

# 植物防疫



特集 RFLP 解析とその応用

1992

8

VOL 46

昭和  
平成  
二四  
四年  
年八  
月七  
月二  
一十  
九五  
日日  
第  
三  
行  
刷  
種  
郵  
便  
物  
認  
可  
(第  
四  
十  
六  
卷  
一  
日  
第  
九  
号  
行  
可)

# 広に適用病害と優れた経済性

## ピルバックス 水和剤

- 普通物で安全。
- 薬剤費が安く経済的。
- 耐性菌の心配なし。

- りんご……黒星病、斑点落葉病、赤星病、黒点病、すす点病、すす斑病
- なし……黒星病、黒斑病、赤星病
- もも……縮葉病、黒星病、灰星病
- かき……円星落葉病



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

農薬に関する唯一の統計資料集！ 登録のある全ての農薬名を掲載！

## 農 薬 要 覧

農林水産省農蚕園芸局植物防疫課 監修

—— 1991 年版 ——

B 6 判 692 ページ

定価 5,000 円 送料 サービス  
(本体 4,855 円)

— 主 な 目 次 —

- I 農薬の生産、出荷  
種類別生産出荷数量・金額 製剤形態別生産数量・金額  
主要農薬原体生産数量 種類別会社別農薬生産・出荷数量など
- II 農薬の流通、消費  
県別農薬出荷金額 農薬の農家購入価格の推移 など
- III 農薬の輸出、輸入  
種類別輸出数量 種類別輸入数量 仕向地別輸出金額など
- IV 登録農薬  
2年9月末現在の登録農薬一覧 農薬登録のしくみなど
- V 新農薬解説
- VI 関連資料  
農作物作付（栽培）面積 空中散布実施状況など
- VII 付 録  
農薬の毒性及び魚毒性一覧表 名簿 登録農薬索引など

- 1990年版—4,600円 送料310円
- 1989年版—4,400円 送料310円
- 1988年版—4,429円 送料310円
- 1987年版—4,223円 送料310円
- 1986年版—4,223円 送料310円
- 1985年版—4,017円 送料310円
- 1983年版—3,296円 送料260円
- 1963～82, 84年版—品切絶版

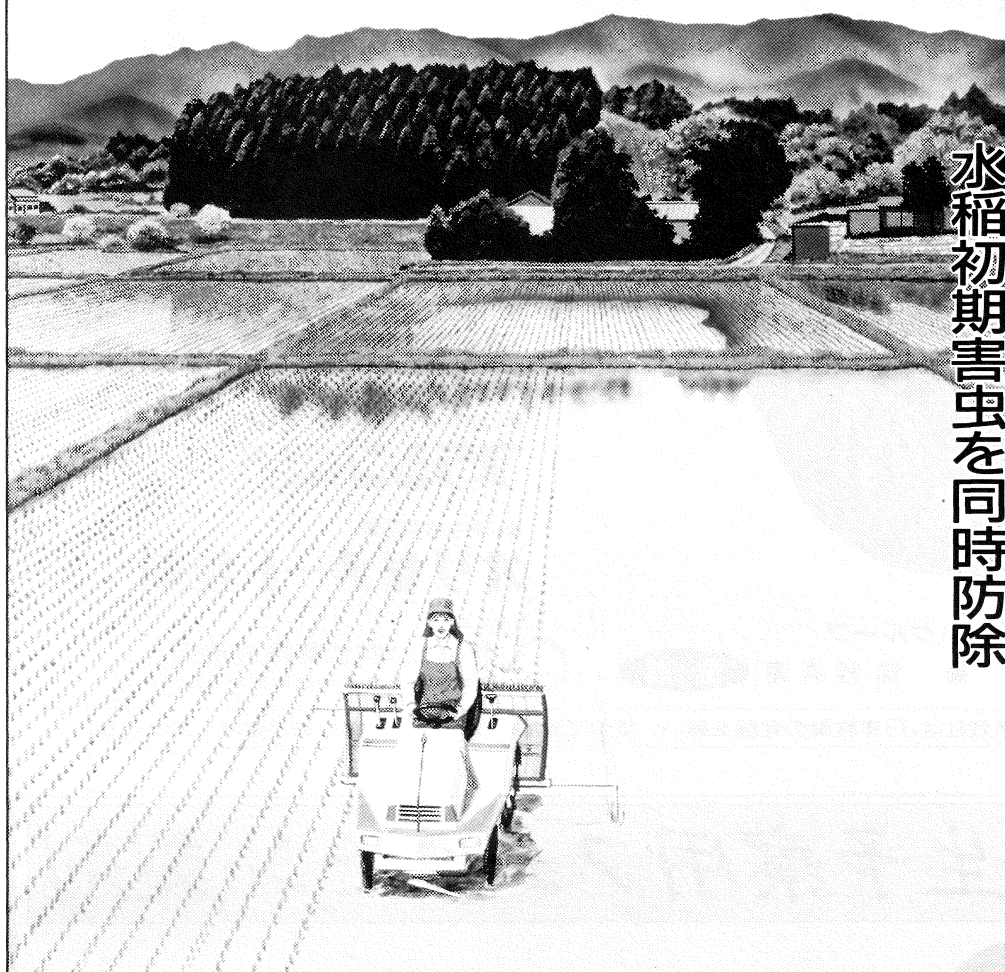
※定価は税込価格です。

お申込みは前金（現金・小為替・振替）で本会へ

〈農薬は正しく使しましょう〉

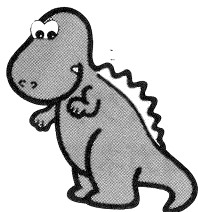
# 箱で余裕、イネミズ防除。

水稻初期害虫を同時防除



- ★高い浸透移行作用により、イネミズゾウムシ成虫・幼虫を強力に防除します。
- ★残効が長いので薬剤の使用回数を減らすことができますので経済的です。
- ★初期害虫であるイネドロオウムシ、ヒメトビウンカなどを同時に防除できます。
- ★箱施用なので省力的です。薬害が出にくいので田植3日前から直前まで使用できます。

| 作物名          | 適 用 害 虫 名                                               | 10アール当り使用量                                       | 使用時期               | 本剤及びカルボスルファンを含む農薬の総使用回数 | 使用方法                    |
|--------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| 水 稻<br>(育苗箱) | イネミズゾウムシ                                                | 育苗箱<br>(30×60×3cm)<br>使用土壌 約5Q<br>1箱当り<br>40～70g | 移植前<br>3日～<br>移植当日 | 1回                      | 本剤の所定量を育苗箱の苗の上から均一に散布する |
|              | ヒメトビウンカ<br>ツマクログコバイ<br>イネヒメハモグリハエ<br>イネドロオウムシ<br>イネゾウムシ | 育苗箱<br>(30×60×3cm)<br>使用土壌 約5Q<br>1箱当り<br>50～70g |                    |                         |                         |



## ガゼット<sup>®</sup>粒剤

カルボスルファン…3.0%

新登場

®は米国FMC社の登録商標です。



日産化学



原体供給元

FMCコーポレーション



豊かさを描いて。

豊かさに、確かさをプラスして、  
さらに美しさを求める。  
ホクコーは、より質の高い実りの  
世界を、今日も描き続けます。

## ホクコーの 主要水稻防除剤

●総合種子消毒剤

デュボン **ベンレートT** 水和剤20

●水稻種子消毒剤

**ヘルシード**® 乳剤 水和剤

●いもち病・ぬぐい細菌病に

**カスラブスターナ**® 粉剤DL

●いもち病・こま葉枯病・穂枯れに

**フーシン**® 水和剤 粉剤DL

●いもち病防除剤

**オリゼメート**® 粒剤

JAグループ

農協経済連 **全農**



北興化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本石町4-4-20

農薬会社は、日本農業の発展を願い、安全で効果の高い農薬を創りおとどけています。

## 発生予察用フェロモン製剤

SEルアー

▶ニカメイガ用

▶シバツトガ用

▶シロイチモジヨトウ用

▶スジキリヨトウ用

▶チャノホソガ用

▶アリモドキゾウムシ用

## 発生予察用誘引剤

新  
発  
売

コガネコ-ⅠA

▶マメコガネ用

コガネコ-ⅠC

▶コアオハナムグリ、  
アシナガコガネ用

●発生予察用フェロモン製剤は、順次品目を追加していきます。



**サンケイ化学株式会社**

本社 ☎890 鹿児島市都元町880番地 ☎(0992)54-1161  
東京本社 ☎101 東京都千代田区神田司町2-1 ☎(03)3294-6981



# 植物防疫

Shokubutsu bōeki  
(Plant Protection)

第 46 卷 第 9 号  
平成 4 年 8 月 号

## 目 次

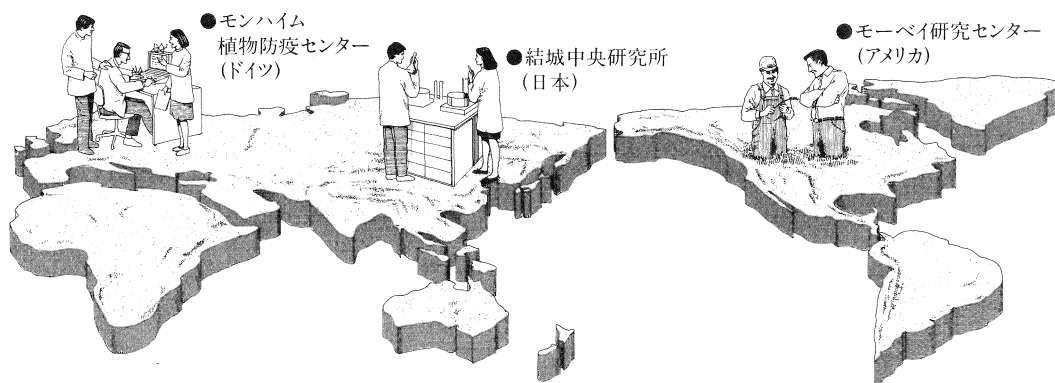
### 特集：RFLP 解析とその応用

|                                                             |                        |
|-------------------------------------------------------------|------------------------|
| 植物の RFLP .....                                              | 河瀬 真琴..... 1           |
| 植物病原糸状菌の RFLP .....                                         | 柘植尚志・草場基章・足立嘉彦..... 9  |
| 植物病原細菌の RFLP .....                                          | 平八重一之・矢野 博・日比忠明.....14 |
| 昆虫における DNA 多型解析の現状 .....                                    | 村路 雅彦.....20           |
| 昆虫の分類における RFLP .....                                        | 野村 昌史.....24           |
| 昆虫寄生性線虫 <i>Steinernema kushidai</i> によるコガネムシ類幼虫防除の可能性 ..... | 小倉 信夫・大矢 慎吾.....28     |
| プロベナゾールの作用機構と遺伝子発現制御 .....                                  | 南 栄一・安東 郁男.....32      |
| 日本産 <i>Panonychus</i> 属ハダニの研究の現状 .....                      | 後藤 哲雄・江原 昭三.....36     |
| モノクローナル抗体を用いたカンキツタターリーフウイルスの ELISA 法による検出方法 .....           | 河合 昭・塚本貴敬.....42       |
| 有用植物の病名のつけ方—新病名命名基準と命名申請制度発足について— .....                     | 鈴井 孝仁.....47           |
| 研究放談室 (12) ——研究の評価—— .....                                  | 小野小三郎.....50           |

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| 紹介 新登録農薬 .....                   | 53, 54     |
| 新しく登録された農薬 (4, 6, 1~6, 30) ..... | 27, 31, 52 |
| 学界だより .....                      | 41         |
| 協会だより .....                      | 54         |
| 新刊紹介 .....                       | 19         |
| 次号予告 .....                       | 35         |
| 出版部より .....                      | 54         |

## 自然の恵みをより豊かにするために。

「確かさ」を追求…バイエルの農薬



### バイエルの植物防疫世界三大研究開発拠点

食糧の安定供給のための植物防疫は、今や地球全体の問題であり、常に世界的視野に立って研究すべき時代。当社は、ドイツのバイエル、アメリカのモーベイとともに世界におけるバイエルの三大研究開発拠点の一つとして、ますます重要な役割を担っています。

Bayer 

日本バイエルアグロケム株式会社

東京都中央区日本橋本町2-7-1 ☎103

**新発売**



# コンピューター発生予察システム を活用したいもち病防除剤——

- いもち病・こま葉枯病・穂枯れ防除に

**ブラシン<sup>®</sup>粉剤DL**

- いもち病・紋枯病・こま葉枯病防除に

**ブラシンバリタ<sup>®</sup>粉剤DL**

- いもち病・こま葉枯病防除に

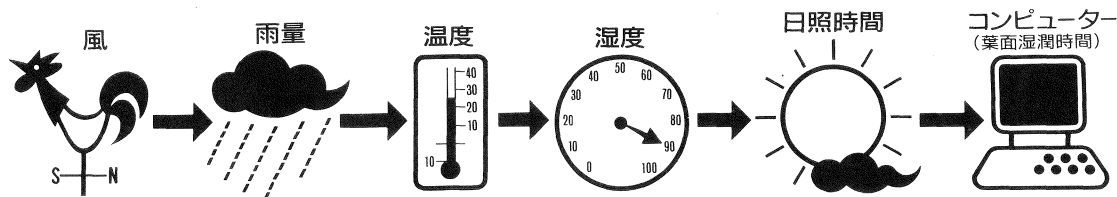
**ブラシン<sup>®</sup>水和剤**

- 雨に強く、散布後の降雨による防除効果の低減が少ない。
- いもち病蔓延初期散布においても高い防除効果。
- こま葉枯病、穂枯れ性病害などにも有効。

アメダスの恋人

# BLASIN

アメダスを利用した発生予察は全国840カ所(日本全土直径18km地点に1カ所あり)から送られたデータをもとに、農業試験場がいもち病の感染好適葉面湿润時間を算出し、いもち病の発生予察・防除に活用しています。



武田薬品工業株式会社 アグロ事業部 東京都中央区日本橋2丁目12番10号

## 特集：RFLP 解析とその応用〔1〕

## 植物の RFLP

農林水産省農業生物資源研究所

かわ

瀬

真

琴

## はじめに

植物の遺伝形質の研究は、まず個々の形質や遺伝現象に着目し、その形質を支配する遺伝子を解析するといった方法で研究されてきた。メンデルのエンドウマメの実験で知られるように、まず形態的形質が研究の対象となり、その後、生化学的形質、生理的形質と広がった。多くの人為的突然変異遺伝子をマーカー（標識）として利用した遺伝研究の結果、トウモロコシ、オオムギ、イネなどの作物で、遺伝子の連鎖関係に基づく連鎖地図が構築された。連鎖地図は個々の遺伝子がどの染色体のどの部分に座乗しているかを表している。

近年の分子生物学の進展により、遺伝情報を担っている DNA の変異を直接分析することが可能になってきた。そのひとつが RFLP 解析である。RFLP 解析は DNA の多型、すなわち自然界に存在する遺伝的変異の検出に利用できる。したがって、多くの人為突然変異のように生存や生育に不都合な形質を導入することなく、一度に多くの遺伝子座について研究することが可能になった。

ここでは植物、とくに作物の核 DNA の RFLP に関して、遺伝的変異の指標としての集団遺伝学的利用や系統分類への応用も含めて述べることにする。

## I RFLP 解析の原理と方法

## 1 RFLP 解析の原理

RFLP は Restriction Fragment Length Polymorphism (制限酵素断片長多型) の略称であり、その検出にはサザーン・プロット法が用いられる (SOUTHERN, 1975)。まず組織から DNA 分子を抽出し、制限酵素によって切断 (消化) すると様々な長さの DNA 断片が得られる。制限酵素は特定の塩基配列の所で DNA を切断する酵素であり、非常に多くの種類が見いだされている。消化された DNA をアガロース電気泳動などによって断片の長さに基づいて分離し、二本鎖 DNA を一本鎖に解離した後ナイロン・フィルター・メンブレンに転写する。別に用意した特定の配列の DNA をプローブとして相補

的な DNA 同士をハイブリダイゼーションさせることによって泳動された断片がバンドとして検出される。一般にはプローブ DNA を予め放射性同位元素によって標識したり、あるいは非放射性的化学標識を行い発色反応や化学発光を利用して検出する。DNA を抽出した植物個体によってバンドの位置、すなわち制限酵素処理によって生成した DNA 断片の長さの違いがあれば、それは個体間の遺伝的な多型を検出したことになる。

RFLP として検出される DNA の塩基配列の変異の原因には、制限酵素認識部位の塩基配列のポイント・ミューテーション (点突然変異) である塩基置換、DNA 断片の挿入、欠失、塩基のメチル化などが考えられる (図-1)。

従来から遺伝的マーカーとして用いられている多くのアイソザイムなどと同様に、雑種が両親のバンドを併せ持つ共優性を示す (変異がバンドの有無の場合は優性・劣性となる) が、一度にアイソザイムでは及びもつかないほど多くの遺伝子座について解析を行うことができる。また、今後さらに検証が必要であるが、植物個体の細胞が同じ染色体のセットを保有しているとすれば、生長のステージによる差異や組織・器官特異性を基本的に無視できると考えられる。

## 2 RFLP 解析の方法

## (1) RFLP プローブ

RFLP の検出に用いるプローブとしては、さまざまな DNA の断片が考えられる。ジェノミッククローンでもよいし、cDNA クローンでもよい。連鎖分析のための遺

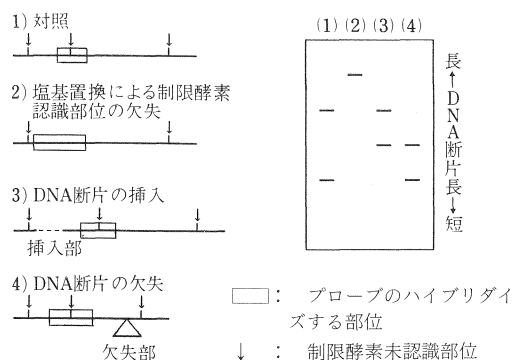


図-1 RFLP の生じる原理



伝子マーカーとして利用するのであれば、なるべくコピー数が少なく、単純なバンドを検出できるものが便利である。イネを例にとると、合衆国のコーネル大学のTANKSLEY博士らのグループが開発したRFLPプローブ(McCOUCH et al., 1988)は現在USDAに寄託されているし、農林水産省と九州大学の研究グループが開発したプローブは農業生物資源研究所で管理しており、申請すれば研究用として配布されている。これらは扱いの簡便さから数百から二千塩基対(bp)程度の長さのDNA断片が多い。また、品種や個体の識別にはDNA反復配列の利用が考えられ、一度に多くのバンドの検出できるプローブを用いた、いわゆるフィンガー・プリンティングが試みられている。

これらDNA断片は適当なプラスミドに組み込んで大腸菌で大量に増殖する、あるいはPCR法で増幅することができる。実際にプローブとして用いる際には検出のため放射性同位元素( $^{32}\text{P}$ など)を用いた放射能標識や非放射能標識(ビオチン、ジゴキシゲニン標識など)を用いて標識化する必要がある。放射能標識にはDNA修復反応を利用したニックトランスレーション法、Klenow fragmentのポリメラーゼ活性を利用したランダムプライマー伸長法などいくつかの方法があり、キットとして販売されている。

筆者らは、最近是非放射能標識法としてジゴキシゲニン(DIG)による方法を利用している。ペーリンガー・マンハイム社よりDIG DNA Labelling Kitとして市販されている。プローブとして用いるDNA断片を一本鎖に解離(変性と呼ぶ)した後、ジゴキシゲニンの結合したデオキシウリジン三リン酸(DIG-dUTP)を含む反応溶液中で、Klenow fragmentのポリメラーゼ活性を利用したランダムプライマー伸長法で標識化する。合成されたDNAの20-25ヌクレオチドごとにDIG-dUTPが取り込まれるといわれている。具体的な標識操作は次のとおりである。

プローブとなるDNA断片をクローニングして増殖後、プラスミドから制限酵素で切り出し、アガロースゲル電気泳動で分離し、抽出する。得られたDNA断片を含む水溶液をウォーターバスで95°C、10分間変性し、氷水に移し急冷する。この変性したDNA(10 ng~3 µgDNAを含む)の水溶液15 µlにヘキサヌクレオチド混合物(ランダムプライマー、キットに付属)2 µl、dNTP混合物(dATP, dCTP, dGTP, dTTP及びDIG-dUTPの混合物、キットに付属)2 µl、Klenow enzyme(キットに付属)1 µlを加え、37°Cで20時間程度置く。DIG標識したプローブの精製にはTakaraのSuprec-02を用いると

簡便である。

## (2) DNAの調製

RFLP分析には50 kbp程度のDNAを得ることが望ましく、そのため植物体からのDNAの抽出にはCTAB法が簡便で適している。筆者らはMURRY and THOMPSON(1980)の方法を改変して用いているので、そのプロトコルを図-2に示す。得られたDNAを少量とって電気泳動し、λDNAより大きいあるいはほぼ同じくらいの分子量であれば、十分RFLP分析に用いることができる。

## (3) アガロース電気泳動とプロットティング

植物体から抽出したDNAを制限酵素で消化し、生じたDNA断片を分子量に応じて分離するためにアガロースゲル電気泳動を用いる。目的とするDNA断片長にもよるが、0.8%から1.5%のアガロースゲルが適している。サザン・プロットティングの場合には電気泳動したゲ

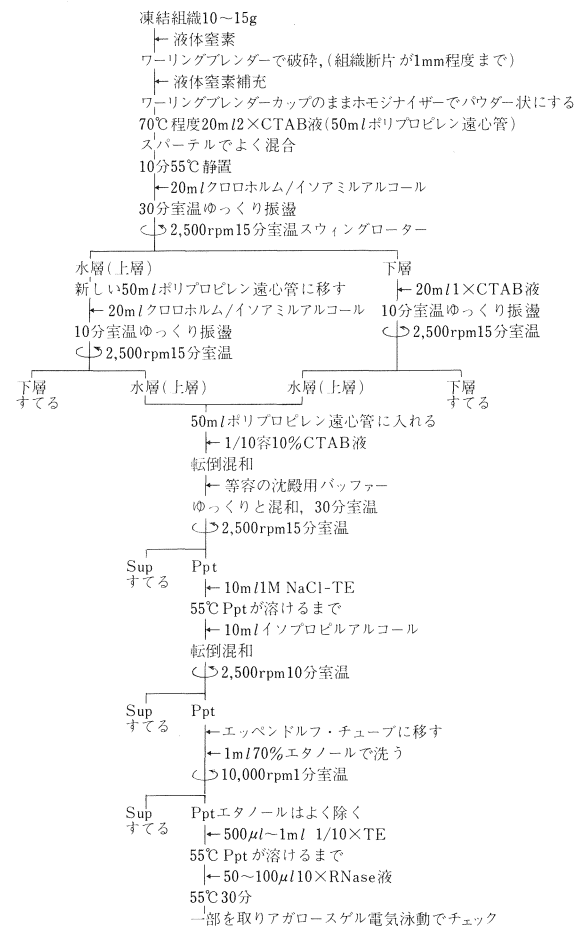


図-2 植物DNAの調整法(渡辺格監修, 植物バイオテクノロジー実験マニュアル「クローニングとシークエンス」(1989)より一部改変)

ルを酸処理, 続いてアルカリ変性処理し, ナイロン・フィルター・メンブレンに転写する。特に大きな DNA 断片を目的としない場合には, 酸処理を省略したアルカリ・プロットイングが簡便である。これは電気泳動後のゲルをアルカリ溶液 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) 中でゆっくり振とうした後, 同じアルカリ溶液を用いたキャピラリー・プロットイングによってナイロン・フィルター・メンブレンに転写する方法である。いずれの場合もゲルを割ったり, ゲルとナイロン・フィルター・メンブレンとの間に気泡が入ったりしないように注意する。また, アルカリ・プロットイングの場合にはナイロン・フィルター・メンブレンを素通りする DNA もあるので, プロットイングを5時間以内にとどめておいた方が無難である。

ハイブリダイゼーションの基本的な原理, 手順は多くの分子生物学に手引き書 (たとえば Sambrook et al., 1989) に解説されているし, とくにハイブリダイゼーションについては小林・小林 (1990) に詳述されているので参照されたい。

#### (4) RFLP の検出

前述のように, RFLP の検出は放射能標識あるいは非放射能標識したプローブによって行われる。標識法には多くの方法が試みられ, 現在ではキットの形で各社より供給されている (兼松ら, 1991)。

ジゴキシゲニンによる方法はベーリンガー・マンハイム社より DIG Luminescent Detection Kit として市販されており, 付属のプロトコールにしたがって X 線フィルムで検出できる。以下にプロトコルを簡単に示す。

1) プレハイブリダイゼーション: DNA をプロットイングしたナイロン・フィルター・メンブレンはメンブレン 100 cm<sup>2</sup> 当たり 20 ml のハイブリダイゼーション溶液 (5×SSC, 1%ブロッキング剤 (キット付属), 0.1% (w/v) N-Lauroylsarcosine/0.02% (w/v) SDS) 中で 68°C で 1~3 時間。ホルムアミドを 50% 添加するときは 42°C。

2) ハイブリダイゼーション: 前述のハイブリダイゼーション溶液 1 ml 当たり 10~20 ng の熱変性した DIG 標識プローブを加えた溶液を調製し入れ換える。量はメンブレン 100 cm<sup>2</sup> あたり 2.5 ml。68°C で一晩置く。ホルムアミドを 50% 添加するときは 42°C。

3) メンブレンの洗浄: ハイブリダイゼーションの終わったメンブレンは 0.1% SDS を含む 2×SSC で室温, 5 分間 2 回, 次いで 0.1% SDS を含む 0.5×SSC で 68°C, 15 分間 2 回洗浄する。

#### 4) 検出:

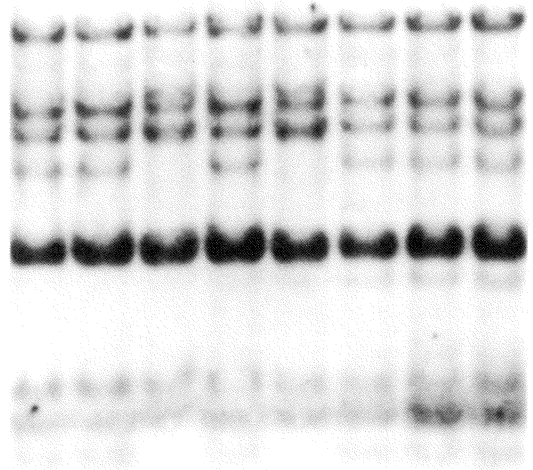


図-3 DIG 標識プローブを用いたイネの RFLP の検出例

① メンブレンをウォッシング・バッファー (0.1 M マレイン酸, 0.2 M NaOH, 0.15 M NaCl, 0.3% (w/v) Tween 20) に軽く浸す。

② メンブレンを 100 ml のバッファー 2 (0.1 M マレイン酸, 0.2 M NaOH, 0.15 M NaCl, 1%ブロッキング剤) で室温で 30 分。

③ 抗ジゴキシゲニン抗体とアルカリ性フォスファターゼの結合体 (キットに付属) をバッファー 2 に 1:10000 で希釈した溶液 20 ml 中にメンブレンを移し, 室温で 30 分。この溶液は 4°C で 12 時間しか活性がない。

④ メンブレンをバッファー 3 (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) で数分平衡化する。

⑤ メンブレンの水分を濾紙に吸わせた後, AMPPD (基質, 3- (2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane) をバッファー 3 に 1:100 に希釈して調製した基質溶液に浸す。

⑥ メンブレンを完全には乾かさないうちに水分を濾紙で吸い取り, 市販のハイブリ・バッグに入れるかあるいは台所用のラップで包み, X 線フィルム・カセットに入れ, 暗室で X 線フィルムを入れる。20 分~2 時間露光後, フィルムを現像する (図-3)。

#### (5) 結果の解析

RFLP の解析法には, 画像解析・自動読み取りによる

方法も開発されているが、まだ一般に普及するには至っていない。

肉眼で多型を判断する場合には、アイソザイムやタンパク質の電気泳動像の解析と同様である。分類単位の間にはどの程度の遺伝的な差異があるかをみるために遺伝距離 (genetic distance) という概念が用いられる。タンパク質のアミノ酸の置換の速度は個々の例では異なっているが、長い進化の時間で考えれば全体としてはほぼ一定とみなして解析を行うことによって、進化の道筋に時間の概念を持ち込むことが可能になるという考えに基づいている。Nei (1972) は、集団の標準遺伝距離 (standard genetic distance) を

$$D = -\log_e I$$

で推定できると考えた。

ここで  $I$  は集団間の類似度を示す遺伝的相同指数で

$$I = J_{XY} / \sqrt{J_X J_Y}$$

で求められる。ここで  $J_{XY}$ ,  $J_X$ ,  $J_Y$  は  $j$  番目の遺伝子座における  $i$  番目の対立遺伝子頻度を、 $X$ ,  $Y$  という二つの集団についてそれぞれ  $x_{ij}$ ,  $y_{ij}$  としたとき

$$J_X = \sum_j \sum_i \frac{(x_{ij})^2}{r}$$

$$J_Y = \sum_j \sum_i \frac{(y_{ij})^2}{r}$$

$$\checkmark J_{XY} = \sum_j \sum_i \frac{(x_{ij} \cdot y_{ij})}{r}$$

で与えられる。 $r$  は調査遺伝子座数を表す。

$X$ ,  $Y$  の二つの集団で遺伝子頻度が全く等しければ、 $I = 1$ ,  $D = 0$  となり、対立遺伝子に共通性が全くなければ  $I = 0$ ,  $D = \infty$  となる。

遺伝距離は、調査遺伝子座数、集団数によって、必ずしも同様な精度で比較できるものではないが、一般に分類単位のランク (属, 種, 亜種など) に比較的良好に対応するといわれ、アイソザイムを中心とする集団の遺伝的構造や遺伝的分化の目安として用いられている。

ミトコンドリア DNA やクロロプラスト DNA をいろいろな制限酵素で消化して得た DNA 断片の情報から、個体  $X$  と個体  $Y$  の遺伝的な類似度は

$$F = \frac{2 m_{xy}}{m_x + m_y}$$

で推定することができる (Nei, 1987)。ここで  $m_x$ ,  $m_y$  はそれぞれ  $X$  と  $Y$  で見られる DNA 断片数,  $m_{xy}$  は  $X$ ,  $Y$  に共通して見られる DNA 断片数である。詳細は省略するが、この値に基づいて 1 サイト当たりの塩基置換数を推定できる。

遺伝距離あるいは個体間の遺伝的類似度に基づいて、共通祖先からの分化のパターンを系統樹として再構成す

る試みには、さまざまな方法が考えられている。枝分かれ図を描く多変量解析はクラスター分析と呼び、いろいろな手法があるが、一般に広く用いられているのが UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) である。各分類単位 (OTU, operational taxonomic unit) 間の遺伝距離の最も小さいものをひとつのグループにまとめ、その新しい分類単位と他の分類単位間の遺伝距離は、もとの二つの遺伝距離の相加平均を用いる (Nei, 1987)。簡単に図で示すと

|     |          |          |          |
|-----|----------|----------|----------|
| OTU | 1        | 2        | 3        |
| 2   | $d_{12}$ |          |          |
| 3   | $d_{13}$ | $d_{23}$ |          |
| 4   | $d_{14}$ | $d_{24}$ | $d_{34}$ |

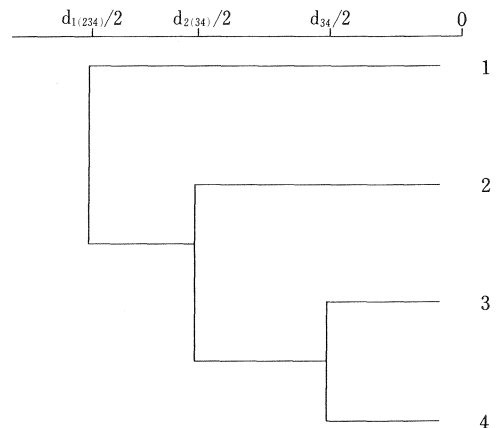
ここで  $d_{ij}$  は  $i$  番目と  $j$  番目の分類単位間の遺伝距離である。

もし、分類単位 3 と 4 の距離が最小であれば、

|        |             |             |
|--------|-------------|-------------|
| OTU    | 1           | 2           |
| 2      | $d_{12}$    |             |
| (3, 4) | $d_{1(34)}$ | $d_{2(34)}$ |

となる。ここで  $d_{1(3,4)}$  と  $d_{2(3,4)}$  は  $(d_{13} + d_{14})/2$ ,  $(d_{23} + d_{24})/2$  でそれぞれ与えられる。

もし  $d_{2(3,4)}$  が最小なら、分類単位 2 と分類単位 (34) が遺伝距離  $d_{2(34)}/2$  の点で結びつく。この場合、分類単位 1 は最後に他の分類単位とつながることになる。その分岐点の遺伝距離は  $d_{1(234)}/2 = d_{12} + d_{13} + d_{14} / (3 \times 2)$  である。



系統樹の再構築のための枝分かれ図 (デンドログラム) の手法には UPGMA 以外にもいろいろ試されている。遺伝距離がタンパク質のアミノ酸の置換、あるいは DNA の塩基の置換などをもとに遺伝的分化に時間軸を導入使用とするものであるが、たとえば RFLP 分析で得られる結果を考えた場合、それには前述のように制限酵素認識部位の塩基の置換、DNA 断片の挿入、欠失、逆位、

塩基のメチル化などいろいろな原因が考えられ、解析している DNA も構造遺伝子の領域もあれば、それ以外の部分もあり、その解析方法も十分に確立されているとはいえない。多型の検出方法、解析方法とも今後のゲノム研究によって新たな展開が予想される。

### 3 RFLP 連鎖地図作成の原理と方法

メンデルの分離の法則、独立の法則、優性・劣性の法則の発見は現在の遺伝学の基礎となったが、独立の法則にはたくさんの例外がある。独立の法則は遺伝子が別の染色体に座乗しているか、あるいは同一の染色体上でも離れた位置にあるときに成り立つ。逆に同じ染色体の上で近くに位置しているときには、二つの遺伝子が一緒に行動しがちになる。この現象を連鎖と呼ぶ。配偶子が形成される減数分裂の際に、交叉と呼ばれる染色体部分の

交換が起こる。交叉が染色体上のいろいろな点でランダムに生じれば、2 個の遺伝子が互いに近ければまれに、離れていればより頻繁に交叉によって組換えられる。すなわち組換えの頻度から遺伝子の染色体上での距離を推察できる。実際には染色体のすべての部分で同じ頻度で組換えが起こるわけではないので、その距離は物理的距離と完全に比例するわけではないが、遺伝子の順序は変わらない。同一染色体上で離れて存在する遺伝子については、検出されない多重交叉があるため、その組換え率は地図距離より低くなり、お互いに独立なほど遠く離れた遺伝子間の組換え率は 50% となる。組換え価の計算法にはプロダクト法や最尤法があるが、詳しくは植物遺伝学実験法（常協（責任編集），1982）などを参考にされたい。

通常ホモ接合性の高い自殖性植物の場合、多くの RFLP を検出できる個体間の組み合わせの交配で得られた雑種第 2 代 ( $F_2$ )（あるいは戻し交雑）の RFLP マーカーの分離を調査し、連鎖関係を分析することによって、RFLP 連鎖地図を作成できる（図-4）。RFLP だけでなく、特定の形質の遺伝子をその地図上に位置づけることも可能である。現在では専用のコンピュータ・ソフトが開発されている（LANDER et al., 1987；鵜飼ら，1990）。

また、三染色体植物（トリソミックス）を利用し、座乗染色体を特定することも行われる。

## II 植物の RFLP とその応用

### 1 研究の現状

植物における RFLP の利用は 1980 年代後半から急速に増え、新しい遺伝マーカーとして広く利用されている。植物、とくに農業において利用されている作物の場合には遺伝子地図の作成あるいは特定の遺伝子の連鎖分析、品種間変異の解析、品種識別、さらには戻し交雑における特定の遺伝子の同質遺伝子系統作出の効率化、量的形質を支配する複数の遺伝子座の解析などが試みられている。そのいくつかを紹介したい。

RFLP 連鎖地図は、トウモロコシ、トマト、イネ、オムギ、コムギ、ジャガイモ、レタス、ブラシカ類、等々主要作物のほとんどで次々と発表されているし、品種間、種間などの遺伝的変異の研究もきわめて盛んである。

図-5 にイネの RFLP 連鎖地図を示す（SAITO et al., 1991）。12 対の染色体に対応した連鎖群で構成され、RFLP マーカーといくつかの形態やアイソザイムの遺伝子が乗っている。

RFLP は遺伝的多様性の研究にも早くから利用されている。筆者らはイネで核 DNA の RFLP を利用して品種分類を試みた（KAWASE et al., 1991）。世界各地の品種

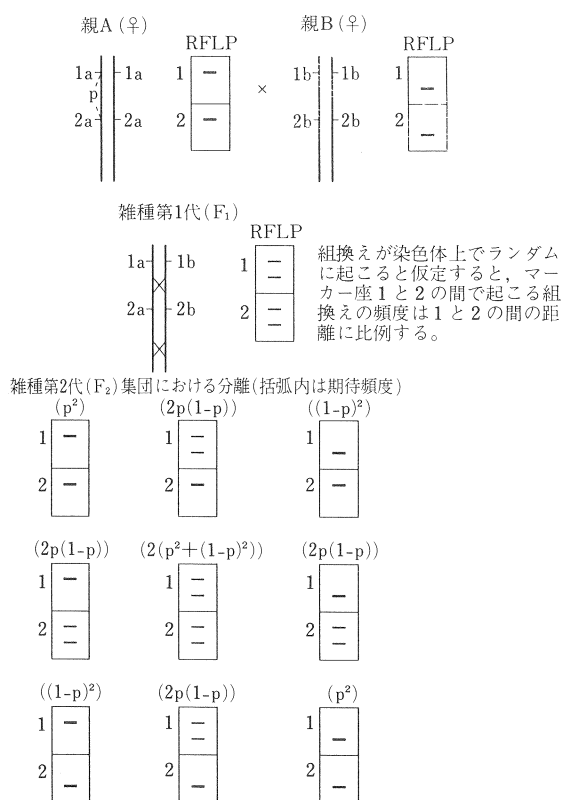


図-4 RFLP 連鎖分析の原理

二つの RFLP マーカー 1 及び 2 について、1a, 2a を示す個体 A と 1b, 2b を示す個体 B (ともに同質接合体とする) との交配から得られる雑種第一代及び第 2 代の分離を模式的に示す。組換え価を  $p$  と置き、 $F_2$  集団の実際の分離と期待頻度から最尤法により組換え価  $p$  を求める。染色体上における RFLP マーカーの配列順序を決めるためには、3 個のマーカーの連鎖を調べる 3 点試験を順次繰り返す。

