

植物防疫

昭和六十一年十月二十五日印刷 第四十卷 第十一号



1986

11

VOL 40

特集号 先端技術と病害防除

強力4駆に実力派新登場

共立スピードスプレーヤ

SSV-660F



苛酷な作業もバリバリこなす待望のSSV-660F。荷重バランスの優れた登坂性能とビッグサイズのタイヤで悪条件の場所でも安定走行を可能にしました。共立独自の整流機構から生まれる微粒子化された薬液は徒長枝まで確実に圧展固着。防除効果も一段とアップしました。広範囲な変速段数もメリット。作業に合せた車速が選択できます。SSV-660FはSSのパイオニア共立ならではの高性能スピードスプレーヤです。

〈仕様〉 ●寸法/3,300(全長)×1,320(全幅)×1,235(全高)mm ●重量/1,005kg ●走行用エンジン排気量/600cc ●送風用エンジン排気量/952cc ●走行部形式/4輪-4駆 ●薬液タンク容量/600ℓ ●噴霧用ポンプ吐出量/80ℓ/min ●送風機風量/550m³/min ●ノズル個数/16



りんごの病害防除に!

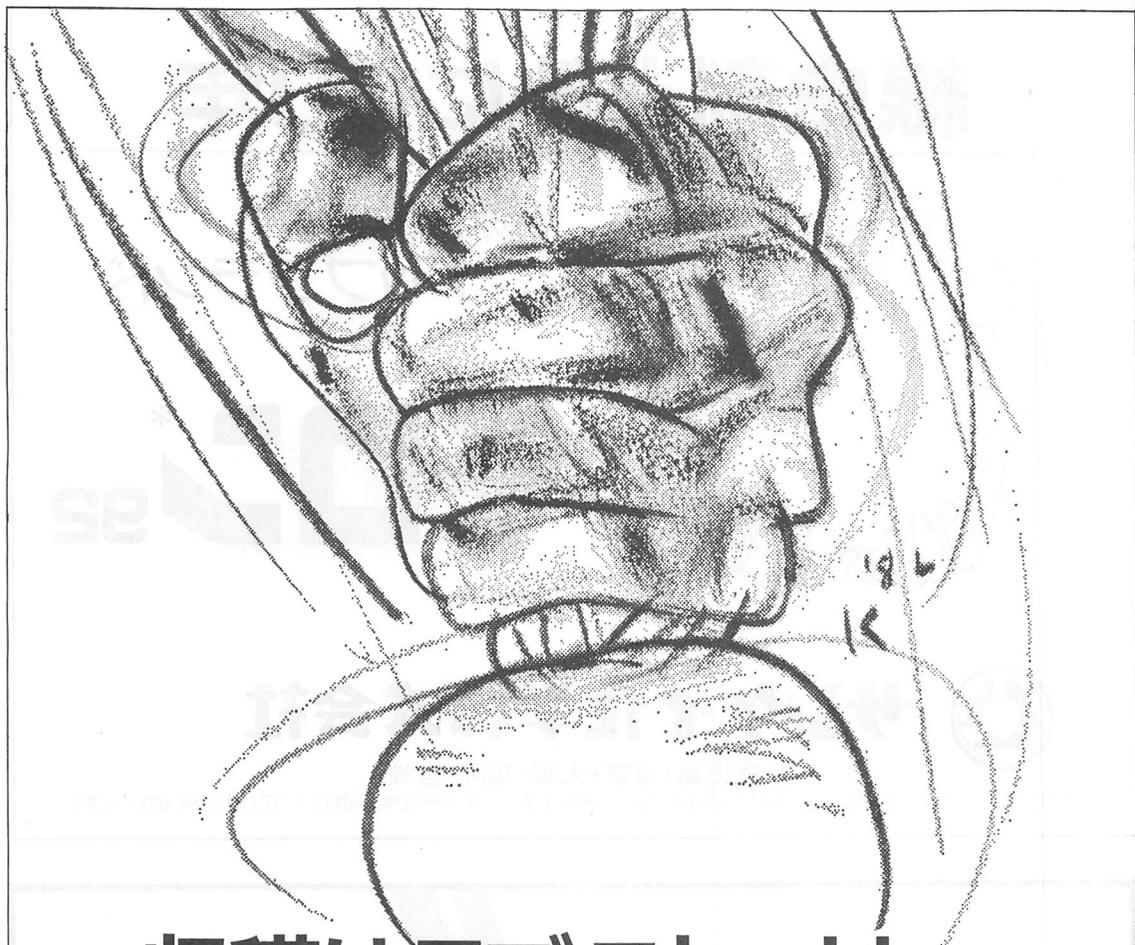
*適用拡大になりました。

*赤星病/黒点病/*黒星病
斑点落葉病/*すす点病/*すす斑病

ピルノックス 水和剤



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



収穫はラブ・ストーリー。

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

豊かな収穫に貢献するデュボン農薬

殺菌剤——ベンレート*ベンレート-T/ダコレート/スパグリン

殺虫剤——ランネード*45/ホスクリン

除草剤——ロロックス*レナバック/ハイバー*X/ゾーバー*

デュボン ジャパン リミテッド 農薬事業部

〒107 東京都港区赤坂1丁目11番39号 第2興和ビル

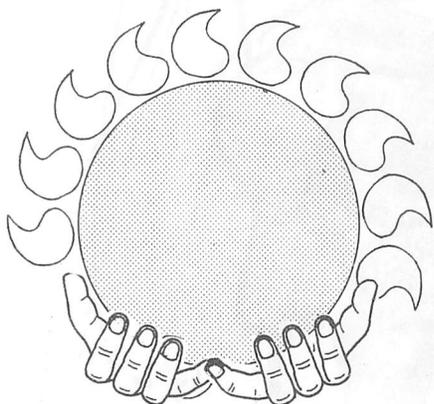


●デュボン農薬のお問い合わせは……
Tel.(03)585-9101

デュボン ジャパン



線虫剤と伴に30年



線虫剤の
トップブランド

テロン^{*}92



サンケイ化学株式会社

鹿児島・東京・大阪・福岡・宮崎

本社 鹿児島市郡元町880 TEL.0992(54)1161(代表)・東京事業所 千代田区神田司町2-1 TEL.03(294)6981(代表)

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。

ホクコーの主要いもち剤

カスラフサイド[®]

粉剤・DL・水和剤・ゾル

オリゼメート[®]粒剤

ヒノラフサイド[®]

粉剤35・DL・水和剤



農協
経済連
全農



北興化学工業株式会社

〒103 東京都中央区日本橋本石町4-2

植物防疫

Shokubutsu bōeki
(Plant Protection)

第 40 卷 第 11 号
昭和 61 年 11 月号

目次

特集号：先端技術と病害防除

先端技術による病害防除研究の現状と問題点	大畑 貫一	1
弱毒ウイルスの分子生物学的研究とその応用	西口正通・本吉 総男	4
サテライト RNA 置換による弱毒 CMV の作出	吉田 幸二	12
CMV の弱毒系統によるトマト CMV モザイク病の防除の試み	善林六朗・亀谷 満朗	18
プロトプラスト利用による病害抵抗性植物の作出	古沢 巖	23
真菌類のプロトプラスト研究の現状	八重樫博志	28
遺伝子操作技術利用によるウイロイド病の診断	高橋 壮	33
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 利用による根頭がんしゅ病の防除	牧野 孝宏	42
新しく登録された農薬 (61.9.1~9.30)		17, 48, 49
協会だより	41	人事消息 27, 32, 50
次号予告	50	出版部より 50



「確かさ」で選ぶ…バイエルの農薬

●いちも病に理想の複合剤

ビノラフサイド®

●いちも病の予防・治療効果が高い

® **ビノザン**

●いちも・穂枯れ・カメムシなどに

® **ビノバイジット**

●いちも・穂枯れ・カメムシ・ウンカなどに

® **ビノラフバイバッサ**

●紋枯病に効果の高い

® **モンセレン**

●いちも・穂枯れ・紋枯病などに

® **ビノラフモンセレン**

●イネミズ・カメムシ・メイチュウに

バイジット

●イネミズゾウムシ・メイチュウに

バサジット®

●イネミズ・ドロオイ・ウンカなどに

® **ガンサイド**

●イネミズ・ウンカ・ツマグロヨコバイに

D.S. アイシストンガンサイド

® **アサヒ**

●さび病・うどんこ病に

® **バイレト**

●灰色かび病に

® **スーパーレン**

●うどんこ病・オンシツコナジラミなどに

® **モレスタン**

●斑点落葉病・黒星病・黒斑病などに

® **アンビラコール**

●もち病・網もち病・炭そ病などに

® **バイエリホルドゥ**
[クスラヒットホルテ]

●コナガ・ヨトウ・アオムシ・ハマキムシ・スリップスに

® **トクチオン**

●ミナミキロアザミウマに

® **ホルスター**

●各種アブラムシに

® **アリアルメート**

●ウンカ・ヨコバイ・アブラムシ・ネダニなどに

® **タイシストン**

●アスバラガス・馬鈴しょの雑草防除に

® **センコル**



® は登録商標

日本特殊農薬製造株式会社

東京都中央区日本橋本町2-4 ☎ 103

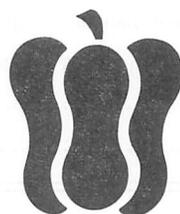
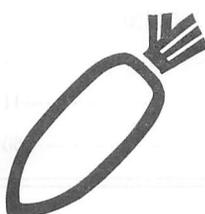
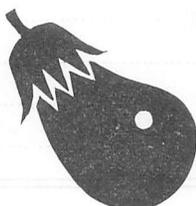
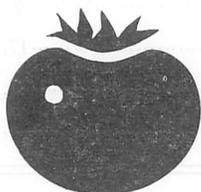
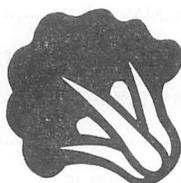
●農薬は正しく使いましょう！



武田の野菜農薬



武田農薬30年



- キャベツ・はくさいのコナガ防除に

パダン[®] 水溶剤

- とうもろこしのアワノメイガに

パダン[®] 粒剤4

- 園芸作物害虫の基幹防除に

武田オルトラン[®] 水和剤
粒剤

- イチゴ・ナス・スイカのハダニ類に

武田オサダン[®] 水和剤25

- キャベツのハスモンヨトウに

ランネート^{*}45 水和剤
「タケダ」

- 速効性のアブラムシ防除剤

武田ピリマー^{*} 水和剤

- 野菜・茶の害虫に

ナパール[®] 水和剤

- 野菜・稲の害虫に

ルーバン[®] 水和剤

新発売

- 新しい園芸作物殺虫剤

武田アクテリック^{*} 乳剤

- だいこんの亀裂褐変症に

バリダシン[®] 粉剤

- レタスすそ枯病・いちご芽枯病に

バリダシン[®] 液剤

- 野菜の灰色かび病・菌核病に

武田ロブロール[®] 水和剤

- 園芸作物病害の基幹防除に

武田ダゴニール[®]

- 園芸作物の病害に

デュボン ベンレート[®] 水和剤

- 畑の雑草防除に

武田トリアアサイド[®] 乳剤

武田薬品工業株式会社

農薬事業部 東京都中央区日本橋2丁目12番10号

先端技術による病害防除研究の現状と問題点

農林水産省農業環境技術研究所 ^{おお}大 ^{はた}畑 ^{かん}貫 ^{いち}一

病害防除における先端技術には広範な領域のものが含まれるが、ここでは本特集の趣旨に沿って、バイオテクノロジーの利用による病害の先端的防除技術開発研究の現状と問題点について述べてみたい。

防除技術の開発に直接関係のあるバイオテクノロジーの基本的な技術は、微生物利用、組換え DNA、細胞融合および組織培養である。これらの技術は、①弱毒ウイルスの作出、②拮抗微生物の利用、③抵抗性品種の作出などの諸分野で適用されている。

I 弱毒ウイルスの利用

わが国では、最近イネ縞葉枯病に対する抵抗性品種ミネタカ、むさしこがね、青い空、星の光、オオムギ縞萎縮病抵抗性品種イシュクシラス、ミサトゴールドン、モザイク病および萎縮病抵抗性ダイズ品種デワムスメなどが育成されたが、一般にウイルス病抵抗性品種の育成は困難で、実用性品種は少ない。また、ウイルスは宿主植物の酵素に依存して増殖するため防除薬剤の開発がきわめて困難である。永年性作物や宿根性作物などでは茎頂培養や熱処理などによってウイルスの無毒化が行われているが、野外では再感染の危険性が高い。

そこで、弱毒ウイルスの干渉作用を利用して防除しようとする試みが国の内外で行われている。わが国では大島らが中心になって TMV トマト系に対する弱毒ウイルスの作出が試みられ、強毒株 L を接種し、35°C で 2 週間処理したトマトから弱毒株を分離した。その後代から弱毒株 L₁₁ が分離され、千葉県、静岡県などのハウス栽培トマトのモザイク病防除に使われ、優れた効果をあげている。さらに、TMV 抵抗性遺伝子 T_{m-1} を持つトマト品種でも増殖可能な弱毒株 L₁₁A 237 が分離されている。このほか TMV トウガラシ系、キュウリ緑斑モザイクウイルス、CMV 糸葉系、カンキョトリステザウイルスなどの弱毒株が探索あるいは作出され、一部では実用化されている。

弱毒ウイルスを得る方法としては、従来、自然界の無病徴株あるいは軽症株からの分離、熱処理、亜硝酸処理などが行われてきた。最近、後藤ら (1985) は CMV

の比較的軽症株へ、CMV 罹病トマトから分離した病徴軽減効果を持つ CMV のサテライト RNA を導入し、弱毒株を得ることに成功した。弱毒ウイルスは組換え DNA によっても作ることができる。多くの植物ウイルスの核酸は RNA で、RNA 遺伝子を直接組換えることは困難である。そこでウイルス RNA に相補的な cDNA を作り、その cDNA から *in vitro* の転写系によってウイルス RNA を再生産する。組換え DNA 技術によって、この cDNA を改変し、それを転写して、病原性はないが感染性、増殖性のある変異 RNA、すなわち弱毒株を作るのである。虫媒性に関与する遺伝子のウイルスゲノム上における位置がわかれば、虫媒性を除去した弱毒株の作出も可能である。

弱毒ウイルスの利用は、ウイルス病防除技術として期待されるところが大きい。①強毒株へ復帰しないか、②他のウイルスと重複感染した場合にどうなるか、③弱毒株は他の作物上でも弱毒か、④弱毒株が他ウイルス病の発生に及ぼす影響はどうか、⑤弱毒株の保存、増殖、配布、品質の保証、検定はどうするのか、など技術的にも行政的にも解決すべき問題が多い。

II 拮抗微生物の利用

有機合成農薬は防除効果が高く、経済性にも優れていることから、急速に普及し、薬剤防除は病害防除の基幹技術として定着し、生産の向上と安定に貢献した。しかし、有機合成農薬をもってしても防除できない病害も多く、また、農薬への過度の依存は食品残留、環境汚染などのひずみの顕在化をもたらした。同一薬剤の連用は耐性菌の出現による防除効果の低下を招来した。このような背景を受けて、拮抗微生物の利用などによる生物防除がクローズアップされてきた。拮抗作用には、抗生、競合、寄生、捕食があり、それぞれの機能を生かした防除技術の開発が試みられている。

抗生を利用した典型的な防除技術は、放線菌が生産する抗生物質農薬の利用である。現在、抗生物質農薬は主に地上部病害の防除に散布剤として使用されているが、土壌病害の防除に根圏微生物の抗生作用を利用しようとする試みが精力的に行われている。ワタの根圏に分布する *Pseudomonas fluorescens* は抗生物質 pyrrolnitrin を生

産し、苗立枯病菌の生育を抑える本菌懸濁液あるいは pyrrolnitrin 溶液への種子の浸漬処理は、苗立枯病の防除に優れた効果を示す。また、多くの木本植物や草本植物の根頭がんしゅ病菌に対して、*Agrobacterium radiobacter* strain 84 の生産するバクテリオシンであるアグロシン 84 が著しい抑制作用を示すことから、*A. radiobacter* strain 84 の細菌懸濁液へ種子あるいは苗木の根を浸漬して播種あるいは移植する技術が、オーストラリアやアメリカなどでは本病の防除法として実用化され、わが国でも有効なことが実証されつつある。

競合を利用した防除技術の例としては、コムギ立枯病の防除がある。一般に土壤病害は連作すると激しくなるが、コムギ立枯病などでは連作当初は発病が増大するが、さらに栽培を続けると発病が減少する、いわゆる衰退現象が見られる。衰退現象には土壤微生物が関与している。コムギ立枯病の場合には、根面に定着している *Pseudomonas fluorescens* が生産する pseudobactin が鉄化合物をキレート化し、病原菌の鉄吸収を阻害するためとされている。この *P. fluorescens* をメチルセルロース液に懸濁し、種子に塗布して播種することによって高い防除効果が得られている。

ダイコン萎黄病は黒ボク土壌では発生しにくい。このように土壤病害によっては発生のしにくい、いわゆる抑止土壌の存在が知られている。抑止機構は十分には解明されていないが、微生物の関与が示唆されている。この微生物と病原菌とが競合関係にあるか否かは明らかではないが、抑止機構が解明されれば、土壌を人為的に抑止化することも夢ではなくなる。

