

リアルタイム PCR を用いた土壌からの 各種植物寄生性線虫の直接定量

東京農工大学 ^{とよだ}豊田 ^{こうき}剛己・^{さとう}佐藤 ^{えりか}恵利華*・^{ゆー ゆー みん}Yu Yu Min・^{ごとう}後藤 ^{けいた}圭太

はじめに

ダイコン、サツマイモ、マメ類、ジャガイモ、トマト、キュウリ、イチゴ、レンコン、ニンニク等非常に多くの作物で線虫による被害が見られている。我が国では、線虫被害を防ぐために多くの圃場で殺線虫剤が使われる。殺線虫剤の使用は現代の作物生産に欠かせない場面が多いのは事実であるが、一部の圃場では防除の可否を問わず、保険的に使用されている可能性がある。無駄な殺線虫剤の使用を回避するため、殺線虫剤が必要とされる圃場を特定しようと線虫診断に関する研究が行われてきた。ダイコンの場合、要防除水準は 20 g 土壌当たり 4 頭と報告されている (大林, 1989)。ところが、これらのダイコンに関する研究例では、キタネグサレセンチュウが全く検出されなくてもダイコンに線虫被害が見られるケースが少なからずある。線虫診断が必ずしも広く普及していない主要な原因にはこうした問題点があると考えられる。

筆者らは、キタネグサレセンチュウが全く検出されなくてもダイコンに線虫被害が見られる原因はサンプリングする土壌の深度にある、と仮説を立てた。そこで、従来の線虫診断で行われる表層土 (0 ~ 15 cm あるいは 0 ~ 20 cm) のみのサンプリングではなく、表層土 (0 ~ 30 cm) と下層土 (30 ~ 60 cm) の両方から土壌を採取しキタネグサレセンチュウ密度を測ることでこの問題点を克服できるのではないかと研究を進めた。2007 ~ 08 年度に行った調査によると、表層土では検出されなくても下層土でキタネグサレセンチュウが検出された圃場がいくつも見られ、それらの圃場の一部では実際に線虫被害が確認された。一方、表層土と下層土のいずれにおいてもキタネグサレセンチュウが検出されなかった圃場では線虫被害が見られなかった。したがって、線虫診断の不正確さの一つの要因はサンプリング深度にあると

いう仮説が検証され、線虫診断には表層土だけでなく下層土からも土壌を採取する重要性が確認された (Sato et al., 2009)。ところが、2009 年度に行った調査では、表層土と下層土でキタネグサレセンチュウが検出されなかったにもかかわらずダイコンに線虫被害が見られた圃場が複数確認された (Sato et al., 投稿中)。この結果は、土壌中にはベルマン法では抽出されない線虫が存在することを示唆すると考えた。具体的には、キタネグサレセンチュウが卵の形態で存在しているためベルマン法では抽出されないが、ダイコンの栽培に伴いふ化して侵入し、被害を引き起こすというシナリオを想定した。ネグサレセンチュウの卵の多くは通常のベルマン法による抽出期間 (2 ~ 3 日) では分離されない (PUDASAINI et al., 2008) ことが知られるからである。さらには、ネコブセンチュウの例ではあるが、ベルマン法では抽出されない休眠体の存在が知られるため (OKA and MIZUKUBO, 2009)、ベルマン法に基づいた線虫計数では正確な線虫診断は困難である可能性が十分に想定される。そのため、ベルマン法やふるいわけ法といった線虫抽出法を伴わない土壌からの植物寄生性線虫の直接定量法の開発に取り組んできた。本稿では、直接定量法の開発の流れと今後の展望を紹介する。

I リアルタイム PCR プライマーの設計

表-1 に示すように 5 種類の線虫に対するリアルタイム PCR をこれまでに設計した。これらのプライマーはすべて ITS1 の領域内の種特異的な部位を見つけて設計したが、種特異的なプライマーはキタネグサレセンチュウのみである。他のプライマーは対象とする種以外も同一の効率で増幅してしまうため、厳密な種の特定には前作や形態的な特徴等との組合せが必要となる。ただし、ジャガイモシストセンチュウ特異プライマーの場合、日本では報告例のないジャガイモシロシストセンチュウと識別できないため、かなり高い確率で、本プライマーで増幅されるのはジャガイモシストセンチュウと考えられる。また、ダイズシストセンチュウ特異プライマーはテンサイシストセンチュウも同一の効率で増幅するが、前作までの作付け体系から、どちらのシストセンチュウであるのかはある程度推定できると考えられる。ネモグリ