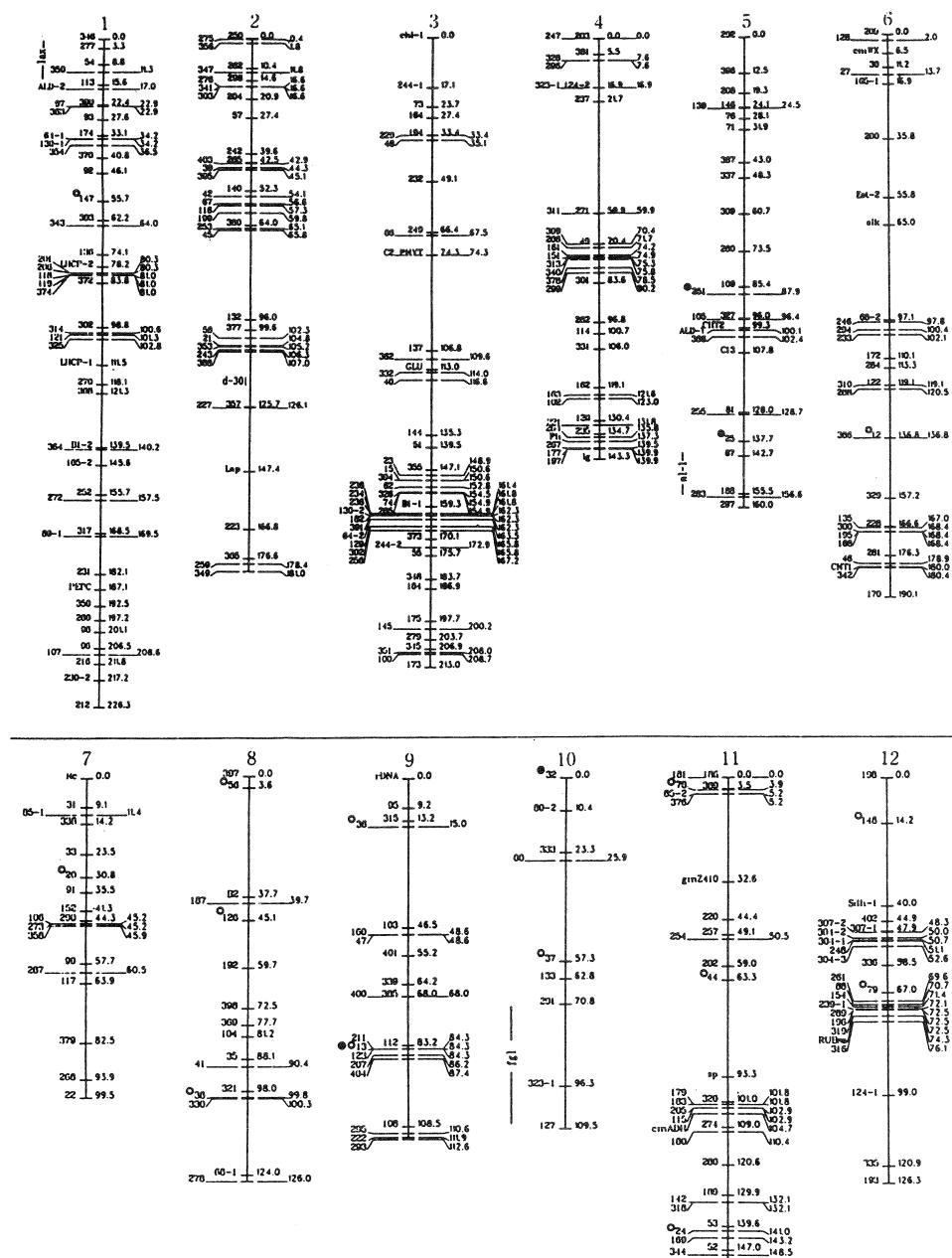


図-5 イネのRFLP連鎖地図 (SAITO et al., 1991)

135品種を用い、57のRFLPマーカーについて調査した。得られた結果を主成分分析、クラスター分析したのが図-6である。このRFLPによる分類の試みの結果、供試品種がまず二つのグループに分類できたが、それは従来唆されてきた2大品種群（インド型品種、日本型品種）とよく対応していた。さらに各品種群の中に特定の分布地域と結びついた小さな品種群の存在も明らかとな

った。

野生イネには2倍体、4倍体の多くの種が知られているが、WANG et al. (1992) は93アクセシオンをRFLP解析し、細胞遺伝学的研究によるゲノム分析の結果と突き合わせ、非常によく対応していることを報告している。さらに異質4倍体の種の祖先2倍体種の推定も試みてい



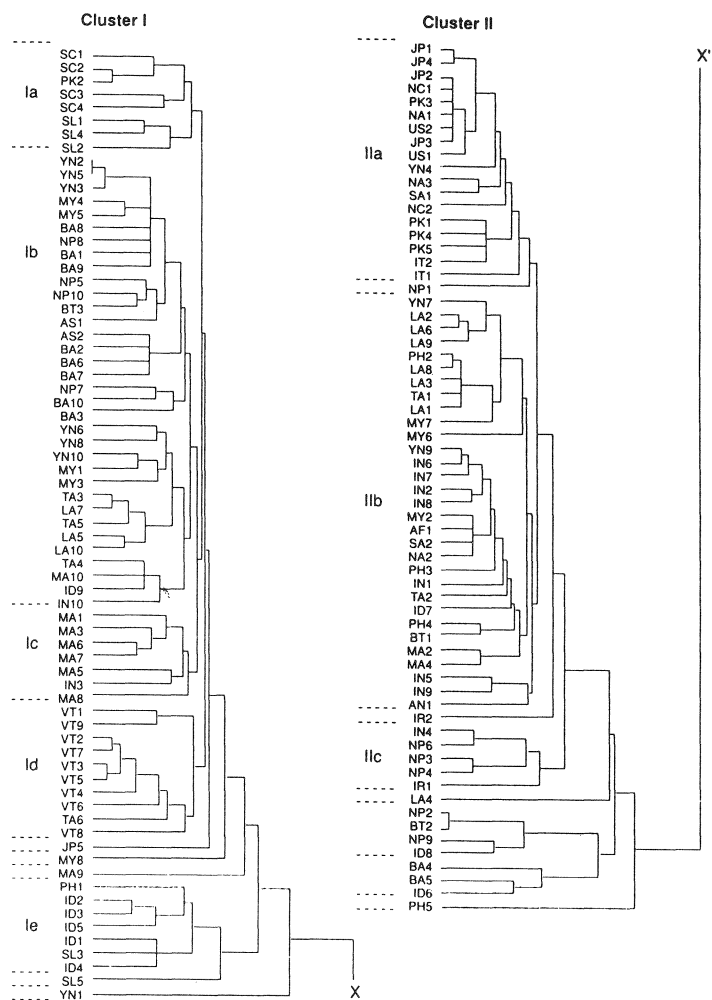


図-6 イネ品種の RFLP に基づくクラスター分析(上)及び主成分分析(下) (KAWASE et al., 1991)

他殖性の植物としては BRUMMER et al. (1991) が二倍体と四倍体のアルファルファの変異の解析に RFLP を用いている。McGRATH et al. (1992) は各地域の草型の異なるキャベツ類の遺伝的変異をアイソザイムと RFLP の両者を用いて比較検討し、キャベツ類の系統分化を議論している。このように RFLP の解析は、作物進化の研究においても強力な武器になると考えられる。

また、量的形質 (QTL) を支配する遺伝子座の解析への RFLP の応用もトウモロコシ、トマトなどで試みられている (PATERSON et al. (1988), EDWARDS et al. (1992))。

## 2 RFLP による病害虫抵抗性遺伝子のマッピング

RFLP の利用のひとつとして、育種において重要な遺伝子のより詳細な研究をあげることができる。そのひとつが病害虫抵抗性遺伝子である。

吉村ら (1989) はイネの白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa-1* および *Xa-12* の近傍に連鎖する RFLP マーカーを得ている。また Yu et al. (1990) はイネいもち病抵抗性遺伝子 (*Pi-2 (t)*) のごく近傍に位置する RFLP マーカーを報告した。MICHELMORE et al. (1989) はレタスの RFLP 地図を構築し、うどんこ病抵抗性、ターニップモザイクウイルス抵抗性、耐虫性 (root aphid resistance) の遺伝子を地図上に位置づけた。MESSEGUER et al. (1991) はトマトのネマトーダ (root knot nematode) 抵抗性遺伝子 (*Mi*) の周囲の詳細な RFLP 地図を作成した。

病害虫抵抗性遺伝子の RFLP 分析は現在緒についたばかりではあるが、従来の遺伝子座の分析や連鎖分析の蓄積があるので急速に進展している。緊密に連鎖したマーカーの発見は、単に遺伝的指標としての RFLP の利用ばかりでなく、将来は遺伝子のクローニングへと進むと思われる。そうなれば現在は機作のよく分かっていない抵抗性遺伝子についても、分子遺伝学的な知見が得られることになる。

## おわりに

栽培される作物を中心に、植物の核 DNA の RFLP の研究は急速に進み、今まで述べてきたようにさまざまな応用が試みられている。RFLP 連鎖地図は遺伝子の詳細なマッピングを可能にしたし、RFLP を利用して育種の過程を詳しく検証することも試みられている。今後のゲ

ノム研究にも、染色体 DNA 各部のマーカーとして重要な役割を果たすであろう。アイソザイムなどに比べ非常に多くの遺伝的マーカーを一度に調査できるため、遺伝的多様性の新しい評価法として、種間や種内の精密な分類に利用できることが明らかとなった。これは遺伝的分化、さらには進化の問題を研究するための強力なツール (道具) が手に入ったと言えることができる。また、実用化には十分なデータの蓄積が必要であるが、将来はさまざまな植物で品種・系統の同定あるいは識別に応用されよう。

分子生物学の分野では、例えば PCR 法による DNA の多型検出など、次々と新しい手法が開発されている。ここで述べた RFLP 分析は決して最新の方法ではないが、その応用分野は今まで以上に広がると考えられる。

## 引用文献

- 1) BRUMMER, E. C. et al. (1991): Theor. Appl. Genet. 83: 89~86.
- 2) EDWARDS, M. D. et al. (1992): ibid. 83: 765~774.
- 3) 兼松誠司ら (1991): 植物防疫 44: 549~556.
- 4) KAWASE, M. et al. (1991) Rice Genetics II: 467~473.
- 5) 小林裕和・小林京子 (1990): 植物細胞工学 2: 543~555.
- 6) LANDER, E. S. et al. (1987): Genomics 1: 174~181.
- 7) MCCOUCH, S. R. et al. (1988): Theor. Appl. Genet. 76: 815~829.
- 8) McGRATH, J. M. et al. (1992): ibid. 83: 783~790.
- 9) MESSEGUER, R. et al. (1991): ibid. 82: 529~536.
- 10) MICHELMORE R. W. et al. (1989): Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics, Cold Spring Harbour Laboratory: 45~50.
- 11) MURRY, M. and W. F. THOMPSON (1980): Nucleic Acids Res. 8: 4321~4325.
- 12) NEI, M. (1972): Am. Naturalist 106: 283~292.
- 13) ——— (1987): Molecular Evolutionary Genetics, Columbia Univ. Press, New York, 512pp.
- 14) PATERSON A. H. et al. (1988): Nature 335: 721~726.
- 15) SAITO et al. (1991): Jpn. J. Breed. 41: 665~670.
- 16) SAMBROOK, J. et al. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Vol. 1~3
- 17) SOUTHERN, E. M. (1975): J. Mol. Biol. 98: 503~517.
- 18) 常脇恒一郎 (責任編集) (1982): 植物遺伝学実験法, 共立出版, 464 pp.
- 19) 鶴飼保雄ら (1990): 農林水産研究計算センター第9回電子計算機利用研究発表会論文集: 1~8.
- 20) 渡辺 格 (監修) (1989): 植物バイオテクノロジー実験マニュアル「クローニングとシークエンス」, 農村文化社, 314 pp.
- 21) WANG Z. Y. et al. (1992): Theor. Appl. Genet. 83: 565~581.
- 22) 吉村智美ら (1989): 育種 39 (別2): 300~301.
- 23) Yu, Z. et al. (1990): Rice Genetics II: 451~458.

## 特集：RFLP 解析とその応用〔2〕

## 植物病原糸状菌の R F L P

名古屋大学農学部植物病理学教室

つげ たかし    くさばもとあき    あだちよしひこ  
柘植尚志・草場基章・足立嘉彦

## はじめに

RFLP(制限酵素断片長多型)とは、制限酵素によって切断された DNA 断片の長さが多型性を示すことをいう。多型性とは、一般に同一生物種の個体間で変異がみられることであり、同じヒトでもひとりひとり顔かたちが違うように、地球上の生物ではむしろあたりまえのことである。しかし、微生物では形態が単純であり、変異形質が検出しにくいいため、多型性の研究はやや置き去りにされてきた感があった。

ゲノム全体を対象とする RFLP 解析では、表現形質には現れない変異をも高感度に検出することができる。微生物の RFLP 解析の歴史はまだ浅いが、微生物における個体という概念の重要性をすでに明確に示している。

植物病原糸状菌の RFLP 解析は、主に分類学、生態学、遺伝学的研究などに応用されている。以下に、その応用例を技術的側面を交えながら紹介する。

## I 植物病原糸状菌の RFLP 解析法

## 1 糸状菌 DNA の調製

糸状菌の RFLP 解析を行う場合、DNA 抽出にその主な時間と労力を費やすことになる。供試する DNA は、制限酵素で切断されるだけの純度が必要であり、その抽出には煩雑な操作が要求される。しかし、抽出した DNA は安定に長期間保存することができ、また、電気泳動後、ナイロン膜にプロットングすれば再生して十回以上のハイブリダイゼーション実験に使用可能である。したがって、いったん DNA を抽出すれば、広範な解析に供試することができる。

糸状菌菌体は多量の多糖類と脂質を含むため、DNA の抽出には一般に塩化セシウム密度勾配遠心が用いられるが、多数の菌株を供試する場合、費用と時間の面で問題がある。筆者らは、*Alternaria alternata* の全 DNA の抽出に当たり図-1 に示す簡便法を用いている(柘植ら、1989)。本法は、他属糸状菌についても有効であり、新鮮重 1 g の菌体から 50~100  $\mu$ g の全 DNA が容易に得られる。糸状菌の細胞壁は硬く、DNA 収量は菌糸細胞の破

壊程度にも依存する。したがって、抽出には振とう培養した若い菌体あるいは孢子を栄養培地中で発芽させた菌

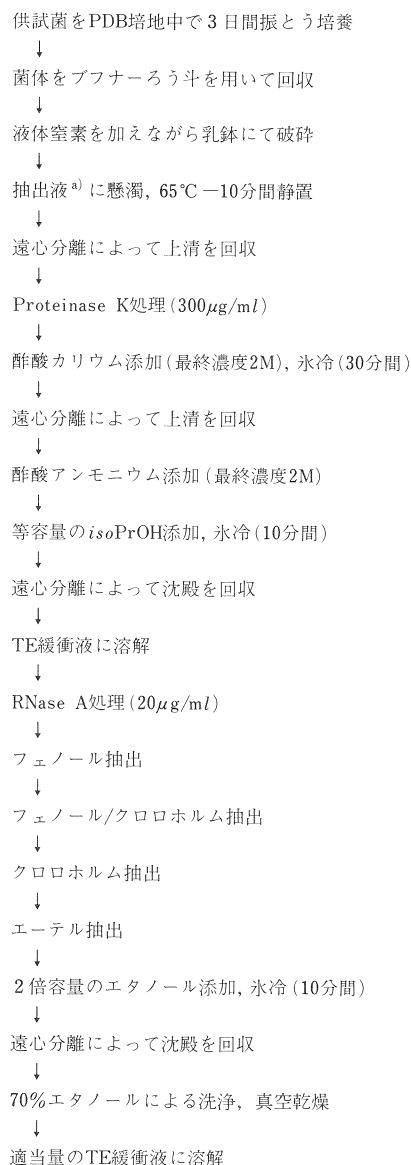


図-1 *Alternaria alternata* 菌体からの DNA の抽出法  
a)抽出液: 50 mM Tris・HCl(pH 8.0), 150 mM EDTA, 1%ラウロイルサルコシン酸ナトリウム

糸などが適している。さらに、菌体を凍結乾燥して用いると収量を向上させることができる。なお、糸状菌 DNA の簡易抽出法については、ほかにも報告されているので参照されたい(BIEL and PARRISH, 1986; LEACH et al., 1986; YODER, 1988)。

糸状菌の RFLP 解析では核とミトコンドリアゲノムが対象となる。上記方法で得られた全 DNA をビスベンズイミドを用いた塩化セシウム密度勾配遠心により分画するか、あるいは、菌体磨砕液から調製した核とミトコンドリア画分から、それぞれ DNA を抽出することによって両者を分離することができる。これら方法の詳細は、文献(GARBER and YODER, 1983; ORBACH et al., 1986; SPECHET et al., 1982)を参照されたい。なお、ミトコンドリア DNA 特異的プローブを準備すれば、全 DNA を用いてもミトコンドリアゲノムの解析が可能である(FÖRSTER and KINGSCHERF, 1988; KIM et al., 1992)。

絶対寄生菌では、孢子あるいは発芽孢子から DNA が抽出されている(HULBERT and MICHELMORE, 1988; O'DELL et al., 1989)。これまで報告されている例では、DNA 収量は比較的良好なようである。また、感染葉から抽出した全 DNA を用いて、菌特異的プローブによって感染菌の RFLP 解析を行うことも可能である(O'DELL et al., 1989)。

## 2 RFLP プローブ

RFLP 解析を行う場合、研究目的に応じてプローブを使い分けることが必要である(MICHELMORE and HULBERT, 1987)。表-1 にこれまでに報告されている植物病原糸状菌の RFLP 解析の研究目的と使用されたプローブをまとめた。種内または特定の集団内での個体識別(DNA フィンガープリンティング)を目的とする場合には、広範な多型の検出が必要であり、一方、種間あるいは属間の識別・同定を目的とする場合には、前者ほどの感度は要求されない。核ゲノムを解析する場合に広く用いられているプローブについて以下に紹介する。

リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)は、種を越えて相同性の高い領域(18 S, 5.8 S 及び 28 S rRNA のコード領域)と比較的変異性に富む遺伝子間領域(intergenic spacer region, 以下 IGS と略す)から構成されている。この構成単位は、タンデムリピートとして染色体上に分布し、糸状菌ではゲノム当たり 100~300 コピー存在する。したがって、RFLP 解析を行う場合、非放射性プローブを用いても容易に検出することができる。ある糸状菌の rDNA をプローブとした場合、すべての糸状菌の rDNA は相同性の高い遺伝子領域を介してハイブリダイズするが、主に IGS における塩基配列さらに長さの違

いにより多型性を示す。なお、糸状菌では、IGS が同一種内では比較的保存されており、RFLP 解析で種内多型が検出された例はむしろまれである。したがって、種の識別など分類学的観点からしばしば利用される(表-1)。

一方、種内変種や個体の識別を目的とする場合には、ゲノムの非遺伝子領域に存在する反復 DNA 配列プローブが用いられている(表-1)。非遺伝子領域の反復 DNA 配列には、直列に反復して存在するもの(直列型配列)と、ゲノム中に散在するもの(分散型配列)とがあり、いくつものファミリーを形成している。このような配列の変異はあまり表現型には影響しないため、各ファミリーの反復単位は多くの変異を含んでいる。また、分散型配列はゲノムに散在するため、近傍配列の多型性をも検出することができる。反復 DNA 配列を用いる利点は、一度に多くの染色体部位を解析できることである。しかし、検出されたおのおのの断片がどの染色体部位に相当するのかを正確に同定できないという欠点をもつ。したがって、“電気泳動レベルで同じ移動度の断片は同一断片とみなす”という RFLP 解析の仮定を考慮すると、反復配列はあくまで種内変異のように基本的に類縁性の高い場合に用いるべきである。

RFLP 連鎖地図の作製には、cDNA や核 DNA 断片(0.5~2 kb)のランダムライブラリーから交配親間で多型性を示すクローンが選抜され、プローブとして用いられる。一般に、反復配列のクローンは解析を複雑にするため敬遠され、シングルあるいは少数コピー配列が利用される。糸状菌のシングルコピー配列や反復配列クローンの単離法の詳細は、文献(HAMER et al., 1989)を参照されたい。

ミトコンドリアゲノムの解析では、電気泳動ゲルの染色によってゲノム全体の酵素切断パターンを直接比較することができる(FÖRSTER et al., 1989)。しかし、種間比較などでは、検出された断片をハイブリダイゼーションによって特定したほうが無難である。糸状菌のミトコンドリアゲノムは 50 kb 程度なので、RFLP を正確に読み取ることによって塩基置換速度を算出することができ、精度の高い進化学的解析が可能となる(根井, 1990; TAYLOR, 1986)。

プローブの標識には通常ラジオアイソトープが使われているが、日常的に実験を行うためには、費用、設備、安全性などの点で問題がある。最近、検出感度の高い非放射性標識・検出キットが市販されており、ゲノムサイズが 10<sup>7</sup>bp オーダーと比較的小さい糸状菌では、シングルコピー配列を検出することも可能である。

## 3 RFLP の解析

糸状菌ではゲノムサイズが比較的小さいため、ハイブリダイゼーションの検出は容易である。一連の実験操作もDNAの抽出を除けば特別注意すべき点はなく、遺伝子操作実験書に従って行えばよい。RFLPデータからの類似度の算出、系統樹の作製などについては、本特集の「植物のRFLP」ならびに成書(根井, 1990)を参照されたい。

植物病原糸状菌に限ったことではないが、RFLP解析を行う場合、用いるサンプルサイズとサンプルにおける

偏りを常にチェックすることが重要である。研究が進むにつれ、個体間で予想以上に多くの多型が存在することが明らかにされてきている。したがって、分類学的観点からRFLP解析を利用する場合にも、種内変異、例えば地理的隔離などによる多型性を無視することはできない。解析には地理的由来などの異なるできるだけ多数の菌株を供試し、集団間すなわち個体群構造の比較として解析を進めることが必要である。また、生態学的研究では、あくまで個体の集まりとしてひとつの病原菌をとら

表-1 植物病原糸状菌のRFLP解析例

| 病原菌                                            | 解析ゲノム     | プローブ <sup>a)</sup>    | 解析目的              | 文献          |
|------------------------------------------------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------|
| <i>Alternaria alternata</i>                    | 核         | rDNA                  | pathotype 間の類縁性解析 | 23)         |
| <i>A. alternata</i><br>Japanese pear pathotype | 核         | rDNA, nuDNA (RSC)     | 個体群構造の解析          | 1, 41, 44)  |
| <i>Armillaria</i> 属菌                           | ミトコンドリア   | mtDNA (RC)            | 種の識別              | 37)         |
|                                                | 核         | rDNA                  | 種の識別              | 2)          |
| <i>A. bulbosa</i>                              | 核とミトコンドリア | rDNA, mtDNA (RC)      | 個体群構造の解析          | 38, 39)     |
| <i>Bremia lactucae</i>                         | 核         | cDNA (RC), nuDNA (RC) | 種内変異の検出           | 15)         |
|                                                | 核         | cDNA (RC), nuDNA (RC) | RFLP連鎖地図の作製       | 16)         |
| <i>Cochliobolus heterostrophus</i>             | 核         | cDNA (RC), nuDNA (RC) | RFLP連鎖地図の作製       | 45)         |
|                                                | ミトコンドリア   | mtDNA (RC)            | 種内変異の検出           | 10)         |
| <i>Erysiphe graminis</i>                       | 核         | nuDNA (RSC)           | 分化型間の類縁性解析        | 35)         |
| <i>E. graminis</i><br>f. sp. <i>hordei</i>     | 核         | nuDNA (RSC)           | 個体群構造の解析          | 5)          |
| <i>Fusarium</i> 属菌                             | 核         | nuDNA (RC)            | 種及び分化型の識別         | 26)         |
| <i>F. oxysporum</i>                            | 核とミトコンドリア | rDNA, mtDNA (RC)      | アブラナ科を宿主とする分化型の識別 | 18)         |
|                                                | 核         | nuDNA (RSC)           | 分化型間の類縁性解析        | 19)         |
| <i>F. oxysporum</i><br>f. sp. <i>dianthi</i>   | 核         | nuDNA (RC)            | 菌糸融合群の識別          | 27)         |
| <i>F. oxysporum</i><br>f. sp. <i>melonis</i>   | ミトコンドリア   | mtDNA (RC)            | 病原性、非病原性菌の類縁性解析   | 11)         |
| <i>F. oxysporum</i><br>f. sp. <i>niveum</i>    | ミトコンドリア   | mtDNA (RC)            | 個体群構造の解析          | 17)         |
| <i>Leptosphaeria maculans</i>                  | 核         | nuDNA (RC)            | 病原性、弱病原性菌の類縁性解析   | 20)         |
| <i>Magnaporthe grisea</i>                      | 核         | nuDNA (RSC)           | pathotypeの識別      | 14, 25)     |
|                                                | 核         | nuDNA (RSC)           | RFLP連鎖地図の作製       | 13, 46)     |
| <i>Mycosphaerella graminicola</i>              | 核         | nuDNA (RC)            | 個体群構造の解析          | 32)         |
| <i>Phialophora gregata</i>                     | ミトコンドリア   | 全mtDNA                | 種内変異の検出           | 12)         |
| <i>Phythium</i> 属菌                             | ミトコンドリア   | mtDNA (RC)            | 種の識別              | 28, 29, 30) |
| <i>Phytophthora</i> 属菌                         | ミトコンドリア   | mtDNA (RC)            | 種間の類縁性解析          | 6)          |
|                                                | 核とミトコンドリア | nuDNA (RC)            | 種内変異の検出           | 8)          |
| <i>P. megasperma</i>                           | ミトコンドリア   | — <sup>b)</sup>       | 分化型間の類縁性解析        | 7)          |
| <i>Rhizoctonia solani</i>                      | 核         | rDNA                  | 菌糸融合群間の類縁性解析      | 48)         |
| <i>Rhynchosporium secalis</i>                  | 核         | rDNA                  | 種内変異の検出           | 31)         |
| <i>Sclerotinia</i> 属菌                          | 核とミトコンドリア | rDNA                  | 種の識別              | 21)         |
| <i>S. sclerotiorum</i>                         | 核とミトコンドリア | nuDNA (RSC), rDNA     | 個体群構造の解析          | 22)         |

a) rDNA: リボソームRNA遺伝子, nuDNA (RSC): 核DNAの反復配列クローン, nuDNA (RC): 核DNAのランダムクローン, mtDNA (RC): ミトコンドリアDNAのランダムクローン, cDNA (RC): cDNAのランダムクローン。

b) 電気泳動ゲルの染色によりミトコンドリアDNAを解析。

え、目的に応じてサンプルの採集方法などを検討しなければならない。実験的に扱える菌株数には限界があり、莫大な自然個体数のほんの一部分しか解析していないことを忘れてはいけない。

## II 植物病原糸状菌の RFLP とその応用

表-1 に、これまでに報告されている植物病原糸状菌の RFLP 解析例を示した。これら研究では、RFLP 解析を分類学、生態学あるいは遺伝学的観点から利用している。そのうちの多くのものは、“植物病原糸状菌の進化”という共通の興味が背景にあり、ほとんどの研究目的が複数の分野にまたがっているが、便宜上、三つの分野に分けてその現状について述べる。紙面の都合上、個々の事例を紹介することはできないので、詳しくは表-1 にあげた文献を参照されたい。

### 1 分類学への応用

これまで、植物病原糸状菌の分類・同定は菌の形態的特徴や交配能だけでなく、菌の病原性、宿主範囲などをも加味して行われてきた。そのため、系統分類学的には混乱を招いている事例も多々見うけられる。また、農業現場への相次ぐ新品種の導入は、新病害の発生、病原菌の分化などを引き起こし、病原菌同定のための基準を複雑化している。RFLP 解析は、従来の基準では明確な分類学的位置づけが困難であった糸状菌や、種内変異である分化型、レースなどの同定に応用されつつある。

明確な形態的特徴や交配能の欠如が原因で分類学的に混乱をきたしている糸状菌では、RFLP 解析によって新たな情報が得られる可能性が十分予想される。*Sclerotinia* 属菌の分類への応用はその一例である (Kohn et al., 1988)。一方、分類学的基準がすでに明確にされている糸状菌では、RFLP 解析を系統進化学に応用する機運が高まっている。これまで、植物病原糸状菌では、病原性や宿主範囲を重視するあまり分類基準を複雑にしてきたきらいがある。RFLP 解析を利用した系統進化学的研究は、病原糸状菌の分類を複雑化するのではなく、むしろ形態分類学の正確さを浮き彫りにし、分類基準を単純化するであろうと筆者は考えている。

種内変異である分化型やレースの分類基準は、あくまで植物病理学的視点に立つものである。したがって、たとえこれらを識別する有効な RFLP プローブが見いだされたとしても、従来からの接種試験は必要不可欠であろう。しかし、多くの植物を使った接種試験は決して容易なものではなく、もし、有効なプローブが開発されればその手間を大幅に軽減できるであろう。農業現場では、発生病害の病原菌の同定は緊急課題であり、RFLP 解析

を利用した“DNA 診断”は魅力ある手法である。このような視点から、*Fusarium oxysporum* の分化型について、すでに、分化型特異的のプローブが単離されている (Kistler et al., 1987; Kistler et al., 1991)。今後、植物病原糸状菌の“DNA 診断”を実用化するためには、有効なプローブの検索に加え解析技術の簡便化に向けての努力が必要である。

### 2 生態学への応用

生態学的研究では、本来、一つの生物を遺伝的に多様な個体の集団すなわち個体群としてとらえ、その個体群動態を解析することが基本である。しかし、植物病原糸状菌では、一つの病原菌個体群の中にも多様な菌系が存在することに経験的に気づきながらも、それを生態学的に解析する試みは必ずしも成功しなかった。これは、個体群構造を解析するための有効なマーカーが存在しなかったためである。このような背景のもと、RFLP 解析法の登場は、植物病原糸状菌の生態研究に新たな展開をもたらした。

現在までのところ、RFLP 解析を用いた病原糸状菌の生態研究は、種内あるいは特定の集団内での多様性の程度とその頻度の検出、すなわち個体群構造の解析という段階にとどまっている (表-1)。しかし、今後、時間的隔離や地理的隔離、さらに、自然環境や人為的環境によって病原菌個体群がどのように変化するのかについて調べられ、病原菌の個体群動態の解明へと発展することを期待する。このような研究は、病原菌の発生生態の理解につながり、発生予察事業などにも役立つだろう。

植物病原菌には、生活環が異なる多様な糸状菌が存在する。生活環の違いは、有性生殖の有無、世代数さらに宿主植物の生活環とも関連し、病原菌進化に多大な影響を与えるものと考えられる。多くの病原菌の研究成果を総合的に眺めたとき、病原糸状菌の多様性を宿主植物との共進化という観点から比較・解析することができるかもしれない。

### 3 遺伝学への応用

RFLP マーカーを用いて、これまでに、*Cochliobolus heterostrophus* (Tzeng et al., 1992), *Bremia lactucae* (Hulbert et al., 1988), *Magnaporthe grisea* (Valent et al., 1991) の RFLP 連鎖地図が報告されている。また、これら病原菌では、RFLP マーカーとともにいくつかの表現形質も加味され、病理学的に重要な非病原性遺伝子、毒素生産遺伝子、形態形成に関与する遺伝子なども連鎖地図にマップされている。

最近、パルスフィールド電気泳動により糸状菌染色体の分離が可能となり、*Aspergillus nidulans* では染色体



特異的ライブラリーが作製されている(BRODY et al., 1991)。今後、染色体特異的プローブ、YACライブラリーなどを用いてより詳細なRFLP連鎖地図が作製されるだろう。また、多くの糸状菌で形質転換系が確立された今日、染色体歩行による目的遺伝子のクローニングなど、植物病原糸状菌の分子遺伝学の飛躍的な発展が期待される。

## おわりに

RFLP解析法は高度な遺伝子操作技術を必要としなため、植物病理学分野の研究者にもDNA解析を身近なものにした。RFLP法は、DNA解析の簡便な方法ではあるが、決して万能ではない。本文でも述べたように、プローブの選択や供試菌の収集には研究目的を加味しながら十分な配慮が必要である。植物病原糸状菌における多型性については、今のところ、予想以上に大きいだろうとしかいえない。また、圃場生態についてもほとんどわかっていない。さらに、RFLP法がどこまで利用可能なのかについても、いまだデータの蓄積を待たなければならない。このような現状では、できるかぎり多数の菌株を用いることが研究に普遍性を与える唯一の方法のように感じている。

最近、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法が登場し、DNA解析に新たなそして強力な武器が加わった。PCR法と自動シーケンサーとの組み合わせによりDNA配列の解析は飛躍的に簡便化された。当然のことながら、塩基配列の比較はより詳細な多型性の検出を可能にする。また、PCRによって簡便にDNAフィンガープリントを検出する方法、RAPD(Random amplified polymorphic DNA)法が生み出された(Williams et al., 1990)。今後、RFLP法とこれら方法を併用することにより、植物病原糸状菌の分類学、生態学、遺伝学などが大きく発展し、病原菌の進化がDNAの言葉で語られることを期待する。

## 引用文献

- ADACHI, Y. et al. : 投稿中
- ANDERSON, J. B. et al. (1989) : *Evolution* 43: 1652~1662.
- BIEL, S. W. and F. W. PARRISH (1986) : *Anal. Biochem.* 154: 21~25.
- BRODY, H. et al. (1991) : *Nucl. Acids Res.* 19: 3105~3109.
- BROWN, J. K. M. et al. (1990) : *Plant Pathol.* 39: 391~401.
- FÖRSTER, H. and T. G. KINSCHERF (1988) : *Mycologia* 80: 466~478.
- et al. (1989) : *Can. J. Bot.* 67: 529~537.
- et al. (1990) : *Exp. Mycol.* 14: 18~31.
- GARBER, R. C. and O. C. YODER (1983) : *Anal. Biochem.* 135: 416~422.
- (1984) : *Curr. Genet.* 8: 621~628.
- GORDON, T. R. and D. OKAMOTO (1992) : *Phytopathology* 82: 73~77.
- GRAY, L. E. and A. G. HEPBURN (1992) : *ibid.* 82: 211~215.
- HAMER, J. E. and S. GIVAN (1990) : *Mol. Gen. Genet.* 223: 487~495.
- et al. (1989) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9981~9985.
- HULBERT, S. H. and MICHELMORE, R. W. (1987) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 17~24.
- et al. (1988) : *Genetics* 120: 947~958.
- KIM, D. H. et al. (1992) : *Phytopathology* 82: 346~353.
- KISTLER, H. C. et al. (1987) : *ibid.* 77: 1289~1293.
- et al. (1991) : *ibid.* 81: 331~336.
- KOCK, E. et al. (1991) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 341~349.
- KOHN, L. M. et al. (1988) : *Phytopathology* 78: 1047~1051.
- et al. (1991) : *ibid.* 81: 480~485.
- 草場基章ら(1991) : *日植病報* 58: 128.
- LEACH, J. et al. (1986) : *Neurospora Newsl.* 33: 32~33.
- LEVY, M. et al. (1991) : *Plant Cell* 3: 95~102.
- MANICOM, B. Q. et al. (1987) : *Phytopathology* 77: 669~672.
- et al. (1990) : *ibid.* 80: 336~339.
- MARTIN, F. N. (1990) : *Exp. Mycol.* 14: 47~56.
- (1991) : *Phytopathology* 81: 742~746.
- and C. H. KISTLER (1990) : *Exp. Mycol.* 14: 32~46.
- MCDERMOTT, J. M. et al. (1989) : *Genetics* 122: 561~565.
- MCDONALD, B. A. and J. P. MARTINEZ (1990) : *Phytopathology* 80: 1368~1373.
- MICHELMORE, R. W. and S. H. HULBERT (1987) : *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 383~404.
- 根井正利(1990) : 分子進化遺伝学, 培風館, 東京, 433 pp.
- O'DELL, M. et al. (1989) : *Plant Pathol.* 38: 340~351.
- ORBACH, M. J. et al. (1986) : *Mol. Cell. Biol.* 6: 2452~2461.
- SMITH, M. L. and J. B. ANDERSON (1989) : *Mycol. Res.* 93: 247~256.
- et al. (1990) : *Genetics* 126: 575~582.
- et al. (1992) : *Nature* 356: 428~430.
- SPECHT, C. A. et al. (1982) : *Anal. Biochem.* 119: 158~163.
- TANABE, K. et al. (1989) : *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 361~365.
- TAYLOR, J. W. (1986) : *Exp. Mycol.* 10: 259~269.
- 柘植尚志ら(1989) : 第14回土壌伝染病談話会講演要旨集, pp.18~25.
- Tsuge, T. and H. KOBAYASHI (1991) : In *Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants*, ed. Patil, S. S. et al., Springer-Verlag, NY, pp. 119~129.
- TZENG, T. H. et al. (1992) : *Genetics* 130: 81~96.
- VALENT, B. et al. (1991) : *ibid.* 127: 87~101.
- VILGALYS, R. and D. GONZALEZ (1990) : *Phytopathology* 80: 151~158.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. (1990) : *Nucl. Acids Res.* 18: 6531~6535.
- YODER, O. C. (1988) : In *Advances in Plant Pathology* Vol. 6. *Genetics of Plant Pathogenic Fungi*, ed. Sidhu, G. S. Academic Press, NY, pp. 93~112.