寄生による病害防除の例としては、*Trichoderma* 菌の利用がある。わが国では *T. lignorum* の乾燥胞子をタバコの株元に処理して白絹病を防除する技術が開発され、海外では *T. harzianum* がインゲン菌核病や苗立枯病の防除に有効なことが報告されている。本菌の防除効果は当初本菌が生産する抗生物質 gliotoxin によるとされていたが、最近では本菌の寄生による細胞壁の溶解、せん孔が主であることが明らかにされている。線虫では、出芽細菌 *Pasturia penetrans* の特殊な系統の寄生によって、ネコブセンチュウやシストセンチュウの密度が著しく低下し、防除に使えぬ見通しも得られている。このほか線虫の卵、あるいはシストに寄生する天敵微生物も多く見いだされており、生物防除の有望素材として注目されている。

捕食の例としては、*Arachnula impatiens* などの食菌アメーバやほふく細菌である myxobacteria が知られている。食菌アメーバは土壌中の病原菌の胞子や菌糸にせん

孔して栄養を奪取し、ほふく細菌は土壌中の病原菌の胞子や菌糸を溶解して死滅させる。これらの微生物はいずれも現在のところ人工培養できないことが、技術化への隘路となっている。

以上、抗生、競合、寄生、捕食の類別ごとに微生物の拮抗機能を利用した防除技術開発の現状を例示したが、これらの機能は明確に区別できるものではなく、また、一つの微生物が複数の機能を持っていることも多い。拮抗微生物による生物的防除の事例は、このほかにも泥巻き法によるリンゴ腐らん病の防除など多数があり、また、拮抗菌といえるかどうか明らかではないが、最近、菌根菌の病害防除機能が注目され、菌根菌の人工接種あるいは粉炭など、菌根菌の定着しやすい素材を施用して、生育の促進と病害防除効果をあげている例が知られている。

拮抗微生物を防除に利用するにあたっては、より機能の優れた微生物の探索・作出と、これらの微生物を感染の場へ定着させることが必要である。複雑な微生物生態系のなかで特定の微生物を定着、増殖させることは、なかなか困難である。そこで考えられたのが、種子や苗を拮抗菌で処理して初期感染を防ぐ、いわゆるバクテリゼーションである。この方法は、長期にわたって感染を阻止しないと防除効果のあがらない病害に対しては適用できない。特定の微生物を長期にわたって根圏に定着・増殖させる方法として、特殊有機物の施用、あるいは特殊作物の間・混作などがある。例えば、有機物ではかにかがら施用によるキャベツ萎黄病の防除がある。間・混作の例としては、ネギ属植物を混作すると拮抗微生物が増え、ユウガオつる割病の発病が抑えられることが報告されている。一方、病原微生物の蓄積・優占化を阻止する方法として、有機物施用あるいは輪作などによる土壤微生物の多様化も試みられている。また、根圏の常在微生物である *Pseudomonas fluorescens* に組換え DNA 技術を利用して抗菌活性など有用形質を導入することも考えられる。すでに *P. fluorescens* に BT 毒素生産遺伝子を導入し、鱗翅目土壌害虫を殺滅する試みが行われている。また、葉圏に常在する *Erwinia herbicola* や *P. syringae* から組換え DNA によって氷核能欠損株を作り、野外で散布して凍霜害を防止する試みも行われている。

III 微生物による抵抗性の誘導

あらかじめ病原性の弱い菌株を接種すると、そのあとで病原性の強い菌株を接種しても発病が抑えられる現象が見られ、これを交差防御と呼んでいる。このような現象はトマト萎ちょう病、イネいもち病、キュウリ炭そ病、ダイズさび病など多くの病気で知られている。最近、小

川らはサツマイモつる割病において、サツマイモの茎から分離した非病原性 *Fusarium* 菌の孢子懸濁液に苗の切り口を浸漬処理することによって高い防除効果を得た。この技術は移植時の1回だけの処理で収穫期まで防除効果が続くところに特徴があり、実用化が期待されている。また、クリ胴枯病では弱病原性の *Endothia parasitica* の前接種によって防除効果をあげている例が知られている。これらの発病抑制機構が解明されれば、この分野の防除技術の開発にいつそうの拍車がかかるであろう。

IV 抵抗性品種の育成

従来、抵抗性品種の育成は少数の例外を除いては種内での品種の交雑および選抜によって行われてきたが、組換え DNA、細胞融合技術の開発によって、種の壁を超えて、病害抵抗性など有用形質を作物に導入することが可能となった。

抵抗性遺伝子の導入には、根頭がんしゅ病菌 *Agrobacterium tumefaciens* の持つ Ti プラスミドがベクターとして用いられる。すなわち、Ti プラスミドを感染性に関与する *vir* 領域を残し、こぶ形成に関与する領域を除去したものに改変し、そこに目的の遺伝子を挿入する。これを作物のプロトプラストに感染させて目的の遺伝子を染色体上に組み込ませる。このプロトプラストを培養し、個体分化を促して抵抗性の作物を得る。高等植物へ遺伝子を導入するには Ti プラスミドのほか、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) があり、bean golden mosaic virus (BGMV)、maize streak virus (MSV) なども候補にあげられ、ベクターとしての改良が試みられている。Ti プラスミドベクターによる植物への遺伝子導入法は技術的には完成の域にあり、TMV 抵抗性遺伝子の導入、弱毒 TMV の導入が試みられている。しかし、*A. tumefaciens* はイネ科植物には寄生しないので、イネ科作物の品種改良、抵抗性品種の育成に Ti プラスミドベクターを利用することはできない。

CaMV・DNA では感染領域を残し、そこに抵抗性遺伝子を乗せて植物へ導入するものであるが、CaMV・DNA は植物の核内には挿入されないので、細胞質遺伝子として働かせるのである。CaMV・DNA は宿主範囲が狭く、挿入可能な外来遺伝子の大きさに制限があるなどの欠点がある。しかし、植物の染色体とは独立に複製するため、外来 DNA のコピー数を多くすることができ、また植物の細胞間を移動できるなどの特徴を持って

おり、今後このような特徴を生かすようなベクターへの改良に期待が寄せられる。

細胞融合は異なる二つの植物の組織から酵素を用いて細胞壁を取り除いてプロトプラストとし、両者を融合させ、さらに核を合体させ、培養してカルスから再分化個体を得るものである。この方法でも種の壁を超えて病害抵抗性など優良形質を導入した新しい植物を作ることが可能であるが、プロトプラスト融合によって作出された新雑種植物は不稔になりやすい欠点がある。そのため核遺伝子全体を取り込ませるよりも有用な少数遺伝子のみを取り込ませる方法も検討されている。また、X線照射などにより片方の親の核を不活化してから融合させ、細胞質のミトコンドリアや葉緑体などに存在している有用形質の遺伝情報を導入し、細胞質雑種を作ることも行われている。

組換え DNA は画期的な技術ではあるが、Ti プラスミドベクターはイネ科植物には適用できないとか、操作が繁雑であるとか、また、細胞融合では不稔が生じやすいなどの欠点がある。これらの欠点を補うものとして、プロトプラストへ直接遺伝子を導入するマイクロインジェクション法や、大腸菌のプラスミドである pBR 系プラスミドを PEG-高 Ca 法によってプロトプラストへ導入して形質転換を起こさせる直接的導入法が開発された。これらの新しい方法は抵抗性品種の育成にも力を発揮するものと思われる。

組換え DNA、細胞融合などによる抵抗性品種の作出にあたっては、遺伝子操作技術の改良とともに抵抗性個体の効率的選抜方法の確立が不可欠である。トマト茎枯病では種子を茎枯病菌の生産する毒素で処理し、抵抗性個体を選抜することに成功している。サトウキビ葉枯病では、病原菌の生産する毒素を添加した培地上でカルスを培養し、生き残った細胞から抵抗性個体を得ている。宿主特異性毒素を生産する他の病原菌でも、毒素を用いて効率的に抵抗性個体を選抜できる可能性がある。

以上のように、拮抗微生物の改良・作出、有用物質の生産、弱毒ウイルスの作出、抵抗性品種の育成には、組換え DNA および細胞融合などの技術がきわめて有効であるが、そのためには優良形質を持った植物、微生物遺伝資源の存在が前提で、遺伝資源の収集・評価・保存とそれらにかかわる情報の整理が不可欠である。また、農業生産では組換え体を野外で使用する場面が多いが、生態系への影響、安全性などについては十分な事前評価が必要で、評価手法の開発は緊急を要する課題である。

弱毒ウイルスの分子生物学的研究とその応用

農林水産省農業生物資源研究所 ^{にし}西 ^{ぐち}口 ^{まさ}正 ^{みち}通・^{もと}本 ^{よし}吉 ^{ふき}総 ^お男

近年、弱毒ウイルスが数種の作物について実用化され、さらに他種ウイルスについても開発が図られている。ここでは、弱毒ウイルス研究の歴史的背景に触れるとともに、TMVの弱毒ウイルスで得られた知見を中心に述べてみたい。

I 植物ウイルスと干渉作用

弱毒ウイルスによる作物のウイルス病防除は、強毒ウイルスに対するその干渉作用を利用したものである。植物にあるウイルスを接種しておく、二次的に侵入するウイルスによる病徴発現が抑制される現象は通常 *CROSS PROTECTION* と呼ばれているが、わが国では干渉作用という語を使用する場合が多い。

1929年に、淡緑色のモザイクを生じるウイルスに感染したタバコは黄色のモザイクを生じるウイルスを接種しても後者の病徴が生じなかったことが *McKINNEY* (1929) によって示され、これが干渉作用に関する最初の報告とされる。しかしこれより前に、*WINGARD* (1928) はリングスポット病に感染したタバコは上葉では病徴が消え、リングスポットウイルスの再感染に対し免疫になっていたこと、またこの部分にもウイルスを含んでいたことを報告している。

これらの研究に続いて、1930年代の初期から種々のウイルスの干渉作用に関する研究が行われ、この作用は同種またはごく近縁のウイルス間に見られる現象であり、異種ウイルス間では通常認められないことが知られるようになった。

干渉作用はRNAウイルス、DNAウイルスをはじめウイロイドに至るまで多くのウイルスで観察されており、植物ウイルスにおける普遍的な現象と考えることができる。しかし外見上の干渉効果はウイルス感染過程に対するいくつかの異なる抑制現象を含むものかもしれない。例えば、最初に侵入したウイルスがのちに侵入するウイルスの増殖を何らかの機構により抑制すると考えられているが、TMVを用いた研究で最初に侵入したウイルスは後に侵入したウイルスによる病徴の発現を抑制す

るけれども、ウイルスの増殖は抑制しなかった例も報告されている (*CASSELLS and HERRICK*, 1977)。

II 弱毒ウイルスのウイルス病防除への利用

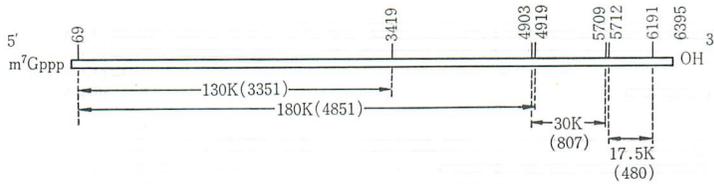
弱毒ウイルスを作物にあらかじめ接種しておけば、干渉作用によりその作物が同種の強毒ウイルスに感染するのを妨げられるのではないかという考えは、すでに *KUNKEL* (1934) や *HOLMES* (1934) により記されている。またジャガイモYウイルスの弱毒株を用い、将来の実用化を意識した実験も示されている (*SALAMAN*, 1937)。*HOLMES* (1934) は TMV を接種したトマト茎を 34°C 以上の高温下に置くことにより、弱毒ウイルスの出現頻度を高めること、得られた弱毒ウイルスが強毒ウイルスに対し干渉作用を示すことを報告した。このように 1930年代にいくつかの啓発的な研究は行われたが、弱毒ウイルスの実用化を旨とした研究は、1960年代に入ってからであった。

大島ら (1965) は *HOLMES* (1934) の方法により、TMVの強毒株(L)を接種したトマト茎を、35°C、2週間処理し、局部病斑分離法により弱毒株 L_{11} を選抜した。 L_{11} を用いたほ場試験ではトマトのモザイク病防除に顕著な効果が見られた。しかし L_{11} は時に病徴を生じさせることもあり、後藤・根本 (1971) はさらに選抜を繰り返して、安定な弱毒株 $L_{11}A$ を得た。 $L_{11}A$ は現在わが国のハウス栽培トマトに使用されている (長井, 1984)。

イギリスでは、ウイルス感染の影響が少ない第一花房形成前に TMV (強毒) を接種することにより、被害の大きい花房形成後の TMV の感染を防ぐ試みがなされた (*BROADBENT*, 1976)。その後オランダで TMV の亜硝酸処理により弱毒ウイルス M_{II-16} が作出された (*RAST*, 1972)。 M_{II-16} はオランダやイギリスにおいてトマトのモザイク病防除に利用され、実績を上げたが、この株を使用した所で新たなモザイク病が発生した (*FLETCHER and ROW*, 1975)。このことは弱毒ウイルス利用が必ずしも容易でないことを示している。

柑橘のトリステザウイルスによる病害の防除にも弱毒ウイルスが利用されている (*SASAKI*, 1979; *COSTA and MÜLLER*, 1980)。これらは野外の病徴を示さない樹木から分離されたものである。また実用化試験で効果の認め

Molecular Biology of Attenuated Plant Virus and Its Perspective. By Masamichi NISHIGUCHI and Fusao MOTOYOSHI



第1図 TMV-Vulgare の遺伝子地図 (GOELET et al., 1982)

番号は 5' 末端からの塩基の数を示し、カッコ内は塩基数を示す。

られている弱毒ウイルスには、マスクメロンのモザイク病に対するキュウリ緑斑モザイクウイルス (本吉・西口, 1984), ピーマンのモザイク病に対するトウガラシ系 TMV (後藤, 1984) がある。パパイヤリングスポットウイルスについてもハワイや台湾でその弱毒ウイルス (YEH and GONSALVES, 1984) が試験されている。

このように弱毒ウイルスの利用は、ウイルス病防除の一つの有力な手段となっているが、他のウイルス病にもその可能性を持つ。しかし、弱毒ウイルス作出の困難さ、毒性の回復、他作物への悪影響、他種ウイルスとの相乗作用、残留性等の軽減が望まれる (本吉, 1986)。これらの問題の解決には、該当するウイルスの病理・生態学的な研究とともに、病原性、病徴発現、干渉作用などの現象をウイルス遺伝子、遺伝子産物の構造や機能と関連させる分子生物学的研究の進展を必要とする。以下、TMV とその弱毒ウイルス、L₁₁A でこれまでに得られた結果を概括する。

III TMV の遺伝子と機能

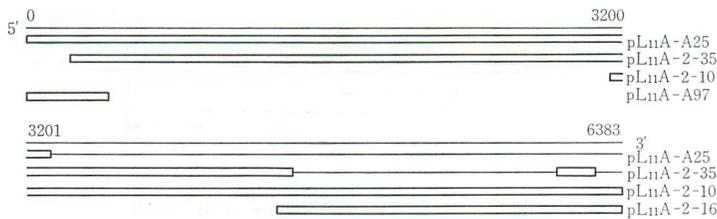
TMV (FRAENKEL-CONRAT, 1974) は長さ 300 nm, 幅 18 nm の桿状の構造をしており、その成分は分子量の 95% を占める外被タンパク質と残りは遺伝子の本体としての RNA である。外被タンパク質は 158 個のアミノ酸からなるサブユニット構造をとり、アミノ酸配列も種々の系統で調べられている。TMV-RNA 上の遺伝子からの翻訳産物としてこの外被タンパク質のほか数種のタンパク質が感染植物で見つけられ推定されてきた。

しかし、最近では組換え DNA 技術を利用し、遺伝子を直接解析することが可能になり、RNA 遺伝子を逆転写し、cDNA を合成後塩基配列が決定できるようになった。TMV では、GOELET ら(1982) が Vulgare 株について初めてその全遺伝子構造を明らかにした。それによると TMV-RNA は 6,395 塩基からなり、タンパク質をコードすることができるリーディングフレームは全部で 4 個存在する (第 1 図)。おのおの 5' 末端から順に分子量が 180 K, 130 K, 30 K および 17.5 K (K は

キロ) のタンパク質がコードされている。

180 K と 130 K のタンパク質はゲノム RNA そのものが mRNA となり翻訳される。またゲノム RNA には m⁷GpppG のキャップ構造が存在する (ZIMMERN, 1975)。180 K タンパク質は、読み始めの開始コドンには 130 K と同じであるが、130 K の終止コドン (UAG) の読み過ごしにより生じる。これらのタンパク質がウイルス RNA にコードされ (ZAITLIN and HARIHARASUBRAMANIAN, 1972)、180 K が UAG の読み過ごしにより生ずること (PELHAM, 1978) は遺伝子構造が明らかになる前に示されていた。両タンパク質の機能は、感染の初期から検出されること (SAKAI and TAKABE, 1974)、アミノ酸配列が他のウイルスの複製に関与するタンパク質と共通性のあること (CORNELISSEN and BOL, 1984; HASELOFF et al., 1984; REZAIN et al., 1984; AHLQUIST et al., 1985)、感染プロトプラストの磨砕液に由来する *in vitro* の複製系にこれらのタンパク質が含まれること (WATANABE et al., 1986) などから、TMV の複製に関与していることが示唆されている。

