

# 虫体を破碎しない簡易凍結 DNA 抽出法による 粘着板から回収したタバココナジラミ成虫の トマト黄化葉巻ウイルス保毒虫検定

農研機構 野菜花き研究部門  
野菜病害虫・機能解析研究領域

おおにし じゅん とよだ しゅうこ きたむら としお たけだ みつよし  
大西 純・豊田 周子・北村 登史雄\*・武田 光能

## はじめに

トマト黄化葉巻病はトマト黄化葉巻ウイルス（以下、TYLCV）を病原とするウイルス病で、タバココナジラミにより永続的に媒介される昆虫媒介性ウイルスである。国内では1996年に初発生が確認され（Kato et al., 1998）、その後西日本から関東地域、南東北地域にまで拡大し、2014年度までに38都府県において発生が報告されている。TYLCVを保毒した成虫は終生にわたりウイルスを高率に媒介し続けることから、施設内においてタバココナジラミが低密度に発生していても本病の発生は拡大する傾向にある。したがって、タバココナジラミの発生動向を調査することは本病の対策では特に重要である。

黄色粘着板はタバココナジラミなどの害虫の発生動向を調査する際に活用され、栽培圃場内や周辺に設置して定期的にモニタリング調査することにより防除対策を適宜実施するのに有用である。一方で、タバココナジラミがTYLCVを保有しているか否かを識別することは、栽培している地域内における本病の発生状況を把握するうえで重要である。タバココナジラミのTYLCV保毒虫検定では、PCR法による遺伝子診断法が常用されている。しかし、PCR法による検定作業では、タバココナジラミを破碎してDNAを抽出し、PCR反応に供試するために、こうした作業工程に時間がかかり、またある程度の習熟が必要であった。

筆者らは粘着板に捕殺されたタバココナジラミを対象としてTYLCVの保毒虫検定とその他の虫体を破碎しない簡易凍結DNA抽出法を検討した。本法により、習

熟が必要であった虫体の破碎とDNA抽出の簡便化が可能となり、PCR検定によりウイルスを高感度に検出し、かつウイルス系統の判別とコナジラミ類のバイオタイプ判定も同時に実施することが可能となった。本稿では、本法の特徴と検定手順を概説するとともに、黄色粘着板を活用したウイルス検出の研究事例を紹介し、さらに発生予察における活用の可能性も展望したい。

## I 虫体を破碎しない簡易凍結 DNA 抽出法

昆虫からDNAを抽出する方法は、虫体を抽出用の緩衝液などを用いて破碎してDNAを精製する方法や市販の試薬や精製キットが知られているが、様々な記事でも紹介されているので本稿では割愛する。

本稿で紹介する虫体を破碎せずにDNAを抽出する方法は、PCR検定をするために試料をすり潰したりせずにDNAを抽出する方法である（豊田ら、2014）。非破壊的なDNA抽出法は既に様々な方法が報告されており、これらはDNAを抽出した後でも同一の試料を証拠標本として形態観察または保管することを目的に考案された。外部形態を損傷させないよう工夫された非破壊的なDNA抽出法の事例として、博物館で保存されている古い貴重な標本を用いて、抽出したDNAサンプルでmtCOI領域をPCRにより増幅し、塩基配列を解析した例も報告されている（Thomsen et al., 2009）。本稿で紹介する方法は、外部形態の保管を主な目的としないが、微小害虫であるタバココナジラミを同時に多数扱う際に手間となる虫体の破碎を省き、簡便化することを目的としている。本法の手順を図-1に、作業の様子を図-2に示す。筆者らは保毒虫検定に用いるタバココナジラミをアセトンに浸漬して室温で保管している。この方法で保管すると、虫体のDNA抽出が良好で、かつ数か月間保管していてもPCR検定の結果に齟齬が生じないことを確かめている。アセトンに浸漬した成虫を取り出してろ紙などの上に置き、十分に乾燥させてアセトンを揮発させる。成虫1頭を0.2 mlのPCRチューブに入れ、-80℃で2時間凍結させる。液体窒素であれば数秒間凍結させるだけでもよく、同様な結果が得られる。凍結後にチュ