## 特集：RFLP解析とその応用〔3〕

## 植物病原細菌の R F L P

|                |         |        |         |          |         |
|----------------|---------|--------|---------|----------|---------|
| 農林水産省農業生物資源研究所 | ひら<br>平 | や<br>八 | え<br>重  | かず<br>一  | ゆき<br>之 |
| 農林水産省種苗管理センター  | 矢       | の      | 野       | ひろし<br>博 |         |
| 農林水産省農業生物資源研究所 | ひ<br>日  | び<br>比 | ただ<br>忠 | あき<br>明  |         |

## はじめに

植物病原細菌には、細菌学的性質による種・亜種の分類に加えて、植物に対する病原性の違いに基づく分類群、すなわち病原型(pathovar)やレース(race)が存在する。例えば、*Pseudomonas syringae* 及び *Xanthomonas campestris* では、それぞれ少なくとも45及び125のpathovarが知られている。これらの識別・同定は、従来、植物に対する病原性試験によって行われてきたが、判別品種の栽培、接種、発病調査など、多くの時間や労力が必要であった。

一方、近年の分子生物学的手法の発達により、属(genus)以上のレベルの分類には主として16S rRNAシーケンスが、また、種(species)レベル以下の識別には主としてアイソザイム分析、DNA-DNAハイブリダイゼーション(分子雑種形成)解析あるいはRFLP(制限酵素断片長多型性)解析が有効に利用されるようになった(GABRIEL et al., 1992)。

RFLPは、制限酵素認識部位の塩基置換や認識部位を含む領域内での転移・欠失・挿入などを反映したものであり、これらの変異は適当なプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによって検出される。RFLPは種(species)や系統(strain)の同定に有効な手法として、動植物、昆虫、線虫、キノコ、酵母、植物病原糸状菌および医学細菌などに広く適用されているが、植物病原細菌への応用は比較的最近のことである。植物病原細菌のRFLP解析では、菌体から解析に十分な純度のDNAを抽出した後は、ほぼ機械的な操作で実験を遂行でき、迅速・簡便に明解な結果が得られるため、生菌を供試する接種試験などの場合のように環境条件・生育ステージ・研究者の熟練の程度などによって結果が左右されることはない。また、本法によって、これまで主として血清学的手法やファージ感受性などから推測されてきた植物病原細菌相互の類縁関係を、遺伝子レベルで系統進化学的に論議することが可能となった。遺伝子解析法としては、

従来のDNAハイブリダイゼーション法及び近年の塩基配列決定法に比較して、RFLP解析法は、簡便性の点で前者とほぼ同等で後者より優れ、得られる情報量の点で後者には及ばないが前者より優れている。

本稿では、植物病原細菌のRFLP解析の技法とその応用の現状について概略を述べた後、著者らがこれまでにやってきた大腸菌rRNAをプローブとした*Pseudomonas*属及び*Xanthomonas*属細菌のRFLP解析例、及びイネ白葉枯病菌(*X. campestris* pv. *oryzae*)のRFLP解析例について、簡単に紹介することとしたい。

## I 植物病原細菌のRFLP解析法

RFLP解析操作は、細菌DNAの抽出、制限酵素による切断、アガロース電気泳動、サザンブロットリング、プローブとのハイブリダイゼーション、RFLPバンドの検出、及びそのデータの解析、という各ステップから成り立っている。

## 1 RFLP プローブ

植物病原細菌のRFLP解析を行うためには、細菌DNAの特定の部位にハイブリダイズし、種、pathovarあるいはストレインの同定・識別に十分な多型性を示す適当なプローブが必要である。これまでの報告で用いられたプローブには、染色体DNA中に多コピー存在しプラスミドともハイブリダイズする配列のクローン、任意のゲノムライブラリークローン、ペクチン分解酵素遺伝子クローン、病原性やHRに関与する遺伝子のクローン(*hrp* genes)、プラスミドDNAの制限酵素断片クローン、ゲノムDNA中の高度反復配列クローン、大腸菌rRNA(16+23S)などがある(表-1)。これらのプローブは、主として放射性同位元素の<sup>32</sup>P、あるいは非放射性のビオチンなどで標識されて用いられている。

## 2 細菌DNAの調製

植物病原細菌からのDNAの抽出には、大腸菌のための方法を若干改良した方法が用いられている。筆者らが用いている方法の例を図-1及び図-2に示した。図-1に示した方法は、*Xanthomonas*属菌のためのもので、CTAB処理とCsCl密度勾配遠心を行うことにより、試

料中に多量に混在する多糖類を除去している。図2は *Pseudomonas* 属菌に対して用いている方法である。それぞれの方法によって RFLP 解析に十分な量と純度の

DNA を得ることができる。

### 3 RFLP の検出と解析

RFLP は、DNA を制限酵素により切断後、アガロースゲル電気泳動し、サザンブロッティングの後、プローブとのハイブリダイゼーションによってバンドとして検出される。この場合、再現性のある確実な RFLP を検出するためには、DNA が制限酵素によって完全に切断されていることをあらかじめチェックして、不完全切断に起因する偽のバンドの出現を防ぐことが最も重要である。

制限酵素による切断が完全に行われているかどうかをチェックするために、各試料ごとに  $\lambda$  テストを行う。 $\lambda$  テストは、サンプル DNA と等量の  $\lambda$  DNA を一緒に含む溶液に、本実験の 1/2 単位の制限酵素を加えて本実験と同一条件で反応させ、その後、この反応液を電気泳動し、 $\lambda$  DNA が完全に切断されて、用いた制限酵素に固有の  $\lambda$  DNA の切断パターンを示すことを確認するものである(江見・中村, 1991)。 $\lambda$  DNA が不完全にしか切断さ

表-1 植物病原細菌の RFLP 解析例

| 植物病原細菌                                                                                                 | プローブ                                                           | 目的                                           | 文献                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <i>Clavibacter michiganensis</i> pv. <i>sepedoni-cam</i>                                               | プラスミドと染色体に共通の反復配列                                              | 遺伝的変異の解析                                     | Mogen, B. D. et al. (1990)                                        |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>                                                                            | ペクチン分解酵素遺伝子, 染色体 DNA 断片                                        | 遺伝的多様性, 宿主範囲との相関解析                           | Boccara, M. et al. (1991)                                         |
| <i>Pseudomonas</i> ( <i>P. syringae</i> pathovars)                                                     | siderophore 一生産関連遺伝子<br>大腸菌 rRNA (16+23S)<br>大腸菌 rRNA (16+23S) | 遺伝的多様性の解析<br>種・pathovar の識別<br>クラスター分析       | Lawson, E. C. et al. (1986)<br>矢野ら (1991)<br>矢野ら (1992)           |
| <i>P. solanacearum</i>                                                                                 | 病原性, HR-関連遺伝子                                                  | 遺伝的多様性の解析                                    | Cook, D. et al. (1989)                                            |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i><br>pv. <i>tomato</i>                                            | 染色体 DNA 断片<br>染色体 DNA 断片                                       | 遺伝的多様性の解析<br>pathovar の識別                    | Denny, T. P. et al. (1988)<br>Denny T. P. (1988)                  |
| <i>Xanthomonas campestris</i>                                                                          | 染色体 DNA 断片<br>染色体 DNA 断片<br>染色体 DNA 断片                         | 遺伝的多様性の解析<br>病原性, 脂肪酸組成との相関解析                | Gabriel, D. W. et al. (1988)<br>Graham, J. H. et al. (1990)       |
|                                                                                                        | 染色体 DNA 断片                                                     | 遺伝的多様性の解析と pathovar の識別                      | Lazo, G. R. et al. (1987a)                                        |
|                                                                                                        | プラスミド DNA 断片                                                   | pathovar の同定                                 | Lazo, G. R. et al. (1987b)                                        |
|                                                                                                        | 大腸菌 rRNA (16+23S)                                              | pathovar の識別                                 | 堀田ら (1992)                                                        |
| <i>X. c.</i> pv. <i>citri</i><br><i>X. c.</i> pv. <i>phaseoli</i><br><i>X. c.</i> pv. <i>citrumelo</i> | 染色体 DNA 断片<br>染色体 DNA 断片<br>染色体 DNA 断片                         | 遺伝的多様性の解析<br>病原性, 血清反応との相関解析                 | Gabriel, D. W. et al. (1989)<br>Gottwald, T. R. et al. (1991)     |
| <i>X. campestris</i><br><i>X. c.</i> pv. <i>citri</i>                                                  | 染色体 DNA 断片                                                     | 遺伝的多様性の解析と相互の識別                              | Hartung, J. S. et al. (1989)                                      |
| <i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i>                                                                 | 反復配列<br>反復配列<br>大腸菌 rRNA (16+23S)                              | 病原性変異との相関解析<br>pathovar, レースの識別<br>遺伝的多様性の解析 | Leach, J. E. et al. (1990, 1992)<br>加来ら (1992a, b)<br>平八重ら (1992) |

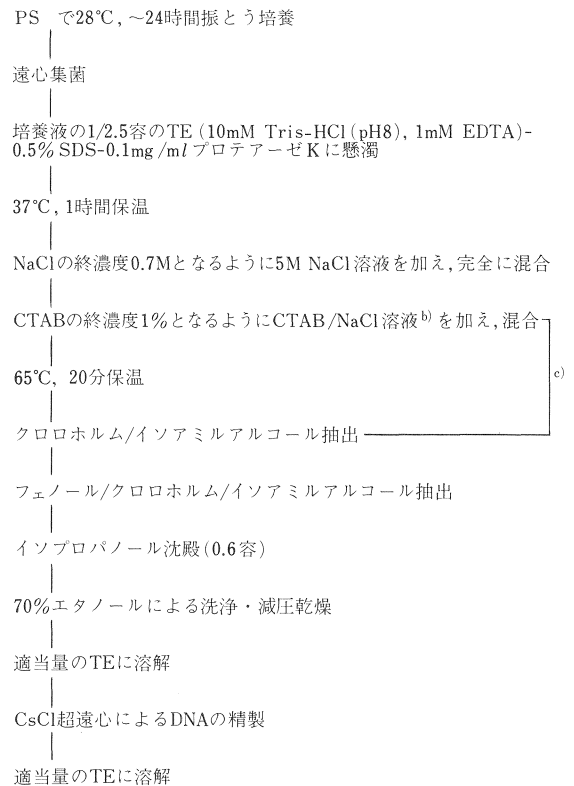


図-1 *Xanthomonas* 属細菌からの DNA の抽出法

<sup>a)</sup>ペプトン 10 g, スクロース 1 g, グルタミン酸ソーダ 1 g/l, pH 7.0.

<sup>b)</sup>10%CTAB-0.7 M NaCl.

<sup>c)</sup>必要に応じて数回繰り返す。

れていない場合には、制限酵素の活性や反応条件、DNAの精製度などについて再検討する必要がある。

確実な RFLP を検出するためのもうひとつの重要なポイントは、比較的低電圧で泳動を行うことによって、安定した泳動パターンを得ることである。また、 $\lambda$ /HindIII などのサイズマーカー DNA を 5~6 レーンごとに配置しておくことによって、泳動時のスマイリングや泳動時間の違いによるバンド位置の差を補正することができる。

二つの菌株相互間の類似度 (similarity coefficients,  $F$ ) は、次の式によって求められる (Nei and Li, 1979)。

$$F = 2 n_{xy} / (n_x + n_y) \times 100 (\%)$$

ここで  $n_x$ ,  $n_y$  はそれぞれの菌株に検出されたバンドの数を、 $n_{xy}$  は両菌株間で一致したバンドの数である。また、二つの菌株相互間の非類似度 (dissimilarity coefficient)

cients) あるいは遺伝的距離 (genetic distance) は、 $100 - F (\%)$  により算出される (Denny et al., 1988)。

上述の式によって類似度を求める場合、プローブとハイブリダイズしたバンドの濃さも問題となるが、この点はそれぞれの検体当たりのバンドが比較的少数 (10 以下) 得られるような複数のプローブを用いることによって軽減される。また、多数のバンドが認められるような場合、以下の式のように、濃いものから順に一定の数までのバンドについて、相互の全バンドと一致した数をカウントすることによって類似度を求める方法もある (GABRIEL et al., 1988)。

$$F = (n_{xy} + n_{yx}) / (n_x + n_y) \times 100 (\%)$$

$n_x$ ,  $n_y$  は菌株  $X$  及び  $Y$  のそれぞれのメジャーなバンドの数を、 $n_{xy}$  は  $X$  のメジャーなバンドのうち  $Y$  の全バンドのいずれかと一致したバンドの数を、 $n_{yx}$  は  $Y$  のメジャーなバンドのうち  $X$  の全バンドのいずれかと一致したバンドの数を示す。この方法では、デンスリトメーターやバンドの一致率を自動的に補正・計算処理するソフトウェアを装着した画像解析装置が必要である。

RFLP 解析で得られる菌株相互間の遺伝的距離は用いるプローブの種類により異なった値となるが、質的な相互関係は、一般に、用いるプローブには左右されることが知られている。すなわち、異なる研究者がそれぞれに別種のプローブを用いて、同一の菌株群の RFLP 解析を行った場合にも、質的に同様な相互関係の結論が得られている (GABRIEL et al., 1988; GOTTFELD et al., 1991)。RFLP 解析の分析能力は、どの遺伝子座にハイブリダイズするプローブを用いるかによって決まるが、GABRIEL ら (1992) は、種やストレインの分類・同定に RFLP 解析を用いる場合、同一種内の各ストレインで 80% 以上の類似度があり、同一属内の各種間では 20% 以下の類似度を示すようなプローブを用いることを提唱している。なお、RFLP のデータ解析法については、本誌の「植物の RFLP」の稿に詳細な解説があるので、そちらを併せて参照されたい。

## II 植物病原細菌の RFLP とその応用

### 1 研究の現状

植物病原細菌の RFLP 解析例を表-1 に示した。植物病原細菌への RFLP 解析の応用は、比較的新しく 1980 年代後半からのことである。RFLP という用語は用いられていないが、LAWSON ら (1986) がシデロフォア生合成関連の遺伝子をプローブに用いてその生産菌の遺伝的類似関係を調べた際に、このプローブが *P. syringae* の pathovar の識別に有効であることを報告したのがおそらく

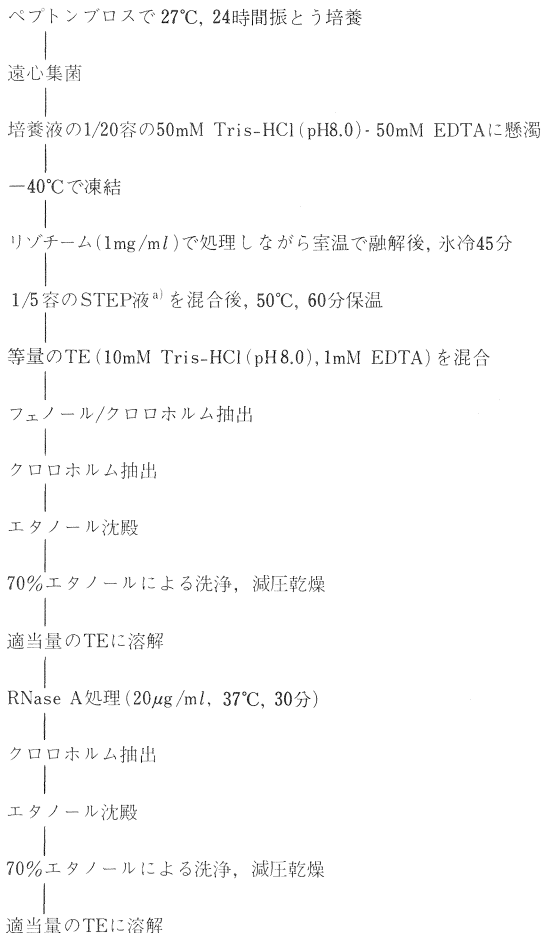


図-2 *Pseudomonas* 属細菌からの DNA の抽出法

<sup>a)</sup> 0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.4 M EDTA, 1 mg/ml プロテアーゼ K.

最初であると思われる。その後、*Xanthomonas* 属や *Pseudomonas* 属細菌の各 pathovar の識別やそれら相互間の類縁関係を明らかにする目的で、あるいは同じ種内の異なるストレインを正確に識別するために RFLP 解析が用いられてきた。

以下に具体例として、著者らが行った *Pseudomonas* 属細菌、*Xanthomonas* 属細菌、及び *X. campestris* pv. *oryzae* の RFLP 解析例を紹介する。

## 2 *Pseudomonas* 属細菌の RFLP

植物病原性 *Pseudomonas* 属細菌の種及び pathovar の識別を目的として RFLP 解析を行った。プローブには、非放射性のフォトビオチンで標識した大腸菌 rRNA (16+23 S) を用いた。これをプローブとしたのは、rRNA 遺伝子には種間あるいは属間に共通した配列部分が存在し、また、rRNA オペロンは、通常、細菌のゲノム中に少なくとも数コピー存在するため、大腸菌 rRNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った場合、rRNA 遺伝子を含む幾つかの制限酵素断片が検出されるであろうと予想されたためである。大腸菌 rRNA (16+23 S) は精製標品が市販されているので、簡単に入手することができる。フォトビオチンによる非放射性標識法の詳細については、兼松ら (1990) の総説を参照されたい。植物病原性 *Pseudomonas* 属細菌の 11 種・14 pathovar、計 24 種類の基準菌株を対象に、図-2 の方法で抽出した全 DNA の *Hind*III 断片について RFLP 解析を行った例を図-3 に示した。供試した 11 種の細菌はそれぞれの種に特異的なパターンを示している。さらに、*P. syringae* の 13 pathovar 間ではおおむね類似した RFLP パターンが認められるが、各 pathovar に特異的なバンドによって相互の識別ができる。例えば、細菌学的、血清学的には相互の識別が困難なキュウリ斑点細菌病菌 (*P. syringae* pv. *lachrymans*) とタバコ野火病菌 (*P. syringae* pv. *tabaci*) についても、RFLP では識別することができる (矢野ら, 1991, 1992)。

## 3 *Xanthomonas* 属細菌の RFLP

植物病原性 *Xanthomonas campestris* の pathovar の識別を目的として、上記と同じく大腸菌 rRNA (16+23 S) をプローブに同様の RFLP 解析を行った。*X. campestris* の 19 pathovar を対象に、図-1 の方法で抽出した全 DNA の *Eco*RI 断片の RFLP 解析例を図-4 に示した。同一 pathovar 内の菌株間で若干のバンドに差が認められる例もあるが、19 の各 pathovar は、相互に識別し得る、それぞれに特徴的な RFLP プロフィールを示している (堀田ら, 1992)。

## 4 *X. campestris* pv. *oryzae* の RFLP

イネ白葉枯病菌 *X. campestris* pv. *oryzae* には判別品種に対して病原性を異にする多数のレースが知られている。これらのレースの識別を目的として、フォトビオチンで標識した pJEL101 プローブを用いて RFLP 解析を行った。pJEL101 は、*X. campestris* pv. *oryzae* の染色

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

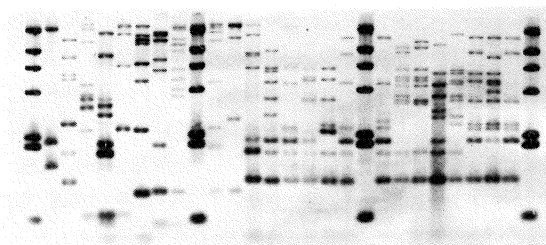


図-3 大腸菌 rRNA (16+23 S) をプローブとした植物病原性 *Pseudomonas* 属基準菌株の RFLP プロフィール (制限酵素 *Hind*III : 矢野ら, 1992)

1, 10, 19, 28 :  $\lambda$ /HindIII, 2 : *avenae*, 3 : *pseudoalcaligenes*, 4 : *cichorii*, 5 : *viridiflava* 6 : *putida*, 7 : *corrugata*, 8 : *caryophylli*, 9 : *cepacia*, 11 : *glumae*, 12 : *solanacearum*, 13 : *marginalis* pv. *marginalis*, 14 : *syringae* pv. *syringae*, 15 : s. pv. *lachrymans*, 16 : s. pv. *tabaci*, 17 : s. pv. *mori*, 18 : s. pv. *maculicola*, 20 : s. pv. *tomato*, 21 : s. pv. *phaseolicola*, 22 : s. pv. *glycinea*, 23 : s. pv. *morsprunorum*, 24 : s. pv. *pisi*, 25 : s. pv. *oryzae*, 26 : s. pv. *atropurpurea*, 27 : s. pv. *coronafaciens*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

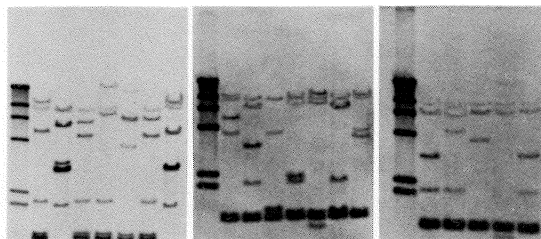


図-4 大腸菌 rRNA (16+23 S) をプローブとした植物病原性 *Xanthomonas campestris* 各種 pathovar の RFLP プロフィール (制限酵素 *Eco*RI : 堀田ら, 1992)

1, 9, 17 :  $\lambda$ /HindIII, 2 : pv. *oryzae*, 3 : pv. *hyacinthi*, 4 : pv. *cucurbitae*, 5 : pv. *alfalfae*, 6 : pv. *pisi*, 7 : pv. *physalidicola*, 8 : pv. *translucens*, 10 : pv. *campestris*, 11 : pv. *dieffenbachiae*, 12 : pv. *carotae*, 13 : pv. *glycines*, 14 : pv. *cannabis*, 15 : pv. *citri*, 16 : pv. *incanae*, 18 : pv. *pruni*, 19 : pv. *vesicatoria*, 20 : pv. *vitiens*, 21 : pv. *ziniiae*, 22 : pv. *zantedeschiae*

体 DNA 中の反復配列約 2.4 kbp を pUC18 に組み込んだプローブであり, Leach ら (1990) が, *X. campestris* pv. *oryzae* のレースの識別に用いたものである。DNA の抽出は, 図-1 の方法で行った。

DNA を *Eco*RI, *Cla*I, *Hind*III で切断し, pJEL101 をプローブとした場合, 日本産レース I, II, III, IV, V 及び VII の代表菌株は, いずれの制限酵素によってもそれぞれのレースに特異的なパターンを示し, 相互に判別可能である (図-5: 加来ら, 1992 a)。さらに, 上記の 6 レースに属する 27 菌株を供試し, 同じレース内の菌株相互の RFLP パターンを比較した結果, 同じレース内の菌株はその代表菌株とほぼ相同なパターンを示したが, 菌株によっては 1~2 本のバンドの増減あるいはその泳動度に差異が認められた (加来ら, 1992 b)。

### 5 *Pseudomonas* 属細菌のクラスター解析

図-3 に示した 24 種類の基準菌株間相互の類縁関係を明らかにするために, PDI 社の画像解析装置を用いて, RFLP のクラスター分析を行った。デンドログラムは, RFLP パターンより I-3 で述べた Nei ら (1979) の方法によって算出した菌株相互間の類似度に基づいて, Saitou ら (1987) の方法に従って作成した。その結果を図-6 に示

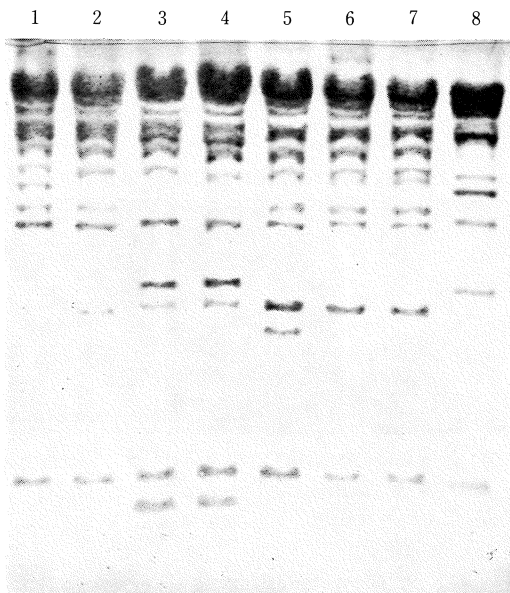


図-5 pJEL101 をプローブとしたイネ白葉枯病菌 (*X. campestris* pv. *oryzae*) 各レースの RFLP プロファイル (制限酵素, *Hind*III: 加来ら, 1992 b)

1: レース I (T 7174), 2: レース II (T 7147), 3: レース III (T 7133), 4: レース IV (H 75373), 5: レース IV (Xo 7435), 6: レース V (H 75304), 7: レース V (Xo 7306), 8: レース VII (H 85149)

す。類似度を 20% 以上とした場合, *P. syringae* の全 pathovar を含む一つの大きなクラスターと, その他の *Pseudomonas* 属細菌の単独種あるいは複数種で構成される数個のクラスターとに分岐している。この結果は, Palleroni (1973) らが DNA ハイブリダイゼーション法によってグルーピングした rRNA ホモロジーグループとおおむね一致しており, 誠に興味深い (矢野ら, 1992)。しかしながら, 同種あるいは同 pathovar 内に属する菌株において, 基準株とはかなり類似度が異なる例が認められたことから, 今後さらに他のプローブを併用してこのようなクラスター解析を進める必要があるものと思われる。

### おわりに

以上紹介したように, RFLP 解析は植物病原細菌の種, pathovar, レースの同定・識別にきわめて有効な手法である。各種の同定された細菌株について, 適切なプローブと制限酵素との組み合わせで RFLP 解析を行い, そのパターンをデータベースに登録・蓄積しておくことによって, 未同定の菌株の RFLP パターンからその菌を簡便・迅速に検索・識別・同定できるようになるものと期待される。特に, 病原細菌の分離源植物が明らかな場合には, その同定の精度は一層高まると予想される。先にも述べたように, RFLP 解析法には, 従来植物病原細菌の同定に必要とされてきたような多項目の細菌学的性

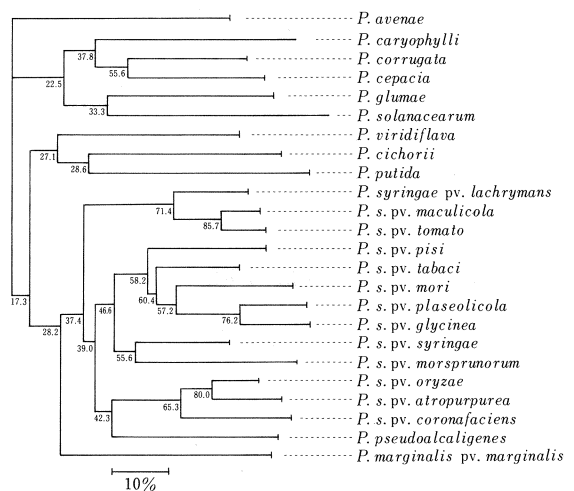


図-6 植物病原性 *Pseudomonas* 属基準菌株のデンドログラム

(プローブ, 大腸菌 rRNA (16+23 S): 制限酵素, *Hind*III: 矢野ら, 1992) 数字は菌株間相互の類似度を, バンドの長さは, 相互の遺伝的距離を表す。

質の調査や病原性試験,あるいは専門的な知識・経験を必ずしも必要とせず,客観的に結果を解析できるという利点がある。

さらに, RFLP 解析によって, 植物病原細菌相互の類縁関係を明らかにすることも可能である。現在, 16S rRNA の塩基配列解析による各種微生物の系統進化学的研究や, あるいは PCR による DNA 多型解析が精力的に行われているが, これらの方法による知見と RFLP 解析による知見とを総合することによって, 植物病原細菌相互の類縁関係がより明確にされるであろうと期待される。

最後に, 著者らとの共同研究者であり, 本稿に貴重な図をご提供いただいた農林水産省・農業生物資源研究所・微生物探索評価研究チーム・加来久敏チーム長及び同所・微生物保存研究チーム・堀田光生研究員に厚くお礼申し上げる。

### 引用文献

- 1) BOCCARA, M. et al. (1991): Mol. Plant-Microbe Interactions. 4: 293~299.
- 2) COOK, D. et al. (1989): ibid. 2: 113~121.
- 3) DENNY, T. P. et al. (1988): J. Gen. Microbiol. 134: 1949~1960.
- 4) ——— (1988): Phytopathology 78: 1186~1193.
- 5) 江見充・中村裕輔(1991): 遺伝子診断マニュアル(高木康敬編), 講談社サイエンティフィク, pp. 91~104.
- 6) GABRIEL, D. W. et al. (1988): Mol. Plant-Microbe Interactions 1: 59~65.
- 7) ——— et al. (1989): Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 14

- ~22.
- 8) ——— and R. D. FEYTER (1992): In Molecular Plant Pathology Vol. 1, A Practical Approach (ed. GURR, S. J. et al.), IRL Press, Oxford, pp. 51~66.
- 9) GOTTWALD, T. R. et al. (1991): Phytopathology 81: 749~753.
- 10) GRAHAM, J. H. et al. (1990): ibid. 80: 829~836.
- 11) HARTUNG, J. S. and E. L. CIVEROLO (1987): ibid. 77: 282~285.
- 12) ——— (1989): ibid. 79: 793~799.
- 13) 平八重一之ら(1992): 日植病報 58: 102.
- 14) 堀田光生ら(1992): 日本植物病理学会平成4年度大会講演要旨集, p.102.
- 15) 兼松誠司ら(1990): 植物防疫 44(12): 549~556.
- 16) 加来久敏ら(1992 a): 日植病報 58: 103.
- 17) ———ら(1992 b): 日本植物病理学会平成4年度大会講演要旨集, p.103.
- 18) LAWSON, E.C. et al. (1986): In Iron, Siderophores, and Plant Diseases (ed. Swinburne, T.R.), Plenum Press, New York, pp. 315~329.
- 19) LAZO, G. R. et al. (1987): Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 214~221.
- 20) ——— and D. W. GABRIEL (1987): Phytopathology 77: 448~453.
- 21) LEACH, J. E. et al. (1990): Mol. Plant-Microbe Interactions 3: 238~246.
- 22) ——— et al. (1992): Appl. Environmental Microbiol. 58: 2188~2195.
- 23) MOGEN, B. D. et al. (1990): Phytopathology 80: 90~96.
- 24) NEI, M. and W. H. LI (1979): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5269~5273.
- 25) SAITOU, N. and M. NEI (1987): Mol. Biol. Evol. 4: 406~425.
- 26) PALLERONI, N. J. et al. (1972): J. Bacteriol. 110: 1~11.
- 27) 矢野博ら(1991): 日植病報 57: 445.
- 28) ———ら(1992): 日本植物病理学会平成4年度大会講演要旨集, p.103.

### 新刊紹介

#### 『日本のさび菌フロラ (The Rust Flora of Japan)』

平塚直秀ほか 著

英文, B5 判, 2 分冊 (本編・索引編), 上製

箱入り, 本編 1,205 ページ, 総ページ数 1,380 ページ

定価 28,840 円 (税込み, 送料サービス)

筑波出版会 (0298-52-6531) 筑波 1992

この書は, 日本学士院会員, 平塚直秀先生およびその門下生 10 名の共著者によって編集, 出版された英文の書である。平塚先生は周知のように世界的に著名なさび菌の分類学者であり, すでに 60 年以上にわたり研究が続けられており, 先生ご自身あるいは門下生と共著で莫大な数の研究報告がある。これらの報告によって日本に分布するほとんどのさび菌が明らかにされ, 紹介されている。

今回これら日本に分布するさび菌の種, 宿主植物, 分

布地などについて, 一般の利用が可能なように筑波大学の UTOPIA データベースに収録されたのを機会に, 単行本として出版されたものである。

1200 ページにおよぶ膨大な書である。本書の序章には, さび菌の経済的重要性, 病徴および標兆, 各世代の胞子, 生活史, 分類, さらに日本におけるさび菌分類の研究史の概要が述べられている。次の章には, さび菌関係の用語とその慣用法が紹介されている。

本書の主体は, さび菌の科, 属, 種の記載で, 約 800 種について, 形態, タイプ標本, 世代別宿主, 日本における分布, 日本以外の分布, 文献などが記載・収録されている。このほか巻末には関係する文献, さび菌命名著者のフルネーム, 生存期間のリスト, および要語集 (英語および日本語) が掲載されている。

いずれにしても, 誠に立派な貴重な書であり, 関係機関の図書室には是非収容しておきたい書といえよう。

(梶原敏宏)



## 特集：RFLP解析とその応用〔4〕

## 昆虫における DNA 多型解析の現状

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 むら じ まさ ひこ  
村 路 雅 彦

DNA レベルでの変異を利用して昆虫の種や系統の類縁関係を推定したり、その属性を識別する試みは、欧米では 1980 年代の半ばごろから行われている。初期の研究では、主にミトコンドリア DNA やリボソーム RNA 遺伝子などの制限酵素断片長多型の解析が行われた。近年では DNA フィンガープリント法や、ポリメラーゼ連鎖反応法などが取り入れられ、昆虫の DNA 多型検出の感度と精度は急速に向上しつつある。これに伴い技術の簡易化が進み、応用可能な研究分野も広がりつつある。

日本でも、ごく最近になって一部の農業害虫を対象に DNA 多型の検出が試みられるようになった。この方法によって昆虫の種や系統関係の解析だけでなく、それらの識別や生物学的機能の判定なども可能となるため、集団遺伝学、行動学、個体群生態学をはじめ現場の害虫防除に携わる研究者・技術者の間でも注目を集めつつある。本稿では技術的な面を中心に、これまでに行われた昆虫の DNA 多型解析の実例を紹介する。

## I 制限酵素断片長多型の利用

制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP) とは、制限酵素による DNA 断片の長さや数がサンプルによって異なることをいう。これは DNA 内に、切断に用いた制限酵素で切れる部分が変わっていたり、DNA の長さが増えたり減ったりしていた場合に、電気泳動によるバンドの位置または数の違いとして検出される。検出はサザンハイブリダイゼーション (相補的な DNA 同士がくっつき合うことを利用する方法) によるものが最も多いが、対象とする昆虫及び DNA 領域、あるいは DNA プローブの種類などによって、検出できる RFLP の感度は大きく異なる。

## 1 ミトコンドリア DNA における多型の利用

ミトコンドリア DNA (mtDNA) はミトコンドリアに存在する DNA で、細胞質を通じて遺伝する。これは分子の大きさが小さく、同一分子が細胞当たり  $10^2 \sim 10^3$  個存在し、かつ染色体 DNA に比較して進化が約 10~100 倍速いとされる。また環状構造のため、EtBr (エチジウムブロマイド)-CsCl (セシウムクロライド) 平衡密度遠心法で容易に核の DNA から単離でき (米川・森脇, 1984),

DNA 多型の検出に適している。

カリブ海沿岸のラセンウジバエ (*Cochliomyia hominivorax*) の系統解析では、精製した mtDNA を制限酵素処理し電気泳動した後、EtBr 染色で DNA バンドを直接観察する方法がとられている (ROEHRDANZ and JOHNSON, 1988)。この方法は mtDNA 精製に大量の新鮮な昆虫を必要とするため、微小な昆虫や大量飼育が困難な昆虫には適さない。ムギミドリアブラムシ (*Shizaphis granminum*) では、一頭の雌に由来するコロニーから精製された微量の mtDNA を放射性同位元素で末端標識する方法が採られている (POWERS et al., 1989)。この研究では、異なるパイオタイプ間で、検出された総バンド数に対する共通バンド数の割合から塩基配列の相同性が解析されるとともに、パイオタイプ識別の可能性について検討されている。コロラドハムシ (*Leptinotarsa decemlineata*) では、少数の制限酵素を用いた解析で地域系統が容易に識別できることが明らかとなり (AZEREDO-ESPIN et al., 1991)、本種の北アメリカでの起源と分散過程を解析する上で有効なマーカーとなることが示された (ZEHNDER et al., 1992)。ミツバチ (*Apis mellifera*) では、1956 年にアフリカ産亜種がブラジルへ導入され、一部が野生化して以来、凶暴性のあるアフリカ系ミツバチが全中南米に急速に分布を拡大し問題となっている。これについても mtDNA の RFLP 解析がなされ、分布の拡大はアフリカ系のクイーンの移動によるもので、交雑が生じる場合も主にアフリカ系のクイーンと在来ヨーロッパ系のオスの間でのみ生じていると考えられた (SMITH et al., 1989; HALL and MURALIDHARN, 1989)。また、*Pissodes* 属のゾウムシ 3 種では、精製された mtDNA とその一部をプローブとする解析によって、後生動物としては例外的に巨大な 30 kb~36 kb の mtDNA をもつことが明らかとなっている (BOYCE et al., 1989)。巨大 mtDNA の成因は、9~13 kb の長いアデニンとチミンに富む配列をもつことと、0.8~2.0 kb を 1 単位とする多数の反復配列が付加されたことで、種内で認められる mtDNA サイズの多型は付加される反復配列数の違いによるものと考えられた。このほか、mtDNA の RFLP は、*Magacicada* 属の周期ゼミ (MARTIN and SIMON, 1990)、オオカバマダラ (*Danaus plexippus*) (BROWN and BOYCE, 1991) などの遺伝

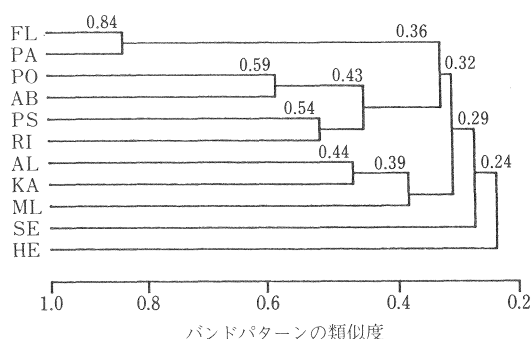


図-1 ミトコンドリア DNA の RFLP 解析にもとづいて作成された *Aedes* 属の *カ* の系統樹 (KAMBHAMPATI and RAI, 1991)

