パルスフィールドゲル電気泳動法による植物病原糸状菌染色体DNAの分離とその応用

農林水産省農業研究センター　林(はやし)　長生(ながお)

はじめに

パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE：Pulsed Field Gel Electrophoresis）は，従来のアガロース電気泳動では分離不可能であった長い直鎖状DNA断片を分離，解析する目的で，1982年Schwartz et al.（1982）により開発された技術で，電場の向きを交互に変えることで従来の方法に比べて100倍以上の長さの巨大DNAを分子量によって分離することができる。

一般に植物病原糸状菌をはじめとする菌類の染色体の多くは，観察するにはきわめて微小であり，通常用いられる分染法技術では十分な解析ができないことが多い。PFGE法を用いれば，染色体をアガロースゲルにバンドの形でとらえることができ，細胞学的観察と相補い，菌類の染色体とゲノム構造の理解がより一層進むものと期待できる。

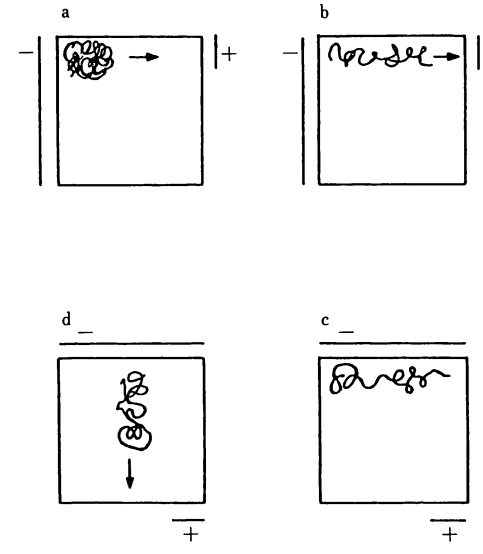
植物病理学の分野においては，1988年にトウモロコシ黒穂病菌で最初のPFGEによる核型が報告され（Kinscherf and Leong, 1988），その後，同様の研究が増加している。PFGEは糸状菌ゲノムのマッピングに使われるなど，構造解析に必要不可欠な技術となっている。

ここでは，PFGEの技術の概略を述べた後，この技術によりこれまでに明らかになった植物病原糸状菌の染色体像，さらにPFGEを利用した染色体の多型について紹介する。

I　PFGEの原理

一定方向に電場をかける従来型のアガロースゲル電気泳動法では，DNAはアガロース分子がつくる網目構造による分子ふるい効果によって分子量に従った分離が行われる。DNAの大きさがある程度以上（20〜40 Kb）になると分子ふるい効果が効かなくなり，DNAの大きさには関係なく移動する。PFGE法では2組の電極を方向を変えて配置し，それらに一定の時間間隔（パルスタイム）で2方向から交互に電場をかける。図-1に示すように，まず左右方向に電場をかけるとDNA分子がヘビ状の形に細長く伸びてゲル中をすすむ(図-1-b)。次に電場の向きを上下に変える(図-1-c)と，再度DNAの方向転換が起こる（図-1-d)。この方向転換に要する時間がDNAサイズに依存するため，方向転換を繰り返すとDNAはサイズに応じて移動する。その結果40 Kbを超えるDNAでも分離が可能となる。

Schwartz and Cantor（1984）によって最初に発表された均一な電場と不均一な電場が交互に形成される基本的な装置と図-2に示した交互の電場の両方が不均一なOFAGE（Orthogonal Field-alternation Gel Electrophoresis）（Smith et al., 1988）により酵母の染色体の分離が可能となったが，これらの装置では，電場の不均一性とゲルの場所によって電場の交差角度が異なることによりDNA分子は異なる速度で移動し，異なる方向に移動した。その後分離能の向上，移動度の均一性，レーンの直線性を中心に改良され，TAFE(Transe alternating Field Electrophoresis)（Gardiner et al., 1986）では，立体的に配置された2方向の不均一な電場がゲルを横断することでレーンがまっすぐになり，レーンとレーンの比較が可能となった。さらに電場を逆転させるFIGE



Separation of Chromosomes of Plant Pathogenic Fungi Using Pulsed Field Gel Electrophoresis and Its Applications.
By Nagao Hayashi

