# 植物防疫

1987

VOL41

微生物の分類と保存

特集号



\* 適用拡大になりました

\*赤星病/黒点病/\*黒星病 斑点落葉病/\*すす点病/\*すす斑病



大内新興化学工業株式会社 〒103 東京都中央区日本橋小舟町7-4

# 土壌調査、植害テストぉょび土壌・肥料・植物などの依頼分析

〈正確・迅速〉

●土壌調査,植害テスト

開発地などの土壌調査,土壌図作成および 汚泥など産業廃棄物の植害テスト

# ●依頼分析

植栽地・緑地の土壌や客土の物理性・化学性分析 農耕地やその他土壌の物理性・化学性分析 および粘土鉱物の同定

考古学分野における遺跡土壌の化学分析 植物体の無機成分分析

●モノリス(土壌断面標本)の作成

特殊樹脂加工による永久保存標本の作成

各種肥料の分析 土壌汚染物質の分析 水質および産業廃棄物の分析

●花粉・微化石分析調査

古環境、地質時代の解明に顕著な実績をあげています

●骨材の岩石・品質鑑定(薄片作製)

# パリノ・サーヴェイ株式会社

4

社 〒103 東京都中央区日本橋室町2-1 三井中3号館 TEL 03(241)4566(∜ FAX 241-4597

地質調査業者 計量証明事業 質 60 - 982 群馬県 環 第17号

研 究 所

〒375 群馬県藤岡市岡之郷字戸崎559-3 TEL 0274(42)8129 FAX 0274-42-7950



収穫はラブ・スト

大きく育ってほしい。大きな姿で応えたい。 人と作物、ふたつの心が通いあい、ひとつになって実りに結びます。 すばらしい愛のストーリー、デュポンジャパンは技術で応援します。

# 豊かな収穫に貢献するデュポン農薬

殺菌剤---ーベンレート\*/ベンレート\*-T/ダコレート/スパグリン 殺虫剤――ランネート\*45/ホスクリン

除草剤--ロロックス\*/レナパック/ハイバー\*X/ゾーバー\*

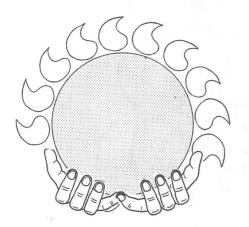
デュポン ジャパン リミテッド 農薬事業部 〒107 東京都港区赤坂I丁目II番39号 第2興和ビル

デュポン農薬のお問い合わせは…… Tel.(03)585-9101

デュポン ジャパン



# 線虫剤と伴に30年



線虫剤の トップブランド

**70** \* 92



# サンケイ化学株式会社

鹿児島・東京・大阪・福岡・宮崎

本社 鹿児島市郡元町880 TEL.0992(54)||16|(代表)・東京事業所 千代田区神田司町2-| TEL.03(294)698|(代表)



# 植物防疫

Shokubutsu bōeki (Plant Protection)

# 第 41 巻 第 5 号 昭和 62 年 5 月号 目 次

特集号:微生物の分類と保存		
農業微生物の分類と保存大畑	貫一	1
菌類の分類研究の現状と問題点椿	啓介	3
植物病原糸状菌の簡易検索法	悦次	9
植物ウイルス分類研究の現状と将来展望	比呂志1	15
土壌細菌の分類・同定法加藤	邦彦	19
放線菌の分類研究の現状と問題点	清貴2	23
植物寄生性線虫の種を巡る問題皆川	望2	29
農林水産省微生物ジーンバンクについて松本	和夫3	33
植物病原細菌・糸状菌の保存法・・・・・・土屋	行夫3	37
植物ウイルスの保存法福本	文良4	<b>1</b> 1
新しく登録された農薬 (62.3.1~3.31)	•••••	8
中央だより····································	•••••4	<del>1</del> 6
次号予告14		



# 「確かさ」で選ぶ…バイエルの農薬

●いもち病に理想の複合剤

# ヒノラフサイド

- ●いもち病の予防・治療効果が高い
- ®ヒ/ザン
- ●いもち・穂枯れ・カメムシなどに

## ®**ヒ**//ヾイジット

- ●いもち・穂枯れ・カメムシ・ウンカなどに
- 『ヒノラスバイバッサ
- ●紋枯病に効果の高い

#### 『モンセレン

- ●いもち・穂枯れ・紋枯病などに
- **『ヒノラスモンセレン**
- ●イネミズ・カメムシ・メイチュウに

## /パイジット

●イネミズゾウムシ・メイチュウに

## التناكار المراد

●イネミズ・ドロオイ・ウンカなどに

# "コンサイド

- ●イネミズ・ウンカ・ツマグロヨコバイに
- ロ・タイシストン・カンサイド

●さび病・うどんこ病に

# 『バイレトン

- ●灰色かび病に
- 『ユーパレン
- ●うどんこ病・オンシツコナジラミなどに

## 『モレスタン

●斑点落葉病・黒星病・黒斑病などに

# 『アンド・ラコール

●もち病・網もち病・炭そ病などに

#### <sup>®</sup>バイエルボルドウ (クスラビットホルテ)

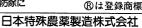
●コナガ·ヨトウ·アオムシ·ハマキムシ·スリップスに

# **『トクチオン**

- ●ミナミキイロアザミウマに
- ●各種アプラムシに

### 『アリルメート

- ●ウンカ・ヨコバイ・アプラムシ・ネダニなどに
  - タイシストン
- ●アスパラガス・馬鈴しよの雑草防除に

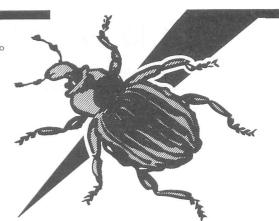


東京都中央区日本橋本町2-4 50 103





\*農薬は正しく使いましょう。



低コスト稲作に最適!

# 薬剤費が安く、 イネミズゾウムシを 経済的に防除できます。

■育苗箱施用及び床土混和に

- ●田植当日、育苗箱施用あるいは床土混和処理により越冬成虫の産卵数の減少および幼虫の防除ができます。
- ●イネミズゾウムシとニカメイチュウ、イネドロオイムシ、イネハモグリバエ、ツマグロヨコバイ等にも防除効果があります。
- ■本田の防除には

- ●パダン粒剤4の箱施用とパダンバッサ粒剤の本田施用との体系 防除により、イネミズゾウムシ防除が一段と効果的にできます。
- ●イネミズゾウムシとコブノメイガ、ニカメイチュウ、イネドロオイムシ、イネットムシ、ウンカ類等の同時防除にも最適です。

# 農業微生物の分類と保存

農林水産省農業環境技術研究所 大畑 貫 一

自然生態系との調和のとれた地力維持・培養技術,病害虫・雑草防除技術の開発には微生物機能の開発・利用に期待されるところが大きいが,この分野における研究は著しく遅れている。その主な原因は,農業生態系では生息する微生物の種類が多く複雑なため,種の分類・同定が困難で,複雑な生態系における微生物の動態を解明する手法の開発が遅れていることである。一方,微生物は微細で形態の分化が単純なことが微生物分類学の発達を大きく阻害している。

農業環境技術研究所では、農業環境にかかわる微生物の分類・同定を重要な研究課題として位置づけ研究を進めているが、さらにこの分野の研究の発展を図るため、昭和61年10月31日に「農業環境微生物分類研究会」を開催した。本特集はその講演内容に微生物の保存法に関する最近の成果を追加して編集されたもので、その概要を紹介する。上記研究会で話題を提供された方々あるいは執筆を分担された方々,ならびに本特集号を企画された日本植物防疫協会に対し深謝の意を表する。

#### Ⅰ 微生物分類の現状と問題点

椿教授は菌類分類学の発達の歴史と今日の動向を紹介 したのち、菌類分類における生活史と胞子形成過程の観 察の重要なことを強調した。さらに二形性と分類、化学 分類の分類学上における意味合い、海中に生息する担子 菌類の細胞構造と分類ならびに生態との関係について、 最近の情報を引用しながら解説した。

従来の分類では形態観察に重点が置かれていたが、形のみでなく培養による連続観察から形態形成あるいは生活史が明らかにされる。これが分類に重要な意味を持つ。培養も従来のような純粋培養ばかりではなく、異なる菌株などとの混合培養によって純粋培養では見られなかった形態や生活が観察されることがある。これまで、酵母は子のう菌類の無性世代と考えられていたが、タフリナ菌やシロキクラゲなど担子菌類にも無性世代として酵母を形成するものが次々と発見されているが、これらは生活史の観察の成果である。

加藤主研は土壌細菌分類の現状を紹介するとともに問

Present Status and Problems in Classification and Preservation of Agricultural Microbes. By Kanichi Ohata

題点を指摘した。土壌細菌の分類研究は遅れており、土 壌細菌全体をカバーできるような分類体系がない。そこ で一般細菌の分類体系を利用し、それに基づいて同定も 行われているが、既往の分類体系の中におさまらず同定 不能の場合もかなり出てくる。

土壌細菌のうち重要な位置を占める好気性有機栄養細菌は、①胞子形成細菌、②グラム陽性細菌、③グラム陰性細菌の3グループに分けられる。胞子形成細菌の分類は Gordon らの方法によって行われてきたが、最近GC 含量や DNA 交雑法などの導入による分類体系の見直しが行われている。グラム陽性菌のうち放線菌を除くコリネホーム細菌については、細胞の分裂様式、GC含量、細胞壁のアミノ酸組成、メナキノン系、DNA 交雑法、菌体の脂肪酸組成などに基づく分類体系が作られつつある。グラム陰性細菌の分類はべん毛の位置、培養・生理的性質などに基づいて行われてきたが、GC 含量、DNA 交雑法、菌体の脂肪酸組成、ユビキノン系、メナキノン系などの調査結果を導入した分類体系の見直しが行われている。

栃原室長は植物ウイルスの命名と分類方式の変遷、命名・分類方式の国際的統一への動きと将来展望について解説した。植物ウイルスの命名法については、宿主植物に番号をつけたウイルス名、ラテン2名法あるいはその変法などさまざまな方法が提唱されたが、いずれも一長一短があり、現在ではタバコモザイクウイルスのように英語の普通名がもっとも広く用いられている。しかし、これは分類学的な種を表しているものではない。

国際ウイルス命名委員会(後の国際ウイルス分類委員会)ではウイルスの形状,物理・化学的性質などに基づいて亜門,網,目,科に分け,種はラテン2名法で表すことが提案された。しかし,植物ウイルス小委員会ではウイルスの性状が十分明らかではない現状で,このような階級分類を急ぐことに反対し,当分の間は普通名にウイルスの主要な形質を記号化して付記することを提唱した。これは科,属,種という階級分類ではなく,主要な形質による共通性の高いものを集めたグループ分けである。1981年の国際ウイルス分類委員会の報告では,このような考えかたが導入され,34科25グループが核酸の種類・鎖数,エンベロップの有無によって七つのクラスターに分けられている。その中で植物ウイルスは

25 のグループに分けられ、 科と同列に 扱われている。 1984 年には イネ縞葉枯病ウイルスなど 二つのグループ が追加されている。

ウイルスの種の概念については現在も議論が続けられているが、ウイルスの主要な形質は生物と同じようにタンパクをコードする遺伝子に支配されていることから、生物における種の概念はウイルスにも適用可能であるとの考えかたが台頭するとともに、ウイルスの塩基配列や構造が明らかにされ、類縁関係が論議され始めている。

#### II 有害線虫の種を巡る諸問題

皆川主研は植物寄生性線虫のうち農作物・林木に重要な5属を取り上げ、種を巡る諸問題について解説した。

シストセンチュウの分類は、テンサイシストセンチュ ウの種内変異とされたものを次々と別種として切り離し ながら発達してきた。しかし、形態的には別種と判断さ れる種においても、他の研究手法を用いると、果たして 別種とすべきか問題が残される例がある。

ネコブセンチュウの分類は形態に基づいて行われてきたが、最近、電気泳動や血清学的手法を導入した類別も行われている。しかし、これらのデータは種の形態的特性を補充する意味は大きいが、形態以上の重要性は少ない。一方、本属の染色体の倍数性と生殖方法・寄主範囲などとの関係が明らかにされつつあり、今後これらが分類上どのように反映されるか興味深い。

キタネグサレセンチュウは北日本,東日本において農業上重要な線虫である。それと形態的に似たキクネグサレセンチュウが本州中部にいる。ヨーロッパでは両者は別種とされ、アメリカでは種内変異とされている。両者の区別点は尾部の形態とされていたが、あいまいな点が多い。日本に分布するものについても再検討の余地がありそうである。

マツノザイセンチュウと形態的にはよく似ているが、マツに対して病原性の弱いニセマツノザイセンチュウがいる。日本の両者は交雑試験から別種とされているが、アメリカでは両者は交雑可能で、両者は同一種内の変異であるとする報告がある。フランスの同属線虫は酵素の電気泳動パターンでは日本の2種と区別できるが、交雑試験では日本の2種の中間的なものであるという。本属線虫の分類については、なお広範な地域の個体群を対象とした検討が必要である。

ミカンネモグリセンチュウには寄生性の異なる 2 レースの存在が知られていた。両者は形態的には区別できないが、染色体数が異なり、胚子発生、性誘引、交雑試験などで差異が見られることから同胞種であるとされた。

従来レースと呼ばれるものの中にも同胞種とされるもの が含まれている可能性がある。

#### III パソコンによる病原菌の簡易検索

浜屋室長は氏が考案したパソコンによる植物病原糸状菌の簡易検索法を紹介した。まず、「日本有用植物病名目録」の1~5 巻に収録されているすべての糸状菌病の記載内容及び発病部位、病徴についての簡単な情報を入れたファイル、植物病原菌を含む主要糸状菌約400属の分類学的所属、形態などに関する情報を入れたファイル、宿主名の変換ファイル、符号で入力した病徴や胞子の形態などの復元ファイルなどからなる検索システムを作成した。

このシステムでは、宿主名、発病部位、病徴の特徴、 胞子形成の特徴、胞子の色・形態・細胞数、菌の栄養体 の構造について条件を設定すれば、病原菌名と病名目録 に記載されている特記事項、分類学的所属、病名、英名 などが出力される。本システムは素人でも簡単な条件さ え入力すれば、病原菌名、病名が検索できるところに特 徴がある。

#### IV 微生物ジーンバンクと微生物の保存法

松本室長は昭和 61 年度から発足した農林水産省微生 物ジーンバンク事業の目的, 事業内容, 組織などについ て紹介した。農林水産業における微生物の利用は広範に わたるが、近年バイオテクノロジーの発達に伴ってその 利用領域はいっそう拡大することが予想される。そこで 微生物を貴重な遺伝資源としてとらえ、その積極的な収 集,確保を図り、その利用に備えるため本事業が発足し た。この事業を推進するため農業生物資源研究所にセン ターバンクを設置し、その下に農業環境関連微生物、家 畜関連微生物, 食品関連微生物別にサブバンクが設置さ れた。 農業環境 関連微生物の サブバンクは 農研センタ 一, 生物研, 農環研, 畜試, 草地試, 果樹試, 野菜試, 蚕試, 林試, 養殖研である。事業はセンターバンクが一 元的に行うが、微生物の収集、評価、保存はそれぞれの 分野ごとにサブバンクが分担する。この事業のセンター バンクの役割は、昨年 12 月1日から生物研に新設され た遺伝資源センターが引き継いでいる。

ジーンバンク事業にとってもっとも重要な技術的課題は、微生物の特性・機能を変えることなく長期間保存する技術の開発である。そこで土屋主研には植物病原細菌及び糸状菌、福本主研には植物ウイルスの長期保存法に関する最近の研究成果を紹介していただくことになった。

# 菌類の分類研究の現状と問題点

介 筑波大学生物科学系

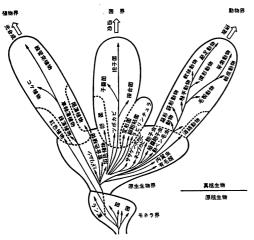
菌類 (Fungi) の科学を研究する学問、すなわち 菌学 (mycology) は、自然史の科学として発展を遂げてきた 動物学および植物学とやや趣を異にし、理学のみならず 農学、医学、工学など諸関連分野の研究とともに発展を 遂げてきた。したがって、これら諸分野で得られてきた 知見に基づくさまざまな情報が種 (species) の特徴とし て取り入れられてきた。したがって、菌学の中心である 分類においても関連諸分野の研究知見の影響は大きく, 種の数においても 64,000 種以上といわれ、自然界にお いては昆虫に匹敵する 大群である (第1表)。 しかしな がら、その内容はいわゆるカビ、キノコ、イーストなど と一般に大きく分けられていて分類基準も同様でなく、 菌類すべてに わたり 系統的に まとめることは 至難の技 である。 Linné (1753) の 2 名法の確立以後、Persoon (1761~1836), FRIES (1753~1878) らの偉大な先駆者に 引き続き, 関連分野の発達に伴って急速に学問として進 んできた現在である。

もっとも大きな分類学上の発展は、菌類の生物界にお ける位置に関してであって、生物を動物と植物の2大生 物界に区分する根強い自然科学思想にしだいに研究と検 討が加えられ、生物多界説が取り入れられてきた。現在 は生物 5 界説である Whittaker (1967) (第1図) の説 が一般に認められてきており、日本においては中・高校 などの教育現場ではいまだしの感があるが、大学以上に おいては研究組織との兼ね合いで多分にためらいはある ものの、生物学としては認められる傾向になってきた。 なぜ、菌類はこの5界説において菌界という独自の位置 が与えられるようになったかは、核相、細胞、運動、有 性生殖、栄養などの面からもっとも矛盾の少ない分けか たとなったからであるが、いまだ残された問題も多い。 南類の研究歴は動植物に比べていまだに浅く, 系統学的 にも原則の確立に遅れが見られ、科学の分野としてもう 少し 時間を 要するようである。 その議論は 別にすると し、小は酵母における単細胞を主体とするものから、大

第1表 菌類における属と種の数 (Dictionary of the Fungi, 1983 より)

	属	異名	種	属	異名	種
変形菌門				118	120	625
鞭毛菌亜門						
ツボカビ綱	110	45	575			
サカゲカビ綱	6	2	16			
卵菌綱	74	35	580			
グト区科	71	33	300			
				190	80	1,170
接合菌亜門						,
接合菌綱	115	60	665			
トリコミセス綱	30	24	100			
r y a c e A AM	30	2.1				
				145	85	765
フ森帯工師				2,720	2,810	28,650
子褒菌亜門				2,720	2,010	20,000
担子菌亜門	750	675	8,000			
<b>菌蕈網</b>	750 145	160				
腹菌綱			1,060			
サビキン綱	150	140	6,000			
クロボキン網	59	38	980			
				1,100	910	16,000
不完全菌亜門				-,		,,
分生子果不完全菌綱	650	750	8,000			
カ生子 未 小 元 主 函 科	1,030	520	9,000			
<b>示</b> 从小光生困啊	1,030	320	3,000			
				1,680	1,270	17,000
 菌 類				5,950	5,275	64, 200

Present Status and Topics of Taxonomy of Fungi By Keisuke Tubaki



第1図 ホィッタカーによるモネラ,原生生物,菌,植物,動物の5界の体制(原核生物,真核単細胞生物,真核多細胞・多核生物)による位置づけ(中村,微生物からみた生物進化学,1983より)

進化の方向は、栄養法 (光合成、吸収、摂取) に基づいている。

は担子菌のように細胞が組織化して複雑な構造を示すものまで多岐にわたる菌類は、その分類の面から見てもきわめて複雑である。種の基準を取り上げても、前述のように同じ基盤に立ってはおらず、議論としてまとまりのつきそうもない問題を含んでいる。 "種とは何か?" という基本的な点でも動植物はもちろん、菌類のなかでさえ議論の分かれるところであるから、菌類の分類研究において問題点はきわめて多いのは当然である。ここではそのすべてにわたる議論は別に譲ることとし、現在研究面で転機と思われる問題点につき紹介してみる。

菌類分類学は先に述べた関連分野、応用分野とのかかわりが深いこともあり、分野によっては人為分類的色彩がかなり濃厚な体系も見られる。人為分類から自然分類へという願望は常に言われているが、人間が表現する場として人為的であることは当然であり、要は分類基準の価値判断に帰するところであろう。現在のように急速な発展を遂げている関連諸科学分野に対する細心な注意と知識の吸収のみならず、科学思想への関心が菌類分類学において今は特に必要と思っているが、一方、生物を区別しようとする技術・方法の発達はとどまるところがない。しかしながら区別法が進んだということと、分類が進んだということは必ずしも同じ意味ではないわけで、ここで分類、同定、命名の意義を混同しない細心の配慮が必要となってくるわけである。分類学者としてもっとも注意を払うべきところである。現在の生化学、遺伝

学、細胞学などにおける発展を取り入れることに目覚ましいところがあるが、全員で先端ばかりを追っていって気がついたら本拠がからっぽになっていた、となってはならない。研究の進めかたにはきわめて慎重を要するところが分類学にはある。しかしながら、新知見を吸収することにより、現在の菌類分類体系における個々の分類群の取り扱いに再検討が加えられることは当然であり、また必要である。菌類の世界はきわめて広大で分類学全体を議論するには筆者の知見は乏しく、今回は比較的関係の深い分類群を中心として問題点を探ることにする。

#### I 生活史と分類

生活環として表現し、その上に出現する生殖細胞を結んだものであるが、菌類の場合は一般に有性と無性の両時代に分けて表現する。有性時代(teleomorph)では核相が交代し、細胞質融合と核融合と減数分裂があり、それぞれが起こる場所と時期は遺伝情報により決まる。無性時代(anamorph)では核相の変化は見られず、一般に単相であると考えられていて、栄養増殖を主体としている。菌類のなかではこの無性時代の生活史だけが示されるもの(表現型として無性時代しかわれわれにわからないもの)が、菌類全体の約20%といわれる。それらは有性生殖が未知(必ずしも欠けているわけではない)で、便宜上分類学的に一括して不完全菌類(亜門)としてまとめられている。

他の生物の界に比べ、菌類研究の大きな利点として純 粋培養の技術が進み, その結果, 生活史が試験管内で全 うする事実が次々と判明し、その再現性もあり、生活環 を回る時間が比較的短いことがある。培養技術の進んだ 結果、今まで自然界における採集と同定のみにとどまっ ていた多くの分類群の菌類の生活史が数多く判明してき ている。そして現在の段階で新しく有性―無性両時代の 結び付きが次々とわかり、 学名の整理も 行われている が、かつては不完全菌類の有性時代の大部分は子嚢菌類 であると思われてきたところが実は担子菌類との結び付 きが意外と多いという結果が出てきている。その端緒と なったものは日本における赤色酵母の研究で、Rhodosporidium toruloides BANNO (1967) の発見であり, 筆者らもか かわったシロキクラゲ目のキノコの酵母様無性時代の発 見などであろう。現在はさらに新知見が続き、重要な人 体病原真菌である酵母 Cryptococcus neoformans の有性時 代が担子菌であることが判明 (Filobasidiella neoformans) するなど, すべてを列記する紙面もないほどである。こ れには遺伝学、生化学の発展が大きく寄与したことはも ちろんであるが,純粋培養技術の発達,分離株の組み合 わせ実験,連続観察の手法などすべてを駆使した結果であろう。試験管内の純粋培養における"顔"は単に半面にすぎず、自然界では実はまったく異なる顔をしている事実はまだまだ多いと思われる。培養下において担子菌であるという証拠はカスガイ連結の存在ばかりではなく、隔壁構造の電顕像や酵素能、核相観察などにも見いだせる現在、担子菌と不完全菌の結び付きはさらに多く判明していくであろう。後で述べる培養技術の進歩に大きく期待するところである。それと同時に、教科書的には著名な菌類であっても、分類位置に疑問のあるものが意外と多い。培養下における生活史の検討がきわめて不十分だったからである。病理学的、分類地理学的研究にとどまっていたこれら菌類の、採集と培養による生活史の再検討にまつところきわめて大である。

#### Ⅱ 二形性と分類

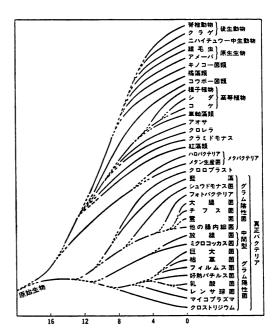
上の生活史の研究と共通するところが多いが、高等動 植物における生活史と異なり、菌類の場合、生活史は必 ずしも一定方向をたどるものではなく、生活環のある場 所から反転したり、ある場所を省略したり、きわめて融 通に富んだところがある。二形性は菌類においてはその 融通性を大いに発揮したもので、特に動植物に寄生性の ある場合によく見られる。すなわち寄主に寄生している 状態と、培養など腐生的にある状態とで著しく"顔"が 相異している。もっとも多い二形性は菌糸型一酵母型に 分かれるもので、植物寄生菌ではてんぐ巣病を起こす子 嚢菌類の Taphrina, がんしゅ病を起こす Protomyces に 見られることはよく 知られているが、 担子菌類 の 黒穂 病 Ustilago でも 普通である。 先に述べたシロキクラゲ Tremella などもこの例であるが、これらの二形性を誘導 する要因は複雑で、温度依存性、温度及び栄養依存性、 栄養依存性に 分けられ 多くの 成果が 出ている (柳田, 1982)。 さて、この二形性が分類に与える影響は決して 小さくない。 もっとも 大きな問題は 酵母との 関係であ る。例えば、ある子囊菌の菌糸組織からなる子実体を採 集し、 子嚢胞子から 培養を 得たら 酵母様であったとす る。この場合生活史の中に酵母型の時代があるという事 実以外に、この酵母型がもし単独で自然界から分離され た場合,酵母分類学上でどの位置にあるかという問題が 出てくる。 酵母の 分類は 細菌分類学に 近い手法がとら れ、化学分類学としても発展してきている。異なった分 類群を異なった手法で分類しているところを比較する難 しさがあるが、分類学上の興味ある知見も期待できると ころである。