FL: *A. flavopictus*, PA: *A. pseudalbopictus*, PO: *A. polynesiensis*, AB: *A. albopictus*, PS: *A. pseudoscutellaris*, RI: *A. riversi*, AL: *A. alcasidi*, KA: *A. katherinensis*, ML: *A. malayensis*, SE: *A. seatoi*, HE: *A. hebrideus*

子構成の解析や、ヒトスジシマカなど *Aedes* 属昆虫の系統解析にも利用されている (KAMBHAMPATI and RAI, 1991)。また、ムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) では、放射性同位元素を用いない方法で標識されたショウジョウバエ (*Drosophila subobscura*) 由来の mtDNA プローブを用いた RFLP の検出に成功している (MAERTINEZ et al., 1992)。

## 2 リボゾーム RNA 遺伝子領域における多型の利用

リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) は、リボゾーム粒子を構成する RNA をコードする遺伝子で、18 S、5.8 S 及び 28 S のリボゾーム RNA 遺伝子とそれらをつなぐ数個のスペーサーを 1 組とする転写単位が、染色体上に多数存在している。この領域のうち、リボゾーム RNA をコードする部分の塩基配列は、様々な生物間で相同性が高く、多量に存在するので検出されるシグナルも強い。他の生物でクローニングされた rDNA をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションによる RFLP 解析が可能である。例えば、この方法によってキビクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum maidis*) のクローンの識別や (LUPOLI et al., 1990)、ハマダラカに近縁な *Anopheles gambiae* 種群の同定が可能となっている (FINNERTY et al., 1988)。しかし筆者の経験では、この方法では、同一種内の地域系統間で電気泳動のバンドパターンに顕著な差異が検出されない場合も多い。これは、この領域の塩基配列は一般に種内変異に乏しいことを反映していると考えられる。

一方、rDNA 領域のうち、転写されないスペーサー領

域は変異が蓄積されやすく、種間だけでなく同一種内の個体間や同一個体内の転写単位間でも複雑な多型が存在する場合があります (BECKINGHAM, 1982)、種内変異の解析に適している。ムギミドリアブラムシのスペーサー領域をプローブに用いた解析では、同一植物体上から採集された個体間でも著しく多型に富むバンドパターンが検出されている (SHUFRAH et al., 1991)。しかし、地域、圃場、作物及び調査年に特異的なバンドパターンは検出されず、本種の米国カンザス州における個体群は毎年遺伝的に多様なクローンが混合することによって形成されたと考えられた。これに対しケニアの *Anopheles gambiae* では、同様な検出方法によるバンドパターンの出現頻度の比較から、わずか 10 km 離れた集団間でも遺伝的交流は少なく、700 km 離れた西部地方と東部海岸地方の集団では完全な地理的隔離が生じていることが示唆されている (McCLAIN et al., 1989)。

## 3 DNA フィンガープリント法

DNA フィンガープリント法は、染色体上に多数散在するミニサテライトと呼ばれる反復配列の多型を、サザンハイブリダイゼーションによって、同時に検出する方法である。昆虫では、モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) など、ヒト由来の  $\lambda$  33.15 プローブ (JEFFREYS et al., 1985) を用いて、個体間で多型に富む DNA フィンガープリントが検出されている (CARVALHO et al., 1991)。また DNA のクローニングに使用される M 13 ファージ DNA は、哺乳類から大腸菌までの様々な種で、DNA フィンガープリントのハイブリダイゼーション用のプローブとして利用できる (VASSART et al., 1987; RYSKOV et al., 1988)、ミツバチやアルファルファハキリバチ (*Megachile rotundata*) でも非常に感度の良い結果が得られ、同一コロニーに所属するクイーンとワーカーでのバンドパターンの比較から、過去にクイーンと交尾したオスの個体数が推定されている (BLANCHETOT, 1991)。

筆者の経験では、他のヒトの DNA フィンガープリント検出用プローブでも、ウンカ類、カメムシ類、鱗翅目昆虫などの DNA 多型を検出できる場合がある。しかし、対象とする昆虫によって、使用できるプローブの種類、検出に必要な DNA 量、最適なハイブリダイゼーション用緩衝液の種類や反応温度、オートラジオグラフィーなどの条件が異なる場合がある。またイエバエ (*Musca domestica*) では、ヒトのミニサテライトと同様な反復配列がクローニングされており、これを用いたサザンハイブリダイゼーションで、イエバエ個体に特異的な DNA フィンガープリントを高い感度で検出することに成功している (BLANCHETOT, 1989)。

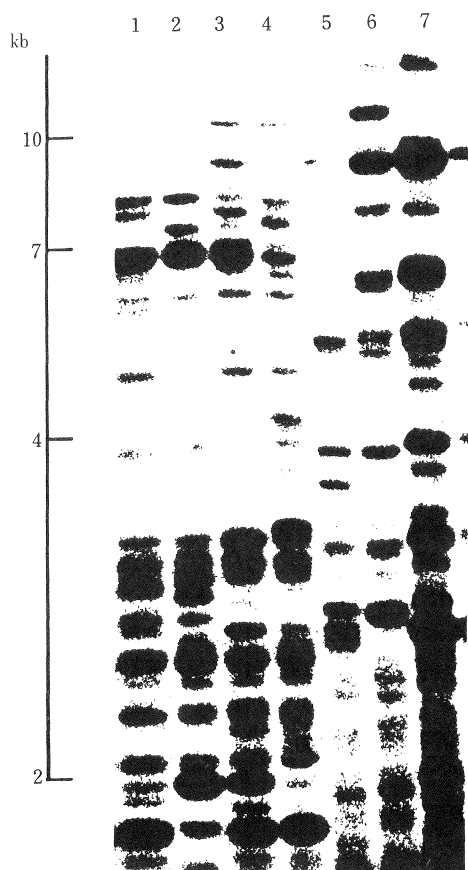


図-2 M13DNA プローブを用いたアルファルファハキ  
ミツバチ (*Megachile rotundata*) (1, 2:メス, 3, 4:  
オス)とミツバチ (*Apis mellifera*) (5, 6:メス, 7:  
オス)のDNA フィンガープリント (BLANCHETOT,  
1991)

#### 4 その他のDNA領域におけるRFLPの利用

ミツバチでは、雑多なDNA断片のクローンから、プローブとして亜種の識別に利用可能なDNAクローンが単離され (HALL, 1986), 南米でのアフリカミツバチの分布拡大様式の解析に利用されている (HALL, 1990)。

スジコナダグラメイガ (*Ephesia kuehniella*) では、キイロショウジョウバエのX染色体上に存在し性決定に関与するとされるBkn配列をプローブとする解析で、系統や個体間で著しい多型を示すDNA領域が検出されている (TRAUT, 1987)。またカイコでは、トランスポゾンを用いたRFLP検出が行われ、品種同定への利用の可能性が検討されている (田村ら, 1992)。

## II RFLP以外のDNA多型を利用する方法

### 1 ポリメラーゼ連鎖反応法の利用

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: RCR) 法とは、目的とするDNA領域の両端の塩基配列を持つ2種の短いDNA (プライマー) を基にしてチューブの中でDNA合成反応を繰り返すことによって微量のサンプルから目的とするDNA領域を数十万倍に増幅する方法である。増幅されたDNAは電気泳動EtBr染色した後、紫外線照射下で直接観察することができる。この方法は、今後、DNA精製の困難な微小昆虫、乾燥標本または残骸、生きた昆虫の一部分などを材料としたDNA多型検出に道を開くものとして注目される。

現在までに、この方法は *Anopheles gambiae* 種群の識別に利用出来ることが報告されており (PASKIEWITZ and COLLINS, 1990), またミツバチでもPCR法で増幅したmtDNAのチトクロームオキシダーゼ遺伝子のサブユニットIとサブユニットII間の配列の長さを調べることによってヨーロッパ系とアフリカ系の亜種の識別が可能となっている (HALL and SMITH, 1991)。このほか、ハナバチ類のチトクロームオキシダーゼサブユニットIIの塩基配列を比較し系統関係を解析した例や (GARNERY, 1991), ピレスロイド系殺虫剤抵抗性に関与するナトリウムチャンネル遺伝子の塩基配列を様々な昆虫で比較した例もある (DOYLE and KNIPPLE, 1991)。

上述の方法では、いずれも増幅するDNA領域の両端の塩基配列に関する情報が不可欠で、それに基づいて合成されたPCRプライマーが必要とされる。これに対し、イネやトウモロコシ等の植物、ヒト、ブドウ状球菌などでは、DNA多型解析以外の目的に使用されるDNAをPCRプライマーとして利用することによって、種、系統または品種などに特異的なDNAフィンガープリントが得られている (WELSH and McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990)。これはAP-PCR (Arbitrarily primed PCR) 法と呼ばれ、昆虫でも WILLIAMS et al. (1990) の方法によって、カイコとその近縁種の系統解析が行われつつあり (嶋田ら, 1992), 今後さまざまな昆虫への応用が期待される。

一般に昆虫を用いたPCRでは、昆虫体内に共生あるいは寄生する微生物などのDNAを増幅する危険性がある。これを避けるためには、昆虫特異的なDNA領域を選びかつ反応条件を厳しくする、共生・寄生生物の少ない組織を使用する、それらの生物のDNAを用いた対照実験を行う、などの工夫が必要で、また検出されたバンドの遺伝様式を調べることも重要であろう。

### 2 その他の方法

殺虫剤抵抗性に関するDNAレベルの研究は、現在、さまざまな昆虫を対象として行われているが、アカイエカ

(*Culex pipines*) (MOUCHES et al., 1986) やモモアカアブラムシ (FIELD et al., 1988) では、有機リン剤抵抗性に関与するエステラーゼの cDNA がクローニングされ、前者の抵抗性系統は感受性系統に比較してエステラーゼ B1 遺伝子が約 250 倍に増えていることが明らかとなっている。モモアカアブラムシでは、この cDNA をプローブに用いたドットプロット法などによる感度の高い薬剤抵抗性遺伝子型個体の識別法が提案されている (FIELD et al., 1988)。

ハマダラカに近縁な *Anopheles dirus* 種群では、形態的特徴による同定が困難であったが、PANYIM et al. (1988) は問題とする種に特異的にハイブリダイズする DNA プローブの作出に成功し、このプローブを用いてドットプロット法を行うことによって新鮮な昆虫標本だけでなく、6 か月間風乾させた個体標本の同定も可能となっている。

また、昆虫に寄生またはそれによって媒介される微生物などに由来する DNA を、それらの検出用プローブとして用いた研究も多い (KUKLA et al., 1987; THOMAS et al., 1989)。農業害虫でも、マイマイガ (*Lymantria dispar*) における核多角体病の感染や (KEATING et al., 1989)、ヨコバイの 1 種 *Paraphlepsius irroratus* でのマイコプラズマ様微生物の保菌の有無を判定した例がある (RAHARDJA et al., 1992)。前者では多数の昆虫個体をメンブレン上で押しつぶし、メンブレンごと変性、中和、固定などの処理をした後ハイブリダイゼーションを行って感染の有無を判定する方法がとられている。

## おわりに

以上、昆虫における DNA 多型解析の応用例を網羅的に紹介してきた。現在のところ、ミトコンドリア DNA に関する研究が最も多く、研究対象も衛生昆虫やミツバチ、アブラムシ等に集中している。しかし、これらの DNA 分析法は、様々な研究分野で利用可能であり、近い将来、一般的手法として広く用いられるものと思われる。

今後、常用手段として確立するには、なお個々の昆虫に関する情報の蓄積が必要である。幸いなことに、近年では DNA 抽出キットやラジオアイソトープを用いない DNA 標識キットなど、各種キットを利用することが可能であり (DNA フィンガープリント検出用キットも市販されている)、一般の研究室でも比較的容易に DNA 解析を行うことができる。しかし、プローブを開発したり、目的とする昆虫に適した手法を確立することは、理論的には単純であっても、さまざまな技術的な問題があるため、すでに同種の研究を行っている場所で練習を積むこ

とが望ましい。

## 引用文献

- 1) AZEREDO-ESPIN, A. M. L. et al. (1991): *Experientia* 47: 483~485.
- 2) BECKINGHAM, K. (1982): *Cell Nucl.* 10: 205~263.
- 3) BOYCE, T. M. et al. (1989): *Genetics* 123: 825~836.
- 4) BLANCHETOT, A. (1989): *Nucleic Acids Res.* 17: 3313.
- 5) ——— (1991): *J. Heredity* 82: 391~396.
- 6) BROWER, A. V. Z. and T. M. BOYCE (1991): *Evolution* 45: 1281~1286.
- 7) CARVALHO, G. R. et al. (1991): *Proc. R. Soc. Lond. B* 243: 109~114.
- 8) DOYLE, K. E. and D. C. KNIPPLE (1991): *Insect Biochem.* 21: 689~696.
- 9) FIELD, L. M. et al. (1988): *Biochem. J.* 251: 309~312.
- 10) ——— (1989): *Pestic. Biochem. Physiol.* 34: 174~178.
- 11) FINNERTY, V. and F. H. COLLINS (1988): *Fla. Entomol.* 71: 288~294.
- 12) GARNERY, L. (1991): *Apidorogie* 22: 87~92.
- 13) HALL, H. G. (1986): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4874~4877.
- 14) ——— (1990): *Genetics* 125: 611~621.
- 15) ——— and K. MURALIDHARN (1989): *Nature* 339: 212~213.
- 16) ——— and D. R. SMITH (1991): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4548~4552.
- 17) JEFFREYS, A. J. et al. (1985): *Nature* 314: 67~73.
- 18) KAMBHAMPATIS, S. and K. S. RAI (1991): *Evolution* 45: 120~129.
- 19) KEATING, et al. (1989): *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2749~2754.
- 20) KUKLA, B. A. et al. (1987): *Parasitology* 95: 1~16.
- 21) LUPOLI, R. et al. (1990): *Ann. Appl. Biol.* 117: 3~8.
- 22) MARTIN, A. and C. SIMON (1990): *Evolution* 44: 1066~1080.
- 23) MARTINEZ, A. et al. (1992): *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 241~246.
- 24) MCLAIN, D. K. et al. (1989): *Heredity* 62: 257~264.
- 25) MOUCHES, C. et al. (1986): *Science* 233: 778~780.
- 26) PASKEWITZ, S. M. and F. H. COLLINS (1990): *Med. Vet. Entomol.* 41: 367~374.
- 27) PANYIM, S. et al. (1988): *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 47~49.
- 28) POWERS, T. O. et al. (1989): *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 298~302.
- 29) RAHARDJA, U. et al. (1992): *Environ. Entomol.* 21: 81~88.
- 30) ROEHRDANZ, R. L. and D. A. JOHNSON (1988): *J. Med. Entomol.* 25: 136~141.
- 31) RYSKOV, A. P. et al. (1988): *FEBS* 233: 388~392.
- 32) 嶋田 透ら (1992): *日蚕講要* 62: 39.
- 33) SHUFRAN, K. A. et al. (1991): *Bull. Entomol. Res.* 81: 303~313.
- 34) SMITH, D. R. et al. (1989): *Nature* 339: 213~215.
- 35) 田村俊樹ら (1992): *日蚕講要* 62: 39.
- 36) THOMAS, R. E. et al. (1989): *J. Med. Entomol.* 26: 342~348.
- 37) TRAUT, W. (1987): *Genetics* 115: 493~498.
- 38) VASSART, G. et al. (1987): *Science* 235: 683~684.
- 39) WELSH, J. and M. McCLELLAND (1990): *Nucleic Acids Res.* 18: 7213~7218.
- 40) WILLIAMS, J. G. et al. (1990): *Nucleic Acids Res.* 18: 6531~6535.
- 41) 米川博通・森脇和郎 (1984): *実験生物学講座* 13, 森脇和郎編, 丸善, 東京, pp 319~350.
- 42) ZEHNDER, G. W. et al. (1992): *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 234~240.

## 特集：RFLP解析とその応用〔5〕

## 昆虫の分類における R E L P

千葉大学園芸学部応用動物昆虫学研究室 の  
野  
むら  
村  
まさ  
昌  
し  
史

## はじめに

昆虫の分類には、従来雌雄交尾器などの安定した形質を主として用いてきたが、ゲル電気泳動法などの生化学的手法の発展に伴い、これらの手法を取り入れた分類がみられるようになった。生化学的手法による分類は当初ショウジョウバエやカなど一部の昆虫群に限られていたが、これらの昆虫ではDNA上の特定の遺伝子の塩基配列を比較して分類が行われ(SATTA and TAKAHATA, 1990)、現在ではこれらの形質は種やそれ以下のカテゴリー(亜種・同胞種など)を決定する際の重要なものとなっている。

またその後、他の昆虫群においても生化学的手法を用いた分類が広く浸透し、アイソザイムの遺伝子頻度などを利用した多くの成果が報告されてきた。さらに最近ではDNAを分類形質に用いる研究が徐々に増加し、なかでも制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)は比較的手軽に解析を行えることから、その利用が急速に進んできた。

本稿では昆虫で行われてきた生化学的手法による研究のうち、RFLPを利用した分類及び同定法を紹介するとともに、今後の研究の進展などについても触れてみたい。

## I 核DNAのRFLPによる分類

核DNAはかなり大きな分子であるため、制限酵素で切断しアガロースゲル電気泳動を行っても明りょうなバンド像が得られず、帯状になって現れる。したがって標識した特定の短い塩基配列のプローブをハイブリダイゼーションする方法により、バンド像をとらえているが、この手法は親子判定などに用いられているDNAフィンガープリント法(Kirdy, 1990)と原理的にはさほど変わらないものである。現在ではラジオアイソトープ標識ではない非放射性プローブも用いられるようになったが、プローブを用いると手間がかかることから、核DNAはRFLP解析に用いられなくなる傾向がある。

昆虫では主にショウジョウバエで核DNAによるRFLP解析が行われており、ハワイ産の*Drosophila*

*planitibia* 種群の近縁種間での比較・解析が報告されている(BISHOP and HUNT, 1988; HUNT et al., 1988)。

またRFLP解析は、分類だけでなく個体群の性質変化の解析にも用いられている。1956年南アフリカからブラジルへ持ち込まれたセイヨウミツバチの一品種である*Apis mellifera scutellata*(アフリカミツバチ)の女王蜂が逃亡し、急速にその分布領域を広げ、1990年にはアメリカ合衆国に侵入した。アフリカミツバチは性質がきわめて荒くその分布の拡大は憂慮すべき問題であるが、HALL(1986)は蜂群のDNAをRFLP解析することにより分布の拡大の程度を調べた。9種の制限酵素と16種のプローブを用いて、核DNAのRFLP解析を行ったところ、アフリカミツバチとセイヨウミツバチ(*Apis mellifera carnica* 及び *A. m. ligustica*)間の塩基配列には明らかに違いが見られた(HALL, 1986)。また最近でもさらにRFLP解析により両亜種間の核DNAの比較が行われている(HALL, 1992)。

## II 細胞小器官(オルガネラ)DNAの利用

RFLPにおけるミトコンドリアDNA(mtDNA)の利用は、最近では核DNAに代わり多くの成果を上げている。動物のmtDNAは、一般には16 kbp程度の大きさを持つが(AVISE et al., 1987; MORTZ et al., 1987)、センチユウの一種では14 kbp(WOLSTENHOLME et al., 1987)、ホタテガイの一種では34 kbp(SNYDER et al., 1987)、また昆虫でもキボシゾウムシの一種が30~36 kbp(BOYCE et al., 1989)といった大小の違いも認められている。しかし、こうした一部の例外を除けば大きさはほぼ安定しており、核DNAよりはるかに小さいためDNAの分離・抽出が容易で扱いやすい。また環状二本鎖を呈していることから、分離・抽出の途中で傷ついたり切断されたmtDNAを除去し、完全なもののみを分離することができる。さらにmtDNAは核DNAの5~10倍の進化速度をもつため(VAWTER and BROWN, 1986)、RFLPによる解析がより有効に行える(ただし SOLIGNAC et al., 1986 や CACCONE et al., 1988 によれば、ショウジョウバエでは両者の進化速度は変わらないという)。

昆虫では、ショウジョウバエの一種*Drosophila yakuba* でmtDNAの全塩基配列が決定されており(CLARY and

WOLSTENHOLME, 1985), このほかにもキイロショウジョウバエ *D. melanogaster* (de BRUIJN, 1983; SATTA et al., 1987; GARESSE, 1988) やカ的一种 (HSUCHEN et al., 1984), そしてトノサマバッタ (*Locusta migratoria*) (McCRACKEN et al., 1987; UHLENBUSCH et al., 1987) やセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) (VLASAK et al., 1987) などでも塩基配列がかなり決定されている。

mtDNA を利用しての RFLP はショウジョウバエで多くの報告があり, キイロショウジョウバエ種群やハワイ産の *D. planitibia* 種群などいくつかの種群において制限酵素切断サイトの相違から進化的なアプローチによる分類が行われ (CHANG et al., 1989; DeSALLE et al., 1987; DeSALLE and TEMPLETON, 1988; LATORRE et al., 1986; LATORRE et al., 1988), これらの結果はいずれも形態及び染色体多型を使った分類結果と一致していた。

DNA の塩基置換などから求めた進化速度は様々な生物においてサイト当たり年当たりほぼ一定 (KIMURA and OHTA, 1974) であるから, 制限酵素切断サイトなどの違いから逆に分岐した年代を推定することができる。MARTIN and SIMON (1990) は同胞種である米国の *Magiciala septendecim* (17 年ゼミ) と *M. tredecim* (13 年ゼミ) の 16 個体群の mtDNA を 11 種の制限酵素で消化し, 切断サイトを解析した。13 年ゼミの mtDNA には A と B の 2 系統が見られ, 個体群間で遺伝的構造が異なることが明らかとなった。またこれら 2 系統は更新世 (大氷河時代) に分岐したものと推測された。

前述のアフリカミツバチの分布拡大による個体群の遺伝的組成の変化については, mtDNA の RFLP についても解析が行われており (HALL and MURALIDHARAN, 1989; SMITH et al., 1989), やはり両亜種間のフラグメントには差異が見られた。また, アフリカミツバチがまだ侵入していないとされていた地域でも, 一部の蜂群でアフリカミツバチ型 DNA を持つ個体が見つかるなど, RFLP 解析の結果が分布拡大の指標として利用されている。

オルガネラ DNA で RFLP 解析に用いられるものとしてはリボゾーム DNA (rDNA) も挙げられる。mtDNA の進化速度が速いといわれているのに対し, rDNA は保存性が高く塩基の置換などもきわめて少ない。このため科や目以上の高次分類に利用されている。昆虫では目レベルでその類縁関係を調べた研究が見られる (WHEELER, 1989)。

### III mtDNA の RFLP 解析によるキンウバ亜科 (ヤガ科) の分類

キンウバ亜科は全世界に 400 種, 日本には 50 余種を

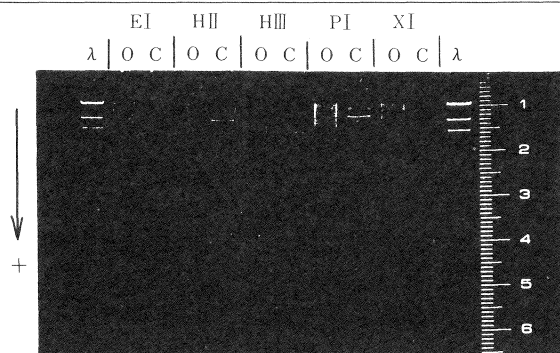


図-1 キンウバの mtDNA の制限酵素 5 種による消化結果 (1% アガロースゲル電気泳動)  
EI: EcoRI, H II: Hinc II, H III: Hind III,  
PI: PstI, XI: XbaI  
λ: λ-DNA の HindIII 消化断片 (マーカー)  
O: 開環状 (壊れた) mtDNA  
C: 閉環状 (完全な) mtDNA

産するヤガ科の一群で, 成虫や幼虫の形態に亜科特有の形質が安定して見られ, ほとんどの種が従来は *Plusia* 一属にまとめられていた。しかしながら雌雄の交尾器の形態に種的特化が著しいことが明らかとなり, 大属 *Plusia* は多くの属に分割された。ところが成虫交尾器のみを指標として分類を行った場合 (McDUNNOUGH, 1944; DUFAY, 1970 など) と, それに幼虫の形質を加味した研究 (一瀬, 1962; EICHLIN and CUNNINGHAM, 1978 など) では, 前者は属を細分化し後者はそれよりは属を統合する傾向が見られるなど必ずしも分類体系が一致せず, 種及び属の類縁関係が曖昧となっている。

そこで生物学的手法を用いて本亜科の種及び属の類縁関係を明らかにしようと試みている。アイソザイムによる分類では供試した 17 属 30 種をいくつかのグループに分けることができたが (NOMURA and ICHINOSE, 1990; 野村, 1990), さらに詳しい類縁関係を求めるため mtDNA の RFLP 解析を行った。供試種数が十分とはいえまだ暫定的な結果ではあるが, キンウバ類 7 種について得られた mtDNA を制限酵素 12 種 (6 塩基認識) で消化し (図-1), その断片から Nei and Li (1979) の方法により分岐距離を求め, UPGMA 法で系統図を作成してみたところ (図-2) アイソザイムの結果と同様な傾向が示された。

### IV PCR 法の利用と問題点

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は, DNA プライマーと DNA ポリメラーゼにより目的とする DNA 断片を数時間のうちに数十万倍以上に増幅できる方法である。SAIKI et al. (1985); MULLIS et al. (1986) などによって開発され, 90°C 以上の高熱でも失活しない耐熱性

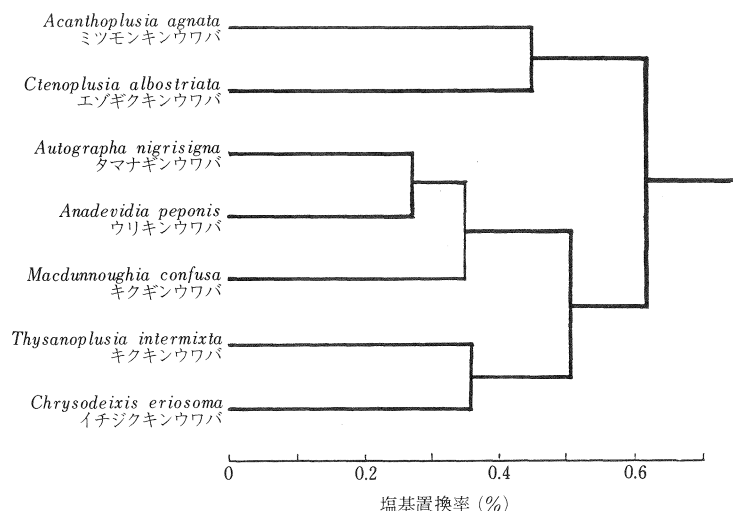


図-2 12種の制限酵素によるmtDNAのRFLP解析に基づくキンウワバ7種の暫定的系統図

DNAポリメラーゼの発見・利用と、完全自動化装置の開発により実用的なDNAの増幅法として急速に普及しつつある(SAIKI et al., 1988)。原理や使用法などについては多くのテキストが出版されており、本誌でも佐野(1990)により紹介されているため、詳細については別稿に譲りたい。

PCR法の利点は微小な昆虫やダニのように個体サイズが小さく目的とするDNAが極めて微量しか得られない場合でも、それを増幅して検出可能な量にすることができることである。1mmにも満たないハダニや卵寄生蜂などのDNAを場合によっては1個体でも解析することができるため、今後さらに利用価値が高まると期待される。

この手法の現時点での問題点は、増幅の成否の鍵を握っている(村松, 1990)プライマーを作成するまでに時間がかかることだが、手法的な問題はさらに簡便化されると期待される。また増幅中に父系由来のmtDNAが一緒に増幅された例も報告されており(GYLLENSTEN et al., 1991)、細心の注意が必要と思われる。

## お わ り に

以上のように昆虫類の分類においても、DNAのRFLP解析は広く利用され、多くの成果がみられるようになってきた。しかし、RFLPはDNAを無差別に制限酵素で切断する解析であるため、DNAの機能的に重要である部分(遺伝子をコードしている部分)とそうでない部分を区別することができない。実際には塩基座ごと

の進化速度は異なり(KIMURA and OHTA, 1974)、分岐年代などの推定に際しては注意を要する。

ただしその限界さえわきまえていれば、RFLPは比較的手軽に行える解析であり、今後も分類の一手法として興味深い結果を提供してくれるであろう。

## 引 用 文 献

- 1) AVISE, J. C. et al. (1987): Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 489~522.
- 2) BISHOP, J. G. III and J. A. HUNT (1988): Mol. Biol. Evol. 5: 415~431.
- 3) BOYCE, T. M. et al. (1989): Genetics 123: 825~836.
- 4) BE BRUIJN, M. H. L. (1983): Nature 304: 234~241.
- 5) CACCONE, A. et al. (1988): Genetics 188: 671~683.
- 6) CHANG, H. et al. (1989): J. Mol. Evol. 28: 337~348.
- 7) CLARY, D. O. and D. R. WOLSTENHOLME (1985): J. Mol. Evol. 22: 252~271.
- 8) DESALLE, R. et al. (1986): J. Mol. Evol. 26: 157~164.
- 9) ——— and A. R. TEMPLETON (1988): Evolution 42: 1076~85.
- 10) DUFAY, C. (1970): Faune de Madagascar 31: 1~198.
- 11) EICHLIN, T. D. and H. B. CUNNINGHAM (1978): Techn. Bull. Agric. Res. Serv. USDA. No. 1567: 1~122.
- 12) GARESSE, R. (1988): Genetics 118: 649~663.
- 13) GYLLENSTEN, U. et al. (1991): Nature 352: 255~257.
- 14) HALL, H. G. (1986): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4874~4877.
- 15) ——— (1992): Arch. Insect. Biochem. Physiol. 19: 163~176.
- 16) ——— and K. MURALIDHARAN (1989): Nature 339: 211~213.
- 17) HSUCHEN, C. C. et al. (1984): Nucleic Acids Res. 12: 7771~7785.
- 18) HUNT, J. A. et al. (1988): Genetics Speciation and The Founder Principle. Oxford Univ. Press. Oxford pp168~180.
- 19) 一瀬太良(1962): 東京農工大学農学部学術報告6: 1~127.

- 20) KIMURA, M. and T. OHTA (1974) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2868~2872.
- 21) KIRDY, L. T. (1990) : DNA Fingerprinting An Introduction. Stcken Press, New York. 365p.
- 22) MARTIN, A. and C. SIMON (1990) : Evolution 44: 1066~1080.
- 23) McCracken, A. et al. (1987) : Curr. Genet. 11: 625~630.
- 24) McDUNNOUGH, J. (1944) : Mem. South Calif. Acad. Sci. 2: 175~232.
- 25) MORITZ, C. et al. (1987) : Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 269~292.
- 26) MULLIS, K. B. et al. (1987) : Meth. Enzymol. 155: 335~350.
- 27) 村松正寛(1990) : ラボマニュアル遺伝子工学(増補版)丸善, 東京 203 p.
- 28) NEI, M. and W. -H. LI (1979) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5269~5273.
- 29) NOMURA, M. and T. ICHINOSE (1990) : Appl. Ent. Zool. 25: 140~143.
- 30) 野村昌史(1990) : 第34回応用動物昆虫学会大会講演要旨.
- 31) SAIKI, R. K. et al. (1985) : Science 230: 1350~1354.
- 32) ——— et al. (1988) : ibid. 239: 487~491.
- 33) 佐野輝雄(1990) : 植物防疫 44(12) : 557~561.
- 34) SATTA, Y. et al. (1987) : Mol. Biol. Evol. 4: 638~650.
- 35) ——— and N. TAKAHATA (1990) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9558~9562.
- 36) SMITH, D. R. et al. (1989) : Nature 339: 213~215.
- 37) SNYDER, M. et al. (1987) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7595~7599.
- 38) SOLIGIVAC, M. N. et al. (1986) : J. Mol. Evol. 23: 31~40.
- 39) VAWTER, L. and W. M. Brown (1986) : Science 234: 194~196.
- 40) VILASAK, I. et al. (1987) : Nucleic Acids. Res. 12: 2388.
- 41) WHEELER, W.C. (1989) : The Hierarchy of Life (FERNHOLM, B. et al. eds). Excerpta Medica. Amsterdam. pp307~321.
- 42) WOLSTENHOLME, D. R. et al. (1987) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1324~1328.