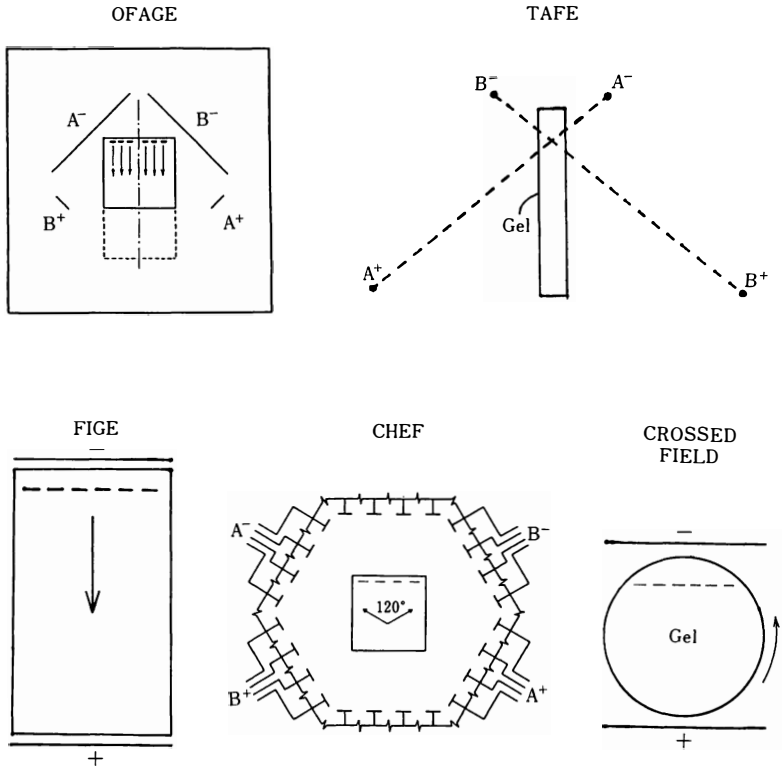


図-2　PFGEのさまざまなタイプ

(Field Inversion Gel Electrophoresis) (Carle et al., 1986), 24個の電極を六角形に並べ，電極間に抵抗器を入れることによって均一な電場を生み出し，試料の移動度を一定にしたCHEF (Contour-clampd Homogeneous Electric Field Electrophoresis) (Chu et al., 1986)，ゲルを回転させるCrossed Fieldが開発された。なかでもCHEFは120度の角度で電流を相互に流すことによりゆがみが少なく，解像度の高い泳動像を得ることができるようになり一枚のゲルで多数の試料の比較が可能になった。現在，CHEFとTAFEの二つのタイプがよく使われている。

II　巨大DNA試料の調製

巨大DNA分子は溶液状態で操作すると切断されやすいので，調製は細胞をアガロースゲル中に固めて，アガロース片の状態で行う。DNA調製は大まかに，糸状菌細胞の培養と集菌，酵素によるプロトプラスト化，プロトプラストのアガロースゲル中への固化，溶菌及びタンパク除去，アガロース片の洗浄の5段階で行う。ここでは，筆者がいもち病菌で行っている調製法を簡単に記す。

① 静地培養した菌糸を破砕し新しい培地に移し，さらに培養する。この操作を2回繰り返しメラニン化する前の若い菌糸細胞を集める。殺菌水で洗浄する。

② 酵素液（1％ Driselase, 5 mg/m*l* Novozyme 234, 10 unit/mg Chitinase T1, 0.7 M Sorbitol, pH 5.2）に懸濁し，28 °Cで1〜2時間処理しプロトプラストを集める。0.7 M Sorbitol, 10 mg $CaCl_2$で洗浄する。

③ プロトプラストを5×10^8個/m*l*となるように1％低融点アガロース（0.7 M Sorbitol, 0.125 M EDTA, pH 7.5, 50 °C）と等量混合し，サンプル容器に注入し，4 °Cでゲル化する。

④ 包埋したアガロース片を細胞溶解及び除タンパク処理液（0.01 M Tris：pH 7.5, 0.5 M EDTA：pH 8.0, 1％Lauroyl sarcosine, 1 mg/m*l* Proteinase K）に浸し50 °Cで24時間ゆっくり振とうする。処理液を交換して，さらに24時間処理する。