菌類には、 特に 糸状菌では 二形性のほかに 多形性も

ある。不完全菌の Phialophora pedrosoi (分生子はフィアロ型) には Cladosporium (出芽型) と Acrotheca (シンポジオ型) の3型が同じ菌株で見られることがある。ほかにもこのような例は多くあり、子嚢菌の培養下で無性時代としてフィアロ型分生子の記されていることがよくある。この場合その分生子は実は不動精子であると思われることが多いが、分生子と 称してよいか 疑問の点である。また、多形性の場合、どの型を種の基準とするか命名上の問題もある。

#### Ⅲ化学分類

言うまでもなく, この分野における 発展は 目覚ましい。細胞を構成する化学成分または代謝産物を指標として分類する方法で発達したもので, さらに分子生物学の登場とその成果を分類に取り入れ, DNA の塩基組成,



第2図 5S rRNA の系統樹 (Hori and Osawa, 1979; Hori et al., 1982 を改変)

これまでに 218 種の生物の 5S rRNA の一次構造がわかっているが, ここではそのうちから主要なものだけを選んで, 系統樹にしてある. 図中の中間型は "放線細菌型"とよぶのがよりふさわしい. チトクロム c のデータから 推定されたヒトと 酵母の 分岐後の 時間 (12 億年) を基準にして, 時間の尺度が入れてある. もちろんここでは 5S rRNA のヌクレオチド置換の速度を一定と仮定したが, 全生物を通じて一定であるかどうかの確実な証明はない(堀・大沢, 分子進化学入門より)

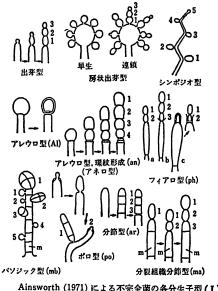
DNA 相同性、細胞壁構成成分、生合成経路などと分類との関係が論じられるようになった。これら個々の成果を基にして分類との関係を探ってみると、今までの分類学の知見とたいした矛盾もなく、またそれらの分類学上の知見が相互によく一致した点に化学分類の価値があり、有効性を物語っている。色素など二次代謝産物の分類への取り入れに問題の多かった点に比べ、化学分類による情報はより合理的なものとされている。化学分類の詳細は成書(駒形編、1982)に譲るが、酵母におけるCoenzyme Q、GC 含量、DNA-DNA 相同性が分類基準として用いられ、特に菌類全般に呼吸系補酵素のユビキノン型が検討され、これは系統を探るうえで有力な手段として最近急速に研究が進められている。

化学分類という用語から"化学"が省略される時期も 分野によっては遠くないように思われるが、先に述べた ように基本的な生物学、形態学の確実な基盤をまず確立 することも同様に肝要であろう。

最近特に注目を浴びている 5S ribosomal RNA と呼ばれる RNA 分子が生物の系統を 論じた意見の 一つを 最後に紹介しておく (第2図)。

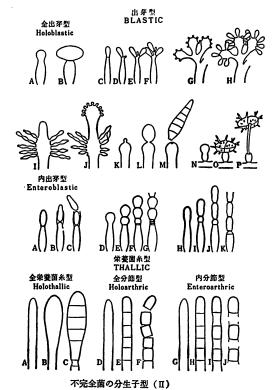
#### IV 分生子形成細胞

分生子とは、菌類において胞子嚢胞子(ケカビなど) および厚膜胞子以外の無性の胞子を広く指すが、この細胞を形成する母体となる細胞を分生子形成細胞と呼び、 個別にはフィアライド (phialide) などがこれに当たる。 不完全菌類の分類に、この分生子形成細胞の検討と分生 子形成様式の検討が不可欠であることはすでに衆知であり、目下のところ第3図のごとく形成様式が大別されている。これにより各分生子の形成様式を分生子型と一般に呼んでいる。ここに至った過程と現状は成書(長谷川編、1984;椿ら訳、1985など)に譲るが、まだ残され



Ainsworth (1971) による不完全菌の各分生子型(I) (Hughes, Subramanian, Tubaki 原図)

第3図 分生子形成様式模式図 (微生物の分類と同定,より)



BLASTIC. A, B: Nigrospora sphaerica, C~F: Tritirachium oryzae,
G, H: Botrylis cinerea, I, J: Gonatobotryum apiculatum,
K~M: Deightoniella torulosa, N~P: Spegazzinia tes-

ENTEROBLASTIC. A~C: Phialophora lagerbergii, D~G: Scopulariopsis brevicaulis, H~K: Cladobolryum varium.

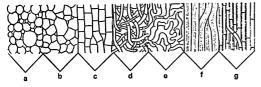
THALLIC. A~C: Microsporum gypseum, D~F: Geotrichum candidum, G~J: Sporendonema purpurascens.

sarthra.

た問題点は多い。まず、分生子形成に伴った核の動きが 十分にわかっていない点である。新しい分生子を生む形 成細胞内において母核の動きは生物としてきわめて重要 な点であるにもかかわらず、 その追求は きわめて少な い。連続培養観察、電子顕微鏡技術の面から方法論的に は追求可能であり、新たな多くの事実が生まれよう。次 に現在でも疑問点の多いものに、分生子形成細胞先端の 環紋形成 (annellation) がある。典型的な構造が見られ る菌類 (Scopulariopsis など) でもこの観察は必ずしも容 易ではなく、菌類に意外に多いこの構造の形成過程には 共通しない点もある。大きく分けるとこの環紋形成には 少なくとも二つ以上あるように考えている。電顕像と核 分裂を十分に検討しないと解決しない点であろう。分節 型分生子 (arthroconidia) の形成も菌類全般にわたり見 られるが、ときとして首をかしげる適用例もあり、同様 に核の動態を調べて再検討する必要があろう。およそ細 胞が生まれる場合、分裂と出芽が基本であるから、各分 生子型もまったく相互に関係しないわけはなく、中間的 な型もあり、定義で明確に区別することは生物の常とし て難しいことも念頭に置く必要がある。

#### V 細胞組織構造

現在,この組織構造の検討が重視される分野は子嚢歯類であり、子嚢微壁の切片から構造を研究する手法が進んできた。基本的にはチャワンタケなど盤菌類 (Discomycetes) で示された Korf (1958) の分けかたが基本であり(第4図), さらに検討が加えられている。電子顕微鏡による超薄切片観察は開発以降,急速に進歩した武器となり、組織化学的手法やオートラジオグラフィ技術も導入されてきている。細胞破壊と細胞分画,さらに変異株を用いた構造観察を発達させることにより新知見も期待できよう。菌学においては動・植物学におけるのと異なり、分類の手段としての微細構造などの研究が行われてきた傾向が強く、分類学と形態学の区別が一般に明りょうではない。菌類形態学としての別の発達もあろう。



第4図 子嚢盤外皮層組織の模式図 (菌類図鑑・上 より)

- a. 円形菌組織, b. 多角菌組織, c. 矩形菌組織,
- d. 交織菌組織, e. 表皮状菌組織, f. 厚膜菌組
- 織, g. 伸長菌組織 (Korf 原図)

不完全菌類の分生子果不完全菌類 Coelomycetes に見られる分生子果 conidiomata (acervuli, pycnidia, sporodochia, synnemata を包含) の形態的検討に、分生子果外皮の微細構造も加えることにより、属の特徴にやや不明りょうなところのある Coelomycetes の分類がより合理的になろう。

#### VI 命 名 規 約

菌類の命名は国際植物命名規約に従っていることは言 うまでもないが、最近取り上げられている問題に、タイ プ標本(基準標本)の作製がある。菌類の新種を発表す る場合、タイプの指定が必要で、しかもこのタイプは乾 燥したものであることが決められている。したがって, 菌類では細菌と異なってタイプカルチャーという語は規 約上では認められていない。この点、乾燥標本であるタ イプ標本は、高等菌類など菌糸組織のしっかりしたもの には適用されてあまり問題はないが、しだいに微小な菌 類となると乾燥標本では基準標本としての価値は難しく なってくる。酵母では粉末となってしまうわけで、糸状 菌や酵母では乾燥標本の代わりに永久プレパラートが作 製される。特に酵母では化学分類手法が用いられる必要 上、培養株の保有が不可欠であり、タイプカルチャーと いう用語が慣用的に使われてさえいる。植物を対象とし た命名規約に一考を要する最近である。

#### VII 培養技術

菌類培養技術の進歩には目覚ましいものがあるが、培地を取り上げてみると組成自体に基本的な変化はあまりない。水溶性の栄養成分や塩類などが主体であることは良好な発育を目的とする場合にはよいが、分類のために目的とする菌類の真の"生きざま"をさぐろうとするためには問題がある。ケラチン、キチン、セルロース、リグニンなどの培地への添加にあまりくふうは見られない。自然界における物質分解には常に関与する微生物の遷移があるが、研究対象となる菌類が遷移過程のどの位置にあるかわかっていない以上、相互比較のため同じ組成の培地を用いるばかりではなく、物質の分解過程に応じた何段階かの培地を考案することも必要であろう。

培地組成ばかりではなく、いまだに綿栓以上に通気性と使用効果性のあるものはない。また、画一的な温度条件、自然界の基質に比べ高すぎるように思われる培地の水分活性、光の質と量の問題などもあるが、もっとも気になることはあいも変わらぬ寒天の使用である。確かにすばらしい素材で微生物学の発展に寄与したところ計り知れないものがあるが、化学的に見た場合まことに純粋

な寒天があるかとなると難しい。厳密さがさらに要求されてくる培養研究に、寒天に代わる合成物が新たに見いだされたら、それによる収穫はきわめて大なるものがあろう。

本稿は農業環境徴生物分類研究会において与えられた 主題を基にまとめ直したものである。農水省農業環境技 術研究所において微生物の分類同定を主要研究課題とし て位置づけるためのシンポジウムであり、それに資する ため具体的な問題を拾ってみた。主催者の皆様のご要望 に添うには舌足らずの内容になってしまったが、分類研 究の着実な発展を願うものである。関係諸氏の方々に厚 く御礼申し上げる。

#### 引用文献

- 1) 長谷川武治編 (1984): 微生物の分類と同定 (上,下),学 会出版センター,東京, 310 pp. 450 pp.
- 2) 木村資生編(1984): 分子進化入門, 培風館, 東京, 304 pp.
- 3) 駒形和男編(1982): 微生物の化学分類実験法,学会出版 センター,東京,352 pp.
- 4) 中村 運 (1983): 微生物からみた生物進化学, 培養館, 東京, 250 pp.
- 5) 椿 啓介ら訳 (1985): ウエブスター菌類概論, 講談社, 東京, 649 pp.
- 6) 宇田川俊一ら (1978): 菌類図鑑 (上,下), 講談社, 東京, 1321 pp.
- 7) 柳田友道 (1980): 徽生物科学, I, 学会出版センター, 東京, 555 pp.
- 8) HAWKSWORTH, D. L. et al. (1983): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, Commonwealth Mycological Institute, Kew, 445 pp.

## 新しく登録された農薬 (62.3.1~62.3.31)

掲載は、種類名、有効成分及び含有量、商品名(登録年月日)、登録番号[登録業者(会社)名]、対象作物:対象病害虫:使用時期及び回数などの順。 但し、除草剤については適用雑草:使用方法を記載。(…日…回は、収穫何日前まで何回以内散布の略)(登録番号 16673~16682 まで計 10 件)

なお,アンダーラインのついた種類名は新規のもので[ ]内は試験段階時の薬剤名である。

#### 『殺虫剤』

ピレトリンエアゾル

ピレトリン 0.1% バラギク殺虫剤 (62.3.28)

16680 (トモノ農薬)

きく. ばら:アブラムシ類

#### 『殺菌剤』

#### TPN くん煙剤

TPN 46.0%

ダコニール 46 くん煙顆粒 (62.3.28)

16678 (中外製薬), 16679 (エス・ディ・エス バイオテック)

きゅうり(温室・ビニールハウス等密閉できる場所):ベ と病・うどんこ病:前日4回,なす(温室・ビニール ハウス等密閉できる場所): 黒枯病:前日4回,トマ ト(温室・ビニールハウス等密閉できる場所):葉かび 病:前日2回

#### 『除草剤』

チアザフルロン粒剤 [エルボタン]

チアザフルロン 5.0%

エルボタン粒剤 (62.3.28)

16674 (日本チバガイギー), 16675 (日産化学工業)

鉄道・道路・駐車場・運動場: 一年生及び多年生雑草: 雑草発生始期・雑草生育初期(草丈 20 cm 以下)・雑草生育中期(草丈 50 cm 以下)

#### チアザフルロン水和剤 [エルボタン]

チアザフルロン 80.0%

エルボタン水和剤 (62.3.28)

16676 (日本チバガイギー), 16677 (日産化学工業) 鉄道・道路・駐車場・運動場: 一年生及び多年生雑草:

雑草生育初期 (草丈 30cm まで)・雑草生育盛期 (草 丈 50cm まで)

#### 『植物成長調整剤』

#### マレイン酸ヒドラジド液剤

マレイン酸ヒドラジドカリウム 32.0%

OMH-K (62.3.28)

16673 (大塚化学)

たばこ:腋芽抑制:芯止後

#### 過酸化カルシウム粉粒剤

過酸化カルシウム 11.0%

カルパー粉粒剤A (62.3.28)

16681 (保土谷化学), 16682 (日本化薬)

湛水直播水稲:発芽率の向上・苗立歩合の安定:播種前 浸種後

# 植物病原糸状菌の簡易検索法

農林水産省農業環境技術研究所 浜 屋 悦 次

#### はじめに

糸状菌の種類はきわめて多く,属の数にして約6千,種の数になると6万以上ともいわれ,いわゆる菌の同定には,長い経験による豊富な知識や的確な判断力を要し,加えて膨大な文献も蓄えなければならず,おいそれとできることではない。

それでは経験・知識・文献やそれに基づく判断をコンピュータに肩代わりさせてみてはどうであろう、とはだれしも考えることである。コンピュータの記憶容量の大きいこと、その記憶の正確であること、検索の速いことなどが、はなはだ有効な手段になりうることはまちがいない。

ところが実際には、このだれでも思いつくことがなかなか実現しない。その理由には、糸状菌に関するばく大なデータを、だれが、どうやって、コンピュータに入力するかという、まず第一の問題がある。さらにご存じのように、糸状菌の分類は形態分類が基盤になっているので、糸状菌の分類学的な特性を完全にコンピュータへ入力しようとすれば、図形処理という、コンピュータにとってかなりめんどうな問題もでてくる。

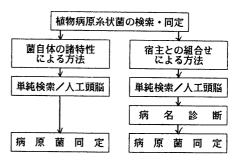
そこでこの際、「糸状菌全体の 完璧な同定」ということではなく、対象を限定し、しかもあまりめんどうなことを考えずに一応の検索・同定ができればよいことにして、問題を処理してみることにした。用いたコンピュータはパーソナル・コンピュータ (パソコン) であり、対象は植物病原糸状菌だけである。すなわち、あくまでも簡易検索・同定ということでシステムを試作したのであるが、それはそれなりに面白い結果が得られ、また将来の本格的なシステム構築にも参考になる点があると思われるので、ここにその概略を報告する。

なお,ここに報告するシステムは,保存菌株の管理なども含む「植物病原糸状菌の総合管理システム」の一部となっている。

#### I 糸状菌の同定方法に関する考えかた

ある未同定の菌を同定しようとする場合, それが植物病原菌とわかっていても, 同定作業の進めかたの基本に

Retrieval System for Plant Pathogenic Fungi Using Personal Computer. By Etsuji HAMAYA



第1図 植物病原糸状菌同定の進め方

は二通りある。一つは、純粋に菌学的な見地から菌を同定しようとするやりかたであって、同定の基礎はあくまでも菌そのものの特性であり、宿主のいかんは副次的な参考資料となる。ある意味ではオーソドックスな方向である。もう一つは、かなり実用的な考えかたで、菌を宿主とのセットで総合的にとらえ、病名を診断し、既知の病害であれば記載されている病原菌名として同定するやりかたである。後者のやりかたであれば、その菌による病害の防除対策まで検索結果に含める場合もあるであろう。

第一のやりかたでまず考えられるのは、分類学の教科 書によく載っている分岐型の検索表の使用である。しか し、この検索表を一度でも試されたかたならご存じのよ うに、使用者にとって検索表の構成がよくわかっている 菌の確認にはきわめて有効であるが、検索表の構成がど うなっているのかよく知らない菌とか、まったく未知の 菌の検索にははなはだ無力なのである。検索表をたどる 途中で一点でも答えが出せないとか、答えがちょっとで もまちがっていれば、そこで検索作業は中絶してしまう か、全然誤った検索結果に導かれてしまうのである。筆 者も,この分岐型系統樹形式の属名検索表を苦労してパ ソコンに移し、やっと不完全菌の部分ができた時点で、 イネいもち病の 大家と 自他ともに 認めている 人に試験 していただいたところ、数回繰り返してそのつど Pyricularia 属とは似ても似つかない属に落ちてしまったの で、結局のところこの形式による検索システムの作成努 力を放棄してしまった。

菌自体の特性によって検索・同定を行うには、この分 岐型系統樹形式以外にも、100~1,000項目の検索条件を 二次元的に 設定する 本格的な 検索システムも ありうる が、それだけの検索項目を各菌と組み合わせたデータベースの作成は容易なことではないし、用いるコンピュータの能力もパソコンのレベルとは程遠い高度のものを要するうえ、使用者側にとっても調査項目の多いことは必ずしも有利ではない。また、菌自体の特性によって同定を行うシステムとしては、人工頭脳形式も考えられる。しかし、この人工頭脳形式にしても、各菌それぞれについて、多くの知識ベースを蓄え、それらをルール化する必要があるので、1年や2年の個人的作業で、多数の菌に対して汎用性があり、実用になるものが構築できるとは到底思えない。

第二の,菌と宿主をセットにして,その病原を検索同定する形式は,前にも触れたように,作業過程が病名の診断とかなりの部分で共通する。病名(疾病)の診断には,いわゆるエキスパートシステムの開発が各方面で進められており,特に医学関係での進歩が著しく,すでに検査技術として実用になっているものも少なくない。農学関係でもいろいろな試みがなされているのは,読者諸賢もご存じのところである。宿主とセットにした病原菌の検索同定システムにも,人工頭脳形式を導入すれば,設定条件に従ってキメの細かい判断が得られるのは当然である。しかし逆に,人工頭脳の利点を生かした病名診断(病原同定)結果を得ようとすれば,それに応じて多くの知識ベースを各病害それぞれに用意しなければならない。これは,菌自体の特性によって菌名を同定するのに人工頭脳を導入するのと同じジレンマである。

いろいろと思い巡らせた結果試作したのが、菌と宿主をセットにする第二の方式のうちで、特に人工頭脳形式を導入することなく、単純な構造のデータベースを中心に検索を繰り返して、病原菌を同定するシステムである。

#### Ⅲ 試作したシステムの基本構造

試作したシステムの構造はきわめて単純である。宿主植物に関するデータベース・ファイル、病名・病原・文献などに関するデータベース・ファイル、病原菌の属に関するデータベース・ファイル、その他いくつかの小さなデータベース・ファイル、およびそれらのデータベース・ファイル相互間で必要なデータを検索したり、受け渡しをしたりするプログラムから成り立っている。

#### 1 用いた機器および基本ソフトウェア

使用したパソコンは NEC の PC-9801 VM2 である。この機種を選んだ理由は特にないが、強いていえば、次に述べる dBASE $\parallel$  を基本ソフトウェア(ソフト)として使えることである。このパソコン本体に、記

憶媒体として 20 メガバイトの固定ディスクを付属させた。入力するデータの数がかなり多くなるので、通常の 1 メガバイトのフロッピー・ディスクでは、複数枚数となり検索上不便となるからである。

基本ソフトとして用いた dBASEII は、すでにあまりにも有名なので、その仕様について述べる必要はないと思う。データベース・ファイルの作成や改造が容易であり、検索能力も高く、しかもシステム構築に要するプログラミングが、これまでコンピュータになじみのなかった人でも簡単に行えるなどの利点がある。関心のある方は、多数の解説書が出ているので、それらを参考にされたい。

#### 2 データベースの構成

#### (1) 宿主植物名ファイル

試作した検索同定システムでは、宿主植物と菌との組み合わせが検索の対象となっているので、検索条件としてまず宿主植物名を入力する必要がある。ところが、この入力する宿主植物名を仮に和名に限っても、同一植物に対していろいろな呼びかたがある。例えば、ジャガイモに対して、ベレイショがあり、サツマイモにカンショがあるなどである。さらに、後述するように、このシステムでは、病名のファイルが「日本有用植物病名目録」によって作成されているので、類似の近縁植物の病名が一括して扱われている場合がある。例えば、多くのミカンの類がカンキツ類となっていたり、サクラの仲間が全部サクラ類として一緒になっているなどである。

そこで、病名目録に収録されている宿主植物の和名を標準名として、その英名、学名、別名、一括収録されている近縁植物名などで構成されるファイルを作成した。 入力された宿主植物名は、いったんこのファイルと照合され、病名ファイルに収録されている標準名に修正されることになる。

#### (2) 病名・病原ファイル

このシステムにおける菌の同定作業は、一種の検索作業にほかならないので、原則的に検索対象はすべてデータベースとしてあらかじめ用意されていなければならない。これが、パラメータによって解は無限に存在しうるいわゆる"計算"とは異なる点であって、有限のすでに入力されている答え(解)と合致するものが検索されなければ、出発点となった検索条件(パラメータ)そのものが偽り(誤りもしくは新種)ということになる。本システムは、簡略化という大前提があるため、大規模のデータベースを用意することはできなかったが、最低限の条件として、病名・病原ファイルを作成した。

先に述べたように, 糸状菌全部をデータベース化する

のはさしあたって無理なので、考えられるのは作物(植物)の病原糸状菌に限るということである。幸いなことに、日本植物病理学会から「日本有用植物病名目録」が編集刊行されているので、それに収録されている糸状菌病全部、5,000 点余りにつき、記載内容のほかに、発病部位および病徴に関する簡単な情報を加えて、ファイルを作成した。発病部位や病徴などに関する情報は符号化して入れてある。これで、わが国に発生する作物(果樹、林木などを含む)の病原糸状菌は一応網羅されていることになる。

言うまでもないことであるが、この病名・病原ファイルは本システムを構成するもっとも重要な中心的存在である。このファイルがあればこそ、本システムばかりではなく、先に触れた植物病原糸状菌の総合管理システム全体が成り立っている。

#### (3) 糸状菌属名ファイル

「日本有用植物病名目録」に収録されている病害 5,000 余りの 病原糸状菌は 2,000 種余りであるが、それとても短時日の間に、全部の分類学的所属、菌学的特徴をコンピュータに入力することはできない。そこで、植物病原菌を含む 400 余りの 属だけに 限って、 分類 学的所属、胞子の形態などに関するきわめて簡単な情報のファイルを作った。菌の特性に関する情報は符号化して入れてある。

ここで困難なのが糸状菌の世代の扱いである。宿主上の病原として検索・同定の対象となっている菌の世代が、病名・病原ファイルに収録されている菌の世代と一致している場合は問題ないが、他世代の場合もありうるので、その点の配慮をしておかなくてはならない。他世代のある属に対しては、その他世代全属名を付加情報としてファイルに入れた。もっとも多いもので五つの他世代名を付け加えた属があり、検索プロセスでは、可能性のある他世代全部を点検するようになっている。この他世代検索機能が、このシステムの一つのポイントである。

#### (4) その他の付属的なファイル

以上の三つのデータベース・ファイルが本システムの 根幹となっているが、そのほかに、検索条件として符号 (数字) で入力した病徴、胞子特徴などの 記述を復元するファイルがあるが、本筋とは関係ないので、詳しくは 述べない。

#### (5) プログラム

パソコンの電源スイッチを入れれば、後は画面に現れる指示どおりに キー操作を すれば、 容易に 検索作業ができる ように なっているが、 そのプログラムは すべて

dBASEⅢ のプログラム言語によって書かれている。

このシステムに関してだけ言えば、検索条件を設定してから検索結果が出力されるまで、単純な検索の繰り返しにすぎない。しかし、それは結果論であって、その単純な検索の繰り返しにも、コロンブスの卵的なアイディアがあり、数多くの試行錯誤があった。いささか手前みそになるが、基本データベース・ファイル間のリンク、菌の他世代名検索などについては、いろいろと苦心・くふうをしてある。検索速度にしても、イネなどの病害数の多い宿主植物の場合には、一つの病原菌を検索・同定するのに 2~3 分間かかっていたのが、改良を重ねた最近ではすべて1分間以内に収まるようになった。

また、このシステムの 直接構成 プログラム ではないが、病名・病原ファイルのデータ入力プログラムは、システム構築の成否の鍵となる重要なものであった。それなくしては、大量のデータを、 短時日の 間に、 誤りなく入力することは不可能であったであろう。そのデータ入力プログラムにおいて、宿主植物名ファイルや菌の属名ファイルは、 データ入力作業時の 支援辞書 として働き、しかも新しいデータを自己にも取り込むようになっているので、学名の自動入力やつづりの誤りチェックに役だつとともに、作業しながら辞書としての完成度が高まった。

本システムに 直接関与する プログラムは約 700 行の I 本にまとめられているが、植物病原糸状菌の総合管理システム全体の プログラムは、 大小合わせて 200 本以上に上る。

#### Ⅲ システムの操作およびテストの結果

本システムは、対象を植物病原糸状菌に限定し、宿主 上の寄生状態、胞子の形成状態、胞子の形態的特徴、菌 糸の特徴などの簡単な観察結果を検索条件として設定す れば、その病原菌を同定できることを狙っている。シス

#### 

第2図 検索条件の設定画面

上の黄色の枠に設当する数字を入力して下さい

テムを起動すると, 第2図に示すような検索条件の設定 画面が現れる。

設定条件として、まず宿主植物名を入力する。続いて、「宿主上の発病部位」および「特記する病徴や標徴」を特定の番号で入力するが、これらはそれぞれ2条件まで受け付けるようになっており、内部では"AND"条件として作用する。もちろん「不明」として"0"を入力しても、あるいは何も入力せずにバスしてもかまわない。