Direct Quantification of Plant-Parasitic Nematodes in Soil using Real-Time PCR. By Koki TOYOTA, Erika SATO, Yu Yu MIN and Keita GOTO

(キーワード: キタネグサレセンチュウ, サツマイモネコブセンチュウ, ダイズシストセンチュウ, ジャガイモシストセンチュウ, 要防除水準)

* 現所属: 近畿中国四国農業研究センター

表-1 我が国の主要な植物寄生性線虫とリアルタイム PCR用プライマーの設計状況

対象線虫	プライマー*の有無	土壌からの直接検出
キタネグサレセンチュウ <i>Pratylenchus penetrans</i>	SATO et al., 2007	SATO et al., 2010
サツマイモネコブセンチュウ <i>Meloidogyne incognita</i>	TOYOTA et al., 2008 *	MIN et al., 2011
ジャガイモシストセンチュウ <i>Globodera rostochiensis</i>	TOYOTA et al., 2008 **	GOTO et al., submitted
ダイズシストセンチュウ <i>Heterodera glycines</i>	GOTO et al., 2009 ***	GOTO et al., 2009
ネモグリセンチュウ <i>Hirschmanniella</i> spp.	投稿予定	投稿予定

* *M. incognita* だけでなく *M. arenaria*, *M. javanica* も同一の効率で検出.

** 日本では報告例がないが *G. pallida* も同一の効率で検出.

*** *H. schachtii* も同一の効率で検出.

センチュウにおいては、イマムラネモグリセンチュウ (*Hirschmanniella imamuri*) とレンコンネモグリセンチュウ (*H. diversa*) の2種がレンコンを加害するが、本プライマーは両種に共通する配列部分に設計されており、両種を同一の効率で検出できる。そのため、レンコンを加害するネモグリセンチュウ全体の評価には適しているが、種の特定はこのプライマーではできない。

II 土壌の前処理法の開発

土壌からDNAを抽出するキット (UltraClean™ soil DNA kit (MO BIO Laboratories), Fast DNA SPIN Kit for soil (Q-BIOgene)) では通常 0.5 g 程度を用いる。これはバクテリアやカビを対象にしているため、土壌中における線虫の密度および不均一性を考慮すると、この土壌量は少なすぎる (DONN et al., 2008)。ベルマン法では 20 g, 3 連から線虫を抽出することが一般的なもので、最低でも 20 g から DNA を抽出することが必要と考えられる。20 g の土壌から DNA を抽出することは不可能ではなく、そうした報告例もあるが、実験器具や機器、廃液等を考慮すると、少ない量の土壌から DNA を抽出するほうがよい。そこで、我々は 100 cc の円筒コアに土壌を入れ特製の器具で土壌を締固めることで、土壌中に存在する幼虫や成虫、卵といったすべての形態の線虫を物理的に破壊し、処理後の土壌を適量の水を加えてブレンダーにより均一にし、得られたスラリー状の土壌 0.5 g から DNA を抽出するという方法を提案した (Goto et al., 2009)。これには 5 万円程度の特製器具と汎用性の高いブレンダーがあればよい簡便性が高いが、締固めという操作には物理的な力が必要で、誰でもできるという一般性には欠くという欠点があった。そこで、線虫細胞を壊すという目的の下、考えたのがボールミルであった。これは粗い土壌粒子を微粉砕する道具なので、それにより線虫細胞も粉砕できるのではないかと想定した。ちょうど同時期に BRIERLEY らがボールミルで

土壌を粉砕すると、いろいろな土壌で病原性糸状菌の DNA を効率よく検出できるということを報告した (BRIERLEY et al., 2009) ので、これは線虫にも適用できると確信した。土壌 20 g に様々なレベルでジャガイモシストセンチュウを添加して、ボールミルで微粉砕し、土壌 0.5 g を取って DNA を抽出しリアルタイム PCR を行ったところ、締固め法と同程度で標的線虫を検出できた。また、締固め法よりも効率的に検出できる土壌もあった (Goto et al., 投稿中)。ボールミルは高価ではあるが、土壌分析を行う実験室では現有していることもある。ボールミルがある場合にはこれにより土壌を線虫細胞ごと微粉砕する、ボールミルがない場合には特製の圧密器具を用いて線虫細胞を破壊し、次いで、土壌を均一にするためブレンダーでスラリー化する、これらのどちらかが、土壌から線虫を直接検出するための土壌の前処理法として有効であるとの結論に至った (Goto et al., 投稿中)。