30 K タンパク質については、従来精製ウイルス粒子に含まれる短い粒子からの RNA (I₂ と呼ばれる) の *in vitro* の翻訳産物で見られていた (BEACHY and ZAITLIN, 1977)。その後 *in vivo* でも見いだされた (JOSHI et al., 1983; KIBERSTIS et al., 1983; WATANABE et al., 1984a)。このタンパク質の mRNA は普通系 TMV の OM 株ではゲノム RNA の 3' 末端を含み、1,558 塩基の長さである (WATANABE et al., 1984b)。このタンパク質は感染後 16.5~25 時間 (JOSHI et al., 1983) (植物組織)、2~9 時間 (WATANABE et al., 1984a)、8~16 時間 (KIBERSTIS et al., 1983) (プロトプラスト) にのみ生じ、後には消失する。これは mRNA の出現時期と一致しており、転写の段階で制御されている (WATANABE et al., 1984a)。30 K タンパク質の機能については、温度感受性変異株の研究からウイルスの細胞間移行に関与していることが示唆されている。32°C の高温において細胞内で増殖するが、隣接する細胞へは移行しない変異



第2図 L₁₁A の遺伝子構造決定に用いられたクローンの長さや決定部分 (NISHIGUCHI et al., 1985) 白ワク部分の塩基配列が決められた。

株, Ls1 (NISHIGUCHI et al., 1978, 1980) の 30 K タンパク質は野生株と異なり (LEONARD and ZAITLIN, 1982), またその遺伝子も調べた結果, 5365 番目の塩基 C が U に変換し, コードされるアミノ酸がプロリンからセリンに変わっていた (OHNO et al., 1983)。類似の挙動をする変異株についても同タンパク質遺伝子での塩基置換による突然変異が示された (ZIMMERN and HUNTER, 1983)。このタンパク質のアミノ酸配列はタバコ茎えそウイルスの RNA-1 にコードされる 29 K タンパク質のそれと非常に相同性の高いことが示されている (BOCCARA et al., 1986)。ジャガイモ X ウイルス (PVX) 感染葉において Ls1 は 32°C でも移行できるので (TALIANSKY et al., 1982), PVX も同様の機能を持つタンパク質を生産している可能性がある。このように細胞間移行に関係するウイルスコードの機能は一般的な概念になりつつある (ATABEKOV and DOROKHOV, 1984)。32°C に置いた Ls1 感染タバコ葉において, ウイルス移行の通路となる原形質連絡糸の数が有意に減少することが示されており (SHALLA et al., 1982), したがって 30 K タンパク質が原形質連絡糸の膜に作用し, 膜構造の変化をもたらすことも考えられる。

17.5 K のタンパク質は大量に生じ, 外被タンパク質であることが同定されていた。このタンパク質の mRNA はゲノムの 3' 末端を含む 693 塩基の長さで, 5' 末端はキャップ構造を持っている (GUILLEY et al., 1979)。

30 K および 17.5 K のタンパク質に対する短い mRNA のほか, 180 K の読みすぎし部分に相当する 54 K タンパク質およびその mRNA も報告されている (SULZINSKI et al., 1985) が, プロトプラスト系では確認されておらず, その機能も不明である。また, これら短いサブゲノミック RNA が生ずる機構のモデルも考えられている (ZAITLIN and PALUKAITIS, 1983)。おそらくブロムモザイクウイルス (BMV) のサブゲノミック RNA (RNA-4) の例 (MILLER et al., 1985) のように, (一) 鎖 RNA の internal initiation によるものと推

定される。これを確認するには BMV に見られるような *in vitro* での複製・転写系の確立が望まれる。

IV 弱毒ウイルス L₁₁A の遺伝子

TMV の弱毒ウイルス L₁₁A について, ゲノム RNA から cDNA を作り全塩基配列が決定された (NISHIGUCHI et al., 1985)。塩基配列に用いられたクローンの長さや決定部分を第2図に示す。また, L₁₁A の全塩基配列およびコードされるアミノ酸を第3図に示す。

上述したように, L₁₁A の派生してきた強毒ウイルス L の塩基配列はすでに示されている (OHNO et al., 1984) が, これらはトマト系の TMV であり, GOELETら (1982) が決めた *Vulgare* 株 (普通系) とは少し異なる。*Vulgare* の全塩基数は 6,395 個であるのに対し, L は 6,384 個であり, その相同性は約 80% になる (OHNO et al., 1984)。L において, ゲノムの 5' 末端の先導配列部で 3 塩基 *Vulgare* より多く, 3' 末端の非翻訳領域で 4 塩基少ない。180 K, 130 K および外被タンパク質をコードする遺伝子の塩基数は両株で同一であるが, 30 K タンパク質に関しては L のほうが 12 塩基 (4 アミノ酸残基) 少ない。

L₁₁A の全塩基数は第3図のように 6,383 個で, L より 1 塩基少ない。これは 6336~6341 番目に存在する A クラスタに存在し, L はこの部分 6~9 個の間で heterogeneity が見られた (TAKAMATSU et al., 1983)。L₁₁A と L を比較すると, 塩基の欠失や付加はなく, 合わせて 10 か所 (635, 1117, 2349, 2754, 3266, 4343, 5277, 5475, 5816 および 5966 番目) で塩基が異なっていた。これら L から L₁₁A の変異に伴う塩基置換は自然界でよく見られるトランジション型 (プリン間およびピリミジン間) である。10 か所のうち 7 か所での塩基置換は 1 個のアミノ酸に対応するトリプレットの 3 番目の塩基で生じたものであり, アミノ酸は変化しない。対応するアミノ酸が変化するのとはわずかに残りの 3 か所である。これらはいずれも 130 K タンパク質 (180 K タン

パク質の一部) 遺伝子部分に存在する。アミノ酸の変化しない塩基置換が弱毒性に関与する可能性を否定することはできないが、コードされるタンパク質の変化は影響が大きいと考えられる。

既述のように、 $L_{11}A$ は強毒ウイルス L から熱処理により作出された弱毒株 L_{11} に由来している。 L_{11} は弱毒性の点でまだ不安定なウイルスとされる (後藤・根本, 1971)。そこで上記アミノ酸が変化する3か所の塩基について、 L_{11} で調べたところ、 L_{11} は1117番目の塩基だけが $L_{11}A$ と同じであり、他の2か所 (2349 および 2754 番目) は L と同じであった (NISHIGUCHI et al., 1985)。弱毒性はこの1117番目のGからAへの置換により、アミノ酸がシステインからチロシンに変化したことが大きく関与していると考えられる。他の2か所のアミノ酸の変化が、弱毒性の安定度に寄与しているか否かについてはさらに検討を要する。

V 弱毒ウイルス $L_{11}A$ の生物学的特性

$L_{11}A$ の遺伝子が明らかになり、強毒の L との比較から、130 K タンパク質 (180 K の一部) が変わっていることが示されたが、次にこの変化と $L_{11}A$ の持つ生物学的な特性との関連を検討する必要がある。

L と比較して $L_{11}A$ のもっとも大きな特徴は、感染葉におけるウイルスの増殖量が少ない (L の約 1/5) ことである (西口ら, 1981)。感染葉からプロトプラストを分離し、ウイルス増殖量と感染細胞を検討したところ、感染細胞当たりのウイルスコピー数の少ないことが示された (西口ら, 1981)。しかし、*in vitro* でプロトプラストにウイルスを接種し増殖を調べると、ほとんどウイルスの増殖は L と $L_{11}A$ で相違は見られなかった (NISHIGUCHI et al., 1982)。葉組織におけるウイルス増殖曲線に関し、 $L_{11}A$ は感染4日後プラトーに到達し、以後増殖は低下するのに対し、 L は4日以後でも増殖は続いた (西口, 1982)。この時期をさらに検討すると、 $L_{11}A$ はウイルスの二つの複製中間体 (RI および RF) のうち RI とゲノム RNA の合成は阻止されていることが示された。 $L_{11}A$ はある程度増殖すると自ら増殖を抑制する性質が示唆され、これに対して autoregulation と名づけられた (KIHO and NISHIGUCHI, 1984)。

この autoregulation が起こっているときに、 L を二次接種するとその増殖が抑制された。しかし他種ウイルスのキュウリモザイクウイルス (CMV) を二次接種した場合、その増殖は抑えられなかった (KIHO and NISHIGUCHI, 1984)。このことは、 $L_{11}A$ の持つ autoregulation が干渉作用に関係しているように思われる。

このほか $L_{11}A$ が L と顕著に異なる点は増殖に及ぼす温度の影響である。 $L_{11}A$ の増殖適温は 25~28°C であるのに対し、 L は 28~30°C である (西口, 1982)。35°C 中で増殖させると $L_{11}A$ の感染性は見られない。このとき外被タンパク質は見られる (NISHIGUCHI et al., 1982) にもかかわらず、正常なウイルス粒子は生じていない可能性が考えられる。

以上のように、 $L_{11}A$ の autoregulation はウイルスの増殖 (複製) に関係する現象であり、ウイルス複製に関与していると推定される 130 K・180 K タンパク質の変化している事実と符合する。どのように $L_{11}A$ の増殖や autoregulation にこれらのタンパク質が関係しているのか詳細な検討は今後に待たねばならない。

VI 干渉作用に関する考察

$L_{11}A$ の autoregulation と干渉作用の関連性について先に触れたが、自らの増殖を抑えることと同様に二次接種されたウイルスの増殖を抑えるように思われる。この autoregulation のメカニズムを突き詰めれば干渉作用の解明につながるかもしれない。

干渉作用の機構についてはまだ定説はなく、いくつかの異なる仮説がある (MATTHEWS, 1981; SEQUEIRA, 1984; HAMILTON, 1985; FRASER, 1985)。例えば、ウイルス増殖部位の競合、ウイルス増殖に必要な物質の競合、ウイルス増殖阻害物質の生産、一次ウイルスの外被タンパク質による二次ウイルス RNA のコーティングおよび一次ウイルスの外被タンパク質による二次ウイルスの脱外被阻害などである。外被タンパク質を作らない変異株 (SARKER and SMITAMANA, 1981) やタンパク質を保持しないウイロイドにおいても干渉作用の見られることから、外被タンパク質関連説は普遍的ではない。

最近、アンチセンス RNA による遺伝子発現の制御が細菌 (MIZUNO et al., 1984) や動物 (IZANT and WEINTRAUB, 1984) において明らかにされている。また、植物の干渉作用に関し、一次ウイルスと二次ウイルスのセンスおよびアンチセンス RNA の雑種形成説が提唱された (PALUKAITIS and ZAITLIN, 1984)。これに関連してアンチセンスのデオキシオリゴマー (BEACHY et al., 1985) や cDNA 断片 (西口ら, 1986) を用いた研究が TMV で示された。また、アルファルファモザイクウイルスにおいては、*in vitro* で合成されたアンチセンス RNA がプロトプラストにおけるウイルス感染を阻止することが確認されている (LOESCH-FRIES et al., 1986)。これらは完全ではないが上記の説を支持するものと考えられる。

T G D I S D M Q F Y Y D K C L P G N S T L L N N Y D A V T M K L T D I S L N V K
CUGGAGUAUAUCUGUAUGCAUUUUAUCU AUGAUAAUGUCUUCUGGGAACAGCAGCU UGUUGAACCAUCACGCGUUGUAUCAUGA AAUUGACUGACAUUUCUGAAUGUCAAG 3600

D C I L D M S K S V A A P K D V K P T L I P M V R T A A E M P R Q T G L L E N L
AUUGCAUAUAUGAUUGUCUAUGUCUGUAG CUCUCGCGAAAGUUGCAAAACCAUCUUAUAA UACCGAUGGUACGAAACGCGCGCAGAAUGU CUCGCCAGACUGGACUGUUGGAAAUUCUAG 3720

V A M I K R N F N S P E L S G V V D I E N T A S L V V D K F F D S Y L L K E K R
UUGCGUAUGGAAUAUGAUUAUAUGGAC CAGAGAGUUGUCGAGUUGUAUUAUUAAGAA AUACUGCAUCUUAUGUGGUAUGUAUUAUGUUA UUGAUGUAUAUUAUCUUAAGGAAAUUAUGA 3840

K P N K N F S L F S R E S L N R W I A K Q E Q V T I G Q L A D F D F V D L P A V
AACCAAAACAAAUUUUUCACUGUUAUGUA GAGAGCUCUCAUAUGGUGUAUGCAAAAGC AAGAACAGUCACAAUUGGUCACAGUUGGCCG AUUUUGAUUUUGUGAUUCUUCAGCCGUUG 3960

D Q Y R H M I K A Q P K Q K L D L S I Q T E Y P A L Q T I V Y H S K K I N A I F
AUACGUAACAGCAUAUGAUUAAGGACAC CAGAGGAAUGUAUGUAAGUCUCAAUUCAGA CAGAAUAUCACGCGUUGCAACGAAUCUGUA GGAGACUAAAGAAUUAACACGCAAUUUUG 4080

G P L F S E L T R Q L L D S I D S S R F L F F T R K T P A Q I E D F F G D L D S
GUCUCUUAUCAGUGAGCUUACAGGCAAU UACUUGACAGUAUUGACUACAGCAGAUUCU UGUUCUUAUCGAGAAAGACACCGGUCAGA UCGAAGAUUUUCUGGAGUUCUAGACAGUC 4200

H V P M D V L E L D V S K Y D K S Q N E F H C A V E Y E I W R R L G L E D F L A
AUGUCCCAUGGACUGAUCUAGUUGGAUG UUGGAAUGUAUGUAAGUCUAAACGUAU UACUUGUGUCUGUUGAGUACGAAAUUCUGUA GGAGACUGGUCUGGAGAUUUUCUGGCG 4320

E V W K Q G H R I K T T L K D Y T A G I K T C L W Y Q R K S G D V T T F I G N T V
AAGUGGGAACAGGGCAUAGGAAACCA CUCUGAAAGUAUACUCUGGUAUAAAA CGUUGUUAUGGUACAGAGAAAGAGUGGUG AUGUUAACAACUUUAUCUGGUAUUCCUGCA 4440

I I A S C L A S M L P M E K L I K G A F C G D D S L L Y F P K G C E Y P D I Q Q
UCAUUGUCUGGUCUAGCAUCAUGCUCC CGAUGGAAAUUAUGUAUAAAGGAGCCUUCU GCGGAGUAUGACAGUUGUUAUCUUCUA AGGUUUGAGUAAAUUCGGAUUAACAACAG 4560

A A N L M W N F E A K L F K K Q Y G Y F C G R Y V I H H D R G C I V Y Y D P L K
CUCGUAUCUAUGGAAUUUGAGGCCA AACUCGUACAGAAACAAUUAUGGUACUUCU GCGGAGGUAUGGUAUUAUCACAGUAGG GUUGCAUAGUAUACUACGCCUUUGAAGC 4680

L I S K L G A K H I K D W D H L E E F R R S L C D V A E S L N N C A Y T Q L D
UGAUUUCGAAAUUGGUCUAACCAUCA AGAUUGGAAUUAUGGAGGAGUUCAGUA GAUCCUCUGUAGUUGGUCUGAGUUGUA ACAAUUGCGGUUAUACACACAUUUGGAGC 4800

D A V G U E V H K T A P P G S F V Y K S L V K Y L S D K V L F R S L F L D G S S C
ACGCUUGGGGAGGUUCAAAAGCCGCC CACCUUGGUUGUUGUUUAAGAGUUUAG UUAAGUAUUUGUCAGUAAAGUUUUGUUA GAAGUUUUUUUCUUGGCUUAGUUGU 4920

*K G K V N I N E F I D L S K E K L L P S M F T P V K S V M V S K V D K I M V H
AAAGGUAAGGUAUUAUUAUAGUUAUUC GAUCUGUCAAGGUCGAGAAACUUCUCCG UCGAUGUUCACGCGUUAAGAGUUGUUAUG GUUUCAAAGGUAUUAAGAUUUUGGUCU 5040

E N E S L S E V N L L K G V K L I E G G Y V C L V G L V S G E W N L P D N C R
GAAAUGAAUAUUGUCUGAAGUAAUUCU UUAAGAGGUAUUAUUAAGAGGUGG UUAUUGUCUUAUGCGGUCUUGUUGUUC GSUGAGGAAUUUACAGAUUUUGGUC 5160

G G V S V C M V D K R M E R A D E A T L G S Y Y T A A A K R R F Q F K V V P N Y
GGUGGUGAGUGUCUGCAGUGGUGCAAG AGAAUGGAAAGCGGACGAGCCACACUG GGUCAUUAUACACUGCUGCUUAAAG CGGUUUCAGUUUAAGUGGUCUCCAAUC 5280

G I U T T K D A E K N I W Q V L V N I K N V K M S A G Y C P L S L E F V S V C I T V
GGUAUACCAAGGAGCAGAAAGAAC AUUAGGCGVUUGUUAUUAUUAUUAUUA GUAAAAUAGUGCGGGCUACUGCCUUUG UCAUUAAGAUUUUGUGUCUUGUUAUUGU 5400

Y K N N I K L G L R E K V T S V N D G G P M E L S E E V D E F M E N V P M S V
UUAUAAAAUUAUUAUUAUUGGUGUUGAG GAGAAGUAACGAGUGUAGCAGGAGGA CCCAUGGAACUUCAGAAAGAUUGUUGAU GAGUUCAGGAGAUUGUCCAUGCGGU 5520

R L A K F R T K S S K R G P K N N N L G K G R S G G R P K P K S F D E V E K E
AGCAUGCAAGUUGAACCAAAUUCUCA AAAAGGUGCCGAAAUUAUUAUUAUUA GUAAGGGGCGUUCAGGCGGAAGGCCUAAA CCAGAAAUUUUGAUGAAGUAAAGAG 5640

