種子

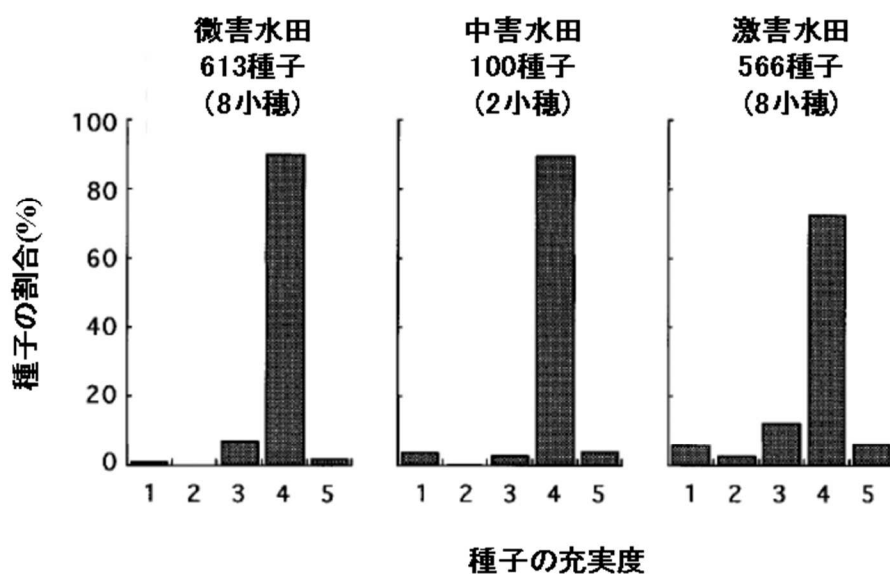


図4.6. ほたるいもちの発生レベルの異なる水田でのイネ種子の充実度の頻度分布

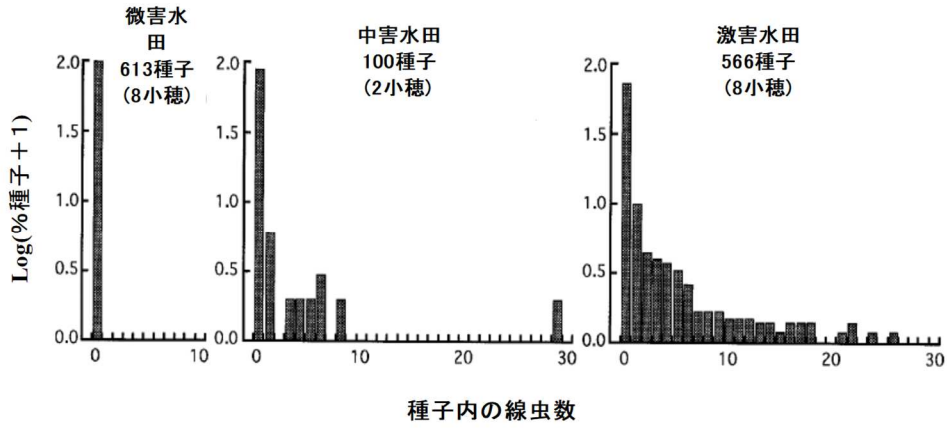
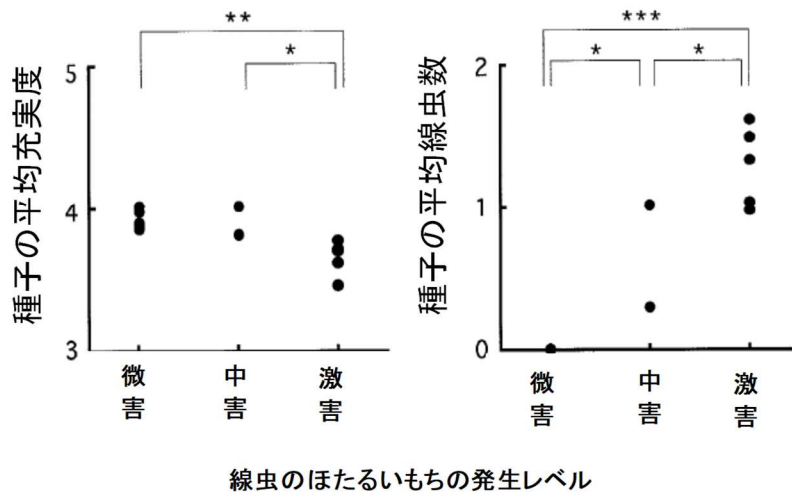


図4.7. ほたるいもちの発生レベルと関連したイネ種子あたりのイネシンガレセンチュウの頻度分布



線虫のほたるいもちの発生レベル

図4.8. 12水田におけるイネ種子の平均充実度と種子あたりイネシンガレセンチュウ平均密度およびほたるいもちの発生レベルの関係
算術平均が種子充実度と種子あたりの線虫密度について計算された。一元のANOVAにおいてTukey-kramerの多重比較に従って発生
レベルの有意差を表した* for $P \ll 0.05$, ** for $P \ll 0.01$, and *** for $P \ll 0.001$.

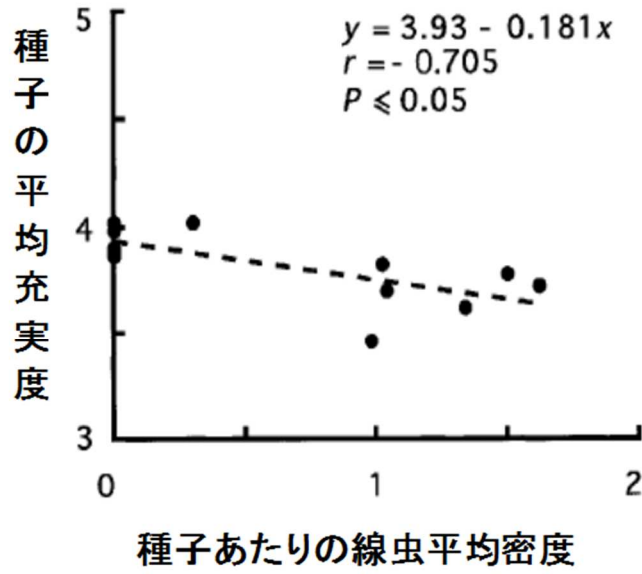


図4.9. 12水田におけるイネ種子の平均充実度と種子あたりのイネシンガレセンチュウ平均密度の関係

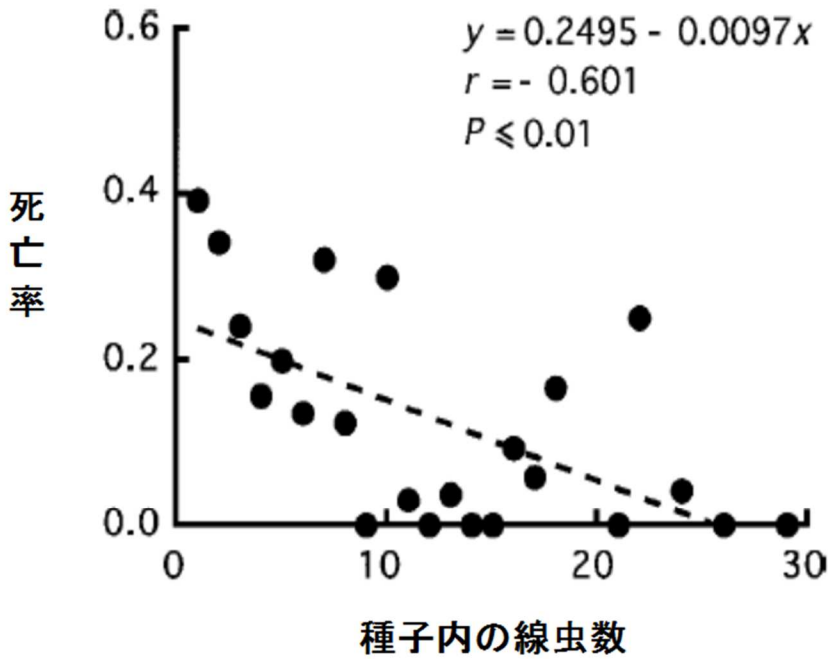


図4.10. イネ種子内のイネシンガレセンチュウ数と死亡率の関係。

死亡率は線虫を有する全種子内における死亡個体数を全個体数で割ることによって算出した。

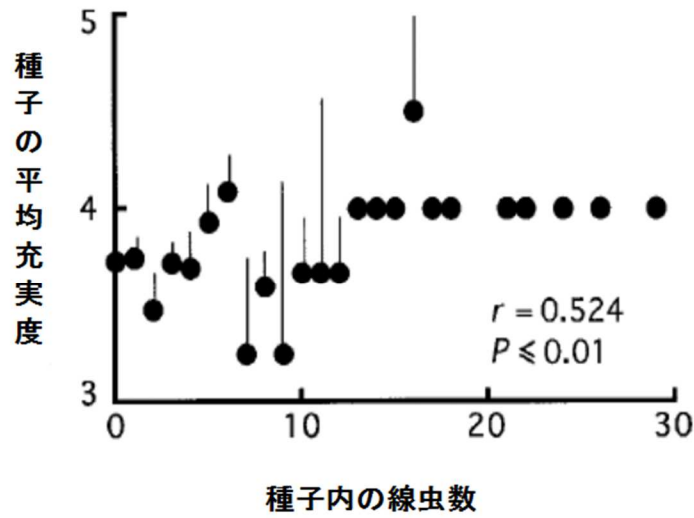


図4.11. イネ種子内のイネシンガレセンチュウ数と種子の平均充実度の関係

解析に用いられた種子はほたるいもちの中害水田と激害水田から得られた。円から伸びた垂直のバーは標準誤差を示す。線虫のいない種子については標準誤差0.04であった。

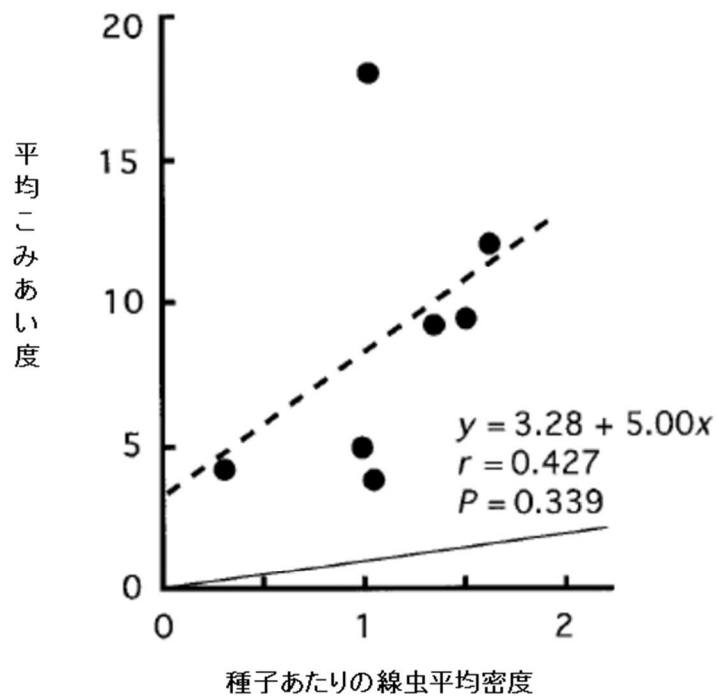


図4.12. ほたるいもち中害と激害水田から採集されたイネ種子間のイネシンガレセンチュウの分布パターン

破線は種子あたりの線虫の平均密度と平均こみあい度の関係を示す。細い実線はランダム分布を示す (poisson分布)

第5章 イネシンガレセンチュウの分散

5.1. 水田におけるイネシンガレセンチュウの分散と繁殖の間のトレードオフ

分散は親や他個体がいる環境から個体が出ていく過程であり、その結果、分散個体は低密度環境に定着する (Begon et al., 1996)。分散は通常危険をとまなう。そして、既に先住者のいる生息場所ですら長く生活することから生じる危険と新しい生息場所に定着する危険の間のバランスが常に存在する (Begon et al., 1996)。ある寄生者や病原体は、宿主操作によって新しい生息場所での定着の可能性を高めることが知られている。たとえば、中間宿主と捕食性の終宿主がいる場合 (間接伝播)、寄生者に感染された中間宿主は非感染宿主より目立つ行動を示す。その結果、終宿主によって簡単に捕食されて、寄生者の伝播率は高くなる例がある (Poulin, 1998)。媒介者によって伝播される脊椎動物の寄生者は、脊椎動物 (宿主) を媒介者に吸血されやすくする例がある (Moore, 1993)。Entomophthorales 目の病原菌類に感染した昆虫は、植物体の先端で死に、その後胞子の分散がおこる (Evans, 1989)。胞子は風によって受動的に分散するが、平均分散距離は死んだ宿主の地上高に依存するに違いない (Begon et al., 1996)。

線虫はイネの外部寄生者であり、種子内では脱水状態で生存する。乾燥したイネ種子を水におくと、水に浮く場合と沈む場合がある。日本では、塩水を使って比重 1.13 より重い種子を選抜して水田で栽培することが勧められている。比重 1.05~1.12 の軽い種子よりも比重 1.12 以上の種子は有意に収量が多い (佐田本, 1928)。しかし、比重 1.00 未満の種子でも発芽することが観察される。水に浮く軽い種子は長距離分散の可能性を持つ。

各個体が制限された資源を分散と増殖に分配する種では、分散と増殖の間にトレードオフが観察される (Zera & Denno, 1997)。宿主の体内の寄生者の場合、その分散は宿主の移動に依存する。従って、寄生者の分散と繁殖の間にトレードオフが存在すると考えられる。なぜなら寄生者の寄生のために宿主の活動性が低くなるからである。

線虫とイネの系では、鉢植えされたイネに線虫を接種して、種子の分散と種内の競争能力の間の負の相関が示されている。それは、線虫接種のイネでも無接種のイネでも、水に浮く軽い種子 (比重 1.0 未満) は水に沈む重い種子 (比重 1.0 以上) よりも、発芽率は低く、根の伸長する時間は長かった (Togashi & Hoshino, 2003)。さらに、比重 1.0 未満の種子の割合は、線虫無接種のイネより線虫接種したイネで高く、線虫死亡率は比重 1.0 以上の種子より 1.0 未満の種子で高かった。これらの結果は、水に浮く種子は種子によって線虫は長距離移動が可能であるが、寄生した種子の生育は悪い、一方、水に沈む種子は分散の可能性は低いが生育は良好と言う種子の比重を通して、種子内の線虫の分散と繁殖の間のトレードオフを示す。

分散後の線虫の繁殖はイネの生存に依存するので、線虫は、自らのいる種子に大量の炭水化物とタンパク質を供給させ、イネにこれらを消費することを線虫は親植物に強いる。興味深いことに、接種実験は、軽い種子内で線虫数が増加するにつれて、線虫死亡率が低下し、種子充実度が増加することを示した (Togashi & Hoshino, 2003)。種子充実度の増加は、線虫による宿主操作を示唆する。これまで、類似の宿主操作は種子寄生の線虫種では報告されていない。

この研究の目的は、線虫感染水田と無感染水田由来のイネ種子を用いて、種子の比重、内胚乳の発育、種子が水に沈むまでの時間、発芽までの時間、苗の生長、種子内線虫数と線虫死亡率の関係を明らかにし、線虫とイネの相互関係を明らかにすることである。

材料と方法

イネ種子

広島県広島市安芸区中野のほたるいもち多発水田では、全てのイネ株が葉にほたるいもち症状が見られた。この水田から 1999 年 9 月 24 日にイネ 10 株をランダムに採集した。収穫した日に、ビニール製温室内で、地上から 1.5m の高さにイネをぶら下げた。イネは 35 日間乾燥した。乾燥期間の平均気温は 17.4℃であった。広島県東広島市八本松町のほたるいもち無発生水田の‘ヒノヒカリ’から 2000 年 9 月 24 日にランダムにイネ 6 株を採集した。収穫後すぐに、前述と同様に乾燥した。ハウス内の平均気温は 17.0℃であった。乾燥後、全ての種子を採集して、実験まで暗黒下 5℃で保存した。

比重による種子の分類；種子をビーカーに入れ、蒸留水（比重 1.00）を注いで、10 秒間強く攪拌した。種子が動きを止めた後、表面に浮く種子を集め、ペーパータオルですぐに乾かした。浮いた種子（比重 1.00 未満）は軽い種子と呼ぶ。ビーカーの底に沈んだ種子を集め、ペーパータオルで乾かして、塩水の中（蒸留水に塩化ナトリウム（129.35g/l）と塩化マグネシウム（0.65g/l）を溶かし、比重計を使って比重 1.13 に調整した）に移した。攪拌した後、浮いた種子と沈んだ種子を分けて集め、それぞれ、中間の種子、重い種子と呼んだ。蒸留水で種子表面についた塩水を洗った後、種子をペーパータオルで拭いた。

線虫感染水田から採集して保存した種子から、2000 年 3 月 14 日にランダムに 900 種子をサンプリングし、異なる比重の 3 群に分けた。非感染水田から得られた種子から、2000 年 12 月 30 日にランダムに 1,000 種子をサンプリングして、比重の異なる 3 群に分けた。これらの種子は比重選の後すぐに後述の実験に使った。

種子充実度

種子充実度は胚の発達程度を表す。4.4 節に従って、4 段階に分けた。

線虫感染

Hoshino & Togashi 法を用いて、1 種子内の生存線虫および死亡線虫の全数線虫個体数と呼ぶ）を調べた。

種子充実度、種子内線虫数、線虫死亡率と種子比重の関係

線虫感染水田で採取され、比重によって分けられた 3 種子群のそれぞれから、100 粒の種子をランダムに選択した。無感染水田から得られた 3 種子群の場合、各群から 50 種子をランダムに選んだ。これらの種子充実度と線虫個体数を種子ごとに調べた。

感染水田から得られた 3 種子群の各々について、種子内線虫数、種子内の線虫死亡率、種子の生存力の間関係を明らかにするために、同数の線虫がいた種子ごとに線虫の平均死亡率と種子の平均充実度を調べた。

種子が沈むまでの時間、発根、苗の生長と種子比重の関係

種子充実度を記録した後、イネ種子を試験管内の 8ml の水の表面に種子を置いた。種子は、蛍光灯

の約 9,530lx の照明の下、25℃に置いた。毎日 7 時 30 分に種子の沈降と発根（幼根出現）を調べた。この調査を 21 日間継続した。鞘葉の基部から葉の先端までの長さを鞘葉長（coleoptile）として、発根の 3 日後に調査した。

感染水田から採集した、比重の異なる 3 種子群のそれぞれから、2000 年 3 月 14 日から 4 月 4 日の間に、100 種子をランダムにサンプリングし、上述の形質を調査した。同様に、無感染水田由来の種子についても、2000 年 12 月 30 日から 2001 年 1 月 20 日の間に、これらの形質を調べた。なお、感染水田で収穫した種子群から最初にサンプリングした種子について、水に沈むまでの時間を記録しなかったため、新しくサンプリングした 50 個の軽い種子を用いて、水に沈む時間と発根 3 日後の鞘葉長を調べた。

統計処理

種子充実度、種子内の線虫数、種子が沈むまでの時間、発根までの時間、鞘葉長を比重の異なる 3 種子群間で比較するために、Kruskal-wallis 検定を使用した。線虫感染水田と無感染水田の間で、3 種子群の比率を比較するために 2×3 直交表検定を用いた。この分析で有意差があった場合、種子群を該当種子群とそれ以外の 2 種子群に分け、Bonferroni 補正（山村，1993）によって調整した有意水準と 2×2 直交表検定を用いて比較した。種子内線虫数、線虫死亡率、種子充実度の間の関係を示すために、直線回帰分析を使用した。種子充実度と種子内線虫数の間の関係および発根までの時間と種子が沈むまでの時間の間の関係を示すために、スピアマンの順位相関係数（ ρ ）を使用した。

種子間の線虫分布集中度を明らかにするために、3.4 節で用いた I_b 示数を使い、F 検定を用いてその有意性を調べた（Morisita, 1959）。ここで、1 未満、1、1 以上の I_b 値は、それぞれ、種子間の線虫の均一分布、ランダム分布、集中分布を示す。

結果

種子充実度、種子内線虫数、線虫死亡率と種子比重の関係

軽い種子、中間の種子、重い種子の比率は線虫感染水田と無感染水田の間で有意差があった（2×3 直交表、 $\chi^2=381.9, p<0.001$ ）。軽い種子の比率は無感染水田（9.7%）より感染水田（33.3%）で高かった（ $p<0.001$ ）（表 5.1）。中間の種子グループも同様であった（ $p<0.001$ ）が、重い種子ではその逆であった（ $p<0.001$ ）（表 5.1）。

軽い種子の種子充実度は、感染水田と無感染水田の間で有意に異なった（Kruskal-wallis 検定、 $H=20.5, p<0.001$ ）。重い種子の種子充実度も 2 種類の水田の間で違いがあった（ $H=4.7, p<0.05$ ）（図 5.1）。軽い種子の場合、感染水田ではグレード 3 の種子の比率が最も高いのに対して（39.6%）、無感染水田では、グレード 1 の種子（もっとも胚乳の発達しない種子）の比率が最大であった（55.0%）（図 5.1）。これに対して、中間の種子や重い種子の大多数は、いずれの水田でも、胚乳がよく発達していた（グレード 4, 5）（図 5.1）。感染水田について、種子の平均充実度は比重 1.0 以上の 2 種子群より比重 1.0 未満の種子群が低かった（Kruskal-wallis 検定、 $H=177.5, p<0.001$ ）（表 5.2）。このことは無感染水田でも観察された（ $H=123.1, p<0.001$ ）。

線虫は感染水田の種子から分離された。一方、無感染水田由来の 150 種子からは本種は分離されなかった（表 5.2）。線虫のいる種子の比率は重い種子（29%）より軽い種子（69%）や中間の種子（77%）

で高かった (2×3 直交表検定, $p<0.001$, 表 5.2)。種子内の平均生存線虫数, 平均死亡線虫数, 平均合計線虫数は重い種子群より軽い種子群や中間の種子群で多かった (全てのケースで $p<0.001$) (表 5.2)。しかしながら, 個々の種子内の線虫数は大きく異なり, 異なる比重の 3 種子群のそれぞれで集中分布を示した (表 5.2)。最も高い分布集中度が重い種子群でみられた。線虫死亡率は中間の種子群や重い種子群より軽い種子群で高かった ($p<0.05$) (表 5.2)。種子内の線虫の密度逆依存的死亡は, 中間の種子群でみられたが, 軽い種子群と重い種子群ではその傾向が観察された (図 5.2)。

興味深いことに, 軽い種子群では, 種子の平均充実度と種子内の線虫数の間に正の相関があった (図 5.3)。線虫のいる軽い種子の平均充実度 (mean±SD=2.7±1.1) は無感染水田の軽い種子の平均充実度 (mean±SD=1.8±1.0) より大きかった (Kruskal-wallis 検定, $H=20.1, p<0.001$) (表 5.3)。軽い種子に対して, 中間の種子や重い種子では, 種子内の線虫数と特定数の線虫のいる種子の平均充実度との間に相関はなかった (図 5.3)。

種子が沈むまでの時間, 発根, 苗の生長と種子比重の関係

中間の種子と重い種子を水面に置くと, それらはすぐに沈んだ。実験期間中に (21 日間) 浮いている種子を除いても, 軽い種子が沈むまでの平均時間は, 無感染水田 (8.4 日) より感染水田 (2.3 日) で短かった (Kruskal-wallis 検定, $H=13.2, p<0.001$) (表 5.3)。感染水田の軽い 50 種子のうち, 19 種子は 1 日以内に沈み, 19 種子が 2 日から 7 日の間に沈み, 残りの 12 種子が試験期間中水に浮いていた (図 5.4)。無感染水田の軽い 50 種子のうち, 14 種子は 1 日以内に沈み, 29 種子は 2 日から 20 日の間に沈み, 7 種子が試験期間中浮いていた (図 5.4)。

水に沈んだ後に, 通常, 種子は幼根を出した。感染水田の中間の種子や重い種子の 97%以上は, 水に沈んだ後に幼根を出した。そして, 無感染水田の中間の種子や重い種子の 66%以上も同様であった。感染水田由来の軽い種子の場合, 25 種子は 1 日後と 2 日後に沈み, そのうち 7 種子から幼根が出た。実験期間中に沈むことなく, 水に浮いた 12 種子の内, 2 種子から 8 日間の内に幼根が出た。その他の種子では発根しなかった。無感染水田由来の軽い種子の場合, 17 種子は水に浮かべて 1, 2 日後に沈み, そのうちの 10 種子は発根した。3 種子は, 水に浮かべてから 10 日から 16 日の間に, 浮いたまま発根し, そのうちの 2 種子は発根後 1 日か 2 日で沈み, 残りの 1 種子は沈まなかった。その他の種子は発根しなかった。線虫感染水田の種子の場合, 発根した種子の割合は, 中間の種子群や重い種子群より軽い種子群で低かった (2×3 直交表検定, 線虫感染水田 $\chi^2=216.91, p<0.001$) (表 5.3)。このことは, 無感染水田の種子でも観察された (2×3 直交表検定, 線虫無感染水田 $\chi^2=433.81, p<0.001$) (表 5.3)。軽い種子群の発根種子の割合は, 感染水田と非感染水田の間で差はなかった (2×2 直交表検定, $\chi^2=0.04, p>0.05$)。

種子を水の表面に置いてから発根するまでの時間は, 感染水田の種子の場合, 中間の種子群と重い種子群より軽い種子群で長かった (Kruskal-wallis 検定, $H=29.73, p<0.001$)。非感染水田の種子の場合, 重い種子群より軽い種子群が発根までの時間は長かった (Kruskal-wallis 検定, $H=18.48, p<0.001$) (表 5.3)。無感染水田の種子より感染水田の種子は, 発根までの時間は短かった。このことは, 異なる比重の 3 種子群の各々で確認された (Kruskal-wallis 検定, 軽い種子; $H=14.68, p<0.001$, 中間の種子; $H=53.81, p<0.001$, 重い種子; $H=33.66, p<0.001$)。軽い種子を水表面に置いてから発根するまでの時間は, 種子が沈むまでの時間と関係はなかった (感染水田の種子 $\rho=0.214, p=0.662, n=7$; 無感染水田の種子 $\rho=0.232,$

$p=0.457$, $n=12$)。

いずれの水田でも、発根の3日後の鞘葉長は、異なる比重の3種子群の間で差はなかった (Kruskal-wallis 検定, 感染水田 $H=3.74$, $p>0.05$; 無感染水田 $H=2.89$, $p>0.05$) (表 5.3)。発根の3日後の鞘葉長は、比重の異なる種子群のそれぞれについて、感染水田と無感染水田の間で違いはなかった (Kruskal-wallis 検定, 軽い種子 $H=0.274$, $p>0.05$; 中間の種子 $H=3.243$, $p>0.05$; 重い種子 $H=0.266$, $p>0.05$)。

考察

本研究では、線虫に無感染の水田のイネ種子の場合、水の表面にそっと置いても、ほとんどの種子はすぐに沈み、水に浮かぶ種子の割合は小さかった。イネはもともと淡水の周辺に自生しているため (Oka, 1988; Sato et al., 1971), 発芽までの日数が長い比重 1.0 未満の軽い種子を作ることは、イネが長距離分散するための手段であるかもしれない。これに対して、比重が 1 より大きい種子 (中間の種子や重い種子) は水に浮くことなく沈み、それらのほとんどが軽い種子より早く発芽する。たいていの場合、中間の種子や重い種子と比較して、軽い種子の胚乳はほとんどないか全く無い。発根後、軽い種子は中間の種子と重い種子と同じ速度で鞘葉を伸張するが、軽い種子は発根するまでに長く時間がかかる。その結果、中間の種子や重い種子に比べて、軽い種子は日光や土壌養分の利用で劣った競争者とみなされる。これは、比重の違いを通して、イネ種子の分散能力と競争能力の間のトレードオフを示す。