III 土壌からの DNA 抽出法の改良

筆者らの研究室では線虫溶液や土壌から DNA を抽出してそれを鋳型に PCR-DGGE を行い、群集構造について評価してきた。これらのサンプルのうち、ネグサレセンチュウが確実に含まれるサンプルを選別し、リアルタイム PCR を行ったところ、多くのサンプルで未検出となった。また、検出される場合でも反復間のバラツキが非常に大きかった。これらの結果から、定量を行うリアルタイム PCR は通常の PCR と比べて精製度が高い、もしくは精製度が一定の DNA を要求することが明確となった。言うまでもなく、環境サンプルを対象としたリアルタイム PCR では DNA とともに抽出される阻害物質が制限要因となることが知られる (SCHNEIDER et al., 2009)。そこで、DNA 抽出および精製法について様々な検討を行った。まず土壌から DNA を抽出する際、DNA の土壌粒子への吸着を阻害するために、スキムミルクを

表-2 土壌から直接植物寄生性線虫を検出・定量した研究例における検出感度

線虫の種類	土壌の種類	検出感度 (頭/20g)	文献	結論
<i>Phasmahabditis hermaphrodita</i> (ナメクジ寄生性線虫)	砂壤土, 埴壌土, 壤質砂土	20 ~ 30	McMILLAN et al., 2006	土壌からの直接検出は方法上問題あり
サツマイモネコブセンチュウ	黒ボク土	100	岩堀, 2008	検出感度の改善が必須
ダイズシストセンチュウ	黒ボク土	10 ~ 50	GOTO et al., 2009	低密度での定量性に難あり
サツマイモネコブセンチュウ	砂土	5	MIN et al., 2011	5頭以上の密度であれば検出可
キタネグサレセンチュウ	黒ボク土	25	SATO et al., 2010	低密度での定量が困難
キタネグサレセンチュウ	灰色低地土	10	SATO et al., 2010	低密度での定量が困難
キタネグサレセンチュウ	黒ボク土	4	SATO et al., 投稿中	4頭以上の密度であれば検出可
ジャガイモシストセンチュウ	黒ボク土	5	GOTO et al., 投稿中	5頭以上の密度であれば検出可

加える (HOSHINO and MATSUMOTO, 2004) が, さらに RNA (IKEDA et al., 2008) やサケ DNA との組合せによる効果を検討した。また, DNA 抽出時の EDTA 濃度 (KRSEK and WELLINGTON, 1999), バッファの組成 (Tris-HCl あるいはリン酸バッファ), DNA を沈殿させるときの溶液 (エタノール, イソプロパノール, ポリエチレングリコール) (KRSEK and WELLINGTON, 1999) についても検討を加えた。また, 得られた DNA 粗抽出液についてはさらなる精製を各種カラムにより行った。さらには, PCR 反応時に BSA の添加の効果 (CHO et al., 1996) も検討した。以上の検討を基に, 黒ボク土と砂土のそれぞれのタイプの土壌に適した DNA 抽出法を確立することができた (SATO et al., 投稿中; 未発表)。研究開始当初は, 土壌 20 g 当たりの検出感度が数十頭であったが, 上記の検討を加えることで 4 ~ 5 頭まで検出できるようになった (表-2)。ただし, 20 g 土壌当たり 1 ~ 2 頭レベルはどうしても検出できず, また, 検出できた場合でも反復間で値がばらついてしまい, このレベルでの検出においてはさらなる検討が必要である。

IV サツマイモにおける線虫診断例

徳島県の砂土地帯に広がるサツマイモ栽培地帯では, 1 ~ 2 月に粒剤あるいは燻蒸剤による殺線虫処理を行った後, 3 ~ 4 月にクロルピクリンによる畝内消毒を行い, サツマイモを定植し, 7 ~ 10 月ごろに収穫するという作付けを行っている。本栽培地帯における最大の脅威は *Streptomyces ipomeae* によるサツマイモ立枯病で, 立枯病防除を目的に全圃場でクロルピクリン消毒が行われる。サツマイモネコブセンチュウによる品質低下も脅威の一つのため殺線虫剤処理が多く圃場で実施されているが, クロルピクリン消毒には殺線虫効果も期待できるため, 殺線虫剤処理を場合によっては省くことができるのではないかと期待する声が聞かれる。そこで, 当該地