F D N L I E D E A E T S V A D S D S Y * S Y S I T S P S Q F V F L S S V W A
UUUGUAUUUGAUGAUGAUGAGGCGGAG ACUGCGGUCGCGGUAUCUGAUUCGUUAUA AUUUGUCUUAUCAUACUUCUCCUACGC AAUUGUUGUUUUUGCAUCUGUUGGCGUG 5760

D P I E L L N V C T N S L G N Q F Q T Q Q A R T T V Q Q Q F S E V W K P F P P Q S
ACCUUUAAGAAUUAACGUUGUACAA AUUCUGUAGGUUACAGUUAUCAAACGACAG AAGCAAGAAUUCUUGUUAACAGCAGUA GCGAGGUGGUAUUAUUCUCCAGCAGCA 5880

T V R F P G D V Y K V Y R Y N A V L D P L I T A L L G A F I D T R N R I E E V E N
CCGUCAGAUUUCUGGCGAUGUUUAUAGG UGUACAGGUACAUAGCAGUUAUAGAUUCUC UAAUUAUCGCGUUGCUGGGGCUUCAGUA CUAGAAUAUGAUAUUAUGAAGUAAACC 6000

Q Q S P T T A E T L D A T R R V D D A T V A I R S A I N N L V N E L V R G T G L
AGCAGAGCCGACCAACAGCGUAAAGUUG AUGUCACCGCGAGGUAAGCAGCUCUACGG UUGCAUUCGCGUUGCUUUAUUAUUAUUG UUAUUAAGCUUAAGAGGUAUGGAGUUG 6120

Y N Q N T F E S M S G L V W T S A P A S *
ACAAUCAGAAUUAUUAUUAUUGUUGUG GGUUGUCUGGACCUUCGACCCUGCAUCUU AAUUGCAUUGGUGCUUAAAUUAUUAUUG UGUUUUCAAACACACGUGGUAUCGAGU 6240

AACGUACAGUUUUUUCCUCCAUUAUUA CGAAGGUAUGUUGUUGGAGCGCGGAGU AAACAUUAUUGGUUAUUAUUGCCGUAG CACGUAAAAAGCGGAGUUCGAAUUC 6360

CCGGAACCCCGUUGGGGCCA 6383

第3図 TMVの弱毒ウイルス L₁₁A ゲノムの全塩基配列とコードされるタンパク質のアミノ酸配列および強毒ウイルスLゲノムとの比較 (NISHIGUCHI et al., 1985; OHNO et al., 1984; TAKAMATSU et al., 1983)

アミノ酸は一文字記号で各コドンの2番目の塩基上に記した(A:アラニン, C:システイン, D:アスパラギン酸, E:グルタミン酸, F:フェニルアラニン, G:グリシン, H:ヒスチジン, I:イソロイシン, K:リシン, L:ロイシン, M:メチオニン, N:アスパラギン, P:プロリン, Q:グルタミン, R:アルギニン, S:セリン, T:トレオニン, V:バリン, W:トリプトファン, Y:チロシン)。タンパク質の開始および終了コドンはおのおのアンダーラインおよび星印で示した。Lゲノムとの相違箇所では, Lの塩基を下段に, アミノ酸を上段に示し, 該当コドン全体を枠組みで示した。6336~6341塩基の~~~~はLゲノムで heterogeneity の見られた箇所。

ウイルスの感染は、宿主細胞への吸着→侵入→脱外被→タンパク質合成(複製酵素)→RNA合成(ゲノムRNA, サブゲノミックRNA)→ウイルス粒子形成(サブゲノミックRNAからのタンパク質合成の後, ゲノムRNAと外被タンパク質の集合)の経路を通ると推定される。このいずれのステップにおいても干渉作用は起こると考えられ、外見上の干渉作用はこれらの総合したものと理解される。どのステップでの干渉作用が重要(普遍的)であるか研究手法の進展とともに明らかにされるだろう。

VII 今後の展望

これまでに得られた知見を基に、それを応用していく道をさぐってみたい。その一つの方向は、より有効な方向性のある弱毒ウイルスの作出であろう。IIで少し触れたが、望ましい弱毒ウイルスとして、①目標作物に病徴を生じさせないこと、②弱毒性が安定し強毒に戻らないこと、③干渉作用の強いこと、④他の植物に感染しないか無病徴であること、⑤他種ウイルスと混合感染しても悪影響を与えないこと、⑥昆虫等のベクター媒介性が欠如していること、⑦目標作物への接種が容易であること、⑧弱毒ウイルス使用後、残留性がないこと、があげられている(本吉, 1986)。

少なくともL₁₁Aで得られた結果は弱毒性に関与する遺伝子を明らかにした点で一步前進である。さらに上記の項目に関連する機能や他のウイルスについて、遺伝子構造との結びつきを明らかにする必要がある。すでに、ウイルスのcDNAから*in vitro*で合成したRNAが感染性を持つことは、BMV(AHLQUIST et al., 1985)をはじめTMV(DAWSON et al., 1986; MESHI et al., 1986)でも報告されている。この系を使えば上記の遺伝子の構造と機能の関係も容易に明らかになるだろうし、またねらいとする遺伝子の塩基を置換させ、より有効な弱毒ウイルスの作出も可能である。

応用のもう一つの方向は、弱毒ウイルスの持つ干渉作用を植物に賦与することである。これはウイルス抵抗性植物の出現にはかならない。これには二つのアイデアが考えられ、一つは植物で発現するベクターを利用することであり、他は植物の染色体に干渉作用に関与する遺伝子を組み込むことである。

前者については、最近BMV-RNAに対するcDNAが外来遺伝子の発現ベクターとして利用できるようになった(FRENCH et al., 1986)。このようなベクターに干渉作用に関与するウイルスゲノムの断片を導入し利用することが考えられる。

植物の染色体に植物ウイルスの遺伝子を組み入れ、形質転換させる実験が報告されているが(GARDNER et al., 1984; SHEWMARKER et al., 1985; BEVAN et al., 1985; ABEL et al., 1986; BAULCOMBE et al., 1986)、いずれも形質転換した植物は外見上健全と変わらない。TMVの外被タンパク質遺伝子を組み入れた植物では、生産された外被タンパク質の量が感染植物中の約1/10を示した。このような植物に強毒ウイルスを接種すると病徴の発現を遅らせた(ABEL et al., 1986)。これは部分的な干渉作用の起こっていることを示し注目される。ウイルスゲノムの特定部分に対するアンチセンスRNAを生じる植物を作る試みも行われている(LOESCH-FRIES et al., 1986; DAHL et al., 1985)。この考えかたはRNAの量比が重要であり、大量あるいは常時存在するRNAより、少量、一時的に存在するRNAを目標にしたほうが容易かもしれない。

以上、弱毒ウイルスの分子生物学的研究とその応用について述べたが、科学の進歩は急速であり、この方面での知見はここ数年で相当に蓄積するだろう。

引用文献

- 1) ABEL, P. P. et al. (1986) : Science 232: 738~743.
- 2) AHLQUIST, P. et al. (1985a) : J. Virol. 53: 536~542.
- 3) ——— et al. (1985b) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7066~7070.
- 4) ATABEKOV, J. G. and Yu. L. DOROKHOV (1984) : Adv. Virus Res. 29: 313~364.
- 5) BAULCOMBE, D. C. et al. (1986) : Nature 321: 446~449.
- 6) BEACHY, R. N. and ZAITLIN, M. (1977) : Virology 81: 160~169.
- 7) ——— et al. (1985) : Biotechnology in Plant Science; Relevance to Agriculture in the nineteen eighties (M. ZAITLIN, P. DAY, A. HOLLANDER eds.), Academic Press, NY, pp. 265~275.
- 8) BEVAN, M. W. et al. (1985) : EMBO J. 4: 1921~1926.
- 9) BOCCARA, M. et al. (1986) : *ibid.* 5: 223~229.
- 10) BROADBENT, L. (1976) : Ann. Rev. Phytopathol. 14: 75~96.
- 11) CASSELLS, A. C. and C. C. HERRICK (1977) : Virology 73: 253~260.
- 12) CORNELISSEN, B. J. C. and J. F. BOL (1984) : Plant Molec. Biol. 3: 379~384.
- 13) COSTA, A. S. and G. W. MÜLLER (1980) : Plant Dis. 64: 538~541.
- 14) DAHL, G. A. et al. (1985) : Abstracts of 1st International Congress of Plant Mol. Biol., p. 149.
- 15) DAWSON, W. O. et al. (1986) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1832~1836.
- 16) FLETCHER, J. T. and J. M. ROW (1975) : Ann. Appl. Biol. 81: 171~179.
- 17) FRAENKEL-CONRAT, H. (1974) : Comprehensive Virology (FRAENKEL-CONRAT, H. and R. R. WAGNER, eds.), Plenum Press, vol. 1, pp. 1~191.
- 18) FRASER, R. S. S. (1985) : Mechanisms of Resistance to Plant Diseases (R. S. S. FRASER ed.), Nijhof/Junk, Dordrecht, pp. 373~404.

- 19) FRENCH, R. et al. (1986) : Science 231 : 1294~1297.
 20) GARDNER, R. C. et al. (1984) : Plant Mol. Biol. Rep. 2 : 3~8.
 21) GOELET, P. et al. (1982) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 5818~5822.
 22) 後藤忠則・根本正康 (1971) : 北農試彙報 99 : 67~76.
 23) ——— (1984) : 植物防疫 38 : 349~352.
 24) GUILLEY, H. et al. (1979) : Nucleic Acids Res. 6 : 1287~1308.
 25) HAMILTON, R. I. (1985) : Hort. Sci. 20 : 848~851.
 26) HASELOFF, J. et al. (1984) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 4358~4362.
 27) HOLMES, F. O. (1934) : Phytopathology 24 : 845~873.
 28) IZANT, J. G. and H. WEINTRAUB (1984) : Cell 36 : 1007~1015.
 29) JOSHI, S. et al. (1983) : Virology 127 : 100~111.
 30) KIBERSTIS, P. A. et al. (1983) : FEBS Lett. 164 : 355~360.
 31) KIHO, Y. and M. NISHIGUCHI (1984) : Microbiol. Immunol. 28 : 589~599.
 32) KUNKEL, L. O. (1934) : Phytopathology 24 : 437~466.
 33) LEONARD, D. A. and M. ZAITLIN (1982) : Virology 117 : 416~424.
 34) LOESCH-FRIES, S. et al. (1986) : J. Cell. Biochem. Supplement 10C, p. 41.
 35) MATTHEWS, R. E. F. (1981) : Plant Virology, Academic Press, New York, 897pp.
 36) MCKINNEY, H. H. (1929) : J. Agric. Res. 39 : 557~578.
 37) MESH, T. et al. (1986) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 5043~5047.
 38) MILLER, W. A. et al. (1985) : Nature 313 : 68~70.
 39) MIZUNO, T. et al. (1984) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1966~1970.
 40) 本吉総男・西口正通 (1984) : 植物防疫 38 : 353~357.
 41) ——— (1986) : 研究ジャーナル 9 : 22~25.
 42) 長井雄二 (1984) : 植物防疫 38 : 345~352.
 43) NISHIGUCHI, M. et al. (1978) : J. Gen. Virol. 39 : 53~61.
 44) ——— et al. (1980) : ibid. 46 : 497~500.
 45) 西口正通ら (1981) : 日植病報 47 : 121.
 46) NISHIGUCHI, M. et al. (1982) : Plant Tissue Culture 1982 (A. FUJIWARA ed.), Maruzen, Tokyo, pp. 665~666.
 47) 西口正通 (1982) : 昭和 57 年度植物感染機作・病理化学談話会講要, pp. 116~122.
 48) NISHIGUCHI, M. et al. (1985) : Nucleic Acids Res. 13 : 5585~5590.
 49) 西口正通ら (1986) : 日植病報 52 : 564.
 50) OHNO, T. et al. (1983) : Virology 131 : 255~258.
 51) ——— et al. (1984) : J. Biochem. 96 : 1915~1923.
 52) 大島信行ら (1965) : 北農試彙報 85 : 23~33.
 53) PALUKAITIS, P. and M. ZAITLIN (1984) : Plant Microbe Interactions : Molecular and Genetic Perspectives (KOSUGE, T. and NESTER, E. W. eds.), Macmillan, NY-London, Vol. 1, pp. 420~429.
 54) PELHAM, H. R. B. (1978) : Nature 272 : 469~471.
 55) RAST, A. Th. B. (1972) : Neth. J. Plant Pathol. 78 : 110~112.
 56) REZAIN, M. A. et al. (1984) : Eur. J. Biochem. 143 : 277~284.
 57) SAKAI, F. and I. TAKEBE (1974) : Virology 62 : 426~433.
 58) SALAMAN, R. N. (1937) : Nature 139 : 924~925.
 59) SARKER, S. and P. SMITAMANA (1981) : Mol. Gen. Genet. 184 : 158~159.
 60) SASAKI, A. (1979) : Rev. Plant Prot. Res. 12 : 80~87.
 61) SEQUEIRA, L. (1984) : Trends Biotechnol. 2 : 25~29.
 62) SHALLA, T. A. et al. (1982) : J. Gen. Virol. 60 : 355~358.
 63) SHEWMARKER, C. K. et al. (1985) : Virology 140 : 281~288.
 64) SULZINSKI, M. A. et al. (1985) : ibid. 145 : 132~140.
 65) TAKAMATSU, N. et al. (1983) : Nucleic Acids Res. 11 : 3767~3778.
 66) TALIANSKY, M. E. et al. (1982) : Virology 122 : 318~326.
 67) WATANABE, Y. et al. (1984a) : ibid. 133 : 18~24.
 68) ——— et al. (1984b) : FEBS Lett. 173 : 247~250.
 69) ——— et al. (1986) : Virology 149 : 64~75.
 70) WINGARD, S. A. (1928) : J. Agric. Res. 37 : 127~153.
 71) YEH, S.-D. and D. GONSALVES (1984) : Phytopathology 74 : 1086~1091.
 72) ZAITLIN, M. and V. HARIHARASUBRAMANIAN (1972) : Virology 47 : 296~305.
 73) ——— and P. PALUKAITIS (1983) : Replication of Viral and Cellular Genomes (Y. BECKER ed.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 329~343.
 74) ZIMMERN, D. (1975) : Nucleic Acids Res. 2 : 1189~1201.
 75) ——— and T. HUNTER (1983) : EMBO J. 2 : 1893~1900.

本会発行図書

「植物防疫」総目次

B5判 63 ページ 定価 1,200 円 送料 200 円

昭和 22 年 4 月に創刊された雑誌「農薬」(農薬協会発行)から「農薬と病虫」へと経てきた雑誌「植物防疫」の創刊号から第 36 巻(昭和 57 年 12 月号)までの総目次。項目別に見やすく編集。植物防疫研究者の必読雑誌である「植物防疫」の総目次をという御要望にこたえて発行!