軽い種子内の線虫は重い種子内の線虫より長い距離を分散する可能性が大きい。イネ種子が分散し、親植物個体群から離れて単独で発芽したとき、線虫は発芽時に游出し、そのイネで生きていかなければならない。実際、イネ種子が発芽するか否かは線虫の生存と繁殖にとって重大である。この考察から、個々の線虫の繁殖の可能性は、種子の発根の割合と種子から線虫が脱出するまでの生存率の積から計算できる。線虫繁殖の可能性は、軽い種子, 中間の種子, 重い種子で各々 0.159, 0.717, 0.764 と推定された。中間の種子内の線虫と重い種子内の線虫は、この推定値より繁殖の可能性は大きいだろう。なぜなら、発根に失敗した種子の近くに多くのイネ (苗) が存在するからである。これらの観察から、水に浮く種子に寄生する線虫は長距離移動が可能であるが、寄生した種子の生育は悪く、水に沈む種子に寄生する線虫は分散の可能性は低いと種子の生育は良好と言うイネ種子の比重の違いを通して、線虫の分散と繁殖の間にトレードオフが起こることが示唆された。

線虫の感染によって、水田での穂あたりの平均種子数と種子内の胚乳の平均サイズが減少する。このため、イネの収量は減少する (Yoshii & Yamamoto, 1950b; Todd & Atkins, 1958; 深野, 1962)。本研究は、線虫の感染が軽い種子の比率を増加させることを確かめた。興味深いことに、感染イネの軽い種子は無感染イネの種子より胚乳量は平均的に多い。さらに、軽い種子内の線虫数が増加するにつれて、平均種子充実度は増加した。軽い種子が十分に発達した胚乳を有する場合、それは、線虫にとって長距離分散のための優れた乗り物とみなされる。それ故、軽い種子が十分に発達した胚乳を有する場合、そのような種子は線虫による宿主操作の結果であるかもしれない。

どのような機構によって線虫感染イネの軽い種子が無感染イネのそれらより大量に胚乳を有するようになるのか。どのような機構によって軽い種子内の線虫数と胚乳の発達の間で正の相関が起きるのか。線虫に対する種子の作用と種子に対する線虫の作用を仮定することが出来る。イネと線虫の増

殖の間の時間的關係は仮説の選択に役立つ。線虫が開花前にイネの穎花に侵入し、繁殖を開始する (Huang & Huang, 1972)。線虫の繁殖は開花後に劇的に低下し、開花の約2週間後に繁殖はほぼ停止する。胚乳の細胞の分裂は開花の3日~10日後の間に起こる (星川, 1967a, b)。胚乳細胞内の澱粉の貯蔵は開花の4日~35日後の間続く (星川, 1968)。それ故、胚乳の高い発達程度は、種子内の休眠前の線虫の高い繁殖の結果であると考え難い。なぜなら、胚乳の発達の始まる前に、線虫の増殖率の減少が始まるからである。

種子充実率グレード3の軽い種子の割合は、無感染水田 (1.6%) より感染水田 (13.2%) で高かった。これに対して、グレード4の中間の種子と重い種子の割合は、無感染水田 (70.6%) より感染水田 (58.5%) で小さかった。このことは、種子内の線虫が胚乳の発達を遅らせることを示唆するかもしれない。しかしながら、このような機構によって種子内の線虫数と胚乳発達の間に正の相関を起こる可能性は小さい。なぜなら、この機構によってそれらの間に負の相関が形成されるからである。

線虫に無感染のイネの穂内でも、胚乳の発達程度は種子間で異なった。例えば、1次枝こう内で最後に開いた花が種子になった場合、その胚乳は貧弱である (Hoshikawa, 1989)。施肥後、1次枝こう上の花は2次枝こう上のそれらより時期的に早くかつ急速に物質を蓄積する (Nagato & Chaudhry, 1969)。前者は「強勢花」と称され、種子になったとき、十分に発達した胚乳を有する。一方、後者は「弱勢花」と称され、その種子は未発達の胚乳を有する。出穂後、葉の一部除去による光合成の減少は、強勢花より高い割合で、弱勢花を胚乳のない種子にさせる (長戸, 1940)。線虫感染によってイネの葉量は減少し (Yoshii & Yamamoto, 1950a)、弱勢花に由来する種子充実度1の種子割合を増やすかもしれない。もし種子内の線虫が胚乳細胞を刺激して、炭水化物とたんぱく質を蓄積させるならば、弱勢花に由来する種子において、種子内の少数の線虫より多数の線虫が胚乳の発達を高いレベルに高めるかもしれない、一方、強勢花由来の種子では、種子内の線虫数に関係なく、胚乳は高い発達レベルに達する。我々の研究の結果はこのような過程によって説明可能である。

イネ種子の発芽後、線虫は苗に寄生する (深野, 1962; 後藤・深津, 1956; 田村・気賀沢, 1957)。イネが少なくとも葉齢6に達するまで、線虫もイネ間を移動する (田村・気賀沢, 1958)。25°Cで種子から出た後、線虫の寿命は短い (田村・気賀沢, 1958) ので、それらは短距離分散者である。線虫の分散パターンは、線虫自身による短距離分散と水表面を浮く種子による長距離分散の組み合わせによる階層的分散であると考えられる (Shigesada and Kawasaki, 1997)。

表5.1.イネシンガレセンチュウ感染水田と非感染水田の種子の比重別個数

	種子数 (比重) ^a			合計
	軽い(比重 < 1.00)	中間(比重 1.00 to 1.13)	重(比重 > 1.13)	
感染した水田	300a	276a	324b	900
無感染水田	97b	102b	801a	1,000

^a 各列で異なる文字は、2つの種子群(他の2つのグループを合わせたもので2つの感染レベルがある)の2×2分割表によって、2つの水田間で、線虫に感染している水田または感染していない水田から採取された種子の総数の割合が異なる(P < 0.001)。ボンフェローニ法により有意なレベルが調整された。各行で同じ文字を有する割合または死亡率は2×2分割表によって有意差を示さなかった。有意水準はBonferroni法によって調整された。

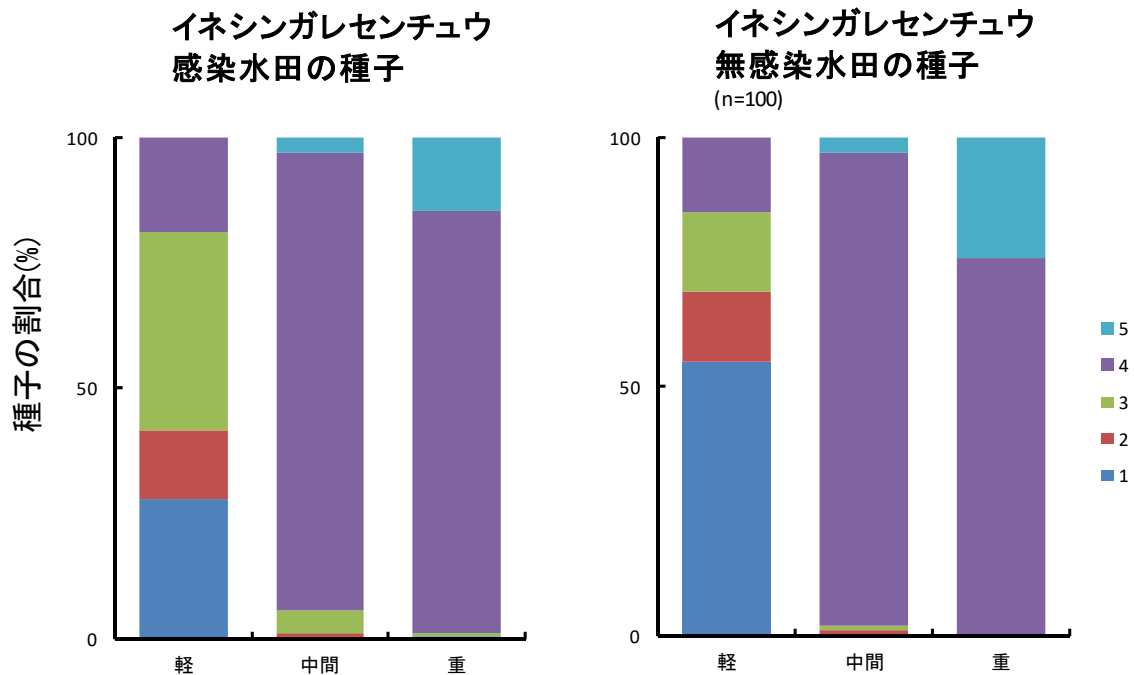


図5.1. イネシンガレセンチュウが感染した水田または感染していない水田のイネから採取された種子の比重 (●: 軽, <1.00; ■: 中間, 1.00-1.13; ▲: 重, >1.13)と充実度(凡例)の関係。
nは調査種子数を表す。左図の軽い種子はn=250, 中間の種子および重い種子は200種子を調べた。
凡例の数字は種子充実度。

表5.2. イネ種子の比重, 種子の充実度, イネシンガレセンチュウに感染した種子の割合, 感染種子内の線虫数 (nematode load), 種子間の線虫の分布集中度および種子内の線虫死亡率の関係

パラメーター	種子グループ (比重)			
	軽 (< 1.00)	中間 (1.00 to 1.13)	重 (> 1.13)	
線虫感染水田				
調査種子数	100	100	100	
種子充実度 ^a	2.7 ± 1.1b	4.0 ± 0.2a	4.2 ± 0.4a	<0.001
線虫のいる種子の割合 ^b	0.69a	0.77a	0.29b	<0.001
種子あたり生存線虫数 ^a	3.02 ± 4.58a	4.61 ± 5.21a	1.39 ± 3.08b	<0.001
種子あたり死亡線虫数 ^a	1.41 ± 2.36a	1.63 ± 2.31a	0.43 ± 1.22b	<0.001
種子あたり線虫数 ^a	4.43 ± 5.37a	6.24 ± 5.97a	1.82 ± 3.75b	<0.001
種子内の生存線虫の I_{δ}	2.95***	2.05***	5.19***	
種子内の死亡線虫の I_{δ}	3.09***	2.39***	6.76***	
種子内の線虫の I_{δ}	2.23***	1.75***	4.69***	
死亡率% ^b	31.8a	26.1b	23.6b	<0.05
線虫非感染水田				
調査種子数	50	50	50	
種子充実度 ^a	1.8 ± 1.0b	4.0 ± 0.0a	4.1 ± 0.2a	<0.001
線虫のいる種子の割合	0.00	0.00	0.00	

^a 平均値±SD. 各行で異なる文字を有する平均値はKruskal-Wallis 検定5%水準で有意差あり。

^b 各行で同じ文字を有する割合または死亡率は2×3分割表によって有意差を示さなかった。有意水準はBonferroni法によって調整された。

*** 同じ文字を有する数字はF検定ランダム分布(p<0.001)で有意である。

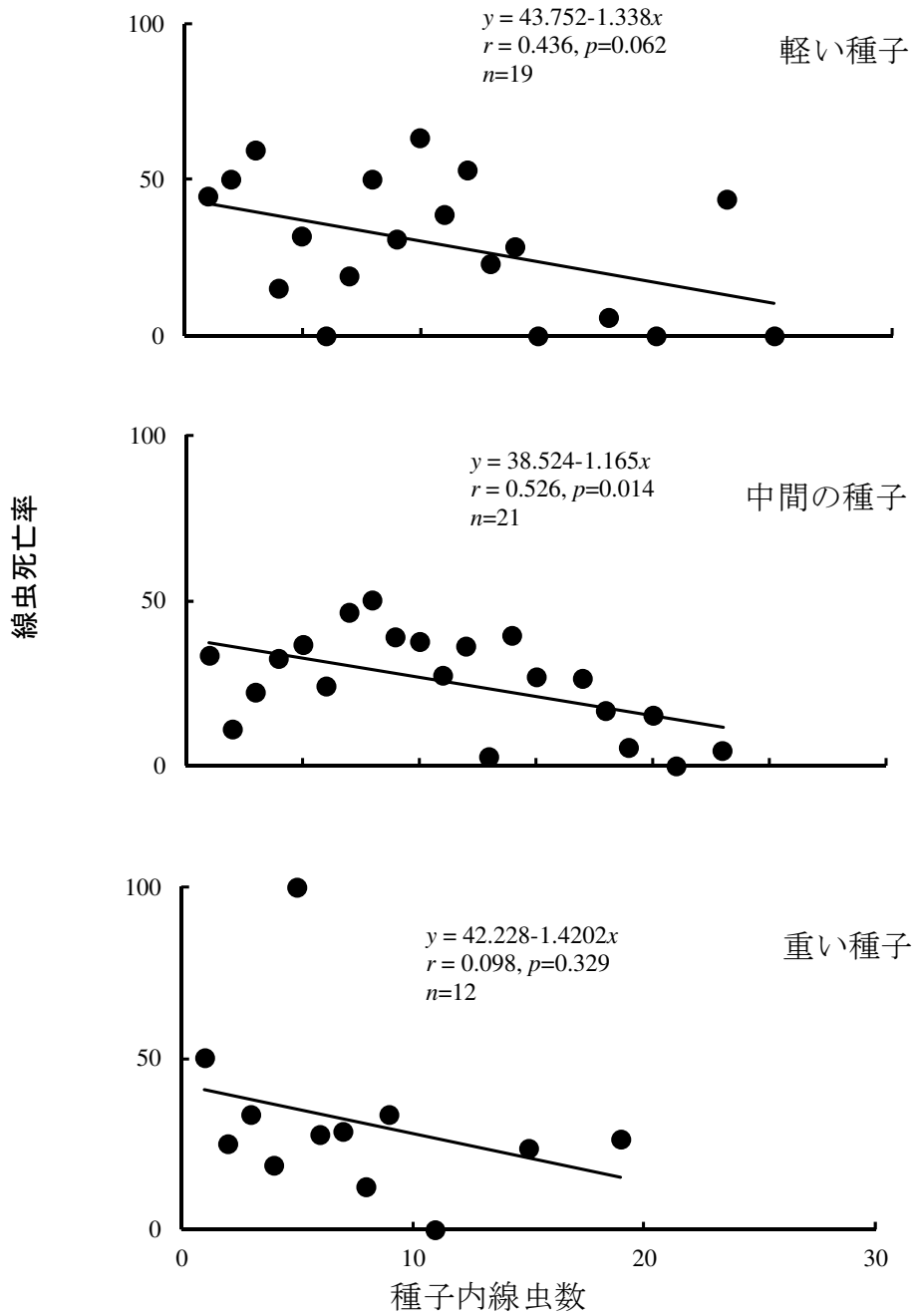


図5.2. 3つの異なる比重クラスにおけるイネ種子内のイネシンガレセンチュウ数と線虫死亡率の関係。軽い種子, 中間の種子, 重い種子はそれぞれ, < 1.00 , 1.00 to 1.13 , および > 1.13 である。nは線虫

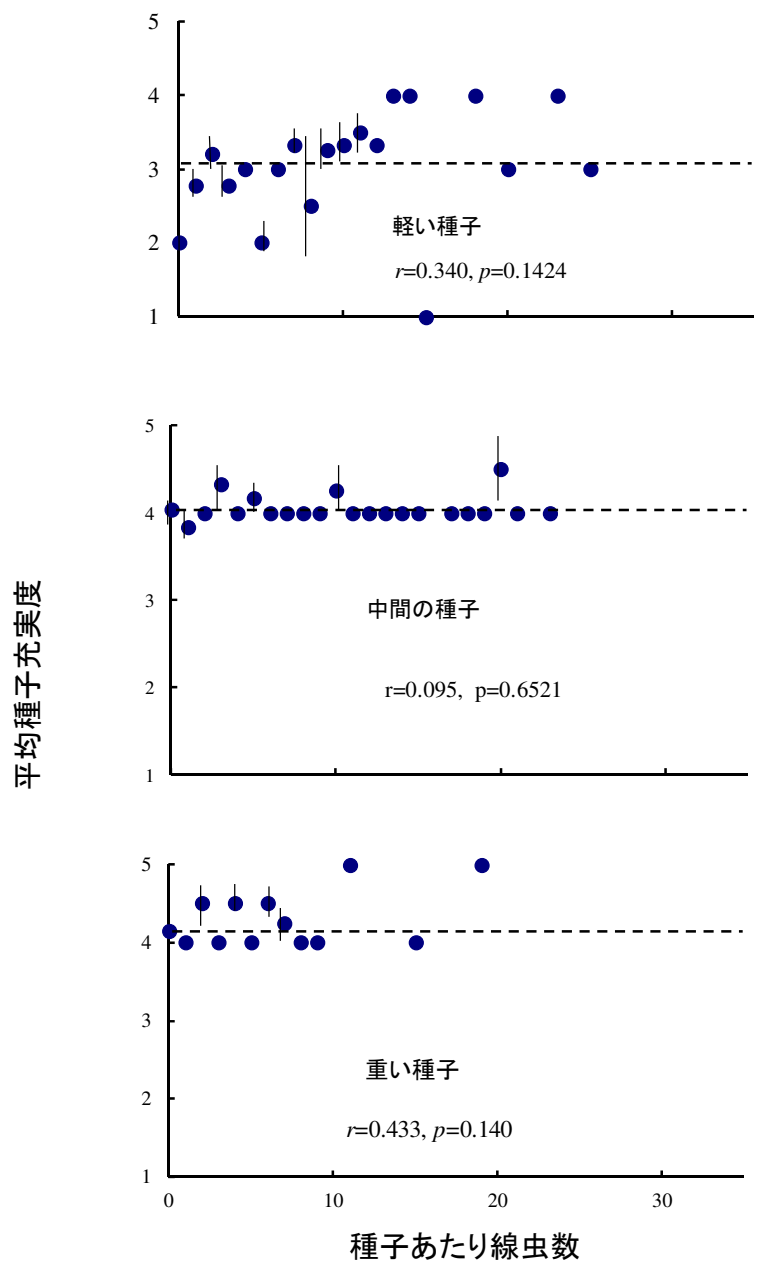


図.5.3. 比重の異なるイネ種子クラスの種子内のイネシンガレセンチュウの個体数と線虫に感染した種子の種子充実度の関係。軽い種子, 中間の種子, 重い種子はそれぞれ, < 1.00 , 1.00 to 1.13 , および > 1.13 である。水平の点線は線虫が感染していない水田から採集した種子の平均種子充実度を表す。垂直なバーは標準誤差を示す。

表5.3. イネ種子の比重, 種子充実度, 幼根を伸長した種子の割合, 発根に要した時間, 発根の3日後の鞘葉の長さの関係 種子はイネシンガレセンチュウの感染水田あるいは非感染水田のイネから獲得した。

パラメータ	種子グループ (比重)								
	軽 (< 1.00)			中間 (1.00 to 1.13)			重い (> 1.13)		
	感染 水田	無感染 水田	比較 ^c	感染 水田	無感染 水田	比較 ^c	感染 水田	無感染 水田	比較 ^c
調査種子数	150	50		100	50		100	50	
種子充実度 ^a	2.4 ± 1.1b	2.0 ± 1.2c	*	3.9 ± 0.4a	4.0 ± 0.4b	ns	4.1 ± 0.5a	4.4 ± 0.5a	*
種子が沈むまでの日数 (日) ^a	2.3 ± 1.6 (38)a	8.4 ± 7.1 (43)a	*	0.0 ± 0.0 (100)b	0.0 ± 0.0 (50)b	ns	0.0 ± 0.0 (100)b	0.0 ± 0.0 (50)b	ns
発根率 ^b	23.3b	26.0c	ns	97.0a	66.0b	*	100.0a	90.0a	*
発根までの日数 (日) ^a	9.5 ± 3.0 (35)a	14.5 ± 3.6 (13)a	*	7.0 ± 1.4 (97)b	11.4 ± 3.4 (33)ab	*	7.2 ± 1.2 (100)b	9.4 ± 2.7 (45)b	*
鞘葉長 (cm) ^a	2.3 ± 0.8 (35)a	2.2 ± 0.5 (13)a	ns	2.5 ± 0.6 (97)a	2.3 ± 0.5 (33)a	ns	2.5 ± 0.6 (100)a	2.4 ± 0.5 (45)a	ns

^a 平均値±SD. 同一水田の各行で同じ文字を有する平均値はKruskal-Wallis 検定5%水準で有意差なし。カッコ内の数字はサンプルサイズを表す。

^b 同一水田の各行で同じ文字を有する発根種子割合は2×3分割表によって有意差のないことが示された。有意水準はBonferroni法によって調整された。

^c *およびnsは、Kruskal-Wallis検定または2×2分割表により、各種子群の各パラメーターにおける2つの水田間の差の有無 (p < 0.05)をそれぞれ示す。

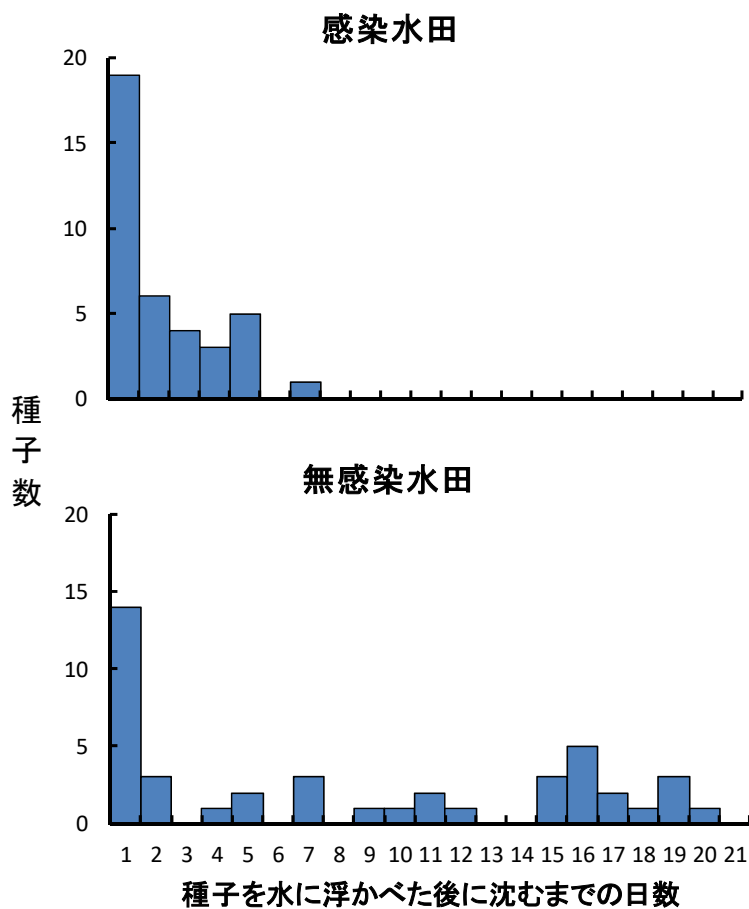


図 5.4. 感染水田および無感染水田の軽い種子を水に浮かべた後に沈むまでの日数

5.2. 隔離されたイネにおけるイネシンガレセンチュウの分散と繁殖の間のトレードオフ

前節では、線虫の無感染水田より感染水田で収穫されたイネ種子の中の比重 1.00 未満の種子の割合が高いことを示した。また、無感染水田よりも感染水田で収穫された比重の軽い種子が平均すると胚乳量は多かった。感染水田由来の種子については、水にすぐ沈む比重の大きい種子より水に浮く種子の発根にかかる時間は長かった。おそらく、不十分な胚乳発達のためであろう。比重の大きい種子よりも水に浮く種子内の線虫の死亡率は高かった。これらの観察は、比重と種子の生存や線虫の死亡率の関係を通して、線虫の分散と繁殖の間にトレードオフがあることを示唆する。水に浮く種子は種子内の線虫個体数と線虫死亡率の間の負の相関および線虫個体数と胚乳の発達のための正の相関を示したことは興味深い。これらのことは、分散距離が長くなるにつれて、線虫の繁殖の可能性は大きく減少することを示唆する。

上述の興味深い結論は、異なる年の、異なる水田で収穫された 1 品種の水稻種子で得られた。このため、結論に線虫感染以外の環境因子の影響が大きく作用した可能性を否定できない。そこで、環境因子の違いを最小にするために、本研究ではイネをポットで栽培し、線虫接種イネと無接種のイネを作り、それらから得られた水稻種子を使って、初期の種子比重、種子が水に沈むまでの時間、発根までの時間、葉の成長、種子内の線虫密度と線虫死亡率の間の関係を調べた。

材料と方法

水稻栽培：東広島市の広島県立農業技術センター（現、広島県立総合技術研究所農業技術センター）の圃場で、2000 年 6 月 24 日に線虫に無感染イネ「ヒノヒカリ」の苗を面積 200cm² のワグネルポット 20 個に 1 本ずつ移植した。同日に *Botrytis cinerea* で 1 ヶ月間培養された線虫の成虫と幼虫を含む 3000 頭の浮遊液 10ml をそれぞれ 10 ポットの水中に加えた、一方、その他の 10 ポットには線虫を加えなかった。線虫の系統は 1998 年広島県尾道市で収穫した種子から得られた。農家と同様の方法で肥料を 4 回施用した。窒素 14%，リン酸 14%，カリ 14% (w/w) を含む肥料 0.43g を 2000 年 6 月 20 日、0.20g を 2000 年 7 月 10 日にそれぞれ各ポットに施用した。窒素 17%，カリ 17% を含む肥料 0.21g を 2000 年 7 月 30 日、0.21g を 2000 年 8 月 10 日にそれぞれ各ポットに施用した。ほたるいもちの多発した 3 イネ株（線虫接種）、無接種の 4 イネ株を 2000 年 10 月 26 日に収穫し、2000 年 11 月 27 日までにガラス温室の中で乾燥した。使用するまで乾燥種子を暗黒下 5°C で保存した。

種子充実度：各種子の種子充実度を 3.3 節の指標に従って記録した。

種子あたりの線虫個体数：Hoshino & Togashi (1999) の方法を用いて、各種子内の生存線虫と死亡線虫を計数した。種子あたりの線虫数は生存線虫と死亡線虫の合計数であった。

比重による種子グループの分類：ビーカーの中の種子に蒸留水（比重 1.00）を入れて強く攪拌した。種子の動きがなくなった後、浮いた種子を集めて、ペーパータオルで表面の水を拭いた。比重 1.00 未満の浮いた種子を「軽い種子」と呼ぶ。ビーカーの底に沈んだ種子はペーパータオルで種子の表面の水を取った後、塩水（比重 1.13）の中に移した。比重 1.13 の塩の溶液は、NaCl (99.5%) と MgCl₂ (0.5%) の混合塩を蒸留水に加えて作成した。比重は比重計を使って調整した。塩の溶液をかき混ぜた後、浮いた種子と沈んだ種子を別々に集めて、それぞれ中程度の種子（比重 1.00～1.13）、重い種子（比重 1.13

以上) と呼ぶ。蒸留水で種子表面を洗い、塩溶液を除去した後、ペーパータオルを用いて、表面の水を取った。

3つの異なる比重クラスの種子を得るために、2001年3月19日に線虫接種イネと線虫を接種していないイネから採集された保存種子から別々に1,000粒以上の種子をランダムにサンプリングした。これらの種子を比重によってクラス分けした後、すぐに以下の実験に使用した。

種子充実度、種子内線虫数、線虫死亡率と種子比重の関係：線虫接種および無接種のイネについて、比重の異なる3クラスのそれぞれから100粒をランダムに選んだ。各種子についてその充実度と種子内線虫数を調査した。各種子比重グループの種子内線虫数、線虫死亡率、種子の生存率の関係を明らかにするために、種子内線虫数ごとに分けて線虫死亡率と種子の平均充実度を計算した。