A Non-destructive and Simple DNA Extraction Method for Detection of TYLCV from Individual Viruliferous Whiteflies Collected from a Sticky Trap Plate. By Jun OHNISHI, Shuko TOYODA, Toshio KITAMURA and Mitsuyoshi TAKEDA

（キーワード：簡易凍結 DNA 抽出法、粘着板、タバココナジラミ、トマト黄化葉巻ウイルス、TYLCV）

\*現所属：農研機構 九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域

- (1) アセトン浸漬した虫体試料を取り出し、ろ紙またはティッシュ上にて十分に風乾してアセトンを揮発させる
- (2) チューブに成虫 1 個体を入れる
- (3)  $-80^{\circ}\text{C}$  で 2 時間凍結, または液体窒素で数秒間凍結する
- (4)  $25^{\circ}\text{C}$  (室温でよい) に戻したら速やかに抽出緩衝液  $20\mu\text{l}$  をチューブに加える
- (5)  $56^{\circ}\text{C}$  で 12 時間処理した後に,  $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間処理する
- (6) 遠心機により  $14,000 \times g$ , 3 分間遠心する
- (7) 上澄みを PCR 用の DNA 抽出液として別のチューブに移す
- (8) PCR 検定により TYLCV の保毒の有無を判定する

図-1 虫体を破碎しない簡易凍結 DNA 抽出法の手順

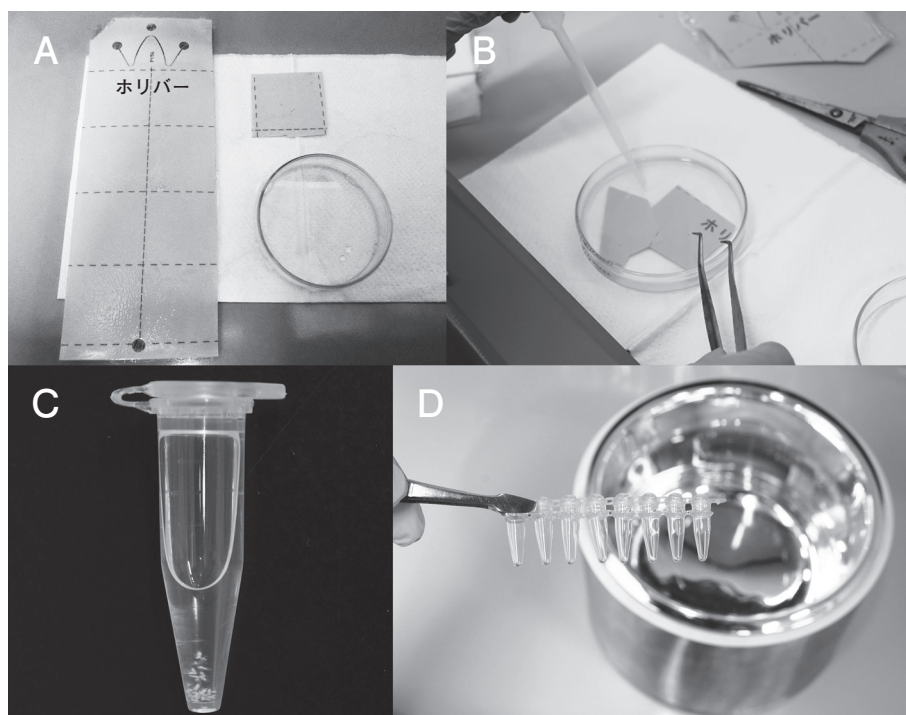


図-2 簡易凍結 DNA 抽出法と粘着板からのタバコナジラミの回収の様子

- A: 粘着板と溶剤を入れるガラスシャーレ.  
 B: 粘着板を溶剤に浸漬して, 虫体試料を剥離している様子.  
 C: 粘着板から回収してアセトン中で保管している虫体試料.  
 D: DNA 抽出のために 8 連 PCR チューブに入れた虫体試料を液体窒素にて凍結させている様子.