帯においてサツマイモ定植時のネコブセンチュウ密度と収穫時の線虫被害との関係を明らかにし, 殺線虫剤を使用しなくて済む信頼性の高い要防除水準を設定することを目的に研究を進めている。

2009 年度の調査では, クロルピクリン消毒後の作付け時土壌では, 表層 0 ~ 30 cm, 下層 30 ~ 60 cm のいずれにおいてもベルマン法では全くネコブセンチュウが検出されなかった。ベルマン法による抽出期間は通常 2 日間であるが, 念のため 7 日間に延ばしてみたが結果は同じであった。このころは土壌からの直接定量法がまだ完全ではなかったため, ベルマン法に用いた土壌の一部は後日の分析のために冷凍庫内で保管した。2009 年夏に土壌を採取した場所 (1.5 m × 1.5 m の枠内) から収穫されたサツマイモの線虫被害を調査したところ, ベルマン法の結果からは予期されない, 側根にネコブセンチュウによる典型的な病徴であるゴールが複数の圃場で見られ, 1 圃場のみではあるが主根にも線虫被害が見られた。その後, DNA 抽出法を確立できたので, リアルタイム PCR によりネコブセンチュウ密度を測定したところ, 被害が少ない圃場では線虫密度が低く, 被害の甚大であった圃場では高いという結果が得られた (MIN et al., 2011)。圃場数は少ないが, 20 g 土壌に 100 頭以下の圃場では線虫被害が軽微である (被害はすべて側根にのみ見られ, 主根の商品価値は全く損なわれないレベル) と診断できる可能性を示すことができた (図-1)。以上の結果は, クロルピクリン消毒により大半の圃場でネコブセンチュウは死滅するが, 一部ゼリー状の物質で覆われた卵が生存しており, これらはベルマン法では検出されないが, リアルタイム PCR 法で検出でき, これらが感染源となると考えられた。ネコブセンチュウの一部は土壌中では休眠体の状態で生存し, ベルマン法では抽出されないことが知られるため, 本方法はネコブセンチュウの診断に極めて有効であると考えられた。

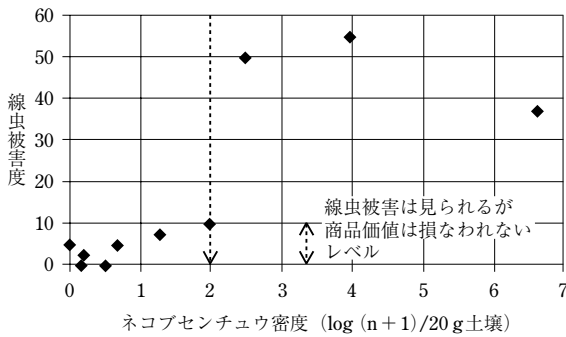


図-1 徳島県のサツマイモ栽培地帯における作付け時のリアルタイム PCR 法で求めたネコブセンチュウ密度と線虫被害との関係

10 個体のサツマイモの線虫被害度の平均値 (0:すべての個体が健全, 100:すべての個体が主根にまで被害). Min et al., 2011 を基に作図.

ただし、問題点もあり、初期密度と被害度との間の相関関係は決して高くなく、初期密度以外にも線虫被害に影響を及ぼす要因があることが示唆される。また、燻蒸後の土壌を用いているため、燻蒸により死滅した線虫細胞に含まれる DNA を検出してしまった可能性も否定できない。定植時のネコブセンチュウ密度と収穫時の線虫被害との関係をより明らかにするため、2010 年度もこの調査を継続中である。