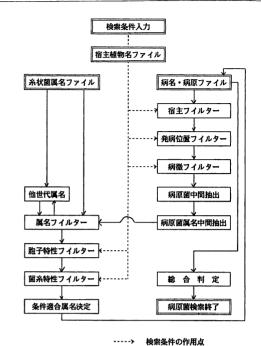
菌の特性に直接かかわる検索条件としては、「胞子形成の特徴」、「胞子の色」、「胞子の形態」、「胞子の細胞数」、「菌の栄養体構造」の5項目が設けられており、それぞれの設定条件は第1図のとおりで、これらは各1条件ずつを入力する。検索条件の設定が終了したら、リターン・キーを押す。

まず入力された宿主植物名が、宿主植物名ファイルと 照合され、標準植物和名と同一であればそのまま、登録 されている別名(和名)または英名であれば標準和名に 変換されて、病名・病原検索回路にいく。もしも宿主植 物ファイルに合致するものがないときは、その旨画面に 表示される。

以後は、システム内部で検索作業が行われるが、設定 した検索条件は一種のフィルターとして働き、条件に合 致したものだけを選んで、次のステップに通す。第一番 に作用するのは宿主植物フィルターで、

病名・病原ファイルから、その宿主の糸 状菌による病害名全部と、それらの病原 として記載されている菌名を検索抽出す る。抽出された菌名は「宿主上の発病位 置」と「特記すべき病徴や標徴」の両フィルターにより絞り込まれ、絞り込まれ た菌名からは属名だけが抜き出され、次 の属名検索回路に送られる。

属名検索回路では、送り込まれた属名 及びその属の他世代(もし登録されていれば)につき、胞子の特徴や菌糸の特 徴などに関する情報を糸状菌属名データ ベースから受け取る。以降、設定された 検索条件(フィルター)により絞り込み を繰り返し、設定条件に適合する属名が決定 定する。設定条件に適合する属名が決定 されると、再び病名・病原ファイルと照 合し、設定条件宿主の該当属全病原菌の 種名及び病名などの情報を、使用者の 希望に従って画面出力あるいはプリント



──→ 検索情報の流れ

第3図 システム構成の模式図

する。

以上の検索過程で, 設定検索条件に矛盾があったり,

\*\*\* 植物病原糸状菌の検索・同定結果 \*\*\* (1987年1月14日)

検索条件:宿主 植 物 名 = rice 宿主上発病郎位=(1)葉(柄・鞘),(2)無 特記すべき病欲や標徴=(1)一般的病欲、(2)無

胞子形成に関する特徴=子嚢や担子器はみられない

胞子の 色 = 機色 胞子の形態 = 糸・鞭・棒形 胞子の 細胞数 = 3 胞以上 菌の栄養体構造 = 有隔壁菌糸

検索結果:宿主標準和名,英名,学名=イネ,rice, Oryza sativa L. 検索された菌(病害)数 =8点

「日本有用植物病名目録」に記載されている菌名及び病名 (検索条件で検索される菌が他世代の場合は下段にその所属を示す)

Curvularia lunata, にせいもち病, false blast

「病名コード番号=9839007

Curvularia senegalense, ブラッキスポリウム病,

[病名コード番号=983902]

Helminthosporium sigmoideum var. irregulare , 小黒薗核病, stem-rot, culm rot [病名コード番号=983501]

Cochliobolus lunatus, にせいもち病, false blast Helminthosporium 属菌(不完全菌亜門) [病名コード番号=531001]

Cochliobolus lunatus, すす紋病, glume mold

Helminthosporium 風薗(不完全菌亜門) [病名コード番号=531002]

Cochliobolus miyabeanus, ごま葉枯病, brown spot Helminthosporium 鳳蘭(不完全菌亜門) [病名コード番号=530800]

Sphaerulina miyakei, ささら病, Cercospora 属菌 (不完全菌亜門) [病名コード番号=582001]

Sphaerulina oryzina, すじ葉枯病, Cercospora leaf spot Cercospora 属菌 (不完全菌亜門) [病名コード番号=582000]

第4図 プリントアウトされた検索結果 (1)

\*\*\* 植物病原糸状菌の検索・同定結果 \*\*\* (1987年1月14日)

検索条件:宿主 植物名 = イネ 宿主上発病部位=(1)葉(柄・鞘),(2)無

特記すべき病徴や標徴=(1)一般的病徴,(2)極酸小な病斑を形成 胞子形成に関する特徴=子囊や担子器はみられない

胞子の色 = 濃色 胞子の細胞数 = 3 胞以上 施子の形態 = 糸・鞭・棒形 菌の栄養体構造=有隔壁菌糸

検索結果:宿主標準和名, 英名, 学名=イネ, rice, Oryza sativa L. 検索された関(毎零)数 = 1 点

検索された菌(病害)数 = 1点 「日本有用植物病名目録」に記載されている菌名及び病名 (検索条件で検索される菌が他世代の場合は下段にその所属を示す)

Cochliobolus miyabeanus, ごま葉枯病, brown spot Helminthosporium 属菌(不完全菌亜門) [病名ユード番号=530800]

第5図 プリントアウトされた検索結果 (2)

該当する宿主植物名や菌名がファイルに登録されていなければ、検索がその段階に到達した時点で、その旨を画面に表示もしくはプリントするようになっている。システム構成の概略を第3図に示す。

いろいろな宿主植物の病害をモデルにしてテストした結果によると、設定検索条件によって一概にはいえないが、検索項目全部に条件を設定した場合、最終検索結果がプリントアウトされるまでに要する時間は1分間以内、出力される菌名は1~数点であり、条件設定に誤りがなく、目的の菌がファイルに登録されてさえいれば、ほぼ確実にその中に正解が存在した。出力された菌名が1点であれば、同定作業は完全に成功したことになり、複数の菌名が出力されても、かなり絞り込まれた結果なので、若干の補足により同定可能であった。検索結果の例として、第4、5図を掲げる。両方とも、イネのごま葉枯病菌を検索しようとしたのであるが、第4図では病徴を単に「一般」とし、第5図では「極微小病斑」という条件が加わっている。

検索結果には、病名コード番号も出力されるようになっているので、さらに詳しい情報が必要なら、そのコード番号により、該当病害に関する全記録を呼び出すことも可能である。

#### IV システムの特徴

- ① このシステムの最大の特徴は、菌の検索・同定条件として、まず宿主植物の入力が要求されることである。これは非常に重要なポイントで、この条件(フィルター)設定により、イネのように登録病害数の多い場合でも、5,000 余りの全登録病害の中からたかだか数十の病害(病原菌)が選び出され、他の検索条件が比較的少数であるにもかかわらず、まずまずの検索結果が得られることになる。しかしこのことは、このシステムの検索能力が宿主植物を離れるとほとんど無くなってしまうことをも意味している。
  - ② 菌の 特性に 関して属までの 情報しか 持たないた

- め, 菌の 種名の 特定は,「病名の特定 (診断)」→「記載されている病原菌の摘 出(同定)」の形となっている。
- ③ この検索システムの基幹データベースが、ほとんど全部「日本有用植物病名目録」の記載に依存しているため、その記載に不備があれば、それはそのまま本システムの検索結果に表れる。
- ④ 宿主植物さえ指定すれば、他の 設定条件はいくらでもパスすることが可能で、設定条件 の多少に応じて、それはそれなりの検索結果が得られ る。極端な場合の例として、設定した検索条件が宿主名 だけであれば、その宿主の糸状菌病全部が検索・出力さ れる。
- ⑤ 菌の属名ファイルには、各属に(もしあれば)他世代の情報が付加してあるので、宿主上で観察された菌の世代と上記「病名目録」に記載されている世代が異なっていても検索される。このことは、この種の検索システムとして非常に有利な点で、比較的経験の浅い使用者でも出力情報を有効に利用できる。
- ⑥ システムの構造が比較的単純なので、設定する検索条件の項目を増やしたり、改良することにより、容易に検索能力の向上が図れる。

#### V 今後の問題点

本システムは、テストした範囲では一応期待どおりの結果が得られた。有用植物の病原菌に関する限り、大ざっぱではあるが、かなり的確に網を絞ることができる。 このことから、システム構成の基本的な考えかたとしては、一つの方向づけができたように思われる。

しかし、データベースそのものの収録範囲やデータ密度など、システムの本質的な弱点に由来する能力の限界があることも確かである。特に、菌の特性データが属についてだけであり、しかも収録属の数もデータ密度も不足している。そのために、菌の特性のみの観察によって検索・同定することはできない。今後は、収録属の数を増やすとともに、各属の種に関する情報をも含めてデータベースの拡充に努め、真の意味での糸状菌分類同定システムを作り上げる必要がある。この形式の検索システムの価値を左右するものは、正に基幹データベースの質と量そのものである。

また、糸状菌の分類が主として形態的特性に基づいているのに、視覚的な情報処理能力をまったく欠いているのも残念な点である。胞子の形態の模式図程度は早急に

扱えるようにしたい。さらに、病名の診断、病原の同定 というプロセスを考慮すると、本システムの検索の出発 点が 糸状菌病を 前提にしているのは 実用上 不利であっ て、病原を糸状菌とその他(細菌、ウイルスなど)に識 別する能力を備えるくふうが必要であろう。

#### おわりに

以上,植物病原糸状菌の簡易検索・同定システムの概略について述べたが,このシステムは植物病原糸状菌の総合管理システムの一部を成すものであって,全体として,病名・病原ファイルを中心に,菌の属名・種名,病名,宿主植物名などによる各種の検索,保存菌の登録・

管理,その他,各種の植物病原糸状菌に関する情報の管理作業を行うことを目的にしている。部分としても,全体としても,まだまだ未完成なので,多くの方々のご意見をいただきながら,少しでも実用性を高めてゆきたいと考えている。ご協力をお願いする次第である。

#### 参考文献

- 1) MICHALSKI, R. S. (1983): Plant Disease 67 (4): 459~463.
- 2) 水沢 博ら (1986): 蛋白質 核酸 酵素 31 (13): 274~ 284.
- 3) 西山幸司 (1978): 植物防疫 32 (7): 283~288.
- 4) 佐々木昭博(1986): 同上 40(10): 491~494.

#### 次号予告

次6月号は下記原稿を掲載する予定です。

イネウンカ類の吸汁害――トビイロウンカとセジロ

ウンカの違い-----

野田 博明

稲作技術の変遷と病害の発生変動(1) 大畑 貫一 ジャガイモ乾腐病の原因菌と病原性

一戸正勝・陶山一雄

農薬の生理活性に及ぼす光学特異性 上路 雅子 リンゴにおけるモモシンクイガの防除をめぐる諸問題

成田 引

媒介昆虫の培養細胞における植物ウイルスの感染・

増殖

木村 郁夫

ハダニ類における有機スズ剤抵抗性の現状と問題点

----チャ寄生カンザワハダニを中心として----

刑部 勝

新しく命名・改訂された線虫の学名および和名

大島康臣・湯原 巌

ボルドウ液の発見者ミヤルデ教授の若き日の**肖像** 中村 **廣**明

植物防疫基礎講座

病害虫防除のための統計学(4)

多重比較

佐々木昭博

定期購読者以外のお申込みは至急前金で本会へ 定価 1 部 500 円 送料 40 円

本会発行図書

# 侵入を警戒する病害虫と早期発見の手引

A 5 判, 126 ページ 口絵カラー 8 ページ

定価 2,600 円 送料 250 円

監修 農林水產省橫浜植物防疫所

海外からの病害虫の侵入・定着を阻止するには,港での検疫とともに,不法持ち込み等による侵入病害虫の早期発見が極めて重要です。

本書は、この観点から多くの人に侵入病害虫に対する警戒心と目による協力をお願いするため、横浜植物防疫所が中心になってまとめた、当面我が国への侵入が警戒される 54 病害虫の解説書で、それぞれの、既発生病害虫との相違点を述べた "発見のポイント"を中心に、図録を付して、1 病害虫で見開き 2 ページとし、図鑑としても、第一線での検索用としても使いやすいように工夫した書です。

お申込みは前金(現金・振替・小為替)で本会へ

# 植物ウイルス分類研究の現状と将来展望

農林水産省農業研究センター 栃 原 比呂志

植物ウイルスの種類は、1983 年現在、世界で 800 種類以上、わが国では 200 種類以上が報告されている。目的は何であれ、取り扱われるウイルスについては、それがどの種類のウイルスで、どんな形質を持つものであるかを誤りなく知らせることができるように、ある秩序に従って類別(分類)し、類別されたウイルスはすべての人に通用する名前を付け(命名)ておくことが必要である。

#### I 命名と分類方式の変遷

植物ウイルスであたかも種(species)のように取り扱われているタバコモザイクウイルス(TMV)、キュウリモザイクウイルス(CMV)という分類の単位は、個々の作物のそれぞれ異なると思われる病気に対して付けられた名前から出発している。このように初期のころのウイルスの分類は、ウイルス自体の形質を調べることが困難であったことから、実用上一つの病気として取り扱うことが便利と考えられるところに、分類の単位が置かれた。

しかし調査が進むに従い、例えばジャガイモにモザイク症状を現している病原は1種類ではなくたくさんあることがわかり、このためジャガイモモザイクウイルスは使えず、ジャガイモXウイルス、ジャガイモYウイルス、ジャガイモAウイルスなどと符号が付けられた。また寄主範囲の広いウイルスがあること、植物の種類や品種によって、さらに生育環境などの違いでも病徴は著しく異なることがあることがわかり、混乱を避けるためには病名を離れた分類の必要性が認識されるようになった。

J. Johnson (1927, '35, '49) や K. M. SMITH (1937) はウイルスの分類を試みるにあたって、英語の普通名の代わりに、寄主植物別に 番号を付けた ウイルス名を提唱し、ウイルスを 寄主別に 整理した。これによると、TMV、CMV、キュウリ 緑斑 モザイクウイルスは、Johnson 方式では、それぞれ Tobacco virus 1、Cucumber virus 1、Cucumber virus 3 であり、SMITH 方式では、それぞれ Nicotiana virus 1、Cucumis virus 1、Cucumis virus 2 である。SMITH の方式は、彼の

The Situation and Future Prospects on Taxonomy of Plant Viruses. By Hiroshi Tochihara

"Textbook of Plant Virus Diseases" が広く利用されたので、一般にある程度利用されたが、ウイルスが増加するにつれて混乱し、1957 年の改訂版(第2版) で SMITH 自身によってこの方式は放棄され、元の英語の普通名に戻っている。さらにこれと平行して Review of Applied Micology 1944、'46、'57 に英語の普通名でウイルス名一覧が記載され、これを利用する人が多かったため、英語の普通名が世界中でもっとも普通に用いられ、そして現在に至っている。

一方、植物ウイルスにも動植物の学名と同じようにラ テン2名法を用いることを一部の人々は早くから考えて いた。しかし具体的な提案は F. O. Holmes (1939) が 最初である。彼はウイルス目 (Virales), 植物ウイルス 亜目 (Phytophagineae) を作り, さらに 10 科, 10 属, 89 種を記載した。彼は寄主植物での病徴を基準にして 属を定めたため、TMV は Marmor tabaci, イネ萎縮ウ イルスは Marmor oryzae でモザイクを示す Marmor 属 が 89 種中 53 種を占めている。このほかにもラテン2 名法の提案はかなりあるが、いずれも病徴の型や伝染方 法を基準にして、ウイルス自体の形質を分類の基準に取 り入れていないため-Holmes が提案した 1939 年当時 はもっとも研究が進んでいる TMV についてすら、核 タンパクで棒状の形をしていることがやっと明らかにさ れ始めた時代で、ウイルスの形質を分類の基準にするこ とは無理であったが一単なる命名の試みに終わり、名前 に含まれる情報も依然として貧弱であった。しかしこれ らの中にはウイルスの類縁関係を明らかにしようとする 試みが含まれており、その点評価されるが、しかし広く 受け入れられるには至らなかった。

H. P. Hansen (1957, '61, '66) はラテン 2名法風ではあるが、従来とは異なる発想でウイルスの属名を作る試みを行っている。例えば TMV は Minchorda nicotianae (M: 汁液伝染性、in: 媒介者不明、chorda: 棒状粒子)、ジャガイモYウイルスは Maphiflexus solani (aphi: アブラムシ伝搬性、flexus: ひも状粒子)、カブモザイクウイルスは Maphiflexus brassicae のように名前に含まれる情報量を増やすために伝染様式や粒子形態などの形質を記号化して組み合わせ、一見ラテン語風の名前にしたものである。

これまで様々な命名法によってたくさんのウイルス名

が提案されたが、tobacco mosaic virus を例にとると、 Strangyloplasma iwanowskii (1922), Tobacco virus 1 (1927), Nicotiana virus 1 (1937), Marmor tabaci (1939), Musivum tabaci (1940), Phytovirus nicomosaicum (1941), Nicotianavir communae (1942), Minchorda nicotianae (1957), Protovirus tabaci (1966), Vironicotum maculans (1968), Virothrix iwanowskii (1970) がある。 植物ウイルスの分類をウイルス自体の形質に基づいて 行う試みは、J. Brandes ら (1959~) によって先鞭が 付けられた。彼らは棒状やひも状の粒子を持つ数多くの 長形植物ウイルスについて粒子の長さを調べ、それに血 清反応試験の 結果を 組み合わせて、 長形植物 ウイルス をいくつかの グループ に分ける ことができる とした。 Brandes らが設定した ウイルスグループに 含められた ウイルス間には、粒子形態や血清関係だけでなく、伝搬 様式、ウイルスの細胞内所在様式や安定性など他の形質 についても共通性が認められ、この考えは後述の ICTV の植物ウイルス小委員会に受け継がれている。

# II ウイルスの命名,分類方式の国際的統一への動き

ウイルスの命名については、「バクテリアと ウイルス の国際命名規約」があったが、規約そのものがウイルス に不適当であったため、取り決め全体が有名無実になっ ていた。このためこれを解消し、別途にウイルス独自の 国際命名法を作るため、1966年モスクワで行われた第9 回国際微生物会議の際に, 新しく国際ウイルス命名法委 員会 (International Committee on Nomenclature of Viruses, ICNV, 1974 年 International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV に改称) を発足させ, "命 名法は国際的でなければならない, ラテン2名法を樹立 する方向で努力する, 先取権の規則は取り入れない, 実 用的見地からウイルスの種 (species) とは似た形質を持 つウイルスの集合とする, ウイルスの属(genus) はいく つかの共通の形質を持った種のグループとする、属名の 語尾は-virus とする,科 (family)はいくつかの共通の 形質を持つ属のグループとする、科名の語尾は-viridae とする"など 18 項目 (現在は 22 項目) からなるウイ ルス命名規約が定められた。

ICNV 準備委員会委員の Lworf (現在は ICTV の life member) らは、ウイルス共通の分類方式を提案し、これをほとんどそのまま ICNV 準備委員会試案として 1965 年発表した。この試案ではウイルス "門" を設け、以下、 核酸の 種類に よって "亜門"、粒子の 対称性 で "綱"、外被の有無で "目"、粒子の直径やカプソメアの

数などで "科" に分けるようにして、ラテン命名が行われている。

これに対し、植物ウイルス小委員会の委員である A. J. Gibbs らは 異議を唱えた。 そもそも 種名は簡単でわ かりやすく, 言語が違う人達にも使え, 名前を付けたも のの特徴がよく示されており、変わらないというのが理 想である。しかし十分量の形質が明らかにされない前に 命名されることが多いウイルスでは、変えないで特徴 をよく示す ということは 難しい。 現段階では 不十分な データを基に宿主や病徴などを無視した階級分類を急ぐ より、 当分の間は 従来用いられている tobacco mosaic virus, cucumber mosaic virus などの普通名を用い、そ れに現在ウイルスの重要な形質と考えられている核酸の 種類, 鎖数, 分子量, 含量, 粒子の形態, 寄生性, 媒介 者などを記号化 (cryptogram) して付記する (TMV の クリプトグラムは R/1:2/5:E/E:S/C,O) ことで普 通名の 欠点を 補い、 この方式で 当分行うことを提案し た。これでは科、属、種という分類方式はとらず、重要 形質で共通性を持つ種類を集めてグループ分けし、これ に普通名の 省略化を 主体とする グループ名を 与えてい る。

1966 年植物ウイルス小委員会は、GIBBS と意見を同じくする B. D. HARRISON を委員長として発足した。小委員会では、①各種のウイルスについて得られるかぎりのデータを参考にして、ウイルス相互の類似性を判定すること、②類似形質を持つウイルスを集めて、グループをどの程度まで設定できるかを検討すること、③まとめることができたものに、どのようなグループ名をつけるかを調査すること、④妥当と考えられるグループ名を提唱すること、⑤このために植物ウイルス関係者に意見を広く求めること、の5項目を作業方針にして調査し、小委員会では粒子が判明している約 150 のウイルスで、69 のものが 16 グループに分けられるとした。このうち12 グループが 1970 年の総会に提出された。

1970 年 ICNV 総会で、動物 ウイルス 小委員会案の "属"名と植物ウイルス 小委員会案の グループ分け方式 は承認されたが、承認されたグループ名は提案された 12 グループ中3 グループだけであった。その後グループ名は追加され、ラテン語やギリシャ語に由来する命名が増加している。第四次 ICTV 報告書 (1981) にある "科とグループのリスト"の中から科名とグループ名を抜き出し第1表に示した。これによれば、宿主の枠が外され、34 科と 25 のグループが核酸の種類と鎖数及び被膜の有無で七つの cluster に分けられ、植物ウイルスのグループは科と同列に並べられている。本来植物ウイルス

 粒子の物	# M-	
一位子の1	4 圧	科 と グ ル ー プ 名
核酸	被膜	
ds DNA	有	Poxviridae, Herpesviridae, Baculoviridae, Plasmaviridae
ds DNA	無	Iridoviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Caulimovirus*, Tectiviridae, Corticoviridae, Myoviridae, Styloviridae, Podoviridae
ss DNA	無	Parvoviridae, Geminivirus*, Microviridae, Inoviridae
ds RNA	有	Cystoviridae
ds RNA	無	Reoviridae**, possible family 4
ss RNA	有	Togaviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae**, Bunyaviridae, Arenaviridae, Tomato spotted wilt virus group*, Retroviridae
ss RNA	無	Picornaviridae, Caliciviridae, Nudaurelia β virus group, Leviviridae, Maize chlorotic dwarf virus group*, Tymovirus*, Luteovirus*, Tombusvirus*, Sobemovirus*, Tobacco necrosis virus group*, Closterovirus*, Carlavirus*, Potyvirus*, Potexvirus*, Tobamovirus*, Dianthovirus*, Comovirus*, Nepovirus*, Pea enation mosaic virus group*, Nodaviridae, Velvet tobacco mottle virus group (possible group)*, Tobravirus*, Cucumovirus*, Bromovirus*, Irarvirus*, Alfalfa mosaic virus group*, Hordeivirus*

第1表 ウイルスの科とグループ名

ss: - 本鎖, ds: 2 本鎖

\* 印は植物ウイルスグループ名, \*\* 印は植物・脊椎動物・無脊椎動物に感染するウイルスを含むウイルス科名. 本表は MATTHEWS (1982) の表から作製したが, 1984 年 ICTV 総会で植物ウイルスでは rice stripe virus group と maize rayado fino virus group が追加承認され, tobacco necrosis virus group が Necrovirus に名称の変更が行われている.