⑤ 0.05 M EDTA, pH 8.0で数回洗浄する。

III　PFGEの泳動条件

アガロース片をウェルに合うサイズに切断して，ウェルに埋め込み低融点アガロースでウェルに固定してから泳動する。泳動条件は表-1に示すようにDNAサイズに

表-1　PFGEの泳動条件

DNAサイズ(Mb)	<0.1	0.1〜0.2	2〜4	>4
アガロース濃度(%)	1.5	1〜1.5	0.8〜1	0.5〜0.8
泳動バッファー	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE
泳動槽温度(℃)	14	14	14	14
電圧(V)	200	150〜200	125〜175	50〜75
パルスタイム	1〜10秒	50〜100秒	120〜180秒	10〜60分
泳動時間	6〜12時間	18〜24時間	24〜36時間	3〜6日

BIO-RAD　CHEF-DRII ™マニュアル

より異なる。一般にDNAサイズが大きくなると，電圧を減少させ，パルスタイム，泳動時間を長くする（口絵参照）。パルスタイムには，シングルパルス(一定のパルスタイムで行う)，途中でパルスタイムを変える，ランピングパルス（開始から終了まで徐々にパルスタイムを変えながら行う）の方法がある。ゲノムサイズや染色体のサイズが未知の場合，いくとおりかの泳動条件で泳動してみる必要がある。染色体サイズの範囲が広い場合，二とおりの泳動条件で泳動するのが好ましい。筆者は，いもち病菌の染色体DNA（染色体サイズはおよそ1〜>10 Mb）をCHEFで分離するために次のような泳動条件を採用している。分離ゲル濃度；0.5％アガロース(0.5×TBEで溶解)，泳動バッファー；0.5×TBE（45 mM Tris, 45 mM Boric acid, 1.25 mM EDTA, pH 8.3)，循環冷却装置の温度；0℃，電圧；40 V，パルスタイム；3,600秒，泳動時間；160時間。泳動後0.5 μg/ml のエチジウム・ブロマイド溶液に約30分間浸して染色する。

Ⅳ　PFGEによる染色体分析

いもち病菌は，イネいもち病の病原として重要であるばかりでなく，最近は宿主一病原体間相互作用，寄生性分化のモデルとして取り上げられゲノム解析が進められつつある。いもち病菌の染色体はPFGEを用いて6〜7本のバンドとして分離でき，各染色体のおおよそのサイズが決定できる(林ら，1991)(口絵参照)。*Schizosaccharomyces pombe* の染色体（3.5，4.6，5.7 Mb）をサイズマーカーとしていもち病菌染色体の大きさを見積もると，イネいもち病菌IBOS 1-1-1菌株(レース003)では，1.5，3.9，4.6，6，8，>10 Mb，シナダレスズメガヤいもち病菌では，1.05，2，3.9，4.8，5.5，6.5，>10 Mbとなった。また，核学的研究からいもち病菌の染色体数は $n=6$ とされており，イネいもち病菌では，PFGEの6本のバンドと一致した。ゲノムサイズは，いずれの菌株も34 Mbとなった。

表-2にこれまでにPFGEの手法により報告された植物病原糸状菌の核型を示した。最も大きな染色体はいもち病菌の10 Mb以上，小さなものは大麦黒穂病菌の170 Kb。染色体数の最も多いものはトウモロコシ黒穂病菌の20本，少ないものは炭そ病菌やいもち病菌などの6〜8本。ゲノムサイズは8〜46 Mbの範囲である。これは，DNA再会合反応速度解析（Cot解析，国永，私信）や顕微分光測定法等で得られている値（9〜45 Mbあるいは6〜30×10^9 daltons)とよく一致する。しかし，すべての植物病原糸状菌でPFGE核型が決定できるわけではない。例えば，同じ *Phytophthora* 属菌でも，*P. cactorum*, *P. megasperma*, *P. boehmeriae* の染色体は複数のバンドとしてよく分離するが，*P. infestans* は分離限界に留まり分離しない（Tooley and Carras, 1992)。顕微分光測定によると *P. infestans* は *P. megasperama* の2〜5倍の核DNAを含むとされ，染色体サイズがPFGEの分離限界より大きいことを示している。