種子が沈むまでの時間、発根、苗の生長と種子比重の関係：イネ種子を水に浸漬すると、初めに発芽し、それから発根する。種子の比重と種子が水に沈むまでの時間、発根（幼根の発生）、または初期生育の関係を明らかにするため、照度約9,530lx（蛍光灯）水温25℃の下で、径14mmの試験管内の水（8ml）の表面に充実度の異なる種子を1粒ずつ置いた。21日間にわたって、種子の沈降と発根を毎日7時30分に調査した。幼苗の長さ（苗の基部から葉の先端までの長さ）を発根の3日後に測定した。

線虫接種と無接種のイネ株について、異なる比重クラスの3種子グループからそれぞれランダムに100種子をサンプリングし、2001年3月19日から2001年4月9日の間に調査した。

統計解析：比重の異なる3種子グループ間で、種子の充実度、種子内の生存と死亡線虫数、発根するまでの時間および幼苗の初期生長を比較するためにKruskal-wallis検定を使用した。発根した種子の比率と種子内の線虫死亡率は2×3直交表検定を用いて比較した。比重の異なる3種子グループ間で有意差が検出されたとき、2グループの比率の比較はBonferroni法によって調整された有意水準を用いて2×2直交表検定を行った（山村、1993）。2つの変数間の関係を示すために直線回帰やピアソンの相関係数を使用した。

種子間の線虫の分布集中度を示すために、 I_b 値を計算し、その有意性をF値で検定した（Morisita, 1959）。1未満、1, 1以上の I_b 値は、それぞれ、種子間の線虫の均一分布、ランダム分布、集中分布を示す。

結果

種子充実度、種子内線虫数、線虫死亡率と種子比重の関係

比重が1未満の種子の割合は線虫無接種のイネ株の種子（21.5%）より線虫接種のイネ株の種子（41.0%）では、大きかった。これに対して、比重が1より大きい種子の割合は逆であった（表5.4）。比重が1未満の種子群の中では充実度が低い種子（充実度1と2）の割合は、線虫接種のイネ株の種子で81.5%、線虫無接種のイネ株の種子で79.0%であった（図5.5）。対照的に、胚乳がよく発達した種子（種子充実度4と5）の割合は、線虫接種のイネ株の比重1.00~1.13の種子では95.0%、比重1.13以上の種子では100.0%であり、線虫無接種のイネ株の種子ではそれぞれ98.0%と100.0%であった（図5.5）。その結果、比重1.00~1.13の種子と比重1.13以上の種子より比重1.00未満の種子群の平均種子充実度は小さかった（線虫接種のイネ株 $H=244.6, p<0.001$ ；線虫無接種イネ株 $H=251.7, p<0.001$ ）（表

5.5)。比重 1.00 未満の種子内の種子充実度 1 の種子の割合は、線虫無接種のイネ株 (62.5%) より線虫接種のイネ株 (38.5%) で小さかった (2×2 直交表検定, $\chi^2=23.0, p<0.001$)。そのため、線虫接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子の平均種子充実度 (平均±標準偏差= $1.82 \pm 0.78, n=200$) は、線虫無接種のイネ株のそれ ($1.62 \pm 0.88, n=200$) より大きかった (Kruskal-wallis 検定, $H=11.4, p<0.001$)。

線虫を接種したイネ株の場合、線虫の存在する種子の割合と種子あたりの平均線虫数は比重 1.13 以上の種子よりも比重 1.00 未満や比重 1.00~1.13 の種子が大きかった (表 5.5)。もっとも、比重 1.00 未満と比重 1.00~1.13 の種子の間に有意な差はなかった。比重の異なる 3 種子群のそれぞれで、線虫は種子間で集中分布を示した (比重 1.00 未満の種子は, $I_0=1.997, F=6.42, p<0.001$; 比重 1.00~1.13 の種子, $I_0=1.861, F=7.29, p<0.001$; 比重 1.13 以上の種子, $I_0=5.293, F=9.80, p<0.001$)。このことは生存線虫についても死亡線虫についても同じであった (生存線虫について, 比重 1.00 未満の種子, $I_0=2.418, F=6.41, p<0.001$, 比重 1.00~1.13 の種子, $I_0=2.089, F=7.06, p<0.001$, 比重 1.13 以上の種子, $I_0=6.271, F=10.158, p<0.001$; 死亡線虫について, 比重 1.00 未満の種子, $I_0=2.814, F=3.91, p<0.001$, 比重 1.00~1.13 の種子, $I_0=2.176, F=3.03, p<0.001$, 比重 1.13 以上の種子, $I_0=3.441, F=1.74, p<0.001$)。線虫の死亡率は比重 1.00 未満の種子内で最も高く、比重 1.13 以上の種子内で最も低かった (表 5.5)。線虫を接種していないイネ株の 300 種子から線虫は分離されなかった (表 5.5)。

種子内の線虫の密度逆依存的な死亡は比重 1.00~1.13 の種子と比重 1.13 以上の種子で観察され、比重 1.00 未満の種子でも同じ傾向があった (図 5.6)。

比重 1.00 未満の種子では種子内の線虫数の増加とともに種子充実度は高まった (図 5.7)。線虫のいる軽い種子 (比重 1.00 未満) の平均種子充実度は線虫無接種のイネ株の軽い種子のそれより大きかった ($H=10.0, p<0.01$) (図 5.6, 表 5.5)。特に、7 頭以上の線虫のいる比重 1.00 未満の種子の平均充実度は線虫無接種のイネ株の種子の平均充実度より大きい傾向にあった (図 5.7)。一方、比重 1.13 以上の種子では、種子充実度と種子内線虫数の間に負の相関が認められたが、その差は小さかった (図 5.7)。比重 1.00~1.13 の種子ではそのような相関はなかった (図 5.7)。

種子が沈むまでの時間、発根、苗の生長と種子比重の関係

比重 1.00 以上の全ての種子を水面に置くとすぐに沈んだ。線虫接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子 100 粒の場合、種子を水に浮かべてから 1 日後と 2 日後にそれぞれ 20 粒と 17 粒が沈み、3~19 日後に 62 粒が沈んだ。線虫無接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子 100 粒の場合、種子を水に浮かべてから 1 日後に 26 粒が沈み、2~21 日後に日あたり 0~8 種子の速度で 68 粒沈んだ。比重 1.00 未満の種子が沈むまでの平均時間 (表 5.6) は、線虫無接種のイネ株 (6.8 日) より線虫接種のイネ株 (4.8 日) で短かった (Kruskal-wallis 検定, $H=2.69, p<0.001$)。線虫接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子の場合、種子を水に浮かべてから 1~7 日後に沈んだ 77 粒のうち 43 粒が発根した。他の 30 粒が発根を示さなかった。実験期間 (21 日) 中に種子が水に沈まなかった場合、それらは発芽しなかった。線虫無接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子のうち、水に浮かべてから 1~11 日後に沈んだ種子 75 粒のうち 34 粒は発根した。それらのうち 30 粒は発根前に沈み、残りの 4 粒は発根後に沈んだ。他の種子は発根しなかった。

その結果、線虫接種のイネ株の場合、発根した種子の割合は比重 1.00 以上の種子より比重 1.00 未満の種子で小さかった (2×3 直交表検定, $\chi^2=140.7, p<0.001$)。線虫無接種のイネ株でも同じであった

($\chi^2=169.2, p<0.001$) (表 5.6)。比重 1.00 未満の種子では発根した種子の割合は、線虫接種のイネ株と線虫無接種のイネ株の間に有意な差はなかった (2×2 直交表検定, $\chi^2=1.35, p>0.05$) (表 5.6)。

線虫接種のイネ株からの種子を水面に置いた後、種子が発根するまでの平均時間は、比重 1.13 以上の種子よりも比重 1.00 未満の種子で長かった ($H=16.5, p<0.001$)。線虫無接種のイネ株の種子も同じであった ($H=19.8, p<0.001$) (表 5.6)。比重 1.00 未満の種子と比重 1.00~1.13 の種子では、発根するまでの時間は、線虫接種のイネ株と線虫無接種のイネ株の間に有意な差はなかった (Kruskal-wallis 検定, 比重 1.00 未満の種子 $H=2.44, p>0.05$, 比重 1.00~1.13 の種子 $H=2.54, p>0.05$)。しかしながら、比重 1.13 以上の種子では線虫接種のイネ株の種子が発根するまでの平均時間は線虫無接種のイネ株の種子より長かった ($H=22.7, p<0.001$)。比重 1.00 未満の種子を水面においてから発根するまでの時間は、種子が沈むまでの時間に関係なく、ほぼ一定であった (図 5.8)。比重 1.00 未満の種子が水に沈むまでの時間が増加するにつれて、水に沈んでから発根するまでの時間は減少した (図 5.9)。

線虫接種のイネ株では、発根の 3 日後の鞘葉長は、比重 1.00~1.13 の種子や比重 1.13 以上の種子より比重 1.00 未満の種子は短くなった ($H=8.32, p<0.05$)。しかし、線虫無接種のイネ株の比重の異なる 3 種子グループ間で有意な差はなかった ($H=3.68, p>0.05$) (表 5.6)。これらの 3 種子グループのそれぞれにおいて、線虫接種のイネ株と線虫無接種のイネ株の間で、鞘葉長に有意な差はなかった (比重 1.00 未満の種子グループ $H=0.935, p<0.05$, 比重 1.00~1.13 の種子グループ $H=0.011, p<0.05$, 比重 1.13 以上の種子グループ $H=0.564, p<0.05$)。

考察

線虫を接種していないイネ株から種子を収穫し、水面にそれらを注意深く置くと、約 20%の種子が水に浮き、そのほかの種子はすぐに沈んだ。水に浮いた種子の一部は平均 6.8 日で水に沈み、そして発芽した。このように水に浮く種子の発芽率は低いが、長距離分散を考えると考えられる。一方、比重 1.00 以上の種子は水に浮くことなく沈み、その全ては水に浮く種子より早く発芽した。たいていの場合、比重 1.00 以上の種子と比較して、比重 1.00 未満の水に浮く種子は胚乳がないか、あるいは、極端に少なかった。その結果、水に浮く種子は比重 1.13 以上の種子より発根までの時間が長くなり、苗の上長成長は小さかった。このため、比重 1.00 未満の種子は日光や土壌からの養分を巡る競争では劣る。このことは、比重の違いを通して、イネ種子の分散と競争能力のトレードオフを示している。

圃場での線虫の大発生は、種子あたりの平均胚乳量と穂あたりの平均種子数の減少によって、収量を減少させる (Yoshi & Yamamoto, 1950b ; Todd & Atkins, 1958 ; 深野, 1962)。線虫接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子は比重 1.00 以上の種子よりも発芽率は低く、発芽までの時間は長く、発芽後まもない時期の苗長は短かった。それ故、分散能力と競争能力の間のトレードオフは線虫感染のイネ株の種子の間でも観察された。

線虫は種子伝播性である。このため、比重 1.00 未満の種子内線虫は比重 1.00 以上の種子内線虫よりも長距離を分散する可能性が大きい。親植物の個体群から種子が分散し、ある距離を離れて単独で発芽するとき、発芽時に脱出したイネ株で線虫は増殖しなければならない。それゆえ、イネ種子の発芽は線虫の生存に重要である。脱水して休眠した線虫が吸水後に活動を再開し、種子から脱出し、他の苗で増殖する確率は、種子内の休眠を脱した全線虫が種子から脱出すると仮定すると、種子での線虫

の生存率(1-死亡率)と種子の発芽率の積によって表すことができる。本研究によって、比重 1.00 未満の種子、比重 1.00~1.13 の種子、比重 1.13 以上の種子内の 1 線虫の増殖確率は、それぞれ 0.302, 0.762, 0.848 と推定された。これらの観察から線虫の分散と繁殖の間にトレードオフの関係が示される。これは、種子分散性の線虫における分散と増殖の間のトレードオフの初めての報告である。線虫の感染によって、比重 1.00 未満の種子の比率が増加したけれども、線虫接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子は線虫無感染のイネ株のそれらより平均的に大量の胚乳量を有した。それ故、前者は後者より水に沈むまでの平均時間は短かった。もっとも、線虫接種のイネ株と線虫無接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子の間には、種子の発芽率、発根までの時間、苗の生長に違いはなかった。

線虫接種のイネ株の比重 1.00 未満の種子について、種子内の線虫数の増加とともに、種子の平均充実度は増加した。このことは線虫多発生水田で収穫したイネ種子においてより顕著であった(5.1 節)。すなわち、11 頭以上の線虫のいる比重 1.00 未満の種子はしばしば十分に発達した胚乳(種子充実度 4)を持つ。高い種子充実度は、分散後のイネの生存確率を高めるであろう。以前の実験では、十分に胚乳が発達した種子から、胚乳を半分切除しても完全な植物に生長した(星野・富樫, 未発表)。その結果から、胚乳の少ない比重 1.00 未満の種子の生長は線虫の侵入と繁殖を支えるのに十分であることが示唆された。

種子内の線虫の死亡率は種子内線虫数の増加とともに減少する傾向であった。もっとも、データはとて変わりやすかった。種子内の線虫の性比は雌に偏る(Huang et al., 1979)。その結果、分散後に線虫が宿主植物に定着する確率は、比重 1.00 未満の種子内線虫数の増加とともに異常に高率となるかもしれない。

線虫接種のイネ株の比重 1.00~1.13 の種子と比重 1.13 以上の種子について、種子の平均充実度は、種子内の線虫数に関係なく、ほぼ一定であった。そのため、以前の実験では、多くの線虫のいる種子は少数の線虫のいる種子より胚乳が十分に発達すると述べたが(4.4 節)、その原因は線虫のいる比重 1.00 未満の種子のためであることは明らかであった。

表5.4. イネシンガレセンチュウを接種したまたは接種しないポット植えイネから採取された種子の比重の頻度分布

標本抽出された水田	種子数(割合%)			合計
	軽い (比重 < 1.00)	中間 (比重 1.00 to 1.13)	重 (比重 > 1.13)	
接種されたポット植えイネ	447 (41.0 %)	323 (29.6 %)	321 (29.4 %)	1091 (100.0 %)
非接種のポット植えイネ	395 (21.5 %)	466 (25.4 %)	972 (53.0 %)	1833 (100.0 %)

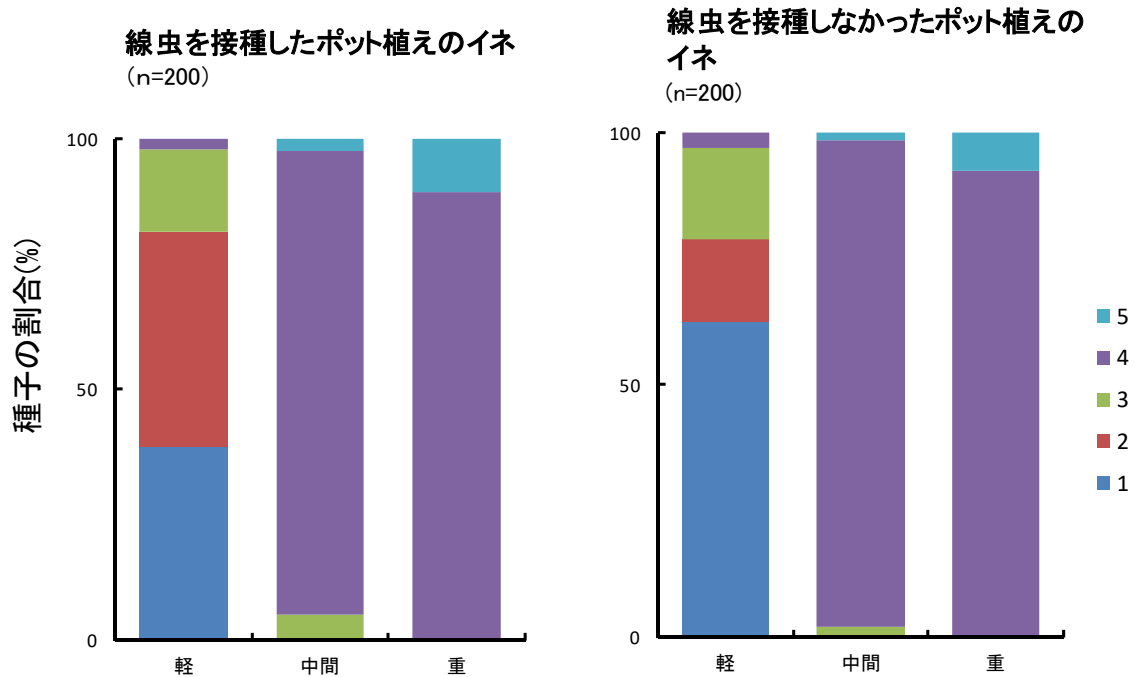


図5.5. イネシンガレセンチュウを接種したまたは接種しなかったイネから採取された種子の比重 (●: 軽, <1.00; ■: 中間, 1.00-1.13; ▲: 重, >1.13)と充実度の関係。
 凡例の数字は種子の充実度, 種子の充実度は胚乳の発達を表す。1: 膨らみのない空の種子; 2: わずかに膨らみ板状の胚乳を有する種子; 3: わずかに膨らみ胚乳の発達の悪い種子; 4: 胚乳が十分に発達した膨らみのある種子; 5: 外穎と内穎の端のロック構造が部分的に破壊された過剰に発達した胚乳を有する種子(各比重クラスについて200種子を調べた)。

表5.5. イネ種子の比重, 種子の充実度, イネシンガレセンチュウに感染した種子の割合, 感染種子内の線虫数 (nematode load), および種子内の線虫死亡率の関係

種子グループ	軽	中間	重	p値
	(比重 < 1.00)	(比重 1.00 to 1.13)	(比重 > 1.13)	
イネシンガレセンチュウを接種したポット植えイネ				
調査種子数	100	100	100	
種子充実度 ¹⁾	1.81±0.75a	3.99±0.27b	4.19±0.39b	<0.001
線虫のいる種子の割合 ²⁾	0.73a	0.86a	0.32b	<0.001
種子あたり生存線虫数 ¹⁾	3.79±4.93a	5.52±6.24a	1.73±4.19b	<0.001
種子あたり死亡線虫数 ¹⁾	1.60±2.50a	1.72±2.28a	0.31±0.73b	<0.001
種子あたり線虫数 ¹⁾	5.39±5.88a	7.24±7.26a	2.04±4.47b	<0.001
死亡率 (%) ²⁾	29.7a	23.8b	15.2c	<0.001
非接種のポット植えイネ				
調査種子数	100	100	100	
種子充実度 ¹⁾	1.54±0.85a	4.00±0.20b	4.13±0.34b	<0.001
線虫のいる種子の割合	0.00	0.00	0.00	

¹⁾ 平均値±SD. 各行で同じ文字を有する平均値はKruskal-Wallis 検定によって有意差を示さなかった。

²⁾ 各行で同じ文字を有する割合または死亡率は2×3分割表によって有意差を示さなかった。有意水準はBonferroni法によって調整された。

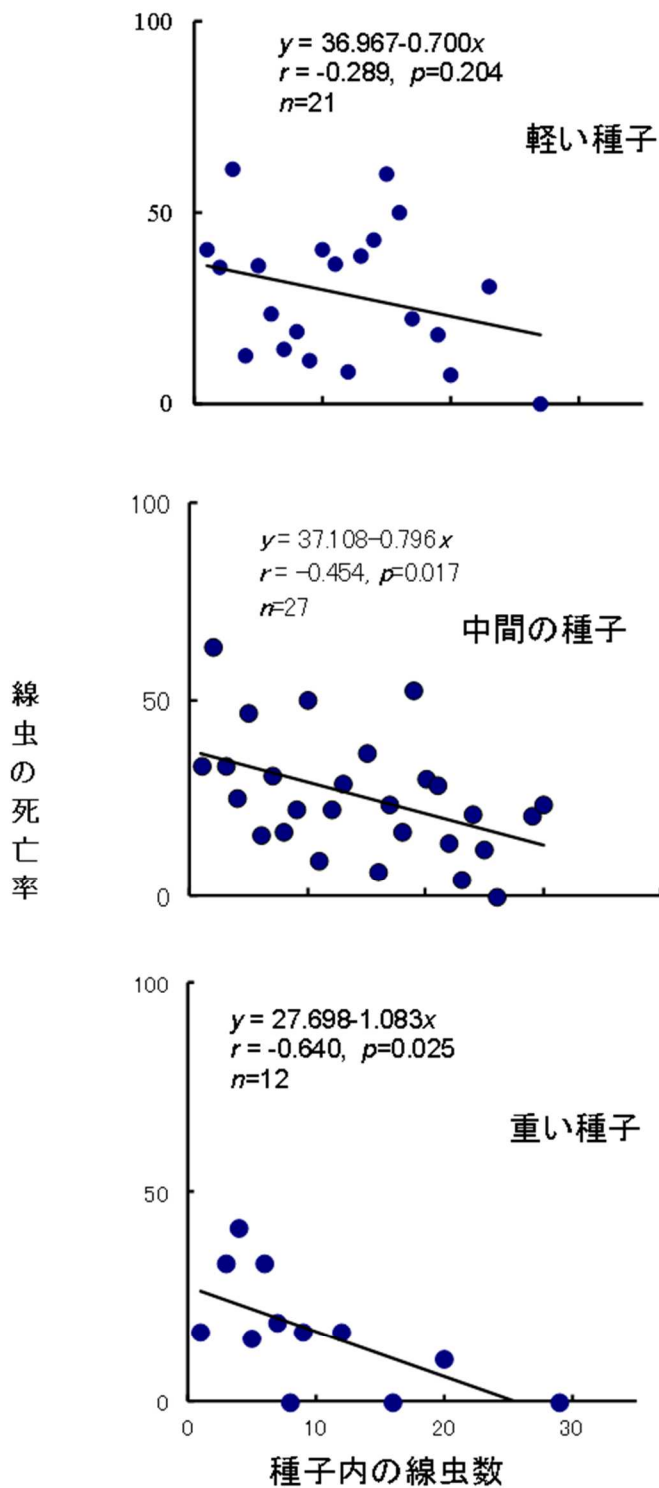


図5.6. 比重の異なるイネ種子クラス(軽, <1.00; 中間, 1.00-1.13; 重, >1.13)の種子内のイネシンガレセンチュウの個体数と死亡率の関係。種子はイネシンガレセンチュウを接種したポット植えイネから採取された。実線は回帰直線をnはサンプル数を示す。死亡率は種子の線虫数のいる種子について、全死亡数と全個体数を調べて計算された。

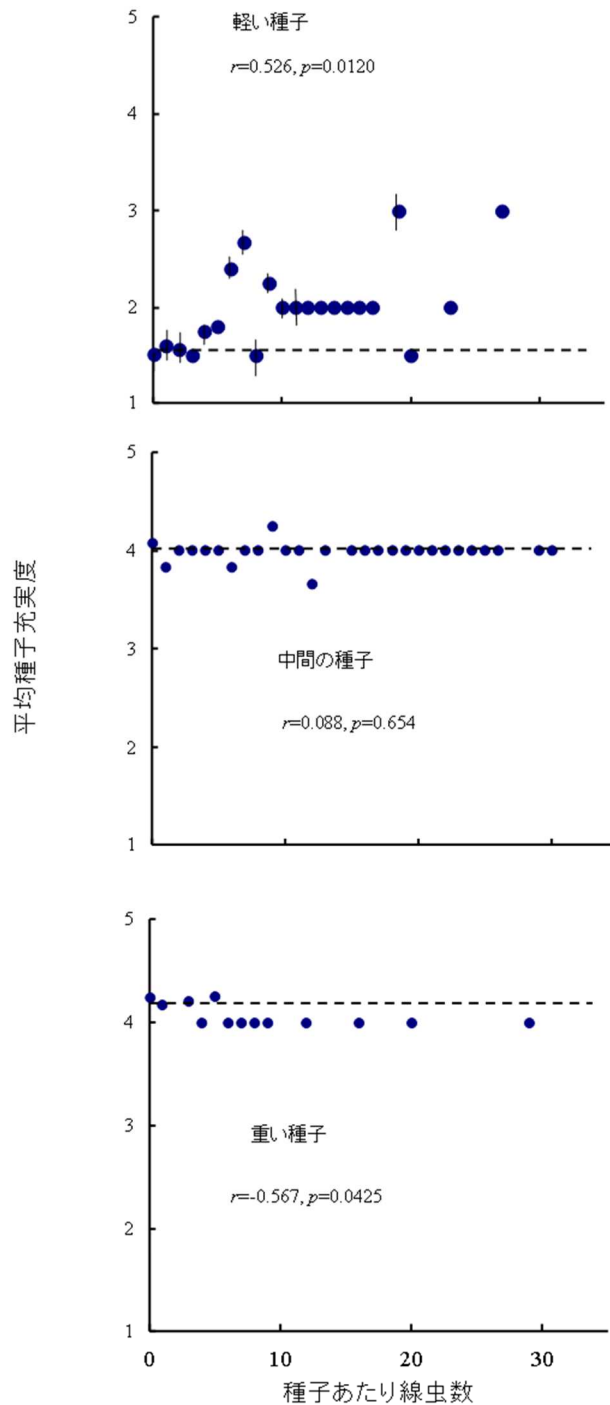


図5.7. 比重の異なるイネ種子クラスの種子内のイネシンガレセンチュウの個体数と種子充実度の関係。種子はイネシンガレセンチュウを接種したポット植えイネから採取された。水平の点線は線虫を接種しないポット植えから採集した種子の平均種子充実度を表す。垂直なバーは標準誤差を示す。

表5.6. イネ種子の比重, 種子充実度, 幼根を伸長した種子の割合, 発根に要した時間, 発根の3日後の鞘葉の長さの関係 種子はイネシンガレセンチュウの接種あるいは非接種のイネから獲得した。

種子グループ	軽 (比重 < 1.00)	中間 (比重 1.00 to 1.13)	重 (比重 > 1.13)	p値
イネシンガレセンチュウを接種したポット植えイネ				
調査種子数	100	100	100	
種子充実度 ¹⁾	1.83±0.80a	3.96±0.28b	4.02±0.14b	<0.001
種子が沈むまでの時間 (日) ¹⁾	4.81±3.61 (99)a	0.00±0.00 (100)b	0.00±0.00 (100)b	<0.001
発根した種子の割合(%) ²⁾	43.0a	100.0b	100.0b	<0.001
幼根が出るまでに要した時間 (日) ¹⁾	8.23±2.03 (43)a	6.95±1.56 (50)ab	6.79±1.37 (50)b	<0.001
鞘葉の長さ (cm) ¹⁾	2.05±0.61 (43)a	2.30±0.51 (50)b	2.30±0.46 (50)b	<0.05
非接種のポット植えイネ				
No. of seeds examined	100	100	100	
種子充実度 ¹⁾	1.69±0.91a	3.99±0.17b	4.02±0.14b	<0.001
種子が沈むまでの時間 (日) ¹⁾	6.83±5.81 (94)a	0.00±0.00 (100)b	0.00±0.00 (100)b	<0.001
発根した種子の割合(%) ²⁾	34.0a	100.0b	100.0b	<0.001
幼根が出るまでに要した時間 (日) ¹⁾	7.50±2.34 (34)a	6.67±1.57 (50)ab	5.93±1.23 (50)b	<0.001
鞘葉の長さ (cm) ¹⁾	2.14±0.48 (34)a	2.29±0.40 (50)a	2.33±0.38 (50)a	>0.05