のグループは科に当たるものではなく、属に当たるものでもない。しかし ICTV 設立の大きな目的の一つは、すべてのウイルスを統一的に分類することにあるので、この報告書は実行委員会が意識的に作成し、植物ウイルスにも科と属を設けるよう暗に催促したものと考えられる。第 1 表ではグループ名は 25 であるが、このほか植物ウイルス研究者の多くは Plant reovirus (Subgroupの Phytoreovirus と Fijivirus をグループ名として使う場合が多くなっている)と Plant rhabdovirus をグループ名として用いている。しかしこれらは Reoviridae 科とRhabdoviridae 科に属するとして 第 1 表には グループ名としての記載がなく、Phytoreovirus と Fijivirus は属扱いとなっている。

"種"の概念についての議論は当初から現在も続いており、ICTV の命名規約中の種の規約も 1981 年改正されている(種とは共通の安定した形質を持ち、他の形質を持つ系統群から、これらの形質で区別できる系統群とする一要約)。そして 1984 年仙台で行われた ICTV 総会では、ウイルスの種の概念と、これらの命名に関して公開のシンポジウムが行われ、これら混乱している問題

について解決への前進を図ろうとする試みが行われた。 このときの主要な 4 講演が Intervirology (24:62~98, 1985) に公表されている。そして高等生物における種の概念との関係,ウイルスの一種名に含まれるウイルス分離株の範囲,種と種の境界や命名について,現在も議論が続いている。

#### Ⅲ 将来への展望

1976~81 年 ICTV の会長を務めた R. E. F. MATTHEWS (1985) は、グループというあいまいな言葉を用いることを非難し、1975 年設けられた Reoviridae 科に、イネ萎縮ウイルスやイネ黒条萎縮ウイルスなどが属するとして、1978 年 Phytoreovirus 属及び Fijivirus 属が承認されたことを歓迎した。そして、これは植物ウイルスを科、属の分類体系に引き込むための重要な一歩であると述べている。また彼は、高等動植物にきわめて有用なMAYR の種の定義は、ウイルスには適用できないが、しかしこれはウイルスに"種"が存在しないことを意味することではなく、ウイルスの主要な性質は生物と同じようにタンパク質をコードする遺伝子を持っているので、

種の概念はウイルスに 適用可能であり、1966 年の IC-NV の会議以来ウイルスの分類には進化論的,系統発生 的な考えにかかわりあわないことが強調されているが、 近年多くのウイルスの塩基配列や構造が明らかにされ, ウイルス間の異同が比較され, 類縁関係が議論され始め ていることを踏まえ、この指針は削除すべき段階に到着 していると述べている。

またこれらの考えに沿ったものとして、らせん状の外 被タンパク質を持つ植物ウイルスを粒子の長さと一定の 長さの中に含まれる RNA 数を基準にして、Flexiviridae, Tobamoviridae, Hordeiviridae, Tobraviridae の 4 科 に分け、 さらに 属や 亜属を 設ける 提案 (VEERISETTY, 1979), Cucumovirus, Ilarvirus, Bromovirus 及び alfalfa mosaic virus group はいずれも一本鎖 RNA で、増殖 に3成分の RNA を必要とする共通点から、これら をまとめて Tricornaviridae 科とし、Bromovirus, Cucumovirus, Ilarvirus の3属を設ける提案 (VAN VLOTEN-Doting ら、1981)、Caulimovirus と Geminivirus は科と すべきだ (MATTHEWS, 1985) などの提案がある。

しかし、植物ウイルス研究者の多くが持つ意見に、ウ イルスの名に果たして属と種のような2名法を必要とす るのかという根本的な疑問と, なにも今さら小難しいラ テン語など使わなくてもよかろうという,素朴な要求が ある。すでに 1939 年 Holmes の提案以来, 動植物の学 名に 類似した 2 名法の 提案が いくつも 出されてきたの に、いずれも一般に受け入れられなかったのは、必ずし も国際規約として制定されなかったことだけに原因があ るとはいえないであろう。

植物ウイルスのみに限るならば、現在の分類方式を採 り続けても実用上不都合はない。しかし ICTV 設立の 目的と近年の動向から考えると、植物ウイルスのみがほ かと異なる分類方式を採り続けることはしだいに困難に なってくるように思われる。近年外被タンパク質のアミ ノ酸組成やウイルス核酸の塩基配列、さらにその構造な どの解析が進み、同じグループ内のウイルスではどの程 度の共通部分があるか、あるいはカウピーモザイクウイ ルスと ポリオウイルス (Picornaviridae 科に属し, 径約 30 nm の球状 ウイルス), TMV や CMV と Sindbis virus (Togaviridae 科に属し、被膜を持つ径約 70 nm の 球状ウイルス), B型肝炎 ウイルスと カリフラワーモザ イクウイルスさらにレトロウイルスとの関係のように、

これまで類縁関係が遠いと考えられていたウイルス間の 類似性に関しても報告が散見されるようになってきた。 また植物と昆虫、昆虫と脊椎動物で宿主が重なるウイル スが珍しくないこと、多くの植物ウイルスが昆虫伝搬性 であること,多成分系のウイルスは動物ウイルスではき わめて少ないが、植物ウイルスでは多く、昆虫ウイルス はその中間であることなどから、植物ウイルスと動物ウ イルスの祖先は昆虫ウイルスであるとする説が出されて いる(H. Franssen ら, 1984)。このように, これらウイ ルスの持つ遺伝子の情報の解読が進めば、系統発生的な 階級分類ができる可能性が高くなるばかりでなく、塩基 配列や構造を基準にしたコンピュータによる分類方法も 登場してくるように思われる。これらがさらに進めば、 地球上に最初に現れた自己複製系は RNA であるとい う考えもあることから (M. Eigen, 1981), ウイルス以 外の生物が持つ DNA 遺伝子との 発生論的な 関係や進 化の過程なども明らかにされてくるのではないかと期待 される。 いずれにしても, 現在の 混乱は 過渡的なもの で、今後も合理的で関係者に積極的に利用される分類方 法を目標に検討が続けられ、その積み重ねの上に立って ウイルス全般に 適した 分類体系が 確立されるものと 考 えている。

#### 主要参考文献

- 1) Brown, F. (1985): Intervirology 25: 141~143.
- 2) FAUGUET, C. et al. (1986): Ibid. 25:1~13.
- 3) Francki, R. I. B. (1981): Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis-E. KURSTAK  $(ed.): 3\sim 16.$
- (1985): The Plant Viruses vol. 1-FRANCKI (ed.): 1~18.
- 5) GIBBS, A. (1969): Advances of Plant Research 14: 263~328.
- 6) GOLDBACH, R. W. (1986): Ann. Rev. Phytopathol. 24:289~310.
- 7) 飯田俊武 (1968): 農業技術 23:18~21.
- 8) (1971):同上 26:268~270.
- 9) (1972): ウイルス 22:107~113.
- 10) 井上忠男(1974): 微生物の新しい分類学(長谷川武治 編), 講談社, pp. 9~30.
- (1977):植物防疫 31:459~462. 11) -
- 12) 松井千秋 (1980):同上 34:475~479. 13) MATTHEWS, R. E. F. (1982): Intervirology 17:1~ 199.
- (1985) : Ann. Rev. Microbiol. 39 : 451~ 14) 474
- 15) PAUL, H. L. et al. (1980) : Intervirology 13:99~ 109.
- 16) VEERISETTY, V.(1979): Ibid. 11:167~173.
- 17) VAN VLOTEN-DOTING, L. et al. (1981): Ibid. 15: 198~203.

# 土壌細菌の分類・同定法

#### かっとう くに ひと 農林水産省農業環境技術研究所 **加 藤 邦 彦**

#### Ⅰ 土壌細菌の分類

土壌中には光合成細菌、嫌気性菌、好気性菌、窒素固 定菌、イオウ細菌、硫酸還元菌など、きわめて多くの種 類の細菌が生息している。ここでは有機物を利用して生 活している好気性の有機栄養細菌について述べる。

細菌を分類する試みはおよそ 100 年ほど前から始ま った。最初は細胞の形,グラム染色,各種培地上のコロ ニーの形態、色などが主に分類のキーに使われた。その 後多くの生理的性質がキーとして使われるようになり、 細菌は多くの属、種に分類されるようになった。しかし この時代の分類にはいくつかの弱点があった。まず使用 した性質の中には必ずしも安定した結果を示さないもの があったり, 菌株によってはほとんどの性質が陰性とな り、分類のしようがなかったりした。また人により、時 代により重要と見なされた性質が異なることがあり、こ のため分類体系が安定しないことがあった。さらに問題 なことは、細菌は形態が単純であり、進化の過程と分類 とが結び付いていなかったことにある。生物の分類は動 物や植物の分類で明らかなように, 進化の過程と結び付 いて始めて万人に納得される分類体系ができると思われ る。

近年における分子生物学の進歩はこれらの弱点のかなりの部分を克服した。いくつかの方法一例えば 5S または 16S の rRNAの塩基配列を決定することにより,細菌の進化の過程が明らかとなりつつあり,これらのデータに基づいた系統樹も提案されている。さらに最近発達してきた化学分類の方法は属間,あるいは種間の関係を明らかにししつつあり,これまで蓄積された多くの形態的,生理的性質のデータとともに,細菌を明快に分類するのに役だっている。

土壌細菌を対象にした分類の研究はこれまでほとんどなく、したがって土壌細菌を網羅した分類体系もない。しかし一般細菌と土壌細菌はかなりの部分が重なっているため、これまでは一般細菌の分類体系を利用しており、同定もこれを使っている。しかし、重ならない部分も多く、このため実際に土壌細菌を同定するとかなりの細菌はこれまでの分類体系のなかに収まらず、同定不能

Classification and Identification of Soil Bacteria. By Kunihiko Катон となる。体系的な土壌細菌分類の研究が待たれる。

#### 1 胞子形成菌 (Bacillus)

Bacillus は GORDON らにより詳細に分類され、この分類方法は BERGEY's manual of systematic bacteriology vol. 2 においても使用されている。 GORDON らの方法は細胞の形態と生理試験に基づいて分類されたが、その後の GC 含量、 DNA-DNA 交雑法などを含む化学分類の発展により分類の再検討が行われている。

#### 2 グラム陽性菌

グラム陽性の土壌細菌のうち、放線菌および球菌はここでは除く。残りはコリネホルムバクテリアと呼ばれる一群の細菌である。このグループの細菌の分類は Komagata ら (1969)、Yamada ら (Yamada and Komagata, 1970, 1972 a, b; Yamada, 1976)、Suzuki ら (Suzuki et al., 1981; Suzuki and Komagata, 1983 a, b) により研究された。特に細胞分裂の様式、GC 含量、細胞壁の主要アミノ酸組成、メナキノン系、DNA-DNA 交雑、菌体脂肪酸組成などが研究され、これらに基づいて分類体系が作られている。さらに最近では朴らにより 5S-rRNA の塩基配列が研究され、これらの分類体系を支持している。

#### 3 グラム陰性菌

グラム陰性菌のうち桿菌について述べる。この細菌の分類は、かつては運動性のあるなし、あれば鞭毛の位置(極鞭毛か周鞭毛か)、各種生理的性質などを基に行われてきた。 その後 GC 含量、DNA-DNA 交雑、菌体脂肪酸組成、ユビキノン系、メナキノン系、DNA-rRNA交雑などの研究により分類体系が再編成されている。グラム陰性細菌の分類については Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1 (Krieg et al., 1984)に詳しく載っている。

細菌の分類にはかつては光学顕微鏡と生理試験を行う 比較的簡単な施設、器具、試薬を使用していたが、今日 では以上のような化学分類の発展のため多くの分析機器 を必要とする。脂肪酸の分析にはガスクロマトグラフィ ーが、キノンや核酸の分析には高速液体クロマトグラフィ ーが、交雑実験にはアイソトープの実験施設が、鞭毛 の着生位置の判定には電子顕微鏡が必要であり、これら を自由に使いこなすことにより分類の研究は可能とな る。土壌細菌の分類の発展には、専門家の養成ととも に, これら設備の充実が望まれる。

#### II 土壌細菌の同定

#### 1 土壌細菌の同定の意義

われわれの研究目的は、土壌細菌の生態を知り、これ を農業生産などに利用しようとすることにある。このた めには土壌に生息する細菌を同定することが研究の第一 歩となる。異なった場所や異なった時に分離した細菌で も、同定してあれば相互に比較することができる。また 一つの 細菌は多くの 能力を持っている。 例えば、 同じ 細菌が脱窒能を持っていたり、拮抗能を持っていたりす る。これらは同定により同一の細菌かどうかがわかる。 これまで土壌細菌に 関連する 膨大な 研究が 世界中にあ る。これらは学名を使って書かれているので、この情報 は学名を使うことにより取り出すことができる。もし目 的の細菌が同定され一すなわち学名を付けられ一たなら ば、文献検索によりその細菌に関する多くの情報を容易 に得ることができ、その利益は計り知れない。特に細菌 を大量培養して自然界に散布し、有効利用しようとする 立場の人にとって,同定は重要である。同定が行われ, その細菌の情報がよく調べられたなら、病原菌など問題 のある菌を知らないで散布するような危険を避けること ができるからである。

#### 2 土壌細菌同定の手順

土壌細菌を同定するときわれわれはまず細菌をグラム 染色し、顕微鏡観察することにより、グラム染色性、細

胞の形と大きさ、胞子形成の有無などを見る。これにより胞子形成菌(ここでは Bacillus), グラム陽性菌, グラム陰性菌に分けて以下の同定作業を行う。これはこの3 グループの細菌は分類方法がそれぞれ異なっているからである。

#### 3 Bacillus の同定

Bacillus 属細菌は耐熱性の胞子を作る特徴を持っている点で他の好気性細菌と異なっている。胞子の形成は培地の組成によって影響され,R-medium やJ-agar は胞子の形成にはよい培地である。グラム染色をした細胞を光学顕微鏡で観察することにより,グラム染色性,細胞の大きさ,胞子の位置,胞子の形,胞子のうの膨れなどがわかる。さらにいくつかの生理試験を行うことにより同定することができる。第I表にはわれわれが土壌から分離したBacillusを同定した結果を示した。このように顕微鏡観察と生理試験によりBacillusの種は比較的容易に同定できる。しかし第I表に見られるように,土壌中にはGORDONらの分類の研究に含まれない菌株も多く,これらについては同定できない。土壌に住むBacillusの分類学的研究が待たれる。

#### 4 グラム陽性菌の同定

グラム陽性細菌が化学分類の手法により整理されてきたのは最近であり、簡単な試験で同定できる簡易同定法はまだできていない。したがって、グラム陽性菌の属の決定には第2表に示したいくつかの化学分類の方法による性質を調べる必要がある。 属が決まったならば 形態

グループナンバー	性質	NO. of isolates	Form  Width $\mu$ Length $\mu$ Gram reaction Ellipsoidal — Round Contral Terminal— Sporangium Catalase Anaerobic growth V-P pH in V-P broth Egg-yolk Lysozyme Growth of media pH5.7 Denitrification Glucose— Arabinose Arabinose Arabinose Mannitol — Starch hydrolysis Gitrate Hippurate Hippurate Hippurate NO <sub>3</sub> reduction	Casein Tyrosine
1	B. megaterium	23	$R : 1.0 \times 3.0 + + - + + 4.8 - d + - + + + + + - d$	- + +
2	B. cereus	14	$R 0.8 \times 2.0 + + - + + + + 4.7 + + + + + + + + - + -$	- + +
3	B. licneni formis B. subtilis	3	$R 0.5 \times 1.7 + + - + + + + 4.8 + + + + + + d + + - + - + R 0.8 \times 2.0 + + - + + - + 5.0 + d + + + + + + + -$	- + -
4 5	B. pumilus	7	$R \ 0.8 \times 2.0 + + - + + - + 5.0 + d + + + + + + + - + - + 0.6 \times 1.5 \ d + - + + - + 4.6 - d + - d + + d - + - + + +$	- + -
6	B. firmus	2	$R 0.9 \times 2.5 d + - + + 6.4 + + + + + + - + + -$	- + +
7	B. brevis	$\bar{2}$	$R \ 0.6 \times 2.5 \ d + - + - + + 6.8 - d + - + +$	- + -
8	B. sphaericus	6	$R 0.8 \times 1.6 d - + - + + + 7.4 - d + d d$	- d -
9	Bacillus sp. 1	7	$R 1.0 \times 2.0 + + - + - + d d - 4.8 + + + d + d d + - d + -$	- d d
10	Bacillus sp. 2	12	$R \ 0.8 \times 2.0 \ d \ + - \ + - \ + \ d \ - \ 5.4 \ \ + \ d \ + \ d \ d \ d \ d \ - \ d \ d$	- d d
11	Bacillus sp. 3	5	$R 1.0 \times 3.0 + + - + + 8.2 d + - +$	+
12	Bacillus sp. 4	14	$R 0.8 \times 2.0 d + - + + 7.8 d d d - + d -$	– – d
13	Bacillus sp. 5	3	$R \ 0.9 \times 3.0 \ d +6.8+ \ d + d \ d + d + d + d + d$	- + +
	1	<u>'</u>		

第1表 胞子形成菌の性質

	MPDA <sup>a)</sup>	GC (Mol%)	MMI <sup>b)</sup>	FATc)
Agromyces	DAB	71~76	MK-12	S, A, I
Arthrobacter	L-Lysine	59~66	$MK-9(H_2)$	S, A, I
Brevibacterium	meso-DAP	60~64	$MK-8(H_2)$	S, A, I
Caseobacter	meso-DAP	65~67	$MK-9(H_2)$ , $MK-8(H_2)$	S, U, T
Cellulomonas	L-Ornithine	71~75	$MK-9(H_4)$	S, A, I
Corynebacterium	meso-DAP	51~60	$MK-8(H_2)$ , $MK-9(H_2)$	S, U, (
Plant pathogenic	DAB	67~78	MK-9, MK-10	S, A, I
Corynebacterium spp.			,	,,, -
Curtobacterium	D-Ornithine	67~75	MK-9	S, A, I
Microbacterium	L-Lysine	69~75	MK-11, MK-12	S, A, I
Mycobacterium	meso-DAP	62~70	MK-9(H <sub>2</sub> )	S, U, T

第2表 グラム陽性菌の性質

- a) MPDA: Major peptidoglycan diamino acid
- b) MMI: Major menaquinone isoprenologue (s)
- c) FAT: Fatty acid types S: straight-chain saturated, A: anteiso-methyl-branched, I: iso-methyl-branched, U: monounsaturated, T: 10-methyl-branched acids, (): may be present
- データは Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2 (Sneath et al., 1986) による.

	グラム染色	運 動 性	r グ Rル N l Aプ	脂肪酸組成	キノン型	鞭毛	3 キ   シ酸   ド ロ	G C 含 量
Agrobacterium Rhizobium Rhizobium Bradyrhizobium Pseudomonas	-  -  -  -	+ + + + + +	N	S S S S	Q10 Q10 Q10 Q10 Q10 Q10	周周極極極	C 12, 14	57~6 59~6 59~6 61~6 65~6
Pseudomonas Pseudomonas Alcaligenes	-  -  -	+ + + +	Ш	S S S	Q 8 Q 8 Q 8	極 極 周	C 14, 16 C 10 C 10, 14	64~7 62~6 56~7
Pseudomonas	-	+	I	S	Q 9	極	C 10, 12	59~6
Xanthomonas	_	+		В	Q 8	極		63~7
Moraxella Cytophaga		_		S B	MK			40~4 33~4

第3表 グラム陰性菌の性質

的、生理的性質により種の決定をする。

#### 5 グラム陰性菌の同定

第3表には文献 (IKEMOTO et al., 1978 a, b, 1980; KRIEG et al., 1984; OYAIZU and KOMAGATA, 1981; OYAIZU et al., 1982; OYAIZU and KOMAGATA, 1983; YAMADA et al., 1976) から調べられた土壌細菌の性質を示す。周鞭毛で運動する細菌は土壌中, 特に根圏に多く, これらの多くは Agrobacterium と Rhizobium と考えられる。これらは Q-10 を持ち, Q-8 を持つ Alcaligenes とは区別できる。これまでわれわれが分離した周鞭毛を持つ細菌はほとんどが Q-10 を持っており, Alcaligenes とは考えられなかった。 Agrobacterium と

Rhizobium はきわめてよく似た性質を示すが、われわれはマメ科植物に根粒を作り、窒素固定をするものをRhizobium と考え、それ以外は Agrobacterium と考えている。 Rhizobium は宿主などから種を決め、 Agrobacterium は病原性により 種を決めている(なおこの分類には問題があることが指摘されている)。

極鞭毛で運動する土壌細菌は Pseudomonas や Xanthomonas が多いと考えている。Xanthomonas は分岐型の脂肪酸を持ち,直鎖型の脂肪酸を持つ Pseudomonas とは区別できる。Pseudomonas はさらにキノン型,3-ヒドロキシ酸の組成などから種への同定に進むことができる。運動性を持たない土壌細菌のうち,分岐型の脂肪酸を持

つ菌株の多くは Cytophaga と考え,直鎖型を持つものは Moraxella と考えている。

#### 引用文献

- 1) IKEMOTO, S. et al. (1978): J. Gen. Appl. Microbiol.  $24:41\sim49$
- et al. (1978) : ibid. 24 : 199∼213.
- et al. (1980) : Int. J. Syst. Bacteriol. 30 : 3) - $437 \sim 447$ .
- 4) Komagata, K. et al. (1969): J. Gen. Appl. Microbiol. 15:243~259.
- 5) KRIEG, N. R. et al. (1984): BERGEY's manual of systematic bacteriology vol. 1, The WILLIAMS and WILKINS Co., Baltimore
- OYAIZU, H. and K. KOMAGATA (1981): J. Gen. Appl. Microbiol. 27:57~107.
- et al. (1982) : ibid. 28 : 369∼388.

- and K. Komagata (1983) : ibid. 29 : 17∼ 8) -
- 9) SNEATH, et al. (1986): BERGEY's manual of systematic bacteriology vol. 2, The WILLIAMS and WILKINS Co., Baltimore
- 10) Suzuki, K. et al. (1981): Int. J. Syst. Bacteriol. 31: 131~138.
- ---- and K. KOMAGATA (1983a); ibid. 33; 188~200.
- -- (1983b) : J. Gen. Appl. Microbiol. 29:59~71.
- 13) YAMADA, K. and ——— (1970a) : ibid. 16 : 103~ 113.
- 14) —
- 15) -16)
- —— et al. (1976) : ibid. 22 : 203~214. 17) -

#### 央 だ ょ

#### 一農林水産省一

#### ○防除要否予測技術導入事業打合せ会議開催さる

上記会議が 5月 7日, 農水省共用 第5会議室におい て、担当県(北海道・青森・岩手・宮城・秋田・茨城・ 群馬・埼玉・長野・新潟・福井・岐阜・愛知・広島・山 口・福岡・長崎・大分=イネいもち病、広島・愛媛・佐 賀=ミカンハダニ), 農業研究センター, 農業環境技術

研究所,果樹試験場,東北農業試験場,日本植物防疫協 会,植物防疫課の担当者ら約60名が参集し開催され た。

#### ○ニカメイチュウの発生予察方法の改善に関する特殊調 査の事業計画検討会開催さる

上記会議が5月8日,農水省農蚕園芸局第2会議室に おいて、担当県(岩手・秋田・埼玉・長野・新潟・岐阜 ·島根·岡山), 筑波大学, 理化学研究所, 農業環境技 術研究所,植物防疫課の担当者ら約20名が参集し開催 された。

#### 本会発行図書

#### 作 物 藩 ഗ 新 分

理化学研究所 見里朝正 編

A 5 判 235 ページ 定価 2,200 円 送料 250 円

昭和 56 年から始まった理化学研究所主催のシンポジウム「科学的総合防除」の講演内容を加籬してとりま とめた好著。我が国の先端を行く研究者が化学的,生物的防除はもちろん,光・音・遺伝子工学等を駆使し て作物保護の新分野にいどむ最新技術を紹介する。

#### 内容目次

- I.「科学的総合防除」とは
- Ⅱ・光の利用 ・・ 元の紀代 光の昆虫勝引作用の利用/光の昆虫忌避作用の利 用/紫外線除去フィルムによる植物病原糸状菌の 胞子形成阻害/雑草防除における光質の活用
- Ⅲ. 環境制御 湿度環境制御によるハウス野菜病害の防除/環境 制御による雑草防除/太陽熱利用による土壌消毒 /水の利用による病害防除
- 音の利用 音と昆虫/鳥と音/動物と音/魚と音

- V. 生物的防除
  - 作物病害の生物的防除/生物的防除と害虫管理/ 雑草の多様性とその生物的防除/生物的防除への 遺伝子工学応用の可能性
- VI.ソフト農薬の開発 ソフト農薬開発の現状/大豆レシチン・重曹農薬 の開発/過酸化カルシウム剤の開発/フェロモン の利用・開発
- VII. 外国の現状 ヨーロッパにおける科学的総合防除/ソピエトの 現状/東南アジアにおける作物保護の現状/アメ リカにおける病害虫の総合防除の現状

# 放線菌の分類研究の現状と問題点

#### みゃ した きょ たか 農林水産省農業環境技術研究所 **宮 下 清 鲁**

放線菌は多数の抗生物質をはじめとした二次代謝産物 や酵素などの生産菌として、また土壌微生物や病原菌と してわれわれになじみの深い微生物であり、いろいろな 角度から研究されてきた。こうした場面における放線菌 の重要性は、今後も変わらずに続いてゆくものと考えら れる。

ここでは以下の順に、放線菌の分類研究の現状と問題 点について解説するとともに、分類を含めた研究の今後 の方向について、とりわけ遺伝子レベルの研究の重要性 について、最後に述べてみたい。

- 1) 放線菌の分類の基準として使われる性状
- 2) 放線菌の分離方法
- 3) 放線菌の属
- 4) Streptomyces の分類について
- 5) どのように分類・同定を行うか
- 6) これからの放線菌研究—DNA レベルの研究の重要性

放線菌の生育形態は「かび」に似ていることから,分類学的には「かび」の仲間とみなされたこともあったが,細胞は一般に「かび」よりも小さく,また原核生物であること(核膜やミトコンドリアを持たない)や,細胞壁の成分,リボソームの構造,抗生物質に対する反応(抗細菌剤には感受性であるが抗カビ剤には非感受性)などから,細菌の仲間とすることにはだれも異存のないところであろう。しかし細胞当たりの DNA 量は一般細菌の代表である大腸菌よりもはるかに大きく(Streptomycesの場合),また形態の分化が著しいなど他の細菌とはかなり異なった面を持っており,分類をはじめとして生理,生化学から分子生物学に至るまで,独特の取り扱いを要求されることが多い。

放線菌は生理活性物質の主要な探索源であるという, 主として経済的な理由から,それこそ無数ともいえる数 の菌株が土壌から分離され,その結果としての特許の申 請というこれまた経済的な理由から,あるいは学問的な 研究の成果として,多数の「属」や「種」が提案されて きた。このことが放線菌に関する情報を格段に豊かにし たことはまちがいないが,それと同時に分類に混乱をも たらす結果ともなったのである。

Classification of Actinomycetes. By Kiyotaka Miyashita

近年、形態や一部の生理的性質だけでなく、菌体成分の化学分析や核酸(DNA の相同性、リボソーム RNA の塩基配列など)に基づいて分類を整理しようとする努力が広範になされ、放線菌の分類体系は格段の進歩を示した。その現時点での集大成ともいうべきものが、本年度 (1987 年) に出版が予定されている Bergey's Manual of Systematic Bacteriology の第4巻である。今後しばらくはこの本が 放線菌の分類・同定のマニュアルとなるものと考えられるが、決してこれで終わるものではなく、遺伝子組換え技術を利用した生物学諸分野の発展は目覚ましく、放線菌の分類も今後さらに発展していくものと考えられる。

徴生物中どの範囲までを放線菌とするかは研究者によって異なっているが、order Actinomycetales (放線菌目) 中 mycobacteria と bifidobacteria を除くグラム陽性菌とするのが慣例である。

#### I 放線菌の分類の基準として使われる性状

#### 1 培養性状

培養性状は培養条件、すなわち培地の種類、培養温度、培養時間、接種方法などによって変わってくる。 Streptomyces の場合には ISP (International Streptomyces Program) で決められた培地、接種及び培養、観察方法が標準となっており、一部の ISP 培地は市販されているので便利である。しかし ISP 培地に限らず、いろいろな培地を試みることが有効な場合がある。例えば気中菌糸を形成し難い菌株をプロトプラスト再生用培地である R2YE 培地で培養したところ、気中菌糸を豊富に形成したことがあった。観察事項としてはコロニーの性状、基生菌糸、気中菌糸の色、可溶性色素などがある。