## 新しく登録された農薬 (4.6.1~4.6.30)

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〕、対照作物:対照病害虫: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 18135~18177 までの 43 件、有効登録件数 6103 件)

### 『殺虫剤』

#### ダイアジノン乳剤

ダイアジノン 40.0%

ダイアジノン乳剤 40 (4.6.8)

18136 (アグロス)

稲:ニカメイチュウ第1世代・フタオビコヤガ・ニカメイチュウ第2世代・イネカラバエ・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・イネハモグリバエ:21日4回,キャベツ・はなやさい:アオムシ・コナガ・アブラムシ類・キスジノミハムシ・キボシマルトビムシ:30日2回,はくさい:アオムシ・コナガ・アブラムシ類・キスジノミハムシ・キボシマルトビムシ:14日2回,セルリー:アブラムシ類:14日2回,ほうれんそう:アブラムシ類:21日2回,ねぎ・たまねぎ:アブラムシ類・スリップス類・ネギハモグリバエ・タマネギバエ:21日2回,トマト・ピーマン:アブラムシ類・テントウムシダマシ・ハダニ類:10日2回,なす(露地):アブラムシ類・テントウムシダマシ・ハダニ類:3日3回,なす(施設):アブラムシ類・テントウムシダマシ・ハダニ類:7日3回,ばれいしょ:アブラムシ類・テントウムシダマシ:収穫7日前まで,散布:さやいんげん・さやえんどう:アブラムシ類・ハダニ類:7日3回,すいか・メロン・かぼちゃ・しろうり・まくわうり:アブラムシ類・ハダニ類・キボシマルトビムシ:14日4回,きゅうり:アブラムシ類・ハダニ類・キボシマルトビムシ:播種時又は植付時:2回以内,芝:コガネムシ類幼虫・シバツトガ・スジキリヨトウ:発生初期:4回以内

#### クロルフルアズロン水和剤

クロルフルアズロン 10.0%

アタブロン SC (4.6.8)

18138 (石原産業), 18139 (三共), 18140 (北海三共), 18141 (九州三共), 18142 (八洲化学工業)

りんご:ハマキムシ類:14日4回

#### MEP 乳剤

MEP 48.0%

スミパイン 48 (4.6.8)

18143(住友化学工業), 18144(サンケイ化学), 18145(ヤシマ産業), 18146 (井筒屋化学産業)

まつ(生立木):マツノマダラカミキリ(成虫):成虫の発生初期及び発生最盛期直前:6回以内:空中散布(単木処理),まつ(生立木):マツノマダラカミキリ(成虫):成虫の発生直前より発生最盛期直前:6回以内:空中散布(10アール当たり投下薬量が本剤 360 ml,ただし,微害林では 240~360 ml とする),まつ(枯損立木):マツノマダラカミキリ(幼虫):幼虫期(秋期):6回以内:空中散布(単木処理),まつ(枯損立木):マツノマダラカミキリ(材内生息虫):成虫の発生期(春期):6回以内:空中散布(単木処理),まつ:マツカレハ:幼虫期:6回以内:空中散布,松類:ハバチ類:幼虫期:6回以内:空中散布(10アール当たり投下薬量は本剤 55~110 ml とする),松類:ハバチ類・ハマキガ類:幼虫期:6回以内:空中散布,松類:キクイムシ類:成虫の発生初期:6回以内:空中散布(単木処理),松類:ミスジツマキリエダシャク:幼虫期:6回以内:空中散布(10アール当たり投下薬量は本剤 180 ml とする),松類(風倒木):キクイムシ類:成虫の発生直前:6回以内:空中散布,一般樹木(材木):エダシャク類:幼虫期:6回以内:空中散布,一般樹木(材木):マイマイガ・ドクガ類:若令・中令・幼虫期:6回以内:空中散布(10アール当たり投下薬量は本剤 110 ml とする),一般樹木(材木):マイマイガ・ドクガ類:幼虫期:6回以内:空中散布

#### ケルセン乳剤

ケルセン 40.0%

(31 ページに続く)



# 昆虫寄生性線虫 *Steinernema kushidai* によるコガネムシ類幼虫防除の可能性

農林水産省森林総合研究所  
鹿児島県農業試験場大隅支場

小倉 信夫  
おお 倉 矢 信 夫

1984年2月静岡県浜北市のサツマイモ畑で採取した土壌から、ドウガネブイブイ幼虫に寄生して死亡させる線虫が検出された(串田ら, 1987)。この線虫は *Steinernema* 属線虫特有の形態と生活史を示し、主に線虫の排泄孔の位置、交接刺と導帯の形態及び感染態幼虫(耐久型3期幼虫)の体長の比較によって新種と判明し、*Steinernema kushidai* と命名された(MAMIYA, 1988)。一般にクシダネマと称されている。クシダネマはドウガネブイブイの他にヒメコガネ、ナガチャコガネなどの幼虫に対しても強い殺虫活性を示すことから、難防除害虫であるコガネムシ類幼虫の生物的防除への利用が期待されている。

ここでは、クシダネマの増殖法、保存法、殺虫活性及びこれまでに行われた圃場施用試験について概説する。

## I 増殖法

### 1 生活史

ドウガネブイブイ幼虫をクシダネマの感染態幼虫を含む土壌で飼育すると、早い場合は2日後に死亡する。死亡虫体は軟らかくて、特有の臭気を発する。死亡後2~3日経過した幼虫を解剖すると、線虫の雌成虫(体長約3.5 mm)と雄成虫(体長約1.5 mm)が観察される(図-1)。死亡後6~7日経過した幼虫体内には、ほぼ均一な大きさの線虫(体長約0.6 mm)が充満しており、体表を傷つけると体外へ遊出してくる(図-2)。この線虫が感染態幼虫と称されるものである。

クシダネマは腸内に *Xenorhabdus japonicus* という共生細菌を保持しており(図-3)(西村行正, 私信)、感染態幼虫は経口・経皮などの様々な方法で宿主昆虫体腔内に侵入後、この共生細菌を放出する。宿主昆虫は体腔内で繁殖する共生細菌による敗血症で死亡するが、線虫そのものは共生細菌や昆虫体内の組織を摂食して増殖する。やがて腸内に共生細菌を保持した多数の感染態幼虫が再び生じ、この幼虫は宿主昆虫の死骸から脱出し、近くの土壌中に生息して新たな感染の機会を待つ。

### 2 人工培地による増殖

*Steinernema* 属線虫の共生細菌は、ドッグフードや家

畜の内臓組織の磨砕物を主成分とした人工培地で盛んに繁殖するので、線虫もこれらの培地で増殖する(近藤ら、



図-1 ドウガネブイブイ幼虫から取り出したクシダネマ雌成虫(体長約3.5 mm)と雄成虫(体長約1.5 mm)



図-2 ドウガネブイブイ幼虫から遊出したクシダネマ感染態幼虫(体長約0.6 mm)

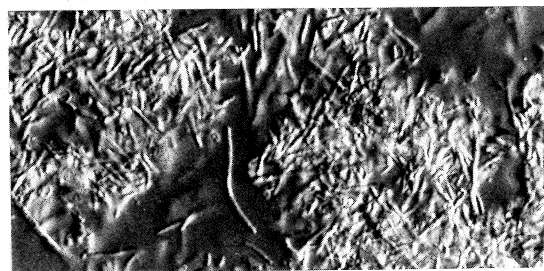


図-3 クシダネマの共生細菌(太さ約0.5 μm)

Control of scarabaeid larvae with an entomogenous nematode, *Steinernema kushidai*. By Nobuo OGURA and Shingo ÔYA

1984, 1985)。しかし、クシダネマの共生細菌はこれらの培地では容易に繁殖せず、これらにさらにペプトン等のタンパク質加水分解物や酵母抽出物を添加した培地でのみ旺盛な繁殖が可能で、そうした培地でクシダネマも増殖する(小倉, 1990)。

クシダネマの人工培地(表-1)は各成分を家庭用ジュースで5分間粉碎し、約80°Cまで加熱して脂肪を溶かした後、スターラーで攪拌しながらピペットで培養容器に分注し、高圧滅菌(120°C 20分間)して作成する。培養容器としてはシリコセン®をした角型培養瓶や三角フラスコあるいはペトリ皿などを用いる。

### 3 人工培地への接種と継代維持

感染態幼虫を0.1%塩化ベンゼトニウム溶液に5分間ずつ3回浸漬して、さらに滅菌蒸留水で3回洗浄して表面殺菌する。この感染態幼虫を人工培地に接種すると、4~5日後に雌雄成虫に成長して交尾産卵し、15日後には200~400倍の感染態幼虫が生じる。

角型培養瓶(45×85×25 mm)に培地B(5 ml)を入れ、感染態幼虫500頭を接種して25°Cで15日間培養すると、培養瓶1本当たり約10万頭の感染態幼虫が生じる。この感染態幼虫を培養瓶に入れたままで5, 10, 15, 20及び25°Cで6か月間保存すると、5, 10, 15及び25°Cでは感染態幼虫の大部分が死亡するが、20°Cでは約20%が生存している。したがって、クシダネマは20°Cでの保存期間を挟むことによって、半年に一回の植え継ぎで安定した継代維持が可能である。この植え継ぎは、感染態幼虫を含む古い培地をピペットで吸い取り、その一部を新しい培地に注入して増殖させることで行われる。

### 4 野外施用試験に向けた増殖

野外施用試験には、ドウガネブイブイ3齢幼虫に感染させて10~15日後に回収した感染態幼虫か、培地AやC(60 ml)をペトリ皿(径12 cm, 高さ3 cm)に入れて高圧滅菌したもので増殖した感染態幼虫を用いている。しかし、前者では幼虫1頭当たり約30万頭(串田ら, 1987)、後者では1ペトリ皿当たり約300万頭の生産にとどまっており、大規模な施用試験を行うにはより効率の高い大量増殖技術の開発が必要である。

## II 保存法及び殺虫活性

### 1 保存法

*Steinernema* 属線虫の場合、感染態幼虫(耐久型3期幼虫)を保存して室内外での殺虫試験や実際の害虫防除に用いる。宿主由来のクシダネマ感染態幼虫を蒸留水による懸濁液(水深約0.7 cm)にした場合、10~15°C 100日間の保存では死亡率は5%以下である。5°C(家庭用冷蔵庫

表-1 クシダネマ増殖用人工培地

| 培地<br>種類 | ドッグ<br>フード | ブタ腸 <sup>a</sup><br>磨砕物 | ペブ<br>トン | ブタ<br>脂肪 | 寒天  | リン酸 <sup>b</sup><br>緩衝液 | 感染態 <sup>c</sup><br>幼虫数 |
|----------|------------|-------------------------|----------|----------|-----|-------------------------|-------------------------|
| A        | 8.8g       | —                       | 1.2      | 4        | 0.2 | 85.8ml                  | 23万頭                    |
| B        | —          | 8.8                     | 1.2      | —        | 0.3 | 89.7                    | 10万頭                    |
| C        | —          | 26.4                    | 3.6      | —        | 0.3 | 69.7                    | 33万頭                    |

a: 市販品を磨砕したもの。b: 66mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ と66mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ を4:6で混合したもの。c: 培地5mlでの培養で得られる感染態幼虫数。

内など)では急激に死亡する。この点生物農薬として実用に供されている *S. carpocapse* の感染態幼虫が、湿潤で酸素供給の容易な状態であれば冷蔵庫での長期保存が可能であることと異なるので、留意しなければならない。土壌あるいはバーク堆肥中では25°Cで10か月間殺虫活性を維持したまま保存できる(串田ら, 1987)。表層腐植質黒ぼく土では、20°C 66日間で約50%の感染態幼虫が生存可能である(上田ら, 1989)。

### 2 殺虫活性

ペトリ皿(直径9 cm)内の土壌に放飼したドウガネブイブイ2~3齢幼虫に対する感染態幼虫懸濁液100  $\mu\text{l}$  滴下試験では、50頭の施用でも死亡幼虫が生じるが、500頭以上の施用ではほぼ100%の幼虫が4~5日で死亡する。体色が黄色になった老熟幼虫に対しては殺虫効果が劣る。プラスチックコンテナ(53×33×18 cm)の土壌(深さ10 cm)に放飼したドウガネブイブイ3齢幼虫25頭に対しては、感染態幼虫1,800頭(1万頭/ $\text{m}^2$ )、18,000頭(10万頭/ $\text{m}^2$ )および180,000頭(100万頭/ $\text{m}^2$ )の懸濁液の施用で、各々平均25, 84及び96%の死亡率が得られている。ペトリ皿あるいはポリエチレン製カップ(底面直径7 cm, 深さ5 cm)内の土壌に放飼したマメコガネ、ヒメコガネ、ナガチャコガネ、ビロードコガネ、シロテンハナムグリ幼虫への感染態幼虫1,000~2,000頭の施用では、3.5~7.2日後までに80%以上が死亡する。カブトムシ幼虫のような大型の幼虫でも感染死亡が起こる。ハチミツガ、ハスモンヨトウ、ミツモンキンウワバ等の鱗翅目昆虫幼虫に対しても殺虫活性を示す。ミミズやコガネムシ類の天敵であるシオヤブの幼虫に対しては殺虫活性を示さない(串田ら, 1987)。

## III 圃場施用試験

宿主由来の感染態幼虫及び人工培地による大量増殖感染態幼虫を用いて、圃場施用試験が行われているが、試験例はまだ少ない。

森林総合研究所(茨城県稲敷郡)では、畦畔板を円形状に地中30 cmまで埋めて1  $\text{m}^2$ を囲み、ヒノキ苗25本を

植えて試験区を設定した。この区内に宿主由来の感染態幼虫の懸濁液を10万～100万頭/m<sup>2</sup>の割合で注いで軽く土壌で覆って放置し、1か月後にドウガネブイブイ2齢幼虫40頭を放した。18日後の掘り取り調査結果でクシダネマの卓越した殺虫活性が示され、さらにクシダネマ施用2年後に放飼したドウガネブイブイ2齢幼虫でも高い死亡率が得られた(KOIZUMI et al., 1988)。

茨城県農業試験場(茨城県水戸市)では、畦畔板を正方形に地中40cmまで埋めて1m<sup>2</sup>を囲み、サツマイモを4株ずつ植えて宿主由来の感染態幼虫の懸濁液を1万頭、5万頭及び10万頭/m<sup>2</sup>の割合でじょろで施用した。6日後及び46日後にドウガネブイブイ1齢幼虫20頭ずつを放飼し、収穫後にサツマイモの被害芋率と食害痕の長さを調査した。その結果、クシダネマ施用区ではいずれの施用密度においてもサツマイモの被害芋率及び食害長の減少が認められた。特に10万頭施用区ではコガネムシ類幼虫の防除に使用されているMPP粒剤(9g/m<sup>2</sup>)施用区と比較して食害長に差がなく、クシダネマの高い防除効果が示された(上田ら, 1989)。

鹿児島県農業試験場大隅支場(鹿児島県肝属郡)では、コガネムシ類の自然発生条件下のサツマイモ畑で被害防止効果の試験を行った。この地域は黒ボク火山灰土壌でヒメコガネ、サクラコガネが優占種であり、ドウガネブイブイ、アオドウガネ、セマダラコガネ等も加害種である。サツマイモの普通植栽培(5月植え付け、10月以降収穫)では、8月中旬から被害が発生し始め、8月下旬から収穫期にかけて経日的に被害が増加する。

幅30cmの畦畔板で土中を仕切り、5m×2.5mの試験区を設定し、この区内に畦間80cm、株間30cmでサツマイモを2列栽培した。この試験区の全面あるいは植え溝に人工培地で増殖した感染態幼虫の懸濁液をサツマイモ植え付け2日前(6月下旬)に施用し、11月上旬に全株を掘り取り、被害芋率と被害度指数を得た。その結果、クシダネマ20万頭/m<sup>2</sup>施用区では、被害芋率、被害度指数とも無施用区の約40%に減少した(大矢ら, 1990)。

同支場ではさらに防除効果を高めるため、人工培地で増殖した感染態幼虫懸濁液をサツマイモの株元に注入する方法で、被害防止効果を調査した。すなわち、6月7日植え付け、11月16日収穫のサツマイモ畑へコガネムシ類幼虫の加害時期に当たる8月23日に2.5万、5万、10万頭/m<sup>2</sup>の割合で施用した。その結果、被害芋率は無処理区の75.1%に対し10万頭施用区は30.5%となり、被害度指数から求めた防除価は10万頭施用区で72.7%となった。青果用商品化芋率は無処理区31.3%に対し10万頭施用区は78.7%であった。各種の調査項目とも施用線

表-2 クシダネマの株元注入によるサツマイモコガネムシ類の被害防止効果(大矢ら, 1992)

| 施用線虫数                |        | 調査芋数  | 被害 <sup>a</sup> 芋率(%) | 被害度  |      | 青果用 <sup>b</sup> 商品化芋率(%) |
|----------------------|--------|-------|-----------------------|------|------|---------------------------|
| (万頭/m <sup>2</sup> ) | (万頭/株) |       |                       | 指数   | 防除価  |                           |
| 10                   | 2.4    | 112.3 | 30.5a                 | 14.1 | 72.7 | 78.7                      |
| 5                    | 1.2    | 102.0 | 51.0abc               | 27.5 | 46.7 | 60.1                      |
| 2.5                  | 0.6    | 111.0 | 66.1 bc               | 39.6 | 23.3 | 47.3                      |
| 無処理                  | —      | 115.7 | 75.1 c                | 51.6 | —    | 31.3                      |

<sup>a</sup>: 同一符号はダンカンの多重検定により、有意差の無いことを示す。

<sup>b</sup>: 小豆粒大の食害痕が2個以内のものを青果用に適用できるものとした。

表-3 サツマイモ収穫時に採取した土壌におけるクシダネマの殺虫活性(大矢ら, 1992)

| 施用線虫数                |        | 供試 <sup>a</sup> 虫数(頭) | 死虫数(頭) | 死亡率(%) |
|----------------------|--------|-----------------------|--------|--------|
| (万頭/m <sup>2</sup> ) | (万頭/株) |                       |        |        |
| 10                   | 2.4    | 30                    | 20     | 66.7   |
| 5                    | 1.2    | 30                    | 12     | 40.0   |
| 2.5                  | 0.6    | 30                    | 7      | 23.3   |
| 無処理                  | —      | 30                    | 0      | 0      |

<sup>a</sup>: ヒメコガネ3齢幼虫を1頭ずつポリエチレン製カップ中の土壌に放飼して調べた。

虫数の増加に伴って防除効果が高まる傾向があり、特に10万頭/m<sup>2</sup>施用区で優れた防除効果が示された(表-2)。

サツマイモ収穫時に各区10地点計30地点から土壌を採取し、ポリエチレン製カップに入れ、ヒメコガネ3齢幼虫を放飼して土壌中のクシダネマの殺虫活性を調査したところ、10万頭施用区では66.7%の死亡率が得られた(表-3)。これは施用したクシダネマが自然発生条件下のコガネムシ類幼虫に感染して増殖したため、土壌中の生息密度が施用時よりも高まったことを示唆しているものと思われる(大矢ら, 1992)。鹿児島県では一部の試験区で前年度施用のクシダネマが翌年度のサツマイモ栽培において、コガネムシ類の被害を防止する効果も認められている(大矢, 未発表)。

このような圃場施用試験例から、クシダネマは難防除土壌害虫コガネムシ類の総合防除技術確立のための素材として利用できるものと思われる。しかし、生物的防除手法として利用技術を確認するためには、各地域のコガネムシ類の発消長及び対象作物の栽培体系や土壌条件を考慮して、クシダネマの特性を生かした適正施用法をさらに検討しなければならない。

## おわりに

1930年及び1940年代にアメリカ東部でマメコガネ幼

虫防除に *S. glaseri* を用いて大きな成果を上げた (POINAR, 1979)。わが国でもコガネムシ類幼虫の防除のために、海外より導入した数種昆虫寄生性線虫の殺虫活性が調べられた。しかし、ペトリ皿で単独飼育したヒメコガネ幼虫への、*S. carpocapsae* (DD-136)、*S. carpocapsae* (Mexican 系統)、*S. glaseri*、*S. feltiae* 及び *Heterorhabditis* sp. の感染態幼虫 5,000 頭の施用では、施用後 5 日間にそれぞれ 60, 60, 87, 60 及び 30% の幼虫が死亡したにすぎなかった (川崎ら, 1986)。クシダネマはこれらの導入線虫と比べて、コガネムシ類幼虫に対してはるかに高い殺虫活性を示す線虫といえよう。圃場施用試験においてもこのことが裏付けられている。しかし、この特性がクシダネマとその共生細菌そのものによるものなのか、随伴している他の微生物によるものなのかは厳密には明らかにされていない。また、殺虫活性の高いクシダネマと継代維持中に生じた殺虫活性の低いクシダネマからはそれぞれ異なる型の共生細菌が検出されたと報告されて

いる (藤家ら, 1990)。したがって、クシダネマをコガネムシ類幼虫の生物的防除へ利用するためには、高い殺虫活性を保持したクシダネマを安価に大量に増殖する技術の開発が何よりも必要である。

## 引用文献

- 1) 藤家 梓ら (1990) : 34 回応動昆虫大会講要 213.
- 2) 川崎政治ら (1986) : 34 回日林中支論 83~86.
- 3) KOIZUMI, C. et al. (1988) : J. Jpn. For. Soc. 70 : 417~419.
- 4) 近藤栄造・石橋信義 (1984) : 日線研 14 : 40~48.
- 5) 近藤栄造ら (1985) : 日線研 15 : 1~10.
- 6) 串田 保ら (1987) : 応動昆 31 : 144~149.
- 7) MAMIYA, Y. (1988) : Appl. Ent. Zool. 23 : 313~320.
- 8) 小倉信夫 (1990) : 森林防疫 39 : 27~32.
- 9) 大矢 慎吾・上和田秀美 (1990) : 九病虫研究会報 36 : 126~128.
- 10) ———— (1992) : 九病虫研究会報 印刷中
- 11) POINAR, G. O. Jr. (1979) : Nematodes for biological control of insects. CRC Press Inc, Florida, 277pp.
- 12) 上田康郎ら (1989) : 日線研 19 : 59~61.

(27 ページより続く)

ケルセン乳剤 40 (4.6.26)

18166 (アグロス)

夏みかん：ミカンハダニ・ミカンサビダニ・コウノシロハダニ・ミヤケハダニ：21 日 2 回，みかん：ミカンハダニ・ミカンサビダニ・コウノシロハダニ・ミヤケハダニ：7 日 2 回，りんご：リンゴハダニ・オウトウハダニ・ナミハダニ：7 日 2 回，いちじく・なし・ぶどう・おうとう：ハダニ類：7 日 2 回，もも・きゅうり：ハダニ類：前日 2 回，いちご・さやいんげん・さやえんどう：ハダニ類：3 日 2 回，トマト・メロン・ピーマン・すいか・かぼちゃ・しろうり・まくわうり：ハダニ類：14 日 2 回，覆い下栽培以外の茶：ハダニ類：20 日 2 回，花き：ハダニ類：2 回以内

ジメトエート乳剤

ジメトエート 43.0%

ジメトエート乳剤 (4.6.26)

18167 (アグロス)

稲：ツマグロヨコバイ・ウンカ類・イネカラバエ・イネハモグリバエ・イネヒメハモグリバエ：30 日 4 回，みかん：ヤノネカイガラムシ・ミカンハモグリガ・ミカンコナジラミ・コナカイガラムシ類・アブラムシ類・ハダニ類・カネタタキ・ゴマダラカミキリ (成虫)：30 日 2 回，なつみかん：ヤノネカイガラムシ・ミカンハモグリガ・ミカンコナジラミ・コナカイガラムシ類・アブラムシ類・ハダニ類：90 日 2 回，キャベツ・はなやさい・アブラムシ類：7 日 3 回，はくさい・レタス・パセリ・ほうれんそう：アブラムシ類：14 日 3 回，セリ：アブラムシ類・ハダニ類：14 日 3 回，トマト・ピーマン・かぼちゃ・しろうり：アブラムシ類・ハダニ類：7 日 2 回，だいこん・かぶ・にんじん・ごぼう・れんこん：アブラムシ類：7 日 3 回，ねぎ・にら：アブラムシ類：7 日 6 回，たまねぎ・らっきょう：アブ

ラムシ類：前日 4 回，ばれいしょ：アブラムシ類：30 日 2 回

EPN 粉剤

EPN 1.5%

EPN 粉剤 (4.6.26)

18168 (アグロス)

稲：ニカメイチュウ・サンカメイチュウ・イネクロカメムシ・ウンカ類・ツマグロヨコバイ・イネカラバエ・イネツトムシ・アワヨトウ・イネハモグリバエ：30 日 3 回，陸稲：ケラ：播種時：播溝散布，ぶどう (露地)・おうとう：ハダニ類・アブラムシ類・ハマキムシ類：45 日 1 回，うめ：アブラムシ類・ハマキムシ類：45 日 1 回，りんご：ハダニ類・アブラムシ類・ハマキムシ類・リンゴワタムシ：30 日 4 回，なし：ハダニ類・アブラムシ類・ハマキムシ類：30 日 4 回，かき：ハマキムシ類：30 日 4 回，もも：ハダニ類・アブラムシ類・ハマキムシ類：収穫 7 日前まで，みかん：ハダニ類・アブラムシ類・ハマキムシ類：収穫 14 日前まで，なつみかん：ハダニ類・アブラムシ類・ハマキムシ類：120 日 4 回，ねぎ：アブラムシ類・スリップス類・タネバエ：30 日 3 回，キャベツ・はなやさい：アブラムシ類・スリップス類：ハダニ類・シンクイムシ類・ヨトウムシ・コガネムシ類：30 日 4 回，トマト (露地)：アブラムシ類・ハダニ類・ヨトウムシ：30 日 4 回，ピーマン (露地)：アブラムシ類・ハダニ類・ヨトウムシ：14 日 1 回，なす：アブラムシ類・ハダニ類・ヨトウムシ：収穫 7 日前まで，きゅうり (露地)：アブラムシ類・ハダニ類・スリップス類：収穫 7 日前まで，メロン (露地)・すいか (露地)・かぼちゃ (露地)：アブラムシ類・ハダニ類・スリップス類：30 日 4 回，だいこん：アブラムシ類・シンクイムシ類・ヨトウムシ・コガネムシ類・キスジノミハムシ：45 日 1 回，豆類：アブラムシ

(52 ページに続く)

# プロベナゾールの作用機構と遺伝子発現制御

農林水産省農業環境技術研究所

みなみ

南

あん

農林水産省農業研究センター

安

どう

東

えい

栄

いく

郁

いち

一

お

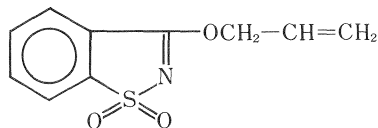
男

今日農業現場で用いられている農薬は、そのほとんどが何らかの作用で防除対象生物を殺してしまう殺滅型であるのに対し、本稿で取り上げるいもち病防除剤、プロベナゾール(図-1:商品名:オリゼメート)はいもち病菌に対する直接的抗菌活性をほとんど示さず、イネにいもち病抵抗性を付与するという、たいへんユニークな作用特性を有する。このような薬剤は殺菌剤に分類されているが、事実上殺菌性を持たないので非殺菌性殺菌剤と呼ばれる。この薬剤は水溶解度が低く、溢水、漏水などがない限り作用が長期間持続する。10 a 当たり 200 g 以下の低葉量で十分な予防効果が認められ(WATANABE, et al., 1977 a), またいもち病菌を直接のターゲットとしないため、耐性菌の出現頻度が極めて低く抑えられるものと期待される。

このような実用上の長所のほかに興味深いのは、プロベナゾールがイネが本来有するいもち病抵抗性機構を発動させているらしいことが示唆され、植物病理学の中心的課題の一つである、植物の病害抵抗性遺伝子の機能を知る一つの手掛かりとなる可能性がでてきているという点である。この作用機構の生化学的解析は関沢らのグループにより精力的に続けられた。プロベナゾールは根から吸収され、イネ体内で代謝変換されるがその代謝産物は試験管内で抗菌活性を持たない(WATANABE, 1977 b)。プロベナゾールを施用したイネではいもち病菌感染時にその孢子発芽、菌糸の伸長を強く阻害する物質が生産され、そのうちの 하나가  $\alpha$ -リノレン酸と同定された(SEKIZAWA and WATANABE, 1981)。またプロベナゾールを前処理したイネにおいては無処理イネに比べて、いもち病菌感染時に抵抗性反応に関連すると考えられるフェニルアラニンアンモニリアーゼ(PAL), ペルオキシダー

ゼ(POX), リポキシゲナーゼ(LOX)などの酵素活性が有意に上昇することが見いだされた(IWATA et al., 1980)。これらの反応に共通する特徴は二つある。第一点はこれらの反応がプロベナゾール処理のみによっては引き起こされず、処理したイネに更にいもち病菌が感染したときにはじめて観察されるものであるということである。第二点はその反応の時間的、量的過程が非親和性いもち病菌を接種したときに観察される抵抗性反応の過程とほぼ同一であるということである(SEKIZAWA et al., 1987)。

ここで宿主抵抗性反応について少し説明することにする。上記のイネといもち病菌のように、病原菌が宿主植物に感染しようとしても宿主の品種と菌のレースの組み合わせによっては感染初期に抵抗性反応が起こり、結果として宿主が病気を免れることが知られている。この抵抗性は宿主の感染部位及びその近傍で起こる過敏反応と呼ばれる細胞壊死によるものであり、リグニンの沈着などによる物理的障壁、及びファイトアレキシンの蓄積などによる化学的障壁が形成されて病原菌の侵入がくい止められる。この過敏反応は病原菌側の非病原性遺伝子(avirulence gene)とそれに特異的に対応する宿主の抵抗性遺伝子(resistance gene)が相互作用して起こると考えられている(DIXON and LAMB, 1990)。これらの遺伝子は感染のごく初期に作動して抵抗性反応を引き起こす最初の引き金になっているものと考えられる。現在のところ、ダイズ斑点細菌病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)をはじめとする数種類の病原バクテリアで非病原性遺伝子が単離され、構造が解析されている(DIXON and LAMB, 1990)。しかしその生化学的機能については不明である。宿主抵抗性遺伝子の方は遺伝学的に同定されているものは数多いがDNA分子として単離されたものではなく、その性状についての情報はまったく得られていない。一方、一連の抵抗性反応の過程はいろいろな宿主・病原菌の系で解析されてきており、生化学的な知見の蓄積がある。その第一はリグニンやフラボノイド系ファイトアレキシンの生合成にかかわる、フェニルプロパノイド代謝系(図-2)の活性化である(DIXON and HARRISON, 1990)。この代謝系はフェニルアラニンの脱アミノ化反応に始まり、その産物にはダイズのグリセオリン、インゲ



3-allyloxy-1,2-benzthiazole-1,1-dioxide

図-1 プロベナゾールの構造

Mode of Action of Probenazole on the Gene Expression in Rice Plants. By Eiichi MINAMI and Ikuo ANDO

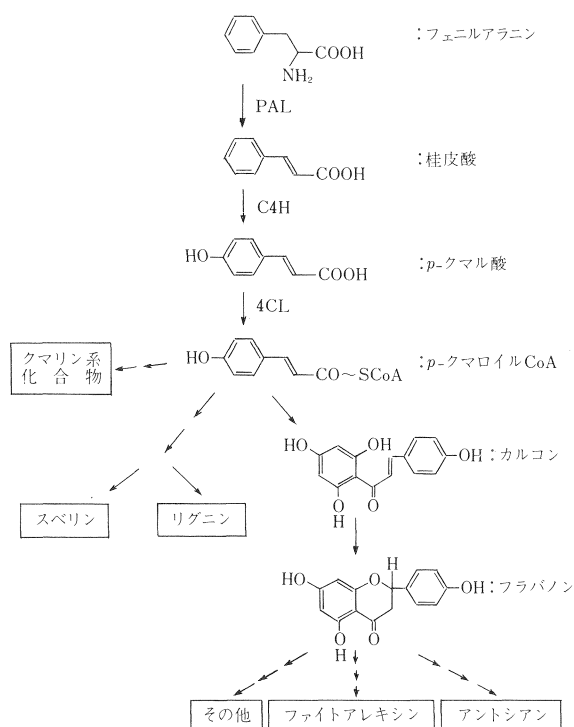


図-2 植物におけるフェニルプロパノイド系化合物の生合成経路 (筆者原図)

PAL: Phenylalanine ammonia-lyase

C4H: Cinnamic acid 4-hydroxylase

4CL: 4-Coumarate: CoA ligase

ンのファゼオリン、イネのサクラネチン(坂本ら, 1991)など、強い抗菌性物質が含まれる。また菌の侵入に対して物理的障壁となるリグニンもこの経路で生成される。第二はリポキシゲナーゼ (LOX) の活性化による酸化型不飽和脂肪酸の蓄積である。これは最近イネ・いもち病菌の系において分子レベルでの解析が進んできたもので、非親和性の組み合わせにおいてのみ LOX の活性化がみられる(柴田, 1991)。このほかにも過敏細胞死と関係づけて考えられている活性酸素の産生や呼吸活性の上昇などが知られている。

話を再びプロベナゾールに戻す。関沢らの研究によればプロベナゾールを処理したイネ (十石) に親和性のいもち病菌 (レース 007) を接種すると PAL, LOX, POX などの酵素活性が接種後数時間以内に一過的に上昇する。プロベナゾールにより抵抗性が誘導されたイネ、あるいは非親和性菌の接種を受けて宿主抵抗性反応を展開しているイネのいずれにおいてもこれらの酵素活性の誘導には植物ホルモンの一つであるエチレンが介在していると考えられている (SEKIZAWA and MASE, 1981)。実際

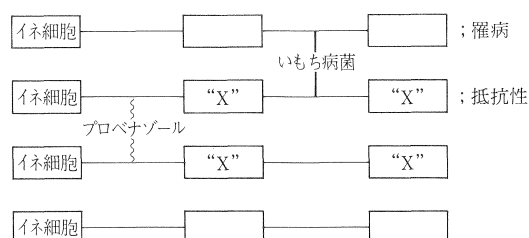


図-3 プロベナゾールがイネ細胞にもたらす変化, X (筆者原図)

エチレンや、エチレン生合成の前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸を直接イネに処理してもこれらの酵素活性が上昇する。そしてこの上昇が遺伝子の mRNA への転写阻害剤であるフォルマイシン A, mRNA のタンパク質への翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドによってほぼ完全に抑制されてしまうことから (SEKIZAWA and WATANABE, 1981), プロベナゾールによって誘導されるいもち病抵抗性反応においてはこれらの防御関連酵素の遺伝子の転写が活性化されていることになる。非親和性菌接種からいもち病抵抗性反応の発現にいたる過程について関沢らは、1) いもち病菌からのエリシターがイネ細胞膜上の受容体に結合; 2) エチレン生合成系の活性化; 3) 細胞核染色体上の PAL や LOX などの抵抗性関連酵素遺伝子の活性化; という機序を提唱している。そしてプロベナゾールは 1) と 2) の間に作用することによってイネに抵抗性を誘導するとしている (SEKIZAWA and MASE, 1981)。ところで既に述べたように 3) の過程はプロベナゾール処理のみによっては観察されない。しかしいもち病菌を接種すると直ちにこれらの遺伝子が活性化されるのであるから、プロベナゾールはこれらの遺伝子群にいつでも出動できるような臨戦体制を整えさせているということになる。またプロベナゾールによって付与される抵抗性にレース特異性がないようであること、また筆者らの実験ではプロベナゾール処理した日本晴 (+型: いもち病抵抗性遺伝子 *Pi-a* が欠落したもの) イネに生ずる病斑の形態が、*Pi-a* を持つ日本晴に生じる抵抗性病斑と比べてやや罹病性病斑に近いことから、この抵抗性は圃場抵抗性的な面を持つものかもしれない。いずれにせよプロベナゾールを処理したイネではある変化 X が起こっているはずである (図-3)。このような変化 X はイネ細胞の遺伝情報の発現の変化によってもたらされたものである。今かりに変化 X をもたらした遺伝子を *x* と呼ぶことにする。*x* は少なくとも次の三点の属性を有すると考えられよう; a) もともとイネが持っているが、いわゆる宿主抵抗性遺伝子とは異なる; b)



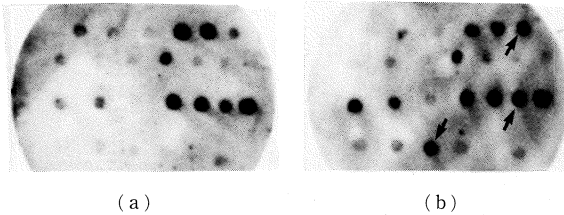


図-5 プラスマイナス法で単離した“x”の候補遺伝子  
プロベナゾール処理をした日本晴緑葉の cDNA ライブラリーを無処理(a), 処理(b)緑葉の mRNA を鋳型とした cDNA をプローブとしてスクリーニングした。写真で矢印がプロベナゾール処理で転写量が増加する cDNA クローン。

用いた鋳型 RNA はプロベナゾールを処理したイネから抽出したものであるからこのライブラリーの中にはプロベナゾールで活性化された遺伝子 x の mRNA を鋳型とした cDNA クローンが含まれているはずである。これの単離はプラスマイナス法によった。まず無処理及びプロベナゾール処理をしたイネの全 mRNA を鋳型として図-4 に示した方法で一本鎖 cDNA を作製する。このとき 4 種類のデオキシヌクレオシド 3 リン酸のどれかを  $P^{32}$  で標識したものをを用いれば一本鎖 cDNA を放射能標識することができる。かりに x の mRNA がプロベナゾール処理区のイネに多量に含まれているならば当然それを鋳型とした一本鎖 cDNA も多量に合成されたはずである。次に遺伝子 x の cDNA を含むファージのブランクがあったとする。これを 2 枚のニトロセルロース膜に別々に移しとり、上記 2 種類の一本鎖 cDNA と分子雑種を作らせると、プロベナゾール処理区イネ由来の cDNA を用いたときにより多くの標識された一本鎖 DNA (すなわち x の mRNA に由来する DNA) が分子雑種を形成し、X 線

フィルム上により強い黒化シグナルとして現れる。この方法によって約 10 万個のブランクをスクリーニングし、3 個の cDNA クローンを得た(図-5)。現在これらの構造を解析中である。

さて、このようにして cDNA クローンが得られればそれを手がかりにして染色体上に存在する遺伝子を単離することもできる。問題はその生理的意義をどのようにして解析するかである。得られたクローンはプロベナゾールによって活性化を受ける遺伝子由来であることはまちがいないわけであるが、それがいもち病抵抗性において果たす役割の解明に至るまでの道のりはまだまだ長いと言わねばならない。今後組換えイネの作製技術などを用いてこのような方法で単離された遺伝子がいもち病抵抗性に果たす役割を解析していきたいと考えている。

#### 引用文献

- 1) DIXON, R. A. and M. J. HARRISON (1990): *Advances in Genet.* 28: 165~234
- 2) ——— and C. J. LAMB (1990): *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 339~367
- 3) GUBLER, U. and B. J. HOFFMAN (1983): *Gene* 25: 263~269
- 4) IWATA, M. et al. (1980): *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46: 297~306
- 5) 南 栄一・安東郁男 (1991): 日本農薬学会第 16 回大会講演要旨集 157 pp
- 6) 坂本成範ら (1991): 日本農薬学会第 16 回大会講演要旨集 152 pp
- 7) O'FARRELL (1975): *J. Biol. Chem.* 250: 4007~4021
- 8) SEKIZAWA, Y. et al. (1987): *Agric. Biol. Chem.* 51: 763~770
- 9) ——— and S. MASE (1981): *J. Pest. Sci.* 6: 91~94
- 10) ——— and T. WATANABE (1981): *J. Pest. Sci.* 6: 247~255
- 11) 柴田大輔 (1991): 蛋白質・核酸・酵素 36 (10): 1727~1730
- 12) WATANABE, T. (1977 a): *J. Pest. Sci.* 2: 395~404
- 13) ——— et al. (1977 b): *J. Pest. Sci.* 2: 291~296

#### 次号予告

次 9 月号は下記原稿を掲載する予定です。

##### 特集: イチモンジセセリ

イチモンジセセリの生活史と発生動態 城所 隆  
分布の北限におけるイチモンジセセリの生命表分  
析 松村正哉  
イチモンジセセリの発生とイネの栽培条件 江村 薫  
黄色粘着トラップによるイチモンジセセリの誘殺  
調査 高橋章夫

有用フザリウム菌の製剤化 小川 奎・渡辺 健  
アブラナ科野菜の害虫ケブカノメイガの日本におけ  
る発生 吉松慎一  
植物葉の濡れ現象—水滴付着の側面— 渡部忠一・山口 勇  
カキグダアザミウマの東北地方における発生実態 吉井太門  
植物防疫基礎講座  
糸状菌における nit 変異株の作出と利用 竹原利明  
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 700 円 送料 51 円



# 日本産 *Panonychus* 属ハダニの研究の現状

茨城大学農学部応用動物昆虫学研究室

後  
え  
江

藤  
は  
原

哲  
し  
よう  
昭

お  
雄  
三

鳥取大学教育学部生物学教室

江

原

昭

三

## はじめに

ハダニ類は農業上重要な種を含むため、古くからじつに多くの研究が行われている。わが国では、特に *Panonychus* 属のミカンハダニとリンゴハダニが、*Tetranychus* 属のナミハダニやカンザワハダニとともに重要害虫として多方面から詳細に調査されている。そしてミカンハダニでは休眠系統と非休眠系統の存在が明らかにされ、両系統の地理的分布境界が、リンゴハダニの分布状況とともに報告されている(真梶, 1961 a, b)。また、2系統は寄主植物の選好性(内田, 1982)やエステルゼサイモグラム(OSAKABE, 1987 a, b)、挿入器先端部(国本ら, 1991)や爪間体など(刑部・斎藤, 1991)の形態によって区別できるほか、生殖的な隔離も報告されている(TAKAFUJI and FUJIMOTO, 1985)。これらの成果を踏まえて詳細な形態学的検討を行った EHARA and GOTOH (1992) は、ミカンハダニの休眠系統をクワオオハダニとして再記載し、2系統をめぐる問題に一応の終止符を打った。

リンゴハダニではリンゴ、ササ、ハルニレに寄生する系統が知られており、これらの間には寄生範囲の違いや生殖的な隔離の存在が報告されている(GOTOH and NOGUCHI, 1990)。筆者らはその後、これらの系統に分類学的な検討を加え、ササとハルニレに寄生する系統をニホンササハダニ及びエルムハダニとしてそれぞれ新種記載した(EHARA and GOTOH, 1991, 1992)。したがって、日本の *Panonychus* 属は現在5種で構成される。本報では、これら5種の形態および生態などの特徴を概説するとともに、全世界から知られている本属9種への検索表(EHARA and GOTOH, 1992)をほぼ再録し、参考に供したい。

## I *Panonychus* 属9種への検索表<sup>\*</sup>

ハダニ科から *Panonychus* 属への検索表は江原・真梶(1975)を参照されたい。また、胴背毛の記号は EHARA and

<sup>\*</sup> TSENG (1990) は、台湾の1900 mの高地のセイヨウリンゴから *P. lishanensis* TSENG を記載しているが、筆者らがこの原記載を見る限りでは、リンゴハダニとの識別点が不明りょうである。

Notes on the Japanese Species of the Genus *Panonychus* (Acari, Tetranychidae). By Tetsuo GOTOH and Shōzō EHARA