¹⁾ 平均値±SD. 各行で同じ文字を有する平均値はKruskal-Wallis検定によって有意差を示さなかった。

²⁾ 各行で同じ文字を有する発根種子割合は2×3分割表によって有意差のないことが示された。有意水準はBonferroni法によって調整された。

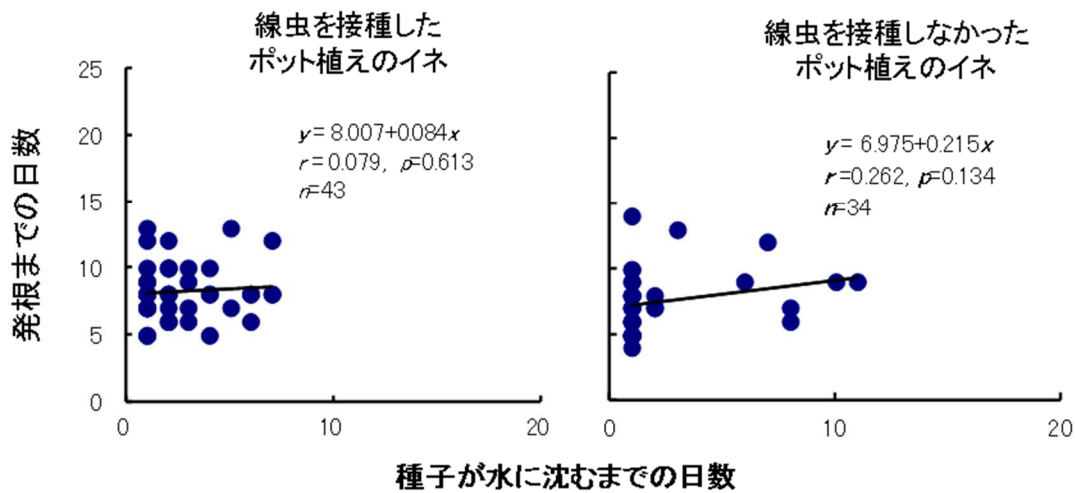


図5.8. 軽い種子を9530lx照明下25℃で水表面に置いてから水に沈むまでの日数と発根までの日数の関係。軽い種子はイネシンガレセンチュウを接種したポット植えのイネと線虫を接種しないポット植えのイネから採取した。実線は回帰直線を、nは発根した種子数を示す。

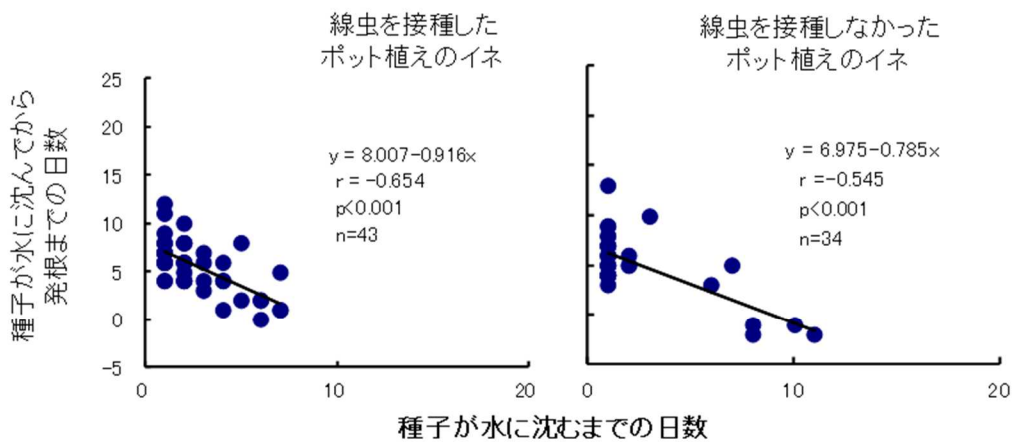


図 5.9. 軽い種子を9530lx照明下25℃で水表面に置いてから水に沈むまでの日数と種子が水に沈んでから発根までの時間の関係。軽い種子はイネシンガレセンチュウを接種したポット植えのイネと線虫を接種しないポット植えのイネから採取した。実線は回帰直線を、nは発根した種子数を示す。

5.3. 育苗箱内分散に及ぼす種子内のイネシンガレセンチュウ密度の影響

線虫は本田での感染より苗代での感染が問題にされてきた（深野，1962；小林・杉山，1977）。本田での感染の可能性はあるが，株間への移動・分散の頻度は少ない（5.4節）。イネは水田移植のために育苗箱で育てる。その場合，苗間の距離は1cm以下であり，本田と比較すれば，育苗箱内は極めて高いイネ密度である。育苗箱での線虫については，育苗方法によりほたるいもち発病率が異なり，育苗に育苗箱を用いると，水苗代よりほたるいもちの発病率は高い（池田ら，1977）。

線虫に感染した種子が育苗箱に播かれると，線虫は感染種子から分散すると考えられる。そのような線虫の分散・定着の頻度がどれくらいか明らかにされていない。そこで，線虫感染種子の混入率を変えて，育苗箱内の線虫初期密度を変え，線虫の分散・定着に及ぼす密度の影響を調べた。

材料と方法

イネ種子と線虫の接種

2002年6月10日にワグネルポットに線虫無感染のイネ‘ヒノヒカリ’の苗を1本移植し，その直後に線虫3,000頭をワグネルポットの水の中に入れた。2002年10月15日に収穫後，天日で11月5日まで乾燥し，その直後に，穂切りを行った後，暗条件5℃の恒温器で保存した。

線虫無感染種子

2002年に広島県立農業技術センターで生産された原種‘ヒノヒカリ’を供試した。無作為に抽出した100種子に大量分離法（2.2節）を適用した。同じ種子に3回抽出を反復し，線虫の寄生のなかった種子を線虫無感染種子として実験に使用した。

線虫を接種したイネの種子（線虫感染種子）10粒，20粒，50粒，100粒，200粒，500粒に無感染種子をそれぞれ，5,820粒，5,810粒，5,780粒，5,730粒，5,630粒，5,330粒を混ぜ合わせて，5,830粒（乾粒約150g）にした（以下，それぞれ，10粒区，20粒区，50粒区，100粒区，200粒区，500粒区と称する）。供試した線虫感染種子あたりの生存線虫数は4.37頭±6.20であった（n=30）。

イネの育苗・栽培管理とほたるいもち発生調査

育苗箱（内寸58cm×28cm×2.8cm）に，粒状培土4,500cm³を入れた。2003年5月2日に，芽出しのために，供試種子を水に浸漬した。2003年5月5日に種子から水を除去して陰干しをした。2003年5月6日に，感染種子10粒区，20粒区，50粒区，100粒区，200粒区，500粒区の種子5,830粒を5育苗箱，2育苗箱，2育苗箱，1育苗箱，1育苗箱，1育苗箱それぞれに播種した。このため，線虫感染種子の割合は，10粒区で0.002，20粒区で0.003，50粒区で0.009，100粒区で0.017，200粒区で0.034，500粒区で0.086となった。

種子を撒いた育苗箱を2003年5月8日まで恒温器に入れ（器内温度29.7℃），その後，ガラス室内に平置きし，慣行の水管理を行った。2003年5月27日に感染種子10粒区，20粒区，50粒区，100粒区，200粒区，500粒区のそれぞれの育苗箱から6本，10本，10本，10本，10本，10本をサンプリングし，ワグネルポットに苗1本ずつを移植して栽培をおこなった。2003年8月4日に，ほたるいもちの発生調査を行った。2003年10月20日に種子を収穫し，11月10日まで乾燥した。乾燥後，線虫調査を行うまで，種子を暗条件5℃で保存した。

線虫密度の調査

ワグネルポットへのイネ苗の移植時（2003年5月27日）に、各育苗箱から10苗を採取し、苗を柄付針で分解しながら、イネ体外の線虫数を調査した。また、2003年8月4日にワグネルポットに移植したイネの茎数とほたるいもち症状を呈している葉のある茎数を計数し、ほたるいもち発生茎率と発生株率を算出した。

収穫したイネから1株あたり5～8穂を無作為に抽出し、1穂から20種子を採取して、大量分離法によって線虫数の調べ、線虫が回収された種子の割合を算出した。

結果と考察

苗に寄生した線虫の検出率は10粒区0.0%、20粒区0.0%、50粒区5.0%、100粒区0.0%、200粒区10.0%、500粒区20.0%となった（表5.7）。ワグネルポットに移植したイネのほたるいもち発生率は、線虫感染種子割合に依存して増加し、感染種子10粒区で3.3%、20粒区で0.0%、50粒区で5.0%、100粒区で10.0%、200粒区で10.0%、500粒区で30.0%であった（表5.7）。ワグネルポットに移植した時点で、線虫を分離できたイネ株の割合は、線虫感染種子割合には関係なく、感染種子10粒区で20.0%、20粒区で20.0%、50粒区で15.0%、100粒区で10.0%、200粒区で20.0%、500粒区で70.0%であった（表5.8）。

ワグネルポットに移植した時点のイネ株への線虫感染株率に対する初期の線虫感染種子混入率は、線虫の増殖の成功度を示す。その値は、感染種子10粒区で116.6倍、20粒区で58.3倍、50粒区で17.5倍、100粒区で5.8倍、200粒区で5.8倍、500粒区で8.2倍となった。すなわち、播種前の線虫密度が極めて低くても、育苗箱での育苗期間の間に線虫は増殖して広く分散することが示された（表5.8）。

線虫感染種子を混入して育苗することによって、線虫に感染した苗数は増加した。このことから、育苗箱で線虫は分散し、無感染のイネに移動し、定着すると推察できる。田村・氣賀沢（1958）は、イネ苗3～4葉期以下で游出線虫は株間移動を活発に行い、健全苗も罹病苗同様の被害をあらわす。葉齢の1齢から6齢までのイネを比較した場合、葉齢1齢で最高の株間移動率を示している。本研究の場合、ワグネルポットに移植した時のイネの葉齢は約2.5齢であった。このことから、本研究での育苗箱では株間移動率は高いと考えられた。

池田ら（1977）は、育苗期間中の二次感染による健全種子苗の発病率は育苗箱で高くなったと報告した。池田ら（1977）の試験では、100種子あたり4頭の線虫でも93.3%の発病株率を示した。育苗箱内に播種された種子数が我々の研究と同じだと考えると、このときの育苗箱の線虫密度は515頭/100種子の場合、300,024頭、23頭/100種子の場合、1,340.9頭、4頭/100種子の場合、232.2頭となる。本研究の場合、線虫感染種子10粒では43.7頭、20粒では97.4頭、50粒では218.5頭、100粒では437頭、200粒では974頭、500粒では2,185頭となり、池田らの試験よりも育苗箱あたりの線虫数は少なかった。池田ら（1977）の試験の4頭/100種子が本研究の線虫感染種子50粒混入と同等と考えると、本研究での感染株率（15%）は池田ら（1977）結果より低くかった。線虫のいる種子の割合は本研究では53.3%であった。池田ら（1977）の試験では、線虫がいる「線虫感染種子」の割合と播種した種子数が不明であるため、池田ら（1977）の試験で感染株率が高くなった理由をこれ以上論議できなかった。

本研究での結果も育苗箱での線虫の分散を示した。このように、育苗箱での線虫の分散は線虫の感染率を高めるため、防除に重要な時期であると考えられる。したがって、線虫の防除は、育苗箱に播種されるまでの線虫数を減少させるだけでなく、育苗箱での線虫の分散を防ぐことが有効と考えられ

る。すなわち、播種直後の殺虫剤の育苗箱への施用は線虫防除の手段として有効であると考えられる。

表5.7. 育苗箱への線虫感染種子混入率とほたるいもち発生株率の関係

処理区	線虫感染種子混入率 (%)	抽出苗数	苗から線虫が分離された株数	苗からの線虫分離株率 (%)	移植した株数	ほたるいもち発生株数	ほたるいもち発生株率 (%)
10粒区	0.2	50	0	0.0	30	1	3.3
20粒区	0.3	20	0	0.0	20	0	0.0
50粒区	0.9	20	1	5.0	20	1	5.0
100粒区	1.7	10	0	0.0	10	1	10.0
200粒区	3.4	10	1	10.0	10	1	10.0
500粒区	8.6	10	2	20.0	10	3	30.0

表5.8. 育苗箱の推定初期生存線虫数と線虫感染株率の関係

処理区	推定初期生存線虫数	株数	線虫感染株数	線虫感染株率 (%)
10粒区	43.7	30	6	20.0
20粒区	87.3	20	4	20.0
50粒区	218.3	20	3	15.0
100粒区	436.7	10	1	10.0
200粒区	873.3	10	2	20.0
500粒区	2183.3	10	7	70.0

5.4. イネシンガレセンチュウの密度依存的な定着と繁殖

線虫がイネに感染する過程は、分布範囲外の新しい地域に生物が侵入にする過程に似ている。生物学的侵入は、通常、別個の3過程に分けられる。すなわち、到達（個体が分布範囲外の新しい地域に運ばれる過程）、定着（絶滅が起こらないレベルにまでに個体群が成長する過程）そして、分布域の拡大（新しいエリアに侵入種の分布域が新しい地域に拡大する過程）である（Liebhold & Tobin, 2008）。到達の段階では、ある場所に到達する個体数とその頻度が重要である。非常に小さな個体群が新しい場所に到達しても、それは絶滅しやすい。なぜなら、極端な性比の偏りのような出生や死亡の偶然性（人口論的不確実性）、嵐のような非生物学的環境の偶然性、あるいはアリー効果が存在するからである。アリー効果は個体群密度と繁殖率の正の相関あるいはアリー閾値（それ以下の密度では個体群は絶滅する）を表す。アリー効果は、配偶者の探索失敗、近交弱勢、捕食者を満腹させるのに必要な個体数の不足、そして、協力的な採餌に必要な個体数の不足によって起こる（Taylor & Hastings, 2005; Berec et al., 2007; Liebhold & Tobin, 2008）。

生物学的侵入の理論から、線虫の高密度個体群に比べて低密度個体群はイネに感染するのが非常に難しいことが予測される。西澤ら（1953）は、感染種子の籾殻の量とほたるいもちの発生率の間に正の相関を認めなかった。しかしながら、イネ種子内の線虫数には大きな変異があるので（4.4節）、西澤ら（1953）の方法は正の相関関係を不明瞭にしたかもしれない。正の相関関係が見られる場合、線虫密度が生物学的侵入の3段階に及ぼす効果を明らかにすることは重要である。線虫の場合、未感染のイネ株での定着に続いて、線虫が種子内に分布を広げると考えられる。なぜなら線虫は植物体の最も内部の生長点付近に生息するからである。それ故、到達と定着の段階は、水田の線虫の個体群動態に重要である。

水中の線虫の個体群密度がイネへの到達や定着に及ぼす効果を明らかにするために、3つの実験を行った。第1の実験では、水中の線虫密度、イネに定着成功率、ほたるいもち発生率、イネ株あたりの線虫個体群の増加率の関係を明らかにした。他の2つの実験では、到達率を直接測定し、線虫密度と到達率の関係を明らかにした。

材料と方法

線虫の初期の定着と繁殖に及ぼす線虫密度の影響（実験1）

線虫

広島県内で採集された線虫の2個体群を実験に使用した。1つの個体群は1998年9月下旬に尾道市（34°12'31.9" N, 133°12'17.3" E）で収穫した線虫感染イネ‘ヒノヒカリ’の種子内から採取した（以下、尾道個体群）。別の個体群は、2001年9月中旬に作木村（34°51'53.1" N, 132°43'8.2" E）で収穫されたイネ‘コシヒカリ’の種子内から採取した（以下、作木個体群）。線虫感染種子は暗黒下5°C、湿度30%の条件下においた。さらに、2003年に作木個体群をイネ‘ヒノヒカリ’に感染させた。

感染種子由来の植物は2004年に栽培した。その後、このイネは、毎年ポットを用いて栽培を繰り返した。収穫された種子は上述の条件下で貯蔵した。

2003年12月5日に2線虫個体群を50~75種子から大量分離法によって分離し、それらの線虫から

ランダムに 30 頭が選び、実験室個体群を無菌的に確立した。その 2 実験室個体群を、*Botrytis cinerea* の菌糸マットを用いて、25°C で別々に継代培養した。約 1 ヶ月間で *B. cinerea* で培養された線虫を実験 1 に用いた。1 頭の幼虫を隔離して培養しても増殖しなかったため、2 個体群は両性生殖であると判断した。線虫を接種する場合、実験日の早朝に線虫を培地から分離し、水中の線虫密度を調整した。

イネの栽培

2004 年 4 月 28 日に、線虫に無感染のイネ種子‘ヒノヒカリ’ 300 粒を発芽のために水に浸漬した。その 4 日後、発芽した種子を育苗箱の殺菌土壌に播種し、4 日間 30°C に保った。苗は通風ビニルハウス内に移した。面積 200cm² のワグネルポット 90 個にそれぞれ 3.3L の土壌を入れ、土壌表面から 2cm に達するまでポットに水を入れた。2004 年 6 月 4 日に苗の第 1 葉と第 2 葉が十分に伸張し、第 3 葉の葉長が 60% に伸張した（葉の 2.6 葉期）ので、苗を 1 本ずつ 90 個のワグネルポットに移植し、広島県立総合技術研究所農業技術センター内の圃場においた。農家の慣行に従って、肥料を 3 回施用した。窒素 14%，リン酸 14%，カリ 14% の組成の肥料を 2004 年 6 月 20 日と 2004 年 7 月 10 日にポットあたり 0.43g と 0.2g をそれぞれ施用した。2004 年 7 月 30 日には窒素 17%，カリ 17% の組成の肥料をポットあたり 0.21g 施用した。

線虫の水中放飼と初期生存率

イネ苗の移植後すぐに、線虫を 10 頭、100 頭、1,000 頭、3,000 頭を含む浮遊液 10ml を各ポットの苗から 3cm 離れた水中に注いだ。線虫浮遊液には成虫と幼虫が含まれていた。各個体群の各処理の反復数は 10 であった。対照として線虫を放していない 10 苗を用いた。

水に放した線虫の生存率を推定するために、2004 年 6 月 4 日に、線虫 96 頭を含む 10ml の水を、径 35mm、深さ 78mm のガラス管ビンに入れた。そして、ガラス管ビンのスクリーキャップをゆるめに閉じた。作木個体群の線虫 121 頭を別のガラス管ビンに入れて同様に置いた。水深を 2cm に調整した対照ワグネルポットの中に、これらの 2 管ビンを垂直に立てた。そして、管ビンの底を土壌の中、深さ 1cm にまで入れて、管ビンの入り口からポットの水が入らないようにした。この時の水温は 22.4°C であった。24 時間後、管ビンの生存線虫と死亡線虫を計数した。

外部病徴

線虫は止葉の先端を黄化させる。これがほたるいもちの病徴である。2004 年 7 月 23 日、29 日および 8 月 12 日に、全てのイネについて、ほたるいもちの病徴を記録した。

線虫感染イネの生産種子の量と特性

2004 年 10 月 10 日にイネを収穫し、2004 年 11 月 10 日までビニールハウス内で乾燥した。穂とそれ以外に植物体を分け、乾燥種子を数えた。種子は種子充実度や種子内線虫数を調べるまで暗黒下 5°C で保存した。

胚乳の発達の指標として種子充実度をイネ株あたり 60 種子で測定した。これら 60 種子は、ランダムに選ばれた 3 穂の各々から 20 種子をランダムに選んで作った。種子充実度は 4.4 節で説明した通りであった。

線虫数の調査

種子内の生存線虫と死亡線虫の数は Hoshino & Togashi 法を使って調べた。イネ株内の線虫の増加率が、水中の線虫数に依存して変化するかどうかを明らかにするために、各株の全種子内の線虫総数を

種子総数と種子あたりの平均線虫数の積によって推定した。そして、イネ苗の周りの水に放した線虫数に対する全種子内の線虫総数の比率によって、増加率が得た。

イネ苗への到達に及ぼす水中の線虫密度の影響（実験 2）

線虫

線虫は作木個体群を用いた。2004年に収穫された種子から分離し、2008年に *Botrytis cinerea* 菌糸で無菌的に培養した。実験日の早朝に線虫を培地から分離し、水中の線虫密度を調整して接種に用いた。

イネの栽培

線虫を種子から除去するため、2008年5月30日にイネ‘ヒノヒカリ’種子を $60 \pm 1^\circ\text{C}$ の湯に10分間浸漬した。2008年6月2日に、粒状培土（宇部粒状培土）の入った育苗箱に種子を播いた。苗は、9,530lxの蛍光灯の下、 25°C で、6月21日まで栽培された。実験2では、苗の根から土壌を完全に取除いてから用いた。

線虫の水中放飼および線虫の苗への到達

内径15.4mm、深さ18cmのガラス製試験管に、線虫を10頭、100頭および1000頭を浮遊させた水10mlを入れ、1本ずつイネ苗をいれた。この試験管を約9,530lxの蛍光灯下 25°C に置いた。24時間後に苗を流水で洗い、水や流水中の線虫を数えた。葉鞘を除いて、十分に伸長した葉の数、伸長中の葉については十分に伸長した葉の長さに対する伸長中の葉の長さの割合、最も長い葉（通常第2葉）の長さを測定した。線虫密度10頭、100頭、1000頭の処理の反復は、それぞれ30、10、5であった。

玄米の発芽、玄米から生じた苗の成長、およびその苗への到達に及ぼす線虫密度の影響（実験3）

線虫

作木個体群を用いた。2007年に収穫された種子から分離され、2009年に *Botrytis cinerea* 菌糸で無菌的に培養された。線虫を接種する場合、実験日の早朝に線虫を培地から分離し、水中の線虫密度を調整した。

イネの種子の処理

イネ‘ヒノヒカリ’種子を2010年5月26日に温湯消毒（ $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 、10分間）し、すぐに種子の水をペーパータオルで除去し、再び暗黒下 5°C で保存した。実験当日（2010年6月7日）に内穎と外穎を種子から取り除き、そのような玄米を実験に用いた。

線虫の水中放飼および玄米種子への線虫の到達

2010年6月8日に、内径10.4mm、深さ80mmの試験管に、10頭、30頭または100頭の線虫を含む6mlの水を入れた。そして、試験管の水表面に玄米種子を1つずつ置いた。玄米を約9,530lxの蛍光灯下、 25°C で保ち、毎日午前7:30に10日間、玄米種子の発芽と発根（幼根）を記録した。発根から3日後に、基部から葉頂までの葉鞘長を測定した。発根から6日後に苗を新しい試験管に移し、古い試験管内の水中の生存線虫と死亡線虫を数えた。ただし、発芽と発根をしなかった2玄米種子については線虫数調査を行わなかった。この後、生存線虫数を毎日記録した。この実験は10日後に終了した。線虫密度10頭、30頭、100頭の処理の反復は、それぞれ36、35、36であった。

統計処理

実験 1 でガラス管ビンの中の線虫の死亡率、線虫が回収されたイネの割合、発芽と発根をした種子の割合を処理区間で比較するために、Fisher の正確確率検定を使用した。水中の線虫の生存率は、Yate の補正を用いた 2×2 分割表によって比較した。その時、5%有意水準は Bonferroni 法によって補正した。

線虫が回収されたイネ株あたりの種子生産数の対数変換値と種子充実度を各線虫密度の 2 個体群間で比較するために、t 検定を使用した。

一元分散分析は、線虫が回収されたイネ株あたりの種子生産数の対数変換値を線虫密度の間で比較するために使った。分散に差がなかった場合、一元分散分析は、葉の数、最も伸長した葉の長さ、葉鞘長、第 1 葉の長さ、第 2 葉の長さを線虫密度間で比較するために使った。平均値の多重比較は Bonferroni 法によって調整された。Kruskal-wallis 検定は、発芽までの時間と発根までの時間を比較するために使った。

種子あたりの線虫数、イネ株が生産した全種子内の推定線虫数、線虫個体群の増加率に及ぼす線虫個体群間、線虫密度、それらの相互作用の影響を明らかにするために、二元配置分散分析を用いた。平均値の多重比較には Bonferroni 法によって調整した有意水準を用いた。

結果

線虫の初期の定着と繁殖に及ぼす線虫密度の影響（実験 1）

ワグネルポット内の水に放された線虫の生存

線虫（尾道個体群）96 頭を管ビン中に入れ、1 日間栽培ポット内の水中に置いた。24 時間の間に 1 頭が死亡した。作木個体群の線虫 121 頭の場合、24 時間後には 3 頭が死亡していた。死亡率は小さく、2 つの個体群間に差はなかった（Fisher 正確確率検定, $P=0.631$ ）。

ほたるいもちの発生と種子生産に及ぼす水中の線虫個体数の影響

線虫の株当たり個体数の増加とともに、ほたるいもち症状のイネの割合と線虫が回収されたイネの割合は尾道個体群と作木個体群の両方で増加した（表 5.9）。尾道個体群では、10 頭で 7 個、100 頭で 7 個、1000 頭で 2 個、作木個体群では 10 頭で 6 個、100 頭で 5 個、1000 頭で 1 個、3000 頭で 1 個と線虫を分離できなかったポットがあった。

尾道個体群の場合、ポット植えイネ株のあたり生産種子数は、線虫密度間で差がなかった ($F_{4,45}=1.25$, $p>0.05$)（表 5.10）。作木個体群の場合、線虫を添加しなかったポットのイネ株に比べて、3,000 頭の線虫の一部が繁殖に成功したイネ株の種子は有意に多かった（表 5.10）。線虫が回収されたイネ株あたりの生産種子数は、水中の線虫個体数が同じ場合、2 線虫個体群間に違いはなかった（表 5.10）。

種子の平均充実度は、水中の線虫個体数 0 のイネ株より尾道個体群の 100 頭または 1,000 頭の線虫の一部が定着に成功したイネ株で小さかった ($H=16.1$, $p<0.01$)。作木個体群の場合、種子の平均充実度は、水中の線虫個体数 0 のイネ株より 1,000 頭の線虫の一部が定着に成功したイネ株で有意に小さかった ($H=19.2$, $p<0.001$)（表 5.11）。種子の平均充実度は、水中の線虫個体数が同じ場合、2 個体群間で有意な差はなかった（表 5.11）。

線虫個体群の増殖に及ぼす水中の線虫密度の影響

種子あたり生存線虫数は、水中の線虫個体数が 1,000 または 3,000 頭のイネ株より、10 頭のイネ株で有意に少なかった ($p < 0.01$) (表 5.12)。すなわち、二元配置分散分析によって、種子あたりの生存線虫密度は水中の線虫個体数間で異なるが ($F_{3, 43} = 5.75, p < 0.01$)、個体群間では異ならず ($F_{1, 43} = 0.03, p > 0.05$)、線虫個体数と個体群の交互作用によって影響されないこと ($F_{3, 43} = 1.29, p > 0.05$) が示された。種子あたりの平均死亡線虫数も水中の線虫個体数間で異なった ($F_{3, 43} = 6.61, p < 0.001$) が、個体群間で異ならず ($F_{1, 43} = 0.01, p > 0.05$)、線虫密度—個体群の交互作用によって影響を受けなかった ($F_{3, 43} = 1.22, p > 0.05$)。その結果、種子あたり平均線虫数 (生存虫 + 死亡虫) は水中の線虫個体数間で有意に異なったが (二元分散分析, $F_{3, 43} = 6.33, p < 0.01$)、個体群間で異ならず ($F_{1, 43} = 0.03, p > 0.05$)、線虫個体数—個体群の交互作用によって影響を受けなかった ($F_{3, 43} = 0.95, p > 0.05$)。水中線虫個体数が増加するにつれて、種子内の平均線虫数は増加した (表 5.12)。

線虫が定着に成功したイネ株あたり生産された全種子数の推定値は、水中の線虫個体数間で異なったが (二元分散分析, $F_{3, 43} = 5.54, p < 0.01$)、個体群間では異ならず ($F_{1, 43} = 0.44, p > 0.05$)、線虫個体数—個体群の相互作用によって影響を受けなかった ($F_{3, 43} = 1.77, p > 0.05$)。水中の線虫個体数が増加するにつれて、栽培終了時の全種子中の線虫数は増加したのに対して、線虫個体群の増殖率は減少した (表 5.13)。個体群の増殖率の対数変換値も水中の線虫個体数の間で異なったが (二元分散分析, $F_{3, 43} = 25.05, p < 0.001$)、個体群間では異ならず ($F_{1, 43} = 0.82, p > 0.05$)、線虫個体数—個体群の交互作用によって影響を受けなかった ($F_{3, 43} = 1.05, p > 0.05$)。