#### 2 形態

放線菌の形態は実に多彩であり、形態の違いを基に多数の属が提案されてきた。現在では確実かつ迅速な化学分析に押されてその重要性が薄らいだ感があるが、依然としてもっとも重要な基準の一つであることには変わりはない。とりわけ胞子を形成する放線菌(Sporoactinomycetes)の繁殖器官の形態は重要である。しかし一体どのような性状を観察すべきかについては現在のところはっきりした基準はなく、場面に応じた対応が必要となる。形態観察では裸眼で言えることは少なく、光学顕微

鏡,電子顕微鏡 (SEM, TEM) が用いられる。電子顕 微鏡の性能の向上,普及は放線菌の微細構造の観察を可 能にした。最近の機種は操作も簡単になったが,試料の 調製にはやはり若干の手間とくふうを必要とする。

#### 3 生理的性質

細菌の分類で用いられるようないくつかの生理試験が、放線菌でも用いられる。実際にどのような試験を行うかは、ここでも扱う菌の種類(属)によって異なってくる。Streptomycesでは糖の資化性、メラノイド色素の生成などの試験が現在のところ用いられている。放線菌の資化性能の試験には一般にプレートが使われるが、その場合接種方法は十分注意する必要がある。その他よく用いられる基準としては、硝酸還元、耐塩性、タンパク分解、デンプンの加水分解、生育温度範囲などがある。

#### 4 生態,病原性

共生窒素固定徴生物である Frankia の場合には、根粒を形成して窒素固定をすることが重要な基準となる。もっとも、現在のところすべての菌で、分離と再接種が成功しているわけではないが。動物病原菌においては病原性は重要であろう。植物病原放線菌についてはまだあまり整理が進んでいないので今後の課題であろうが、現在のところ植物病原性を分離の基準とすることには多少無理があると思う。

#### 5 菌体成分

菌体の個々の成分を分析し、その結果を比較して論じ る化学分類は、今や放線菌分類の主流となった感さえあ る。形態や生理, 生化学的分析に基づく従来の分類は, ともすれば実験者の経験に左右されたり主観の入る危険 性が多分にあった。このことが「素人」を分類・同定に 近づき難くしていた大きな理由であろう。それに対して 化学成分の分析に基づく分類では、多少の分析装置を必 要とするが、むしろ分析機器の発達とともに実験操作は 簡単になり、だれでも再現性のある信頼できる結果が得 られるという大きなメリットがある。このことが化学分 類を盛んにした大きな理由であろう。今後も分析方法, 分析機器の進歩とともに従来は分析できなかった成分の 分析が可能となるであろうし, データの蓄積とともに分 類体系、指標とも進歩を続けていくものと考えられる。 現在分類に用いられている化学成分には、細胞壁成分, リン脂質、ミコール酸、イソプレノイドキノン、脂肪酸 がある。中でも細胞壁組成と全細胞の糖組成(後者だけ で間に合う場合が多い)は薄層クロマトグラフィーで簡 単に分析でき, 有用である。形態観察で属の特徴がはっ きりと認められる場合でも, ジアミノピメリン酸の異性 体の型と、さらに必要なときは、全細胞の糖組成は調べ るべきであろう。

#### 6 核酸 (DNA, RNA)

DNA の塩基組成(GC 含量)は、細菌の分類においては不可欠な基準である。最近普及の著しい高速液体クロマトグラフィーと、ヌクレアーゼ $P_1$ を用いる方法は、簡単で精度も高い。放線菌の場合には GC 含量に関するデータは少ないのが現状であるが、放線菌は唯一の例外である Thermoactinomyces を除くとすべてが GC 含量は 55% 以上と高い部類に入り、分類の基準としてのGC 含量の意義は他の細菌の場合ほど高くはないといえよう。しかし属の定義として、GC 含量がある一定の範囲内に収まることが、多くの場合重要であることには変わりはなかろう。

DNA の分離法の原理は昔と変わらないが、いろいろな変法があり、簡便な方法もずいぶんとある。分類・同定の実験書に載っている DNA の分離法はほとんどが古いものだが、迅速な方法でも  $P_1$  ヌクレアーゼを用いた GC 含量の測定や、S1 ヌクレアーゼによる DNA 交雑の実験にはまったく問題がないはずである。そうした方法を使えば、1人が1日に 10 株程度から DNA を分離することも、十分に可能である。

全 DNA の塩基配列の相同値を比較する DNA-DNA 交雑は、S1 ヌクレアーゼの利用によりずいぶん 簡単に なった。DNA のラベル法も試験管内で行えるので、楽 である。DNA の相同性を測定することの意義について は今さら言うまでもなく、微生物の系統分類は DNA の 相同値を一つのよりどころとして発展してきている。相 同値の高い(誤差の範囲内でほとんど同じ値を示す)2 菌株を同一種とすることはだれも異存のないところであ り、逆に同一種と判定する一番確実な方法はこの方法で あろう。しかし類縁的に多少隔たった菌株間の測定値は バックグラウンドと同じになってしまうため、この方法 は使えない。また DNA の相同値の隔たりが 果 たして 属や種の隔たりを示すかどうかという点については疑問 視する向きもある。しかし少なくとも DNA の相同性 のほとんどないものどうしを同一の種とすることは,無 理な話であろう。この点については早急に解明されてい くものと考えられる。

DNA-RNA 交雑は、DNA-DNA 交雑の使えない遠縁の菌株間の類縁関係を知るのに有効である。

最近リボソームの 5S または 16S サブユニットの RNA (rRNA) の塩基配列から微生物間(またはより高等な生物も含めて) の系統関係を知ろうという研究が盛んになってきた。塩基配列の決定自体は分子生物学の進歩のお陰で日常の手法となってきている。すでに新しい

知見が数多く得られているが、今後さらにデータを蓄積 することによって微生物の進化の道筋が解明されること が期待される。しかしこれは大きなレベルでの比較であ り、種レベルの仕事には使えないであろう。

#### Ⅱ 放線菌の分離方法

放線菌の分離には、目的に応じて様々な培地が用いられる。一般的には starch casein agar, starch glycerol agar, water agar, chitin agar, soil extract agar などがよく使われる。顕微鏡で観察すると一面放線菌に覆われている 堆肥から 放線菌を 分離するとき,通常の培地ではまったく分離できなかったが,その堆肥の浸出液の培地で成功したという例もある。培地上の糸状菌の生育を抑制するのには抗生物質(actidione, nystatin)が有効だが,他の細菌と放線菌を抗生物質で一般的に区別するのは困難である。属や種によっては,特定の抗生物質に対して特異的な耐性を示すものがある。この性質を利用して,分離のための選択培地もいくつか考案されている。

#### III 放線菌の属

放線菌の属の数はかなり多く, 現在までに約50 にも達する。このように属の数が多くなったのは, 放線菌が多様な形態を有しているためと, 最初に述べたように, この菌が産業上有用であるため世界中から膨大な数の菌株が分離され, 試験されてきたためである。

従来の属の中に整理、見直しの必要なものがあることは、以前から指摘されていた。 近々刊行予定の Bergey's Manual of Systematic Bacteriology の第 4 巻では、第 1 表に示した 39 属にまとめる方向で、整理が進められている。従来の属の中で整理(他の属に統合)されるのは、 Actinopycnidium、 Actinosporangium、 Chinia、 Elytrosporangium、 Microellobosporia(以上は Streptomyces と同一)、 Amorphosporangium (Actinoplanes と同一)、 Microtetraspora (Actinomadura と同一) などである。

放線菌を属レベルで分類・同定しようとするとき,化 学分類が非常に大きな力を発揮する。

#### IV Streptomyces の分類について

Streptomyces は放線菌最大の属であり、抗生物質産生菌としてもっとも重要な属である。抗生物質のほかにも各種酵素、色素などを産生し、代謝産物の多様性は他の菌に類を見ない。また植物病原菌もすべて Streptomyces であるし、土壌から分離される放線菌も通常の方法では大多数が Streptomyces である。このようなわけで、この菌

#### 第1表 放線菌の属

1. Nocardioform Actinomycetes

Nocardia
Rhodococcus
Coerskovia
Promicromonospora
Intrasporangium
Nocardioides
Pseudonocardia
Saccharopolyspora
Micropolyspora
Actinopolyspora

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第2巻にすでに記載

2. Actinomycetes with Multi-Locular Sporangia

Dermatophilus

Saccharomonospora

Geodermatophilus

Frankia

Actinoplanes

Ampullariella

Pilimelia

Dactilosporangium

Micromonospora

3. Streptomycetes and Related Genera

Streptom yces

Streptoverticillium

Sporichthya

Kineosporia

4. Maduromycetes

Actinomadura

Microbispora

Microtetraspora

Planobispora

Planomonospora

Spirillospora

Streptosporangium

5. Thermomonospora and Related Genera

Thermomonos pora

Actinosynnema

Nocardiopsis

Streptoalloteichus

6. Thermoactinomycetes

Thermoactinomyces

. Other Genera

Glycomyces

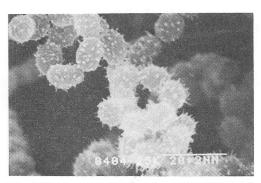
Kibdelosporangium

Kitasatosporia

Saccharothrix

はいろいろな角度から研究されてきた。とりわけ最近の 最大のトピックは、この菌における遺伝子組換え技術の 進歩であろうが、この点については後で触れることとす る。

Streptomyces は、伸長して分岐する基生菌糸及び気中菌 糸を形成する。 基生菌糸が Nocardia のように分断した り、胞子を形成することはまれだが、気中菌糸に分節胞



第1図 Streptomyces の胞子鎖の走査型電子顕微鏡写真

子の連鎖を作る。分節胞子の連鎖は短いもの(3~10個) から長いもの (20~50 個以上) まである。 胞子鎖の形態 はらせん状 (spira), 直線状 (rectus), 波状 (flexibiles), ループ状~開いた不完全ならせん状 (retinaculum-apertum) と、多彩である。また胞子は表面が鞘 (sheath) で覆われ, 胞子の表面構造も多様で平滑 (smooth), いぼ状 (warty), とげ状 (spiny), 毛状 (hairy) などがある。細胞壁タイプはI型,脂肪酸は iso, anteiso の分岐酸タイプ,メナキノンは MK-9,GC 含量は 69~76 mol% である。単純な合成培地によく生育し、プ ロテアーゼ,アミラーゼ,セルラーゼ,キシラナーゼ, ペクチナーゼ、キチナーゼなどの菌体外酵素をよく生産 する。また中にはアガラーゼ (寒天分解酵素) を分泌す るものもある。リグニン分解能を有することが証明され た菌株もいくつか知られているが、自然界のリグニン分 解におけるこの菌の役割についてはまだはっきりしてい ない。大部分の菌株は中温性だが、中には好温性(耐高 温性)のものもあり、堆肥などから高頻度で分離され る。しかし一般に、これら好温で生育できる Streptomyces 株の生育上限温度は他の 好温性放線菌のそれほど は高くないようである。

農業や工業をはじめとした各分野の Streptomyces を対象とする研究者にとって、Streptomyces の分類が重要であることはいうまでもない。単に名前を付けるだけならナンバーでもかまわないが、他の菌と比較するためにはきちんと分類・同定を行うことが必要となる。

形態的には Streptomyces と区別し難い属がいくつかあるが、Nocardia や Actinomadura とは細胞壁組成から簡単に区別できる。 細胞壁組成からも区別できない Actinopicnidium や Actinosporangium、Chinia、Elytrosporangium、Kitasatoa、Microtetraspora などは、先に述べたように Streptomyces に統合させる方向にある。

今までに提案された Streptomyces の種の数は 3,000 以

上ともいわれているが、そのほとんどは特許文献に記載されているだけである。1980年の細菌名承認リスト (approved list)には342種が載っており、いずれにしろ、細菌中もっとも種の数の多い菌であることはまちがいなかろう。このように多数の種が作られたのは単に産業上の要請からばかりではなく、分類体系自体に問題があったためでもあろう。国際微生物会議の放線菌命名委員会が1964年に企画した国際的な共同研究International Streptomyces Program (ISP)などの努力があったにもかかわらず、依然としてStreptomycesの分類は混乱の中にある。現在Streptomycesの新たな分離株を分類・同定するのは実に困難である。他の種と比較するときは単にISPなどの記載と比較するだけでなく、実際にその種の基準株を取り寄せて同時に比較することが望ましい。

現在の Streptomyces の分類体系に対する疑問としては、用いられている試験項目が種の基準として妥当かどうかという点と、項目の数がこれだけで十分かという点がある。現在種の基準として用いられているのは上に述べた胞子鎖の形態、胞子の表面構造のほかに、気中菌糸の色、メラノイド色素生成の有無、それに糖の資化性である。この中には変異しやすい性質もいくつかある。

この Streptomyces の分類体系を抜本的に見直そうという試みは、リバプール大学の S. T. WILLIAMS、ニューキャッスル大学の M. GOODFELLOW ら、イギリスの研究者の手で精力的に行われており、BERGEY の第4巻のStreptomyces の分類はその結果を基に書かれることが確実である。WILLIAMS らは Streptomyces を中心に約500株を対象とし、多数の形質を調べて数値分類を行ったのである。その結果、少数の主要なクラスターと、それよりやや数は多いがその他のマイナーなクラスターとにまとめられた。この仕事の結果、Streptomyces の膨大な数の種を整理する基礎が築かれたとしており、この一つつのクラスターをそのまま種とするのが妥当かどうかはわからないが、かなり少数の種にまとめられることはまちがいないものと思われる。

同時にまた、ここで得られたクラスターは Streptom-yces の従来の分類とは必ずしも一致せず、従来用いられていた基準のうち、例えば気中菌糸の色、胞子鎖の形態、胞子の表面構造、メラノイド色素生成などは、分類の基準として不適当であると述べているが、このことはある程度予想されたとおりであろう。WILLIAMS らの仕事はその後、DNA の相同性や遺伝子の伝達能、化学分類などの仕事により補完する努力が続けられている。

以上のようなわけで、どのような分類体系になるの

か、Berger の第4巻の発刊が待たれるところであるが、中でも興味があるのはどのような同定方法が採用されるかという点である。Goodfellow らは化学分類の手法を Streptomyces の種レベルの分類に用いるべく検討を続けているが、その結果はあまりはかばかしくないようである。

Streptomyces のように長い歴史的背景を持つ微生物の分類は、急激な改革に対しては抵抗があるかもしれない。そうなると、多少の過渡期が必要になることもありうるだろう。しかしいずれにせよ WILLIAMS らの行った仕事の方向に、Streptomyces の分類体系が変わっていくであろうことはまちがいない。

#### ▼ どのように分類・同定を行うか

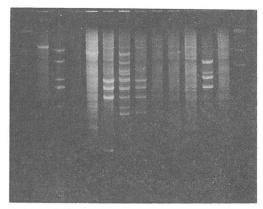
以上述べてきたように、長い間経験と洞察力のたまものであり、専門家以外には近づき難かった放線菌の分類も、周辺の諸科学の進歩の影響を受け、大きく変わってきている。化学分析などにより明確な結論を得ることが可能となった。そして従来の人為的な分類から、科学的で役にたつ、利用価値のある分類にと育ってきている。しかしその反面、形態と若干の性質を調べるだけでよかった以前の分類から比べると、手間を要することも事実である。

分類を専業的に行っている人以外にとっては,分類・同定はできるなら避けて通りたいところであろう。単に名前を付けるだけなら番号でもよいわけだが,しかし Streptomyces sp. では他の菌株,種との比較ができない。既知の菌株ばかりを相手にしているときはよいが,新たな分離株などを材料とする場合,分類・同定が必要となってくる。

分類・同定を引き受けてくれる公的機関が皆無といってよい現状では、ほとんどの場合みずからやってみるしかない。その場合大きな助けとなるのが、分類・同定のためのガイドブックである。最近では日本語のものもいくつか出版されている。とりわけ実験方法はていねいに述べられており、便利である。また化学分類のための分析器具は、薄層クロマトグラフィーはもとより、ガスクロ、液クロに至るまで、多くの試験研究機関で身近なものとなった。こうしてできるだけ新しい解説書を基に、必要に応じて可能ならば経験者に尋ねながら、分類・同定を行っていくことになろう。

# **VI** これからの放線菌研究—**DNA** レベルの研究の重要性

近年、生物学にもっとも強力なインパクトを与えたの



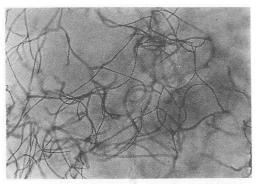
第2図 S. lividans の変異株の DNA の高度繰返 し構造

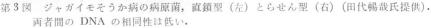
全 DNA を Ban HI で分解後, アガロース ゲル電気泳動を行った. 明るい帯が繰返し構造 (遺伝子の重複を示す).

は、遺伝子組換えを中心技術にした分子生物学であることはいうまでもない。放線菌の分類もその影響を受けてきたがまだ十分とは言い難く、今後の課題であろう。ここでは放線菌を分類しよう、あるいはさらに進んで農業上で利用・制御しようとする立場から、放線菌の DNA レベルでの研究の現状と将来について、簡単に述べてみたい。

形態の分化と二次代謝産物産生は放線菌の大きな特徴であるが、これらが遺伝子のレベルでどのように調節されているかは学問的にも、また実用的にも大きな関心が持たれていた。ほんの数年前まではかなり困難と思われていた抗生物質産生遺伝子のクローニングが、最近ではいろいろな成功例が出ている。こうなると意外に早く遺伝子レベルでの調節・制御の機構が解明され、その結果遺伝子操作による抗生物質産生のより有効な利用法が開発されることが期待される。また、土壌中での拮抗作用に関連した「土壌中でも抗生物質が作られているか否か」という古くて新しい命題も、生態の研究から答えを得ることは今後も難しそうだが、形態分化と二次代謝産物産生の遺伝子の発現機構がわかれば、そちらから答えを得ることが可能になるのではないだろうか。

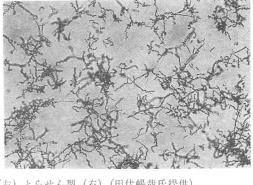
放線菌、特に Streptomyces を扱ってみると、不安定な 形質が多いことに気がつく。メラノイドやその他の色素 生成能、抗生物質耐性能と生産能などは 容易に 欠落す る。培養中に気中菌糸の色が変化したり、らせん状胞子 鎖が巻かなくなったりする。植物病原性が無くなる、な ど。こうした形質の中には現在分類の基準となっている ものもあり、そのメカニズムは学問的にも、また菌株の 保存管理の面からも関心を呼んできた。当初はブラスミ





ド関与説が主流だったが、現在では放線菌の染色体は予 想以上に柔軟で、ある種の DNA 断片の 重複や欠失と いった DNA の再編成が高頻度に起こることが判明し、 表現形質の欠落がその遺伝子の欠失によることがいくつ かの例で証明されている。 DNA の 再編成の 機構とし て、挿入配列 (IS) やトランスポゾンといった可動遺伝 子や, その他の特殊な配列が関与していることが明らか になりつつある。 Streptomyces の遺伝子が 柔軟であると いうことは、何を意味するのであろうか。「Streptomyces は周囲の状況に応じて自らの DNA を再編成しており、 この遺伝子の柔軟性ゆえに Streptomyces は土壌中で優占 できるのである」という説も出ている。また最近, 自然 環境中でプラスミドが個体間で伝達されることを証明す る実験がいくつか行われている。放線菌においても一個 体当たりの DNA は一定と考えられることから、欠失に よって 無くなった分は 他の 個体から 伝達されて補われ ていることも考えられる。すなわち放線菌の個体間で, 大量の 遺伝子の 伝達が 起こっている 可能性がある。そ うなると分類の"種"の概念も、変更する必要が出てこ よう。

ジャガイモそうか病の病原菌 S. scables は分類上問題が多く、とうとう 1980 年の approved list から除外されてしまった。日本でも、かなり性状の異なる複数の病



原菌株の存在が指摘され、DNA の相同性試験の結果、まったく相同性のない菌株が同じ病気を起こすことが確かめられた。このことが意味するのは、まったく独立に病原性を獲得したか、病原性遺伝子が一つの菌株から他の菌株へ転移したか、あるいはまた同じ病原菌から出発して非常に大きく分化したか、の三つに一つである。現在の遺伝子組換えの技術をもってすれば、答えを得ることは十分可能であろう。また病原性遺伝子がクローニングでき、発現機構が解明されれば、病気に対する新しい対応方法が期待される。

以上挙げた例にとどまらず、農業微生物の分野でも基 礎研究のためだけでなく応用を進めるためにも、今後こ うした方向の研究がますます重要になっていくであろ う。

#### 参考文献(放線菌の分類・同定のための参考書)

- 1) WILLIAMS S. T. 編 (近刊): BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, volume 4, "THE ACTINOMYCETES", The Williams and Wilkins Company, Baltimore
- 2) 日本放線菌研究会編(1985): 放線菌の同定実験法,日本 放線菌研究会事務局,東京,344 pp.
- 3) 長谷川徹ら編(1982): 微生物の化学分類実験法, 学会出版センター, 東京, 352 pp.
- 4) 岡見吉郎ら編(1985): 微生物の分類と同定(下巻), 学会 出版センター, 東京, pp. 1~98.

# 植物寄生性線虫の種を巡る問題

# 農林水産省農業環境技術研究所 皆 川 のぞむ 望

#### はじめに

耕地,草地,林地を問わず,土壌中には多種多様な線虫が生息する。自然植生下においては、特定の線虫が際だって多いということはまれだが,そこが耕地化し作物が作られるにつれ,単一または数種の線虫が高密度となり,ときにこれが作物の連作障害・忌地の原因となる。この現象は古くから知られていたが,要因として線虫が発見されたのは,19世紀後半から今世紀初頭にかけてである。

現在,線虫対策として殺線虫剤が使用されることが多い。その登場以前は,輪作によって線虫害を回避していた。わが国の畑作地帯における伝統的な作付体系の中には,その土地に生息する線虫に対応した作物の組み合わせや作付け順序が,合理的にでき上がっている例が少なくない。逆に慣行作付体系が崩れた時期に,被害が顕在化したとも言えよう。このように輪作,あるいは線虫抵抗品種の育成及び利用を考えるとき,線虫の種類,レースの判定は重要な意味を持つ。

#### I 線虫の分類について

今までに約1万5千種の線虫が報告されている。この うち,人間を含む動物に寄生する線虫が約7千,海中に 約4千,淡水に若干の種,土壌中からも4千に近い種類 の記録がある。植物寄生性線虫は,土壌線虫の中の約2 千種である。

線虫の分類の基準は、形態である。土壌線虫は色彩を欠き、表面形態は概して特徴が少ない。種の区別点は、消化器官、生殖器官などの内部形態が主である。これは、分類学上の基本的形質と考えられるものの、近似種間の質的差異が少ないうえ観察が難しく、植物寄生性線虫の大部分が、体長が1mm以下と小さいこととともに、線虫分類学を困難なものにしている。有害線虫の多くは、同一種が世界中に分布する。分布が広く、種内変異が大きいことも問題を複雑にする要因である。

光学顕微鏡の性能の向上や,走査電子顕微鏡の登場に よる形態学的研究の進歩は大きい。生化学,免疫学,行 動学,細胞学,遺伝学,発生学などの手法を用いての研

Species Problems in Plant-Parasitic Nematodes.
By Nozomu Minagawa

究も最近は多くなった。これらは形態分類学で解決できない問題を、別の方面からアプローチする試みである。 当然のことながら、形態分類学では知ることのできない、線虫の機能的な側面を明らかにする場合もある。

農業害虫として重要な、ネコブセンチュウ、シストセンチュウ、クキセンチュウなどでは、寄主反応の違いが見られる種内変異の存在が古くから知られていた。これらの扱いは、初期の植物線虫学では大きな問題であった。現在の知見からすると、1940年代以前の1種とされた中には、多くの種類を含んでいたことになる。寄主反応と形態から別種とされた線虫は、これで分類学上の問題が片づいたかというと、別の手法で検討することによりまた別の問題があることがわかった。次に、このような種レベルの事例について見てゆきたい。

#### II 線虫の種を巡る問題

#### 1 シストセンチュウ

シストセンチュウ類はつい 10 数年前までは、Heterodera という単一の属名であった。 現在では主にシストの形態的特徴により,多くの属に細分される。この処置に関して研究者間で見解の相違があり,同じ線虫の学名(属名)が,人によって異なる例もある。そのことは本項の最後にまた触れるとして,ここではダイズシストセンチュウの種内の変異,及び近縁種との関係を巡る問題に話題を限って進めたい。

ダイズシストセンチュウは、ダイズの連作障害の原因となる線虫である。本種は大正4年、福島県において最初に発見された。その後、北海道から九州にいたる日本全国で検出され、国外でも中国東北部(旧満州)、朝鮮、ソ連極東地方、北アメリカ、インドネシアに分布する。

本線虫抵抗性ダイズの育種は、日本、アメリカで行われている。東北地方の在来品種"下田不知"は、本線虫に免疫性であった。中国の在来品種の中にも抵抗性のものがある。しかし、抵抗性とされるこれら品種も、別の土地では線虫の寄生を受ける例があることから、線虫個体群の中に寄生性の異なるレースの存在が知られた。

ダイズシストセンチュウは、アメリカ国内に四つのレース、日本からはレース1と3、及び5番目のレースが記録された。レースは判別品種に対する寄生性で判定するが、日本で新たに5番目のレースが検出されたのは、

既知の全レースに抵抗性とされた Pickett 71 に寄生す る個体群が発見されたためである。また、北海道のレー ス 1,3 の中には、"トヨスズ"に対する寄生性が異なる 個体群が見いだされている。このように、判別品種の数 が増すにつれ、レースの数が増加することがある。この 典型的な例が Riggs らの研究である。アメリカと日本 の38個体群を用い、18品種あるいは系統のダイズに対 する寄生性を調査した。それによると、基準とした品種 の寄生度と比べ、寄生の多少によって分ける方法では、 5 品種を用いると供試線虫は6群に分かれ、13 品種で は 25 群に 区分された。 寄生度を 階級値で表す 方法で は、38 個体群は36 群と、ほぼ全部の個体群の寄生性 が異なることが判明した。遺伝学的には、従来のレース 判別方法はナンセンスであると言われるが、今後議論を 尽くさなければならない問題である。レースを五つに分 ける意味が薄れたようであるが、この問題をもう少し見 てゆきたい。