ープを取り出して,  $25^{\circ}\text{C}$  (室温でよい) に戻ったら速やかに抽出緩衝液  $20\mu\text{l}$  (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mg/ml プロテイナーゼ K, pH 8.0) をチューブに加える。チューブを  $56^{\circ}\text{C}$  で 12 時間処理し, その後に  $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間処理する。遠心機により虫体を沈殿させ, 上澄みを別の新しいチューブに回収して DNA 抽出液とする。検定する虫体数が多い場合には, 8 連の PCR チューブを利用すると凍結や遠心の操作が速やかに同時に行える。

## II 粘着板から回収したタバコナジラミ成虫の TYLCV 保毒虫検定

### 1 粘着板からのタバコナジラミの回収: 溶媒の選択と洗浄がポイント

色彩粘着板は表面の接着層で害虫を捕殺するため, タバコナジラミを回収するためには接着層を溶解させて包埋された状態の試料を剥離する必要がある。粘着板に捕殺されたアザミウマ類を対象とした IYSV (*Iris Yellow*

**Spot Virus** 保毒虫の血清診断法 (DAS-ELISA 法) による「マス検定」において、各種溶剤を用いた付着したアザミウマ類の剥離・回収性が比較され、IYSV 検出に影響しない資材として市販のシールはがし剤、リモネンが紹介されている (芝ら, 2013)。筆者らは、TYLCV を保毒したタバコナジラミ成虫を試験的に粘着板 (商品名: ホリバーイエロー, アリスタライフサイエンス) に付着させ、各種溶剤による成虫の剥離・回収性と TYLCV の PCR 検定に及ぼす影響を評価した。剥離に用いた溶剤はヘキサン、クロロホルム、リモネン、シールはがし剤であったが、いずれも成虫の剥離ならびに回収性は良好であり、かつ PCR 検定の結果も同じであった (表-1)。このうち、ヘキサンとクロロホルムは接着層を速やかに溶解させた。しかし、クロロホルムは浸漬時間が長くなると、粘着板のプラスチック基材も溶解させてしまうため、その後の作業性が劣っていた。ヘキサンは比較的安価で手に入り、試料の剥離性と洗浄等の作業性にも優れていると考えられる。マス検定のように、ウイルスタンパク質を対象とした血清診断法の場合は、抗原であるタンパク質の変性を抑えるためにも溶剤の選択は重要となる (芝ら, 2013)。一方、DNA を対象とした遺伝子診断では、上記の溶剤は PCR 検定に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

表-1 色彩粘着板からのタバコナジラミの剥離に用いた各種溶剤がウイルス検出率に及ぼす影響

|            | ヘキサン | リモネン* | クロロホルム | シールはがし溶剤** |
|------------|------|-------|--------|------------|
| ウイルス検出率(%) | 100  | 100   | 100    | 100        |

TYLCV の Mld 系統に感染し、発病したトマト葉を用いてタバコナジラミ・バイオタイプ B を 96 時間吸汁させてウイルスを獲得させた。各 10 頭ずつを供試し、PCR 検定にて供試個体数に対する陽性個体の割合を示す (豊田ら, 2014 を改変)。

\* D-Limonene.

\*\*シールはがし剤: 商品名 ドフィックス ハケ塗りシール剥がし剤 ヘンケルジャパン。

本法の手順を図-3 に、作業の様子を図-2 に示す。粘着板上のコナジラミの位置を確認して、作業がしやすいように適当な大きさに切り出す。シャーレなどのガラス容器にヘキサンを満たして粘着板を浸漬して、接着層を溶解させる。虫体が剥離したら粘着板を取り出し、ヘキサンを捨て、新しいヘキサンを注ぎ足して洗浄する。この操作を 1 回から 2 回繰り返して、溶解した接着層の成分をなるべく除く。虫体試料をろ紙などの上に置き、余分なヘキサンを吸収させて、あらかじめアセトンを入れたチューブ中へ虫体試料を移す。保毒虫検定に用いるタバコナジラミはアセトンに浸漬して 4℃ で保管する。