イネ苗への到達に及ぼす水中の線虫密度の影響 (実験 2)

線虫をポットに入れてから 24 時間後、水中に残っていた線虫は少なかった (図 5.10)。すなわち、たいいていの線虫はイネ苗に到達したと考えられた。接種頭数が多いほど、苗に到達した線虫数は増加した (表 5.14)。試験管内のイネ苗に 1 線虫が到達する確率は、試験管に放した線虫のうち水中から消失した線虫の割合として定義した。1 線虫の到達確率は水中の線虫密度の間で有意に異なった (Kruskal-wallis 検定, $H_{2, 101} = 34.76, p < 0.001$)。高い線虫密度より最低の線虫密度は高い到達確率を示した (表 5.14)。

玄米の発芽、玄米から生じた苗の成長、およびその苗への到達に及ぼす線虫密度の影響 (実験 3)

10 日間に 2 玄米以外の全玄米が芽と幼根を伸ばした (表 5.15)。発芽は実験開始の 1 日後から 6 日後までの間に、発根は 3 日後から 7 日後までの間に起こった。30 頭の線虫を入れた水に玄米を浮かべた場合、35 玄米のうち 2 玄米は発芽も発根もせず、実験期間中に腐敗した。

線虫のいない水中の玄米に比べると、30 頭と 100 頭の線虫を接種した区では玄米の発芽が遅かった ($F_{3, 136} = 3.41, p < 0.05$) (表 5.15)。発芽・発根した玄米の割合 ($p > 0.05$)、発芽までの時間 (Kruskal-wallis 検定, $H_{3, 136} = 0.36, p > 0.05$)、発根までの時間 ($H_{3, 136} = 0.03, p > 0.05$)、鞘葉長 ($F_{3, 136} = 1.39, p > 0.05$)、第 1 葉長 ($F_{3, 136} = 1.05, p > 0.05$)、第 2 葉長 ($F_{3, 136} = 1.05, p > 0.05$) と水中の線虫密度の間に有意な差はなかった (表 5.15)。

一部の線虫は試験管の水中に放してから 6 日後にも生きていた。試験管あたり 10 頭を放した場合、35 本の試験管の水中から 28 頭の死亡線虫が見つかった。30 頭の線虫を放した場合、33 本の試験管の水中から生存線虫 1 頭と死亡線虫 194 頭が見つかった。100 頭の線虫を放した場合、36 本の試験管の

水中から生存線虫 33 頭と死亡線虫 898 頭が見つかった。線虫を水中に放してから 6 日後には生きた線虫は水中にいなかった。もっとも、10 頭、30 頭、100 頭の線虫を放した全ての試験管の 1 日あたりの平均死亡線虫はそれぞれ 11.3 頭、96.3 頭、239.0 頭であった。試験管に 30 頭放した場合より 100 頭放した場合で、水中の線虫の生存率は高かった。

試験管の水中に放された線虫数が増えるにつれて、水中に残っている線虫数は増加したが、線虫あたりの玄米への到達確率（＝消失した線虫数（接種線虫数-水中の線虫数）/放された線虫数）は減少した（表 5.15）。

考察

本研究では、水中の線虫の個体群サイズが減少するにつれて、イネ苗に定着する確率は減少した（表 5.9）、すなわち、ほたるいもちの発生株率が減少した。このような正の相関関係は、感染と発病の中に密度依存的過程が含まれることを示す。そして、それらはイネ株への線虫の到達と線虫の繁殖に相当する。

実験 1 でポット内のイネ苗の近くに線虫 1,000 頭あるいは 3,000 頭を放した時、線虫あたりの到達確率はとても小さいと推定された。実験 2 と 3 では、イネ苗を有する試験管の中に線虫を入れたとき、比較的大きな割合の線虫が試験管内の水中から消失することが示された。実験 2 では苗に穎が残っていたので、線虫は穎の上にもいたかもしれない。実験 3 では穎のない玄米から生じた苗でもかなりの割合の線虫の消失が示された（表 5.15）。両方の結果から、水中から消失した線虫はイネ苗に到達したことが示された。従って、2 つの実験は線虫 1 頭あたりの実際の到達確率が比較的高く、1 試験管あたり線虫 1 頭から 100 頭までの範囲内では、到達確率が密度依存的に減少することを示した。

実験 1 において 10 頭から 3000 頭までの線虫を放した時、異性の 2 頭の幼虫または 1 頭の受精したメス成虫がイネ上で繁殖すると仮定すると、イネ苗に到達した平均線虫数は非常に少ないと推定される。しかしながら、実験 2 と 3 では、10 頭から 100 頭までの線虫を放したとき、苗に到達した平均線虫数はかなり多いことを示した。それ故、実験 1 で 100 頭以上の線虫を放したとき、多数の線虫がイネに到達したと考えられる。

1 頭の線虫もイネに到達しない時、線虫個体群はイネに定着できない。さらに、同性の幼虫だけが到達したり、あるいはオス成虫だけが到達したりする場合、線虫は両性生殖なので、個体群はイネで増殖できない、このような場合が偶然で起こるかもしれない。つまり、人口統計学的不確実性が存在する。

生物学的侵入の理論は、環境的または人口統計学的不確実性やアリー効果によって、植物に到達した線虫の小個体群は定着しにくいことを説明する（Liebhold & Tobin, 2008）。実験 1 の期間中に激しい台風のような散発的で破壊的なく乱はなかった。植物に到達した線虫個体群にアリー効果が作用するかもしれない。アリー効果が起こる原因は、配偶者探索の失敗、近交弱勢、捕食者を満腹させるのに必要な個体数の不足、および協力的な採餌に必要な個体数の不足を含む（Berec, 2007; Liebhold & Tobin, 2008）。到達時に少なくとも 1 頭の受精雌を含む場合、雌は平均 100 卵から 138 卵を産む（Gakto & Mathur, 1989）。したがって、これらの卵が成虫になれば、未受精雌が到達しても配偶者を見つけるのは容易であるだろう。イネの抵抗性品種（西澤, 1953; Todd & Atkins, 1958）の存在によって、生きた

イネは到達線虫の数や活動性を抑制する能力があることが示唆される。線虫の大きな個体群は、小さな個体群よりも、協力的摂食のような行動によって容易に抵抗性機構に打ち勝つかもれない。

この研究の実験1は、水中の線虫密度が増加するにつれて、1シーズンあたり、感染イネ株（線虫が回収されたイネ株）あたりの線虫個体群の増殖率が減少することを示した。殺虫剤の濃度を変えて線虫の生存数を変えた種子を用いて、深野（1962）は100種子あたりの線虫密度と線虫個体群の増加率の間の負の関係を示した（深野，1962の表107）。本研究の実験1も、水中の線虫数の減少とともに、線虫の定着したイネ株の割合は減少することを示した。従って、水中の線虫密度が低い時、イネの各苗に到達する線虫個体群の根絶の失敗は水田の線虫の大発生を容易にするだろう。

表5.9. イネを植えたワグネルポットの水中に放したイネシンガレセンチュウ数，ほたるいもちを発生したイネ株数および線虫が分離されたイネ株数

個体群	ワグネルポットの水中に放した線虫数	使用したイネ株数	ほたるいもちを発生したイネ株数	線虫が分離されたイネ株数	推定到達率	
					幼虫	成虫
尾道	10	10	3	3	0.1652	0.0497
	100	10	3	3	0.0179	0.0051
	1000	10	7	8	0.0056	0.0023
	3000	10	10	10	—	—
作木	10	10	2	4	0.2060	0.0704
	100	10	5	5	0.0283	0.0099
	1000	10	8	9	0.0078	0.0033
	3000	10	9	9	0.0026	0.0011
対照	0	10	0	0	—	—

表5.10. イネを植えたワグネルポットの水中に放したイネシンガレセンチュウ数と種子収量の関係

ワグネルポットの水中に放した線虫数	線虫が分離されたイネ株あたりの種子数 ^a		P 値 ^b
	尾道個体群	作木個体群	
0	365.0 ± 19.8 a (n = 10)	365.0 ± 19.8 b (n = 10)	
10	459.0 ± 66.2 a (n = 3)	522.5 ± 60.4 ab (n = 4)	0.501
100	375.7 ± 109.6 a (n = 3)	451.6 ± 36.2 ab (n = 5)	0.520
1000	489.5 ± 62.2 a (n = 8)	426.6 ± 38.4 ab (n = 9)	0.577
3000	500.5 ± 44.6 a (n = 10)	574.6 ± 62.2 a (n = 9)	0.336

^a Mean ± SE. 対数変換 $\log_{10}(x+1)$ 後に一元の分散分析を行った。各列の同一文字を有する平均値はボンフェローニ多重比較検定によって有意な差はないことを示す ($P < 0.05$)。nは サンプルサイズ を表す。線虫を放さなかった場合(対照), 種子の平均値とSEはすべてのイネ株から得られたデータに基づいて計算した。

^b t検定による P 値.

表5.11. イネを植えたワグネルポットの水中に放したイネシンガレセンチュウ数と線虫が分離されたイネ株の種子充実度の関係

ワグネルポットの水中に放した線虫数	線虫が分離されたイネ株の種子充実度 ^a		P 値 ^b
	尾道個体群	作木個体群	
0	3.95 ± 0.03 a (n = 10)	3.95 ± 0.03 a (n = 10)	
10	3.56 ± 0.17 ac (n = 3)	3.55 ± 0.16 ab (n = 4)	0.970
100	3.27 ± 0.33 bc (n = 3)	3.67 ± 0.08 ab (n = 5)	0.356
1000	3.62 ± 0.08 bc (n = 8)	3.30 ± 0.16 b (n = 9)	0.100
3000	3.65 ± 0.09 ac (n = 10)	3.70 ± 0.05 ab (n = 9)	0.615

^a Mean ± SE. 各列の同一文字を有する平均値はクラスカルワリス検定によって有意な差はないことを示す (P < 0.05)。nは サンプルサイズ を表す。線虫を放さなかった場合 (対照), 種子充実度の平均値とSEはすべてのイネ株から得られたデータに基づいて計算した。

^b t検定による P 値.

表5.12. 水中のイネシンガレセンチュウ数と線虫が分離されたイネ株の種子あたりの線虫数の関係

ワグネルポットの 水中に放した 線虫数	線虫が分離 されたイネ 株の数	種子あたりの線虫数 ^a		
		生存	死亡	合計
10	7	2.38 ± 0.92 b	0.87 ± 0.32 b	3.25 ± 1.21 b
100	8	4.36 ± 1.00 ab	1.40 ± 0.31 ab	5.75 ± 1.29 ab
1000	17	5.45 ± 0.68 a	1.71 ± 0.21 ab	7.15 ± 0.81 a
3000	19	5.84 ± 0.72 a	2.16 ± 0.23 a	8.00 ± 0.92 a

^a Mean ± SE. 各列の同一文字を有する平均値はボンフェローニ多重比較検定によって有意差がないことを示す (P < 0.05)。二元配置分散分析によって個体群と個体群×線虫数の交互作用が種子あたり線虫密度に及ぼす影響がないことが示されたので、表では2線虫個体群からのデータを合わせて示している。

表5.13. イネを植えたワグネルポットの水中に放したイネシンガレセンチュウ数、線虫が分離されたイネ株の種子内線虫数および線虫増殖率の関係

ワグネル ポットの水 中に放した 線虫数	線虫が分離さ れたイネ株数	イネ株あたりの全種子内 の線虫数の推定値 ^a	増殖率 ^a
10	7	1561.8 ± 628.8 b	156.2 ± 62.9 a
100	8	2401.1 ± 594.9 b	24.0 ± 5.9 a
1000	17	3294.7 ± 492.4 ab	3.3 ± 0.5 b
3000	19	4440.9 ± 706.7 a	1.5 ± 0.2 b

^a Mean ± SE. 各列の同一文字を有する平均値はボンフェローニ多重比較検定によって有意差がないことを示す (P < 0.05)。二元配置分散分析によって個体群と個体群×線虫数の交互作用が全種子内の線虫総数と増殖率に及ぼす影響がないことが示されたので、2線虫個体群からのデータを合わせて表に示した。対数変換した増殖率を用いて解析を行った。

表5.14. イネシソガレセンチュウあたりのイネ苗到達率

水中に放した線虫数	反復数	葉数 ^a	葉長 ^a (cm)	到達した線虫数 ^b	線虫あたりの到達率 ^b
10	30	3.6 ± 0.1 a	21.0 ± 0.8 a	9.97 ± 0.03 c	0.997 ± 0.003 a
100	10	3.7 ± 0.2 a	20.6 ± 0.7 a	97.30 ± 1.04 b	0.973 ± 0.010 b
1000	5	3.5 ± 0.2 a	18.6 ± 1.5 a	952.40 ± 22.07 a	0.952 ± 0.022 b

Mean ± SE. ^a 各列の同一文字を有する平均値は5%水準で有意差がないことを示す(一元配置分散分析)。 ^b 各列の同一文字を有する平均値は5%水準で有意差がないことを示す(クラスカルワリス検定)。

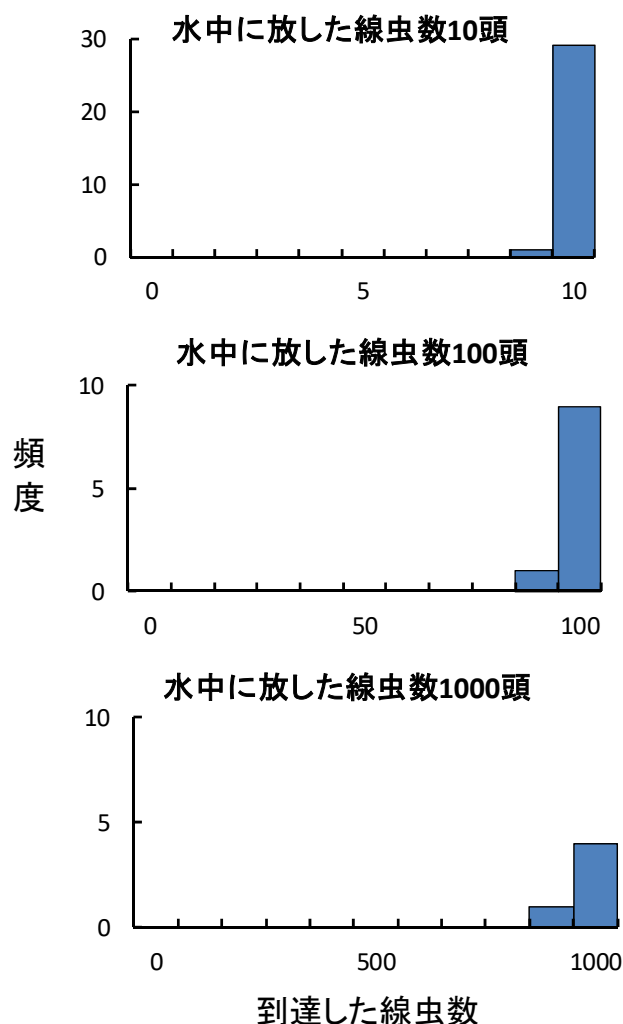


図5.10. 水中に放した異なる線虫数と24時間でイネ苗に到達した線虫数の関係
(反復数10頭30, 100頭10, 1000頭10)

表 5.15. 水中のイネシガラセンチュウ数とイネ種子および苗の生育との関係

植物と線虫の特性	水中に放した線虫数			
	0	10	30	100
供試した種子数	36	35	35	36
発芽した種子数	36	35	33	36
発根した種子数	36	35	33	36
発根した種子の割合 ^a	1.00 a	1.00 a	0.94 a	1.00 a
発芽までに要した日数 ^b	1.9 ± 0.1 a	1.9 ± 0.1 a	1.9 ± 0.1 a	1.8 ± 0.1 a
発根までに要した日数 ^b	3.6 ± 0.2 b	4.1 ± 0.2 ab	4.4 ± 0.2 a	4.3 ± 0.2 a
鞘葉長 (cm) ^c	1.79 ± 0.07 a	1.97 ± 0.08 a	1.93 ± 0.06 a	1.91 ± 0.06 a
第1葉長 (cm) ^c	1.11 ± 0.12 a	0.99 ± 0.12 a	0.94 ± 0.12 a	0.81 ± 0.11 a
第2葉長 (cm) ^c	0.12 ± 0.09 a	0.35 ± 0.14 a	0.38 ± 0.14 a	0.37 ± 0.12 a
水中に残った線虫数 ^b		2.1 ± 0.4 c	17.6 ± 1.1 b	52.4 ± 1.9 a
6日後に水中に残った線虫の生存率 (生存線虫数/全線虫数) ^d		0.0000 (0/ 73) ab	0.0017 (1/ 580) b	0.0175 (33/ 1887) a
線虫あたりの到達率 ^b		0.791 ± 0.037 a	0.414 ± 0.036 b	0.476 ± 0.019 b

^a 同一の文字を有する割合は、線虫30頭を放した線虫感染イネと0、10および100頭を放した感染イネの間で差がないことを示す(フィッシャーの精確検定, $P < 0.05$)

^b Mean ± SE. 各行の平均値に付した同一文字は5%有意水準で有意差がないことを示す(クラスカルワリス検定, $P < 0.05$)。

^c Mean ± SE. 各行の平均値に付した同一文字は5%有意水準で有意差がないことを示す(一元配置分散分析後ボンフェローニ検定, $P < 0.05$)。

^d 同一文字を有する生存率はYateの補正を行った2×2分割表による解析後ボンフェローニ法によって調整された5%有意水準で有意差がないことを示す。

第6章 防除

6.1. イネ種子の水浸漬と風乾が種子内のイネシンガレセンチュウの生存に及ぼす影響

線虫は、乾燥したイネ種子の胚のすぐ下に脱水状態にいる（千代西尾・中澤, 1988, Hollis & Keoboonrueng, 1984; Huang & Chiang, 1975; Huang & Huang, 1972; Huang et al., 1972; Nandakumar et al., 1975）。日本ではイネ種子を秋に収穫し、その後、播種されるまで冷蔵する。春になると種子を水に浸漬した後、育苗箱に播種する。水田には等間隔で移植する。線虫は水に浸漬された種子から出て、苗に侵入する（田村・気賀沢, 1957, 1958）。

線虫の感染はイネ種子の収量減少とコメの品質低下を引き起こす（深野, 1962; Todd & Atkins, 1958; Yoshii & Yamamoto, 1950a）。このため、日本では線虫の防除に通常、フェニトロチオン、フェンチオン（現在、農薬登録失効）、カルタップのような殺虫剤の水溶液にイネ種子を24時間浸漬する。浸漬後、種子は発芽のために再び水に浸けられるまで、数日間、風乾される。イネ種子が殺虫剤で処理されても、イネ株の感染レベルは広島県の限られた地域でも水田間に大きなばらつきが認められる（星野, 未発表）。このことは殺虫剤処理の効果に疑問を持たせた。種子消毒のための殺虫剤の効果は、いくつかの要素に基づいて推定されてきた。例えば、処理した種子内の線虫死亡率（千代西尾・中澤, 1988）、水田のほたるいもち発生茎率（藤本・山口, 1971）、および処理した種子を用いて栽培されたイネの種子内線虫密度によって評価された。千代西尾・中澤（1988）は、種子を殺虫剤溶液に浸漬してもしなくても、線虫死亡率は変わらないことを示した。しかしながら、それらの研究は、種子処理の間のいつ死亡が起こるかを明らかにしなかった。この研究の目的は、種子の浸漬とその後の風乾が線虫の死亡に及ぼす効果を明らかにすることであった。

材料と方法

イネ種子

広島県東広島市で1/5,000aのワグネルポットで栽培された2株のイネから、1998年10月23日にイネ種子が採集された（サンプルA）。他の種子は、1998年9月29日広島県尾道市の木の庄西（サンプルB）と浦崎（サンプルC）の2水田のイネ30株から採集された。採集後すぐに、種子を4±1°Cの暗条件で保存し、3~4ヵ月後に使用した。サンプルAは実験1に使用し、サンプルBは実験1の反復に用いた。サンプルCは実験2に使用した。使用した全ての種子は‘ヒノヒカリ’であった。成熟した種子としいながサンプルに含まれた。全ての実験において、乾いた種子と浸漬された種子中の線虫死亡率は、Hoshino & Togashiの方法と種子の残存する線虫を生死別に計数した。

殺虫剤が線虫死亡率に及ぼす影響（実験1）

サンプルAの400種子を同数の4グループに分けた。グループ1の種子をフェンチオン1,000倍液300mlに浸漬した。グループ2の種子を同じ濃度のフェンチオン乳液に浸漬した。25±0.1°Cで24時間後に、上清を20µm目の篩に通し、篩上に残った線虫を集めて計数した。種子を水300mlに入れて洗浄した。この洗浄を3回繰り返し、洗浄液から線虫を集めて計数した。その後、種子を25±0.1°Cに置いて24時間風乾した。風乾した種子内に残る線虫の生存率を前述の方法で調べた。グループ3の種子

をで殺虫剤を含まない水 (25±0.1°C) に 24 時間浸漬し、前述の方法で 24 時間風乾した (25±0.1°C)。これらの種子から脱出した線虫と種子内に残っている線虫を計数した。グループ 4 の種子 (対照) を用いて、実験直前の線虫 (冷蔵庫から種子を取り出したときの線虫) の生存率を調べた。

実験 1 の繰り返しでは、次の処理を追加した。すなわち、フェニトロチオン 1,000 倍液 (25±0.1°C) に種子を 72 時間浸漬した。それから、水で 3 回洗い、25±0.5°C で 24 時間風乾した。風乾した種子内の線虫の死亡率を調べた。

水浸漬後の風乾処理が線虫死亡率に与える影響 (実験 2)

水に浸漬されて起こる死亡とその後の風乾によって起こる死亡を分離するために、ランダムに 400 種子を選び、それらを同数の 4 グループに分けた。冷蔵庫から取り出してすぐに、グループ 1 の種子内の生存線虫と死亡線虫の割合を調べた (無処理, 対照)。グループ 2 の種子を 25±0.1°C の水 300ml に 24 時間浸漬し、その後 300ml の水で洗浄した。洗浄を 3 回繰り返し、浸漬と洗浄に用いた水中の線虫 (種子から游出した線虫) を計数した。また、種子を乾燥する前に、種子内に残る線虫の生存率を測定した。グループ 2 の種子と同じ様に、グループ 3 の種子を水に浸漬してから、25±0.5°C で 24 時間風乾した。それから、種子に残る線虫の生存率を測定した。グループ 4 の種子を 25±0.5°C で 48 時間に保ち、線虫の生存率を測定した。つまり、4°C から 25°C に暖めることによる種子内の線虫死亡率を測定した。

統計学方法：処理区間の線虫死亡率を比較するために、生存線虫数と死亡線虫数によって作られた直交表を使用した。処理区間に有意差が検出されたとき、2 処理区間の死亡率を比較するために、Fisher の正確確率を計算し、有意水準は Bonferroni 法 (山村, 1993) によって調整された。さらに、サンプルの初期死亡率の影響を除くために、Abbott (1925) の補正死亡率を計算した。すなわち、

$$\{(無処理の生存率(\%)) - (処理後の生存率(\%))\} / (無処理の生存率(\%)) \times 100\%$$

ここで、生存率(%)は 100 から死亡率(%)を引くことによって得られる。

結果

水あるいは殺虫剤に 24 時間浸漬した場合、ほとんどの線虫はイネ種子の中に残っていた (表 6.1, 表 6.2, 表 6.3)。実験 1 では、線虫の死亡率は、無処理より殺虫剤浸漬とその後の風乾または単なる水浸漬とその後の風乾によって有意に大きくなった (表 6.1, 表 6.2)。しかしながら、殺線虫浸漬とその後の風乾は、死亡率は、単なる水浸漬とその後の風乾より種子内の死亡率を有意に高めなかった (表 6.1, 表 6.2)。

実験 2 では、種子を水に浸漬しただけより、水浸漬とその後の風乾によって、線虫の死亡率は大きくなった (表 6.3)。冷蔵庫から種子を取り出し、25±0.5°C に 48 時間置いた場合、死亡率は最も低かった。実験開始時の初期死亡率の影響を取り除くために、補正死亡率を用いると、処理間の違いはより明瞭になった (表 6.3)。水浸漬後の種子内の生存線虫の一部はその後の風乾処理によって死亡するため、2 つの処理による正味の死亡率 (m_3) は次の式を満たさねばならない。

$$m_3 = 1 - (1 - m_1) (1 - m_2)$$

ここで、 m_1 と m_2 は水浸漬と風乾によって起こる死亡率を表す。表 6.3 から m_1 と m_2 の値は、それぞれ 0.340, 0.724 と与えられる。したがって、風乾による死亡率 (m_2) は 0.582 であると推定された。この

ことから、風乾による死亡率は水浸漬による死亡率の 1.7 倍であることが示された。

考察

種子浸漬中の線虫死亡の理由は不明である。イネ種子の場合、線虫は、特に、種子の基底部分、穎（内穎と外穎）の内面と外果皮の間に分布する（Huang & Huang, 1972）。水に浸漬した時、イネ種子は水を吸収し、急速に膨らむ（盛永・田尻, 1941; 星川, 1975）。種子の膨張はイネ種子内の圧力を高めるかもしれない。種子の呼吸も急速に増加する（Takahashi, 1955）。それ故、一部の線虫は死に、他の線虫は水を吸収した種子内の高い圧力、高 CO₂、低酸素含有量によってストレスを受けると考えられる。もしそうならば、水浸漬後の風乾の間に、種子の呼吸のストレスは線虫の死亡に寄与するかもしれない。もう 1 つの考えられる説明は、吸水したばかりの線虫がその後の乾燥に生理的に対応できないというものである。たいていの場合、イネ種子内の線虫の成虫と幼虫は休眠（無水）状態であり（Huang & Huang, 1972; Nandakumar et al., 1975）、3 年までの間、乾燥保存種子の中で生存可能である（Yoshii & Yamamoto, 1950a）。種子の水浸漬によって線虫は休眠を終了する（Huang & Chiang, 1975; Huang & Huang, 1974; Nandakumar et al., 1975）。種子を 25°C の水に 78-88 時間浸漬した場合、この過程は十分に早く、種子内の線虫の 50% が水中に出て来る（田村・気賀沢, 1957）。無水状態の線虫の 90% 以上は、吸水後 3 時間で復活する（千代西尾・中澤, 1988）。我々の実験では、この急速な反応は、水浸漬後の風乾の致死効果の原因であったかもしれない。Sivakumar (1987) は、イネ種子を太陽熱で加温して線虫を殺す場合、前もって水に種子を浸漬することによって線虫死亡率は増加すると述べた。ここでの推論は Sivakumar (1987) の観察をもうまく説明できる。

水浸漬とその後の風乾による線虫の死亡率は、時としてフェニトロチオンやフェンチオンの処理による死亡率に匹敵した（千代西尾・中澤, 1988）。殺虫剤の効果を評価するために、千代西尾・中澤 (1988) の種子を水に再浸漬した場合、すべての生存線虫はストレスを受けているように見えた。なぜなら線虫は体を曲げ、ねじらせ、緩慢にまたは間欠的に移動したからであった。このような症状は種子表面の残留殺虫剤によるものだと考えられる。なぜなら種子は風乾前に洗浄されなかったからである（千代西尾・中澤, 1988）。我々の実験では、殺虫剤に浸漬した後に種子を洗浄したので、残留殺虫剤が種子表面から除去されたと考える。残留殺虫剤の除去は、種子を水に再浸漬した後、生理的なストレス症状を示す線虫がいないことと矛盾しない。もし殺虫剤処理後にイネ種子を洗浄しないならば、播種後に線虫が種子から出て来るので、残留した殺虫剤によって線虫は死ぬかもしれない。もしそうなら、種子を発芽させるのに使う水の量は重要である。なぜなら種子から泳ぎ出た線虫が会う殺虫剤の濃度はその水の量で決まるからである。殺虫剤の不安定な希釈は殺虫剤の効果のばらつきを説明するであろう。