全虫体をもとに作った抗血清では、免疫電気泳動法を用いて、レース 3、4 の違いを識別できなかった。別の論文によると、レース 3 と 4 には共通の抗原があり、それ以外にレース 4 の独自の抗原があるとされた。水溶性の低分子タンパクを抗体とした試験では、ポリアクリルアミドゲルを使用した際は、レースの識別はできなかったが、SDS-PAGE を使用すると、レース 1 と 2、レース 3 と 4 はそれぞれ同じパターンであった。二つのグループに分かれたが、違いはわずか 1 本のバンドにすぎない。

品種に対する反応では、レース 1、3 に対する抵抗性品種は、レース 2、4 には感受性の場合が多い。またレース間の交雑試験では、偶数番号どうし、あるいは奇数番号どうしの交雑で、 $F_1$  の雌成虫の 産卵率、 産卵数ともに高いが、偶数と奇数番号のレース間では、 $F_1$  雌成虫の産卵率、産卵数は共に少ない。 寄生性は レース 2、4 の性質が優性遺伝となる。しかし、レース 3 と 4 の組み合わせからできた  $F_2$  の寄生性は、既知のどのレースとも異なった。染色体はすべてのレースが 2n=18 とされる。

アメリカのダイズシストセンチュウと、テンサイシストセンチュウは交雑可能である。前者の雌と後者の雄の組み合わせの 16% (数にすると 20 個体) で、 $F_1$  の雌成虫が育ち、そのうち 18 個体が産卵した。13 の雌成虫の卵からふ化した幼虫は、テンサイ、ダイズの双方に寄生性を持たず、1 雌からのは双方に寄生した。4 雌からの幼虫はテンサイだけに寄生した。 また、 $F_1$  どうしの交尾もあり、産卵が確認された。 $F_1$  幼虫の口針節球

の形態は、どちらか一方に似た個体、両種の中間などさまざまであった(MILLER、1983)。この試験結果、及びアメリカ国内における分布が重ならないことなどから、MILLERは、両種は亜種の関係にあると述べている。

ダイズシストセンチュウと、今は別属とされるジャガイモシストセンチュウ近縁種(G. solanacearum) の間に、属間雑種ができることも 報告された(MILLER、1983)。 Wouts (1985) のシストセンチュウ科の分類体系では、Heterodera 属と Globodera 属は別亜科とされる。しかし MILLER も述べているように、両属は分類学上、それほど離れた関係ではないのではないだろうか。

#### 2 ネコブセンチュウ

ネコブセンチュウは 60 種に近い種類が記載されている。世界的に見て分布が広く、検出頻度も高く、しかも重要 害虫と なると、 サツマイモネコブセンチュウ(以下、 MI と呼ぶ)、 ジャワネコブセンチュウ(同、 MJ)、 キタネコブセンチュウ(同、 MH) アレナリアネコブセンチュウ(同、 MA) の 4 種である。 わが国では、最初の 3 種が農業上重要である。

ネコブセンチュウの同定は、雌の体の後端のクチクラの模様を基に行う。上記4種について検討した結果、雄成虫の頭部、雄・雌成虫の口針節球の形などにも種間差を認めた。また、より多くの種類につき、上記形質に加えて、幼虫の形態により識別する試みもある。

ネコブセンチュウにおいても,種の識別や種内のレースの判定に,酵素や全虫体のタンパク質の電気泳動や,血清学的手法による比較が試みられている。 MI,MA,MJの雌成虫のアイソザイムの比較では,isoesterase b は種の同定に,isoesterase  $\beta$  は種内の変異の検出に使用可能であるとされた(Dalmasso and Berge,1983)。しかし,一般にこの属においては泳動パターンに,発育ステージによる差,寄主の影響が大きく,また種内変異とその意義の関係が不明であったりするため,生化学的なデータは形態的特性を 補足する 意味は 大きいが,形態以上の重要性は少ないとされた(Dalmasso and Berge,1978)。

世界のネコブセンチュウの分布,被害などに関する研究が,アメリカのノース・カロライナ州立大学を中心に行われた。集められた850の個体群のうち,MIが51%,MJが31%,MHが8%,MAが8%,残り2%は12種を含んでいた。形態や寄生性の検討と平行して,500個体群の染色体数が調べられた。その結果,本属の基本染色体数は n=18 であった。この染色体数の種類は、寄主範囲が狭く、つねに有性生殖、あるいは雄の存在するときのみ有性生殖をするという,共通の性質を有

していた。 MH の1個体群を除き、基本数の2倍の染色体を持つ種類では、無性生殖を行う。しかもこの場合、生殖細胞では減数分裂は見られず、寄主範囲も広い種類が多い。 MA では判別寄主で二つに分けられたレースが、染色体数でも2倍体と3倍体に区分された。 MJ にはレースの報告はなく、染色体数はばらつきはあるが、すべて3倍体と考えられる。 MI では大多数の個体群は3倍体で、わずかに2倍体が混ざっていた。 MH では半数性のもの、2倍体、3倍体があり、半数性のみがつねに雄が存在し、両性生殖を行う。重要害虫である種は、2倍体、3倍体が主であった。このように染色体数と、生殖方法、寄主範囲などの関係が明らかになった。

#### 3 ネグサレセンチュウ

本属の線虫は世界でおよそ 70 種, わが国からは 20 種が報告された。このうち国内の農業生産で特に問題となるのは、ミナミネグサレセンチュウとキタネグサレセンチュウである。両種とも寄主範囲が広く、前者は西日本で、後者は東日本、北日本において多くの畑作物、そ菜に被害を与えている。ここでは、分類学上また農業上しばしば問題とされる、キタネグサレセンチュウ(以下、Ppと呼ぶ)とキクネグサレセンチュウ(同、Pf)の関係に焦点を絞って話を進めたい。

両種の区別点は、Pp の尾端はスムーズで、Pf では体環があることとされる。世界各地のPp 個体群の比較によると、尾端部は単一雌の卵からふ化した個体の中でさえ変異が大きく、これだけでは2 種を分けることはできない。線虫の分類では、体の前端、つまり"顔"の形態が重要な形質とされる。イギリスでも日本でも、Pp とPf の走査電顕で見た"顔"の形態に違いが認められない。しかし、イギリスのPp とPf の交雑実験では、 $F_1$  は少数 できたが $F_2$  はできなかったため、両種は別種とされた。

Pf は Pp の種内変異にすぎないと結論を下したコーネル大学のグループは、その後アメリカ国内の Pf 的個体群と Pp 的個体群を、低照明下で作物に接種し比較した。その実験では、 Pf 的個体群のみがエンドウ、ハツカダイコン、タマネギの生育を阻害した。特にこの個体群はハツカダイコンで増殖できたが、 Pp 的個体群は増殖できなかった。イギリスの Pf は根の表皮に寄生し、ネクロシスを 起こした 組織では 増殖しないのに 対し、Pp は表皮及び中心柱に寄生し、病斑部でよく増える。ドイツでは Verticillium albo-atrum と Pp をホウセンカに接種すると植物体にネクロシスが生ずるが、 Pf とででは生じない。

わが国においては、中部、近畿地方の尾端に体環を持つ個体群は、キクネグサレセンチュウと同定された。これらはキタネグサレセンチュウと同一サンプル中に混じって検出される。アメリカ、ヨーロッパの例を見ると、形態だけでは両種の区別は不十分で、寄生性の検討などが必要のようである。日本の Pf 的個体群が、キタネグサレセンチュウの単なる形態上の種内変異なのか、あるいは欧米で見られるように、寄生性など生理的にもキタネグサレセンチュウとは異なった生物であるのか、今後検討されるべきであろう。

#### 4 マツノザイセンチュウ

マッの 枯損の 原因となる マッノザイ センチュウ (以下,Bx と呼ぶ) に対し,病原性の弱いニセマッノザイセンチュウ (同,Bm) という種類がある。 両者は 形態的には,雌成虫の尾端が Bx では 丸いあるいは 短い刺状の突起があり,Bm ではつねに Bx に比較して長い突起がある点で区別できる。分散型第3期幼虫の尾端の突起は,Bx では欠き,Bm では存在する。分布は,Bx がここ 20 年くらいの間に,西日本から始まり,徐々に東に分布を広げて東北地方に達したのに対し,Bm は初めから東北地方を含む日本各地にいた。

日本国内の個体群を用いた両種の交雑実験結果では、 $F_1$  は数の多少はあるが、すべての組み合わせでできるものの、形態は異常なものが多かった。しかし、 $F_2$  を作る試み及び戻し交雑はすべて失敗している。このことから、両種は別種と結論された(Mamiya, 1986)。

Kondo ら (1982) も日本の  $Bx \ge Bm$  の交雑から,同様の結果を得た。またアメリカと日本の Bx 間の交雑では,遺伝的障壁は存在しないことを確認した。これはわが国の Bx が,北アメリカからの侵入害虫とする説を支持するものであろう。Wingfield ら (1983) によると,アメリカと日本の Bm 間では 交雑できないが, アメリカの Bm E Bx の間は交雑可能であり, 両者は同一種内の変異であると結論した。Bolla ら (1985) は,アメリカ国内に分布するストローブマツ,ヨーロッパアカマッに対し寄生性が異なる 個体群を,Biotype と呼んでいる。

一方、フランスにも同属の線虫がいる(以下、BF)。BF 個体群中の尾端突起の長さの変異幅から、Bm とBx は同種の種内変異にすぎない、とする説もある。BF と日本のBx、Bm の、卵殻のポリスチレンに対する粘着性と、麦芽レクチンに対する結合性が比較された。BF の尾端の形態は、日本のBm と似るが、BF はポリスチレンに対して、Bx に近い性質が1系統、Bm に近いもの1系統、それらの中間的なもの3系統とさまざま

であった。レクチンに対しても、 Bx と同様の反応を示したのが 1 系統、 Bm と同様の反応を示したのが 4 系統であった。

BF と日本の Bx, Bm のエステラーゼのアイソザイム,及びリンゴ酸脱水素酵素の電気泳動パターンを比較すると,Bx と Bm は違いはあるが,二つの酵素ともよく似たパターンを示したのに対し,BF は両方の酵素の泳動パターンともに日本の2種と大きな違いがあった。また BF と Bx は 交雑 可能だが,BF と Bm は 交雑できない。別の BF の個体 群と,日本の Bx,Bm では交雑可能と報告された。De Guiran らは,これらは "superspecies" とする考えを示した。

被害の面では、土着の線虫は土着のマツに対する病原性は強くなく、線虫、ベクター(カミキリ)、マツは、安定した共存関係、あるいは線虫は衰弱したマツにおいて細々と世代を繰り返しているように見える。それに反し、外来の線虫は在来のマツの枯損を引き起こし、逆に外来のマツが、在来の線虫による被害を受けている。

マツノザイセンチュウとニセマツノザイセンチュウの 分類学上の問題の解決は、マツノザイセンチュウがわが 国への侵入害虫であると考えられることから、日本国内 の個体群を対象とした研究だけではなく、今後さらに北 アメリカ、ヨーロッパ、中国、同属の線虫のいるシベリ アなどの個体群との比較検討が必要となるだろう。

#### 5 ミカンネモグリセンチュウ

ミカンネモグリセンチュウの中の、寄生性の異なるレースは古くから知られていた。フロリダ大学の HUETTEL らは、二つのレースは同胞種で、別種であるとして、バナナ・レースが真の Radopholus similis (以下、Rs と呼ぶ) であり、カンキツ・レースについては R. citrophilus (同、Rc) と命名した。

両種の違いは、Rs は世界に広く分布し、バナナに寄生するがカンキツ類では増殖しないのに対し、Rc の分布はフロリダとハワイに限られ、カンキツでもバナナでも増殖可能な点である。染色体数は、Rsは n=4, Rc は n=5 であった。胚子発生、 性誘引・交雑試験、電気泳動法によるアイソザイム及びその他のタンパク質の分析

でも、両者の差異は認められた。しかし、形態は今のところまったく相違点が見いだされていない。HUETTEL ら(1984) は、従来レースと呼ばれていたものの中に、詳細な研究によって、同胞種とされるものが含まれている可能性が大きいと述べている。

#### おわりに

形態的形質の検討では解決されない問題を,他の手法を用いることにより回答が得られる,あるいはその糸口をつかむ手助けになる場合がある。しかし,上に挙げた事例で見てきたように,形態的なもの以外の形質,例えば寄主範囲,交雑試験,アイソザイムの電気泳動などは,どれを取っても,それだけで種を分ける確実な決め手とはならない。最終的には研究者の判断が必要である。

これら形態学以外の手法は、種のレベルの研究では多く取り入れられてきているが、線虫のより高次な分類への適用については、今のところ手を付けられていない。 属科目などの分類体系は、形態を基にできており、化学分類などの手法が、実際に使えるかどうかも未知と言わざるをえない。生物はさまざまな機能を持つ。上に見てきた化学的形質は、その機能の一部であり、形態と同列の形質と考えるのが自然ではないだろうか。

ここに紹介した事例から、線虫の種が不明確という印象を受けるかもしれない。しかし、日本国内のように限られた地域を対象とした場合は、形態を基に種の同定が可能である。それが、グローバルな観点からすると、分類上不明確な点や疑問が残るケースがある。今まで見てきたのは、このたぐいの例が多い。

これら形態学的手法では解決できない問題には、当然のことであるが形態以外の形質一生きた生物の機能的な特徴一に関する研究が重要となる。植物寄生性線虫の場合は、特にこれらが害虫としての特色を示すことも多いのを考え合わせると、今後より広い諸分野の手法を取り入れ、形態学的検討とともに、線虫分類学を推し進める必要があると考える。 (引用文献省略)

# 農林水産省微生物ジーンバンクについて

# 農林水産省農業生物資源研究所 松 本 和 夫

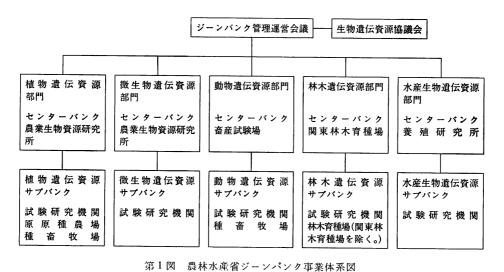
#### はじめに

バイオテクノロジーなど先端技術の急速な 発展によ り、遺伝子操作を含む新しい細胞工学的手法によって農 林水産物の品種改良や物質生産に革新がもたらされる可 能性が高まっている。元来生物はそれぞれ固有の遺伝子 を持ち、その表現型である諸特性によって、あるものは 人間生活に欠くことができない衣食住をはじめとする必 要物質を提供し、利用されてきた。新しい科学技術はこ れをさらに進めるとともに、未利用の生物にも遺伝資源 としての価値があり, 広く収集, 保存する必要性が認識 されてきた。一方、世界的規模で見ると、人口増加、経 済発展によって食糧不足、耕地山林の荒廃、生物資源の 喪失から, 農林水産業の振興, 緑の保全, 環境保全など の重要性が叫ばれて久しい。生物資源は一度死滅すると その復元を望めないことから、生物資源の滅亡から地球 を守る一方、遺伝資源としての重要性の認識から、世界 各国とも生物資源の確保、保存を図るようになってきて いる。

従来からも生物資源の維持保存が図られてきたが、農 林水産省では、昭和 60 年度から植物(作物、林木)を はじめ、動物、微生物、水産生物に至る広範囲の生物資 源を収集,保存管理,利用するため,第1図に示すような体制で,農林水産省ジーンバンク事業を開始した。農林水産省ジーンバンクでは国内外から収集した各種の生物資源を分類・同定し、特性の評価を行うとともに、それら資源の増殖,保存を行い、遺伝資源の配布およびそれらの情報を提供することを目的としている。ここでは微生物部門のジーンバンク体制を紹介する。

#### 微生物ジーンバンク

微生物は、物質の生産機能、分解機能が高いことから 広く利用されているが、細胞工学的手法により物質生産 あるいは変換の効率的利用が期待される。また生物病原 体としての微生物があり、農林水産物・食品の高品質生 産、家畜などの障害・病害など、重要な阻害要因をなし、 今後とも防止策の対応が必要である。そこで微生物シー く後とも防止策の対応が必要である。そこで微生物シー ンバンクでは、「農林水産物生産、食品加工等多岐の用 途」(事業実施計画) にわたる細菌・放線菌、糸状菌・酵 母、ウイルス・ファージ、マイコプラズマ、リケッチア、 培養細胞、形質転換菌、DNA・RNA、線虫、原虫等を保 存対象としている。その関係する分野も農業、林業、蚕 業、畜産、食品加工、水産業、環境保全などにわたる。こ れらの微生物の収集、分類、同定、特性評価を行い、保存



Newly Established Gene Bank Center (Microorganisms), Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in Japan. By Kazuo Matsumoto

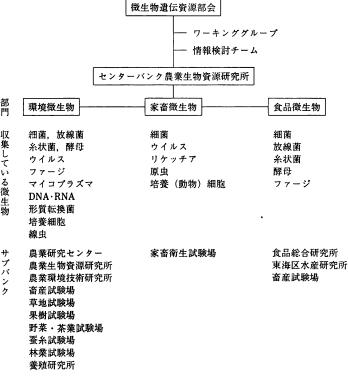
し,保存株及びその情報を提供する。

#### 1 組織

農業生物資源研究所に遺伝資源センタ - (通称)を設置し、センターバンクと して位置づけ、微生物保存研究チーム, 微生物探索評価研究チームほかがその任 に当たっている。 遺伝資源 センター で は、微生物の収集、増殖、保存のほか保 存全微生物の情報を把握, 提供し, 保存 株の配布業務を行う。サブバンクとして 第2図に示す研究機関がセンターバンク と連係をとりながら、それぞれの専門分 野の微生物を収集, 増殖, 特性評価し保 存する。微生物はその範囲が多岐にわた り、また長期保存に耐えられない株も多 くあり、安全のためセンターバンクと二 重保存を行う。遺伝資源センターは、昨 年 12 月に保存研究チーム, 探索評価研 究チームに増強され第3図に示す運営体 制で,また遺伝資源管理施設(第4図) は, 本年 12 月に完成し体制が整う予定 である。なお、 微生物のうち人畜毒性が 強い病原体は、サブバンクである専門場 所の家畜衛生試験場で取り扱う。

#### 2 微生物の取り扱い区分

微生物は、研究、保存および配布対象の区分によって ワーキング、ベース、アクチブのコレクションに3区分 (第1表) している。保存情報のデータ・ベース化はベ ース・コレクションより、配布はアクチブ・コレクショ ンからとしている。利用者には配布目録によってアクチ

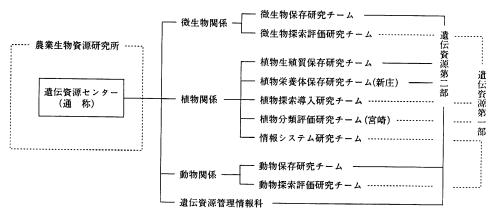


第2図 農林水産省ジーンパンク事業 (微生物遺伝資源) 保存推進体制

#### 3 保存微生物株の持つ意味

すでに述べたように微生物ジーンバンクでは収集保存の対象とする微生物の種類、収集分野は広範多岐にわたっている。同種の微生物を保存することも多くなる。ここで保存株の持つ意味を考えておきたい。ここでは植物病原菌を例にして考える。

ブ・コレクションより選択していただくことになる。



第3図 農業生物資源研究所遺伝資源センターの体制・運営



第4図 遺伝資源センター(通称)遺伝資源管理施設 (1987 年 12 月完成予定)

第1表 微生物の保存区分

ワーキング・ コレクション	国内外から収集され、将来ベース・コレクションまたはアクチブ・コレクションに入れる目的で一時的に保存または研究中の微生物群
ベース・ コレクション	ワーキング・コレクショ間に遺して一 時的に保存されている間に遺伝・・ として資産をといる間に選ぶ・ としてでの基準 (バスボート ータを含む一次的評価及び増殖) 満たし、かつ極長期保存の対象とする できるであり、原則として配布の対象としない.
アクチブ・ コレクション	ベース・コレクションの内,配布用として保存される微生物群で,数量等が確保されており,研究等への利用が期待されるものをいう.ベース・コレクションと二重保存される.

第2表 植物病原菌の区分 (YODER et al., 1986 よ り作成)

菌株型	採 集 地 別	菌の系統
野 外 型	野外分離菌	菌 系
(wild type)	(field isolate)	(strain)
変 異 株	実 験 系	レース
(mutant)	(laboratory strain)	(race)

取り扱う 植物病原菌は、野外から 直接とった 野生型 (wild type) か、実験室内操作で生じた変異株(mutant) が多いであろう。 YODER ら(1986)は第2表のように整理している。

菌系(系統、strain)は、クローンの関係がある個体または細胞のグループで、同じ種であるが同一でないものを区別する一般用語である。植物病理分野では遺伝的特性情報の少ない菌を扱うことが多いが、同一であることが同定されない限り、すべての培養株は異なった菌系に属すると考えたほうがよい。レース(race)は菌系より広義の用語で、病原型(pathotype、宿主の特異性で同定される)、生態的な生物型(biotype)などを含む。

野外分離株 (field isolate) は野外 (自然) から直接 とった菌系で、実験室操作で遺伝的変化が見られないも

の。実験系(統)(laboratory strain) は,一つあるいは それ以上の野外分離株から変異や交配の結果生 じた 菌 系。野生型 (wild type) は、遺伝的標準菌として注意 して選んだ一つあるいはそれ以上の菌系を意味する用語 である。植物病原菌はいろいろな genotype の混群 (個 体群)と考えられるから、そのいずれも野生型と考えら れる。しかし野生型は、"自然(野外)からとった菌系 (strain)"とは同義語ではない。 野生型の 標準菌は実験 室内の保存系統(実験系)から選ばれることも多いこと から,一般的な野生型,野外分離菌とは違うと考えられ る。変異株 (mutant) は、少なくとも一つの遺伝子座の 変異 (mutation) によって生じた株で、野生型とは異な った系統である。野生型とか変異株の用語は、菌系を定 義するほか染色体や対立染色体の変異によるものかを表 すためにも用いられる。自然 (野外) にある菌系や増殖 の過程で見られる自然に起きた差異には別の用語おそら く variant を用いるべきであろう。

このように植物病原菌も明らかにその持つ遺伝子の構造, 作用に着目して区別される方向にある。遺伝特性情報の明らかでない微生物では, いろいろな可能性を秘めた菌系から成り立つと考えるのがよい。同種でも複数の菌系を保存する理由があるのである。

#### 4 微生物の収集と受け入れ

センターバンク, サブバンクでは, 国内外から積極的 に収集に努めることはすでに述べたが, 同時に広く各分 野の研究者より微生物株の寄託, 提供を受け, 微生物資 源の維持, 保存に努めるとともに, 機能の充実を図る。

そのためには、特に微生物の分類・同 定 の 分 野、保 存、情報管理などの機能の充実を図り、信頼にこたえな ければならないが、ご協力をお願いしたい。

保存に移される菌系は、単純で短い固有の保存番号(受入番号)を与える。菌系を受け入れたときは、その原名、種名、分離源、分離者・同定者名、提供者名などをデータベース(パスポート情報といっている)に記録する。利用にあたって、原記載、genotype、phenotype など菌系の情報を把握あるいは提供できるようデータベースの整備を図っている。

#### 5 保存方法

微生物を安定して遺伝形質を変化させないで供給するため、簡便で省力的な長期保存法が開発されている。乾燥、凍結乾燥、L-乾燥、凍結などの方法で、保存温度も室温から液体窒素( $-196\,^{\circ}$ C)の範囲まであるが、-般には -70 から  $-196\,^{\circ}$ C が多い。多くの文献(参考文献の  $2)\sim9$ ))があるので参照されたい。農林水産省ジーンバンクでもこれらの方法によっているが、要点は、

保存株は連続的な継代培養や冷蔵庫内の液体培地のような代謝が行われるような状態での保存は避ける。遺伝形質の変化が起きやすいからである。

しかし、安全な保存法が未開発の種類、特に糸状菌などの場合は、長期保存法を検討しながら、既存の方法で保存し、順次安定した保存法に切り替えていく。

#### 6 微生物遺伝資源の特性評価と情報管理

徴生物遺伝資源として利用促進を図り、管理を適正に行うため、一次特性(属または種の識別に必要な形態的特性)、二次特性(病原性、利用の可能性など)、三次特性(生理活性物質、有効物質の産出など)の諸特性を調査、評価することにしている。現在、種名、来歷、分離源、収集場所、保存機関など一次特性を中心とした(パスポート情報)保存目録の作成中である。次いで二、三次特性を含む特性情報のデータ・ベースを作成し、効率的利用の促進を図るよう計画を進めている。これらは保存株目録、配布株目録として提供される。配布は、原則としてアクチブ・コレクションを対象とすることはすでに述べたとおりである。

#### 7 配 布

現在,農林水産技術会議事務局で配布規定の検討中であり,近く一般に試験研究用として配布(有料)できることになろう。分譲受付,手続きは,センターバンクで行う計画である。

#### おわりに

このように,農林水産省微生物ジーンバンクは発足し

た。ジーンバンク事業では昭和 67 年度末には保存徴生物株として 13,000 点の保存を目標としている。そのためには、必要なセンターバンクとしての機能の充実や体制を確立し、収集・有効利用のため国際、国内の保存機関との連携、協力に努めなければならない。また研究者の積極的な協力、支援をお願いしたい。

#### 参考文献

- 1) Boswll, K. F. et al. (1986): Rev. Plant. Pathol. 65 (5)221~231.
- 2) Fennel, D. L. (1960): Bot. Rev. 26:79~141.
- HATT, H. ed. (1980): American type culture collection methods. I. Laboratory manual on preservation freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection. Maryland, USA. 51pp.
- KIRSOP, B. E. and J. J. S. SNELL ed. (1984): Maintenance of microorganisms, Academic Press, NY, 207pp.
- 5) KURTZMAN, C. P. (1985): The ARS culture collections: present status and new directions. Proof from author.
- 6) ——— (1980): The preservation of microorganisms by freezing and freeze-drying. Workshop in conjunction with the annual meeting of the society for industrial microbiology. Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA. 9pp.
- 7) 根井外喜男編(1977): 微生物の 保存法, 東大 出版会, 441pp.
- 8) 農業環境技術研究所編 (1986): 微生物の長期保存法に関 する研究推進会議資料および同文献集録
- SMITH, D. and AGNES H. S. Onions (1983): The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute. 51pp.
- 10) YODER, O. C. et al. (1986): Phytopathology 76 (4) 383~385.