## 2 PCR の実施例: TYLCV の検出

TYLCV のウイルスゲノムは一本鎖 DNA であることから、本法にて抽出した DNA 試料を鋳型として PCR を実施することにより、ウイルスを検出することができる。現在までに日本で発生する TYLCV にはイスラエル (IL) 系統とマイルド (Mld) 系統の二つのウイルス系統が存在し、ウイルスゲノムの塩基配列情報が報告されている。筆者らは、国内の既発生分離株を対象として、ウイルス系統が異なっても検出できる特異的プライマー (表-2) を設計し、タバコナジラミ成虫 1 頭からでも TYLCV を検出できる活用事例を報告している (OHNISHI et al., 2009)。また、IL 系統と Mld 系統を識別できるマルチプレックス PCR 法が開発され、罹病植物を対象とした検出事例も報告されている (LEFEUVRE et al., 2007)。筆者らは、このマルチプレックス PCR 法を活用することにより、両ウイルス系統を保毒したタバコナジラミ成虫 1 頭よりウイルスを特異的に検出し、かつ二つのウイルス系統を識別できることを報告している (OHNISHI et al., 2011)。本稿で紹介した方法により調製した DNA 抽出液は、通常の PCR 用酵素を用いて上記のプライマーを組合せることで TYLCV を特異的に検出することができる (図-4)。筆者らは、PCR 用酵素として TaKaRa Ex Taq HS (タカラバイオ) を付属の説明書に沿って使用した場合、TYLCV を検出できることを確認

- (1) 粘着板を適当な大きさに切り分ける
- (2) 粘着板を浸漬させるのに十分量のヘキサンをガラス容器に入れる
- (3) 粘着板を入れて浸漬し、虫体試料を粘着層から剥離させる
- (4) 粘着板のみを取り出す
- (5) 虫体試料を洗浄するために、容器内のヘキサンを 2 回交換
- (6) 虫体試料を取り出し、ろ紙またはティッシュ上にて余分なヘキサンを除く
- (7) 新しいチューブにアセトンを分取して、ヘキサンより取り出した虫体試料を移す
- (8) PCR 検定を実施するまで、冷蔵庫 (4℃) にて保管

図-3 色彩粘着板からのタバコナジラミの回収法の手順

表-2 PCR 検定に用いる各プライマーの情報

| 用途と検出対象      | プライマー名           | 塩基配列 (5' - 3')                | 推定される<br>増幅DNAサイズ (bp) | 文献                    |
|--------------|------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|
| TYLCV の通常の検出 | Outer F          | GCCCCGTGACTATGTCTGAAGCGACCA   | 561                    | OHNISHI et al., 2009  |
|              | Outer R          | ATTCCTCATCACTTGAAACCTATCCCCGC |                        |                       |
| TYLCV の系統判別  | TYLCV-1840F      | GGTCTACGTCATCAATGAC           | Mld 系統 : 514           | LEFEUVRE et al., 2007 |
|              | Mld-2354R        | AGGGAGCTAAATCCAGTT            | IL 系統 : 802            |                       |
|              | IL-2642R         | ACACCGATTTCATTCAAC            |                        |                       |
| mtCOI 領域     | C1-J-2195 MTD-10 | TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT      | 866                    | FROLICH et al., 1999  |
|              | L2-N-3014 MTD-12 | TCCAATGCACTAATCTGCCATATT      |                        |                       |

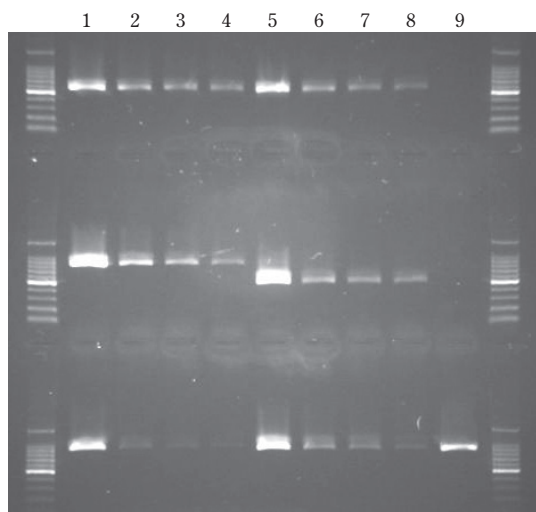


図-4 PCR によるタバココナジラミ成虫からの TYLCV と mtCOI の検出と検出感度

レーン 1 から 4 : TYLCV の IL 系統を保毒, レーン 5 から 8 : TYLCV の Mld 系統を保毒, レーン 9 : TYLCV 非保毒虫, 左右両端は DNA マーカー (100 bp DNA Ladder).