V ダイコンにおける線虫診断例

2006 年度より主に神奈川県三浦半島内のダイコン生産者圃場について、カタネグサレセンチュウ密度と線虫被害度との関係について調査を行っている。2008 年度まではベルマン法によってしか線虫密度を測定できなかったが、09 年度以降は東京都内のダイコン生産者圃場も加えて、ベルマン法とリアルタイム PCR 法の二つの手法を用いてカタネグサレセンチュウ密度を比較している。結果は予想に反し、カタネグサレセンチュウ密度に両者の間で全く相関はなかった。個別の事例を見てみると、ベルマン法で検出されない場合でもリアルタイム PCR 法では検出されない例が多く見つかる一方、リアルタイム PCR 法では検出されず、ベルマン法でのみ検出される例も若干であるがあった。ベルマン法では 20 g の 3 連でトータル 60 g の土壌から線虫を抽出するが、DNA 抽出は 0.5 g の 3 連でわずか 1.5 g である。締固めとブレンダーにより 60 g の土壌を均一にして DNA 抽出に供試しているが、それでも完全には均一になっていない場合があると考えられ、リアルタイム PCR 法においても土壌の前処理、DNA 抽出など検討の余地がま

だまだある。そうは言ってもベルマン法で検出されないにもかかわらず、リアルタイム PCR 法では検出される例が多数認められたことは、本方法が線虫診断において強力な武器になる可能性を示唆する。ベルマン法では検出されず、リアルタイム PCR 法で 12.1 頭/20 g 検出された圃場では、実際にダイコンに 1 本当たり 50 個を超える病斑が見られた。これは、土壌中でベルマン法では抽出されない形態、おそらく卵もしくは活性が低い状態で存在していたカタネグサレセンチュウがダイコンに被害を及ぼしたことを意味し、こうした状態のカタネグサレセンチュウも検出できるという点がリアルタイム PCR 法の最大のメリットと言える。

リアルタイム PCR 法の欠点として、DNA 抽出に際して阻害物質がなんらかの理由で混入し、それが PCR 反応を阻害することで目的 DNA 量を過少評価してしまう危険性がある。特に対象とする線虫が低密度の場合、本当に低密度なのか、単に DNA 抽出がうまくいかなかっただけなのか、明確に区別されなければならない。この点を克服するために、土壌から DNA を抽出する際に、ジャガイモシストセンチュウの DNA 断片を既知量添加することにした。この線虫は北海道、青森、長崎等の限られた地域にしか生息していない (植原ら, 2005)。事実、神奈川県や東京都から採取した土壌から抽出した DNA を鋳型に、ジャガイモシストセンチュウ特異プライマーで DNA 増幅を試みても全く検出されなかった。したがって、人工的に添加したジャガイモシストセンチュウの DNA 断片の回収率から DNA 抽出効率を判断することが可能であり、目的線虫の定量の精度を向上できたと考えている。

もう一つの問題点は、検出された DNA が生きた線虫あるいは死んだ線虫のどちらに由来するのかが厳密にはわからない点である。これについては、熱湯で死滅させた線虫を土壌に添加し、一定期間培養してから DNA を抽出しリアルタイム PCR を行ったところ、添加 4 日後には 99% 以上の DNA が消失していることがわかったため (Min et al., 2011)、リアルタイム PCR で検出される DNA は大部分が生きた線虫に由来すると考えている。

さらに問題点を挙げるとすると個体数の意味である。リアルタイム PCR で得られる Ct 値から個体数に変換するには、あらかじめ求めた検量線を用いる。この検量線は、既知数の線虫 (カタネグサレセンチュウとサツマイモネコブセンチュウでは二期幼虫, シストセンチュウでは卵) を加えた土壌から DNA を抽出して得られた Ct 値と添加した線虫数の関係から得られたものである。線虫は、二期幼虫, 三期幼虫, 四期幼虫, 成虫とステージ

表-3 線虫による被害が深刻な作物における要防除水準

作物	線虫の種類	要防除水準 (頭数/20 g)	文献	宿主への影響
ダイコン	キタネグサレセンチュウ	4	大林, 1989	病斑による品質低下
		2.5	Sato et al., 2009	
		0.8	Sato et al., 投稿中	
		4.6 (PCR法)	Sato et al., 投稿中	
ダイコン	サツマイモネコブセンチュウ	2.5	未発表	奇根による品質低下
ゴボウ	キタネグサレセンチュウ	4	山田, 1992	根腐れによる収量減少
ニンジン	キタネグサレセンチュウ	3.6	萩谷, 1992	寸づまりによる減収
ニンジン	キタネコブセンチュウ	1.6	山田, 1982	減収と品質低下
ニンジン	サツマイモネコブセンチュウ	20	佐野, 1988	異常根の発生
トマト	サツマイモネコブセンチュウ	1.6	道南農試, 1994	50%減収
キュウリ	サツマイモネコブセンチュウ	1.6	道南農試, 1994	50%減収
ジャガイモ	シストセンチュウ	220 (卵)	山田, 1992	10 ~ 50%減収
ダイズ	シストセンチュウ	136 (卵)	相場・一戸, 1992	5%減収の被害許容レベル
イチゴ	クルミネグサレセンチュウ	10	脇部, 1992	萎縮による減収