### 本会発行図書

# 日本有用植物病名目録

日本植物病理学会 編

### 第3巻(果樹編)

B6判 198 ページ

定価 2,300 円 送料 200 円 採録樹種:温帯果樹,熱帯果樹な

ど 43 種

# 第4巻(針葉樹編)

B6判 232 ページ

定価 3,500 円 送料 250 円 採録樹種:林木,緑化樹,竹笹な

ど 112 種

#### 第 5 巻 (広葉樹編)

B6判 512 ページ

定価 3,900 円 送料 300 円 採録樹種:林木,花木,緑化樹な ど 387 種

お申込みは前金(現金・振替・小為替)で本会へ

(なお, 第1, 2巻は日本植物病理学会で発行しております)

# 植物病原細菌・糸状菌の保存法

# 農林水産省農業環境技術研究所 土 屋 行 夫

#### はじめに

植物病原細菌・糸状菌は環境の変化によって常に変異を伴い、さらにその取り扱いかたによって病原性の減退、喪失など重要な性質に変異を起こしやすい。継代培養の過程で、病原性や胞子形成能の減退、死滅、雑菌混入などのトラブルが生じることはだれもが経験することである。試験に用いる菌株は常に再現性を持つことが重要で、遺伝形質を損なうことなく長期にわたって安定保存することは、各研究者や機関でそれぞれ試みられ、実施されている。植物病原細菌は属が限られており、その歯類にわたっており、それぞれ保存方法にくふらがなされているが、保存が難しいものもある。また人工培地で発達できない純寄生菌は、限られた季節に特定の地域に発生するので、必要に応じて試験に供し難く、宿主植物によって継代保存される例が多い。

植物病原細菌・糸状菌に用いられている主な簡便保存 方法について 述べ,適用の 広範な 凍結乾燥法, L-乾燥 法,液体窒素を含む超低温保存法については 詳 述 し た い。

なお微生物の保存法について根井編の成書 (1977) が あり、農林水産技術会議事務局から、農林水産関係の微 生物保存法マニュアルの出版が予定されている。

#### I 植物病原細菌・糸状菌に用いられている 主な簡便保存法

#### 1 流動パラフィン重層法

斜面または高層培地で十分生育した菌の上に滅菌流動パラフィンを 1 cm 重層保存する方法で、空気の流通による代謝を抑え、また培地の乾燥を防ぐので長期間保存できるが、継代培養法同様、変異、死滅、雑菌混入のおそれがある。菌株によってかなり長期の保存例が報告されている(Little and Gordon, 1967)。

#### 2 滅菌土壌法

湿潤な土壌を用いる方法、乾燥した土壌を用いる方法がある。前者は植物病原細菌のほとんど(Lelliott.

Preservation Methods for Plant Pathogenic Bacteria and Fungi. By Yukio TSUCHIYA

1965), Fusarium, Helminthosporium などの糸状菌 (Co-RNECK, 1951; JONES, 1974) に,後者は胞子形成菌株に有効であり (阿部, 1977; 横山, 1977),病原性の低下を防ぐ長期保存法として優れている。

#### 3 シリカゲル法

小試験管に無色シリカゲルを入れて綿栓し,乾燥滅菌したのち,胞子塊,罹病組織などを入れてデシケータ中で低温保存する。この方法は植物病原細菌でも試みられている(TROLLOPE, 1975)。

その他の乾燥保存法は、磁器ビーズに付着 させる 方法、担体を用いないで胞子や罹病組織をデシケータ中に保存する方法など各種試みられている。

#### 4 懸濁液法

滅菌した蒸留水, リン酸緩衝液 (pH 7.0), 井戸水などに保存する方法で, 青枯病菌の長期保存 (KELMAN, 1965), 鞭毛菌類 の 寒天培養 ブロックを 用いた 保存例 (SMITH, 1984) があるが, 適用菌株が限られている。

#### 5 凍結法 (-20~-40°C)

1.5% グルタミン酸ナトリウム+10% スキムミルクを 小試験管に分注,滅菌して植物病原細菌を懸濁し,普通 の冷凍庫で凍結保存することで長期間保存できる(西山, 1977)。凍結融解をかなり 繰り 返しても生存し,一連の 実験を続けていくために,その期間内の保存方法として 優れている。

植物病原糸状菌では胞子を形成した試験管をそのまま 冷凍庫で凍結保存するか,滅菌スキムミルクの入った小 試験管に胞子を入れて凍結保存する。この方法は凍結融 解による損傷が大きいといわれる。しかし抗菌物質生産 菌株の一部は,斜面培地培養菌を凍結保存すると,他の 保存法より抗菌物質産生能の保持に有効な方法であると いう報告がある(渡辺ら,1980)。

#### Ⅲ凍結乾燥法

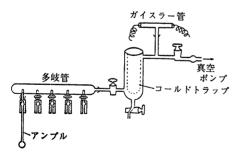
凍結真空乾燥装置、アンプルなどの機器が必要である。凍結真空乾燥装置は第1図にガラス製のものを示したが、現在はほとんど金属製である。原理はどの製品も同じで、資料を乾燥させる部分(多岐管)、水分トラップ(コールドトラップ)、真空計、それに真空ポンプから成り立っている。アンブルは脆損の少ない丈夫なものが

供 試 菌 名	保存年数	接 槌 植 物	接種方法	病 原 凍結乾燥 保 存 菌	性* 継代培養 保 存 菌
Agrobacterium tumefaciens Gorynebacterium michiganense pv. michiganense	19.5 7	カブ(根), トマト(茎) トマト	刺針 断根	<del>   </del> 	## -
Erwinia carotovora subsp.	21	ジャガイモ (塊茎), ニンジン (根)	刺針	##	_
Pseudomonas caryophylli Ps. marginalis pv. marginalis	11.5 18	カーネーション ジャガイモ (塊茎), ニンジン (根)	断根 刺針	## ##	+ -
Ps. solanacearum Ps. syringae pv. coronafaciens Ps. syringae pv. japonica Ps. syringae pv. lachrymans Xanthomonas campestris pv.	22 20.5 20.5 18 17	トマト, ナス エンバク (葉) オオムギ (葉) キュウリ (葉) ダイコン (葉)	断噴刺噴刺噴刺	# # # #	- + + +
campestris X. campestris pv. oryzae	17	イネ (葉)	刺針	111	+

第1表 植物病原細菌の凍結乾燥保存菌と継代培養保存菌の病原性の比較

第2表 植物病原糸状菌の凍結乾燥保存菌と継代培養保存菌の病原性の比較

供 試 菌 名	保存年数	接種植物	接種方法	病 原 性* 凍結乾燥保存菌 継代培養保存菌
Cochliobolus miyabeanus	21	イネ(葉)	噴霧	#
Corticium rolfsii	12	ホワイトクローバー	土壌灌注	
Fusarium oxysporum f. sp. niveum	12	スイカ	土壌灌注	
Glomerella cingulata	12	リンゴ(果実)	切傷	

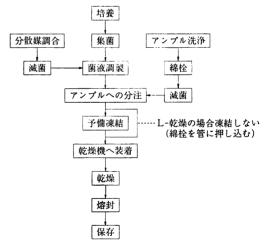


第1図 ガラス製凍結真空乾燥 (L-乾燥) 装置

よい。筆者はパイレックス製  $8 \times 150 \, \mathrm{mm}$  中肉,棒状のものを用いている。

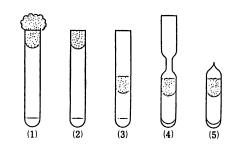
凍結乾燥の手順は第2図に示したとおりである。アンプルへの 菌液分注量は 上記アンプルを 用いる 場合 0.1 ml がよい。多すぎると乾燥の過程で,自己蒸散熱が 奪われて凍結状態を保っている部分から下が溶けて突沸することがある。 分散媒は現在 1% グルタミン酸 ナトリウム+ 10% スキムミルクを用いている。

植物病原細菌はすべて,凍結乾燥後 4~5°C に保存す

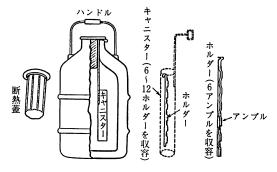


第2図 凍結乾燥, L-乾燥保存の手順

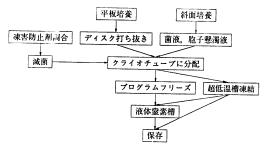
ると長期間生存し、同糸状菌も胞子か、成熟した菌核は 生残率は低いが同様長期間生存していた。青枯病菌とご ま葉枯病菌で調べたところ、21 年で生残率が 1/10 に低 下した。凍結、乾燥とかなり厳しい条件下に置かれるの



第3図 L-乾燥標本の調整法 (坂根)



第4図 小型液体窒素保存容器



第5図 超低温槽,液体窒素槽保存の手順

で変異株が発生するとの報告があるが、分散媒の保護作用もかなりあると考えられる。凍結乾燥後低温保存した 青枯病菌の病原型コロニーの出現率は、筆者の試験では 100% であった。凍結乾燥保存後、病原性を調べた結果 は第 1,2 表のとおりである。

#### Ⅲ L-乾 燥 法

L-乾燥法は drying from the liquid state の意味で, Annear (1958) が,凍結乾燥の難しい微生物を対象に開発した方法である。 飯島と坂根(1970)も独自の方法を開発し,わが国で,発酵研究所をはじめ広く用いられるようになった比較的新しい方法である。

機器は凍結乾燥とまったく同じで, 手順は第2図に示

したとおり、凍結させないで濃縮乾燥する。発酵研究所 の方法を第3図に示した。試料を分注後、アンブルの綿 栓頭部を焼いたのち切り捨て、アンブル中に残りの綿を 押し込む。乾燥時間は2時間と少なくて済む。試料から 乾燥した綿に 水分が移行し、程よい乾燥状態が保たれ る。

坂根ら (1985) は変異の誘発を防ぐ化合物としてアドニット、チオウレア、システインが有効であることを証明した。分散媒は坂根の方法では、植物病原細菌に 3%グルタミン酸ナトリウム、 $3\,\mathrm{mM}$  システイン、 $100\,\mathrm{mM}$  アドニット 加用  $0.1\,\mathrm{M}$  リン酸 カリウム 緩衝液 (pH 7.0)、同糸状菌に 6% グルタミン酸ナトリウム、 $3\,\mathrm{mM}$  システイン、 $100\,\mathrm{mM}$  アドニット加用  $0.01\,\mathrm{M}$  リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いている。

植物病原細菌では、L-乾燥直後の生残率が凍結乾燥に 比べ劣る菌株もあるが、4°C長期保存した場合、生残率 の低下は緩やかと推測された。同糸状菌の胞子、菌核を L-乾燥すると凍結乾燥に比べ生残率が高く、また凍結乾 燥に耐えにくいいもち病菌の胞子も生残していた。ただ し菌糸は凍結乾燥同様、L-乾燥で死滅した。

#### IV 液体窒素を含む超低温保存

超低温槽保存の場合は超低温槽( $-80^{\circ}$ C 前後),アンプルラック,液体窒素保存の場合はさらに液体窒素槽,プログラムフリーザー,クライオチューブ,アンプルケーンなどの機器が必要である。超低温槽保存では電源に注意し,故障や停電に対処する方策を配慮しなければならない。液体窒素槽は液相が  $-196^{\circ}$ C と低く,より安定した保存方法である。しかし液体窒素の定期的な補充が必要であり,ランニングコストも廉価ではない。液体窒素保存容器は第4図に示した。

超低温槽,液体窒素槽保存の手順は第5図に示した。 平板培養した菌そうの周縁部を培地ごと 4~6 mm のコルクボーラーで打ち抜き,陳書防止剤を 1 ml ずつ分注した 2 ml 容クライオチューブに 5~10 個程度入れるのが一般的である。あるいは斜面培養した植物病原細菌・糸状菌の菌体または胞子懸濁液を凍害防止剤の入ったクライオチューブに入れる。超低温槽保存のできる 菌株は、そのまま超低温槽に入れて保存する。液体窒素槽保存の場合は超低温槽で凍結後,液体窒素槽に入れるか、過冷却後凍結のショックを抑えるためプログラムフリーザーで-35°C 以下まで凍結し、液体窒素槽に入れて保存する。

凍害防止剤として 10% グリセリン, 10% ジメチルスルホキシド (DMSO) などを用いる。菌そうディスクや

	A. cochlioides	A. euteiches	Py. myriotylum
EYCG	5/10 (4/10)	0/10 (0/10)	10/10 (10/10)
SMG	2/10 (4/10)	6/10 (7/10)	7/10 (0/10)
SG	0/10	5/10	0/10
Glycerol	0/10	0/10	0/10
DMSD	0/10	0/10	0/10

第3表 保存困難な鞭毛菌類菌糸に対する各種凍害防止剤の影響

プログラムフリーズ後液体窒素に浸潰し,直ちに  $40^{\circ}$ Cの温湯で融解,ディスク 10 個中の生残を調べた

EYCG - 卵黄3:3%クエン酸ナトリウム6:グリセリン1

SMG — スキムミルク 10%加用 10%グリセリン

SG - 仔牛血清 10%加用 10%グリセリン

Glycerol - 10%グリセリン

DMSO - 10% DMSO

( ) は予備試験の結果

菌体, 胞子を凍害防止剤に浸漬し, 冷蔵庫で 30 分から 2 時間程度平衡後凍結処理する。保存後復元するときは, 35~40°C の温湯で急速に融解する。

横山と伊藤 (1984) は多数の接合菌類,子嚢菌類,担 子菌類,不完全菌類に属する菌株の菌 そうディスクを 10% グリセリンに 浸漬し,-80°C の 超低温槽で 凍結 し,そのまま保存すると,かなり多数の菌株が凍結・融 解の反復を経ても生存していたことを報告し,超低温槽 保存法は糸状菌の長期保存法として簡便かつ安全な方法 であると述べている。ただし鞭毛菌類はこの方法で耐性 がきわめて低く,実施困難と判定している。

筆者の試験でも鞭毛菌類の超低温保存は不安定な結果であった。しかし、前培養培地に V-8 ジュース寒天平板を用い、菌そうディスクを 10% DMSO に浸漬してプログラムフリーズ後、液体窒素槽に浸漬すると、多くの鞭毛菌類の安定した生残結果が得られた。生残困難な Aphanomyces 2 属 2 種、Pythium myriotylum の菌そうディスクを、10% スキムミルク加用 10% グリセリンなど タンパク質の入った凍害防止剤を用いてプログラムフリーズすると、第 3 表に示したように生残の向上が見られた。

#### おわりに

植物病原細菌の長期安定保存法には凍結乾燥法,L-乾燥法が適用できるが、いずれが優れているかを今の段階で判定することは困難である。簡便法の中では凍結法がかなり用いられている。

植物病原糸状菌は、胞子や菌核を形成し、保存後発芽が良好であれば、L-乾燥法が優れている。発芽不良か、 菌糸状態のものは、 超低温槽 または 液体窒素槽保存す る。超低温槽さえあれば、超低温槽保存は簡便な方法で ある。

鞭毛菌類や純寄生菌では、保存方法が解決されていないか不十分のものがあるが、銹病菌(横山, 1977)、べと病菌の一部 (Tetsuka and Katsuya, 1983) のように保存方法が開発されているものもあり、今後の開発研究で適用の幅が広がると考えられる。

保存後は、病原性をはじめ遺伝形質の変化の有無について検討する必要がある。

#### 引用文献

- 阿部重雄(1977):根井外喜雄編, 微生物の保存法, 糸状菌の保存法(I), 東京大学出版会, 東京, pp.291~315.
- Annear, D. J. (1958): Austral. J. Exp. Biol. 36: 211~221.
- 3) CORNECK, M. W. (1951): Can. J. Bot. 29: 32~45.
- 4) 飯島貞二・坂根 健(1970): 凍結及び乾燥研究会会誌 16:87~91.
- 5) Jones, J. D. (1974): Phytopathology (64): 1158.
- 6) Kelman, A. (1965): ibid. 46: 16~17.
- 7) LELLIOTT, R. A. (1965): J. Appl. Bacteriol. 28: 181~193.
- 8) LITTLE, G. W. and M. A. GORDON (1967): Mycologia 59:733~736.
- 9) 根井外喜男編(1977): 微生物の保存法,東京大学出版部,東京,433 pp.
- 10) 西山幸司 (1977): 植物防疫 31:465~467.
- 11) 坂根 健ら (1985): 凍結及び乾燥研究会会誌 31:27~ 35.
- SMITH, D. (1984): Maintenance of fumgi, ed KIRSOP B. E. and SNELL, J. J., Maintenance of microorganisms, 83~117, Academic Press, Lond.
- 13) Tetsuka, Y. and K. Katsuya (1983): 日植病報49:731~735.
- 14) Trollope, D. R. (1975) : J. Appl. Bacteriol. 38 : 115 ~120.
- 15) 渡辺公博ら(1980): 凍結及び乾燥研究会会誌 26:101~ 109.
- 16) 横山竜夫 (1977): 根井外喜男編, 微生物の保存法, 糸状 菌の保存法 (II), 東京大学出版会, 東京, pp. 317~353.
- 17) 横山竜夫・伊藤忠義 (1984): 凍結及び乾燥研究会会誌 30:65~67.

# 植物ウイルスの保存法

# 農林水産省農業環境技術研究所 福本文 良

#### はじめに

植物ウイルスは生体内でしか増殖できないが、in vitro でウイルス分離株を長期保存することは可能であり、主として凍結、乾燥、凍結乾燥及び L-乾燥保存などの方法が用いられている。しかし、これらの方法では保存が困難なウイルスも多数存在し、特に永続型の虫媒伝染性ウイルスではほとんど in vitro での保存例がなく、生体保存に依存しているのが現状である。生体保存では、継代のための労力、保存中の変異、他のウイルスによる汚染の可能性などで問題があり、in vitro で保存可能なウイルスではこの方法は避けるべきである。具体的な保存方法は他の総説を参照されたい(根井外喜男編、1977)。

現在植物ウイルスは 28 グループに分類されているが、ウイルス粒子の形態、構造など多様であり、タバコモザイクウイルスのようにきわめて安定なウイルスから、トマト黄化えそウイルスや plant rahbdovirus に属するウイルスのように不安定なウイルスまで、ウイルスの種類によって安定性にも顕著な差が認められる。同一グループ内のウイルスにも安定性に差異は認められるが、筆者らの研究から、同一グループ内及び近縁のウイルスは凍結や乾燥などの処理に対して類似した変化を伴い、そのときに有効な保護剤の種類も共通していることが示唆されている。本稿では筆者らの研究結果を中心に紹介するが、保存法についてはほかに、最近植物ウイルスに関する保存例をウイルスグループごとにまとめた筆者らの総説(福本・栃原、1987)や、脇本の総説(1977)も併せて参考にされたい。

#### I 凍 結 保 存

#### 1 凍結の影響

小球形ウイルスの粒子形態を維持する結合様式には、 主としてタンパクサブユニットどうしの結合力が関与し ているもの、タンパクサブユニットと RNA の結合力 が関与しているもの、及び両方が関与しているものなど がある (KAPER, 1973)。タンパクサブユニットと RNA の結合力が関与する Cucumovirus は凍結に対して安定

Methods of Preservation of Plant Viruses. Fumiyoshi Fukuмото である (KAPER, 1973)。両方の結合力が関与しているイ ンゲンマメ南部モザイクウイルス (SBMV) は蒸留水中 で凍結融解すると粒子構造がルーズになるため、タンパ ク分解酵素、タンパク変性剤及び RNase に感受性にな る。またウイルス活性も 20% に低下するが、RNA に は影響がなく感染性が認められる。しかし, ウイルス粒 子は 10 mM Mg++, 10 mM Ca++, 0.2% ショ糖, 1.0 M NaCl 及び 20 mM Na-P. B. pH 7.0 の条件下では凍 結融解による変化から保護される (SEHGAL and Dos, 1975)。一方、タンパクサブユニットどうしの 結 合力に よって 粒子構造を 維持している ウイルスの 代表である turnip yellow mosaic virus (TYMV, Tymovirus group) は、蒸留水中に懸濁したウイルス液を -75°C で凍結処理すると、粒子は完全に崩壊して RNA と外 被タンパクに解離するが、処理前に 0.2% ショ糖また は 0.2M エチレングリコールを添加することによって, ウイルス粒子は完全に保護される (KAPER and SIBERG, 1969a, b)。10 mM Tris-HCl pH 7.5 に懸濁したウイ ルス液の場合も類似の変化を生ずるが、1% グリセリン 添加標品では凍結処理で 95% 以上の粒子が維持される (KATOUZIAN-SATADI et al., 1980; KATOUZIAN-SAFADI and HAENNI, 1986)。また、凍結処理でタンパクサブユ ニットの一部が capsid から離脱するために RNA が放 出されることも 明らかに されている (KATOUZIAN-SAF-ADI and BERTHET-COLOMINAS, 1983; KATOUZIAN-SA-FADI and HAENNI, 1986)。 TYMV と同様の結合様式 を持つ chicory yellow mottle virus, grapevine fan leaf virus (GFV) 及び raspberry ringspot virus は -25°C の凍結と融解で middle 成分と bottom 成分が 崩壊し、RNA と中空粒子に分かれるが (Quacquar-ELLI et al., 1976, 1972), arabis mosaic virus (QUA-CQUARELLI et al., 1976), タバコ輪点ウイルス (TRSV) はほとんど影響を受けない。ダイコンひだ葉モザイクウ イルス (RMV) は -20°C または -70°C で凍結融解 を5回繰り返すと約 50% の粒子が RNA と中空粒子 に解離し、活性も低下する。しかし、0.5% ペプトンや 3%(v/v) グリセリンを添加した試料ではこれらの変化 は認められない。タンパクサブユニットどうしの結合力 で粒子形態を維持しているウイルスでは、凍結前にペプ トンやグリセリンをウイルス液に添加すれば凍結融解の

影響から粒子を保護することが可能と考えられる。

Tomato spotted wilt virus (TSWV) に罹病した Nicotiana rustica 葉粗汁液を  $-20^{\circ}$ C 及び  $-70^{\circ}$ C で凍結した場合,  $-20^{\circ}$ C で約 20%,  $-70^{\circ}$ C で約 30% に活性が低下する。組織片の場合  $30\sim50\%$  の活性が維持される。カブモザイクウイルス(TuMV), peanut chlorotic ring mottle virus (PCRMV)及びカーネーション斑紋ウイルス(CarMV)では凍結による影響は認められていない。

#### 2 長期保存

-70°C で保存したアルファルファモザイクウイルス (AlMV) や TRSV は、それぞれ5年と8年の保存中に前者は粒子構造にわずかな変化が認められ、後者は粒子の一部が RNA と中空粒子に解離するが、顕著な活性低下は生じない。TSWV は粗汁液中ではきわめて不安定であるが、組織片を-69°C で保存すれば6年間活性が維持されることが報告されている (Best, 1961)。5%システインを添加した粗汁液を-70°C で保存した筆者らの試験でも、その活性は9年後に保存直後と同程度維持され、無添加の粗汁液や組織片の活性より高い結果を得ている。キュウリモザイクウイルス (CMV)、TuMVの純化標品及び粗汁液は、-70°C 保存でそれぞれ 10数年と8~9 年間高い活性を維持している。 RMV、SBMV、CarMV,PCRMV も -70°C で長期保存が可能である。

一般に広く普及している -20°C のフリーザーでウイ ルスを保存した場合, -70°C 保存に比べかなり劣るが, 有効な保護物質 (ペプトンやグリセリン) を粗汁液に添 加することによってかなり長期保存が可能である。純化 CMV を -20°C で保存した場合, 無添加と 5% ショ糖 添加標品の活性は 10 年後にそれぞれ保存直後の 15~30 % と50~100% に維持される。粗汁液では純化ウイルス に比べて活性の低下が速く、無添加の粗汁液では数か月 で大部分の活性が消失する。しかし、5%ショ糖、1% グルタミン酸ナトリウムを添加した標品では,10年後で も数%の活性が維持される。純化 TRSV を -20°C に 保存すると、無添加では活性の低下と粒子の解離を生ず るが, 0.5% ペプトン, 3% (v/v) グリセリン, 1% ショ 糖などのいずれの添加でも8年間高い活性と粒子構造が 維持される。RMV でも TRSV と同様の添加物を加え ると 6.5 年間粒子の形態に変化が認められていない。 TuMV は、純化ウイルス及び粗汁液のいずれでもグリ セリンやペプトンを添加すると 8~9 年間高い活性を維 持している。 AlMV, SBMV, CarMV, PCRMV でも グリセリンやベプトンを添加すると長期保存が可能であ

る。試料に添加するグリセリンとペプトンの濃度は、純化ウイルスではそれぞれ  $3\sim5\%$  と 0.5%, 粗汁液では  $5\sim10\%$  と 1% である。