上段 : TYLCV の通常の検出, 中段 : TYLCV の系統判別, 下段 : mtCOI の検出.

DNA 抽出試料の希釈は原液 (レーン 1, 5), 100 倍 (レーン 2, 6), 200 倍 (レーン 3, 7), 400 倍 (レーン 4, 8) とした.

している。また, PCR 反応液を 1 反応当たり 20  $\mu$ l (総容量) として, このうち鋳型 DNA として DNA 抽出液を 1  $\mu$ l 加用しても, 十分に TYLCV を検出できることから, 反応組成を変えずにスケールダウンできることも確認している。

### 3 PCR の実施例 : タバココナジラミ・バイオタイプ判定のための mtCOI の検出

本稿で紹介した手法は DNA ウイルスの検出のみではなく, 昆虫の DNA を対象とした検出も可能である。タ

バココナジラミのバイオタイプは外部形態からは識別することができないことから, mtCOI の配列情報を解析して判別する手法が常用されている (FROLICH et al., 1999)。本法にて抽出した DNA 試料を鋳型として PCR を実施することにより, mtCOI 領域を特異的に増幅することができる (図-4)。さらに, 増幅した PCR 産物を精製して塩基配列を解析することにより, バイオタイプの判定が可能である。上記で紹介した PCR 反応において, mtCOI 領域に特異的なプライマー (表-2) (FROLICH et al., 1999) を利用することで, シーケンス反応に必要な DNA を確保することができる。また, 粘着板に付着した虫体は往々にして接着層に埋もれた状態となり, 粘着板上のコナジラミ類を目視により識別することも困難な場合があり, タバココナジラミとオンシツコナジラミを識別するのも困難な場合がある。前述の方法により粘着板から虫体を回収することができ, 外部形態の確認または mtCOI 領域の塩基配列解析によりコナジラミ類の同定が可能となる。

タバココナジラミならびにオンシツコナジラミは, トマト黄化葉巻病に罹病したトマト葉を吸汁することにより両種とも TYLCV を保毒することが知られている (OHNISHI et al., 2009)。オンシツコナジラミは TYLCV を保毒していても, ウイルスを媒介することはない。トマト黄化葉巻病とタバココナジラミの予察を目的にウイルスの保毒虫検定をする場合は, コナジラミ類の種を識別したうえで, TYLCV の媒介虫であるタバココナジラミからウイルスを検出する必要がある。

### 4 検出感度

本稿で紹介した手法では, タバココナジラミ 1 頭から TYLCV を検出することが可能である。PCR 法による TYLCV の検出感度は, タバココナジラミ体内のウイルス濃度によるところが大きいと考えられる。本法にて抽出した DNA 試料を 400 倍に希釈しても TYLCV を十分

に検出することができることから (図-4), 虫体内のウイルス濃度が  $10^3$  から  $10^4$  (TYLCV DNA コピー数/成虫 1 頭) 程度でも検出できると推定される。このウイルス濃度は, タバコナジラミに罹病トマト葉を 24 時間吸汁させたときに虫体内に取り込まれる濃度よりも低い濃度となる。Nested PCR 法を組合せることで, 検出感度はさらに向上するものと想像される。一方, マス検定では, 粘着板に付着した多数の虫体をひとまとめにして, ウイルスの有無を評価する。アザミウマ類の場合は, DAS-ELISA 法による IYSV のマス検定法が確立されており, 供試虫 500 頭中にウイルス保毒虫が 1 頭含まれていても検出可能と報告されている (芝ら, 2013)。本稿で紹介した手法はマス検定にも応用可能である。筆者らの予備的な試験では, タバコナジラミ非保毒成虫 200 頭に対して, TYLCV 保毒成虫が 1 頭の比率でも十分に検出可能であった。コナジラミ類の場合はアザミウマ類よりも虫体が大いことから, 100 から 200 頭程度を 1 本のチューブに入れて DNA 抽出をするのが作業性が良好であると思われる。マス検定に活用する場合でも, 個体別の検定と同等以上の感度があると考えられる。