THO (1988) に、形態用語は江原・真梶(1975)に準じた。日本産の種には\*印を付し、和名を入れた。

1. 挿入器の先端部に球状のふくらみがある(図-1 A) ; *Achyranthes* (ヒユ科イノコズチ属) に寄生 ..... *P. globosus* TSENG
- 挿入器の先端部にふくらみはない(図-1 B~H) .....
2. 第1脚と2脚の膝節に各4本の毛をもち、第3脚膝節に2本の毛をもつ ; ササに寄生 .....  
\* *P. bambusicola* EHARA et GOTOH (ニホンササハダニ)
- 第1脚と2脚の膝節に各5本の毛をもち、第3脚膝節に3本の毛をもつ .....
3. 第4脚膝節は2本の毛をもつ ; キイチゴなどに寄生 ..... *P. caglei* MELLOTT

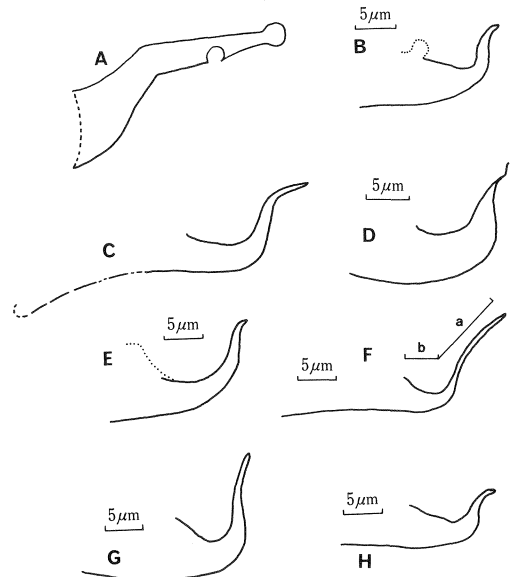


図-1 *Panonychus* 属の挿入器

A : *P. globosus*, B : *P. bambusicola*, C : *P. caglei*, D : *P. caricae*, E : *P. ulmi*, F : *P. elongatus*, G : *P. citri*, H : *P. mori* (A : TSENG, 1974 ; B & E : EHARA and GOTOH, 1991 ; C : MELLOTT, 1968 ; D : HATZINIKOLIS, 1984 ; F~H : EHARA and GOTOH, 1992 より作図した)

- 第4脚膝節は3本の毛をもつ .....4
- 4. 雌の胴背毛  $L_4$  の長さは、胴背毛  $C_4$  のおよそ2/3 (図-2) .....5
- 雌の胴背毛  $L_4$  の長さは、胴背毛  $C_4$  のおよそ1/2; イチジクに寄生 ..... *P. caricae* HATZINIKOLIS
- 雌の胴背毛  $L_4$  の長さは、胴背毛  $C_4$  のおよそ1/3 .....6
- 5. 雌触肢の出糸突起は長さが幅より顕著に大きい (図-3 A, 矢印); 雌の第2脚附節にある二重毛の基部側の毛は末端部側の毛より長い; ハルニレに寄生; 産雌単性生殖を営み, 雄は極めてまれ .....  
\* *P. thelytokus* EHARA et GOTOH (エルムハダニ)
- 雌触肢の出糸突起は、長さと幅がほぼ同長 (図-3 B, 矢印); 雌の第2脚附節にある二重毛の基部側の毛は末端部側の毛より著しく短い; パラ科樹木に寄生 .....  
\* *P. ulmi* (KOCH) (リングハダニ)
- 6. 挿入器は後方で緩やかに背方に曲がるS字状を呈し (図-1 F の a), S字部分の長さは軸部の背縁 (図-1 F の b) のおよそ2倍; カンキツやモモなどに寄生 .....  
*P. elongatus* MANSON
- 挿入器のS字部分の長さは軸部の背縁の2倍以下 .....7
- 7. 挿入器のS字部分の長さは軸部の背縁のおよそ1.5倍 (図-1 G); 非休眠性; 主にカンキツに寄生 .....  
\* *P. citri* (McGREGOR) (ミカンハダニ)

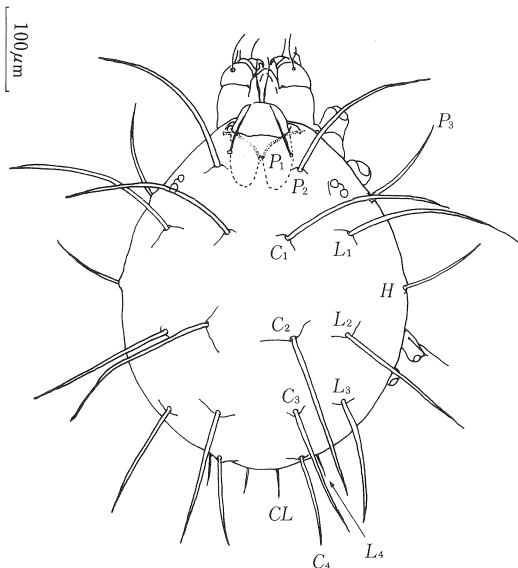


図-2 クワオオハダニの雌の背面。

$P_{1-3}$ : 前胴体背毛,  $C_{1-4}$ : 背中後体毛,  $L_{1-4}$ : 背側後体毛,  $H$ : 肩毛,  $CL$ : 臀毛. (EHARA and GOTOH, 1992 を改写)

- 挿入器のS字部分と軸部の背縁の長さはほぼ同長 (図-1 H); 休眠卵を産下; クワやナシなどに寄生 .....  
\* *P. mori* YOKOYAMA (クワオオハダニ)

## II 形態と生態

### 1 ニホンササハダニ (*P. bambusicola* EHARA et GOTOH)

長野県志賀高原のクマザサで採集され、リングハダニの名のもとに報告された前歴がある (MORIYAMA and MORI, 1977)。1991年に新種として記載された (EHARA and GOTOH, 1991)。日本国内のタケ科に寄生するハダニでは唯一赤色をしている。種小名 *bambusicola* は「ササの住人」という意味である。和名は、日本のササにちなむ。

雌の体長 (口吻前端から胴体部後端まで) は  $430\mu\text{m}$  内外, 雄は  $290\mu\text{m}$  内外であり, 体色は黒味を帯びた赤色である。胴背毛の生え際のこぶは鮮やかな白色を呈する。白～淡赤色の卵を主に葉表に産下し, 卵柄から葉面に数本の糸を張って卵を固定する。休眠卵産下雌は透明感のある濃赤色に変化し, 赤橙色～濃橙色の休眠卵を葉裏の葉柄付近や主脈沿いに産下する。活動ステージは主に葉表に寄生し, 夜間や雨の日は葉裏に移動するが, 葉裏を摂食することはない (GOTOH, 1987)。雄成虫と静止期は葉裏, 特に葉縁部に集中的に分布する。これは雄が第三静止期の雌をガードし, 成虫化後すぐに交尾することに関係する。被害は葉面全体にかすれたような小さな白斑点として現れ, 特定の部位に集中することはない。札幌では休眠卵が5月上～下旬にふ化し始め, 10月下旬～11月上旬まで活動し, この間に約5世代を経過する。休眠卵から発育した雌はちょうど展葉した新葉に移動して産卵し, そこから発育した個体が成虫になる7月に個体数はピークを迎える (GOTOH, 1987)。

### 2 エルムハダニ (*P. thelytokus* EHARA et GOTOH)

KOCH (1836) がリングハダニとして記載した標本はニレ科 *Ulmus* 属から採集されたものである。このため日本のニレに住む本種は長い間リングハダニと見られてき

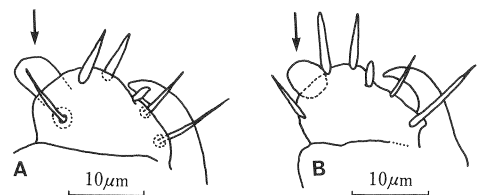


図-3 雌の触肢の先端部 (矢印は出糸突起 (= 端感覚体) を示す)。

A: エルムハダニ (EHARA and GOTOH, 1992), B: リングハダニ (EHARA, 1956)

た。この背景には、本種の個体数が極めて少なく十分な研究が行えなかったという事情もある。エルムハダニは本年記載された (EHARA and GOTOH, 1992)。

本種には雄が極めてまれであり、産雌単性生殖 (thelytoky) を営む。種小名 *thelytokus* はこのことにちなんで与えられた。和名は完模式標本 (ホロタイプ) が北海道大学構内のハルニレから採集されたことに由来する。雌の体長は 430  $\mu\text{m}$  内外、体色は緑色を帯びた透明感のある赤色であり、胴背毛の生え際のこぶは白く浮き立っている。雌は赤色の卵を主に葉表の脈上に産下する。卵柄はあるが糸で固定することはない。休眠卵産下雌は深みのある赤色に変化し、濃赤色の卵を枝上に産下する。活動ステージは主に葉表に生息し、葉表に白斑点の食痕を現す。札幌では7月下旬から休眠卵産下雌が出現し始め、8月中旬にはすべての個体が休眠卵を産下する。これはハルニレの葉が8月下旬に硬質化することに関係すると思われるが、詳細は不明である。発育日数 (12.1 日, 25°C) から推定すると、本種は年2~3世代を経過する。

### 3 リングハダニ (*P. ulmi* (Kosch))

雌の体長は 410  $\mu\text{m}$  内外、雄は 330  $\mu\text{m}$  内外であり、胴背毛基部のこぶは白色である。体色は暗赤色であり、橙~赤橙色の卵を葉の両面にある主支脈沿いに産下する。卵柄から数本の糸を張って卵を葉に固定するが、しばしば糸を張らないことがある。休眠卵産下雌は透明感のある赤色に変化し、濃赤色の卵を葉芽腋や花芽基部、2~5年生枝の分岐部などにまとめて産下する。被害は、成虫密度に関係なく葉面全体に白斑点として現れるが、葉縁部や葉柄部への被害が先行する。寄生数が多いと葉は銀白色になり、やがて褐変する。札幌のリング上では休眠卵が5月中旬からふ化し、枝の上方に向かう。密度が高いと糸で枝から垂れ下がり風で他樹へ分散することがある。個体数は7月下旬~8月下旬にピークに達するが、ピークの時期や個体数の年次変動は大きい。8月下旬~9月上旬に休眠卵が多くなり、10月下旬には活動を終了する。この間に5~7世代を経過する。

### 4 ミカンハダニ (*P. citri* (McGREGOR))

従来、ミカンハダニの非休眠系統と呼ばれてきたものである。雌の体長は 450  $\mu\text{m}$  内外、雄は 360  $\mu\text{m}$  内外であり、鮮やかな赤色を呈する。胴背毛基部のこぶは赤色である。橙色の卵を葉の両面に産下し、卵柄の頂部から葉面に10本ほどの糸を掛けて固定する。ハダニはかなり散開した状態で生息するため、被害は葉の両面全体に現れるが、葉脈部よりは葉の面部を好し、寄生が進むと葉脈部付近だけが緑色で、他は白化することがある。ミカンの緑枝にも寄生する。休眠性をもたないので常緑樹で

は周年発生し、静岡のミカンでは年13~14世代を繰り返す。通常夏と秋の二回発生のピークをもつ。岡山のナシでは他樹種から移入して寄生するため、8月中旬までハダニの発生がなく、発生が始まると急激に個体数が増加し、10月中旬にピークに達したのち、再び急激に減少して落葉と共に消滅する (TAKAFUJI and MORIMOTO, 1983)。生け垣のイヌツゲやキンモクセイ、サンゴジュなどにも寄生・越冬し、隣接するナシ園などでの翌春からの発生源となる (孫ら, 1988)。

### 5 クワオオハダニ (*P. mori* YOKOYAMA)

本種は従来ミカンハダニの休眠系統と呼ばれてきたものであり (EHARA and GOTOH, 1992)、ナシやモモの他クワなどにも発生する。横山桐郎 (1929) は、本種を *P. mori* KISHIDA として紹介しているが、岸田久吉による原記載は存在しないため、図解入りで形態を記述した横山 (1929) が原記載となる (PRITCHARD and BAKER, 1955)。種小名の *mori* は「クワの」の意味であり、和名クワオオハダニも横山による命名である。なお、本種は *Panonychus* 属の模式種である (EHARA, 1956)。

雌の体長は 480  $\mu\text{m}$  内外、雄は 380  $\mu\text{m}$  内外である。夏型雌は少し黒色を帯びた深みのある赤色を呈し、胴背毛基部のこぶは白色を帯びた赤色である。夏卵の色は寄主植物により異なり、白~淡橙色である。卵柄に糸をからめて葉面に固定するが、ミカンハダニほど密に張ることはない。休眠卵産下雌は黒色の斑点をもつ鮮赤色に変化し、濃赤色の卵を発育枝や短果枝基部などにまとめて産下する。休眠卵産下雌は卵を産下するごとに葉上に戻り摂食する (FUJIMOTO and TAKAFUJI, 1990)。本種は葉の両面に寄生し、卵は主に葉表の主支脈沿いの凹部に沿って産下される。個体数の増加につれて面部や葉裏にも産下される。活動ステージは主に葉表に生息し、雨や曇りの日には葉裏に移動する。静止期と雄成虫は葉裏の葉縁部に多く生息する。被害は葉全体に白斑として現れるが、最初に主脈と葉縁部、葉柄部を加害し、次にその他の部分へと広がるので、葉の面部中央の食痕は少ない。鳥取のナシでは休眠卵が4月中~下旬にふ化し始め、10月下旬まで活動する。この間に約9世代を経過する。個体数は夏季に著しく増加して単峰型の発生消長を示す年と、7~8月及び9~10月の2回ピークをもつ年がある (内田, 1982)。

## III 寄主植物

ニホンササハダニの寄主植物はタケ科の一部に限定される (表-1)、*Panonychus* 属の中でも特徴的な地位を占めている。本種はタケ科のササ属とスズタケ属では良く発

育・産卵するが、マダケ属やメダケ属での発育率は4割と低く、出現した雌の大半が産卵しない。また、イネやススキなどのイネ科植物ではまったく発育できない (GOTOH and NOGUCHI, 1990)。

残りの4種はバラ科植物とクワで程度の差はあるものの発育が可能である。エルムハダニはハルニレのみが寄主植物であり、この他にサクラやハマナシ、ヤマグワで約半数の個体が成虫まで発育できるが、寄主範囲はかなり狭い。

リングハダニはバラ科を中心に90種以上の植物に寄生することが知られており (BLAIR and GROVES, 1952)、日本ではリング、ナシ、モモ、スモモ、オウトウなどのバラ科果樹の害虫である。しかし、本種は自然生態系の植物への選好性がかなり低く、バラ科植物全般に寄生す

るわけではない (GOTOH and NOGUCHI, 1990)。バラ科以外の植物ではハルニレとヤマグワで良好に発育し、カラタチでも半数の個体が発育できる。また、スモモとハルニレにおける発育率には供試個体群間に大きな変異がみられ、品種や植物の状態などに応じて発育できないことがあるらしい。さらに、OSAKABE et al. (1990) は本種がインゲンマメでは発育しないことを示しており、BLAIR and GROVES (1952) が挙げている草本植物への寄生性については再検討の余地が残されている。

ミカンハダニとクワオオハダニの寄主植物は比較的共通性が高く、モモ、ナシ、ヤマグワ、カラタチで良好な発育を示すほか、インゲンマメやウリ類でも発育できる (OSAKABE, 1987 a; OSAKABE et al., 1990)。両種を分かち最も顕著な植物はカンキツであり、ミカンハダニはよく発育するが、クワオオハダニは発育できない。

以上のように、5種に共通する植物はない。しかし、リングハダニ、ミカンハダニそしてクワオオハダニが良好な発育を示したヤマグワとカラタチの存在は極めて興味深く、*Panonychus* 属の系統を考える上での貴重な資料を与えてくれる。

#### IV 種 間 交 配

ハダニ類では異種間の交配実験を容易に行うことができる。*Panonychus* 属では、交配実験がミカンハダニの休眠系統と非休眠系統間 (TAKAFUJI and FUJIMOTO, 1985)、リングハダニのリング、ハルニレ及びクマイザサ系統間 (GOTOH and NOGUCHI, 1990)、そしてミカンハダニの2系統とリングハダニのリング系統間 (国本ら, 1991) で行われているが、これらを現在の種名に置き換えて表-2に結果を示した。これによると、種内交配ではいずれも90%以上のふ化率と67%以上の性比(雌率)を示しており、半・倍数性の性決定様式を持つこれらのハダニでは、雌の出現は当然のことながら受精の成功を示唆している。特に、エルムハダニでは出現したすべての個体が雌成虫であった。これは本種が産雌単性生殖を営むことに起因し (GOTOH and NOGUCHI, 1990)、この単性生殖は染色体の観察によって2倍体で起こることが推察されている (BOLLAND and GOTOH, 投稿中)。

種間交配では、クワオオハダニ(雌)×ミカンハダニ(雄)の組み合わせを除いて、ふ化率の顕著な低下は起こらず、また出現した個体は、エルムハダニの雌を交配した場合を除き、すべて雄であった。したがって、これらの種間には生殖的隔離が認められた。エルムハダニを雌にした交配ではふ化率の低下や発育不全ではなく、また未交尾雌と同様、出現した個体はすべて雌であったた

表-1 *Panonychus* 属5種の各種植物上における発育率 (%)<sup>a)</sup>

| 供 試 植 物  | ニホンササ<br>ハダニ | エルム<br>ハダニ | リング<br>ハダニ | ミカン<br>ハダニ | クワオオ<br>ハダニ |
|----------|--------------|------------|------------|------------|-------------|
| バラ科      |              |            |            |            |             |
| セイヨウサンザシ | 0            | 0          | 79         | <10        | <10         |
| リング      | 0            | 0          | 73~83      | 36         | 15          |
| ズ ミ      | 0            | 2          | 56         | —          | —           |
| モ モ      | 0            | 7          | 81~98      | 91         | 75          |
| スモモ      | 0            | 0          | 2~83       | —          | —           |
| サクラ      | 0            | 50         | 90~94      | —          | —           |
| ナ シ      | 0            | 6          | 79~90      | 93         | 80          |
| サンショウバラ  | 0            | 21         | 73         | —          | —           |
| ハマナシ     | 0            | 42         | 65         | —          | —           |
| ナナカマド    | 0            | 0          | 46         | —          | —           |
| ニレ科      |              |            |            |            |             |
| ハルニレ     | 0            | 74         | 10~90      | —          | —           |
| クワ科      |              |            |            |            |             |
| ヤマグワ     | 0            | 58         | 75~97      | >80        | >80         |
| ミカン科     |              |            |            |            |             |
| ウンシュウミカン | —            | —          | —          | 95         | 2           |
| ユ ズ      | —            | —          | —          | —          | 5           |
| カラタチ     | 0            | 8          | 50         | 98         | 95          |
| イ ネ科     |              |            |            |            |             |
| エゾミヤコザサ  | 90           | 0          | 0          | —          | —           |
| クマイザサ    | 80           | 0          | 0          | —          | —           |
| クマザサ     | 96           | 0          | 0          | —          | —           |
| スズタケ     | 87           | 0          | 0          | —          | —           |
| マメ科      |              |            |            |            |             |
| インゲンマメ   | —            | —          | 3          | >80        | >60         |

<sup>a)</sup> 内田(1982), OSAKABE(1987), OSAKABE et al. (1990), GOTOH and NOGUCHI(1990), 刑部(1991)から作成した(ダニの名称は現在のものに直した)。

め、本種と他種との間に遺伝子の交流があるか否かは確認できていない。クワオオハダニとミカンハダニの組み合わせでは受精が起こり、受精卵がふ化しなかったり、発育初期に死亡したりする配偶子隔離の存在が知られており (TAKAFUJI and FUJIMOTO, 1985; 高藤, 1986), ふ化率の著しい低下は受精卵に由来する。このように5種は互いに独立した種である。

## V エステラーゼザイモグラムによる識別

電気泳動法はサイズが小さく、形態的に類似したハダニ類や寄生蜂などの昆虫の分類学的研究にとって重要な手法の一つになりつつある。これはザイモグラムが種内変異の検出、同胞種や近縁種の識別に優れた威力を発揮するからである (MENKEN and ULENBERG, 1987)。

ハダニ類の酵素活性を電気泳動法によって検出したのは OGITA and KASAI (1965) が最初であった。その後武久・田中 (1967) や刑部 (1984) がミカンハダニの休眠・非休眠系統のエステラーゼアイソザイムを調査し、この2系統が遺伝的に異なっていることをタンパクレベルで明らかにしている。特に、刑部 (1984) の報告以来、ハダニ類の分野では電気泳動法が広く用いられるようになり、ナミハダニ (GOKA and TAKAFUJI, 1992) やオウトウハダニ (GOTOH and TAKAYAMA, 1992) などの遺伝的変異性や同胞種の識別に重用されている。

*Panonychus* 属について、刑部 (1984) はミカンハダニの休眠・非休眠系統をアガロース電気泳動法で解析し、両系統を容易に識別できることを示している (図-4)。この場合、6本のバンド (E1~E6) が検出され、このうち

両系統に共通する2本のバンド (E4とE5) があること、非休眠系統 (ミカンハダニ) ではE1とE3, E2とE3, E3の3つの組み合わせがあること、休眠系統 (クワオオハダニ) にはE1~E3が欠如し、E6が特異的に現れることを明らかにした。

一方、リングハダニ、ニホンササハダニ及びエルムハダニでは、ザイモグラムの検討が遅れていたが、最近 GOTOH and ISHIKAWA (1992) が識別を試みた。その結果、この3種では陰極側に6本 (EST-2), その陽極側に15本 (EST-1) のバンドが検出されている。EST-1はバンドの数が多すぎ同定には不適切であるが、EST-2を使えば3種を容易に識別できることがわかった。このようにエステラーゼザイモグラムは日本産5種の分類学的差異とよく一致し、ハダニの近縁種識別には有用な手段である。

## おわりに

ミカンハダニの生態学的、遺伝学的そして生化学的研究は、休眠性と食性の変異が一つの契機となって始まり、同様にリングハダニの研究も寄主植物の変異にその源を発している。これらはいずれも生態学的視点からのアプローチであり、一見分類学とは何ら関係をもたないように見える。しかし、ここに挙げた研究はハダニ学ではいかなる研究も分類学とは不可分であることを示す好例であると考えられる。ともすると分類学は応用面から敬遠されがちであるが、これを機に少しでもその重要性について再認識して頂ければ幸いである。

筆者らはこれまでの知見に基づいて *Panonychus* 属の5種の諸特徴を記述してきたが、本属にはまだまだたくさん問題が残っている。例えば、クワヤムクノキに寄生するクワオオハダニは、ナシなどから知られている個体と色彩や寄主範囲に違いがあるように思われる。また、

表-2 *Panonychus* 属5種の交配実験<sup>a)</sup>

| 組み合わせ(♀×♂)  | ふ化率 | 性比 (%♀) |
|-------------|-----|---------|
| ニホンササ×ニホンササ | 98  | 74      |
| エルム×エルム     | 91  | 100     |
| リング×リング     | 96  | 73      |
| ミカン×ミカン     | 95  | 67      |
| クワオオ×クワオオ   | 95  | 67      |
| ニホンササ×リング   | 88  | 0       |
| リング×ニホンササ   | 94  | 0       |
| エルム×ニホンササ   | 96  | 100     |
| エルム×リング     | 94  | 100     |
| クワオオ×リング    | 93  | 0       |
| リング×クワオオ    | 79  | 0       |
| ミカン×クワオオ    | 94  | 0       |
| クワオオ×ミカン    | 55  | 0       |

<sup>a)</sup>TAKAFUJI and FUJIMOTO (1985), GOTOH and NOGUCHI (1990), 国本ら (1991) から作成した (ダニの名称は現在のものに直した)。

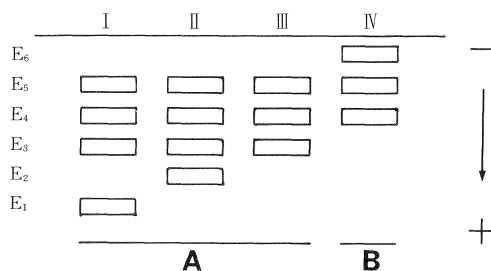


図-4 ミカンハダニ(A)とクワオオハダニ(B)のエステラーゼザイモグラム  
(刑部, 1984 を改写; ダニの名称は現在のものに直した)

ミカンハダニのイヌツゲ類やモクセイ、カラタチなどに寄生する個体群の生物学的特徴も気になるところである。将来、分類学的な再検討に迫られる可能性もなくはないので、本属の研究に際しては寄主植物の明記と標本の保存が望まれる。

本稿をご校閲下され、貴重なご意見を頂いた千葉大学園芸学部の天野 洋博士に深く感謝の意を表する。

### 引用文献

- 分類関係の文献の一部を割愛した。
- 1) BLAIR, C. A. and J. R. GROVES (1952) : J. Hort. Sci. 27 : 14~43.
  - 2) EHARA, S. (1956) : J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. 6 Zool. 12 : 499~510.
  - 3) ——— and T. GOTOH (1991) : Internat. J. Acarol. 17 : 9~12.
  - 4) ——— (1992) : Appl. Entomol. Zool. 27 : 107~115.
  - 5) ——— and Y. P. THO (1988) : J. Fac. Educ. Tottori Univ., Nat. Sci. 37 : 1~24.
  - 6) 江原昭三・真梶徳純 (1975) : 農業ダニ学, 全国農村教育協会, 東京, 328 pp.
  - 7) FUJIMOTO, H. and A. TAKAFUJI (1990) : Appl. Entomol. Zool. 25 : 509~514.
  - 8) GOKA, K. and ——— (1992) : ibid. 27 : 141~150.
  - 9) GOTOH, T. (1987) : ibid. 22 : 248~258.
  - 10) ——— and Y. ISHIKAWA (1992) : ibid. 27 (in press).

- 11) ——— and O. NOGUCHI (1990) : Exp. Appl. Acarol. 10 : 157~165.
- 12) ——— and K. TAKAYAMA (1992) : J. Acarol. Soc. Jpn. 1 : 45~60.
- 13) 国本佳範ら (1991) : 応動昆 35 : 103~108.
- 14) MENKEN, S. B. J. and S. A. ULENBERG (1987) : Agric. Zool. Rev. 2 : 305~360.
- 15) MORIYAMA, S. and H. MORI (1977) : JIBP Synthesis 15 (Kitazawa, Y. ed.), Univ. of Tokyo Press, Tokyo, pp. 54~61.
- 16) OGITA, Z. and T. KASAI (1965) : SABCO Journal 1 : 1~4.
- 17) 刑部正博 (1984) : 応動昆 28 : 1~4.
- 18) ——— (1991) : 化学と生物 29 : 304~311.
- 19) ———・斎藤 裕 (1991) : 果樹試報 21 : 95~115.
- 20) OSAKABE, M. (1987 a) : Appl. Entomol. Zool. 22 : 35~44.
- 21) ——— (1987 b) : ibid. 22 : 577~584.
- 22) ——— et al. (1990) : ibid. 25 : 326~328.
- 23) 真梶徳純 (1961 a) : 東近農試研報 (園芸) 6 : 49~63.
- 24) ——— (1961 b) : 同上 6 : 64~76.
- 25) 孫 緒良ら (1988) : 応動昆 32 : 260~265.
- 26) 高藤晃雄 (1986) : 植物防疫 40 : 433~438.
- 27) TAKAFUJI, A. and H. FUJIMOTO (1985) : Res. Popul. Ecol. 27 : 361~372.
- 28) ——— and N. MORIMOTO (1983) : Appl. Entomol. Zool. 18 : 525~532.
- 29) 武久 喬・田中 学 (1967) : 九州病虫研会報 13 : 126~130.
- 30) 内田正人 (1982) : 鳥取県果試特報 2 : 1~63.
- 31) 横山桐郎 (1929) : 最新日本畜業害虫全書, 明文堂, 東京, 569 pp.

## 学 界 だ よ り

### ○鳥害研究会開催のおしらせ

A. 我孫子シンポジウム「カラス研究の現状と課題」

日 時 : 8月30日(日) 10:30~16:00

場 所 : 千葉県親水広場会議室(我孫子市鳥の博物館前)。JR 我孫子駅よりバスで市役所前下車、徒歩5分。

参加費 : 鳥害研究会員は無料、一般は500円

講演

1. 黒田長久氏 : カラス研究の現状と課題
2. 福田道雄氏 : 都市緑地に住むハシブトガラスの繁殖生態
3. 藤巻裕蔵氏 : 北海道のカラスの生態
4. 佐藤文男氏 : マルチトラップ法によるカラスの捕獲
5. 北島伸秋氏 : 我孫子市高野山のカラス塙

情報交換「ネットワーク」(自由発表の時間)

B. 弘前シンポジウム「カラス——人とは一緒に住めない?」

日 時 : 9月25日(金)16:00~18:00(応用動物昆虫学会大会前日)

場 所 : 青森県弘前市 弘前大学農学部

参加費 : 鳥害研究会員は無料、一般は500円

講演者 : 日高敏隆、唐沢孝一、中村和雄、城田安幸の各氏  
連絡先 : 鳥害研究会(〒305 つくば市観音台 3-1-1

農業研究センター鳥害研究室内)

TEL 0298-38-8825, FAX 0298-38-8837

### ○国際ワークショップ(科学技術庁重点国際支流)「東アジアにおけるイネミズゾウムシ及び移動性害虫の蔓延と制御対策」開催のご案内

共 催 : 農林水産省農業研究センター、東北農業試験場、韓国農業技術研究所

日 時 : 平成4年9月20日~24日

場 所 : 大韓民国京畿道水原市西屯洞、農村振興廳農業技術研究所熱帯農業会議室

会議日程 : 20日 : 登録, 21~23日午前 : 講演, 23日午後 : 現地研究会, 24日 : 解散

講演プログラム :

日本, 韓国, 中国, 台湾, アメリカにおけるイネミズゾウムシと水稻害虫のカントリーレポート

イネミズゾウムシの越冬と分散, 発生予察法, 被害解析, 化学的防除法, 生物的防除法, 移動性昆虫の発生と気象

日本人講演者9名, 外国人講演者11名

参加費 : 1万円, 予稿集, 懇親会費を含む

連絡先 : 参加希望は, 農業研究センター病害虫防除部水田害虫研究室(平井一男氏)に, 氏名, 所属, 懇親会参加有無を書面で連絡

申込締切 : 8月20日

# モノクローナル抗体を用いたカンキツタターリーフウイルスの ELISA 法による検出方法

農林水産省横浜植物防疫所 かわい あきら つかもと たかのり  
川合 昭・塚本 貴敬

## はじめに

海外からの果樹苗木、穂木の輸入に当たっては、植物防疫法により隔離検疫が行われている。果樹類の隔離検疫は植物防疫所の隔離圃場で行われており、輸入された果樹苗木、穂木は一定期間そこで栽培され、その間にウイルス病等の検定が行われる。

果樹苗木の輸入動向は、遺伝資源として公的機関などにより導入される計画的な輸入は別として、多分に国内の果樹苗木の需要動向に左右される。かつては、リンゴのわい性台木を多く海外に依存した時代があり、隔離圃場が、導入されたリンゴわい性台木でにぎわった。また、昭和50年代初頭の、イチゴ、ブルーベリー、スグリなどのスモールフルーツの流行、その後のワインブームによるワイン用ブドウ品種の大量輸入等、その時代の要請により隔離圃場を埋める主要果樹の種類は変動した。

果樹にはそれぞれ特定の注目すべきウイルス病が知られており、一定の隔離検疫期間内にはそれらを確実に検定しなければならないが、隔離圃場の収容能力、検定可能数量には必ずと限りがある。そこで、果樹の輸入に当たっては事前に計画を連絡していただき、隔離検疫後直接販売（消費）されるような苗の大量輸入については極力差し控え、必要最少量の健全な増殖源を輸入していただくよう輸入者の方々にご協力をお願いしているが、果樹輸入についての検疫需要を満たすためには、より短時間に大量の果樹を経済的かつ的確に検定する方法の採用が要求される。このことから、果樹ウイルスの簡易・迅速検定法の開発は、常に植物防疫所の課題となっている。

今回、カンキツタターリーフウイルス（CTLV）の酵素結合抗体法（ELISA 法）による検定について検討したのでその概要を紹介する。

本試験を行うに当たり、徳島県果樹試験場 辻雅人氏、USDA・ARS S. M. GARNSEY 博士、農林水産省果樹試験場 柳瀬春夫博士からは貴重なウイルス株を分譲していただいた。また、農林水産省農業生物資源研究所 野津祐三博士からはモノクローナル抗体作製のご指導を賜っ

た。さらに、南九州大学 宮川経邦教授、元横浜植物防疫所病菌課長 西尾健博士からは常に有益な助言をいただいた。ここに謝意を表する。

## I カンキツ品種の輸入動向とカンキツタターリーフウイルスの検出

果樹苗木の輸入動向が国内の需要と深い関係にあることは上述のとおりであり、カンキツ品種の輸入についても例外ではなかった。昭和30～60年のカンキツ苗木・穂木の輸入数量（横浜植物防疫所，1987）を見ると、昭和35年ごろから輸入が目立ち始め、昭和47～53年にそのピークがあった（図-1）。なお、当記録は隔離検疫期間終了時に集計されているため、実際の輸入年度とは多少のずれがある。昭和49年頃からはそれまで見られなかった中国産カンキツ苗が輸入されるようになった。その頃、宮川（1975）は、国内のカラタチ台カンキツに発生する接木部異常症の原因がCTLVではないかとして、中国からわが国に導入されたカンキツ類については、中国原産と考えられたこのウイルスの保毒調査が必要であると指摘した。そして、昭和50年には神戸植物防疫所で隔離検疫中の中国産カンキツがCTLVにより不合格となったという記録がある（神戸植物防疫所，1975）。国内の接木部異常症の原因がCTLVであると同定される（MIYAKAWA and MATSUI, 1976）一方、中国産カンキツ苗

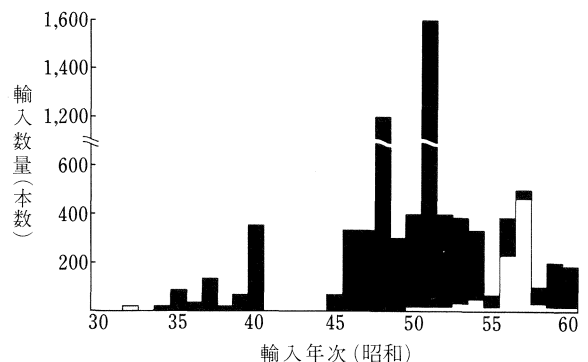


図-1 カンキツ苗木・穂木の輸入動向（全国）  
昭和50年以降の白抜き部分は中国産カンキツの輸入量を示す。

Development of ELISA for Citrus Tatter Leaf Virus Using a Monoclonal Antibody. By Akira KAWAI and Takanori TSUKAMOTO

木の輸入も増加し、それらからきわめて高率に CTLV が検出されることが判明して (西尾ら, 1982; 西尾ら, 1984), CTLV が隔離検疫, 国内の果樹母樹検疫のいずれにとってもきわめて重要なウイルスであるという認識がもたれた。

## II カンキツタターリーフウイルスの ELISA の試み

CTLV は, 接ぎ木接種 (WALLECE and DRAKE, 1962) や, 汁液接種 (SEMANCIK and WEATHERS, 1965) によって検定することができる。特に *Chenopodium quinoa* (キノア) を用いた検定 (キノア検定) は鋭敏で, *Citrus excelsa* を用いた接ぎ木検定の代行が可能であることが示されたが (西尾ら, 1982), これらの接種検定はいずれも温室において一定の環境条件のもとで行う必要があり (GARNSEY and WEATHERS, 1968), 多量の検体を迅速, 経済的に検定するのに適した方法ではない。

西尾ら (1989) は, 中国産カンキツ “大紅甜橙” から分離した CTLV (K-1 株) を用いて, 本ウイルスが capillovirus group に所属することを示し, また純化法を検討して K-1 株の家兎抗血清を得た。本抗血清を用いて, horseradish peroxidase (HRP) 結合抗体 (HRP コンジュゲート) を作製し, ELISA を試みた結果 (川合・西尾, 1990), 通常のダブルサンドイッチ法: DAS-ELISA (常法) (Clark and Adams, 1977) では非特異反応が現れ, 検出感度も十分でなかったが, 試料汁液とコンジュゲートを混合して同時にインキュベートする変法 (FLEGG and CLARK, 1979) (図-2) を用いると, 非特異反応が現れず, 検出感度も十分であることが判明した (図-3)。アルカリフォスファターゼを用いたキュウリ緑斑モザイクウイルスの ELISA でも, 変法は常法より検出感度が高いことが示されており (川合ら, 1985), 変法は簡易検定法を検討する場合, 作業行程が少ないことと併せて興味もたれる。

隔離検疫中のカンキツ, 国内産カンキツ計 68 個体について HRP を用いた CTLV の変法 ELISA (HRP-ELISA) とキノア検定とを行い, 結果を比較したところ, ELISA で陽性と判定した試料は 30 試料あり, このうちキノア検定で 27 試料が陽性, 3 試料が陰性であった。ELISA で陰性と判定した 38 試料はキノア検定でもすべて陰性であった。このことから, HRP-ELISA は実用に供し得ることが示され, 隔離検疫, 果樹母樹検疫で使用された。しかし, 温州萎縮ウイルスではアルカリフォスファターゼを用いた ELISA が実用化されて久しく, 果樹母樹検疫等でも使用されていることから, HRP-