お申込みは前金(現金・振替・小為替)で本会へ

サテライト RNA 置換による弱毒 CMV の作出

北海道農業試験場 よし
吉 だ
田 こう
幸 じ
二

はじめに

植物ウイルス病を防除するにはウイルス間の干渉作用を利用した方法が有効であり、タバコモザイクウイルスでは熱処理、キュウリ緑斑モザイクウイルスでは亜硝酸と紫外線処理により弱毒株が作出され、またカンキョトリステザウイルスでは自然界に存在する弱毒株利用により、それぞれ弱毒ウイルスの実用化が進んでいる。

一方、キュウリモザイクウイルス (CMV) は野菜に発生の多い重要なウイルスにもかかわらず有効な弱毒ウイルスは開発されていなかった。そこで筆者は CMV の病徴を軽減化させるサテライト RNA の利用により CMV の弱毒化を図り、それらを用いてトマトに発生する CMV の防除方法を検討したのでここに紹介する。

I キュウリモザイクウイルス

CMV は、トマト、ピーマン、キュウリ、メロンなど多くの野菜に感染して大きな被害を及ぼすほか、草花や樹木などにも感染する代表的な植物ウイルスの一つで、このウイルスは主としてアブラムシにより伝搬されることが知られている。このほかメロン、トマトでは芽かき作業等の接触によっても二次感染が起こることが報告されている。

病原ウイルスの粒子は径 30 nm の球形で、ウイルスの核酸分子は 1 本鎖 RNA であり、通常分子量の異なる四つの RNA から成り立ち、分子量の大きい順に RNA1, RNA2, RNA3, RNA4 と呼ばれている。さらに、RNA を五つ含む CMV も知られ、この余分な 5 番目の RNA は RNA5 あるいはサテライト RNA と呼ばれている。サテライト RNA は他の 4 種の RNA と比べて分子量が最小であることから密度勾配遠心分離法や電気泳動法により他の RNA から単離でき、そのさまざまな機能について研究が進んでいる。

II サテライト RNA の機能

サテライト RNA は CMV 以外の病原ウイルスでも

Attenuated Isolates of Cucumber Mosaic Virus
Produced by Replacing the Satellite RNA. By
Kouji YOSHIDA

その存在が知られている。いずれの場合もウイルス本体の増殖に不可欠なものではないことからサテライト (付随の) RNA と呼ばれているが、そのうちいくつかのものはウイルスが寄生した植物の病徴の強弱に関与することが知られている。CMV のサテライト RNA の場合も同様で、CMV に感染したトマトに現れるえそ症状とサテライト RNA とは深い関係があることが知られている。

トマトにえそ症状を生じる "tomato necrosis" はすでに 1972 年にフランスのアルサク地方に発生し大打撃を与えている。1977 年には、KAPER らにより tomato necrosis の病原は CMV であり、CMV 中の RNA5 が関与することが明らかにされた。そして KAPER らは CMV の RNA5 を CARNA5 と呼んだ。その後、RNA5 は単独では複製できず、複製には CMV の RNA1, RNA2, RNA3 を必要とするサテライト RNA であることがわかった。さらに MOSSOP と FRANCKI (1979), KAPER ら (1981) のトマトにえそを生じない Sat-RNA や (1) CARNA5, GONSOLVES ら (1982) の tomato white leaf を生じる CMV-WL RNA5, TAKANAMI (1981) のタバコの黄化やトマトにえそを生じるサテライト RNA など、生物学的性質が異なるもの大きさが近似しているいくつかのサテライト RNA の存在が明らかとなっている。いくつかのサテライト RNA ではその全塩基配列が明らかにされ比較されているが、その一次構造の違いと生物学的性質の違いの関連性は依然として明らかではない。

III CMV から検出したサテライト RNA

北海道で発生する CMV からは 2 種の異なったサテライト RNA が見つかった。一つはトマトのえそ症状株から分離した CMV に含まれるもので、トマトのえそ症状の発現に関与する。他の一つはトマトの糸葉症状株から分離した CMV に含まれ、トマトでの CMV の病徴を軽減化することが明らかになっている。

I トマトのえそ症状株から得られた CMV に含まれるサテライト RNA

1982 年に北海道南部のハウス抑制栽培トマトで、茎、葉柄、葉、果実にえそ症状を現す株が多発し、トマト栽

第1表 CMV-P(n) より得たサテライト RNA とトマトのえそ症状の関係

供試ウイルス	試験 1 ^{a)}		試験 2 ^{a)}		試験 3 ^{a)}	
	N	(m)	N	(m)	N	(m)
CMV-P (トウガラシ系統)	0	3	0	3	0	3
CMV-P (トウガラシ系統) + (n)RNA5 ^{b)}	3	0	3	0	3	0
CMV-P (No. 2) ^{c)}	0	3	0	3	0	3
CMV-P (No. 2) + (n)RNA5	3	0	3	0	3	0

a) 供試トマト3株の病徴および株数 N: えそ症状, (m): 時に軽いモザイク

b) CMV-P(n) より電気泳動で分離したサテライト RNA

c) CMV-P(n) より単病斑分離で得たトマトにえそを生じない分離株

第2表 サテライト RNA ((n)RNA5) 添加ウイルスにおける RNA 産生の変化

供試ウイルス	RNA 成分の比率 (%)					ウイルスの収量 (mg/kg)
	RNA1	RNA2	RNA3	RNA4	RNA5	
CMV-P (トウガラシ系統)	19.6	32.3	33.8	14.2	—	108.0
CMV-P (トウガラシ系統) + (n)RNA5	16.5	22.3	29.5	11.6	20.1	62.3
CMV-P (No. 2)	21.9	28.7	34.2	15.2	—	70.4
CMV-P (No. 2) + (n)RNA5	13.5	22.6	28.8	21.2	21.2	45.2

培農家に深刻な打撃を与えた。これらの株からは CMV が分離され、CMV に起因するウイルス病であることが明らかにされた。またこの CMV (CMV-P(n)) はサテライト RNA を含み、それがトマトのえそ症状発現に関与することが判明した。

CMV-P(n) の感染葉の粗汁液をトマトに汁液接種すると、トマトは茎や葉にえそを生じ、激しい場合は枯死する。CMV-P(n) を純化し、1% になるようにラウリル硫酸ナトリウムを加えたのち 40°C 10 分間放置し、外皮タンパク質を崩し RNA を遊離させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行い、トルイジンブルー-O で RNA の染色を行ったところ5本のバンドを検出できた。この結果、RNA が五つ存在し、サテライト RNA を含むことが明らかになった。

これとトマトのえそ症状の発現との関係を明らかにするため、CMV-P(n) からサテライト RNA の除去を行った。CMV-P(n) の感染葉の粗汁液をササゲ (黒種三尺) に接種し、2~4 日後に生じたえそ斑点を1個ずつ切り取り、1~2 滴のリン酸緩衝液 (チオグリコール酸を含む) を加えてすりつぶし、キサンチタバコに接種した。発病葉の粗汁液をトマトに接種したところ、12 株中5株ではトマトはえそ症状を現したが、7株では軽いモザイクを現すのみでえそ症状とはならなかった。後者をキサンチタバコで増殖、純化のち PAGE を行ったところサテライト RNA は除去されており、原株の持つサテライト RNA がトマトのえそ症状発現に関与する

ことが示唆された。

純化した CMV-P(n) から PAGE を繰り返して単離した (n)RNA5 を、サテライト RNA を含まない、かつトマトにえそ症状を現さない CMV-P (トウガラシ系統) および CMV-P (No. 2) に混合してトマトに接種した結果は第1表のとおりであった。サテライト RNA を含まない2分離株はトマトに軽いモザイクを現すのみであったが、サテライト RNA ((n)RNA5) を加えることによりトマトに激しいえそ症状を現した。このサテライト RNA はこれ以外の CMV-Y, CMV-O (No. 138) に混合した場合も同様にトマトにえそ症状を現し、このサテライト RNA がトマトのえそ症状発現に関与することが明らかになった。

一方、キサンチタバコでの病徴はサテライト RNA を加えることにより逆に軽減した。このサテライト RNA を加えた場合、キサンチタバコでの CMV の増殖や RNA の成分の比率の変化を見たのが第2表である。サテライト RNA は、CMV の増殖を抑制し、それぞれの RNA 成分を減少させた。またサテライト RNA 自身は多量に増殖した。

2 トマトの糸葉症状株から得られた CMV に含まれるサテライト RNA

トマトの糸葉症状株から分離した CMV-PF (fl) はキサンチタバコで増殖、純化し PAGE を行ったところ多量のサテライト RNA を含んでいたが、トマトにはえそ症状は現さなかった。この CMV-PF (fl) をササゲ

第3表 サテライト RNA ((f)RNA5) を除去または添加した CMV 系統接種によるトマトの病徴

系統または分離株	(f)RNA5	
	無 添 加	添 加
CMV-Y	黄斑モザイク・萎縮	軽い黄斑モザイク
CMV-O (No. 138)	モザイク・萎縮	軽いモザイク
CMV-P (トウガラシ系統)	軽いモザイク・奇形	ごく軽いモザイク
CMV-P (No. 2)	軽いモザイク	無病徴
CMV-P (No. 7)	軽いモザイク	無病徴

第4表 採集した CMV とキサンチタバコの病徴

キサンチタバコの病徴	分 離 株 数
モザイク・奇形	97
モザイク・軽い奇形	8
モザイク	32
軽いモザイク	5
計	142

に接種し、単病斑分離によって得たウイルス株から PAGE によりサテライト RNA ((f) RNA5) を除去した。このサテライト RNA を除去して得た株 CMV-PF(No. 1) は、サテライト RNA を含む CMV-PF(f) に比べ、キサンチタバコ、トマトなど多くの植物で病徴が激しくなり、原株(後者)に比べて病徴に差異が見られ、それに含まれるサテライト RNA が病徴の軽減に関与すると考えられた。このため、CMV-PF(f) を純化し、PAGE により単離、精製したサテライト RNA ((f) RNA5) を、サテライト RNA を含まない CMV に添加し、トマトに接種した結果(第3表)、いずれの場合もトマトの病徴を軽減させることがわかった。キサンチタバコを用いた場合も同様な効果が認められた。

3 各種植物からのサテライト RNA を含む CMV の探索

1984, 1985 年の2年間、北海道各地の各種植物から数種検定植物を用いて CMV を分離し、サテライト RNA の存否を調べた。このため、CMV の各分離株に感染したキサンチタバコを2容のクエン酸緩衝液(チオグリコール酸を含む)と1容のクロロホルムですりつぶし、10,000 rpm で15分間遠心分離して得た上澄みを、40,000 rpm で90分間遠心分離した。得られた沈殿をリン酸緩衝液で溶かした後、1% になるようにラウリル硫酸ナトリウムを加え 40°C 10分間放置し、その後 PAGE を行いサテライト RNA の存否を調べた。

サテライト RNA を含む CMV は、サテライト

第5表 PAGE によるサテライト RNA の検出

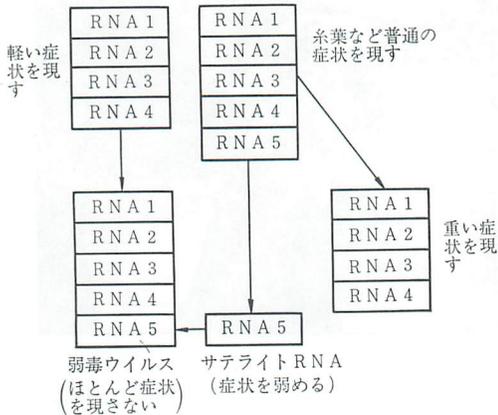
キサンチタバコの病徴	供試株数	サテライト RNA	
		有	無
モザイク・奇形	12	2	10
モザイク・軽い奇形	5	1	4
モザイク	20	20	0
軽いモザイク	5	4	1
計	42	27	15

RNA を含まない CMV に比較して、キサンチタバコでの病徴が軽減化する傾向にあるので、CMV 分離株をキサンチタバコに接種して病徴別に類別した。その結果は第4表のとおりであった。1984 年度採集株については、そのうちサテライト RNA を含んでいる可能性が高い(キサンチタバコの病徴が比較的軽い)分離株を中心に42株選び PAGE を行った。42株中27株の CMV 分離株でサテライト RNA が含まれていた(第5表)。

サテライト RNA を含む CMV の27株をそれぞれトマトに接種したところ、12株はトマトにえそ症状を現したが、15株はえそ症状とはならず、後者を一次ウイルスとしてトマトに接種し、二次ウイルスとしてサテライト RNA を含むトマトにえそ症状を発現させる CMV-P(n) を接種しても、トマトはえそ症状とならず干渉効果が認められた。通常、一次ウイルスにサテライト RNA を含まない CMV を用いると、CMV-P(n) に対して干渉効果はなくえそ症状となることから、一次ウイルスに含まれるサテライト RNA が CMV-P(n) のサテライト RNA に対して干渉効果を示すものと考えられる。

1985 年度採集株については全株で PAGE を行ったが、23株がサテライト RNA を含む、そのうち5株はトマトにえそ症状を現したが、18株ではトマトはえそ症状とならなかった。また、1984 年度採集株ほど顕著ではなかったが、キサンチタバコにモザイクのみを現す CMV にサテライト RNA が含まれていることが多く、逆に奇形を伴う CMV には含まれることが少ない傾向が見られた。

これら採集されたサテライト RNA を含む CMV のうち、トマトにえそを生じる株が分離された植物は、トマト、メロン、キュウリ、カボチャ、ダイコン、ハウレンソウ、ヒャクニチソウ、ヤチヌガラシ、スカシタゴボウ、ツクサである。一方、サテライト RNA を含むがトマトにえそを生じない株は、トマト、メロン、キ



第1図 キュウリモザイクウイルス (CMV) の弱毒ウイルスの作出法

キュウリ, カボチャ, ホウレンソウ, スカシタゴボウ, スベリヒユから分離された。

IV CMV の弱毒株の作出

先にも述べたように、CMV-PF (f) に含まれるサテライト RNA ((f) RNA5) は、各種植物での CMV の病徴を軽減化する作用がある。CMV-PF (f) から (f) RNA5 を除去して得た CMV-PF (No. 1) はキサンチタバコに強い黄色モザイクを生じるとともに、奇形や萎縮を伴う激しい病徴を現す。一方、この CMV-PF (No. 1) に (f) RNA5 を加えると、モザイクや、奇形、萎縮が軽くなり、CMV-PF (f) と同程度の病徴を現すようになる。しかし、CMV-PF (No. 1) は病徴が本来強いものであるため、これに (f) RNA5 を加えても無病徴化には至らず、モザイクや軽い奇形を伴っていた。また、キサンチタバコ以外の植物に対する反応でも、CMV-PF (f) はサテライト RNA を含まない CMV-PF (No. 1) よりも病徴は軽いものの、かなり強い病徴を現すことがある。トマトでも、この CMV-PF (f) はサテライト RNA を含んでいるにもかかわらず感染したトマトはモザイクや糸葉症状を現す。サテライト RNA を含まない CMV-P (トウガラシ系統) や、CMV-P(n) からサテライト RNA を除去して得た CMV-P (No.2) や CMV-P (No. 7) は、いずれもトマトに軽い病徴しか現さない。これらに (f) RNA5 を加えると第3表に示すようにトマトにほとんど病徴を現さない弱毒株が得られた。つまり、CMV の軽症株に、CMV-PF (f) に含まれる CMV の病徴を軽減化させるサテライト RNA ((f) RNA5) を添加することにより弱

第6表 サテライト RNA ((f) RNA5) を加えた弱毒株による強毒株に対する干渉効果

一次ウイルス	二次ウイルス	病徴
— CMV-P (No. 2) CMV-P (No. 2) + (f) RNA5	CMV-O (No. 138) 〃 〃	モザイク・萎縮 軽いモザイク なし
— CMV-P (No. 2) CMV-P (No. 2) + (f) RNA5	CMV-P (n) 〃 〃	えそ症状 なし
— CMV-P (No. 2) CMV-P (No. 2) + (f) RNA5	— — —	なし 軽いモザイク なし

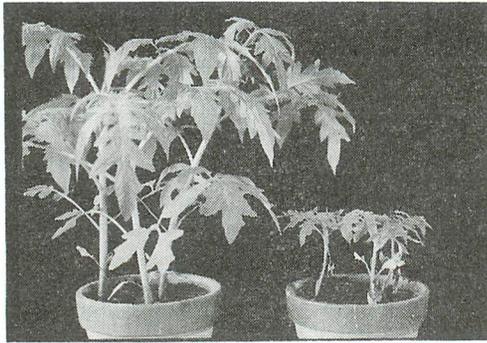
毒株が得られた。その作出の概略図を示すと第1図のようになる。こうして得た弱毒株を用いて弱毒ウイルスとしての利用を検討した。

V 弱毒株による干渉効果

先の方法で作出した弱毒株を一次ウイルスとしてトマトに接種し、干渉効果を利用した防除方法を検討した。一次ウイルス接種 12 日後に二次ウイルスを接種し、その後 30~40 日間発病調査を行った。その結果は第6表に示すとおりである。一次ウイルスとしてはサテライト RNA を含まない CMV-P (No. 2) および CMV-P (No. 2) に (f) RNA5 を加えて作出した弱毒株を用いた。二次ウイルスには、トマトにモザイクと萎縮を生じる CMV-O (No. 138) でサテライト RNA を含んでいないウイルスおよびトマトにえそ症状を生じる CMV-P (n) でサテライト RNA を含んでいるウイルスを供試した。その結果、サテライト RNA を含む弱毒株は CMV-O (No. 138), CMV-P (n) のいずれに対しても干渉効果を示した (第2, 3 図)。一方、サテライト RNA を含まない CMV-P (No. 2) は、サテライト RNA を含む CMV-P (n) に対しては干渉効果を示さなかった。この結果は、サテライト RNA に起因するトマトのえそ症状を防ぐには弱毒株にサテライト RNA が含まれることが必須であることを示している。

さらに、弱毒株 CMV-P (No. 2) + (f) RNA5 をトマトに接種後、干渉効果の持続期間を調べたのが第7表である。この場合、えそを生じる CMV-P (n) またはモザイクを生じる CMV-O (No. 138) の両系統に対し、弱毒株 CMV-P (No. 2) + (f) RNA5 は接種 60 日後でも干渉効果を示している。

次に弱毒株をトマトに接種し、12 日後に二次ウイルス



第2図 左：弱毒化した CMV を接種したのち、強毒株 (モザイクや萎縮を生じる CMV) を接種したトマト。モザイクや萎縮症状は現れない。
右：強毒株 (モザイクや萎縮を生じる CMV) だけを接種したトマト。葉にモザイク症状が現れ、生長が遅れる。



第3図 左：弱毒化した CMV を接種したのち、強毒株 (えそを生じる CMV) を接種したトマト。えそ症状は現れない。
右：強毒株 (えそを生じる CMV) だけを接種したトマト。えそを生じて枯れる。

第7表 CMV-P (No. 2) + (fl)RNA5 の CMV-P(n) と CMV-O (No. 138) に対する干渉効果

一次ウイルス	二次ウイルス	12 日 目 ^{a)}			35 日 目			60 日 目		
		M ^{b)}	SN	—	M	SN	—	M	SN	—
— CMV-P (No. 2) + (fl)RNA5	CMV-P(n) CMV-P(n)	9 ^{c)} 0	0 9		5 0	4 9		8 0	1 9	
— CMV-P (No. 2) + (fl)RNA5	CMV-O (No. 138) CMV-O (No. 138)	9 0	0 9		9 0	0 9		9 0	0 9	

a) 一次接種と二次接種の接種間隔
b) M：強い斑紋，SN：茎のえそ症状，—：無病徴
c) トマト (福寿2号) の供試9株中の発病株数

スの強毒株を接種して、温室内で育て、接種47日後に生育の違いを調べた。ウイルスを接種しないトマト (対照) では、苗は草丈 40.7 cm、重さ 34.8 g まで生育した。また、トマトにえそ症状を現す CMV-P(n) を接種した場合は全株とも枯れ、モザイクを現す CMV-O (No. 138) の接種では、葉にモザイクを生じ、株は萎縮し草丈 27.9 cm、重さは 13.1 g にとどまった。しかし、最初に弱毒株を接種し、12日後に強毒株を接種したトマトでは、いずれの場合も強毒株による病徴は現れず、草丈や重さも無接種の株とほとんど差がなかった。また、弱毒株だけ接種した株は、草丈 43.3 cm、重さ 37.1 g まで生育した。

このように CMV の弱毒株を先にトマトの苗に接種しておく、あとで強毒の CMV を接種してもほとんど生育障害が認められず、弱毒株接種による予防効果が認められた。

おわりに

CMV に感染した植物の症状を軽減させるサテライト RNA を見だし、これを他の CMV とうまく組み合わせることにより CMV の弱毒化が可能となり、トマトの CMV 防除のための弱毒ウイルスの人為的作出に新たな道が開かれた。

CMV による、トマトの病徴の軽減化に関与するサテライト RNA は MOSSOP と FRANCKI (1979) によっても見いだされ、そのサテライト RNA は特定の系統と組み合わせるとトマトでの病徴が軽減すると報告されている。また、TIEN と CHANG (1984) によりトマト、ピーマンにおいて同様な手法による弱毒ウイルスの作出および利用の研究が進められている。将来的には、サテライト RNA と組み合わせる CMV は必ずしも軽症株ではなく、サテライト RNA と親和性の高い CMV をう

まく選べば弱毒株の作出は可能かもしれない。このような原理ないし干涉の応用により、CMV の被害が大きいピーマンやメロンなど、トマト以外の作物についても適用できる弱毒ウイルスの作出とその利用が期待される。

引用文献

1) GONSALVES, D. et al. (1982) : *Phytopathology* 72 :

- 1533~1538.
 2) KAPER, J. M. and H. E. WATERWORTH (1977) : *Science* 196 : 429~431.
 3) ——— et al. (1981) : *Virology* 114 : 526~533.
 4) MOSSOP, D. W. and R. I. B. FRANCKI (1979) : *ibid.* 95 : 395~404.
 5) TAKANAMI, Y. (1981) : *ibid.* 109 : 120~126.
 6) TIEN, P. and X. H. CHANG (1984) : Abstracts of Sixth International Congress of Virology (Sendai), p. 379.