また，*P. megasperma* 菌株63の染色体DNAは，PFGEにより13のバンドに分離し細胞観察により得られた核数と一致した（Tooley and Carras, 1992）が，一般には同じサイズの染色体があったり，PFGEの分離限界に複数の染色体が含まれたりするため，実際にはPFGEにより分離された染色体DNAの数と細胞学的観察による染色体の数は一致しないことが多い。しかし，遺伝解析が進んでいる *Saccharomyces cerevisiae*（Carle and Olson, 1985)，*Aspergillus nidulans*（Brody and Carbon, 1989)，*Neurospora crassa*（Orbach et al., 1988）の3菌種では，PFGEにより分離された染色体DNAの数と遺伝学的手法で決定された連関群の数は一致することが判明している。PFGEで分離される染色体サイズDNAは，染色体そのものであるとみて間違いない。

動植物には，基本数の染色体に加えて機能の不明な生存上必須ではない短い染色体［アクセサリー染色体，常染色体（autosomes，A染色体）に対してB染色体（過剰染色体）と呼ばれる］を持つものが知られている。植物病原糸状菌においても，PFGEで分離された *Nectria haematococca* の1.6 Mb染色体（ファイトアレキシンを不活化する遺伝子 *pda 1* が座上している）（Miao et al., 1991)，*Cochliobolus heterostrophus* の1.3 Mbの第16染色体（Tzeng et al., 1992）はB染色体であることが明らかになった。

Ⅴ　染色体DNAの多型

一般に，核型は生物種属に特有で正しく保存され伝達される。しかし報告された植物病原糸状菌はいずれもほかの菌類と同様に染色体DNAのサイズ及び数に著しい

表-2　PFGEによる植物病原糸状菌の核型

糸状菌	染色体数	染色体の長さの範囲(Kb)	ゲノムサイズ(Mb)	文献
Phytophthora megasperma	≧9	1,400～>4,000		10
Phytophthora megasperma				
Isolate 63	13	1,800～6,800	46.5	27
Isolate 77	9	2,500～6,100		27
Phytophthora cactorum	>6	2,600～6,100		27
Phytophthora bohmeriae	>4	2,700～>5,700		27
Phoma tracheiphila	12	700～1,600		20
Leptosphaeria maculans				
Highly virulent isolates	6～8	390～2,150	8.6～12.7	25
Weakly virulent isolates	12～14	620～2,150	16.0～21.0	25
Septoria nodorum	14～19	500～3,500	30	6
Septoria tritici	17～18	330～3,500	30～32	15
Colletotrichum gloeosporioides				
Type A	13～15	270～>6,000	24	13
Type B	6～8	330～>6,000	19	13
Fusarium oxysporum				
f. sp. *niveum*	5～9	950～4,600	13.8～23.6	6
f. sp. *raphani*	11			17
f. sp. *conglutinans*	8			17
Nectria haematococca	10～15	400～>4,000		14
Erysiphe graminis f. sp. *hordei*	≧7	200～>800		1
Cochliobolus heterostrophus				
Isolate B 30. A 3. R.45	16	1,300～3,700	35.8	28
Isolate Hm 540	15	1,400～3,300	33.8	28
Bipolaris maydis	8	1,550～3,300	17	24
Bipolaris oryzae	≧8	1,600～3,300		24
Curvularia lunata	7	1,200～3,200		24
Magnaporthe grisea	6～8	900～>10,000		18
Pyricularia oryzae	6	1,500～>10,000	>34	9
Pyricularia grisea	7	1,050～>10,000	>33.8	9
Ustilago hordei	15～19	170～3,150	19.6～27.4	16
Ustilago maydis	≧20	300～>2,000		12
Ustilago scitaminea	>17	470～2,000		7
Rhizoctonia solani(AG-4)	6	800～3,800	11.6	29