我々は線虫を管理するために、育苗箱に殺虫剤を施用することが時として推奨される。種子の水浸漬とその後の風乾を組み合わせた後に、移植前の苗に殺虫剤を施用することが線虫防除に最も効果的な方法であるかもしれない。なぜなら水浸漬とその後の風乾によっても少数の線虫が生存するからである。

表6.1. 4°Cで保存したイネシンガレセンチュウに感染した種子をfenitrothionあるいはfenthionの0.1%薬液に24時間25°Cで浸漬、および24時間25°Cの水に浸漬後、25°Cで乾燥した時の死亡率

処理区	生存 線虫数 ^b	死亡 線虫数 ^b	死亡率 ^c (%)	補正 ^d 死亡率 (%)
fenitrothion浸漬後風乾	12(0)	52(2)	81.3a	79.5
fenthion浸漬後風乾	9(0)	42(8)	82.4a	80.7
水浸漬後風乾	19(2)	89(0)	82.4a	80.7
無処理	167	16	8.7b	0

a イネ種子100粒をそれぞれ処理した。乾燥および水の処理時の温度は25°Cであった。

b カッコは浸漬後に水や薬液に種子から游出した線虫数。生存線虫数あるいは死亡線虫数にその数字を含む。

c 線虫死亡率は4処理間で2×4直交表検定を行った。

列の異なる英小文字は処理区間で5%水準で有意差あり, 5%水準はBonferroni法 (Fisher正確確率) で補正した。

d Abbottの補正死亡率 (無処理の生存率%) - (処理後の生存率%) / (無処理区の生存率%) × 100(%) で算出した

表6.2. 4°Cで保存したイネシンガレセンチュウに感染した種子をfenitrothionの0.1%薬液にfenthionの0.1%薬液に24時間あるいは72時間浸漬および水に24時間浸漬後、25°Cで乾燥した時の死亡率

Treatment	生存 線虫数 ^b	死亡 線虫数 ^b	死亡率 ^c (%)	補正 ^d 死亡率 (%)
fenitrothionの薬液に24時間浸漬後風乾	19 (19)	51 (45)	72.9a	68.7
fenitrothionの薬液に72時間浸漬後風乾	14 (14)	80 (77)	85.1a	82.8
fenthionの薬液に24時間浸漬後風乾	10 (10)	57 (54)	85.1a	82.8
水に24時間浸漬後風乾	28 (22)	38 (38)	57.6a	51.1
無処理	66	10	13.2b	0

a イネ種子100粒をそれぞれ処理した。乾燥および水の処理時の温度は25°Cであった。

b カッコは浸漬後に水や薬液に種子から游出した線虫数。生存線虫数あるいは死亡線虫数にその数字を含む。

c 線虫死亡率は4処理間で2×4直交表検定を行った。

列の異なる英小文字は処理区間で5%水準で有意差あり, 5%水準はBonferroni法 (Fisher正確確率) で補正した。

d Abbottの補正死亡率 (無処理の生存率%) - (処理後の生存率%) / (無処理区の生存率%) × 100(%) で算出した

表6.3. 4°Cで保存したイネシンガレセンチュウに感染した種子を48時間25°Cで加温,
24時間25°Cの水に浸漬および24時間25°Cの水に浸漬後, 25°Cで乾燥した時の死亡率

種子処理 ^a	生存 線虫数 ^b	死亡 線虫数 ^b	生存率 ^c (%)	補正 ^d 死亡率 (%)
25°Cで水浸漬, 乾燥は無し	179(1)	182(0)	49.6a	34.0
25°Cで水浸漬後, 25°Cで乾燥	51(0)	195(0)	20.7b	72.4
25°Cで加温	301	126	70.5c	6.1
無処理	410	136	75.1c	0.0

a イネ種子100粒をそれぞれ処理した。乾燥および水の処理時の温度は25°Cであった。

b カッコは水に浸漬中に種子から水中に游出した線虫数。生存線虫数あるいは死亡線虫数にその数字を含む。

c 線虫死亡率は4処理間で2×4直交表検定を行った。

列の異なる英小文字は処理区間で5%水準で有意差あり, 5%水準はBonferroni法(Fisher正確確率)で補正した。

d Abbottの補正死亡率 (無処理の生存率%) - (処理後の生存率%) / (無処理区の生存率%) × 100(%)で算出した

6.2. 種子の鉄コーティング処理がイネシンガレセンチュウの生存に及ぼす影響

近年、鉄コーティング湛水直播イネ栽培が開発された（山内，2004, 2005）。この技術では、乾燥したイネ種子に鉄粉をコーティングして播種する。日本の水稻栽培は、大規模化、低コスト化の要請が強まっており、省力的な栽培法である直播栽培の確立が求められている（吉永ら，2000）。

鉄でイネ種子をコーティングすることによって、育苗期のイネ病害である、もみ枯細菌病、苗立枯細菌病、褐条病、ばか苗病に対して防除効果が明らかとなった（井上ら，2009）。しかしながら、線虫に対する防除効果は不明である。イネ種子の鉄コーティング処理が線虫の生存に及ぼす影響を明らかにした。

材料と方法

イネ種子：2006年に水田で収穫後に種子を乾燥した。これらの種子内には平均1.11頭の線虫生存個体がいた。これらの感染‘ヒノヒカリ’種子を水浸漬して催芽した。その種子を2007年5月7日に育苗箱に播種して育苗した。成長した苗を2007年6月1日に本田に移植し、2007年10月9日に収穫し、2007年10月23日まで乾燥した。実験を行うまで種子を5°Cで保存した。

種子の鉄コーティング工程が線虫の生存に及ぼす影響（実験1）

山内（2004, 2005）の鉄コーティング行程に従い、以下の6処理を行った。第1の処理では、種子を水温20°Cで24時間水に浸漬してから、気温40°Cで3日間乾燥した。その後、種子に水を噴霧し、鉄粉1gをイネ種子100粒にまぶして、25°Cで乾燥した（水浸漬・40°C3日間乾燥・粉衣処理鉄1g区）。第2の処理では、水温20°Cで24時間水に浸漬し、気温40°Cで3日間乾燥し、水を噴霧して、鉄粉4gをイネ種子100粒にまぶして、25°Cで乾燥した（水浸漬・40°C3日間乾燥・粉衣処理鉄4g区）。第3の処理では、水温20°Cでイネ種子100粒を24時間水に浸漬し、気温40°Cで3日間乾燥した（水浸漬・40°C3日間乾燥・粉衣処理鉄0g区）。第4の処理では、水温20°Cで24時間イネ種子100粒を水に浸漬し、気温40°Cで3日間乾燥した（水浸漬・40°C3日間乾燥区）。第5の処理では、水温20°Cで24時間イネ種子100粒を水に浸漬した（水浸漬区）。第6の処理では、イネ種子200粒を無処理のまま供試した（無処理区）。大量分離法を用いて、処理の終わった種子100粒から生存線虫数と死亡線虫数を数え、死亡率を算出した。

コーティングした鉄粉が種子内の線虫の生存に及ぼす影響（実験2）

種子内の線虫の休眠は吸水によって打破される。休眠打破された線虫に及ぼす鉄粉の効果を明らかにするために、5処理を行った。第1の処理では、イネ種子100粒を25°Cの水に4時間浸漬した後、24時間室温で乾燥し、鉄を1g粉衣した（休眠覚醒・1g鉄粉衣処理区）。第2の処理では、イネ種子100粒を25°Cの水に4時間浸漬した後、24時間室温で乾燥し、鉄を4g粉衣した（休眠覚醒・4g鉄粉衣処理区）。第3の処理では、イネ種子100粒を25°Cの水に4時間浸漬した後、24時間室温で乾燥した（休眠覚醒・0g鉄粉衣処理区）。第4の処理では、イネ種子100粒を25°Cの水に4時間浸漬した（休眠覚醒区）。第5の処理は無処理区の設定を行った。大量分離法を用いて、処理の終わった種子100粒から生存線虫数と死亡線虫数を数え、死亡率を算出した。

線虫の休眠打破がその後の生存に及ぼす影響（実験3）

線虫の休眠打破がその後の生存に及ぼす影響を明らかにするために、3 処理を行った。第 1 の処理では、イネ種子 100 粒を 25℃の水に 24 時間浸漬した (25℃24 時間水浸漬)。第 2 の処理では、イネ種子 100 粒を 25℃の水に 48 時間浸漬した (25℃48 時間水浸漬)。第 3 の処理では、イネ種子 100 粒を気温 25℃に静置した (25℃恒温)。大量分離法を用いて、処理の終わった種子 100 粒から生存線数と死亡線虫を数え、死亡率を算出した。第 4 の処理は対照であり、処理前に 100 種子内の生存線数と死亡線虫を数え、死亡率を算出した。

結果

実験 1 では、水浸漬・40℃3 日間乾燥・粉衣処理鉄 1g 区、水浸漬・40℃3 日間乾燥・粉衣処理鉄 0g 区および水浸漬・40℃3 日間乾燥区は、水浸漬区と無処理区より線虫の死亡率が高かった (2×6 直交表検定 $H=81.0, p=0.0000$, 表 6.4)。また、水浸漬・40℃3 日間乾燥・粉衣処理鉄 1g 区と水浸漬区は無処理区より線虫の死亡率が高かった (2×6 直交表検定 $H=81.0, p=0.0000$) , (表 6.4)。

実験 2 では、休眠覚醒・1g 鉄粉衣処理区、休眠覚醒・4g 鉄粉衣処理区、休眠覚醒・0g 鉄粉衣処理区、休眠覚醒区、無処理区間に死亡率の差はなかった (2×5 直交表検定 $H=6.74, p=0.1474$) (表 6.5)。

実験 3 では、25℃恒温区と処理前区より 25℃48 時間水浸漬区の線虫死亡率は高かった (2×4 直交表検定 $H=14.13, p=0.0027$) (表 6.6)。

考察

休眠覚醒・1g 鉄粉衣処理区、休眠覚醒・4g 鉄粉衣処理区、休眠覚醒・0g 鉄粉衣処理区および休眠覚醒区、無処理区の死亡率の間に差はなかった。このため、鉄コーティングした鉄の有・無による線虫の死亡率への影響はないと考えられた。

実験 1 では、イネ種子の鉄コーティング処理によって線虫死亡率が 35~42%高まったが、その工程内の水浸漬・3 日間乾燥 (気温 40℃) による死亡率と差がなかった。種子の水浸漬後の風乾は、吸水によって休眠打破された線虫がその後の乾燥に対して対応できないためであろう (6.1 節)。つまり、鉄コーティング処理では、水浸漬後の乾燥の工程で、鉄の酸化が起こり、そのため種子表面の温度が上がると考えられる。休眠覚醒した線虫が 40℃以上の温度に晒され、さらに、急激な乾燥に線虫は遭遇するため、線虫の死亡率が高くなったと考えられる。

しかしながら、この推論は実験 2 で否定された。実験 2 では水浸漬後に休眠覚醒・1g 鉄粉衣処理区、休眠覚醒・4g 鉄粉衣処理区、休眠覚醒・0g 鉄粉衣処理区および休眠覚醒区、無処理区の死亡率の間に差はなかった。このため、鉄粉の酸化による発熱は線虫の死亡率に影響しないと考えられ、鉄のコーティングは線虫の防除に無効であると判断された。

実験 3 によって、種子の水浸漬時間を 24 時間から 48 時間に長くすると、種子内の線虫死亡率が増加することが示された。このことは、浸漬時間の増加によって種子の内部環境が悪化することを示唆している。

鉄コーティング処理はイネ病害の種子消毒と同等の防除効果が認められている (井上ら, 2009)。鉄による還元反応によって、病原菌を死滅させると推察されている (井上ら, 2009)。苗立枯細菌病とばか苗病に対して、イネ種子の鉄コーティング処理時の風乾の有無を検討した結果、風乾処理の有無が

直接発病抑制に影響はしないが、コーティングの強度に影響するため、発病抑制に影響を与えるのではないかと推察している（井上ら，2012）。

鉄コーティング処理は農薬によるイネ病害の種子消毒を必要としない技術とされている（鉄コーティングマニュアル）。本研究の成果により、鉄コーティング処理の中で、種子の水浸漬後の風乾処理が線虫の生存線虫数を減少させることが明らかとなった。鉄コーティング強度を増すだけでなく、線虫の防除のためには、風乾の工程を無くすべきではない。

コメの生産費削減や省力化のため、鉄コーティング直播栽培の導入が進められている。副次的ではあるが、病害だけでなく線虫を防除できる技術であるならば、種子消毒時に化学農薬を使用しない減農薬栽培の可能性を大きくすると考えられた。

表6.4. 鉄コーティング処理の工程(活性化処理, 乾燥, 鉄コーティング)がイネシンガレセンチュウ死亡率に与える影響

処理区名	種子数	線虫数		死亡率	補正死亡率
		生	死		
水浸漬・40°C3日間乾燥・粉衣処理鉄1g区	100	22	29	56.9 ab	47.7
水浸漬・40°C3日間乾燥・粉衣処理鉄4g区	100	7	36	83.7 b	80.3
水浸漬・40°C3日間乾燥・粉衣処理鉄0g区	100	11	36	76.6 b	71.6
水浸漬・40°C3日間乾燥区	100	17	57	77.0 b	72.1
水浸漬区	100	35	33	48.5 a	37.6
無処理区	100	61	13	17.6 c	0.0

死亡率は7処理間で2×7直交表検定を行った。

死亡率に付した列の異なる英小文字は処理区間で5%水準で有意差あり, 5%水準はBonferroni法 (Fisher正確確率) で補正した。

表6.5. 鉄のコーティングがイネシンガレセンチュウに与える影響

処理区	線虫覚醒 水浸漬 25°C4時間	コーテ ィング 25°C	酸化 室温 20時間	線虫数		死亡率 (%)	補正 死亡率 (%)
				生	死		
休眠覚醒・1g鉄粉衣処理区	○	○	乾燥	53	18	25.4 a	9.4
休眠覚醒・4g鉄粉衣処理区	○	○	乾燥	51	23	31.1 a	16.4
休眠覚醒・0g鉄粉衣処理区	○	×	乾燥	47	23	32.9 a	18.5
休眠覚醒区	○	×	×	66	17	20.5 a	3.5
無処理区	×	×	×	61	13	17.6 a	0.0

死亡率は5処理間で2×5直交表検定を行った。

死亡率に付した列の異なる英小文字は処理区間で5%水準で有意差あり, 5%水準はBonferroni法 (Fisher正確確率) で補正した。

表6.6. 線虫感染種子の水浸漬(活性化処理)が線虫死亡率に与える影響

	処理前	25°C	25°C	25°C
		24時間 水浸漬	48時間 水浸漬	48時間 恒温
生存線虫数	68	29	25	33
死亡線虫数	20	16	27	11
水中への游出线虫数	0	1	0	0
生存率(%)	77.3	64.4	48.1	75.0
死亡率(%)	22.7 a	35.6 ab	51.9 b	25.0 a
補正死亡率(%)	0.0	16.6	37.8	2.9

死亡率は4処理間で2×4直交表検定を行った。

死亡率に付した行の異なる英小文字は処理区間で5%水準で有意差あり, 5%水準はBonferroni法 (Fisher正確確率) で補正した。

6.3. 広島県の栽培品種におけるイネシンガレセンチュウの増殖

イネの品種間に線虫の罹病差異があることが知られている(田村・気賀沢, 1959)。線虫に対するイネ品種の抵抗性について、西澤(1953)は、1949から1952年までの品種比較の結果を要約し、‘農林8号’、‘東山36号’、‘東山37号’、‘東山38号’、‘東山58号’、‘南海3号’、‘朝日’、‘旭1号’の9品種は病徴発生が少なく、‘農林6号’、‘農林37号’、‘農林39号’、‘農林糯5号’、‘西海37号’、‘中生銀坊主’の6品種は抵抗性であると報告した。その他の24品種は中程度の感受性であり、9品種は高い感受性を示すと述べた。罹病種子のもみ殻を用いて、後藤・深津(1956)は水田内の20品種に線虫を接種した。その結果、‘東山38号’は3年間病徴を示さず、‘農林8号’、‘農林糯5号’と‘初霜’の病徴は軽微であった。‘旭1号’、‘愛知旭’と‘畿内小町2号’は強い感受性を示すと報告した。

西澤ら(1953)は、接種源(罹病モミの殻)の量が症状の出ない‘南海3号’だけでなく感受性の瑞宝の茎長、穂の重さ、モミの千粒重などに影響することを表した。Todd & Atkins(1958)は葉鞘のそばに線虫浮遊液を注入することによってイネに接種することを成功した。深野・横山(1951)は、感染した茎の数とほたるいもちの度合いの両方で抵抗性検定は判断を行い、ほたるいもち症状がない品種でも線虫が寄生していることがあった。後藤・深津(1956)は線虫抵抗性の解析を行い、イネ品種間で線虫の増殖率に違いがあることを明らかにした。ところが、当時(1960年代以前)、栽培されていた品種は、現在ほとんど栽培されていない。近年、栽培されている品種はコシヒカリを親に持つ品種が多い。しかしながら、コシヒカリ系統の品種について、線虫への抵抗性を検討した例はほとんどない。また、栽培品種における線虫の増殖などの性質は明らかにされていない。そこで、現在、広島県で栽培されている水稻品種を中心に、線虫の増殖率とほたるいもちの発生茎率に対する影響を明らかにした。

材料と方法

線虫

1998年9月26日に広島県尾道市のほたるいもち多発水田からイネ‘ヒノヒカリ’6株を採集した。1998年10月20日まで株をハウス内に吊るして乾燥し、その後5°Cで保存した。種子から線虫をHoshino & Togashi法で分離し、*B.cinerea*の菌糸マットを用いて25°Cの暗条件で増やされた。ベールマン法で線虫を分離して、懸濁液を3,000頭/mlに調整し、接種に用いた。

イネの栽培、線虫の接種と個体数調査、および収量と種子充実度

2001年6月21日、東広島市八本松町の広島県立農業技術センター内圃場で22個のポット(1/5,000a)に土壌3Lを入れ、水を一杯になるまで入れた。‘ヒノヒカリ’(‘コシヒカリ’×‘黄金晴’)、‘コシヒカリ’(‘農林22号’×‘農林1号’)、‘ハウレイ’(‘トドロキワセ’×‘東海33号’)、‘あきろまん’(‘ミネアサヒ’×‘中生新千本’)、‘中生新千本’(‘農林22号’×‘隼’)の苗を1本ずつ5または6ポットに移植した。移植直後のワグネルポットの水中に線虫3,000頭を接種した。対照は線虫無接種のポットであり、各品種に5ポットずつ用意した。2001年10月27日までイネを栽培した。収穫後、2001年11月28日までの32日間地上1.5mの棒に吊るして、乾燥させた。乾燥後、種子を調査するまで5°C暗条件で保存した。

線虫調査

イネ 1 株から 3 穂を無作為に抽出し、1 穂あたり 20 粒の種子を抽出した。Hoshino & Togashi 法により、種子毎の生存線虫数と死亡線虫数を調べた。

4.4 節に従い、種子充実度の調査を行った。また、ワグネルポットの株ごとに全種子を数えた。

結果

種子あたり生存線虫数は 5 品種の間で有意な差はなかった (Tukey 検定, $F=0.80$, $p=0.538$) (表 6.7)。種子あたり死亡線虫数は 5 品種の間で有意な差はなかった (対数変換後分散分析, Tukey 検定, $F=0.82$, $p=0.525$)。種子あたり合計線虫数は 5 品種の間で有意な差はなかった (Tukey 検定, $F=0.84$, $p=0.517$)。生産された種子数は 5 品種の間で有意な差はなかった (Tukey 検定, $F=1.36$, $p=0.283$) (表 6.8)。種子数と種子あたりの生存線虫数の積によって株あたり生存線虫数を推定すると、その値は 5 品種の間で有意な差はなかった (Tukey 検定, $F=0.54$, $p=0.710$)。同様に株あたり死亡線虫数は 5 品種の間で有意な差はなかった (対数変換後分散分析, Tukey 検定, $F=0.21$, $p=0.930$)。株あたり合計線虫数も 5 品種の間で有意な差はなかった (対数変換後分散分析 Tukey 検定, $F=0.15$, $p=0.961$)。線虫の増殖率は 5 品種 (‘ヒノヒカリ’, ‘コシヒカリ’, ‘ホウレイ’, ‘あきろまん’, ‘中生新千本’) の間で有意な差はなかった (Tukey 検定, $F=0.59$, $p=0.674$)。

‘ヒノヒカリ’ と ‘コシヒカリ’ では、種子内の線虫数と死亡率の間に負の相関を認めた (‘ヒノヒカリ’, $y=-0.0051x+0.469$, $r=-0.459$, $n=21$, $p=0.032$; ‘コシヒカリ’, $y=-0.0149x+0.4151$, $r=-0.536$, $n=21$, $p=0.036$) (図 6.1)。これに対して、あきろまんでは種子内の線虫数と死亡率の間に正の相関があった ($y=0.0174x+0.231$, $r=0.567$, $n=16$, $p=0.022$)。‘ホウレイ’ と ‘中生新千本’ では種子内線虫数と死亡率の間に相関はなかった (‘ホウレイ’, $r=-0.233$, $n=20$, $p=0.310$; ‘中生新千本’, $r=-0.239$, $n=9$, $p=0.501$) (図 6.1)。

種子充実度は用いた 5 品種の間に有意な差はなかった (Tukey 検定, $F=0.81$, $p=0.533$) (表 6.7)。

考察

ほたるいもちの発病茎率を用いて、西澤・山本 (1951) はイネ品種の抵抗性の強弱を表した。西澤 (1953) は、線虫接種量 (罹病籾殻の量) を変えて、弱い品種と強い品種を比較した。西澤 (1953) は抵抗性品種は葉先白枯症状の無い品種と言っている。このため、これらの実験では初期の線虫個体数が明らかでなく、本研究の年次変動の実験で明らかにしたように線虫密度とほたるいもち発生率の間に相関がないため、彼らの研究によって、品種による線虫増殖率の低さなどの形質を論議することは難しい。

後藤・深津 (1956) は、本研究と同様に幼苗期に線虫を接種し、旭 1 号では線虫の増殖率が高く、東山 38 号では増殖率が低く、抵抗性品種では線虫の増殖率は低いと報告した。後藤・深津 (1956) は、イネ幼苗に対する線虫の走向性の程度が品種間で異なることを示した。この結果は、オーキシンの生成と阻害によって、線虫の移動や増殖が影響を受け、感受性品種ではオーキシン生成量が多く、線虫が集まるとするという報告と一致している (Feng et al., 2014)。

線虫の増殖率と品種抵抗性の間の正の相関があるならば、広島県の主要な栽培品種間で線虫の増殖率に違いはないため、どの品種もほたるいもちの発生の抑制や線虫増殖率の抑制する形質は持ってい

ないと考えられた。これらのことから、3.1節で、1990年代前半に広島県では‘中生新千本’から‘ヒノヒカリ’に替わり、ほたるいもちの発生面積が減少したが、それは線虫に対する品種間の抵抗性の違いではないと考えられた。‘ヒノヒカリ’は1990年に品種登録された品種であり、原種の線虫感染率が低かったため、ほたるいもちの発生が少なかったと考えられる。

本研究によって、種子内の線虫個体数と死亡率の関係が供試した品種の間で異なることが明らかとなった。‘ヒノヒカリ’と‘コシヒカリ’では密度逆依存的な死亡を示し、‘あきろまん’では密度依存的な死亡を示した。筆者らの過去の研究でも、‘ヒノヒカリ’で密度逆依存的な死亡が観察された(4.4節, 5.2節)。「コシヒカリ」と‘ヒノヒカリ’は‘コシヒカリ’系品種であり、幼穂形成期以降にセジロウンカ殺卵物質を生成する(清野・鈴木, 1996)。「コシヒカリ’系品種とその他の品種間に線虫抵抗性を誘導する機構に違いがあるかもしれない。しかしながら、‘あきろまん’でみられた密度依存的な死亡の原因を明らかにできなかった。未供試の品種の調査と密度依存的死亡に及ぼす非生物的環境要因の影響を後検討する必要がある。特に、田村・気賀沢(1959)が‘旭1号’や‘農林43号’などの品種で線虫抵抗性を明らかにしているため、それらの品種における種子内線虫数と死亡率の関係を明らかにする必要がある。

表6.7. ホウレイ, あきろまん, ヒノヒカリおよびコシヒカリでの種子内の線虫数

	調査種子数	種子の大きさ ¹⁾	種子内の線虫数			ほたるいもち茎率 ¹⁾ (%)
			生存 ¹⁾	死亡 ²⁾	合計 ²⁾	
ホウレイ	300	3.73±0.17 a	1.36±1.02 a	1.18±1.44 a	2.54±2.42 a	0.20±0.15 a
あきろまん	300	3.63±0.29 a	0.82±0.87 a	0.57±0.61 a	1.39±1.49 a	0.09±0.11 a
ヒノヒカリ	360	3.76±0.08 a	1.49±1.51 a	1.03±1.17 a	2.52±2.57 a	0.12±0.12 a
中生新千本	180	3.83±0.09 a	0.39±0.41 a	0.43±0.39 a	0.83±0.79 a	0.11±0.11 a
コシヒカリ	360	3.78±0.12 a	0.83±0.75 a	0.33±0.31 a	1.16±0.99 a	0.15±0.15 a

*平均値±S.D

1)平均値に付した同一の英小文字はTukey検定5%水準で有意差なし。

2)平均値に付した同一の英小文字は対数変換後Tukey検定5%水準で有意差なし。

表6.8 ホウレイ, あきろまん, ヒノヒカリおよびコシヒカリの株当たり
平均種子数, 株当たり生存線虫数, 死亡線虫数, 合計線虫数と線虫増殖率

	種子数 ¹⁾	株あたり線虫数			線虫 ¹⁾ 増殖率
		生存 ¹⁾	死亡 ²⁾	合計 ²⁾	
ホウレイ	356.8± 94.9 a	418.8± 234.74 a	316.3± 278.9 a	735.1± 470.75 a	0.25±0.16 a
あきろまん	561.8±137.4 a	499.7± 584.0 a	348.3± 411.1 a	848.0± 989.4 a	0.28±0.33 a
ヒノヒカリ	488.3± 95.4 a	754.4± 751.3 a	555.2± 668.4 a	1309.6±1376.9 a	0.44±0.46 a
中生新千本	553.7±205.5 a	422.9± 401.4 a	160.2± 159.0 a	583.1± 536.6 a	0.19± 0.18 a
コシヒカリ	545.7±290.5 a	288.7± 379.6 a	293.7± 335.9 a	582.4± 713.8 a	0.19± 0.24 a