新しく登録された農薬 (61.9.1~9.30)

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〕、対象作物:対象病虫害:使用時期及び回数などの順。ただし、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 16472~16525 まで計 54 件)

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

『殺虫剤』

BPMC・PAP 粉剤

BPMC 3.0%, PAP 2.0%

エルサンバッサ粉剤 30DL (61.9.8)

16481 (日産化学工業)

稲:ニカメイチュウ・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・カメムシ類・イネツトムシ:7日4回

チオメトン乳剤

チオメトン 25.0%

エカチン (61.9.8)

16486 (北海三共)

かんきつ:アブラムシ類・ハダニ類・ミカントゲコナジラミ:150日2回,りんご・かき:アブラムシ類・ハダニ類:90日3回,なし:アブラムシ類・ハダニ類・ナシグンバイ:90日3回,もも:アブラムシ類・ハダニ類:45日3回,うめ:アブラムシ類:30日5回,きゅうり:アブラムシ類・ナミハダニ:7日5回,すいか・メロン:アブラムシ類・ナミハダニ:14日3回,まくわうり・かぼちゃ・しろうり:アブラムシ類:14日3回,なす:アブラムシ類・ハダニ類:7日5回

チオンクラム・NAC 粉剤

チオンクラム 1.0%, NAC 1.5%

エビセクトナック粉剤 DL (61.9.8)

16492 (三共), 16493 (北海三共)

稲:イネドロオイムシ:14日4回

ピリダフェンチオン・BPMC・PAP 粉剤

ピリダフェンチオン 1.0%, BPMC 2.0%, PAP 2.0%

エルオフバッサ粉剤 DL (61.9.8)

16495 (日産化学工業)

稲:ニカメイチュウ・ウンカ類・ツマグロヨコバイ・イナゴ:21日3回

ピリダフェンチオン・PAP 粉剤

ピリダフェンチオン 1.5%, PAP 1.5%

エルサンオフナック粉剤 DL (61.9.8)

16496 (日産化学工業)

稲:イネドロオイムシ:21日3回

ダイアジノン・ピリダフェンチオン・MTMC 粉剤

ダイアジノン 2.0%, ピリダフェンチオン 2.0%,

MTMC 2.0%

ダイアジノンオフナックM粉剤 DL (61.9.13)

16522 (サンケイ化学)

稲:コブノメイガ・ツマグロヨコバイ・ウンカ類:21日3回

『殺菌剤』

トリシクラゾール・メプロニル水和剤

トリシクラゾール 10.0%, メプロニル 25.0%

ビームバンタックゾル (61.9.8)

16483 (クミアイ化学工業)

稲:いもち病・紋枯病:21日3回

銅・バリダマイシン・フサライド粉剤

塩基性塩化銅 8.4%, バリダマイシン 0.30%, フサライド 2.5%

ラブバリダボルドー粉剤 DL (61.9.8)

16507 (北興化学工業), 16508 (武田薬品工業)

稲:いもち病・紋枯病・稲こうじ病:出穂 10日4回

トリクラミド粉剤

トリクラミド 10.0%

ハタクリン粉剤 10 (61.9.13)

16515 (北海三共)

はくさい・キャベツ:根こぶ病:播種又は移植前:土壌全面混和・作条混和,かぶ:根こぶ病:播種又は移植前:根くびれ病:播種前:作条混和,だいこん:亀裂褐変症(アフノミセス菌):播種前:土壌全面混和・作条混和,のざわな・なばな:根こぶ病:播種前:土壌全面混和,さやえんどう:根腐病(アフノミセス菌):播種前:土壌全面混和,ばれいしょ:そうか病・粉状そうか病:土壌全面混和・作条混和

(48 ページに続く)

CMV の弱毒系統によるトマト CMV モザイク病の防除の試み

埼玉県園芸試験場 **善林六郎**
 農林水産省農業環境技術研究所 **かめ亀** **や谷** **みつ満** **ろう朗**

はじめに

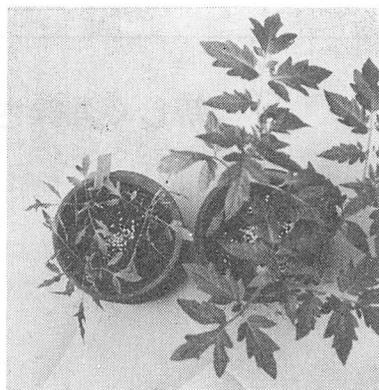
春から秋にかけて栽培される露地栽培トマトにはキュウリモザイクウイルス (CMV) によるモザイク病の発生が多く、大きな被害を起している。CMV に対して、トマトでは実用的な抵抗性品種がなく、弱毒ウイルスによる防除が望まれ、また、試みられてきた。

CMV には普通系、黄斑系その他多くの系統が知られており、それぞれトマトなどにおける病徴の程度が異なっている。タバコ、キュウリなどに軽い病徴を生ずる分離株や無病徴のものが知られている。その一つである P 系統 (フキより分離された CMV: 栃原・田村, 1976) は多くの植物における病徴が他の系統より軽く、タバコ (Ky-57) では接種 5~7 日後ころから新葉の 1~3 枚にモザイクを生じるが、生育が進むにつれて病徴は不明りょうとなる。キュウリ (はつかり) ではまったく病徴が見られない。これらのことから、弱毒ウイルスとして利用できるかどうか試験されたこともある。しかし、病原性が弱いといっても多くの植物に病徴を生ずるといふ難点があったものと思われる。

また、タイ国のウイングドビーンから分離された CMV はタバコにまったく病徴を生じなかった (土崎ら, 1982)。この分離株については CMV-Y との干渉作用試験がなされ、CMV-Y の発病をかなり遅らせたが、1 か月過ぎから病徴を生ずるようになり、感染を完全に防ぐことはできなかった。

このようにタバコに対して CMV の軽症系統を用いたモザイク病の防除試験はなされてきたが、トマトに対しては試験されなかった。

筆者らにより、縮葉症状を生じているハウレンソウから分離された CMV (CMV-SR) はトマトに全身感染するがまったく病徴を生じないことから、CMV の弱毒ウイルスとして利用できる可能性があると考え、CMV 普通系に対する干渉試験を行ったところ、高い干渉作用



第1図 CMV-SR の強毒 CMV に対するトマトでの干渉効果
 右: CMV-SR を前接種した後強毒 CMV を接種した株
 左: 強毒 CMV だけを接種した株

が認められたので、実用化試験を行った (第1図)。干渉試験などの詳細は日植病報 (岩木ら, 投稿中) を見ていただくとして、ここでは、CMV-SR の性質とその実用化の試験結果を中心にその概要を述べてみたい。

I CMV-SR の諸性質

1979 年ころ埼玉県北部地域のハウレンソウに葉身が細くなり、縮葉症状を示す病害が発生し、その病原ウイルスは CMV であることが明らかとなった。この CMV はハウレンソウに縮葉症状だけを生じ、モザイクなどを生じないことなどから、ハウレンソウ縮葉系統 (CMV-SR) と名づけられた (善林ら, 1983)。CMV-SR は多くの植物での病徴が軽く、特にトマト、キュウリ、タバコ (ブライトエロー、キサンチ nc) などには全身感染するが、病徴をまったく生じなかった。いくつかの植物に生じた病徴もこれまで軽症といわれてきた P 系統より、さらに軽いものであった。数種植物における CMV-SR と P の病徴を比較すると第1表のようであった。CMV-SR はハウレンソウに縮葉症状を起し、フダンソウ、テンサイに全身的な退緑斑点、*Nicotiana clevelandii*, *N. debneyi* (第2図), *N. glutinosa* (第3図)、サムスタバコに軽いモザイクを生じたほか、

Utilization of an Attenuated Strain of Cucumber Mosaic Virus for Control of Tomato Mosaic Disease Caused by Cucumber Mosaic Virus. By Rokuo ZENBAYASHI and Mitsuro KAMEYA

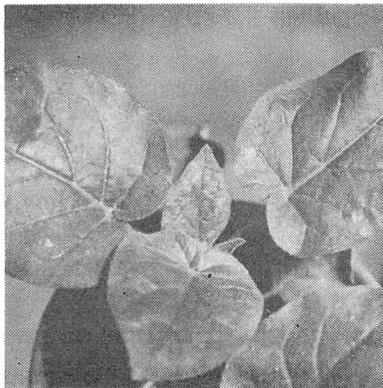
第1表 CMV-SR と CMV-P の数種植物上の病徴の比較

植 物 名 (品種)	CMV-SR		CMV-P	
	接 種 葉	上 葉	接 種 葉	上 葉
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Lc	—	Lc	—
<i>C. quinoa</i>	Ln	—	Ln	—
フダンソウ (白茎)	l	CS	Lc	s
テンサイ	l	CS	Lc	s
ハウレンソウ (10 品種)	l	R	l	R,m
トマト (福寿2号, 強力米寿, サターンなど)	l	s	l	m
<i>Nicotiana clevelandii</i>	l	m
<i>N. debneyi</i>	l	m	l	m
<i>N. glutinosa</i>	l	m	l	M
タバコ (ブライトエロー, キサンチ nc)	l	s	l	M
ク (サムスン)	l	m
ナス (千両2号)	—	—	l	m
ピーマン	l	M
キュウリ (ときわ光3-P)	l	S	l	m

Lc: 退緑性局部病斑, Ln: えそ性局部病斑, CS: 退緑斑点, m: 軽いモザイク, M: モザイク, R: 縮葉, l, s: 接種葉および上葉における無病徴感染, —: 感染しなかったこと, ..: 病徴不明, を示す。



第2図 CMV-SR に感染した *Nicotiana debneyi* の病徴



第3図 CMV-SR に感染した *Nicotiana glutinosa* の病徴

ピーマンにはかなり明りょうなモザイクを生じた。これらの病徴もフダンソウ, テンサイを除いてP系統より軽いものであった。

センニチコウ, シュンギク, ヒャクニチソウ, ペチュニアには無病徴で全身感染した。*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* のほか, ブラックアイカウピー, 黒種三尺ササゲにも局部病斑を生じたが, これらの病斑は普通系などに比して明らかに小型であった。ナス, スイカ, ニホンカボチャ, メロン, ハクサイ, ダイコン, キャベツ, カブ, ニンジン, オクラ, ネギ, ゴマ, デントコーン, ソルガム, イタリアンライグラスなどには感染しなかった。

CMV-SR に含まれる核酸成分はその電気泳動で4種類のRNAを含んでいることがわかり, サテライトRNAは含んでいなかった。その4種類のRNAのうちRNA-1, 2, 3の分子量はCMV-Pとほぼ同じ大きさであったが, RNA-4はCMV-PのそれよりCMV-Yに近い値であった。また, 血清型は寒天ゲル内拡散法で, CMV-Yとの間にはスパーを生じ, CMV-Pのバンドと癒合したことから, P型と判定された。

II CMV-SR の強毒 CMV に対する干渉作用

CMV-SR をトマト苗に前接種して強毒CMVの感染をどの程度防ぐことができるか, また, どの程度の濃度のCMV-SRを接種する必要があるかについてガラス室で試験した。CMV-SR感染 *N. debneyi* 葉粗汁液でも強毒CMVの感染をかなり抑える力があり, さらに, 純化CMV-SR 100 µg/ml 液ではほぼ完全に抑えるこ

第2表 CMV-SR の接種源の形態, その濃度および接種方法を変えて接種したトマトにおける CMV モザイク病の防除効果

CMV-SR の接種源の形態	ウイルス濃度	接種法 ^{a)}	調査株数	発病株率(%)				発病度(%) ^{b)}
				5/31	6/13	6/29	7/12	
純化ウイルス液	100 $\mu\text{g/ml}$	綿球	24	0	8	29	29	15
			48	0	17	38	40	25
〃	10 〃	スプレーガン	48	10	27	48	58	28
			48	0	13	28	30	14
<i>N. glutinosa</i> 病葉粗汁液	5 倍	綿球	48	4	21	31	48	24
			48	8	19	42	50	27
〃	5 〃	スプレーガン	48	6	19	38	55	28
			48	6	47	64	78	54
リン酸緩衝液	—	綿球	47	6	47	64	78	54

a) 綿球: カーボランダムを用いる摩擦接種, スプレーガン: 2 kg/cm², 苗の上 10~15cm.

b) 発病度 = $\frac{\text{発病程度甚の株数} \times 3 + \text{中の株数} \times 2 + \text{軽の株数} \times 1 + \text{健全の株数} \times 0}{\text{調査株数} \times 3} \times 100$

とができた。

は場試験においては実用化を旨として CMV-SR (100 $\mu\text{g/ml}$) の前接種による CMV モザイク病の防除効果 (発病率, 発病度), 異常着色果の発生率について調査するとともに, トマト体内における CMV-SR の濃度の推移, トマトの生育への影響についても調査した。その結果, CMV-SR をトマトの幼苗に接種することにより, CMV モザイク病の発病率を約 1/4 に低下させ, 発病度も低下させた。さらに異常着色果の発生率も抑えることが明らかとなった。このように CMV-SR の接種により, トマトの CMV モザイク病の発病率などを抑えることがわかったが, トマト体内における CMV-SR の濃度は生育期間中を通してきわめて低く推移しており (*C. amaranticolor* における局部病斑数で接種源の 0.05~0.4%), 干渉作用がどのような機構によるものか興味あるところである。CMV-SR をトマトの幼苗に接種しても病徴は生じないが, 生育に支障をきたしたのでは実用化が難しい。そこで, 生育期間中の生育を比較したところ, 初期には生育がやや抑えられるが, 後期には健全株とほとんど差がなくなり, 実害はないものと判断され, この点でも実用化に支障はないものと思われた。

III CMV-SR の実用的接種法の検討

CMV の効率的大量接種法として, タバコ (ブライトエロー, Ky-57 など) の幼苗にスプレーガンを用いた噴霧接種法が報告されている (高浪・都丸, 1971)。CMV-SR についても弱毒ウイルスとして実用化する場合, その接種源の形態としてどのようなものが可能か, また, スプレーガンによる噴霧接種法が利用できるかどうか, CMV モザイク病防除効果により調べた。

CMV-SR は第1表に示したように *N. glutinosa* に *N. debneyi* 同様明りょうな病徴を生ずることおよびウイルス濃度が高いことから, 明りょうなモザイクを生じた *N. glutinosa* 葉を接種源として用いることとした。その病葉に5倍および20倍容量の0.05モルリン酸緩衝液を加えて磨砕・搾汁した粗汁液を接種源とした。大量接種法としてはスプレーガンによる噴霧接種を試みた。スプレーガンは岩田塗装機製 W-61-1S を用い, 吐出圧力を 2 kg/cm² とした。接種源にその容量の3%のカーボランダム (600 メッシュ) を加え, 随時かくはんしながら, トマト苗と吐出口との距離を 10~15 cm に保ち, 苗 50 株当たり 80~120 秒間に 59~80 ml 噴霧した。なお, 対照として, 純化ウイルス液のスプレーガンによる噴霧接種ならびに感染 *N. glutinosa* 葉粗汁液の綿球による常法の摩擦接種を行った。

その結果, CMV-SR 接種区の発病率, 発病度も無接種区に比して低く, CMV-SR 接種による CMV モザイク病の防除効果が見られた (第2表, 第4図)。