### 5 粘着板の設置環境条件が検出に及ぼす影響

色彩粘着板を栽培圃場内や周辺に設置してモニタリング調査する場合, 様々な環境条件に曝露されることとなる。粘着板に捕殺された虫体は設置環境の温度や設置期

間によっては劣化がすすみ, 検定に影響を及ぼす可能性がある。筆者らは試験的にウイルスを獲得させたタバコナジラミ成虫を粘着板に付着させ, 粘着板の設置温度と期間がウイルス検出率に及ぼす影響を調査した (表-3)。タバコナジラミ 1 頭より上述の方法にて DNA を抽出し, 同一の DNA 試料を用いて TYLCV と mtCOI 領域を PCR により増幅して検出率を評価した。TYLCV の検出率は 25℃ と 35℃ に 14 日間設置した場合でも大差はなく, 良好に検出ができることが明らかとなった。一方で, mtCOI も同様に良好に検出することができた。したがって, TYLCV と mtCOI 領域を対象として PCR 検定をする場合, 2 週間程度であれば上記の温度でも検出は可能と考えられる。夏季の栽培圃場の環境条件は昼間の日射と高温, 昼夜の温度差等があり, 筆者らの試験条件よりも過酷な環境となる。実際に夏季に設置した粘着板より回収したタバコナジラミ成虫では, 個体別のウイルス検出の成功率が低下する傾向がある (豊田ら, 2014)。日射や温度条件が過酷な状況となる夏季では設置期間が長くなるとウイルス検出に影響が現れて, ウイルス保毒虫率を過小評価する可能性があることから, 本法の適用には注意が必要である。

### III 他のウイルス, 害虫等への適用の可能性

本稿で紹介した DNA 抽出法は, PCR を実施すること

表-3 簡易凍結 DNA 抽出法による粘着板から回収したタバコナジラミ成虫のウイルス保毒虫検定

| 検出対象       | ウイルス系統 | 付着前の生虫* | 付着直後に回収** | 設置温度*** | 設置日数 |      |
|------------|--------|---------|-----------|---------|------|------|
|            |        |         |           |         | 7 日  | 14 日 |
| TYLCV      | IL     | 93****  | 86        | 25℃     | 100  | 93   |
|            |        |         |           | 35℃     | 93   | 100  |
|            | Mld    | 100     | 93        | 25℃     | 100  | 100  |
|            |        |         |           | 35℃     | 93   | 100  |
| TYLCV 系統判別 | IL     | 93      | 86        | 25℃     | 93   | 93   |
|            |        |         |           | 35℃     | 93   | 100  |
|            | Mld    | 100     | 79        | 25℃     | 100  | 100  |
|            |        |         |           | 35℃     | 93   | 100  |
| mtCOI      | IL     | 100     | 100       | 25℃     | 100  | 86   |
|            |        |         |           | 35℃     | 93   | 93   |
|            | Mld    | 100     | 100       | 25℃     | 93   | 93   |
|            |        |         |           | 35℃     | 79   | 100  |

TYLCV の IL 系統または Mld 系統に感染し, 発病したトマト葉を用いた。タバコナジラミ・バイオタイプ B を 48 時間吸汁させてウイルスを獲得させた。各 14 頭ずつを供試し, PCR 検定にて供試個体数に対する陽性個体の割合を示す。