*平均値±S.D

1)平均値に付した同一の英小文字はTukey検定5%水準で有意差なし。

2)平均値に付した同一の英小文字は対数変換後Tukey検定5%水準で有意差なし。

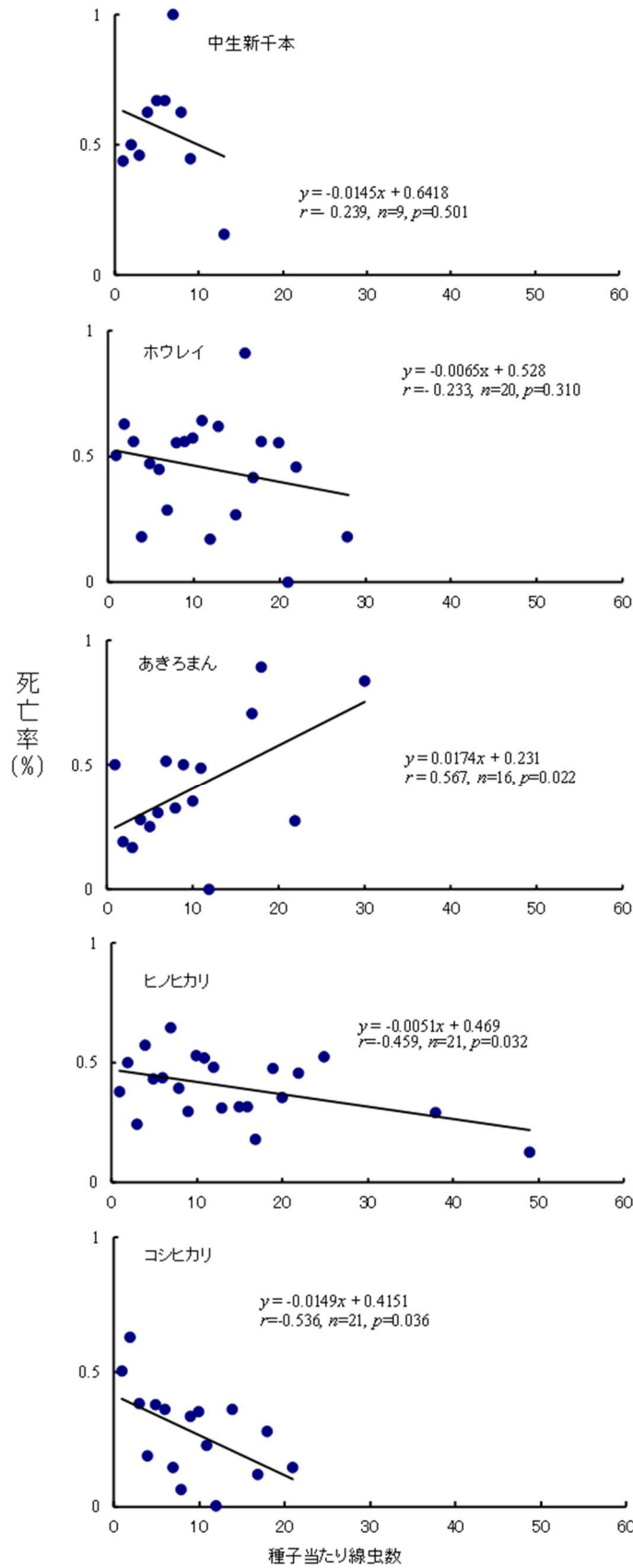


図 6.1. 中生新千本, ホウレイ, あぎろまん, ヒノヒカリおよびコシヒカリにおける種子当たり線虫数と死亡率の関係

第7章 総合考察

現在、広島県での線虫によるほたるいもちの発生は発生地点率で5~25%で推移している。ただし、中程度以上の発生は少なく、減収等にまで至った水田はほとんどない。一方、全国の線虫の発生面積率は過去10年間で、平均0.4%で推移している。農協協会の全国アンケート調査によれば、営農指導員の40%弱が線虫を必ず防除する害虫として認識している。そのため、全国の防除面積率は約20%となっている。つまり、種子消毒を含む防除により線虫の発生が低く抑えられていると考えられる。

全てのイネ株が葉にほたるいもち症状を呈していても、種子あたり生存線虫密度は、水田間、水田内のイネ株間、イネ株内の穂間で有意に異なることを、本研究は示した。さらに、生存線虫は穂、株、水田の3つの空間スケールにおいて種子間で集中分布を示した。このことは種子内の線虫数と生存率の間の正の相関に関係するのかもしれない（アリー効果）（Huang & Huang, 1974）。水田での線虫の発生パターンや死亡率を解析した結果、水田の「ほたるいもち」の感染レベルが高くなると水稻の平均種子充実度は低下することを示した（図4.8, 図4.9）。我々は「ほたるいもち」の圃場感染レベルが増加すると種子あたりの線虫の平均個体数が増加することも観察した。さらに、圃場の平均種子充実度と種子あたり平均線虫数の間に有意な負の相関があった。これらの事実は、水田では線虫の感染は、平均種子重量や種子のサイズが低下するように作用している（Yoshii & Yamamoto, 1950a; Todd & Atkins, 1958; 深野, 1962）。

線虫感染種子を人為的に作成し、2003年から2016年までの14年間にわたって、播種、育苗、移植、収穫を繰り返して、線虫の個体群動態を調査した。その結果、2003年から2012年までの10年間にわたる線虫密度と空間分布の関係をみると、全線虫数が多くなると、線虫の存在する種子の割合が高まり、分布集中度は低下した。線虫の種子内密度と空間分布の関係をみると、全線虫数の減少とともに、線虫の存在する種子の割合が低下したが、線虫の存在する種子については、種子内の線虫数はほぼ一定であった。生存線虫数も同様の結果を示した。種子内の線虫数、線虫の存在する種子割合、線虫の存在する種子内の線虫数の年次変動において、線虫の存在する種子内の線虫数はほぼ一定で、全線虫数の増減は線虫の存在する割合の増減と相関が高かった。また、種子内線虫数と死亡率の逆密度依存関係は14年のうち9年で見られた。その分布集中度の増加とそれに伴う種子内線虫数の減少により、線虫密度と死亡率の逆密度依存関係を引き起こしていると示唆された。

本報には掲載していない実験で、線虫の存在する種子が出現する要因を解析するために、イネの出穂期に穎花に生存線虫10頭、30頭、100頭を接種し、接種7日後、21日後および42日後に、線虫数、死亡率、線虫の存在頻度を調査した。その結果、接種21日後から42日後に、線虫を接種した全種子で、線虫個体数の減少が観察された（図7.1）。接種21日後から42日後に30頭接種区と100頭接種区では、死亡率の増加と線虫の存在しない種子割合の増加が観察された（図7.2, 図7.3）。このことから、線虫の増殖は開花後21日までに起こり、それ以降、イネの抵抗反応により、線虫が死亡する機構の存在が考えられる。

それぞれの種子に多数の線虫が寄生している場合、平均種子充実度は減少しなかった。これは種子内の多数の線虫は、植物体が種子に蓄積する物質量を制御している可能性（寄生者による宿主操作）を示す。

本研究で種子内線虫の偏った雌比（♂18%）が明らかとなった。種子間の線虫の高い集中分布と種子内での密度逆依存的死亡は線虫個体群の存続に寄与すると考えられる。実際、多くの線虫が寄生した水稻種子が多数の非感染種子とともに播種されたとき、新しく発芽したイネ個体群で線虫の定着が容易に起こる。胚乳の小さい種子が発芽すると、胚乳が大きな種子と同等に生育する（未発表データ）。線虫感染の比重 1 以下の軽い種子の発芽率は低いが、水に沈む種子（比重 1.00~1.13）の発芽率は低下しない。これらのことは、種子間での線虫の集中分布を通して、イネ個体群における線虫個体群の存続の頑強さを示している。

総合的線虫管理法を確立するために、線虫とイネの相互関係を打破するための方策を考えたい。線虫の分散は、主に育苗箱で起こり、水田では起こりにくいことを明らかにした。このため、線虫の防除時期は、種子の水浸漬から育苗期の間であろう。防除の方法としては、線虫に対する抵抗性品種の利用や線虫の駆除が中心となる。後藤・深津（1952）は本研究と同様に幼苗期に線虫を接種し、線虫に強い品種と弱い品種があることと線虫の増殖率と品種の抵抗性の間の負の相関を報告した。広島県の栽培種で線虫の増殖率を検討したところ、‘コシヒカリ’、‘ヒノヒカリ’、‘あきろまん’、‘中生新千本’および‘ハウレイ’の間に増殖率の差はなかった。田村・気賀沢（1959）が抵抗性品種として報告した‘農林 43 号’と現在栽培されている品種と比較する必要があるだろう。

現在、育苗箱での線虫の個体数を低下させるために、殺虫剤による駆除を行っている。本研究では、種子を水浸漬し、線虫が休眠覚醒した後に急速に乾燥させることによる死亡率の上昇効果が種子消毒の成功のポイントとなることを明らかにした。鉄コーティング直播のための鉄粉コーティング過程における線虫の高い死亡率は、線虫の休眠覚醒とその後の乾燥によるものであることが示された。このため、線虫感染種子は水や殺虫剤等への浸漬後に急速な乾燥を行うことが防除のために重要である。また、育苗箱での分散や増殖を防ぐために、育苗箱への殺虫剤の灌注や育苗箱への籾の播種前に粒剤を施用する方法も有効であろう。

本研究の結果から、被害の発生しない線虫密度以下に抑制する管理を行うことで、線虫被害は回避可能と考えられる。実際、線虫の種子消毒法は温湯消毒より殺虫剤による種子消毒が広く普及している。しかしながら、毎年、種子消毒を行うのは、線虫の殺虫剤感受性の低下を招くであろう。やみくもな過剰な種子消毒を実施しないためには、播種前の種子内の線虫密度の把握が必要である。現在、原々種圃、原種圃並びに採種圃では、徹底的に線虫の防除対策は取られている。このため、販売される種籾の線虫密度は極めて低い状態となっている。さらなる安全を期すために、種子の線虫数をモニターすることが必要である。種子からの線虫分離は収穫前に行うことができるため、本研究で確立した 3 段抽出法を活用し、収穫 10 日前に穂をサンプリングし、線虫を調査することによって、圃場内の線虫密度を推定することは可能である。病害虫発生予察調査の少発生のレベル（1~20%）以下に抑えることができれば、減収はないと考えられる。ほたるいもち株率 20%以下に抑えられるレベルを 5.3 節の育苗箱での線虫の分散から考えると、推定初期生存線虫数 436.7 頭/5,830 種子、すなわち、種子当たり生存線虫 0.08 頭以下に抑制することが必要である。このような密度管理が達成されれば、1 年で種子更新する栽培体系では農家段階での線虫のための種子消毒は不要と考えられる。また、生存線虫 0.08 頭以上となった場合には、その圃場から採種しないという選択も可能となる。

一方、自家採種する場合は、線虫密度の把握を行う必要があり、線虫密度に応じた対策を行う必要

がある。自家採種する場合も、3段抽出法に基づいた線虫密度推定を行えば、種子管理が可能である。また、近年、農薬の使用回数を減らしたい生産者も多い。このため、線虫に対する抵抗性品種の育成も必要であろう。

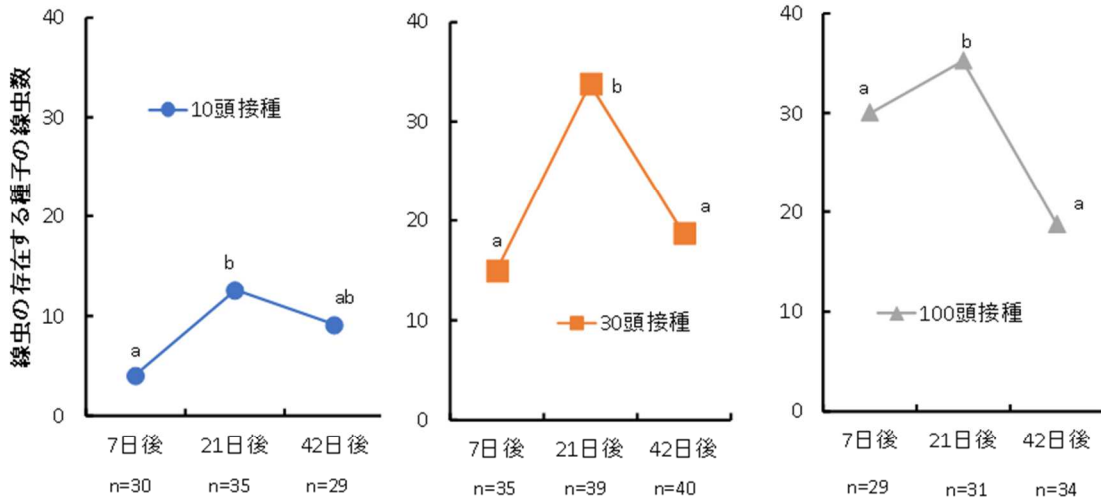


図7.1. 穎花に生存線虫10頭、30頭、100頭を接種し、その7日後、21日後、42日後の線虫の存在する種子の線虫数への影響
異なる英小文字は対数変換後Tukey検定5%水準で有意差あり
nは調査種子数

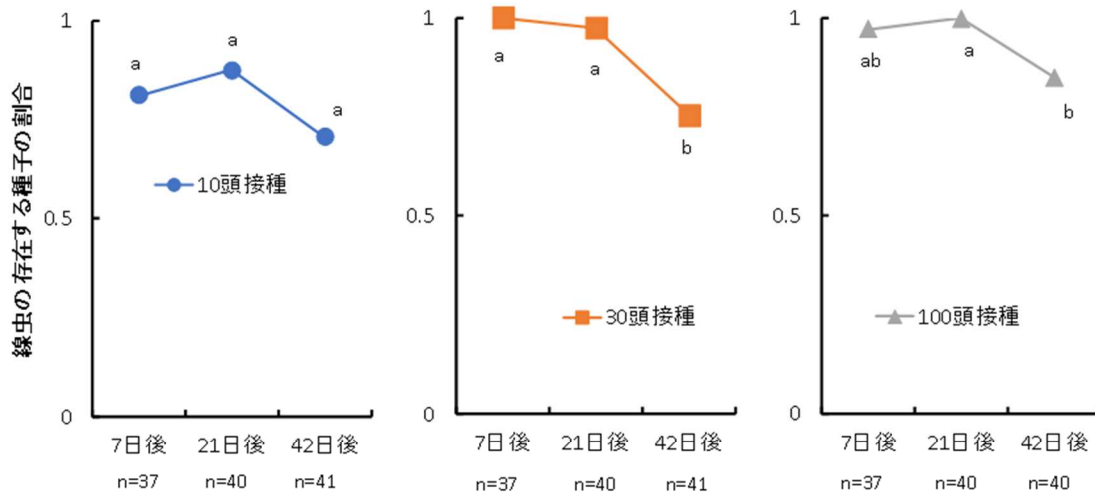


図7.2. 穎花に生存線虫10頭、30頭、100頭を接種し、その7日後、21日後、42日後の線虫の存在する種子の割合への影響
異なる英小文字は対数変換後Tukey検定5%水準で有意差あり
nは調査種子数

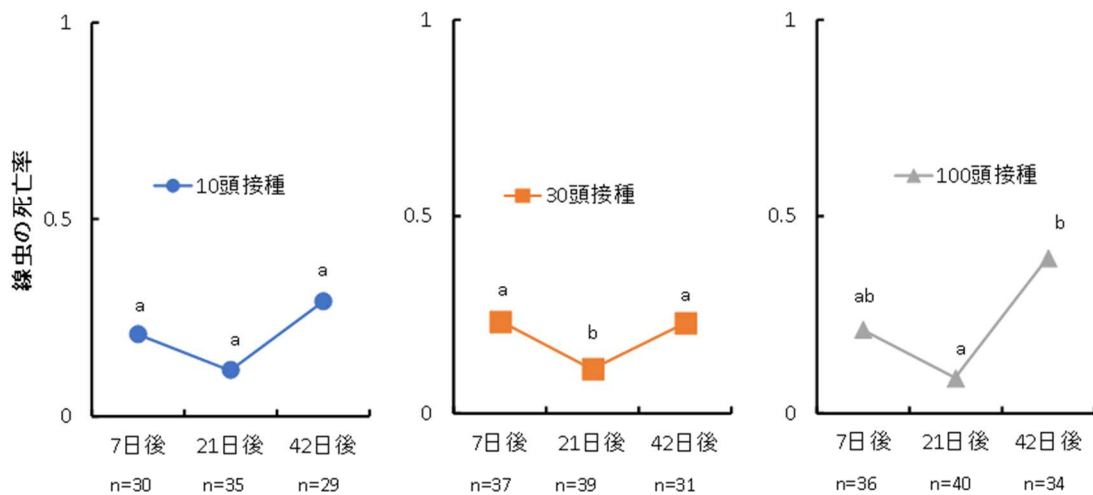


図7.3. 穎花に生存線虫10頭、30頭、100頭を接種し、その7日後、21日後、42日後の線虫の死亡率への影響
異なる英小文字は対数変換後Tukey検定5%水準で有意差あり
nは調査種子数

要旨

日本の茨城県以南では、2007年から近年まで、ほたるいもちの発生があり、その発生面積率は平均約0.5%（最大0.7%、最低0.2%）であった。一方、心枯線虫病の防除面積率は、毎年約20%であった。種子消毒の可否の判断基準がないため、予防的に種子消毒が行われていると考えられる。これに対して、イネの主要な有害昆虫では要防除水準等の設定がなされ、予防散布回数が増加を抑制してきた。本論文では、イネシガラセンチュウ（以下、線虫と称す）の個体群動態および線虫とイネの相互関係について研究し、これらの成果によって、線虫の総合的害虫管理法の提言を行った。主要な結論は以下に要約する。

1. 種子1粒内のイネシガラセンチュウ数の調査法

イネ種子1種子から線虫を得るための簡単な分離方法を開発した。その方法は以下の通りである：それぞれのイネ種子を縦に分割し、次いで単一のピペットチップに移した。分割した種子を入れたチップを、水を入れたガラス管瓶に直立させて、線虫を抽出した。この方法はベルマン法よりも効率的であり、4時間以内に1つのイネ種子から生存している線虫を約100%の効率で分離可能である Hoshino & Togashi 法と称する。

2. 大量の種子内のイネシガラセンチュウ数の調査法

線虫の低密度個体群の密度推定を行うために、イネ種子20, 50, 100, 150粒から本種を分離するための大量分離法を作成した。本方法では、各種子を縦に二分してステンレス製金網の上に置き、25°Cの水に浸した。4時間後の分離効率（分離された個体の割合）は、用いた種子数に関係なく、ほとんど100%であった。線虫の個体群密度が低い場合、Hoshino and Togashi 法では多くの種子を個別に調査する必要があったが、この大量分離法は多くの種子を一度に調査できるため、短時間での密度推定が可能になった。

3. 広島県のほたるいもち発生の年次的変化

広島県におけるほたるいもちの発生は、1980年代後半まで10~20%の発生面積率で推移し、発生程度「中」以上の発生も認めている。しかし、1990年代前半に南部地域の主な水稻栽培品種が「中生新千本」から「ヒノヒカリ」に替わり、無感染した種子に置き換わったので、その発生面積率は減少して数%となり、発生程度「中」の発生はなくなった。しかし、1995年以降、発生程度「中」以上の被害が発生し、1998年には発生程度「中」以上の面積率が3.5%と広島県瀬戸内沿岸部を中心に多発した。1999年以降、広島県内の農業協同組合などの育苗センターでは、線虫防除を目的とした種子消毒剤を使った種子消毒が導入されたため、発生程度「中」以上の発生は2016年まで認めていない。しかし、発生はなくなることなく、少発生ではあるが、発生面積率は5~25%で推移している。

4. 1圃場のほたるいもち発生の水田間の違いとその要因

広島県2地域でのほたるいもちの発生分布を調査した結果、水田の灌漑水の流れによって起こる線虫の圃場間移動の頻度は通常低いと考えられた。栽培者毎に育苗に使用する水稻種子に潜む線虫数が異なること、また、水稻育苗の環境やその行程の違いがほたるいもちの発生程度に大きく影響すると考えられた。

5. 水田、イネ株、穂という空間スケールにおけるイネシガラセンチュウの空間分布とそれに基づく個体群密度調査法（多段抽出法）

穂間、イネ株間、激害の水田の空間スケールにおけるイネ種子あたりの線虫の空間分布パターンを明らかにし、水田における1種子あたりの平均密度を推定するための3段階サンプリング法を提示することを目的とした。8つの水田のそれぞれ6つのイネ株から採取した5つの穂の各々から採取した20種の種子から、生存

線虫と死亡線虫を個別に抽出した。

Nest-ANOVA は、8 つの水田、水田内のイネ株間、およびイネ株内の穂間で、種子あたりの線虫密度が有意に異なっていることを示した。線虫が存在する種子の割合と株あたりと水田あたりの平均密度との間に線形の関係が認められたのに対して、線虫が存在する種子の割合は増加し、上限に達した。線虫の平均密度と線虫の平均こみあい度との関係から、線虫は穂、株、水田スケールのそれぞれに集中分布を示した。これらの関係を用いて、指定された精度レベルでの種子あたりの線虫密度を推定するための 3 段階サンプリング計画を提示した。

6. 1 圃場のイネシガラレセンチュウ個体群の年次変動

農家が新しく購入した種子を用いてイネを栽培した場合、この線虫はほとんど発生しない。しかし、その収穫物を使って栽培を繰り返すと、新しい種子を購入してから 2~3 年で線虫の大発生が起こりやすい。このメカニズムを明らかにするとともに、長期間にわたる線虫の年次変動の特徴、および、それを引き起こす機構を推定した結果、線虫の種子あたり個体数は、2004 年と 2008 年、2012 年にピークを持つ減衰振動を示し、2012 年以降は 1 年毎に増減を繰り返した。線虫密度と空間分布の関係をみると、種子内線虫数が多くなると、線虫のいる種子の割合が高まり、分布集中度は低下した。しかし、種子内の線虫数が減少すると分布集中度は大きくなった。一方、種子内線虫数と死亡率の逆密度依存的関係は 2004 年、2008 年、2012 年、2013 年以外の 9 ヶ年で見られた。線虫の存在する種子の種子内の線虫数はほぼ一定であった。

7. イネ穎花に侵入したイネシガラレセンチュウと種子の生長・成熟

線虫が水稻種子の胚乳の発達に与える影響を明らかにするため、上位 3 葉を切除し、光合成産物の穂への転流を変えることによって、種子の肥大を変化させる条件を作り出し、その条件下での種子内の線虫数と種子重量の関係を検討した。生存線虫を穎花に接種した場合と水を接種した場合の両方で、止葉、第 2 葉および第 3 葉を切除したイネの種子は小さくなった。穎花に侵入した生存線虫によってイネの種子重量が増加したが、死亡線虫接種と水接種では影響しなかった。止葉、第 2 葉および第 3 葉の有無によって、回帰直線の傾きが変わらないことから、上位 3 葉の光合成で作られられた種子への転流物質質量の変化に関係なく、生存線虫は種子の充実に影響していると考えられた。

8. 温度と時間がイネ種子内のイネシガラレセンチュウの生存に及ぼす影響

異なる越冬の温度条件での線虫生存率を調査し、温度条件による越冬時の死亡への影響、低温下での種子保存の線虫生存率への影響について検討した。乾燥条件下 10℃以下で保存すると秋から翌春までの約半年は種子内の線虫の生存率は低下しないと考えられた。5℃で保存すると、4,687 日間の保存でも生存率の低下は認められなかった。通常、種子の長期保存は 5℃以下で行われており、種子が長期保存される場合でも線虫の生存率は低下することがないことを示している。-30℃で 1,783 日間保存した場合、保存前と比較して有意な生存率の低下を認めた。しかし、線虫の生存率は 48.7%であり、相当数の生存線虫が生き残っていた。このことから、種子内の線虫は、無水状態であれば氷温での長期生存も可能であると考えられた。種子を 5℃以下で保存すれば、長期間、線虫生存率が変わらず、実験に供試する材料として利用できることが明らかとなった。このことから、線虫の実験のサンプルは 5℃で保存すれば、4,600 日以内なら供試しても差し支えないと考えられた。

9. イネ種子内のイネシガラレセンチュウ密度と性比の関係

日本の線虫の個体群管理を考えるうえでも、性比を知ることは重要と考えられる。そこで、広島県の個体群

を使って、性比および生殖様式を明らかにした。雄成虫と一緒に種子から分離された雌成虫は、個体飼育されるまでに交尾を行った可能性がある。また、幼虫の個体飼育実験でも幼虫は全て増殖しなかったが、雌成虫の単独飼育では増殖する場合があった。雄成虫と一緒に分離されなかった雌成虫は種子から分離された後、雄成虫と交尾を行うことはできない。つまり、両性生殖ならば脱水前に交尾によって得た精子を使って雌は繁殖を行ったと推測される。また、幼虫の個体飼育実験の結果から本個体群は、両性生殖すると考えられた。

10. イネ種子におけるイネシガラレセンチュウの分布パターンと死亡率

種子あたりの線虫数、線虫を有する種子の大きさおよび線虫死亡率の間の関係を明らかにするために、3つの異なるレベルのほたるいもち症状を示している12水田のイネから18穂を採取した。この穂を4℃で30～82日間保存した後に調べた。貯蔵中に種子内の線虫に死亡はなかった。水田のほたるいもちの感染レベルが高くなると水稻の平均種子充実度は低下することを示した。ほたるいもちの圃場感染レベルが増加すると種子あたりの線虫の平均個体数が増加した。それぞれの種子で、種子内の線虫数の増加により、平均種子充実度が増加し、より発達したサイズに達していた。また、種子内での線虫の密度逆依存的死亡が明らかとなった。種子内に線虫が多数いることが宿主生存に悪影響しないと考えられた。種子間の線虫の集中分布を通じて、イネ個体群における線虫の絶滅は起こりにくいであろう。

11. 水田におけるイネシガラレセンチュウの分散と繁殖の間のトレードオフ

線虫多発水田と無発生水田との間の種子の比重を比較して、イネおよび線虫の両方の分散および生存に対する線虫感染の影響を個体群パラメータで評価した。無発生水田由来の種子を水に浮かべると、軽い種子（水面に浮かぶことによって識別される）の割合は、多発水田の方が無発生水田よりも大きかった。軽い種子は、より少ない平均種子充実度を示し、発根した種子の割合はより少なくなり、発根までの時間は、多発生水田の種子が無発生水田の種子よりも長く必要であった。線虫の死亡率は軽い種子の方が重い種子よりも大きかった。これらの結果は、イネ種子の分散と繁殖の間にトレードオフがあることを示唆した。多発生水田の軽い種子は、無発生水田の種子よりも平均種子充実度が高く、多くの線虫を有する軽い種子は、発達した胚乳を有しており、線虫による宿主の操作を示唆している。

12. 隔離されたイネにおけるイネシガラレセンチュウの分散と繁殖の間のトレードオフ

イネ種子と線虫を用いて、宿主植物および線虫の両方の分散および生存に及ぼす線虫感染の影響を実験的に調べた。線虫を接種したイネは、無接種のイネよりも水に浮かぶ軽い種子の割合が高かった。線虫の死亡率は、重い種子よりも軽い種子で大きかった。軽い種子の場合、種子充実度の平均程度は、線虫数が増加するにつれて増加したが、中間および重い種子の線虫数では、増加するにつれて一定であった。線虫接種イネ由来あるいは線虫無接種イネ由来に関わらず、軽い種子は発芽した割合が少なく、重い種子よりも発根するのに時間がかかった。これらの結果は、イネ種子の競争能力と分散能力のトレードオフを示している。線虫の分散パターンは階層的分散であると考えられる。

13. 育苗箱内分散に及ぼす種子内のイネシガラレセンチュウ密度の影響

線虫に感染した種子から育苗箱中で、線虫が分散すると考えられるが、その分散・定着の頻度がどれくらいか明らかにされていない。そこで、線虫感染種子の混入率を変えることによって、線虫初期密度を変化させた育苗箱を作り、線虫の分散・定着の頻度を明らかにした。線虫汚染種子の混入数から算出した線虫汚染種子混入率を基準とし、ワグネルポットに移植したイネから分離された線虫との比では、それぞれ、10粒区116.6倍、20粒区58.3倍、50粒区17.5倍、100粒区5.8倍、200粒区5.8倍、500粒区8.2倍と増加し、育苗箱におい