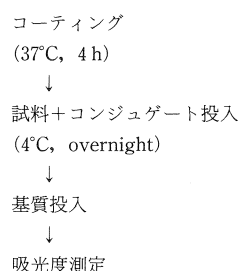


図-2 変法 ELISA の手順

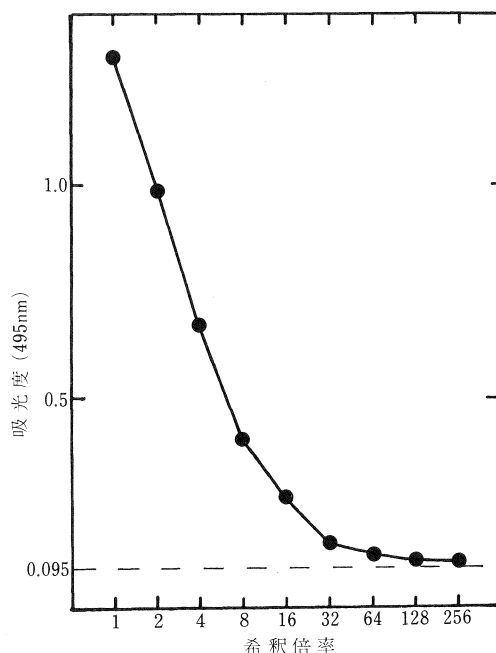


図-3 HRP 変法 ELISA の検出感度  
K-1 株罹病カンキツ葉汁液 (1:10 の PBS・T・PVP で磨砕) を同様に磨砕した健全カンキツ葉汁液で希釈。点線は健全葉汁液の示した吸光度。

ELISA を果樹母樹検疫等に追加することに対しては, 使用する側から方法や基質の統一を望む声があった。

## III カンキツタターリーフウイルスに対するモノクローナル抗体の作製

一方, CTLV は純化が比較的困難でキノア葉からの純化では収量も少なく, 抗体価の高い兎抗血清を得るのが難しい。このように, CTLV 検定試薬を長期にわたり安定供給するのが困難であるという事情もあり, モノクローナル抗体 (MCA) を作製した (川合ら, 1991)。



## 1 マウスの免疫

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ (HM) を作製するため、BALB/c マウスの腹腔内に抗原を投与してマウスを免疫した。抗原には、CTLV (K-1 株) を西尾ら (1989) の方法により純化して用いた。第 1 回目の免疫はウイルス懸濁液と同量の Freund's complete adjuvant を混合したものを投与し、第 2 回目からはウイルス懸濁液のみを短日間隔 (2~5 日間隔) で投与した。

## 2 ハイブリドーマのスクリーニング

抗体価の高くなったマウスの脾臓細胞と農業生物資源研究所から分譲を受けたマウスミエローマ PAI 株を GODING (1986) の方法に準じて細胞融合を行い、HM を作製した。

ELISA を用いた HM のスクリーニングの方法は各種報告されている (OHSHIMA and SHIKATA, 1990) が、CTLV の場合には図-4 のとおりとした。すなわち、CTLV ウサギ抗体 (PCA) をコーティングしたプレートに、CTLV 罹病キノア葉汁液をベントナイトなどで清澄化した試料を投入し、ウイルス抗原吸着プレートを作製した。当プレート 2 枚を一組として HM 培養上清を反応させ、1 枚で CTLV 抗体産生のチェックを行い、もう 1 枚では、CTLV 抗体のイソタイプが IgM であるかどうかをチェックした。そして、IgM ではない CTLV 抗体を産生する HM を選び出し、クローニングを行った。なお、抗体産生のチェックにはアビジン-ビオチン法 (Vecton 社ベクタステイン ABC キット) による間接 ELISA 法、IgM 産生のチェックには抗マウス IgM ヤギ IgG-アルカリフォスファターゼ・コンジュゲート (KIRKEGAARD and PERRY Lab. Inc.) を使用した直接 ELISA 法を用いた。

## 3 得られた CTLV モノクローナル抗体の性質

上述の行程を経て 3 株の HM が得られた。それらの産生する MCA (4B6, 9A3, 9E10) のイソタイプはすべて IgG<sub>1</sub> であった。3 株の HM はマウス腹腔に接種して腹水を採取し、腹水からプロテイン A を用いたアフィニティークロマトグラフィーで IgG を純化した。これら

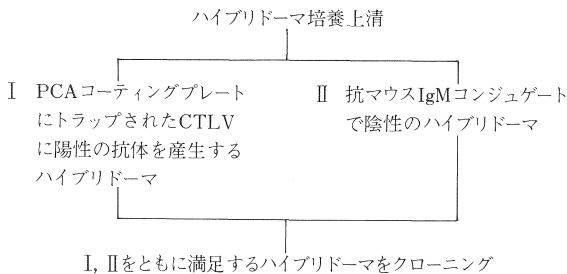


図-4 CTLV 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

の抗体価は、スクリーニングと同様の間接 ELISA で HM 培養上清が  $10^{2-4}$  倍、腹水が  $10^{5-7}$  倍であった。これら 3 種の MCA はいずれも、ゲル内二重拡散法 (OHKI and INOUE, 1987) により CTLV (K-1 株) 純化標品と反応して沈降帯を生じ、健全キノア汁液とは反応しなかった。また、3 種の MCA の各種ウイルス分離株 (CTLV 21 株：日本産はユリ分離株 1 株を含む 10 株、中国産 7 株、米国産 4 株、apple stem grooving virus (ASGV) 2 株：中国産ウメ分離株 (高橋ら, 1990) 及び日本産リンゴ分離株) のキノア罹病葉汁液を清澄化して、PCA をコーティングしたプレートにウイルスをトラップし、3 種の MCA を反応させて ABC キットによる間接 ELISA を行った。同一の試料は、同時に PCA の HRP コンジュゲートによる直接 ELISA 法を行って比較した。その結果、3 種の MCA は apple stem grooving virus 2 株を含むすべての分離株に反応した。

## IV モノクローナル抗体を用いた ELISA

3 種の MCA のアルカリフォスファターゼコンジュゲートを作製し、固相化抗体 (コーティング抗体) とコンジュゲートに同一抗体、あるいは異なる抗体を用いた DAS-ELISA を行った。

試料には CTLV の各分離株 (日本産はユリ分離株を含む 6 株、中国産 5 株、米国産 4 株) と ASGV 分離株 2 株 (中国産ウメ分離株及び日本産リンゴ分離株) を供した。

4B6, 9A3, 9E10 をコーティングした ELISA プレートに各分離株罹病キノア葉粗汁液を投入した後、3 種のコンジュゲートの反応を調べたところ、いずれの MCA をコーティングした場合にも 4B6, 9A3 のコンジュゲートは K-1 株以外では陽性反応を示さず、9E10 のコンジュゲートは K-1 株以外にも陽性反応を示した。

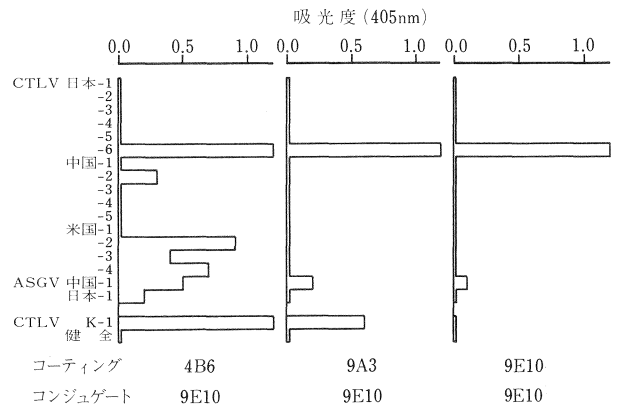


図-5 モノクローナル抗体による ELISA

図-5は3種のMCAをコーティング抗体に使用した時の各分離株に対する9E10コンジュゲートの反応である。以上のとおり、MCA3種のコーティングIgGとコンジュゲートのいかなる組み合わせでも、分離株すべてに陽性反応を示す組み合わせはなかった。

## V ELISAによるカンキツからのCTLVの検出

MCAをELISAに使用する場合、特異性が高いことが問題となるが、コーティングにポリクローナル抗体を使用して好結果を得た例が報告されている(Powell, 1990)。CTLVの場合、K-1株の兔抗血清(西尾ら, 1989)をコーティング抗体として用い、3種MCAのコンジュゲートを用いて各分離株に対する反応を調べた。試料には

表-1 コーティングにポリクローナル抗体、コンジュゲートにモノクローナル抗体を用いたELISA(吸光度)

| 供試株 <sup>a)</sup>   | コーティング：ポリクローナル抗体     |       |       |
|---------------------|----------------------|-------|-------|
|                     | コンジュゲート：4B6 9A3 9E10 |       |       |
| CTLV 日本-1           | <0.01                | <0.01 | 0.94  |
| -2                  | <0.01                | <0.01 | 1.43  |
| -3                  | <0.01                | <0.01 | 0.77  |
| -4                  | <0.01                | <0.01 | 1.26  |
| -5                  | <0.01                | <0.01 | 1.28  |
| -6                  | <0.01                | <0.01 | 1.49  |
| 中国-1                | <0.01                | <0.01 | 0.64  |
| -2                  | <0.01                | <0.01 | 0.85  |
| -3                  | <0.01                | <0.01 | 1.32  |
| -4                  | <0.01                | <0.01 | 1.19  |
| -5                  | <0.01                | <0.01 | 1.18  |
| 米国-1                | <0.01                | <0.01 | 1.29  |
| -2                  | <0.01                | <0.01 | 1.36  |
| -3                  | <0.01                | <0.01 | 1.46  |
| -4                  | <0.01                | <0.01 | 1.40  |
| ASGV 中国-1           | <0.01                | <0.01 | 1.47  |
| 日本-1                | <0.01                | <0.01 | 1.49  |
| CTLV K-1            | 1.49                 | 1.37  | 1.50  |
| 健全 <i>C. quinoa</i> | <0.01                | <0.01 | <0.01 |

a) 試料は *Chenopodium quinoa* の罹病葉

コーティング (ポリクローナル抗体 2.5  $\mu$ g/ml)

37°C, 4h, 静置

試料投入 (カンキツ葉 1g/10ml PBS-T+2%PVP)

4°C, 16h, 静置

コンジュゲート投入 (MCAコンジュゲート PBS-T 400倍希釈)

37°C, 3h, 静置

基質投入 (*p*-Nitrophenylphosphate, Disodium Salt)

60 min.

吸光度測定 (405 nm)

図-6 モノクローナル抗体を用いたELISAの手順

MCAを用いたDAS-ELISAの場合と同一のものを供した。結果は表-1のとおりで、4B6, 9A3のコンジュゲートはMCAをコーティングした時と同様にK-1株以外には陽性反応を示さなかったが、9E10はASGVを含むすべての分離株に陽性反応を示した。このことから、コーティングにポリクローナル抗体を使用し、コンジュゲートに9E10を使用するELISAが有効であると考えられた。そこで、この組み合わせによりカンキツ葉からのCTLVの検出を試みた。試料には、CTLVに罹病していることが確認されている24点(日本産カンキツ14点、中国産カンキツ10点)、CTLVフリーの日本産カンキツ5点、罹病コントロールとしてK-1株罹病カンキツ1点を供した。

本ELISAの手順は図-6に示すとおりである。本ELISAに供した試料汁液の残りは1点当たりキノア3本に汁液接種した。結果は図-7に示すとおりで、CTLV罹病試料にはすべて基質の発色が認められ、陽性と判定できた。また、健全試料には数時間後の観察でも基質の発色が認められなかった。ELISAの結果はキノア検定の結果と一致した。なお、CTLV罹病カンキツ葉汁液を段階希釈し、本ELISAの検出限界を調査した結果が図-8である。反応の強い試料、弱い試料それにK-1株の3点について調べた。

以上のとおり、コーティングにポリクローナル抗体を

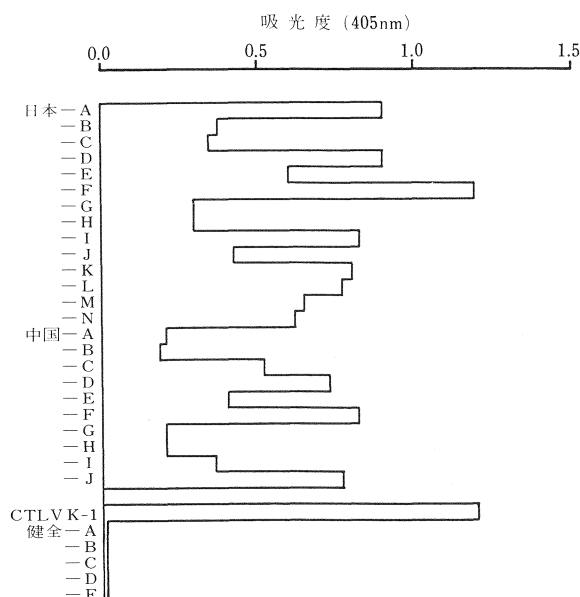


図-7 コーティングにポリクローナル抗体、コンジュゲートにモノクローナル抗体を用いたELISAによるカンキツ葉からのCTLVの検出

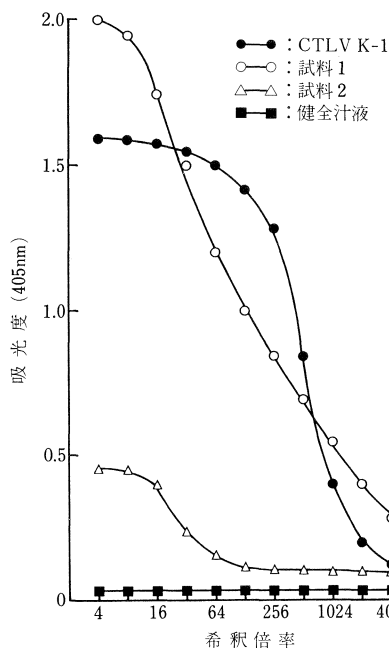


図-8 MCAを用いたELISAの検出感度

使用し、コンジュゲートに9E10を使用するELISAがカンキツのCTLV検定に供し得ることが示された。

## VI CTLV に対する ELISA の今後の課題

冒頭に記した理由から、CTLVは純化試料をELISAの試料として供するのが困難で、ELISA反応の強弱(吸光度の強弱)を試料中のウイルス濃度、抗原抗体反応の強弱と直接結び付ける実験の実施が難しい。しかし、多くのCTLV罹病カンキツをDAS-ELISAで検定した場合、ELISA反応の強弱が明りょうに現れて再現性のあること、3株のMCAの示す反応特異性にそれぞれ特徴があることから、CTLVには血清型の異なる株の存在が示唆される。

小泉ら(1992)はPCAをコーティングに使用し、MCA-9E10を2次抗体として用いた間接DAS-ELISAではほとんど反応しない株の存在することを指摘した。今後、ポリクローナル抗体とMCAコンジュゲートのELISAの系でも検出できないウイルス株が存在するのかどうか引き続き調査する必要がある。また、現在のところ、コーティングにはポリクローナル抗体を使う必要があり、試薬の安定供給についてはいまだ目的を達成した訳ではない。

## 引用文献

- 1) CLARK, M. F. and A. N. ADAMS (1977): J. gen. Virol. 34: 475~483.
- 2) FLEGG, C. L. and M. F. CLARK (1979): Ann. appl. Biol. 92: 61~65.
- 3) GARNSEY, S. M. and L. G. WEATHERS (1968): USDA Agric. Handbook No. 333. U. S. D. A. Washington. pp. 80~82.
- 4) GODING, J. W. (1986): Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, London. pp. 315.
- 5) 川合 昭ら (1985): 植防研報 21: 47~53.
- 6) ———ら (1991): 植防研報 27: 55~60.
- 7) ———・西尾 健 (1990): 日植病報 56: 342~345.
- 8) 小泉銘冊・岩波 徹 (1992): 平成3年度常緑果樹試験研究成績概要集, 病害編 pp.98~99.
- 9) 神戸植物防疫所 (1975): 神戸植物防疫情報 第686号, 昭和50年8月1日
- 10) 横浜植物防疫所 (1987): 昭和60年植物検疫統計第52号, 植物防疫資料第37号, 326 pp.
- 11) 宮川経邦 (1975): 植物防疫 29: 371~376.
- 12) MIYAKAWA, T. and C. MATSUI (1976): Proc. 7th Conf. IOCV, Riverside. pp. 125~131.
- 13) 西尾 健ら (1982): 植防研報 18: 11~18.
- 14) ———ら (1984): 植防研報 20: 69~71.
- 15) ———ら (1989): 日植病報 55: 254~258.
- 16) OHKI, S. and T. INOUE (1987): Ann. Phytopath. Soc. Japan 53: 557~561.
- 17) OHSHIMA, K. and E. SHIKATA (1990): Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 219~228.
- 18) POWELL, C. A. (1990): Plant Disease 74: 904~907.
- 19) SEMANCIK, J. S. and L. G. WEATHERS (1965): Phytopathology 55: 1354~1358.
- 20) 高橋 勤ら (1990): 植防研報 26: 15~21.
- 21) WALLECE, J. M. and R. J. DRAKE (1962): Plant Dis. Repr. 46: 211~212.

# 有用植物の病名のつけ方——新病名命名基準と命名申請制度発足について

日本植物病理学会・病名委員会 すず い たか ひと  
鈴 井 孝 仁

植物の病名は、日本有用植物病名目録<sup>1)~5)</sup>に記載されているものが正式の病名として今日では広く利用されているところである。日本植物病理学会においては、古くから用いられている病名の混乱を整理するため、昭和12年から様々な検討を行ってきた。日本有用植物病名目録は、その長い間の努力の集積である。現在、日本植物病理学会では、病名委員会を設け毎年新しく発表された病名、学名変更、文献追加などその整理・検討を行い日本有用植物病名目録追録として年1回公表しており、これまで12回に及んでいる。しかし、近年の国際化にともない種々な植物が海外から導入され、わが国で栽培されとともに、各種植物の栽培様式が多様化するにしたがって多数の新病害の発生をみている。これらの状況から新病名として発表される研究者の参考になる事項を整理するとともに、1992年4月から日本植物病理学会において新しく発足した新病名の申請制度について紹介し、研究者の参考に供したい。

## 1 新しく病名を付与する対象と方法

新たに発生した有用植物の病害に対し病名を命名しようとする場合は、以下の基準に従って新病名を付し、学会もしくはこれに準ずる専門誌に発表し提案する。

ここで対象としている有用植物とは、食用作物（禾穀作物など）、野菜、果樹、特用作物（チャ、タバコなど）、牧草・芝草、草花、樹木、竹笹類、きのこ類である。また、有用植物に被害を与える病原体としては、ウイルス、ウイロイド、マイコプラズマ様微生物、細菌、細菌様微生物、糸状菌、酵母、粘菌、線虫、一部の動物（フシダニ類など）、一部の植物生理病（尻腐病など）等がある。

学会とは、日本植物病理学会をはじめ通常認められている各種の学会をさし、これに準ずる専門誌とは各種研究会誌等を意味し、単行本、商業誌、普及誌等での記載は原則としてこれを認めない。学会、専門誌での発表とは、これらの雑誌に原著、短報として掲載されたものか、あるいは、口頭発表した講演要旨が本印刷されたものであり、口頭発表でも講演要旨集のみのものは発表・提案されたものとは認められない。

## 2 新たに病名を付与できる条件

有用植物に新しく病名を付与しようとする場合には次

図-1 新病名命名等に使用する日本植物病理学会病名委員長宛の申請書（様式1）

| 新病名命名等申請書                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 年 月 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |        |
| 日本植物病理学会<br>病名委員長 殿                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |        |
| 氏名<br>所属<br>住所<br>(電話                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Fax. ) |
| 日本有用植物における新病名命名等を提案したいので、下記のとおり申請します。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |        |
| 記                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |        |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>1. 新病名</span> <span>2. 病名変更</span> <span>3. 病原学名変更</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>4. 新病原名（種名、病原型を含む）</span> <span>5. 病原追加</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>6. 輸入検疫発見病害</span> <span>7. 海外発生病害</span> </div> <p style="text-align: center;">（該当項目にチェックして下さい）</p>                                                                                                                                                     |        |
| <div style="display: flex;"> <div style="width: 30%;">1. 植物名</div> <div style="width: 70%;">和名<br/>英名<br/>学名</div> </div> <div style="display: flex;"> <div style="width: 30%;">2. 病名</div> <div style="width: 70%;">（和名）<br/>（訓令式ローマ字）<br/>（英名）</div> </div> <div style="display: flex;"> <div style="width: 30%;">3. 病原学名</div> <div style="width: 70%;">（著者名は全員省略しない。細菌の場合は年を記入する）</div> </div> <div style="display: flex;"> <div style="width: 30%;">4. 発表文献</div> <div style="width: 70%;">著者名<br/>（3名以上の場合は、筆頭者を記し“ら”とする）<br/>雑誌名<br/>巻、号、ページ、年<br/>（発表文献のコピーを1部添付する）</div> </div> |        |

のいずれかの条件を満たしていることが必要である。

（1）日本において新たに自然発生の認められた病害であること。したがって、実験によって病原体を有用植物に接種しておきた病害は、この対象から除かれる。

（2）輸入検疫において発見された国内未発生の病害であること。

（3）海外において発生している病害で、日本に紹介する病害であること。

（4）既に病名が付されている病害であるが、病名を変更することが適切として提案する場合であること。

## 3 病名（和名）のつけ方

新しく病名（和名）を付す場合には、次の事項を考慮

して提案することが望ましい。

(1) 病名(和名)は、植物の病徴、病気の性質を的確に表す表現とする。

(2) 原則として一植物ごとに一病名、一病原とする。ただし、異なった二種以上の病原によって起こる病気で、病徴による区別が困難なもの(例: 苗立枯病)については一病名とする。

(3) 同一病原が種々の植物を侵すものは、病原に共通した病名(例: 灰色かび病)を採用する。ただし、病徴が極端に異なる場合はこの限りでない(例: リゾクトニア菌による根腐病と葉腐病)。

(4) 原則として、細菌、線虫及び動物による病気では……細菌病(例: ……萎ちょう細菌病), ……線虫病(例: ……根腐線虫病), ……(動物名)病(例: ……サビダニ病)とする。

(5) 病名は原則として常用漢字を用い、常用漢字以外は「斑」「萎」「縞」を除き、他は平仮名、外来語は片仮名を用いる。ただし、この常用漢字以外に使用できる漢字をさらに拡大すべきであるとする意見があり、現在病名委員会において検討中である。

(6) 病名の読み方は、ローマ字(訓令式)で表す(例: iô-byô, ityô-byô)。

#### 4 病名(英名)のつけ方

病名(英名)は、主として U. S. D. A.: Index of plant diseases in the United States, Agriculture Handbook 165, 1960, D. F. Farr et al. eds.: Fungi on plants and plant products in the United States, APS Press, 1989, E. B. Martyn (ed.): Plant virus names, 1986 及び CMI/AAB Descriptions of plant viruses, 1970-1988 を参考にして提案する。

なお、英名と和名は必ずしも一致させなくてもよい。

#### 5 その他、病名、学名に関する病名委員会の合意事項

これまで開催されてきた病名委員会の中で、病名の付与、学名の採用ならびに発表論文の取扱いについて審議を経て合意を得ている事項の中、上記以外のものを記すと以下のとおりである。

##### 1) 多犯性病原菌の学名表示

①通常不完全世代でときに完全世代の観察される病原菌は、完全世代の確認された宿主でのみ完全世代の学名を用いる(例: くもの巢病・葉腐病: *Thanatephorus cucumeris* と *Rhizoctonia solani*, 環紋葉枯病: *Grovesinia pyramidalis* と *Cristulariella moricola*, 灰色かび病: *Botryotinia fuckeliana* と *Botrytis cinerea*)。

②完全・不完全世代とも孢子形成がまれな病原菌は、

完全世代の学名を用いる(白紋羽病: *Rosellinia necatrix*, 紫紋羽病: *Helicobasidium mompa*, ならたけ病: *Armillariella mellea*)。

2) 一病原一病名の原則に反する(1病名2病原など)ものの取扱い

病名(和名)のつけ方の原則に反する病名を付けようとする場合は、研究者が学会等で発表・提案した後、病名委員会での病名の適否を判断する。病名委員会は、それ相当の理由がある場合にこれを認めることとしている。これによって承認されている病名は次のとおりである。

①イネ褐色小粒菌核病と赤色菌核病(*Waitea circinata*)。それぞれ独立病名として残し、どちらかの備考欄に培養型を記して区別する。すなわち、病徴の明確な差異、病原微生物的特徴的な差異(毒素生産性、培養型、交配型等)、実用上の重要性を考慮して特例的扱いとした。

②イネ褐色紋枯病と紋枯病(*Thanatephorus cucumeris*)。実用上の重要性を考慮して特例的扱いとし、それぞれ独立病名として残す。

③タバコ野火病と角斑病(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)。それぞれ別病名とし、角斑病の備考に「野火病病原細菌とは毒素を産生せず、病徴が明確に異なる」と記載する。

④イネ株枯病と馬鹿苗病(*Gibberella fujikuroi*)。前者はリクトウの、後者はスイトウの病気で別病名として残す。株枯病の備考欄に「病菌は馬鹿苗病菌と同一だがリクトウに発生し症状が異なる」と記載する。

⑤ダイズ葉腐病とリゾクトニア根腐病(*Thanatephorus cucumeris* と *Rhizoctonia solani*)。他作物の苗立枯病と葉腐病(くもの巢病)と同様、別病名として残す。

⑥サツマイモ帯状粗皮病とサツマイモ斑紋病。前者の病原は Sweet potato feathery virus の severe strain で、後者の病原は同ウイルスの ordinary strain である。これらは病原系統を異にするが病徴等の違いが著しいことから認められた。この場合、備考欄に系統名を記載する。

##### 3) 新種、新生理型、新病原型の扱い

病原が新種、新 f. sp., 新 pv. の発表は講演要旨の段階では採録についての検討は行わず、本論文となった後採録について審査する。ただし、病原の属名が既報告のものであれば属レベルで採録について審査する(例: 病原を *Erwinia panacea* sp. nov. として講演発表し病名を付した場合、病原は *Erwinia* sp. としてその病名の採録を検討する)。

## 4) その他

①植物病原細菌の学名において、2名以上のオーサーがいる場合には and を用いるとともに年をつける。

②植物病原糸状菌の学名において、2名以上のオーサーがいる場合には et を用いる。

③新病名の発表に際して仮称を用いている場合があるが、仮称の用い方は提案者によって異なっていることから、病名委員会で内容を検討しその採否を決定する。

④講演要旨には、新病名付与に関して、病原の種名を明確に同定せずに何々に近い、または酷似するとする場合が認められる。この場合、病名委員会では発表内容を検討し、確実なもののみについて病名の採用を決め、病原は sp.に留める（例：*Phytophthora nicotianae* に近いとした発表には *Phytophthora* sp.とする）。

## 6 新病名等の申請制度の発足

新病名等の発表される情報を正確にかつ速やかに整理することは重要なこととなっています。しかし、新病名等の発表は多方面にわたる学会誌等に発表・提案される傾向にあり、限られた日本植物病理学会の病名委員の多大の労力にかかわらず新病名等の調査を把握することが不可能な状況になりつつあります。このような情勢から日本植物病理学会では、評議委員会（平成3年11月26日）の審議を経て新病名を提案される場合は、学会等に発表後日本植物病理学会病名委員会に新病名等を申請する制度を平成4年4月1日から発足することにしました。日本植物病理学会に所属する会員諸氏には、この事情を了解していただき本制度にご協力をお願いする次第です。また、これ以外の学会に対しても日本植物病理学会の趣旨にご理解をえて、ご協力を依頼する所存であります。

様式(図-1)によって申請するものは、下記のいずれかに該当し、学会もしくはこれに準ずる専門誌に発表・提案された場合です。

- ①新病名
- ②病名の変更
- ③病原の学名変更
- ④病原の新たな属名、種名、病原型
- ⑤新たな新病原の追加
- ⑥輸入検疫において発見された新病害
- ⑦海外において発生、日本に未発生病害を紹介した場合

## 7 病名の決定

学会誌等に掲載された新病名は、これが公認された病名という訳ではなく、日本植物病理学会では研究者が病名を提案したものと解釈する。日本植物病理学会病名委

員会では、提案された病名について検討し、妥当と認められた病名を日本有用植物病名目録に登載するか、あるいは、その追録に掲載する。これをもって提案病名は日本植物病理学会として承認したものとします。

## おわりに

21世紀を間近に迎え各種の情報量は飛躍的に増加し、これを管理するコンピュータ化の進歩も著しく、各種のデータベースが構築されている。かかる状況からも、多方面で公表された病名に関する情報もできるだけ速やかにかつ正確に集約するためには、提案者である各人から情報を提供していただくことがなによりである。これはひとえに提案者である各研究者の協力なくして成り立たないことは言うまでもない。このためには多くの研究者の協力を得て、是非本制度を定着させたいと願っている次第である。さらに、新しい植物に新病名を付された場合、これに関する情報はもとより、後から研究される方々に利用できるように病原微生物もぜひ指定の微生物株保存機関に寄託しておくことを考慮していただきたい。保存機関への寄託に関しては、各機関ごとの約束があるのでそれぞれに問い合わせいただきたいが、各機関とも微生物株に関するデータシートへの記入は必要である。

ここに記した病名命名基準は、現在、利用されている有用植物病名目録(第1~5巻)に記載されている病名あるいは引用文献として記載されている記事とは必ずしも合致しないものがあるが、徐々にこの基準に沿って改善を図って行きたいと考えている。

なお、ここに記した新病名命名等の基準は、昭和12年4月12日の日本植物病理学会評議委員会の記録、日植病報 34:307, 1967, 54:253, 1988の記事ならびにこれらをもとに作成し病名調査委員会の審議を経て発表した記事(日植病報 58:167, 1992)に解説を加えたものである。

## 引用文献

- 1) 日本植物病理学会 日本有用植物病名目録 第1巻第3版 pp.492, 東京, 1990.
- 2) 日本植物病理学会 日本有用植物病名目録 第2巻第2版 pp.518, 東京, 1980.
- 3) 日本植物病理学会 日本有用植物病名目録 第3巻第2版 pp.190, 東京, 1984.
- 4) 日本植物病理学会 日本有用植物病名目録 第4巻第2版 pp.232, 東京, 1983.
- 5) 日本植物病理学会 日本有用植物病名目録 第5巻第2版 pp.504, 東京, 1984.
- 6) 日植病報 (1967): 34: 307~308.
- 7) 日植病報 (1988): 54: 253~254.
- 8) 日植病報 (1992): 58: 166~168.

## 研究放談室(12)

## 研究の評価

小野小三郎

世の中に、人間の行為に対する評価ほど難しいものはない。その理由の第一は、人間あるいは人間の業績を数量的に表現することが困難だからである。したがって、第二に、人によって評価がまちまちになる。よく“人は棺をおおうて定まる”などと言われるように生前は、人間の評価ができないこともある。ときには誰々は2度死んだ、などと死後に再び酷評をされる人さえいる。

良い事をしたときの評価は、ノーベル賞、文化勲章、褒章、学会賞など、またいろいろの団体や会社などの各種賞から小学生の皆勤賞まで、それぞれ賞の制度のあることからしても、評価の有意義なことが分る。一方マイナスの評価の場合にも公的には、地方裁判所、高等裁判所、最高裁判所があり、この面の大切なことが分る。裁判所が三段階になっているということは、評価が難しく、仮にも間違っただけとはいけないという、要心深さから来ているものであろう。

評価というと、他人が自分を評価するのが、普通のように、これが大体世の中をまかり通っているが、自分を、自己の業績を採点する、自己評価ということも捨て難い。万人の評に打ち勝って、自己評価を押し通して、大を成した快談も少なくない。が、度がすぎるとウヌボレになるから、要注意。

企業などでは、たいてい人事考課というものが行われる。従業員の職務行動を通して、各人の職務遂行度や業績、能力を分析評価し、これを人事管理に反映させる、というのがネライのようである。これが昇格、昇給、ボーナスなどの基準になるのであるから、恐ろしい存在である。ここで重要な役割をする業績と能力であるが、業績は一応外部に現われたものであるから、まあいいとして、能力というのは一段とつかみにくい。“あの子は頭が良いから、数学ができる”などというが、“あの子は数学ができる(業績)から、頭が良い(能力)と推察する”というのが、ほんとうではなからうか。能力というのは、その人の行動、業績から推理するものである。実際、会社に入ってから、実力を発揮出来るような業務につく機

会がなく、長く能力を認めてもらえない人などもある。

能力は、それ自体はボールに包まれていて、直接見ることもできないし、計量もできない。能力が発揮できる機会に会わずに、他人も本人も知らずにいる能力は、潜在能力といわれるが、この潜在のままで消えてしまう能力は、世の中にどれほど沢山あるのかと思うと、もったいないように思われてならない。つとめて、自分自身の潜在能力に陽の目を見させるよう冒険を試みる必要があるであろう。能力は可能性ということで、多分に未来的である。将来、あいつは何かやりそうだと、思わせるのが能力である。これに対し、業績は、何らかの形で有形化している。研究関係なら、発明品(作物の品種、農機具など)としてか、論文などになって現われている。業績は何とか人に見えるから、一応の評価もできるはずである。しかし、その評価が今されるか、何年かあとにされるかという点で、かなり異なったものにもなる。線香花火のように今は良いが、あとは消えるものや、ジワジワと年とともに評価の昇るものもある。業績の評価の方法に、他の論文に何回引用されたか、ということがあがるが、これも一つの指標になるものと思われる。

世間一般に広く、評価という行為が行われているが、比較的単純なものでは、問題に対する答えの定まっている場合がある。入学試験の場合などは大半これに当たる。正しい答えは、下の四つのうちどれか、といった具合に問題が出る場合は、もちろん答えがあらかじめ用意されている。実社会でこれに似た評価としては、営業の売上目標を定めておき、その達成度で判定する場合、工場生産の量的目標と実績との関係で評価する場合などがこれに当たる。

次は数量的に計測出来る場合である。例えばスポーツの重量挙げ、棒高飛びなど。ところが同じスポーツでも、そう簡単に数量化できないものがある。この場合には二者間または多者間で勝負を決める。相撲、柔道、テニス、野球、ラグビー、マラソンなどがこれに当たるが、ただ判定勝ち、などという少し難しい要素が入ることもある。これが、鉄棒、つり輪、鞍馬などの体操になると、いろいろの規定によって採点するのであろうが、判断作用が入ってくる。とくにフィギュアスケートや新体操などになると、評価の要素に美しさとか感じがよい、などの要素が入ってくるので、一筋縄ではいけなくなる。さらに小説、絵、陶器、彫刻、演劇、音楽などの芸術品になると、どこに評価の規準があるのかわからない。専門家が良いと言うと、そうかと信ずるよりほかない。

さて、問題の研究分野もまた、評価の規準はあるような無いような、あるとしても、ごく一部のみにしか評価

能力がないのが普通である。ある発見は、一部の専門仲間には認められても、一般には音も聞こえないが、あるとき、その発見が利用されて、人気商品ができ上がったとなると、急に、そのもとの研究が高く評価されることになる。研究業績の評価には、一部の人達しか評価眼がないため、師、上司、あるいは専門学会の有識者などに限られることになる。発明品の場合には、特許に関する公的組織が厳密に審査に当たる。

医学研究の世界では“病気の研究には、まず病気を作ること”というのが重視されているらしい。医学では、やたらに人間を実験に用いることができないので、ラットやウサギなどの代用動物を用いるが、これに人間と同じ病気にさせることができないと、急速な進歩は望めない。農学の場合、代用植物を必ずしも要しないが、自然に発生する病害を、人工的に、容易に、いつでも、大量に発生させられないと研究は進まない。害虫の人工飼育などもこの意味で重要である。このほか、小さいものを拡大して観察する方法（光顕、電顕などを使用するための各種の方法）、微生物の分離増殖の方法、植物体成分の分析法、実験に伴う統計法など、研究のあらゆる工程に新しい方法が考えられ、改良され、広く活用されている。機械化学分析、高速度撮影法、各種のバイオ技術など、すべて、どこかの科学研究の分野に生れたものが、広い分野に活動しているものである。研究には方法が、いかに大切であるかがよくわかる。昔から新しい方法は新しい真理を生むとさえ言われ、一つの新しい有用な方法が考案されると、科学は急速に進んでおり、その例はいくらでもある。

新しい生物の発見、新しい法則、理論が発見されたとすると、これらはいろいろの面で利用されることになる。ある害虫の天敵として、ある種のハチが発見されると、他の害虫でも天敵探索熱が高まったり、天敵現象を生物学的に、また生化学的に、より深く研究するようになるかもしれない。またある研究者はその天敵を実際の果樹園で利用出来ないかと研究を進める。その結果、天敵利用の害虫防除ができれば、実用的研究として、農家の需要に応ずることができるようになる。つまり、一つの理論の発見は、学術的な面で活用される面もあるが、実用面にも利用されるように、成長することも珍しくない。実用場面になると、農業の実際に役立つわけであるから、比較的容易に評価することができるようになる。

以上のことから、新しい方法を考案することも立派な

貢献であるし、新しい理論を考えることも大きな貢献であることが分る。また実用的に利用される技術を作り上げることも、農家に直接感謝されるものとなる。イネばか苗病菌の出す物質が、イネ苗を徒長させる、という現象を見つけたのは黒沢英一（1926）であったが、その後、藪田貞次郎、住木諭介らによって、その物質が、ジベレリンであることが知られた（1938）。このジベレリンは植物生化学的に、面白い活性をもつことは、多くの研究者によって証明された。一方、この生理活性をうまく利用し、すなわち、満開予定約14日前と、満開後約10日目の2回、一定濃度のジベレリンを、デラウエアなどのブドウに処理することによって、種子なしブドウを作出することに成功した、岸光夫らの功績（1960頃）も実に大きい。ジベレリンの研究は、作用に気がつき、生化学的に研究し、ついに実用的な面にまで進んだ、興味ある研究の連鎖といわねばならない。何れの段階でも高く評価されているのは当然である。

へんな例を引きあいに出すが、ある年ある歌謡曲がレコードになり売り出された。日本の一部ではいくらか売れたが、あまり反響がなかった。ところが、それから10年ばかり後に、その曲が別の歌手に歌われ、レコードになって売り出されたのが、とんでもない大流行で、老いも若きも歌い出し日本中のテレビやラジオで鳴り出した。前に歌った歌手だって、一流の人だったのだが、後の機会には、いろいろの条件が流行に適していたのだろう。同じ作家の推理小説が、ある時期に突然ベストセラーになったりすることもある。イナ作が重視されないときは、イネの研究の評価が下がる、などのように時流に乗らないものは実力を認められないこともある。

真に新しい研究は旧来の学説に対して、多分に反逆的であるので、理解されず、良い評価を得られないのが普通である。ある程度の人達が理解し、世の中に通用し、一つのパラダイムを形成し始めると、やっと高い評価を得るようになるが、それまでには何年かを待つことになる。