\*粘着板に付着させる前の生虫をアセトン中にサンプリングした。

\*\*粘着板に付着させた直後に虫体を本稿の手法にて回収し, アセトン中にサンプリングした。

\*\*\*ウイルス保毒虫を付着させた粘着板を設置した温度。

\*\*\*\*対象とする DNA の検出率 (%)。

により TYLCV とタバココナジラミの mtCOI を検出することができることから、TYLCV 以外の他の DNA ウイルスや害虫の mtCOI、ゲノム DNA の増幅ができる可能性がある。DNA の抽出過程においては、夾雑物となるタンパク質や脂質等を取り除く処理、RNA の消化反応を含めていないことから、これらが含まれた粗抽出物となり DNA の純度は必ずしも高くない。こうしたことから、RT-PCR 法により RNA ウイルスも検出の対象となる可能性もあるが、検定の対象となるウイルス核酸や粒子形態、物理性により検出に適する手法を最適化することが望ましい。

アザミウマ類により媒介される IYSV や *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) では、色彩粘着板を活用したウイルス保毒虫検定が報告されている(古味ら, 2003; 芝ら, 2013; OKAZAKI et al., 2011)。いずれも、虫体試料を破碎して DAS-ELISA 法もしくは RT-PCR 法によりウイルスを検出している。OKAZAKI ら (2011) は RNA ウイルスである TSWV を保毒したミカンキイロアザミウマを粘着板に付着させて一定期間放置した場合、時間の経過とともに虫体内のウイルス RNA 量が分解され 1/10 以下となるものの、RT-PCR による検出感度以上は残存することを報告している。本法を利用して RNA ウイルスを対象に検定する場合、虫体からの核酸の調製法をさらに工夫し、検出感度や実用性を検討する必要がある。

## お わ り に

本稿で紹介した虫体を破碎しない簡易 DNA 抽出法は、特異的なプライマーを用いた PCR 法と組合せることに

より、色彩粘着板に捕殺されたタバココナジラミを対象とした TYLCV の保毒虫検定ならびにバイオタイプの判別に有用な方法となる。発生予察においては対象害虫の発生動向をモニタリング調査することが重要である。一方で、PCR 検定では DNA や RNA といった核酸を供試材料とすることから、虫体試料が曝露されてきた温度やその期間により標的ウイルスや核酸の分解が起きる。検定手法や核酸の抽出法が優れていても、供試材料の標的ウイルスや核酸が損なわれていては検定結果に齟齬が生じ、適正な評価が困難となる。本稿で紹介した簡易 DNA 抽出法や PCR 検定方法にも適正な評価を得るための諸条件があることから、適用の範囲を踏まえた使用が必要である。色彩粘着板を活用して害虫の発生密度を把握するとともに、捕殺された害虫の種判別や昆虫媒介性ウイルスの検出に本法を利用すると有用な情報が得られると考えられる。

## 引 用 文 献

- 1) FROLICH, D. R. et al. (1999): Mol. Ecol. **8**: 1683 ~ 1691.
- 2) KATO, K. et al. (1998): Ann. Phytopathol. Soc. Japan **64**: 552 ~ 559.
- 3) 古味一洋ら (2003): 九州沖縄農業研究成果情報: <http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/karc/2003/konarc03-35.html>
- 4) LEFEUVRE, P. et al. (2007): J. Virol. Methods **144**: 165 ~ 168.
- 5) OHNISHI, J. et al. (2009): J. Gen. Plant. Pathol. **75**: 131 ~ 139.
- 6) ——— et al. (2011): ibid. **77**: 54 ~ 59.
- 7) OKAZAKI, S. et al. (2011): Australasian Plant Patho. **40**: 120 ~ 125.
- 8) 芝 章二ら (2013): 植物防疫 **67**: 677 ~ 682.
- 9) THOMSEN, P. F. et al. (2009): PLoS ONE **4**(4): e5048.
- 10) 豊田周子ら (2014): 関西病虫研報 **56**: 127 ~ 129.

## 農林水産省プレスリリース (28.8.16 ~ 9.11)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syoutan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

- ◆「第 1 回クロバネキノコバエ科の一種の対策検討会議」の開催について  
(8/19) /syokubo/160819.html
- ◆「平成 28 年度病害虫発生予報第 6 号」の発表について

- (8/23) /nouyaku/160823.html
- ◆「第 3 回ジャガイモシロシストセンチュウ対策検討会議」の開催について  
(9/5) /syokubo/keneki/k\_kokunai/gp/gpinfo.html