て線虫に感染した苗数は線虫汚染種子混入率よりも高まった。育苗箱では株間移動率は高いと考えられた。線虫防除は、育苗箱に播種されるまでの線虫数を減少させることだけでなく、育苗箱での線虫の分散を防ぐことが有効と考えられる。すなわち、播種直後の殺虫剤の育苗箱への施用は線虫防除の手段としては有効であると考えられる。

14. イネシガラレセンチュウの密度依存的な定着と繁殖

線虫 1 頭あたりの到着率、線虫個体群の増加率、および種子充実度ならびに線虫に感染したイネの収量に対する水中の線虫の数の影響を、3 つの実験で評価した。実験 1 では、4 つの初期線虫個体群密度 (Pi) の影響を、ワグネルポットの水中に線虫を接種することによってポットに植えたイネで評価した。実験 2 は、試験管中の 3 つの初期線虫密度 (Pi) レベルで水中および水上に置かれたイネ苗に接種した。実験 3 は、試験管中の 3 つの初期線虫密度 (Pi) レベルで水中に置かれた玄米に接種した。実験 1 は、水中の線虫個体群密度が増加するにつれて、感染率および種子あたりの平均線虫数の両方が増加したが、線虫個体群の増加率は減少したことを示した。実験 2 と 3 では、イネ苗を有する試験管の中に線虫を入れたとき、比較的大きな割合の線虫が試験管内の水中から消失することが示された。1 頭あたりの到達確率が比較的高く、線虫 1 頭から 100 頭の範囲内では、到達確率が密度依存的に減少することを示した。

15. 種子の水浸漬と風乾が種子内のイネシガラレセンチュウの生存に及ぼす影響

線虫に寄生されたイネ種子の消毒のために、いくつかの殺虫剤が使用されている。標準的な種子消毒の有効性を測定した。フェニトロチオンまたはフェンチオンの薬液に種子を浸漬し、続いて種子を風乾させた。また、殺虫剤を添加しなかった水に浸漬し、同じ処理の有効性を線虫の生存率で測定した。その結果、殺虫剤単独と水浸漬の間に種子内での線虫死亡率はほとんど差がなかったことを示した。ほとんどの死亡は、種子を風乾している間に発生した。風乾単独による死亡率は、種子を水に 24 時間浸したことによる死亡率の 1.7 倍であった。

16. 種子の鉄コーティング処理がイネシガラレセンチュウの生存に及ぼす影響

イネ種子への鉄コーティング処理の工程を詳細に検討し、線虫に対する影響を検討した。鉄コーティングした鉄の有無による線虫の死亡率への影響はなかった。イネ種子への鉄コーティング処理によって、40°C 3 日間の乾燥で死亡率が 35~42% 高まった。イネ種子への鉄コーティング処理の工程では、まず、イネ種子を水温 20°C で 24 時間水浸漬する。この時、線虫は休眠から覚醒すると考えられる。その後、3 日間の乾燥の工程で、鉄が発熱することによって、種子の温度が 40°C 程度になる。つまり、覚醒した線虫が 40°C の温度に晒されることになる。その後も、急激な乾燥に線虫は遭遇するので、線虫の死亡率が高くなったと考えられた。

17. 広島県の栽培品種におけるイネシガラレセンチュウの増殖

広島県で栽培されている水稻品種を中心に、線虫の増殖率や線虫に対する性質を明らかにした。ここでは、線虫の増殖率の高低を抵抗性の強弱とみなした。広島県で栽培されている主要な水稻品種での線虫増殖率に違いはないため、どの品種も線虫に対する抵抗性は持っていないと考えられた。

18. イネシガラレセンチュウの密度管理技術の提言

種子からの線虫分離は収穫前に行うことができるため、本研究で確立した 3 段階抽出法を活用し、収穫 10 日前に穂をサンプリングし、線虫を調査することによって、圃場内の線虫密度を推定することは可能である。病害虫発生予察調査の少発生のレベル (1~20%) 以下に抑えることができれば、減収はないと考えられる。ほたるいもち株率 20% 以下に抑えられるレベルを 5.3 節の育苗箱での線虫の分散

から考えると、推定初期生存線虫数 436.7 頭/5,830 種子，すなわち，種子当たり生存線虫 0.08 頭以下に抑制することが必要である。このような密度管理が達成されれば，1 年で種子更新する栽培体系は農家段階の線虫のための種子消毒は不要と考えられる。

謝辞

本研究は、主として1998年から2016年にかけて著者が広島県立総合技術研究所農業技術センターに在職中の成績をまとめたものである。研究当初から貴重なご助言をしていただき、共同研究者として本研究を遂行し、まとめるにあたり、直接ご指導を頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科教授富樫一巳博士に対して心から感謝を申し上げます。東京大学大学院農学生命科学研究科教授 福田健二博士、東京大学大学院農学生命科学研究科教授 根本圭介博士、東京大学大学院農学生命科学研究科教授 難波成任博士、東京大学大学院農学生命科学研究科准教授 松下範久博士には、多くの有益な示唆と暖かい激励を賜った。ここに記し、深謝する。

稿を起すにあたり、ご指導を頂いた広島県立総合技術研究所農業技術センター軸丸祥大博士に深く感謝を申し上げます。また、本研究を推進する上で貴重な意見を頂いた故氣賀沢和男博士、線虫の同定をして頂いた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター（現、丸和化学）水久保隆之博士、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター（現、JA 広島経済連）山内稔博士に感謝の意を表す。また、調査で協力を頂いた荒川洋博士、広島県尾道農業改良普及所川上浩之氏（現、西部農業技術指導所）、同所清水佳苗氏（現、西部農業技術指導所）、広島県三次農業改良普及所佐々木誠氏（現、広島県立農業技術大学校）に感謝の意を表す。また、広島県立総合技術研究所農業技術センターの非常勤職員の皆様に、日々の栽培管理の支援や実験装置の製作において多大な協力を頂いた感謝の意を表す。

本研究の遂行に当たりご指導、ご助言を頂いた広島県立総合技術研究所農業技術センター長新田浩通氏、同センター元次長林 英明氏（現、大信産業）、同センター次長兼技術支援部長平尾晃氏、同センター次長栗久宏昭氏、同センター生産環境研究部長梶原真二博士には敬意と謝意をささげる。

引用文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.
- Allee, W. C, Bowen E (1932) "Studies in animal aggregations: mass protection against colloidal silver among goldfishes". *Journal of Experimental Zoology*. 61 (2): 185-207.
- Allen, M. W. (1952) Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to '*Aphelenchoides Fragariae*' (Ritzema Bos, 1891) *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. 19, 108-120.
- Anderson, R.M. (1980) The dynamics and control of direct life-cycle helminth parasites. *Lecture Notes in Biomathematics*. 39, 278-322.
- Anderson, R.M. (1981) Population ecology of infectious disease agents. In: May, R.M. (Ed.) *Theoretical ecology. principles and applications*. 2nd ed. Oxford, UK, Blackwell Scientific Publications. pp.318-355.
- 浅見 宏・内藤 忠・小沢保治・露木敏雄・近岡一郎 (1978) イネシンガレセンチュウの本田における水媒伝染の発生事例. 関東東山病害虫研究会年報. 25, 121-122.
- Atkins, J. G., and Todd, E. H. (1959) White tip disease of rice. III. Yield tests and varietal resistance. *Phytopathology*. 49,189-191.
- Barat, H., Delassus,M., and Vuong,Huu-Hai, (1969) The geographical distribution of white tip disease of rice in tropical Africa and Madagascar. *Technical Communication, Commonwealth Bureau of Helminthology*. 40, 269-273.
- Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, C.R. (1996) *Ecology*. 3rd edition. Oxford, UK, Blackwell Scientific Publications. pp. 1068
- Berec, L., Angulo, E, and Courchamp, F. (2007) Multiple Allee effects and population management. *Trends in Ecology and Evolution*. 22, 185-191
- 千代西尾伊作・中澤 肇(1988) 種子消毒によるイネシンガレセンチュウの防除技術に関する基礎研究. 第1報. 線虫の検出技術と種子消毒の簡易検定法について. 鳥取県農業試験場研究報告 24, 1-37.
- Christie, J. R. (1942) A description of *Aphelenchoides besseyi* n. sp., the summer-dwarf nematode of strawberries, with comments on the identity of *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb, 1926) and *Aphelenchoides hodsoni* Goodey, 1935. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 1942. (9), pp. 82-4 ref. bibl. 6.
- Cralley, E. M. (1949) White tip of rice. *Phytopathology*. 39, 5.
- Cralley, E. M. (1952) Control of white tip of rice. *Arkansas Farm Research* 1 (1), 6
- Croll, N. A., Anderson, R. M., Gyorkos, T. W. and Ghadirian, E. (1982). The population biology and control of *Ascaris lumbricoides* in a rural community in Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 76, 187-197.
- Evans, H. C. (1989) Mycopathogens of insects of epigeal and aerial habitats. In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P. M. & Webber, J. F. (Eds). *Insect-fungus interactions*. London, UK, Academic Press, pp.

- 205-238.
- Feakin, S. D. (1970) Pest control in rice. PAN Manual. 3, 99-107.
- Feng H., Wei L., Lin, M., and Zhou, Y. (2014) Assessment of rice cultivars in China for field resistance to *Aphelenchoides besseyi*. Journal of Integrative agriculture. 13 (10). 2221-2228.
- Fourtuner, R. and Williams K. J. O. (1975) Review of the literature on *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, the nematode causing 'white-tip' disease in rice. Helminthological Abstracts. B 44 1-40.
- French N., and Barraclough R., M. (1962) Survival of *Aphelenchoides ritemabosi* (SCHWARTZ) in soil and dry leaves. Nematologica. 7, 309-316.
- 藤本 清・山口福男 (1971) 兵庫県におけるイネシンガレセンチュウの発生分布とその生態および防除. 兵庫県立農業試験場報告. 19, 33-38.
- 深野 弘 (1962) イネ線虫心枯病の生態および防除に関する研究. 福岡県農業試験場特別報告. 18, 1-108.
- 深野 弘・横山佐太正 (1951) 稲線虫心枯病豫防種籾消毒法の研究 第 II 報 風呂浸法の消毒効果. 九州農業研究. 8, 88-90.
- Gokte, N. & Mathur, V. (1989) Reproduction and Development of *Aphelenchoides besseyi*. Phytoparasitica. 17, 263-267
- 後藤和夫・深津量栄 (1952) 稲線虫心枯病に関する研究 第 2 報 稲體上の線虫数と分布. 日本植物病理学会報. 16, 57-60.
- 後藤和夫・深津量栄 (1956) 稲線虫心枯病に関する研究 第 3 報 品種抵抗性の解析と抵抗性質. 農業技術研究所報告. C 6, 123-149.
- Griesbach, J. A., Chitambar, J. J., Hamerlynck, M. J. and Duarte, E. O. (1999) A comparative analysis of extraction methods for the recovery of *Anguina* sp. from grass seed samples. Supplement to the Journal of Nematology. 31, 635-640
- Hamilton W. D. (1967) Extraordinary sex ratios. A sex-ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology. Science. 156 (3774), 477-88.
- Hashioka, R. (1964) Nematode diseases of rice in the world. Riso 13 (2), 139-147.
- Hollis JP, and Keoboonrueng, S. (1984) Nematode parasites of rice. In: Nickle WR (ed) Plant insect nematodes. Marcel Dekker, New York, pp 95-146.
- 星川清親 (1967a) 米の胚乳発達に関する組織形態学的研究. 第 1 報 胚乳細胞組織の形成過程について. 日本作物学会紀事. 36, 151-161
- 星川清親 (1967b) 米の胚乳発達に関する組織形態学的研究. 第 3 報 胚乳細胞の分裂の様相について. 日本作物学会紀事. 36, 210-215.
- 星川清親 (1968) 米の胚乳発達に関する組織形態学的研究. 第 11 報 胚乳組織における澱粉粒の蓄積と発達について. 日本作物学会紀事. 37, 207-216.
- Hoshikawa, K. (1989) The Growing Rice Plant. Nosan Gyoson Bunka Kyokai, Tokyo. pp.310.
- 星川清親 (1975) イネの生長. 農村漁村文化協会. 東京. pp317.
- Hoshino, S. and Togashi, K. (1999) A simple method for determining *Aphelenchoides besseyi* infestation level of

- Oryza sativa* seeds. Journal of Nematology. 31S, 641-643.
- Hoshino, S. and Togashi, K. (2000). Effect of Water-Soaking and Air-Drying on Survival of *Aphelenchoides besseyi* in *Oryza sativa* Seeds. Journal of Nematology. 32, 303-308.
- Hoshino, S. and Togashi, K. (2002). Mass extraction method for determining *Aphelenchoides besseyi* density in *Oryza sativa* seeds. Japanese Journal of Nematology. 32, 25-30.
- Hoshino, S. and Togashi, K. (2009). Trade-off between dispersal and reproduction in *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae) harbored in *Oryza sativa* seeds in paddy fields. Applied Entomology and Zoology. 44, 387-396.
- Huang, C. S., and Huang, S. P. (1972) Bionomics of white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, in rice florets and developing grains. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 13, 1-10.
- Huang, C. S., and Chiang, Y. C. (1975) The influence of temperature on the ability of *Aphelenchoides besseyi* to survive dehydration. Nematologica. 21, 351-357.
- Huang, C. S., Huang, S. P. and Lin, L. H. (1972) The effect of temperature on development and generation periods of *Aphelenchoides besseyi*. Nematologica. 18, 432-438.
- Huang, C. S. and Huang, S. P. (1974) Dehydration and the survival of rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* Nematologica. 20, 9-18.
- Huang, C. S., Huang, S. P. and Chiang, Y. C. (1979). Mode of reproduction and sex ratio of rice white-tip nematode. Nematologica. 25, 255-260.
- Huang, Y. P. (1959) "White tip disease of rice in Taiwan." PI. Prot. Bull. F. A. O.,
- Huang Y. P. (1962) "White tip nematode of rice." Kaohsiung District Agric.
- 池田 弘・吉村大三郎・吉田桂輔 (1977) イネ心枯線虫病の育苗箱における感染及び発病について. 九州病害虫研究会報 23, 28-30.
- 稲生 稔 (1968) イネ心枯線虫病の水媒感染について (第2報) 移植後の線虫寄生と発病. 関東東山病害虫研究年報. 15, 118.
- 井上博喜・山内 稔・宮川久義 (2009) 種子の鉄コーティング処理によるイネ育苗期病害の防除. 日本植物病理学会報. 75, 164-169.
- 井上博喜・山内 稔・竹原利明・宮川久義・竹下 稔・古屋成人・平八重一之・土屋 健 (2012) イネ種子の鉄コーティング処理と種子消毒法の発病抑制効果の評価, ならびに鉄粉種, コーティング比率および風乾処理が発病抑制効果に与える影響. 九州病害虫研究会報告. 58, 1-6.
- Iwao, S. (1968) A new regression method for analyzing the aggregation pattern of animal populations. Researches on Population Ecology. 10, 1-20.
- Iwao, S. and Kuno, E. (1971) An approach to the analysis of aggregation pattern in biological populations. In: Patil, G. P., Pielou, E. C. & Waters, W. E. (Eds). Spatial patterns and statistical Press. G. P., Pielou, E. C. & Waters, W. E. (Eds). Statistical ecology, Vol. 1. University Park, PA, USA, Pennsylvania State University Press, pp. 461-513.
- Jagdale, G. B. & Grewal, P. S. (2006) Infection Behavior and Overwintering Survival of Foliar Nematodes, *Aphelenchoides fragariae*, on Hosta. Journal of Nematology. 38, 130-136.

- 軸丸祥大 (1996) カラフトヒゲナガカミキリの個体群動態とニセマツノザイセンチュウの伝播に関する研究：冷涼な地域におけるマツ材線虫病激害化の阻害過程. 博士請求論文
- 梶原敏宏 (2016) 普通作物病害図説. 養賢堂. 東京. 255 pp.
- 角田鷹次郎 (1915) 稲の黒糲病に就て. 病虫害雑誌. 2, 214-218.
- 加藤照孝・伊藤 博・宮城耕治 (1966) 種子の貯蔵と輸送. 日本生物環境調節研究会報. 4(1), 1-5.
- 上林 讓・天野 隆・中西 勇 (1974) 黒点米に関する研究 (第4報) 組織観察. 愛知県農業総合試験場研究報告. (A) 6, 77-82.
- 小林義明・杉山朝一 (1977) 田植機栽培におけるイネシンガレセンチュウの増殖と伝播. *Nematological Research (Japanese Journal of Nematology)* 7, 74-77.
- 甲元眞之 (2001) 中国新石器時代の生業と文化. 中国書店. 福岡. 401 pp.
- Kononova, N. E. and Vinnichuk, R. I. (1959) Studies for the control of infested with *Aphelenchoides oryzae* Yokoo. *Trudy gel'mint. Lab.*, 9, 130-132. (Dn Russian.)
- Kostyuk, N. A. (1967) "The study of anabiosis in some phytohelminths." In: Zuckerman, B. M., Brzeski, M. W. & Deubert, K. H. (Editors), "English translation of selected East European papers in nematology." East Wareham, Massachusetts: University of Massachusetts, pp. 7-10.
- Kondo, E., and N. Ishibashi. (1986) Nictating Behavior and Infectivity of Entomogenous Nematodes, *Steinernema* spp., to the Larvae of Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae), on the Soil Surface. *Applied Entomology and Zoology*. 21 (4), 553-560.
- 久野英二 (1968) 水田における稲ウンカ・ヨコバイ類個体群の動態に関する研究. 九州農業試験場彙報. 14 (2) , 131-246.
- Kuno, K. (1976) Multi-stage sampling for population estimation. *Researches on Population Ecology*. 18, 39-56.
- Liebholt & Tobin (2008) Population Ecology of Insect Invasions and Their Management. *Annual Review of Entomology*. 53, 387-408.
- Lloyd, M. (1967). 'Mean crowding'. *Journal of Animal Ecology*. 36, 1-30.
- 水久保隆之 (2006) 線虫の見分け方. 日本植物防疫協会. 東京. 99 pp.
- Moore, J. (1993). Parasites and the behaviour of bitingies. *Journal of Parasitology*. 79, 1-16.
- Morand, S., Pointer, J. P., Borel, G. & Theron, A. (1993) Pairing probability of schistosomes related to their distribution among the host population. *Ecology*. 74, 2444-2449.
- 盛永俊太郎・田尻龍彦 (1941) 多粒稻の遺傳と一般粃の護芽機構. 遺伝学雑誌. 17, 57-62.
- Morisita, M. (1959) Measuring of the dispersion of individuals and analysis of the distributional patterns. *Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. E (Biol.)* 2, 215-235.
- 村山 登・吉田よし子・長谷川周一・末永一博 (1986) 稲作科学の基礎. 株式会社博友社. 東京. 316 pp.
- 中野勝喜 (1916) 粟不稔病 (一名紫穂病) に就いて (1). 病虫害雑誌. 3, 33-36.
- 長戸一雄 (1940) 水稻の葉面積制限が粃の生成に及ぼす影響. 日本作物学会紀事. 12, 79-89.
- Nagato, K. and F. M. Chaudhry (1969) A comparative study of ripening press and kernel development in japonica and indica rice. *Japanese Journal of Crop Science*. 38, 425-433.

- Nandakumar, C., J. S. Prasad, Y. S. Rao, and J. Rao. (1975) Investigations on the white-tip nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942) of rice (*Oriza sativa* L.). *Indian Journal of Nematology*. 5, 62-69.
- 西澤正洋・山本 滋 (1951) 稲線虫心枯病に対する抵抗性品種に関する研究 第3報 本病における被害検定. 九州農業試験場彙報. 1 (1), 65-66.
- 西澤正洋 (1953) 稲線虫心枯病に対する抵抗性品種に関する研究 (第6報). 九州農業試験場彙報. 1 (3), 339-349.
- 西澤正洋・山本 滋・水田隼人 (1953) 稲線虫心枯病に対する抵抗性品種に関する研究 (第7報). 九州農業試験場彙報. 2 (1), 71-80.
- Ou, S. H. (1985) *Rice disease*. Second Edition. C·A·B International UK. 380 pp.
- Oka, H. I. (1988) *Origin of Cultivated Rice*. Elsevier, Amsterdam, 254 pp.
- Poulin, R. (1998). *Evolutionary ecology of parasites*. London, UK, Chapman & Hall, 212 pp.
- Rajan and Lal, A. (2006). Extraction techniques of the whitetip nematode *Aphelenchoides besseyi* from paddy seeds in regulatory samples. *Nematropica*. 36, 1-6.
- San Martino, S., Singer, J. M. and Stanek III, E. J. (2008). Performance of balanced two-stage empirical predictors of realized cluster latent values from finite populations: a simulation study. *Computational Statistics and Data Analysis*. 52, 2199-2217.
- 佐田本亘 (1928) 稲種子塩水選種法の効果に就きて. 日本作物学会記事 2, 24-27.
- Sato, Y. I., S. X. Tang, L. U. Young and L. H. Tang (1991) Wild-rice seeds found in an oldest rice remain. *Rice Genet. Newslett.* 8, 76-78.
- 清野義人・鈴木芳人 (1996) 異なる発育段階のセジロウンカ卵に対する安息香酸ベンジルの殺卵活性. 九州病害虫研究会報告. 42, 67-68.
- Shigesada, N. and K. Kawasaki (1997) *Biological Invasions : Theory and Practice*. Oxford University Press, Oxford. 205 pp.
- Simberloff, D. (2009) The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 40, 81-102.
- Sivakumar, C. V. (1987) Disinfestation of white-tip nematode in rice seeds. *Indian Journal of Nematology*. 17, 148-149.
- Sudakova, M. I. and Stoyakov, A. V. (1967) [Reproduction and duration of life of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942.] *Zool. Zh.* 46, 1079-1099 (in Russian).
- 高橋成人 (1955) 水稻種子の発芽遅速の品種間差異について. 東北大学農学研究所彙報. 7, 1-12.
- 田村市太郎・気賀沢和夫 (1957) スイトウセンチュウの生態に関する研究 第1報 籾内センチュウの游出と温度の関係. 日本生態学会誌. 7, 111-114.
- 田村市太郎・気賀沢和夫 (1958) スイトウセンチュウの生態に関する研究 第2報 幼苗にたいする游出センチュウの加害の加害能力と株間移動寄主. 日本生態学会誌. 8, 37-42.
- 田村市太郎・気賀沢和夫 (1959) スイトウセンチュウの生態に関する研究 第5報 罹害イネの生育並びに収量解析試験. 日本生態学会誌. 9 (3), 120-124.

- Taylor, C. M. and Hastings, A (2005) Allee effects in biological invasions. *Ecological letter* 8 (8), 895–908
- Tikhonova, L. V. (1966) [*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Nematoda, r" Aphelenchoididae) on rice and method of control.] *Zool. Zh.*, 45 (12), 1759-1766. [In Russian: English summary].
- Todd, E. H., and Atkins, J. G. (1958) White-tip disease of rice. I. Symptoms, laboratory culture of nematodes, and pathogenicity tests. *Phytopathology*. 48, 632-637.
- 富樫一巳 (1989) マツノマダラカミキリの個体群動態とマツ材線虫病の伝播に関する研究. 石川県農業試験場報告. 20, 1-142.
- Togashi, K. and Hoshino, S. (2001) Distribution pattern and mortality of the white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae), among rice seeds. *Nematology*. 3, 17-24.
- Togashi, K. and Hoshino, S. (2003) Trade-off between dispersal and reproduction of a seed-borne nematode, *Aphelenchoides besseyi*, parasitic on rice plants. *Nematology*. 5, 821-829.
- Togashi, K. and Hoshino, S. (2010) Assessment of a three-stage sampling strategy to investigate the spatial distribution and population density of *Aphelenchoides besseyi* among *Oryza sativa* seeds. *Nematology*. 12, 373-380.
- Triantaphyllou, A. C. (1973) Environmental Sex Differentiation of Nematodes in Relation to Pest Management. *Annual review of Phytopatology*. 11, 441-462.
- Vuong, H. H. and Rudriguez, H. (1970) Lutte contre les nématodes du riz à Madagascar (résultats d'expérimentation 1968-1969). *L'Agronomie Tropicale. Série 1, Riz et Riziculture et Cultures Vivrières Tropicales*. 25 (1), 52-66.
- Vuong, H. H. (1969) The occurrence in Madagascar of the rice nematodes, *Aphelenchoides besseyi* and *Ditylenchus angustus*. In: Peachey JE, ed. *Nematodes of Tropical Crops*. Technical Communication No. 40. St Albans, UK: Commonwealth Bureau of Helminthology. 274-288.
- 渡邊朋也 (1994) 長距離移動性イネウシカ類の発生動態および水稲被害の解析. 学位請求論文.
- Wang, J., Gao, G., Fan, Y., Chen, L., Liu, S., Jin, Y. & Yu, J. (2006). The estimation of sample size in multistage sampling and its application in medical survey. *Applied Mathematics and Computation*. 178, 239-249.
- Yamamura, K. (1989) Effect of aggregation on the reproductive rate of population. *Res. Popul. Ecol.*, 31, 161-168.
- 山村光司 (1993) 多重比較法とその選び方-3-ノンパラメトリック検定で用いる多重比較法 (植物防疫基礎講座). *植物防疫*. 47, 463-467.
- 山内 稔 (2004) イネ種子の鉄コーティング方法と湛水直播栽培. *日本作物學會紀事*. 73(Extra Issue 1), 10-11.
- 山内 稔 (2005) 鉄コーティング種子を用いた水稲の湛水表面播種. *近畿中国四国地域における新技術*. 4, 47-49.
- Yano, E. (1983) Spatial distribution of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) and a suggested sampling plan for estimating its density in greenhouses. *Researches on Population Ecology*. 25, 309-320.
- 横尾多美男 (1948) 稲の心枯線虫 (*Aphelenchoides oryzae* YOKOO n. sp.) に就いて. *日本植物病理学会*

- 報告. 13(1-2), 40-43.
- 吉井 甫 (1946) 稲線虫心枯病に関する報告. 九大農農林省委託研究試験成績概要 (昭和 20 年度). 26, 23-26.
- Yoshii, H., and S. Yamamoto (1950a) A rice nematode disease “Senchu Shingare Byo.” I. Symptoms and pathogenic nematode. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 9, 209-222.
- Yoshii, H., and S. Yamamoto (1950b) A rice nematode disease “Senchu Shingare Byo.” II. Hibernation of *Aphelenchoides oryzae*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 9, 223-233.
- 吉井 甫 (1951) 稲心枯線虫病の生態と防除. 農業および園芸. 26 (1), 23-26.
- 吉井 甫 (1965) イネ心枯線虫病. 日本植物病理学会報告. 31, 254-260.
- 吉永悟志・西田瑞彦・脇本賢三・田坂幸平・松島憲一・富樫辰志・下坪訓次 (2000) 湛水直播栽培における播種後の水管理が施肥窒素の動態および水稻の生育・収量に及ぼす影響. 日本作物学会紀事. 69, 481-486.
- 全国米麦改良協会 (2008) 米麦の種子更新率調査の概要について. 米麦改良 7, 22-26.
- Zera, A. J. and R. F. Denno (1997) Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annual Review of Entomology*. 42, 207-230.

広島県立総合技術研究所農業技術センター研究報告 第97号

令和5年9月 発行

編 集 広島県立総合技術研究所農業技術センター
発 行
〒 739-0151 広島県東広島市八本松原 6869
Tel (082) 429-0522

BULLETIN
OF
THE HIROSHIMA PREFECTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH CENTER
No. 97

CONTENTS

Research on population dynamics and control of the White-Tip Nematode
Aphelenchoides besseyi (Nematoda: Aphelenchoididae)

Shigeru HOSHINO

Hiroshima Prefectural Technology Research Institute
Agricultural Technology Research Center
(Higashihiroshima, Hiroshima Prefecture, 739-0151 Japan)
September, 2023