多型を示した。さらに，大きいサイズの染色体DNAは保持されていて，比較的短いサイズの染色体で多型が著しい傾向がみられた。

1　レース及び分化型と染色体DNA多型

Ustilago hordei のレースを異にする14菌株間の染色体DNAの泳動パタンは，それぞれ特徴ある多型を示した。またレース8の一つの黒穂胞子から減数分裂を経て形成された担子胞子株間に多型はみられなかったが，レース14由来の一部の担子胞子株には多型の分離がみられた（McCluskey and Mikks, 1990）。*Colletotrichum gloeosporides* には，宿主範囲や胞子形態等の異なる二つのタイプ(Type A及びType B)があり，Type A及びType Bにはそれぞれレースが存在する。PFGEにより染色体DNAはType Aが13～15本に，Type Bが6～8本に分離した。染色体DNAを大きさでmaxi-chromosomeとmini-chromosomeの二つに分けると，病原性の異なるレース間ではmini-chromosomeの染色体DNAのほうに著しい多型が認められた（Masel et al., 1990）。また，Type Bのレース3には1.2 Mbの特有のバンドがみられた。しかし，これらの菌を宿主に戻し接種し再分離しても染色体DNAの分離パタンに変化は認められない。このことから同一菌株の核型は安定しているといえる。*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* の菌株間でも同様のことがみられた（Kim et al., 1991）。

2　同一圃場からの分離菌の多型

Kinscherf and Leong (1988) は多数の *U. maydis* 菌株

を供試して染色体をPFGEで分離した。菌株間で染色体の数は非常に似ていたが，全く同じ分離パタンの核型をもつ系統は得られていない。さらに，*Septoria tritici* では小麦畑の一区画（40 m×40 m）から分離した菌株間においても多型が認められている（McDonald and Martinez, 1991）。

3　多型を起こす原因

多くの菌で染色体DNAのサイズが変異に富んでいることが明らかになったが，この多型が試料調製時のアーティファクトに由来するのではないことは，異なる試料調製法，同じ菌株由来の異なる単胞子分離菌による反復した試験でも同一のPFGE泳動像が得られることで確かめられている。菌類で染色体多型が最初に観察された酵母菌ではDNAの欠失，増幅，転座などが多型をもたらす原因であると現在考えられている。*U. hordei*（McCluskey and Mikks, 1990）や *S. tritici*（McDonald and Martinez,1991）では，相同染色体の大きさが，それぞれ100 Kb，20％程度異なることが検出されている。また，*U. maydis* では転座による染色体の突然変異が知られている（Kinscherf and Leong, 1988）。*Candida albicans* では，DNAの転座はゲノムに散在する反復配列中のDNA配列間の組替えにより起こるとされている。この反復配列は，PFGEの結果では菌株を問わず同じ大きさであった第5染色体にだけみられない。このことから，多型が生じる原因として，この反復配列による組替えが推定されている（Thrash-Bingham and Gorman, 1992）。このほか，多型の原因として生存上必須でないB染色体の関与も示唆されている。減数分裂では，常染色体（A染色体）との対合はないが，B染色体どうしの対合はみられる。B染色体は，分裂時に不均等分配を示しやすく多型を生じやすいのだろう。

染色体DNAの多型，特に染色体の長さの違いは減数分裂の際に染色体の対合に影響を及ぼさないことが，*S. cerevisiae* で確認されている。筆者も染色体長多型を示すいもち病菌を交配して得た後代が正常に生育し，病原性もあることを確認している。病原菌の自然集団の核型は，大いに変異に富んでいることが想像される。

Ⅵ　PFGEの応用

1　サザンブロッティングによる連関群の決定及び遺伝情報のマッピング

PFGEの実験では，各染色体に特異的なDNA配列をプローブとしてサザンブロットを行えば，これまで遺伝的な方法でしかできなかった連鎖群の対応も容易にできる。この方法を利用して，相同染色体を決定し，そのサイズが菌株間で比較されている。また，種々のプローブを用いて染色体上の情報がどのように配置されているかが調べられ，*Pythium paroecandrum* のrDNA26Sは *Phytophthora* 属菌の複数の染色体に存在することがわかった（Tooley and Carras, 1992）。さらに，*C. heterostrophus* では，16連鎖群に134の遺伝子座が決められた（Tzeng et al., 1992）。*alb 1*（色素変異に関係する遺伝子）は第1染色体，rDNAは第9染色体，*MAT1*（交配に関係する遺伝子）は第10染色体にそれぞれ座上していた。また *Tox1*（T毒素産生遺伝子）が第6染色体と第12染色体で相互転座（reciprocal translocation）していることが発見された。そのほか *U. maydis*（Kinscherf and Leong, 1988）でも同様なことが調べられている。