純化 CMV は粗汁液に比べて著しく保存性が高く, この傾向は TuMV など他のウイルスにも 共通してい た。

#### II 常圧乾燥保存

#### 1 常圧乾燥の影響

本法による多数の長期保存例はあるが、乾燥の影響に関する報告例は見当たらない。 筆者らの試験では TR-SV 罹病タバコ葉を  $4^{\circ}$ C 常圧下で数時間乾燥すると、活性は 42% に低下する。凍結乾燥処理 (8% に低下)に比べて活性が高く維持されるのは乾燥度が低いためと考えられる。 CMV と TuMV の場合数日間  $4^{\circ}$ C 下で乾燥した標品と  $-70^{\circ}$ C で凍結した標品の間にほとんど活性の差異が認められなかったことから、乾燥による活性低下はほとんどないのではないかと考えられる。

#### 2 長期保存

多種のウイルスについて保存例が報告されている。Barley stripe virus, brome mosaic virus, CMV, potato virus X, potato virus Y, tobacco etch virus, TRSV などは 10 年以上保存が可能であることが報告されている (Bos, 1969; MCKINNEY et al., 1965)。ウイルス活性を定量的に扱った報告によれば, CMV と AIMV は室温あるいは低温保存でいずれも 7~8 年間かなり高い活性を維持している。同時に行われた試験で, インゲンマメ黄斑モザイクウイルスは CMV に比べて保存性が劣り,保存後徐々に活性が低下し,36 か月後には活性がわずかしか残っていない (Bos, 1977)。筆者らも TuMV とCMV を比較して同様の結果を得ている。

本法は多種のウイルスによる試験例があり有効な保存 法である。また標品を十分に乾燥後 -20°C 以下で保存 すれば、さらに長期間安定した保存が可能ではないかと 考えられる。

#### III 凍結乾燥保存

#### 1 凍結乾燥の影響

主としてタンパクサブユニットどうしの結合力で粒子の形態を維持している Nepovirus や Comovirus groupに属するウイルスは、凍結乾燥処理による影響が著しい。例えば、TRSV は同処理で RNA と中空粒子に解離し、活性は 3% に低下する。RMV は TRSV よりも影響が顕著であり、capsid の大部分は タンパクサブユニットに崩壊する。しかし、ソルビトール、ブドウ糖

などの添加物はウイルス粒子を保護し、これらのグループに属するウイルスに比較的共通していた。しかし、添加物の効果の程度はウイルスの種類によって異なっている。一方、主としてタンパクサブユニットと RNA の結合力で粒子の形態を維持している Cucumovirus groupに属するラッカセイわい化ウイルスやキク微斑ウイルスでは、凍結乾燥処理によってかなりの粒子が膨潤する。CMVでもショ糖密度勾配遠心の沈降図に著しい変化を生ずる。これらの変化は 1% ショ糖や 1% イノシトールを添加することによってほとんど認められなくなる。Cucumovirus と同様の結合様式を持つ AIMV は凍結乾燥によって粒子の構造に変化を生ずるが、粒子の崩壊には至らない。AIMVでもショ糖などの添加物で保護効果が認められ、保護効果の高い添加物は Cucumovirus と比較的共通していた。

タンパクサブユニットどうし及びタンパクサブユニットと RNA の 結合力のいずれをも持つ SBMV と Car MV は、凍結乾燥処理によって 粒子が 膨潤し、RNase や sodium dodecyl sulfate に感受性になり、活性もそれ ぞれ  $11\sim16\%$  と  $14\sim21\%$  に低下する。凍結乾燥によるこのような変化は、乾燥前に保護物質を加えることによって抑制され、SBMV では 0.5% リジン、CarMV では 0.5% リジン、0.5% ペプトン及び 1% ショ糖で効果が認められる。凍結乾燥処理された粒子の RNA は活性を維持し、タンパクサブユニットの電気泳動パターンでも無処理との間に差が認められない。これらのことから凍結乾燥による活性の低下は、ウイルス粒子の高次構造の変化によると考えられる。

Potyvirus group に属する TuMV と PCRMV は凍結乾燥によって粒子が凝集し、一部の RNA は崩壊して活性が低下する。リジンやペプトンを添加した標品ではこのような変化は抑制され、高い活性が維持される。

TSWV 罹病薬粗汁液を凍結乾燥処理すると、ウイルス活性は 4% に低下するが、1% システインを添加した標品では 84% の活性が維持され、有効添加物の種類が他のウイルスと異なっている。

TRSV, RMV 及び SBMV 罹病葉粗汁液を凍結乾燥 処理すると, ウイルス活性は純化ウイルスと同様に大幅 に低下し, それぞれ 1%, 2%, 22% になる。TRSV と RMV の罹病葉組織片を凍結乾燥した場合も著しく活性 は低下する。AlMV, CarMV 及び PCRMV の粗汁液では純化ウイルスにおける活性低下ほど顕著ではない。

#### 2 長期保存

凍結乾燥保存中に 有 効 な 添 加 物 は、Nepovirus と Comovirus の凍結乾燥処理時に有効であるソルビトール を除けば、すべて処理時に保護効果が顕著なものと共通 している。有効な添加物を加えた純化ウイルス液の凍結 乾燥標品でも、ウイルスの種類によって活性を維持する 期間や粒子の変化は著しく異なっている。凍結乾燥標品 を 65°C で保存した場合, ウイルス活性は TRSV, RMV, TSWV (本ウイルスのみ粗汁液の結果) では 1 ~2 日, SBMV, CarMV 及び Potyvirus では 1~2 週 間, Cucumovirus では  $1 \sim 3$  か月間維持している。 TRSV と RMV は保存中に粒子が RNA と capsid に解離し、Potyvirus は粒子の切断と RNA の崩壊が 起こる。SBMV, CarMV 及び Cucumovirus は粒子の 構造がかなり維持されるが、RNA は崩壊し、ウイルス 活性と RNA の崩壊程度がよく一致する。純化 CMV (無添加) と TuMV (0.5% ペプトン添加) の凍結乾燥 標品は、4°C 保存で約 50% の活性がそれぞれ 10 年と 8~9 年間維持されている。5% ショ糖・1% グルタミ ン酸ナトリウムを添加した CMV 罹病葉粗汁液の凍結 乾燥標品でも、4°C 保存で 10.5 年後に 50% 以上の活 性が維持 される。 TRSV, RMV 及び TSWV は、 Cucumovirus に比べると 4°C 保存中の活性低下の速度 が速いが、有効な添加物を加えた罹病葉粗汁液の凍結乾 燥標品を -20°C 以下に保存すれば、少なくとも 3~5 年間活性の低下はほとんど認められていない。粗汁液の 凍結乾燥標品は純化ウイルスに比べて保存中の活性低下 が速く, 添加物の至適濃度も高くなる傾向が 認め られ る。粗汁液で保存する場合、ショ糖、ブドウ糖及びリジ ンの濃度は 3~10% の範囲が適当と考えられる。

#### IV L-乾 燥 保 存

#### 1 L-乾燥の影響

TRSV 罹病棄粗汁液を L-乾燥すると, 無添加でも 19% の活性を維持し,  $1\sim10\%$  リジン,  $5\sim10\%$  ブドウ糖及び 5% リジン・10% ブドウ糖の添加で  $60\sim80\%$  の活性が維持され, 特に後者で保護効果が顕著である。純化ウイルスの場合でも、L-乾燥が凍結乾燥より優れている (福本, 1986)。

Rice dwarf virus (RDV) 罹病葉粗汁液を凍結乾燥すると活性が消失するが、L-乾燥では約 20% の活性が維持され、5% ショ糖、5% ブドウ糖、5% マルトース、5% PVP K-30 を添加した L-乾燥標品ではさらに高い活性が維持される(福本ら、未発表)。

#### 2 長期保存

5% リジン・1% ブドウ糖を添加した TRSV 罹病薬 粗汁液の L-乾燥標品を 35°C で保存すると、半年後でも高いウイルス活性が維持される。純化ウイルスの場合

7

	凍 結 保 存b)			凍 結 乾 燥 保 存 <sup>b)</sup>							
ウイルス 名ª)	凍結の影響		保存中の影響 (-20°C)			凍結乾燥の影響			保存中の影響 (4~100°C)	所属ウイルス	文献番号
	ウイルス活 性 <sup>c)</sup>	粒子の変 化	有効添	加 物d)	ウイルス 活性 <sup>c)</sup>	、粒-		有効添加物(1)	有効添加物d)	グループ名	
CMV		_			_		?	ショ糖,イノシトール	ショ糖,イノシトール	Cucumovirus	6, 13
CMMV					82	膨	潤	ショ糖,イノシトール	ショ糖,イノシトール	Cucumovirus	13
PSV		-			76	膨	潤	ショ糖,イノシトール	ショ糖,イノシトール	Cucumovirus	13
AlMV	_	-~+	ショ糖,ペ リセリン	プトン,グ	48	構造	変化	ショ糖,イノシトール, ペプトン	ショ糖,ペプトン	Alfalfa mosaic virus	8
TRSV	_	_	ペプトン,	グリセリン	3	解	離	ソルビトール,ブドウ 糖	ブドウ糖,リジン	Nepovirus	10
ArMV		-				解	離	ソルビトール,ブドウ 糖		Nepovirus	10
TBRV		_				解	階	ソルビトール,ブドウ 糖		Nepovirus	10
RMV	82	一部解離	ペプトン,	グリセリン	16	解	離		リジン, グルタミン酸 ナトリウム, ブドウ糖	Comovirus	10
SqMV						解	離	ソルビトール,リジン, グルタミン酸ナトリウ ム		Comovirus	10
SBMV	_		ペプトン,	グリセリン	11~16	膨	潤	リジン	リジン	Sobemovirus	11
CarMV		_	ペプトン,	グリセリン	14~21	膨	潤	リジン,ショ糖,ペプ トン	リジン,ショ糖,ペプ トン	未分類	12
TuMV			ペプトン,	グリセリン	18~35	凝	集	リジン,ペプトン	リジン、ペプトン	Potyvirus	4, 9
PCRMV	_		ペプトン		63	凝	集	リジン, ペプトン	リジン, ペプトン	Potyvirus	4

第1表 凍結及び凍結乾燥保存中のウイルスに対する有効添加物の種類

システイン

システイン

Tomato spotted

wilt virus

ショ糖、グリセリン

 $10 (-20^{\circ} C)$ 

30  $(-70^{\circ} C)$ 

TSWV

a) 略されたウイルス名は以下のとおりである。 CMV: キュウリモザイクウイルス, CMMV: キク微斑ウイルス, PSV: ラッカセイわい化ウイルス, AIMV:アルファルファモザイクウイルス, TRSV:タバコ輪点ウイルス, ArMV:アラビスモザイクウイルス, TBRV:トマト黒色輪点ウイルス, RMV:ダイコンひだ葉モザイクウイルス, SqMV:スカッシュモザイクウイルス, SBMV:インゲンマメ南部モザイクウイルス, CarMV:カーネーション斑紋ウイルス, TuMV:カブモザイクウイルス, PCRMV:Peanut chlorotic ring mottle virus, TSWV:トマト黄化えそウイルス.

b) TSWV のみ粗汁液で、他のウイルスは純化試料での結果をまとめた.

c) 凍結及び凍結乾燥処理で影響が認められなかった場合―と表し、影響があった場合処理区の無処理区に対するウイルス活性を%で表した.

d) 有効添加物の種類は代表的なものを挙げた.

でも L-乾燥保存が凍結乾燥保存より優れている(福本, 1986)。

5% ショ糖を添加した RDV 罹病葉粗汁液の L-乾燥標品を 65°C に保存すると, 5% ブドウ糖, 5% マルトース, 5% PVP K-30 を添加した標品に比べて優れ, 2 日後でもわずかに活性が認められる。この高温保存の試験結果から, 5% ショ糖を添加した L-乾燥標品は -20°C 以下で長期保存が可能と考えられる(福本ら,未発表)。

#### おわりに

Tymovirus, Nepovirus 及び Comovirus の各グループに属するウイルスは、凍結融解でウイルス粒子に変化のないものから、変化の程度の異なるものまでかなり幅がある(福本・栃原、1984; Kaper and Siberg、1969a, b; Marcinka and Musil、1977; Quacquarelli et al., 1976, 1972)。一方、Cucumovirus、SBMV 及びCarMV のように、少なくともタンパクサブユニットとRNA の結合力が粒子の形態維持に関与しているウイルスは、Kaper(1973)が報告しているように、凍結融解に対して比較的安定である。

一般に、-20°C は凍結保存に適さないとされており、第1表に掲げたウイルスの場合も満足できるものではなく、比較的短期間に活性が低下する。しかし、TSWV以外のウイルスでは保存標品にペプトンまたはグリセリンを添加することによって -20°C でもかなりの期間、保存が可能となる。これら2種の添加物はウイルスグループを超えて有効性が認められるので、保存法が未検討のウイルスに対してもこれらの添加物の使用によって-20°C 凍結保存の可能性が示唆される。-70°C で凍結保存すると、TSWV を含め第1表に示すすべてのウイルスで長期間高い活性が維持されることから、-70°Cの凍結保存は多くの植物ウイルスに適用でき、信頼性の高い保存法であることが示唆される。

凍結乾燥処理によって受ける影響についてまとめると、第1表の小球形ウイルスは次のように三つに大別される。①Cucumovirus のように粒子の膨 潤など処理の影響を 受けながら 活性はそれほど 低下しないもの、② Nepovirus や Comovirus のように粒子の形態が維持できず、活性が著しく低下するもの、③SBMV や CarMVのように粒子の構造は維持されるが、活性がかなり低下するもの、である。粒子形態の維持にタンパクサブユニットと RNA の結合力が関与している Cucumovirus、SBMV 及び CarMV は、凍結乾燥処理に比較的強く、タンパクサブユニットどうしの結合力による Nepovirus

や Comovirus は弱い。一方,ひも状粒子の Potyvirus では凍結乾燥処理で 粒子の 凝集が 顕著に 起こる。しかし,以上のような凍結乾燥処理による悪影響は,各種添加物を用いることによって軽減されることが,第 1 表に挙げたすべてのウイルスについて認められる。

以上のことから、同一グループ内はもちろん、異なるグループに属するウイルスでも粒子形態を維持している結合様式や物理化学的諸性質が類似していれば、保護効果のある添加物の種類に共通性があることが明らかである。そのような観点から、Bromovirus や Ilarvirus groupのウイルスは①に、Tymovirus groupのウイルスは②に、Tombusvirus や Necrovirus groupのウイルスは③に相当する保存条件で長期保存が可能と考えられる。また、凍結乾燥標品の長期保存にあたっては、-20°Cの低温保存が実際的に有効である。

L-乾燥保存の試験例はきわめて少ないが、TRSV や RDV の結果から、植物ウイルスの保存に有効な方法ではないかと考えられる。

Closterovirus, Fijivirus, Geminivirus, Maize chlorotic dwarf virus, Maize rayado fino virus, Plant rahbdovirus, Rice stripe virus の各グループに属するウイルスは in vitro で保存した試験例がなく、これらのウイルスの大部分は永続型の虫媒伝染性である。冒頭に触れたような問題点から、保存法の確立が望まれる。

#### 引用文献

- 1) Best, R. J. (1961): Virology 14: 440~443.
- Bos, L. (1969): Mededelingen Rijkstakulteit Landbouwwetenschappen Gent, Wageningen 34: 875~ 887.
- 3) ——— (1977): Neth. J. Pl. Path. 83: 217~220.
- 4) 福本文良(1984):日植病報 50:438(講要).
- 5) ——— (1986): 凍結 及び 乾燥研究会 会誌 32:70~73.
- 6) · 栃原比呂志 (1980): 日植病報 46:448~454.
- 7) ——— (1981):同上 47:688~690.
- 8) (1982):同上 48:399 (講要).
- 9) ——— (1983):同上 49:220~227.
- 10) (1984):同上 50:158~165.
- 11) Fuкuмото, F. and H. Тоснінака (1985) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 51 : 413~420.
- 12) ----- (1986) : ibid. 52 : 636~642.
- 13) 福本文良·栃原比呂志(1986):日植病秋季関東部会(講要).
- 14) ------ (1987): 植物ウイルス,農林水産関連微生物の保存法マニュアル (仮称),農林水産省,印刷中.
- 15) KAPER, J. M. (1973): Virology 55: 299~304.
- 16) \_\_\_\_ and R. A. SIBERG (1969a): ibid. 38: 407~
- 17) (1969b) : Cryobiology 5 : 366~
- 18) KATOUZIAN-SAFADI, M. and C. BERTHET-COLOMI-NAS (1983): Eur. J. Biochem. 137: 47~55.
- 19) ——— et al. (1980) : ibid. 112 : 479~486.
- 20) --- and A. L. HAENNI (1986): J. gen. Virol.

67:557~565

- 21) MARCINKA, K. and M. MUSIL (1977): Acta. Virol. 21:71~78.
- 22) MCKINNEY, H. H. et al. (1965): Phytopathology 55: 1043~1044.
- 23) 根井外喜男編 (1977): 微生物の保存法,東大出版会,東京,434 pp.
- 24) QUACQUARELLI, A. et al. (1976) : J. gen. Virol. 32:349~360.
- 25) ———— et al. (1972) : ibid. 17 : 147~156.
- 26) Sehgal, O. P. and P. D. Das(1975): Virology 64: 180~186.
- 27) 脇本 哲(1977): 微生物の保存法(根井外喜男編),東大出版会,東京,pp. 93~105.

#### 人事消息

(3月31日付)

永江啓一氏(農林水産技術会議事務局連絡調整課課長補佐(連絡調整第一班担当)) は退職(農林漁業金融公庫 融資第一部調査役へ)

(4月1日付)

野田知広氏(農蚕園芸局農産課課長補佐(指導班担当)) は農林水産技術会議事務局連絡調整課課長補佐(連絡 調整第一班担当)に

(4月1日付)

奥富一夫氏 (農薬検査所検査第一部毒性検査課検査管理 官) は農薬検査所農薬審査官に

(4月1日付)(植物防疫所)

小島良徳氏(家畜衛生試験場総務部長)は横浜・総務部 長に

高橋順三氏(横浜・総務部長)は大臣官房経理課会計監 香室長に

前田武男氏(横浜・東京支所長)は神戸・業務部長に 松延正弘氏(神戸・大阪支所長)は横浜・東京支所長に 岩崎勘十郎氏(名古屋・国際課防疫管理官)は名古屋・ 清水支所長に

石井頼治氏(神戸・国際第一課長)は神戸・大阪支所長に

藤岡一治氏 (神戸・姫路出張所長) は神戸・広島支所長 に

小林敏郎氏 (横浜・国際第二課長) は横浜・国際第一課 長に

末次哲雄氏(門司・国内課長)は横浜・国際第二課長に 細川一伍氏(門司・国際課長)は神戸・国際第一課長に 津止健市氏(那覇・調整指導官)は門司・国際課長に 諸橋公穂氏(横浜・成田支所業務第二課防疫管理官)は

久貝晃常氏(神戸・国際第一課防疫管理官)は那覇・調 整指導官に

弓削高志氏(神戸・業務部長)は退職 木村幹夫氏(名古屋・清水支所長)は退職 永易正男氏(神戸・広島支所長)は退職 松原芳久氏(横浜・国際第一課長)は退職 (4月21日付)

門司・国内課長に

内藤秀樹氏(九州農試環境一部病害 I 研主研)は同研室 長に

茂木静夫氏(同上研室長)は派遣職員〔インドネシア〕に (4月24日付)

秋山典昭氏(生物研企画連絡室)は生物研細胞育種部細胞生理研併任に

# 新しい 「植物防疫」専用合本ファイル 本誌名金文字入・美麗装幀

本誌B5判12冊1年分が簡単にご自分で製本できる。

①貴方の書棚を飾る美しい外観。 ②穴もあけず糊も使わず合本ができる。

③冊誌を傷めず保存できる。 ④中のい

④中のいずれでも取外しが簡単にできる。

⑤製本費がはぶける。

⑥表紙がビニールクロスになり丈夫になった。

### 改訂定価 1 部 600 円 送料 350 円

ご希望の方は現金・振替・小為替で直接本会へお申込み下さい。



## 植物防疫

昭和62年

第 41 巻 阳和 62 年 4 月 25 日印刷 第 5 号 阳和 62 年 5 月 1 日発行

. . . . .

編 集 人 植物防疫編集委員会

5 月 号 (毎月 1 回 1 日発行)

発行人 遠 藤 武 雄

二禁 転 載二

印刷所 株式会社 双文社印刷所 東京都板橋区熊野町 13—11 **定価 550 円 送料 50 円** <sup>1 か年 6,100円 (送料共概算)</sup>

#### ——発 行 所——

東京都豐島区駒込 1 丁目43番11号 郵便番号 170 社団 日本植物防疫協会 電話東京:(03) 944—1561—6番 最替東京 1 - 1 7 7 8 6 7 番

# 日本曹達が

独自の技術で開発した新農薬!

増収を約束する

日曹の農薬

黒星病・赤星病・うどんこ病などの防除に 強力殺菌剤-

果樹・いちごのダニ防除に 強力殺ダニ剤-

水和割

茶・メロン・すいか・花のハダ二防除に -強力殺虫・殺ダニ剤-

畑作イネ科雑草の除草に 生育期処理除草剤一



日本曹達株式会社 本 社 〒100 東京都千代田区大手町2-2-1 支 店 〒541 大 阪 市 東 区 北 浜 2 - 90 営業所 札幌・仙台・信越・東京・名古屋・福岡・四国・高岡

# 豊かな収穫が見えてくる。















●粒剤タイプで省力的!

土壌センチュウ・ミナミキイロアザミウマ防除剤

稲の害虫退治に!



難防除病害

# 梨の自欲羽病に

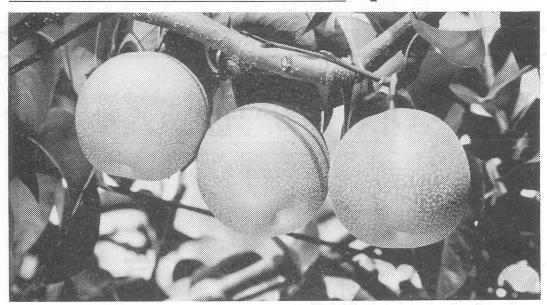
# フランショ 米立者リ

Rは日本農薬の登録商標です

紋羽病の防除は、早期発見・早期防除が基本です。

# --特 長--

- ●梨の白紋羽病にすぐれた 効果を示します。
- ●発根をうながし、樹勢の 回復を早めます。
- ●効果の持続性にすぐれています。
- ●粒剤のため、水を必要と せず処理作業が簡便です。



使用時期:収穫後から翌年の落花直後まで。

#### 使い方

- ①樹のまわりを半径1~1.5m、深さ30cm程度掘り上げ、根を露出する。
- ②腐敗根を切りとり、病患部を削りとる。

使用薬量: 1樹当り3~5kg

- ③乾燥している時は、ジョロで水をまき根をぬらす。
- ④フジワン粒剤半量をまき、根にこすりつける。
- ⑤掘り上げた土に残りの半量を混和しながら埋め もどす。



日本農薬株式会社

東京都中央区日本橋 | 丁目 2 番 5 号

AND THE PARTY OF T

# 連作障害を抑え健康な土壌をつくる!

花・タバコ・桑の土壌消毒剤

微粉剤

- ❖いやな刺激臭がなく、民家の近くで も安心して使えます。
- ❖作物の初期生育が旺盛になります。
- ●安全性が確認された使い易い殺虫剤

# マリックス

乳 剤 水和剤

●ボルドーの幅広い効果に安全性がプラス された有機舗設備剤

キノンドー® 水和

水和剤80 水和剤40

- ❖広範囲の主壌病害、センチュウに高い効果があります。
- ❖粒剤なので簡単に散布できます。
- 各種ハダニにシャープな効きめのダニ剤

# バイデン

到高

●澄んだ水が太陽の光をまねく/ 水田の中期除草剤

# モゲブロン料剤



# アグロ・カネショウ株式会社

東京都千代田区丸の内2-4-1

# 農業技術

B 5 判 定価 400 円 (〒45円) (1年〒共4,800円)

昭和21年創刊 農業技術についての月刊総合雑誌

# 農業技術研究の課題と展望

第 I 巻 農業技術研究の原点を求めて 第 II 巻 21世紀の農業技術をめざして 川嶋良一著 A 5 判 各約300頁 定価各1700円 〒各250円(2冊で300円)

農水省農事試場長,技術会議事務局長,農研センター所長等を歴任された著者が,これまで各誌に執筆された諸稿を体系的にまとめたもの。農業技術関係者の必読書

## 農林水産研究とコンピュータ

斎尾乾二郎他編著 A5判上製 定価3,800円 〒300円 農林水産研究の各分野におけるコンピュータ利用の現状と 展望,およびコンピュータ利用技法についての解説

# 【新刊】野菜種類・品種名考

西 貞夫監修 22氏執筆 B6判 406頁 定価 2,200円

第一部として野菜とは何か,野菜の種類,品種の分化等を, 第二部として主要34野菜の起源と伝播,栽培の歩み,品種 改良の経過,代表的品種の来歴・名の由来等を解説。

# 最新 作物 生理 実験法

北條良夫 • 石塚潤爾 編 大学 • 試験研究機関 新進気鋭の研究者24氏執筆

A 5 判 (上製) 416頁 定価 3,500 円 〒300円

作物の形態と機能を体系的に関連づけ,多くの研究領域で基本的な最新の生理実験技法を解説,農学系,生物系の学生・院生,農業関係研究者の常備実験書

## 実験以前のこと一農学研究序論

小野小三郎著 B 6 判 定価 1,600 円 〒250円

創造的研究とは何か、創造的研究の取り組み方と問題点等 を述べた、農学・生物学についての唯一の研究方法論

# 作物品種名雜考

農業技術協会編 B 6 判 定価 1,800 円 〒250円 普通作物・工芸作物の品種名の由来,命名の裏話等を,育 種専攻19氏が解説した品種改良の裏面史

# 果樹品種名雑考

農業技術協会編 B 6 判 定価 1,800 円 〒250円

わが国の主要果樹の品種名の由来,命名裏話,あわせて各 樹種の起源,渡来と定着の状況を果樹育種専攻14氏が解説

〒114 東京都北区西ケ原

(財団法人) 農業技術協会

振替 東京 8-176531 Tel (03) 910-3787