接種源として用いた感染 *N. glutinosa* 葉の5倍粗汁液は純化ウイルスの 100 $\mu\text{g/ml}$ 液とはほぼ同等の防除効果を示した。しかし, 20倍粗汁液区は純化ウイルスの 10 $\mu\text{g/ml}$ 液よりはるかに劣った。

接種法について見ると, 綿球を用いた常法による接種がスプレーガンによる接種よりモザイク病の発生率を低下させる効果が高かった。スプレーガンを用いて接種するためにはさらに改善する必要がある。

発病度についても同様に CMV-SR の接種によりかなり抑えられ, 特に純化ウイルス 100 $\mu\text{g/ml}$ と粗汁液 5倍区で低かった。そして, 発病率同様, スプレーガンによる接種区ではその値が高く, 効果が低かった (第

第3表 CMV-SR の接種源の形態, その濃度および接種方法を変えて接種したトマトにおける異常着色果の発生抑制効果

CMV-SR の接種源の形態	ウイルス濃度	接種法 ^{a)}	調査株数	調査果 ^{b)} 実数	異常着色果の発生率(%)
純化ウイルス液	100 μ g/ml	綿球	24	152 (304)	25.0
〃	10〃	〃	48	214	19.6
〃	10〃	スプレーガン	48	156	32.1
<i>N. glutinosa</i> 病葉粗汁液	5倍	綿球	48	267	20.6
〃	20〃	〃	48	267	26.6
〃	5〃	スプレーガン	48	196	30.1
〃	20〃	〃	48	171	27.5
リン酸緩衝液	—	綿球	47	100 (102)	56.0

a) 接種法は第2表と同じ。

b) 同じ規模の試験でとれた果実数であり, おおよその生産量の比を表している。() 内は調査株数を同じにした場合の計算値。

2表)。

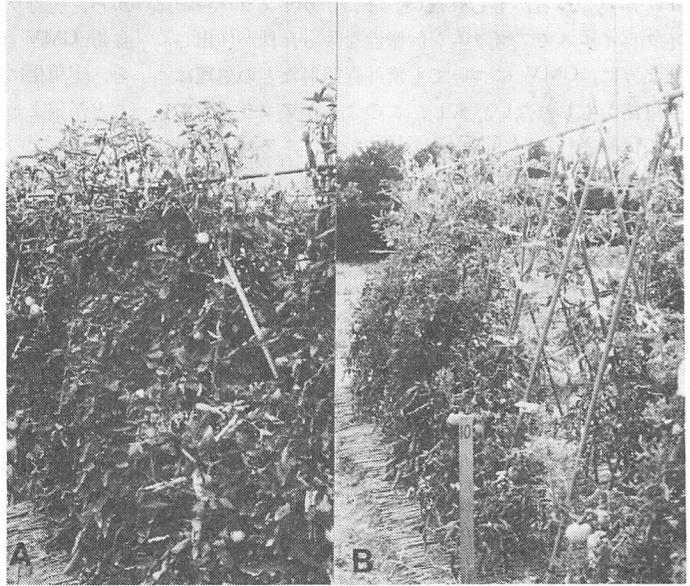
異常着色果の発生は商品価値を低下させるが, CMV の感染によって異常着色果を生じることが明らかにされているので, この発生率についても調査した(第3表)。ここで調査した果実数は各区でとれた果実数であり, おおよその収量を表している。ただし, 純化ウイルス 100 μ g/ml 区は株数が半分であり, 2倍にして示した。綿球接種区での収量は無接種区の2~3倍になり, 異常着色果の発生率は半分以下に低下することから, CMV-SR の接種の効果は高いと思われる。ここでもスプレーガンによる接種では効果が劣っていた。

以上の結果から, CMV-SR の接種源としては感染した *N. glutinosa* 葉の5倍粗汁液を用いれば 100 μ g/ml の純化ウイルス液とほぼ同等な効果を示すことから, 実用段階でも使用可能と考えられる。一方, 本試験で試みたスプレーガンを用いた接種法ではその効果が劣り, さらに検討が必要である。

VI 今後の課題

今後さらに効果的な弱毒 CMV の探索が行われると思うが, 現在トマトの CMV モザイク病防除に効果的な弱毒系統としては CMV-SR がもっとも有効と考えられるので, CMV-SR を中心に今後の課題を考えてみたい。

弱毒ウイルスとして必須な条件は強毒株に対する干渉



第4図 ほ場トマトにおける CMV-SR による CMV モザイク病の防除効果
A : CMV-SR 接種区, B : 無接種区

作用が強いことのほか, 毒力が回復しないこと, 他の作物に伝染して被害を起こさないことなどである。CMV-SR はトマトに対する強力な点においてはここ数年間使用してきた限りにおいて, 強くならなかったことから, 毒力が強くなる心配はないように思う。

CMV-SR はトマトにはまったく病徴を生じないが, ホウレンソウ, フダンソウ, ピーマンなどに病徴を生ずるため, 実際に畑で使用するためにはこれらの作物への影響に注意する必要がある。そのためにも上記作物を含めて多くの作物に病徴を生じないような株の選抜が必要

である。また、CMV-SR はトマト以外のタバコ (ブライトエロー, キサンチ nc) やキュウリにも病徴を生じないことから、CMV の発生により生産が阻害されているこれらの作物への適用試験が望まれる。

CMV-SR はアブラムシにより伝搬されるため、他の作物への影響が心配になる。このアブラムシ伝搬性をなくすことができればこの危険性はなくなる。これまで CMV と同定されたウイルスはアブラムシ伝搬性も重要な性質として確かめられており、アブラムシ伝搬性を有しない CMV は知られていない。しかし、CMV はサクラ、モモ、アジサイ、キリ、キョウチクトウなど木本植物を含め多くの多年生植物から分離されていることから、最近進歩した血清学的診断法によりこれらの植物から集めれば、中にはアブラムシ伝搬性を有しない CMV が見つかるかもしれない。また、カリフラワーモザイクウイルスでアブラムシ伝搬性を失った株が作出されたように、CMV についても紫外線照射などの処理により可能かもしれない。もし、このようなアブラムシによって伝搬されない CMV が見つければ、アブラムシ伝搬性は RNA-3 により支配されているので、アブラムシ非伝搬性株の RNA-3 と弱毒株の RNA-1+RNA-2 を組み合わせることで、アブラムシにより伝搬されない弱毒 CMV が作出されると考えられる。

CMV-SR は前にも述べたように血清型が P 型である。一方、畑により発生している CMV の血清型は一定していないが、今まで試験したほ場や一般ほ場で発生の多い強毒 CMV の血清型は Y 型である。このため CMV-SR の血清型を Y 型に変えることにより、防除効果が高くなる可能性がある。そこで、血清型が Y 型の CMV 普通系から電気泳動により核酸を分離し、その血清型を支配している RNA-3 を取り出し、これを CMV-SR の RNA-1+RNA-2 と組み合わせることにより、CMV-SR の弱毒性と普通系の血清型 (Y) を持つ弱毒ウイルス (CMV-SRO) が作出されている。この CMV-SRO を用いて CMV モザイク病の防除試験が試みられ、元の CMV-SR より高い防除効果が得られている (花田・栃原, 1986; 善林ら, 1986)。交換する RNA-

3 についても各系統・分離株により異なる可能性があり、いろいろな組み合わせをすることにより、いっそう良い弱毒ウイルスの作出できる可能性があると思う。

CMV-SR はトマトの初期生育を若干抑えることなどから、病徴を軽くするサテライト RNA を取り入れることにより、生育障害や病徴を軽くできるのではないかと考え、CMV-SR にサテライト RNA を入れてみたが、ウイルスそのものの増殖が極端に悪くなり、干渉作用が十分でなかったため、この方法は中断した。

おわりに

CMV-SR は高濃度の粗汁液や純化ウイルス液を接種してもトマトに病徴 (接種直後の生育抑制を除いて) を現さず、CMV モザイク病の防除効果もかなり高いことから、弱毒ウイルスとして有望と考えられる。しかし、強毒 CMV に対する感染防止効果が完全でないことから、実用化に際してはさらに干渉力の高い弱毒株であることが望ましい。CMV-SR はガラス室では高い干渉効果を示したのにほ場では効果は十分とは言えない。これは CMV の特性でもあるが、感染植物体内での濃度に大幅な波があり、感染初期から後期までの間の濃度の変動が大きいためと思われる。生育全期にわたって病徴を現さず、しかも高い干渉力を維持させる実用性の高い弱毒株を CMV で得るには困難が多いと考えられる。

CMV-SR については前項で述べたような点の改良が望まれるとともに、よりいっそう有効な弱毒ウイルスの発見・作出が望まれる。そして、CMV による被害を防ぎ、この点では安心してトマト栽培できるようにしたいものである。

引用文献

- 1) 花田 薫・栃原比呂志 (1986): 日植病報 52: 154 (講要).
- 2) 岩木満朗ら: 同上 (投稿中).
- 3) 高波洋一・都丸敏一 (1971): 秦野たばこ試報 70: 63~69.
- 4) 栃原比呂志・田村 実 (1967): 日植病報 42: 533~539.
- 5) 土崎常男ら (1982): 同上 48: 130 (講要).
- 6) 善林六朗ら (1983): 同上 49: 716~719.
- 7) ———ら (1986): 同上 52: 561~562 (講要).

プロトプラスト利用による病害抵抗性植物の作出

京都大学農学部植物病理学研究室 ^{ふる}古 ^{さわ}沢 ^{いわお}巖

はじめに

病害抵抗性品種育成のために、これまでいくつかの方法がとられてきた。そのうち、もっとも一般的な方法は、野生種あるいは他品種が持っている抵抗性遺伝子を交配と選抜によって目的とする作物に導入させる方法であり、多くの成果をあげてきた。この場合、導入すべき有益な遺伝子を探し出すことが先決となる。最近では、この“有益な”遺伝子源の探索ということを含め植物の収集・保存が重要視されてきた。一方、バイオテクノロジーを用いた新しい遺伝子源の拡大が考えられており、作物育種にかかわるバイオテクノロジーには、次のような四つの技術がある。①育種障害の克服を目的とした胚培養技術、②体細胞培養によって生じた変異を利用する細胞育種、③交配不能な組み合わせでの交雑を目的とした細胞融合技術、そして④遺伝子組換え技術である。これらはいずれも基本的には育種のための遺伝子源拡大が目的とされた技術であるので、新しい作物の作出までを考えた場合には、ち密な育種プログラムを経る必要がある。すなわち、本稿の課題である細胞培養による病害抵抗性育種においても、新しい遺伝子源としての病害抵抗性植物を作ることはそれほど多くの時間と困難を伴わない。しかし、“病害抵抗性作物”を作ろうとする場合には、作物として種々の条件が備わったうえで新しい病害抵抗性を持たせなければならない点、きっちりとした育種プログラム・システムに乗せる必要がある。また、それには長時間を必要とすることも考えておかなければならない。

I 体細胞培養によって生じる変異

細胞育種の基本は、単細胞からの個体再生が可能であることと同時に、その過程で変異が出現することが条件となる。植物の組織を形成している各細胞の間で遺伝的(遺伝子の発現レベル)変異があり、その結果、1個の細胞から再生した個体はそのような形質を維持したままで固定化され、その個体は特殊な形質を持つようになると考えられている。宿主-病原体の相互関係を細胞レベ

ルで詳しく研究している植物病理学者にとって、しばしば経験することであるが、病原菌に対する宿主の個々の細胞反応は必ずしも均一ではないことが観察される(Douke and Furuchi, 1982)。すなわち、個々の細胞に変異があることがわかる。しかし、細胞育種で利用する変異の大部分は細胞培養の間に生じると考えたほうがよい。タバコにおいて sulphar locus をマーカーに遺伝的変異を分析した結果によると、細胞培養の間に少なくとも75%が変異していたことが報告されている。このような変異は、率の違いこそあれトウモロコシ、エンバク、ナタネ、イネなどでも観察されている。そして細胞培養中に起こるこのような変異は、異数体の出現、染色体の倍化、遺伝子のコピー数の増加、mRNA レベルでの増幅が原因であると考えられている。第1表は、タバコプロトプラスト由来のカルス中のスーパーオキシジスムターゼ活性を示す。この結果は本来細胞が持っている変異プラス細胞培養中に生じた変異と考えられるが、カルスによって酵素活性の間に50倍以上の差が見られる(Furusawa et al., 1984)。第2表は、種々の植物の体細胞培養において生じた変異についてまとめたものである。その変異は形態的、生理的および生化学的に見られ、遺伝的にその形質が後代に伝わるということが明らかにされている。それらの形質の中に病害抵抗性も含まれる。すなわち、細胞培養の間に種々の変異が起こるので、適当なストレス剤を用いて選抜を行えば、目的とする性質を持った植物を作ることができる。

II 病害抵抗性植物の作出と細胞培養

BRETTELL and INGRAM (1979) は、病害抵抗性育種において細胞培養が利用価値のある方法であることを述べ、培養細胞を選抜することによって突然変異株を見つけることができるとした。その際、突然変異誘発剤を使用しなくても再生個体には安定な遺伝的突然変異株が得られることがわかった。病害抵抗性を持った細胞を培養細胞から選抜するためには、抵抗性や罹病性が *in vitro* で発現される必要がある。例えば HELGESON ら (1976) は、タバコ疫病に抵抗性のカルスを獲得するため *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* の遊走子をタバコカルスに接種し、カルスのスクリーニングを行った。この場合に

Production of Disease Resistant Plant Using Protoplast Culture. By Iwao FURUSAWA

第1表 タバコプロトプラスト由来カルスにおけるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)

カルス番号	SOD 活性 (unit/mg) (タンパク質)	カルス番号	SOD 活性 (unit/mg) (タンパク質)
1	5.3	9	19.2
2	0.9	10	25.6
3	0.8	11	46.8
4	13.1	12	31.7
5	10.8	13	17.6
6	14.3	14	16.3
7	39.8	15	44.6
8	13.5	16	13.4

(FURUSAWA, 1984 より)

第2表 体細胞培養による変異

植 物	変 異 し た 形 質
エンバク コムギ	体高, 出穂日, 葉のしま模様, のぎ 体高, 穂形, のぎ, 成熟期間, ワックス, グリアジン
イネ サトウキビ	種子稔性, 開花日, 体高, ひこばえの数 種々の病原菌に対する抵抗性, 糖量, エ ステラーゼ
トウモロコシ ソルガム タマネギ ジャガイモ	葎の稔性 稔性, 葉形, 生育度 鱗茎の大きさ, 鱗茎の数, 鱗茎発芽 塊茎の形, 生産量, 成熟期間, 茎・花・ 葉の形, 疫病抵抗性
タバコ	体高, 葉の形や生産量, 品質, アルカロ イド
クローバ ナタネ バイナップル	葉の数, 花びらの長さ, 体高, 乾燥重 開花期, 生育度 葉の色, ワックス分泌, 葉の密度, 葉の 幅, 葉のねじれ
レタス テンジクアオ イ キク	葉の重さ・幅・長さ・色 葉の形・大きさ, 花の形, 体高, アント シアニン, 油脂組成 花の色, 開花温度

(SCOWCROFT et al., 1983 より改変)

は菌を直接カルスに接種して選抜するのであるから、接種された菌を死に至らしめるような強度抵抗性の場合には選抜方法として利用できるかもしれないが、選抜後、病原体を除去することなく個体再生を行うことは難しいので問題である。そのため病原性を決める因子が病原菌の毒素である場合、あるいは病原性決定に毒素が深くかかわっている場合には、細胞培養に用いる培地に純化した毒素および病原菌の培養液を入れ、毒素抵抗性のカルスを選抜することができる。そして、これらカルスから個体を再生させることによって、病害抵抗性植物を作ることができる。この場合には、一つの宿主に対して数種病原菌の組み合わせを同時に選抜することも理論的には可能である。この際、用いる毒素としては、病原性決定因子と考えられている宿主特異的の毒素を用いることが望ましい。なぜなら、病原菌が宿主特異的の毒素を産生する

第3表 宿主特異的の毒素が発見されている病原菌

毒 素	病 原 菌	宿 主
HV	<i>Helminthosporium victoriae</i>	エンバク
HC	<i>H. carbonum</i>	トウモロコシ
HS	<i>H. sacchari</i>	サトウキビ
HmT	<i>H. maydis</i> race T	トウモロコシ
AK	<i>Alternaria kikuchiana</i>	ナ シ
AM	<i>A. mali</i>	リンゴ
AC-L	<i>A. citri</i>	レモン
AL	<i>A. alternata</i> f. <i>lycopersici</i>	トマト
AF	<i>A. fragariae</i>	イチゴ
ALo	<i>A. alternata longipes</i>	タバコ
PC	<i>Periconia circinata</i>	ソルガム
PM	<i>Phyllosticta maydis</i>	トウモロコシ
CC	<i>Corynespora crassicola</i>	トマト

(SCHEFFER, 1983 より)

かしないか、その病原菌が作物を侵せるかどうかが決まっているからである。逆に、宿主特異的の毒素に細胞が反応するかしないか、罹病性になるか抵抗性になるかが決まるからである。第3表に示したように、これまで病原性決定因子として考えられている宿主特異的の毒素は14種発見されている。これら毒素に対して抵抗性の植物を作ることができれば、これら病害に対する抵抗性植物の作出も可能である。実際、宿主特異的の毒素を産生する *Helminthosporium victoriae*, *H. maydis*, *H. sacchari*, *Alternaria alternata* pathotype tobacco などに対し抵抗性植物が作られている。しかし、ストレス剤として、宿主特異的の毒素以外の病斑拡大などに関与するような毒素を用いても可能であり、*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Phoma lingam*, *Sclerotinia sacchari* などはずでに抵抗性植物の作出に成功している。