2　PFGEによる菌類の分類

PFGEの手法を菌類の分類に応用した研究例はまだ少ない。ナタネ根朽病菌（*Leptosphaeria maculans*）には強病原性型と弱病原性型があり，この両者は生育速度，胞子発芽，アイソザイムの違いから別種ではないかと推定されていた。両者のPFGEの核型を比較すると両型は明らかに異なっていた（Taylor et al., 1991）。種内変異の問題はあるが，分類基準が少ない菌種では，有効な分類手段としてまたは付加的に使用できることが *Colletotricum* 属菌（Masel et al., 1990）や *Phytophthora* 属菌（Tooley and Carras, 1992）でも示された。

そのほか，PFGE核型はプロトプラスト融合による染色体組替えの有無，疑似有性世代におけるDNA伝達を調べる手段として，また，フィンガープリント多型がほとんど検出されない病原菌においてはフィンガープリントに代わるものとして病原菌の圃場でのモニターなどに使えるだろう。

おわりに

PFGEの開発により初めて菌類の染色体単離が可能となった。PFGEの結果から明らかになった染色体の著しい多型は，反復DNAの量あるいはそれらの配置の変化に起因すると考えられている。染色体の多型は，菌類が自然集団の多様性を高めることで生育環境の変化に対応していることを示しているのかもしれない。今後，PFGEの技術により植物病理学の研究分野においても病原菌類の遺伝的解析が進むものと期待される。

引用文献

1) Borbye, L. et al. (1992) : Mycol. Res. 96 (2) : 97～102.
2) Brody, H. and J. Carbon (1988) : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 : 6260～6263.
3) Carle, G. F. and M. V. Olson (1985) : ibid. 82 : 3756

～3760.
4) ——— et al. (1986) : Science 232 : 65～68.
5) CHU, G. et al. (1986) : ibid. 234 : 1582～1585.
6) COOLEY, R. N. and C. E. CATEN (1991) : J. Exp. Bot. 42 (238 Suppl.) : 45.
7) DAMANN, K. E. and D. A. Navarre (1991) : Phytopathology, 81 (10) : 1161～1162.
8) GARDINER, K. et al. (1986) : Somatic Cell Mol. Genet. 12 : 185～195.
9) 林　長生ら (1991) : 日植病報 57 (1) : 130.
10) HOWLETT, B. J. (1988) : Exp. Mycol. 13 (2) : 199～202.
11) KIM, D. H. et al. (1991) : Phytopathology 81 (10) : 1218～1219.
12) KINSCHERF, T. and S. LEONG (1988) : Chromosoma (Berl.) 96 (6) : 427～433.
13) MASEL, A. et al. (1990) : Curr. Genet. 18 (1) : 81～86.
14) MIAO, V. P. W. et al. (1991) : Mol. Gen. Genet. 226 (1-2) : 214～223.
15) McDONALD B. A. and J. P. MARTINEZ (1991) : Curr. Genet. 19 (4) : 265～271.
16) McCLUSKEY, K. and D. MIKKS (1990) : Mol. Plant-Microbe. Interactions 3 (6) : 366～373.
17) MOMOL, E. A. et al. (1990) : Phytopathology 80 (10) : 993.
18) ORBACH, M. (1989) : Fungal Genetics Conference : Posters 1.
19) ORBACH, M. J. et al. (1988) : Mol. Cell. Biol. 8 (4) : 1469～1473.
20) ROLLO et al. (1989) : Curr. Genet. 16 (5-6) : 477～479.
21) SCHWARTZ, D. C. et al. (1982) : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47 : 189～195.
22) ——— and C. R. Cantor (1984) : Cell 37 : 67～75.
23) SMITH, C. L. et al. (1988) : Genome analysis, K. E. Davies ed., IRL Press, pp. 41～72.
24) TANAKA, C. et al. (1992) : Trans. Mycol. Soc. Japan 33 : 95～102.
25) TAYLOR, J. L. et al. (1991) : Curr. Genet. 19 : 273～277.
26) THRASH-BINGHAM, C. and J. A. GORMAN (1992) : ibid 22 (2) : 93～100.
27) TOOLEY, P. W. and M. M. CARRAS (1992) : Exp. Mycol. 16 : 188～196.
28) TZENG, T. H. et al. (1992) : Genetics 130 (1) : 81～96.
29) WAKO, T. et al. (1991) : J. Gen. Microbiol. 137 (12) : 2817～2822.