このほか、同じような問題を複数の人達が研究している場合、同じような傾向を示しても功を分けることになるし、違った傾向を示したときの競合作用も問題である。研究にあつては、酷評に会ってもめげずに、真価の認められる日を気長に待つ、寛容と忍耐も大事なことも知れない。



(31 ページより続く)

類・ハダニ類・シンクイムシ類・カメムシ類・ダイズ  
サヤタマバエ：21 日 3 回，麦類：アワノメイガ・ムギ  
アカタマバエ：30 日 2 回

#### 『殺菌剤』

##### ブラストサイジン S 乳剤

ブラストサイジン S 2.0%

ブラストサイジン S 乳剤 1 (4.6.8)

18137 (アグロス)

稲：いもち病：21 日 5 回

#### 『殺虫殺菌剤』

##### エトフェンプロックス・ピリダフェンチオン・トリシク ラゾール粉剤

エトフェンプロックス 0.50%，ピリダフェンチオン  
2.0%，トリシクラゾール 0.50%

ビームオフトレボン粉剤 5 DL (4.6.8)

18135 (クミアイ化学工業)

稲：いもち病・ニカメイチュウ・イネツトムシ・ツマグ  
ロヨコバイ・ウンカ類：収穫 45 日前まで (但し，出穂  
前まで)：2 回以内

エトフェンプロックス・MPP・フサライド・EDDP 粉剤  
エトフェンプロックス 0.50%，MPP 2.0%，フサライド  
1.5%，EDDP 2.0%

ヒノラブایتトレボン粉剤 35 DL (4.6.26)

18147 (日本バイエルアグロケム)，18148 (八洲化学工業)，  
18149 (三笠化学工業)，18150 (北興化学工業)

稲：いもち病・ニカメイチュウ・ツマグロヨコバイ・ウ  
ンカ類・カメムシ類・コブノメイガ・アザミウマ類・  
イネツトムシ・フタオビコヤガ：21 日 3 回

##### エトフェンプロックス・フサライド・ペンシクロン・ EDDP 粉剤

エトフェンプロックス 0.50%，フサライド 1.5%，ペン  
シクロン 1.5%，EDDP 2.0%

ヒノラブモントレボン粉剤 35 DL (4.6.26)

18151 (日本バイエルアグロケム)，18152 (呉羽化学工業)，  
18153 (八洲化学工業)，18154 (三笠化学工業)，18155 (大  
日本除虫菊)，18156 (北海三共)

稲：いもち病・紋枯病・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・  
アザミウマ類・カメムシ類：21 日 3 回

##### エトフェンプロックス・ピリダフェンチオン・フサライ ド・EDDP 粉剤

エトフェンプロックス 0.50%，ピリダフェンチオン  
2.0%，フサライド 1.5%，EDDP 2.0%

ヒノラブオフトレボン粉剤 35 DL (4.6.26)

18157 (日本バイエルアグロケム)，18158 (呉羽化学工業)，  
18159 (八洲化学工業)，18160 (三笠化学工業)，18161 (大  
日本除虫菊)，18162 (北海三共)

稲：いもち病・ニカメイチュウ・ツマグロヨコバイ・ウ  
ンカ類・コブノメイガ・アザミウマ類・イネツトムシ・  
カメムシ類・フタオビコヤガ：収穫 45 日前まで (但し，  
出穂前まで)：2 回以内

エトフェンプロックス・フェリムゾン・フサライド粉剤  
エトフェンプロックス 0.50%，フェリムゾン 2.0%，フ  
サライド 1.5%

ブラシントレボン粉剤 DL (4.6.26)

18170 (武田薬品工業)，18171 (北興化学工業)，18172 (サ  
ンケイ化学)

稲：いもち病・ごま葉枯病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・ツ  
マグロヨコバイ・ウンカ類・カメムシ類：21 日 2 回  
エトフェンプロックス・トリシクラゾール・フェリムゾ  
ン粉剤

エトフェンプロックス 0.50%，トリシクラゾール  
0.50%，フェリムゾン 2.0%

ノンブラストレボン粉剤 DL (4.6.26)

18173 (武田薬品工業)

稲：いもち病・ごま葉枯病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・ツ  
マグロヨコバイ・ウンカ類・カメムシ類：21 日 2 回

##### エトフェンプロックス・バリダマイシン・フェリムゾン・ フサライド粉剤

エトフェンプロックス 0.50%，バリダマイシン 0.30%，  
フェリムゾン 2.0%，フサライド 1.5%

ブラシントレバリダ粉剤 DL (4.6.26)

18174 (武田薬品工業)，18175 (北興化学工業)，18176 (サ  
ンケイ化学)

稲：いもち病・紋枯病・ごま葉枯病・穂枯れ (ごま葉枯  
病菌)・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・カメムシ類：21  
日 2 回

##### エトフェンプロックス・トリシクラゾール・バリダマイ シン・フェリムゾン粉剤

エトフェンプロックス 0.50%，トリシクラゾール  
0.50%，バリダマイシン 0.30%，フェリムゾン 2.0%

ノンブラストレバリダ粉剤 DL (4.6.26)

18177 (武田薬品工業)

稲：いもち病・紋枯病・ごま葉枯病・穂枯れ (ごま葉枯  
病菌)・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・カメムシ類：21  
日 2 回

#### 『除草剤』

##### ブレチラクロール乳剤

ブレチラクロール 12.0%

エリジャン乳剤 (4.6.26)

18163 (日本チバガイギー)，18164 (クミアイ化学工業)，  
18165 (武田薬品工業)

移植水稻：水田一年生雑草・マツバイ・ホタルイ・ヘラ  
オモダカ：植代時～移植 4 日前まで：2 回以内 (本剤  
は 1 回)：壤土～埴土 (減水深 2 cm/日以下)：原液湛  
水散布：九州を除く全域

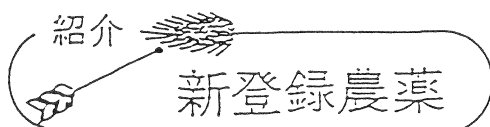
##### ダイムロン・ベンスルフロンメチル・メフェナセット粒 剤

ダイムロン 1.5%，ベンスルフロンメチル 0.17%，メフ  
ェナセット 3.5%

ザーク粒剤 17 (4.6.26)

18169 (日本バイエルアグロケム)

移植水稻：水田一年生雑草・マツバイ・ホタルイ・ウリ  
カワ・ヘラオモダカ・ヒルムシロ・ミズガヤツリ・オ  
モダカ・クログワイ・セリ・アオミドロ・藻類による  
表層剥離：移植後 5～15 日 (ノビエ 2.5 葉期まで)：1  
回：砂壤土～埴土 (減水深 2 cm/日以下)：湛水散布：  
北陸・関東・東山・東海の普通期及び早期栽培地帯，  
移植水稻：水田一年生雑草・マツバイ・ホタルイ・ウ  
リカワ・ヘラオモダカ・ヒルムシロ・ミズガヤツリ・  
オモダカ・クログワイ・セリ・アオミドロ・藻類によ  
る表層剥離：移植後 5～15 日 (ノビエ 3 葉期まで)：1  
回：砂壤土～埴土 (減水深 2 cm/日以下)：湛水散布：  
近畿以西の普通期及び早期栽培地帯



## 「殺菌剤」

## フェリムゾン・フサライド粉剤 (3.11.1 登録)

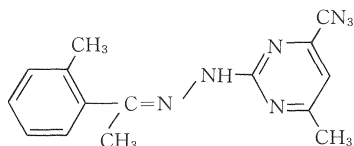
フェリムゾンは武田薬品工業(株)が開発したピリミジン骨格を有する殺菌剤である。作用機構は、植物病原菌の膜機能あるいは脂質生合成系に作用し、菌の活動を抑制すると考えられている。

商品名：プラシン粉剤 DL

成分・性状：製剤は(Z)-2'-メチルアセトフェノン=4,6-ジメチルピリミジン-2-イルヒドラゾン 2.0%, フェリムゾンの純品は無色プリズム状晶で、比重 1.185, 融点 175~176°C, 蒸気圧  $3.09 \times 10^{-8}$  mmHg (20°C), 溶解度：水 0.162 (g/l, 20°C), テトラヒドロフラン, クロロホルム, エタノール, メタノール, プロパノール, 酢酸エチル, アセトニトリル, キシレンに易溶である。

適用作物・使用目的及び使用方法：表-3 参照。

(構造式) フェリムゾン



## 使用上の注意事項：

①本剤は飛散を少なくするように製剤されており、一般の粉剤に比べ、見かけ比重がやや大きく流動性が良いので、散布の際は散布機の開度を一目盛程度しぼって散布すること。

②本剤の使用に当たっては、使用量、使用時期、使用方法を誤らないように注意し、特に初めて使用する場合は、病害虫防除所等関係機関の指導を受けることが望ましい。

## 毒性：(急性毒性) 普通物

①誤食などのないよう注意すること。誤って飲み込んだ場合には吐き出させ、直ちに医師の手当を受けさせること。本剤使用中に身体に異常を感じた場合には直ちに医師の手当を受けること。

②本剤は目に対して弱い刺激性があるので目に入らないように注意すること。眼に入った場合には直ちに水洗すること。

③散布の際は防護マスク、手袋、長ズボン・長袖の作業衣などを着用すること。また、粉末を吸い込んだり浴

表-3 フェリムゾン・フサライド粉剤 (プラシン粉剤 DL)

| 作物名 | 適用病害名                            | 10アール当り使用量 (kg) | 使用時期     | 本剤のみを使用する場合の使用回数 | 使用方法 | フェリムゾンを含む農業の総使用回数 | フサライドを含む農業の総使用回数 |
|-----|----------------------------------|-----------------|----------|------------------|------|-------------------|------------------|
| 稲   | いもち病<br>ごま葉枯病<br>穂枯れ<br>(ごま葉枯病菌) | 3~4             | 収穫21日前まで | 2回以内             | 散布   | 2回以内              | 穂ばらみ期以降は4回以内     |

表-4 バリダマイシン・フェリムゾン・フサライド粉剤 (プラシンバリダ粉剤 DL)

| 作物名 | 適用病害名                                   | 10アール当り使用量 (kg) | 使用時期     | 本剤のみを使用する場合の使用回数 | バリダマイシンを含む農業の総使用回数 | フェリムゾンを含む農業の総使用回数 | フサライドを含む農業の総使用回数     |
|-----|-----------------------------------------|-----------------|----------|------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| 稲   | いもち病<br>紋枯病<br>ごま葉枯病<br>穂枯れ<br>(ごま葉枯病菌) | 3~4             | 収穫21日前まで | 2回以内             | 散布                 | —                 | 2回以内<br>穂ばらみ期以降は4回以内 |

表-5 トリシクラゾール・バリダマイシン・フェリムゾン粉剤 (ノンプラス粉剤 DL)

| 作物名 | 適用病害名                            | 10アール当り使用量 (kg) | 使用時期     | 本剤のみを使用する場合の使用回数 | トリシクラゾールを含む農業の総使用回数 | バリダマイシンを含む農業の総使用回数 | フェリムゾンを含む農業の総使用回数 |
|-----|----------------------------------|-----------------|----------|------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| 稲   | いもち病<br>ごま葉枯病<br>穂枯れ<br>(ごま葉枯病菌) | 3~4             | 収穫21日前まで | 2回以内             | 散布                  | 4回以内<br>但し、本田期3回以内 | 2回以内              |

表-6 トリシクラゾール・バリダマイシン・フェリムゾン粉剤 (ノンプラスバリダ粉剤 DL)

| 作物名 | 適用病害名                                   | 10アール当り使用量 (kg) | 使用時期     | 本剤のみを使用する場合の使用回数 | トリシクラゾールを含む農業の総使用回数 | バリダマイシンを含む農業の総使用回数 | フェリムゾンを含む農業の総使用回数 |
|-----|-----------------------------------------|-----------------|----------|------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| 稲   | いもち病<br>紋枯病<br>ごま葉枯病<br>穂枯れ<br>(ごま葉枯病菌) | 3~4             | 収穫21日前まで | 2回以内             | 散布<br>ただし、本田期3回以内   | —                  | 2回以内              |

びたりしないよう注意し、作業後は直ちに手足、顔などを石けんでよく洗い、うがいをするとともに衣服を交換すること。

④作業時に着用していた衣服等は他のものとは分けて洗濯すること。

⑤かぶれやすい体質の人は取扱いに注意すること。

(魚毒性) A 類

なお、本剤の他、バリダマイシン・フェリムゾン・フサライド粉剤(ブラシンバリダ粉剤 DL)、トリシクラゾール・バリダマイシン・フェリムゾン粉剤(ノンプラスト粉剤 DL)、トリシクラゾール・バリダマイシン・フェリムゾン粉剤(ノンプラスバリダ粉剤 DL)が同時に登録された。

### 「展着剤」

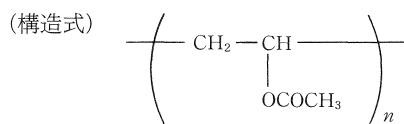
**ポリ酢酸ビニル** (3.9.26 登録)

本剤は北海三共(株)が登録を有する展着剤であり、有機銅水和剤に添加してペントグラスに散布するものである。

**商品名:** ラビコート

**成分・性状:** 製剤はポリ酢酸ビニル 23.0%を含む淡緑色不透明粘性液体である。純品は無色透明液体で、比重

0.934, 沸点 73°C, 融点 -100°C, 液解度: 水 25 g/l (20°C), 熱・触媒・光により重合固化する。



$n \approx 2000$

**適用作物・使用目的及び使用方法:** 表-1 参照。

**使用上の注意事項:**

所定量の本剤を、直接散布液に加え十分かき混ぜてから散布すること。あるいは、本剤を加えた水で散布液を調製しても差し支えない。

**毒性:** (急性毒性) 普通物

通常の使用法ではその該当がない。

(魚毒性) A 類

表-1 ポリ酢酸ビニル (ラビコート)

| 適用農薬名  | 適用作物名    | 散布液 10 l 当り使用量 (希釈倍数)    | 使用方法 |
|--------|----------|--------------------------|------|
| 有機銅水和剤 | 芝 ペントグラス | 50~100 ml<br>(100~200 倍) | 添加   |

## 協 会 だ よ り

### ○お知らせ

在庫切れのため、長らく TuMV(カブモザイクウイルス)及び WMV(カボチャモザイクウイルス)の抗血清の配布を中止しておりましたが、このたび補充作製が完了いたしました。8月1日より、両血清の配布を再開いたします。お申込みは、研究所総務係宛にお願い致します。

### ○出版部より

☆『農業ハンドブック 1992 年版』が出来上がりました。89 年版が品切れになりましてから、永らくご利用いただいている皆様にご不便をおかけしておりましたが、このほど出来上がりました。前版より 100 ページ余ページも

増え、より充実した内容となっております。詳しくは次ページの色刷広告をご覧くださいご注文下さい。

(A5 判, 768 ページ, 定価 5,500 円, 送料 360 円)

### 教官公募のお知らせ

名古屋大学農学部では、害虫学講座助手を公募しています。応募期限は、平成 4 年 8 月 25 日(火)必着です。

問い合わせ先は以下のとおりです。

〒 464-01 名古屋市中種区不老町

名古屋大学農学部

名古屋大学農学部害虫学講座助手選考委員会

## 植 物 防 疫

第 46 卷  
第 9 号

平成 4 年 7 月 25 日印刷

平成 4 年 8 月 1 日発行

平成 4 年

8 月 号

編 集 人 植物防疫編集委員会

発 行 人 岩 本 毅

印 刷 所 三 美 印 刷 (株)

東京都荒川区西日暮里 5-9-8

(毎月 1 回 1 日発行)

＝ 禁 転 載 ＝

定価 700 円 送料 51 円  
(本体 680 円)

平成 4 年分  
前金購読料 7,800 円  
後払購読料 8,400 円  
(共に〒サービス、消費税込み)

### — 発 行 所 —

東京都豊島区駒込 1 丁目 43 番 11 号 郵便番号 170  
社 団 日 本 植 物 防 疫 協 会  
法 人

電 話・東京 (03) 3944-1561~6 番

振 替 東京 1 - 1 7 7 8 6 7 番



◇最新情報を掲載した改訂版ここに刊行!!◇

〔主な掲載内容〕

## 農薬ハンドブック

### 1992年版

農薬ハンドブック 1992年版編集委員会 編  
農林水産省農業環境技術研究所 担当技官執筆  
A 5判 750ページ 美装幀 ビニールカバー付

定価 5,500円(本体 5,340円) 送料 360円

市販農薬を用途別に、薬剤の名称、作用特性、使用上の注意、各製剤ごとにその商品名、使用方法、適用病害虫、雑草など詳しく解説した本文と、農薬の一般名・商品名、化学名・化学構造式・物理化学的性質、毒性・魚毒性を表とした農薬成分一覧表、残留農薬基準・農薬登録保留基準・農薬安全使用基準の解説、農薬中毒の治療法を付録とし、索引では登録薬剤名・一般名(ISO名)から商品名の英名まで含めて取り上げました。昭和42年に第1版刊行後、平成元年に刊行した第7版(1989年版)まで毎回ご好評を博しておりましたが、ここに平成4年度版として1992年版が完成いたしました。今回の版では、最近特に増加の著しい植物成長調整剤について、作用特性をもとに新しく分類して掲載しました。その他、農薬の使用にあたって役立ついくつかの用語についての解説を囲み記事として入れ、また、混合剤については、有効成分それぞれの項に重複して記載するなど一層利用しやすいように改善しました。農薬の研究者はもちろんのこと作物保護に携わる研究者、指導者、実務者の方にとって必携書となる解説書です。

本書のご注文は直接本協会へ前金でお願いいたします。

#### 【本文】

〔殺虫剤〕 I 有機リン殺虫剤 II カーバメート系殺虫剤 III 合成ピレスロイド殺虫剤 IV ネライストキシン系殺虫剤 V 昆虫成長制御剤(Insect growth regulator, IGR) VI 天然殺虫剤 VII 殺ダニ剤 VIII 殺線虫剤 IX くん蒸剤 X その他の殺虫剤

〔殺菌剤〕 I 銅殺菌剤 II 硫黄殺菌剤 III ポリハロアルキルチオ殺菌剤 IV 有機塩素殺菌剤 V 有機リン殺菌剤 VI ベンゾイミダゾール系殺菌剤 VII ジカルボキシイミド殺菌剤 VIII カルボキシアミド殺菌剤 IX アシルアラニン系殺菌剤 X N-ヘテロ環系エルゴステロール生合成阻害剤 XI 抗生物質剤 XII 土壌殺菌剤 XIII その他の殺菌剤

〔殺虫殺菌剤〕 I 稲作用殺虫殺菌剤 II その他の殺虫殺菌剤

〔除草剤〕 I フェノキシ系除草剤 II ジフェニルエーテル系除草剤 III カーバメート系除草剤 IV 酸アミド系除草剤 V 尿素系除草剤 VI スルホニル尿素系除草剤 VII トリアジン系除草剤 VIII ダイアジン系除草剤 IX ダイアゾール系除草剤 X ビピリジウム系除草剤 XI ジニトロアニリン系除草剤 XII 芳香族カルボン酸系除草剤 XIII 脂肪酸系除草剤 XIV 有機リン系除草剤 XV アミノ酸系除草剤 XVI その他の有機除草剤 XVII 無機除草剤

〔殺そ剤〕,〔植物成長調整剤〕,〔誘引剤〕,〔忌避剤〕,〔展着剤〕,その他

#### 【付録】

農薬成分一覧表、農薬の開発から登録まで、残留農薬基準・農薬登録保留基準・農薬安全使用基準、毒性の分類、農薬中毒の治療法、会社紹介

#### 【索引】

社団法人 日本植物防疫協会

〒170 東京都豊島区駒込 1-43-11

電話 東京 (03)3944-1561~6

FAX 東京 (03)3944-2103

振替 東京 1-177867



X N-ヘテロ環系エルゴステロール生合成阻害剤(EBI剤)

フェナリモルクン煙剤(ルビゲンくん煙剤) フェナリモル：1%含有。ハウス等の室容積 200 m<sup>3</sup>当たり 40 g を用いてくん煙する。

適用病害 イチゴ：うどんこ病

フェナリモル：ポリオキシシン水和剤(オメガロン水和剤) フェナリモル：4%，ポリオキシシン：10% (ポリオキシシン B として 100,000 AmBu/g) 含有。1,000 倍液を散布する。石灰硫黄合剤およびボルドー液との混用は避ける。

適用病害 ナシ：黒斑病・黒星病

フェナリモル・有機銅水和剤(オキサシン水和剤) フェナリモル：3%，オキシシン銅：65%含有。1,000～1,200 倍液を散布する。

適用病害 ナシ：黒星病・黒斑病・赤星病・輪紋病 リンゴ：黒星病・斑点落葉病

[その他の混合剤]

ジラム・チウラム・フェナリモル水和剤(スペックス水和剤) (170 頁掲載)

# 10 ピリフェノックス剤(ポジグロール)

本剤は、スイスのドクター・アール・マージ社で開発されたピリジン系 EBI 剤で、オキサゾリンの誘導体である。

[作用特性]

本剤は、治療効果を有し、発芽管や菌糸先端を膨化させてその生長を抑制する。

[使用上の注意]

薬害：ナシには薬害を生ずるおそれがあるのでかからないようにする。

毒性：眼に対して刺激性があるので散布液調製時には保護眼鏡を着用する。魚毒性 B。

[製剤]

ピリフェノックス水和剤(ポジグロール水和剤 5) ピリフェノックス：5%含有。リンゴ黒星病には 1,000～1,500 倍、リンゴ赤星病、うどんこ病およびブドウには 1,000 倍液を、テンサイには 500 倍液を、またバラには 1,000～1,500 倍液を散布する。

適用病害 リンゴ：黒星病・赤星病・うどんこ病 ブドウ：うどんこ病 テンサイ：褐斑病 バラ：黒星病・うどんこ病

ピリフェノックス水和剤(ランノック水和剤) ピリフェノックス：5%含有。500 倍液を散布する。

適用病害 テンサイ：褐斑病

[その他の注]

ジラム・

殺虫剤

ドイツの  
病、さび病  
[作用特性]  
広範囲の

V-1  
ジフルベンズロン  
diflubenzuron(I)

1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea  
1-(4-クロロフェニル)-3-(2,6-ジフルオロベンゾイル)尿素



魚毒性：A 類

原寸大

デミリン  
Dimili

無臭・白色結晶性粉末，m.p. 230～232，水：約 0.2 ppm (20°C)，アセトン：0.65 g/100 ml (20°C)，メタノール：0.1 g/100 ml (25°C)，エーテル・ベンゼン・石油エーテル：難溶，熱・水・光：安定

本文解説 112 ページ

V-2  
テフルベンズロン

1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea

魚毒性：B 類

# 広範囲の作物の病害虫防除に 農作物を守る! 日曹の農業

新発売!

●りんご・なしの病害総合防除に

**ブルーグ**

●トマト・みかんの病害防除に

日曹 **ゲッター**

●広範囲の病害防除に

日曹 **フロンサイド**

●べと病・疫病・細菌病の防除に

日曹 **アリエッティボルドー**

●芝・たばこ・花の病害防除に

日曹 **プレビクルN**

●水稻用新種子消毒剤

**トリフミン** 乳剤

●ハダニ・アブラムシ防除に

日曹 **プロカーブ**

●ハダニ・スリップス防除に

日曹 **ノンマイト**

●巨峰の着粒増加に

日曹 **フラスター**

新 植物成長調整剤

好評発売中!

○果樹・野菜の病害防除に

**トリフミン**

○病害防除の基幹薬剤

**トップジンM**

○桃・おうとう・すももの灰星病、  
野菜・豆類の菌核病・灰色かび病の防除に

日曹 **ロニラン**

○果樹・野菜のハダニ防除に

**ニッソラン**

○べと病・疫病の専門薬 /

日曹 **アリエッティ**

○きゅうりのべと病防除に、  
ぶどう・りんご・なしの病害防除に

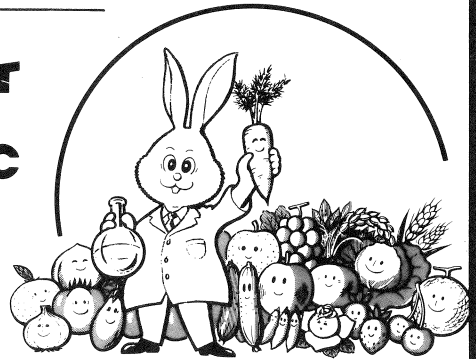
日曹 **アリエッティC**

○広範囲の害虫防除に  
—合成ピレスロイド剤—

日曹 **スカウト**

○畑作イネ科雑草の除草に

生着期処理  
除草剤 **ナブ**



農業は、適期・適量・安全使用



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 大阪府中央区北浜2-1-11  
営業所 札幌・仙台・信越・新潟・東京・名古屋・福岡・四国・高岡

## “箱でたたこう! イネミズゾウムシ”

イネミズゾウムシをはじめ、イネドロオイムシ・イネヒメハモグリバエ・ウンカ、  
ヨコバイ類などの水稻初期害虫の同時防除が出来ます。

〈育苗箱専用〉

**オンコル<sup>®</sup> 粒剤 5**

特長

- 1 浸透移行性: 速やかに浸透移行し、植物全体を害虫から守ります。
- 2 残効性: 残効期間が長いので、薬剤散布回数を減らすことが出来ます。
- 3 広い殺虫スペクトル: 広範囲の害虫に効果を示し、一剤で同時防除が出来ます。



大塚化学株式会社

大阪府中央区大手通3-2-27  
農薬部 / Tel.06(946)6241

CIBA—GEIGY

# 研究の伝統に生きる



## 水稲殺菌剤

- コラトップ®粒剤5
- フジトップ®粒剤

## 園芸殺菌剤

- リドミル®MZ水和剤
- リドミル®銅水和剤
- リドミル®粒剤2
- リミドル®モンカット®粉剤

## 畑作殺菌剤

- チルト®乳剤25

## 水稲除草剤

- ソルネット®粒剤
- バレージ®粒剤
- センチ®粒剤
- クサホープ®D粒剤
- ワンオール®粒剤
- ゴルボ®粒剤
- ライザー®粒剤
- アピロサン®粒剤
- ワイダー®粒剤
- クサノック®粒剤
- シメトリン混合剤

## 畑作除草剤

- デュアル®乳剤
- ゲザノン®フロアブル
- コダール®水和剤・細粒剤F
- シマジン®水和剤・粒剤
- ゲザプリム®水和剤・フロアブル
- ゲザバックス®乳剤・粒剤
- ゲザガード®粒剤・水和剤

## 殺虫剤

- エンセダン®乳剤
- スプラサイド®乳剤・水和剤
- エイカロール®乳剤
- ダイアジノン®乳剤・粒剤・水和剤

日本チバガイギー株式会社

アグロテック事業部 〒105 東京都港区浜松町2-4-1 (世界貿易センタービル34F) ☎03-3435-5252

®=登録商標

正確・迅速をモットーに  
時代のニーズにお応えします。

## 業 務 内 容

### ●依頼分析

植栽地、緑地-----植栽地土壌、客土の物理性、化学性分析  
考古学分野-----遺跡土壌などの化学分析  
農耕地・その他の土壌---土壌の物理性、化学性分析  
植物体分析-----植物体の無機成分分析  
肥料分析-----植物質、動物質、無機質肥料の分析  
土壌汚染-----土壌汚染物質の分析  
その他、水質、産業廃棄物の分析は、その都度ご相談に応じます。

### ●土壌調査および植生テスト

依頼分析のための土壌調査、採取、および活性汚泥、産業廃棄物に係わる植生テストなどもご相談に応じます。

パリノ・サーヴエイ株式会社

地質調査業者 質 80-982  
計量証明事業 群馬県 環 第17号

本 社 〒103 東京都中央区日本橋室町2-1-1三井ビル  
TEL 03(3241)4566 FAX 03(3241)4597  
研究所 〒375 群馬県藤岡市岡之郷戸崎559-3  
TEL 0274(42)8129 FAX 0274(42)7950



★ 日産化学

奏でるのは、  
実りの前奏曲。  
プレリュード



- 優れた抗菌力で、馬鹿苗病、こま葉枯病、いもち病を同時に防除します。
- 低温時でも安定した消毒効果を示し、他剤の耐性菌にも高い効果があります。
- 乳剤なので薬剤の均一性が高く、攪拌の必要がありません。
- 種粒への吸着(浸透)に優れているので、消毒液は風乾せずに浸種できます。

新登場

実りのプレリュード・種子消毒剤  
スポルタック<sup>®</sup> 乳剤

●フロコロス 25% SPORTAK<sup>®</sup>

Rは旭エンレーリングAGの商標登録



## 雑誌「植物防疫」バックナンバーのお知らせ

月の後は特集号の題名、( ) 内は特集の題名、価格は1部(送料・消費税込)の値段

購読者各位よりたびたびバックナンバーのお問い合わせがありますので、現在在庫しております巻号をお知らせいたします。この機会に是非お取り揃え下さい。

### 38 巻 (59 年)

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| 1, 2, 6, 7, 8, 10, 12 月 | 566 円 |
| 3 月: 線虫                 | 618 円 |
| 5 月: ビシウム菌による病害         | 618 円 |
| 6 月: (導入天敵)             | 566 円 |
| 8 月: (弱毒ウイルス)           | 566 円 |

### 39 巻 (60 年) [全号揃]

|                     |       |
|---------------------|-------|
| 1, 2, 3, 6, 7, 12 月 | 566 円 |
| 4 月: (カメムシ)         | 566 円 |
| 5 月: 植物検疫           | 618 円 |
| 8 月: (ウイロイド)        | 566 円 |
| 9 月: (イネもみ枯細菌病)     | 566 円 |
| 10 月: (害虫防除と生態学)    | 566 円 |
| 11 月: イネ縞葉枯病        | 618 円 |

### 40 巻 (61 年) [全号揃]

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| 1, 6, 7, 9, 10 月      | 566 円 |
| 2 月: (性フェロモンによる交信かく乱) | 566 円 |
| 3 月: (農薬の付着性)         | 566 円 |
| 4 月: (ムギの病害)          | 566 円 |
| 5 月: 昆虫の神経制御          | 618 円 |
| 8 月: (コナガ)            | 566 円 |
| 11 月: 先端技術と病害防除       | 618 円 |
| 12 月: (野菜ハダニ類の発生予察法)  | 566 円 |

### 41 巻 (62 年) [全号揃]

|                      |       |
|----------------------|-------|
| 1, 2, 6, 7, 8, 10 月  | 566 円 |
| 3 月: (永年作物の紋羽病)      | 566 円 |
| 4 月: (アブラムシ)         | 566 円 |
| 5 月: 微生物の分類と保存       | 618 円 |
| 9 月: (茎頂培養とウイルスフリー化) | 566 円 |
| 11 月: 害虫の長距離移動       | 618 円 |
| 12 月: (暖地・亜熱帯のウイルス病) | 566 円 |

### 42 巻 (63 年) [全号揃]

|                      |       |
|----------------------|-------|
| 1, 2, 4, 7, 10, 12 月 | 566 円 |
| 3 月: (ネズミ)           | 566 円 |
| 5 月: 微生物による病害防除      | 618 円 |
| 6 月: (寄生昆虫の生物学)      | 566 円 |
| 8 月: (動物のモニタリング)     | 566 円 |

|                 |       |
|-----------------|-------|
| 9 月: (害虫・線虫と病害) | 566 円 |
| 11 月: 害虫管理      | 618 円 |

### 43 巻 (平成元年) [全号揃]

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| 2, 3, 10, 12 月                    | 648 円 |
| 1 月: (植物病理学最近の進歩 (ICPP シンポジウムより)) | 648 円 |
| 4 月: (熱帯の害虫獣)                     | 648 円 |
| 5 月: 植物ウイルス研究の進歩                  | 669 円 |
| 6 月: (イネいもち病の多発生)                 | 648 円 |
| 7 月: (ハダニ類)                       | 648 円 |
| 8 月: (熱帯作物の病害(1))                 | 648 円 |
| 9 月: (熱帯作物の病害(2))                 | 648 円 |
| 11 月: 新農薬の開発をめぐる                  | 669 円 |

### 44 巻 (平成2年)

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| 1, 2, 10 月              | 651 円 |
| 3 月: (アリモドキゾウムシとイモゾウムシ) | 651 円 |
| 4 月: 花と緑の病害虫            | 671 円 |
| 5 月: (ムギの病害)            | 651 円 |
| 6 月: (果樹コナカイガラムシ類)      | 651 円 |
| 7 月: (病原菌の病原性の分化)       | 651 円 |
| 8 月: (施設野菜栽培における害虫管理)   | 651 円 |
| 9 月: (薬剤抵抗性)            | 651 円 |
| 12 月: (線虫学)             | 651 円 |

### 45 巻 (平成3年)

|                   |       |
|-------------------|-------|
| 1, 2, 4           | 651 円 |
| 3 月: (作物病害の生物防除)  | 651 円 |
| 5 月: 病害虫発生予察      | 671 円 |
| 6 月: (シロイチモジヨトウ)  | 651 円 |
| 7 月: (植物病原体の分子進化) | 651 円 |
| 8 月: (果樹の根頭がんしゅ病) | 651 円 |
| 9 月: (熱帯のイネウンカ類)  | 651 円 |
| 10 月: (ウリ類の病害)    | 651 円 |
| 11 月: 高品質生産と病害虫防除 | 671 円 |
| 12 月: (BT 剤)      | 651 円 |

### 46 巻 (平成4年)

|             |         |
|-------------|---------|
| 1~12 月 (前納) | 7,800 円 |
| (後納)        | 8,400 円 |

在庫僅少のものもありますので、ご希望の方はお早めに郵便振替・小為替・現金など(切手でも結構です)で直接本会へお申し込み下さい。38 巻 (59 年) 以前のものについては、出版部までお問い合わせ下さい。

上記の定価、送料につきましては、43 巻 3 月号以前発行のものについては、消費税導入以前の料金が印刷されておりますのでお含みおき下さい。

送料は1部につき51円です。2部以上は実費となります。

ラウンドアップ専用ノズルなら、

散布量は

$\frac{1}{4}$

ラウンドリアル™

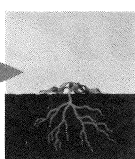
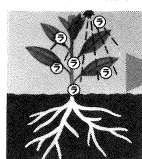
出方が  
ちがう

泡状で出るので  
飛散が少ない。

つき方が  
ちがう

かけ跡が  
白く見えて楽。

ラウンドアップは、  
雑草の一部につくと根まで  
移行して全体を枯らします。



だからチョットつくだけで充分なのです。  
この性質を利用したのが  
少量散布法です。



®米園モンサント社登録商標

ラウンドアップ普及会 事務局 日本モンサント株式会社 〒100 東京都千代田区丸の内3-1-1(国際ビル) Tel. (03) 3287-1254

●詳しい資料をご希望の方は、ハガキに資料請求券を貼って上記までご請求ください。

資料請求券  
ハガキ

# ダニ専科。



チクソロピー性を  
有する高品質処方



## ダニトロン<sup>®</sup>フロアブル

Ⓔ:「ダニトロン」は日本農薬㈱の登録商標です。



日本農薬株式会社  
東京都中央区日本橋1丁目2番5号



ニコッ。ハハッ。ウフフツの明日へ。



**除草剤**

MO粒剤・9・ショウロンM粒剤・シンザン粒剤

**殺虫剤**

トレボン粒剤・トレボン粉剤DL・トレボン乳剤  
トレボン水和剤・トレボンエア  
オフナックM粉剤DL

**殺虫・殺菌剤**

ドロクロール



地球サイズで考えて

**三井東圧化学**

東京都千代田区霞が関3-2-5  
TEL 03 (3592) 4616

**野菜・タバコ・花**

刺激が少なく安心して使える

**土壌消毒剤**

**® バスアミド** **微粒剤**

**脱皮阻害剤**

天敵にも安全。IPMIにも使える

**デミリン** 水和剤

**落果防止・着色促進に**

晩柑類のへた落ち、落果防止、  
りんごの落果防止、着色促進

**マデック** 乳剤

**時代を先取り！**

りんごの各種害虫に

**アップデート** 水和剤

**汚れの目立たない新製剤**

キノンドーがさらに性能アップ

**キノンドー**® フロアブル



**アグロ・カネショウ株式会社**

東京都千代田区丸の内3-1-1

■ 野菜・果樹・花・花木の灰色かび病や  
うどんこ病、つる枯病に

# ポリバリン® 水和剤

- 新複合殺菌剤。
- 耐性菌の灰色かび病  
つる枯病、うどんこ病  
に卓効。
- 安定した防除効果。
- よごれや、薬害も  
ほとんどない。
- 人畜・魚類に毒性低く  
安心使用。



◎資料御請求は、下記のところに御連絡ください。



自然に学び 自然を守る

**クミアイ化学工業株式会社**

本社／〒110-91 東京都台東区池之端1-4-26

平成  
昭和  
二十四  
四年  
年  
九八七  
月  
月  
月  
二  
一  
五  
日  
日  
日  
第  
三  
行  
刷  
（  
種  
月  
郵  
便  
回  
一  
日  
認  
行  
）  
第  
四  
十  
六  
卷  
第  
九  
号

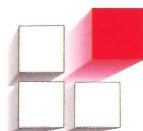


Hoechst

速くて、  
しっかり

ダブル  
**W効果の除草剤**

- 速く効く、長く効くバスタ
- 人、作物、土、環境に優しいバスタ
- なんでも枯らすバスタ ● 使いやすいバスタ



**バスタ** 液剤

（商）ドイツ・ヘキスト社の登録商標

バスタ普及会 石原産業／日本農薬／日産化学

〈事務局〉ヘキストジャパン株式会社 〒107 東京都港区赤坂8-10-16 ☎03(3479)4382

資料請求  
補助

定  
価  
七  
〇  
〇  
円  
（  
本  
体  
六  
八  
〇  
円  
）  
（  
送  
料  
五  
一  
円  
）