を重ねるたびに1頭の線虫個体が大きくなるので、それにつれてDNA量も多くなる。土壌中に卵から成虫までの様々なステージで存在するキタネグサレセンチュウの例では、1頭の成虫は約4頭の二期幼虫に相当した(Sato et al., 2007)。本記事で示すリアルタイムPCR法により推定される線虫の個体数はすべて二期幼虫換算値であるため、土壌中の主要な存在形態が二期幼虫ではなく成虫の場合、実際の個体数は推定値よりも少なくなる。

VI 今後の展望

植物寄生性線虫がベルマン法では検出されず、リアルタイムPCR法では検出される土壌が数多く見つかる一方、ベルマン法で検出されたにもかかわらずリアルタイムPCR法では検出されないケースがあるのも事実である。ベルマン法では20g、3反復で60gの土壌から線虫を分離するのに対し、リアルタイムPCR法ではボールミルあるいは締固めにより20g土壌をできる限り均一にしようとはするが、実際にDNAを抽出する土壌は0.5g程度である。筆者らの研究室が有するボールミルは一度に20gしか処理できないが、100gを一度に粉碎できる機器もあることから、より多くの土壌を均一化して、より多くの土壌からDNAを抽出することでリアルタイムPCR法の測定精度を上げることは理論上可能だが、その分余計に必要となるコストを考慮する必要がある。

ダイコン、サツマイモにおいて線虫被害の生じない要防除水準を、リアルタイムPCR法により求めた作付け時のキタネグサレセンチュウあるいはネコブセンチュウ密度に基づいて設定できることを紹介したが、高密度で植物寄生性線虫が生息しているにもかかわらず線虫被害

の生じない、線虫抑止型土壌の存在も同時に明らかになってきた。現時点ではそれらのメカニズム解析にまでは至っていないが、今後ぜひ研究していきたいテーマである。

現在、エダマメのダイズシストセンチュウ被害、レンコンのネモグリセンチュウ被害に対して要防除水準を設定しようと研究を進めている。さらには、ジャガイモのシストセンチュウ被害やキュウリのネコブセンチュウ被害、ニンニクのイモグサレセンチュウ被害についても要防除水準を設定したいと考えている。要防除水準に関するこれまでの研究はそれほど多くはなく(表-3)、またそれらはすべてベルマン法に基づいた調査結果である。したがって、休眠状態の線虫、卵やシストも一括して定量できる本リアルタイムPCR法を用いて新たに要防除水準を設定し直す必要があると考える。

病害虫防除の主流はIPMであり、そのためには、土壌にどれだけの線虫が生息していると作物に被害が出るのか、についての情報が必須である。ベルマン法に基づく線虫密度測定にはいくつかの問題があり線虫診断が広く普及するに至っていないが、本リアルタイムPCR法はベルマン法を補完する基礎技術になると思われる。多くの作物-線虫の組合せで要防除水準が明らかにされれば、適切な殺線虫剤使用に大いに貢献すると確信し、研究を進めている。

おわりに

本誌2008年11月号において、「リアルタイムPCRによる植物寄生性線虫定量法の確立」と題して、ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ、シストセンチュウに対するリアルタイムPCRを用いた定量法について報告し

た。このときはベルマン法などで土壤からあらかじめ抽出した線虫溶液を対象としていたが、その後、土壤から抽出したDNAを鋳型に用いる実験系の開発を行った。その結果、土壤の前処理法、土壤からのDNA抽出法に検討を重ねることでキタネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウ、ジャガイモシストセンチュウ、ダイズシストセンチュウを土壤20g当たり5頭程度まで定量することが可能となった。この方法を実際の生産者圃場に適用すると、ベルマン法では植物寄生性線虫が全く抽出されない土壤であっても、リアルタイムPCR法を用いると植物寄生性線虫が検出される土壤がいくつも見つかった。一部のそうした圃場では実際に線虫による被害が見られたことより、線虫被害の予測診断に本リアルタイムPCR法が有効な手法となる可能性が見いだされた。