(25ページより続く)

ミズガヤツリ・ヘラオモダカ（北海道）・クログワイ（北海道・北陸・九州を除く）・ヒルムシロ（北海道）・セリ（北海道）・アオミドロ・藻類による表層剝離（北海道）：移植後10～15日（移植前後の初期除草剤による土壌処理との体系で使用）：砂壌土～埴土（減水深2.0 cm/日以下）：2回以内：湛水散布：関東・東山・東海の普通期栽培地帯，水田一年生雑草（イネ科を除く）及びマツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ・ヘラオモダカ（北海道）・クログワイ（北海道・北陸・九州を除く）・ヒルムシロ（北海道）・セリ（北海道）・アオミドロ・藻類による表層剝離（北海道）：移植後10～15日（移植前後の初期除草剤による土壌処理との体系で使用）：壌土～埴土（減水深1.0 cm/日以下）：2回以内：湛水散布：近畿以西の普通期栽培地帯

イマゾスルフロン水和剤〔TH-913㊐フロアブル〕
イマゾスルフロン10.0%
シバタイト（5.4.28）
18324（武田薬品）
日本芝・西洋芝（ベントグラス・ブルーグラス）：一年生及び多年生広葉雑草・ヒメクグ・ハマスゲ：芝生育期（雑草生育初期）：1回：雑草茎葉散布

テニルクロール粒剤〔NSK 850粒剤〕
テニルクロール0.90%
アルハーブ粒剤（5.4.28）
18325（徳山曹達）
移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ：移植後3～7日（ノビエ1葉期まで）：砂壌土～埴土（減水深　砂壌土1.5 cm/日以下，壌土～埴土2 cm/日以下）：1回：湛水散布：北海道・東北・北陸，移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ：移植後3～13日（ノビエ2葉期まで）：埴壌土～埴土（減水深2 cm/日以下）：1回：湛水散布：関東・東山・東海の普通期及び早期栽培地帯，移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ：移植後3～13日（ノビエ2葉期まで）：埴壌土～埴土（減水深1 cm/日以下）：1回：湛水散布：近畿以西の普通期栽培地帯

テニルクロール・ベンスルフロンメチル粒剤〔NSK 850 D〕
テニルクロール0.90%，ベンスルフロンメチル0.25%
クサメッツ粒剤25（5.4.28）
18326(徳山曹達)，18327(北興化学)，18328(日本農薬)，18329（デュポンジャパン）
移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ・ヘラオモダカ・ヒルムシロ・セリ・藻類による表層剝離：移植後5～10日（ノビエ1.5葉期まで）：壌土～埴土（減水深2 cm/日以下）：1回：湛水散布：北海道，移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ・ヘラオモダカ・ヒルムシロ・セリ・藻類による表層剝離：移植後5～13日（ノビエ2葉期まで）：壌土～埴土（減水深2 cm/日以下）：1回：湛水散布：東北

テニルクロール・ベンスルフロンメチル粒剤〔NSK 850 D㊊〕
テニルクロール0.90%，ベンスルフロンメチル0.17%
クサメッツ粒剤17（5.4.28）
18330(徳山曹達)，18331(北興化学)，18332(日本農薬)，18333（デュポンジャパン）
移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ・ヘラオモダカ・セリ・藻類による表層剝離：移植後5～13日(ノビエ2葉期まで)：砂壌土～埴土（減水深2 cm/日以下）：：1回：湛水散布：北陸，移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ・ヒルムシロ・セリ・藻類による表層剝離：移植後5～13日(ノビエ2葉期まで)：砂壌土～埴土（減水深2 cm/日以下）：1回：湛水散布：関東・東山・東海の普通期栽培地帯，移植水稲：水田一年生雑草及びマツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ：移植後5～13日(ノビエ2葉

(43ページに続く)