引用文献

- 1) 相場 聡・一戸 稔 (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会, つくば, p. 125 ~ 128.
- 2) BRIERLEY, J. L. et al. (2009): *Appl. Soil Ecol.* **41**: 234 ~ 238.
- 3) CHO, J. C. et al. (1996): *J. Microbiol.* **34**: 229 ~ 235.
- 4) DONN, S. et al. (2008): *Appl. Soil Ecol.* **38**: 20 ~ 26.
- 5) GOTO, K. et al. (2009): *Nematol. Res.* **39**: 1 ~ 7.
- 6) ——— et al.: submitted.
- 7) 萩谷俊一 (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会, つくば, p. 306 ~ 309.
- 8) 北海道道南農試 (1994): 北海道立農業試験場試験研究成果一覽.
- 9) HOSHINO, T. Y. and N. MATSUMOTO (2004): *Microbes Environ.* **19**: 13 ~ 19.
- 10) IKEDA, S. et al. (2008): *Microbes Environ.* **23**: 159 ~ 166.
- 11) 岩堀英晶 (2008): 植物防疫 **62**: 576 ~ 580.
- 12) KRSEK, M. and E. M. H. WELLINGTON (1999): *J. Microbiol. Methods* **39**: 1 ~ 16.
- 13) MACMILLAN, K. et al. (2006): *Int. J. Parasitol.* **36**: 1453 ~ 1461.
- 14) MIN, Y. Y. et al. (2011): *Nematology*, in press.
- 15) 大林延夫 (1989): 神奈川園誌研報 **39**: 1 ~ 90.
- 16) OKA, Y. and T. MIZUKUBO (2009): *Nematology* **11**: 51 ~ 61.
- 17) PUDASAINI, M. P. et al. (2008): *Nematology* **10**: 47 ~ 54.
- 18) 佐野善一 (1988): 九病虫研究会報 **34**: 127 ~ 130.
- 19) SATO, E. et al. (2007): *Jpn. J. Nematol.* **37**: 87 ~ 92.
- 20) ——— et al. (2009): *Soil Sci. Plant Nutr.* **55**: 478 ~ 484.
- 21) ——— et al. (2010): *Nematol. Res.* **40**: 1 ~ 6.
- 22) ——— et al.: submitted.
- 23) SCHNEIDER, S. et al. (2009): *J. Microbiol. Methods* **78**: 351 ~ 353.
- 24) TOYOTA, K. et al. (2008): *Soil Sci. Plant Nutr.* **54**: 72 ~ 76.
- 25) 植原健人ら (2005): 北海道農業研究センター, 新しい研究成果—北海道地域—. <http://cryo.naro.affrc.go.jp/seika/new/h17/23.html>
- 26) 脇部秀彦 (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会, つくば, p. 155 ~ 158.
- 27) 山田栄一 (1982): 北海道立農試報 **61**: 1 ~ 98.
- 28) ——— (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会, つくば, p. 286 ~ 289.

新しく登録された農薬 (22.9.1 ~ 9.30)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、適用雑草等を記載。（登録番号：22789 ~ 22790）種類名に下線付きは新規成分。※は新規登録の内容。

「殺虫殺菌剤」

- ジノテフラン・ブプロフェジン・トリシクラズール・フルトラニル粉剤
- 22789：ワッシュヨイ粉剤 DL（日本農薬）10/09/22
- ジノテフラン：0.35%，ブプロフェジン：1.0%，トリシクラズール：0.50%，フルトラニル：2.0%
- 稲：いもち病、紋枯病、ウンカ類、ツマグロヨコバイ、カメムシ類：収穫14日前まで

「除草剤」

- イマズスルフロン・ピラクロニル・ベンゾピシクロン粒剤
- ※新製剤
- 22790：忍ジャンボ（住友化学）10/09/22
- イマズスルフロン：4.5%，ピラクロニル：10.0%，ベンゾピシクロン：10.0%
- 移植水稻：水田一年生雑草、マツバイ、ホタルイ、ヘラオモダカ（東北）、ミズガヤツリ、ウリカワ、ヒルムシロ、セリ、アオミドロ・藻類による表層はく離（北陸、近畿・中国・四国）