III 細胞培養によって得られた病害抵抗性株

第4表は、これまで細胞培養法によって得られた病害抵抗性植物についてまとめたものである。数種の植物についてその実験結果を簡単に説明する。

1 サトウキビ

Hawaiian Sugar Planter's Association の研究所において、サトウキビの体細胞を培養することによって、形態的、細胞遺伝的、あるいは酵素のアイソザイムに変異が起こることが最初に報告された。その後、いくつかの研究室で体細胞培養で生じた変異の中から細胞選抜することによって、downy mildew, eyespot disease, Fiji disease に抵抗性を持った株が作物としての性格を失うことなく得られたことが報告され、その形質が後代に伝わることも明らかにされた。その後、オーストラリアでも同じような研究が行われ、eyespot disease 抵抗性株を得ている。その株は本菌毒素に対しても抵抗性であ

第4表 細胞選抜によってこれまで得られた病害抵抗性植物

病原菌	植物	参考文献番号
<i>Alternaria alternata</i> pathotype tobacco	タバコ	22)
<i>Helminthosporium maydis</i>	トウモロコシ	7)
<i>Helminthosporium victoriae</i>	エンバク	17)
Fiji disease	サトウキビ	11)
<i>Alternaria solani</i>	ジャガイモ	15)
<i>Fusarium oxysporum</i>	ジャガイモ	2)
<i>Helminthosporium sacchari</i>	サトウキビ	8)
<i>Helminthosporium oryzae</i>	イネ	13)
<i>Phoma lingam</i>	キャベツ	18)
<i>Phytophthora infestans</i>	ジャガイモ	1)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tabaci	タバコ	22)
<i>Rhizoctonia solani</i>	ジャガイモ	23)
<i>Sclerospora sacchari</i>	サトウキビ	11)
Tobacco mosaic virus	タバコ	16)
<i>Ustilago scitaminea</i> *	サトウキビ	14)
<i>Verticillium albo-atrum</i>	クローバ	12)

り、その性質が後代に伝わるということが報告されている。しかし、そのような株の中には元の感受性に戻るものもあるようである。

2 ジャガイモ

栽培品種である“Russet Burbank”の葉のプロトプラストから、約 1,000 個のプロトクロンを作った結果、第2表に示すようにいろいろな形質を持った株が得られている。そのうち、1% のものが *Alternaria solani* の毒素および夏疫病に対して抵抗性であったとしている。また、2.5% が疫病に対して抵抗性であり、これらの形質は塊茎を通して後代に伝わり、いくつかの形質に対しては何代にもわたってその性質が伝わるということが報告されている。このような病害抵抗性出現が突然変異誘発剤の使用なしでも起こることは大変興味深い。また、*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* の培養液を用いて選抜した毒素抵抗性カルスからの再生個体は、その親株よりも明らかに本病に対して抵抗性になったという報告もある。

3 イネ

イネの場合も、体細胞培養によっていろいろな変異が生じることは他の作物とおなじであった(第2表)。最近、*Helminthosporium oryzae* の粗毒素画分を用いて毒素抵抗性カルスを選抜し、その再生個体の中から本菌に抵抗性の株が分離されている。

4 トウモロコシ

Helminthosporium maydis T レースに感受性のトウモロコシを、本菌の毒素含有培地中で継代培養することによって抵抗性株を得ている。再生個体は毒素および本菌に対しても強い抵抗性を示したが、重要な形質の一つで

ある雄性不稔の性質を失っていたため、品種として利用されていない。

5 ナタネ

Phoma lingam の培養液を用いて感受性株からのカルスを選抜し、抵抗性品種を得ている。4 個の毒素抵抗性カルスから 63 個体の再生植物が得られたが、そのうち 12 個体が耐性で、2 個体が抵抗性であったとしている。

6 タバコ

タバコは古くから細胞培養や個体再生の材料として使われてきた。1973 年には CARLSON のタバコ細胞を用いたストレス剤による細胞選抜法の先駆的な仕事がある。その後、TMV、タバコ野火病、タバコ赤星病に対する抵抗性株の粗毒素を使った選抜が行われた。次に、筆者の研究室で行った実験結果 (THANUTONG et al., 1983) を少し詳しく紹介する。

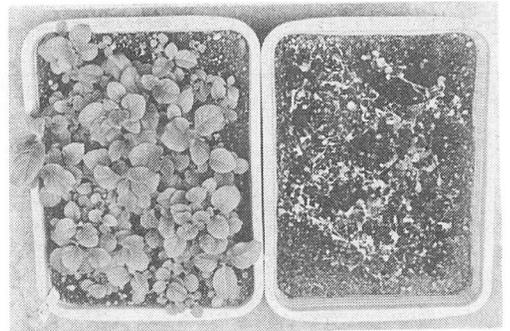
IV タバコ赤星病抵抗性株の作出

すでに述べたように、細胞培養による病害抵抗性株の作出は、基本的には生じる変異を利用することであるから、できるだけ多くの変異が生じる過程を経ることが重要である。そのためには、まず個々の細胞が持っている変異を利用することが望ましい。最近では、プロトプラスト(単細胞)からの個体再生系が多くの植物で可能になったので、変異率を上げるためにはプロトプラストからの再生系を用いるほうがよい。しかし、組織から誘導したカルスでも細胞培養の過程を経るため変異の誘発は起こるので、このようなカルスを選抜の材料に用いてもよい。われわれは、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 葉からプロトプラストを調製し、長田・建部の培地でカルス誘導を行った。用いる細胞によって生育速度が異なるが、タバコプロトプラストでは約 4 週間後には、直径 0.5 mm 程度の大きさのカルスに成長する。その際、使用したタバコの葉の状態が良いことはもちろんのこと、培養時のプロトプラストの濃度が再生効率に大きく影響する。これらの条件は細胞の種類にかかわらず注意すべき点である。また、プロトプラストの培養時には培地をできるだけ薄く(1~1.5 mm の厚さ)広げるほうが、カルスを効率よく得ることができるようである。これらカルスを寒天とともに 1~2 cm² の大きさに切り取り、カルス生育用培地 (LINSMAIER and SKOOG の培地を基本にしたもの) 上に置き、さらに 2~3 週間培養した。カルスは直径 2 mm 程度の球形になり、それぞれが独立に形成される。それゆえ、1 個のプロトプラスト由来カルスとして取り扱うことができ便利であ

る。

次に、これらのカルスを目的とする病原菌毒素含有培地に移植する。用いる毒素は必ずしも純化する必要がなく、粗毒素および培養液を用いても抵抗性細胞の選抜は可能である。タバコ赤星病は宿主特異的の毒素を産生する病原菌であるが(児玉ら, 1984), 同時に非特異的の毒素である tenuazonic acid も産生する。われわれは、この tenuazonic acid を除いた粗毒素画分を用いてカルスを選抜した。選抜に用いる毒素の濃度は、選抜効率を上げるため十分考慮する必要がある。すなわち、濃度が高すぎると目的とする細胞を死滅させることになり、逆に低すぎると抵抗性でない細胞までも選ぶことになる。われわれは、数%のカルスが生き残る濃度の粗毒素を用いた。その結果、最初の選抜によって約 700 個のカルスから 36 個のカルスを得た。これらカルスから 695 の再生個体が得られたが、そのうち、抵抗性を示したものはなかった。しかし、約 10% のものが中度抵抗性を示した。1 株は親株よりさらに罹病性であった。本病の抵抗性検定は切葉 (2×2 cm) を用いて行った。切葉に均一に孢子懸濁液 (10⁶ 孢子/ml) を噴霧接種し、28°C, 10,000 lx 下の温室に 48 時間置いた。罹病度は接種葉片 (1 cm²) に現れたえ死斑の数で表し、顕微鏡下で測定した。え死斑が 50 個以上現れたものを罹病性とし、11~50 個/cm² を中度抵抗性、0~10 個/cm² を抵抗性とした。1 回の選抜で生き残ったカルスをさらにもう一度、毒素含有培地に移植した。その結果、5 個のカルスが生き残った。4 個は再生能力があり、24 の再生個体が得られた。そのうち、約 22% に当たる 5 個体が抵抗性を示し、約 30% が中度抵抗性であった。

この結果は、カルスにおける毒素選抜を繰り返すことによって、抵抗性植物の出現頻度を高めることができることを示している。また、このような選抜は検定個体数を減少させ、労力と時間の節約に有効である。しかし、その際常に、個体再生能力を検定しながら選抜を繰り返すことが重要である。事実、2 回選抜を繰り返して得られたカルスのうち、一つは再生能力を失っていた。また、他の 4 個のカルスの再生能力も 1 回の選抜では 19.3 個体/カルスであったのが、2 回目では 4.6 個体/カルスに低下した。前述したように、毒素抵抗性カルスから再生された個体がすべて抵抗性を示すわけではない。なお、非毒素選抜カルスから 700 個の個体を再生させ、種々の形質について調べた結果、約 70% に形態的、生理的変異が見られたが、本病に抵抗性のは見つからなかった。毒素抵抗性カルス No. 48 から再生した個体は、毒素および本菌に対して強い抵抗性を示した。この



第1図 細胞選抜によるパラコート抵抗性タバコ
右：親株、左：選抜されたパラコート抵抗性タバコ

個体の体細胞の染色体数は $2n=48$ で親株のそれと同じであり、自家受粉により多数の種子 (R₁ 植物) を採取することができたので、本株を後代の検定に用いることにした。

新しい抵抗性遺伝子を持った作物に改良するためには、その遺伝的性質を知っておく必要がある。そのためには後代の評価とその後の選抜を繰り返し、新しい親株として価値あるものかどうかを決定しなければならない。R₂, R₃, R₄ は R₁, R₂, R₃ 個体群の中から本病に強い抵抗性を示す個体を数個選び、自家受粉によって得たものである。R₁ 世代においては 9.3% がタバコ赤星病に抵抗性を示し、R₂, R₃ ではそれぞれ 38.9%, 56.7% であった。R₃ 世代の 6 個体を選び、それらの R₄ 世代の抵抗性は 62%, 中度抵抗性は 25%, 罹病性は 13% であった。しかし、そのうちの 1 個体はすべて抵抗性であった。このように自家受粉と選抜を繰り返すことにより、明らかに抵抗性個体出現頻度が増加していくことがわかる。しかし、実験室内での抵抗性検定に用いる植物はガラス室内で育てられたものであり、また、検定を行う条件が野外とかなり異なることから、得られた実験結果が必ずしも野外での反応を示すものではない。それゆえ、抵抗性株としての固定にはさらに自然発病下での選抜が必要であることはいうまでもない。現在、われわれはこれら抵抗性株を用いては場検定を行っている。

おわりに

細胞培養の技術の発達に伴って、個々の細胞が持つ性質および培養時に生じる変異を利用して、目的とする特性を持った植物を作ることが可能となった。その際、用いるストレス剤によって、病害抵抗性、除草剤耐性、耐薬性などの植物を得ることができる。第1図は、非選択

性除草剤であるパラコートにストレス剤にして、タバコ細胞を選抜して得られたパラコート抵抗性タバコを示す。このような性質を持った植物は自然界では手には入らないし、目的とする作物に導入できるような、すなわち、交配可能な植物が見つかることはほとんど期待できない。このような点から考えると、細胞培養技術はいろいろなストレス剤に対して抵抗性の植物を比較的容易に作る点、利用価値のあるものと思われる。病害防除において農薬の果たす役割は大変大きい、細菌病、ウイルス病、土壌病については種々問題があり、細胞培養による抵抗性作物の作出は、これらの問題解決に可能性を提供してくれるかもしれない。

主な引用文献

- 1) BEHNKE, M. (1979) : Theor. Appl. Genet. 55 : 69~71.
- 2) ——— (1980) : Z. Pflanzenzuechtung 85 : 254~258.
- 3) BRETTELL, R. I. S. and D. S. INGRAM (1979) : Biol. Rev. 54 : 329~345.
- 4) CARLSON, P. S. (1973) : Science 180 : 1366~1368.
- 5) DOUKE, N. and N. FURUICHI (1982) : Physiol. Plant Pathol. 21 : 23~30.
- 6) FURUSAWA, I. et al. (1984) : Plant Cell Physiol. 25 : 1247~1254.
- 7) GENGENBACH, B. C. and C. E. GREEN (1975) : Crop Sci. 15 : 645~649.
- 8) HBINZ, D. J. et al. (1977) : In "Plant Cell, Tissue and Organ Culture" (eds. by REINERT, J. and Y. P. S. BAJAJ, pp. 3~17, Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg.
- 9) HELGASON, J. P. et al. (1976) : Phytopathology 66 : 91~99.
- 10) 児玉基一郎ら (1984) : 日植病報 (講要) 50 : 410.
- 11) KRISHNAMURTHI, M. (1982) : In "Plant Tissue Culture" (ed. by FUJIWARA, A.), pp. 769~770, 1.
- 12) LATUNDE-DADA, A. D. and T. A. LUCAS (1983) : Plant Sci. Lett. 32 : 205~211.
- 13) LING, D. H. et al. (1985) : Theor. Appl. Genet. 71 : 133~135.
- 14) LUI, M. C. (1981) : In "Plant Tissue Culture" (ed. by THORPE, T. A.) Academic Press, New York p. 299.
- 15) MATTERN, U. et al. (1978) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 4935~4939.
- 16) MURAKISHI, H. H. and P. S. CARLSON (1982) : Plant Cell Rep. 1 : 94~97.
- 17) RINES, H. W. and H. H. LUKE (1985) : Theor. Appl. Genet. 71 : 16~21.
- 18) SACRISTAN, M. D. (1982) : ibid. 61 : 193~200.
- 19) SCHEFFER, R. P. (1983) : In "Toxin and Plant Pathogenesis" (eds. by DALY, J. M. and B. T. DEVERALL), Academic Press, pp. 1~34.
- 20) SCOWCROFT, W. R. et al. (1983) : In "Use of Tissue Culture and Protoplasts in Plant Pathology" (eds. by HELGASON, J. P. and B. D. DEVERALL), pp. 139~159.
- 21) SHEPARD, E. J. et al. (1980) : Science 208 : 17~24.
- 22) THANUTONG, P. et al. (1983) : Theor. Appl. Genet. 66 : 209~215.
- 23) UPADHYA, M. D. (1978) : Z. Pflanzenzuechtung 82 : 1~30.

人事消息

(10月1日付)

林 健一氏 (熱帯農業研究センター所長) は農業生物資源研究所長に
 西山保直氏 (果樹試験場企画連絡室長) は果樹試験場長に
 西部慎三氏 (四国農業試験場長) は北海道農業試験場長に
 増田澄夫氏 (農業研究センター作物第二部長) は四国農業試験場長に
 田村真八郎氏 (食品総合研究所分析栄養部長) は食品総合研究所長に
 梶原敏宏氏 (農業研究センター次長) は熱帯農業研究センター所長に
 木村 悟氏 (農業環境技術研究所環境資源部長) は農業研究センター次長に
 山下 淳氏 (生物研分子育種部長) は農研センター作物第二部長に
 杉浦已代治氏 (生物研機能開発部微生物機能利用研究室) は生物研分子育種部長に
 大山勝夫氏 (生物研細胞育種部分化制御研究室) は生物研細胞育種部長に
 久保七郎氏 (農土試企連室長) は環境研環境管理部長に
 五十嵐孝典氏 (熱研センター研究第一部主任研究官) は環境研環境資源部長に

小崎 格氏 (果樹試育種部長) は果樹試企連室長に
 吉田義雄氏 (果樹試盛岡支場育種研究室) は果樹試育種部長に
 高梨和雄氏 (果樹試保護部病害第2研主任研究官) は果樹試企連室連絡科長に
 家城洋之氏 (果樹試興津支場病害研主任研究官) は果樹試安芸津支場病害研究室長に
 井上 平氏 (中国農試企連室連絡1科長) は野菜試久留米支場虫害研究室長に
 小林正弘氏 (鹿児島県農試大隅支場畑作病害虫指定試験地主任) は九州農試環境第一部虫害第1研究室長に
 福本文良氏 (農研センター病害虫防除部ウイルス病診断研主任研究官) は環境研環境生物部微生物管理科土壌微生物分類研主任研究官に
 大矢慎吾氏 (九州農試環境第一部虫害第3研主任研究官) は鹿児島県農試大隅支場畑作病害虫指定試験地主任に
 鳥山國士氏 (生物研所長) は退職
 山口 昭氏 (果樹試験場長) は退職
 井上喬二郎氏 (北海道農試場長) は退職
 津村信蔵氏 (食総研所長) は退職
 志賀敏夫氏 (生物研細胞育種部長) は退職
 大久保博人氏 (環境研企連室) は環境研環境生物部微生物管理科糸状菌分類研究室へ
 吉松慎一氏 (同上) は同上部昆虫管理科昆虫分類研へ

真菌類のプロトプラスト研究の現状

農林水産省農業環境技術研究所 ^{や え がし}八重樫 ^{ひろ}博 ^し志

はじめに

COCKING がトマト根端組織のプロトプラスト分離に成功したのは、1960年のことである。以来、高等植物のプロトプラスト研究は飛躍的進歩を遂げるに至ったが、プロトプラスト研究の歴史は、実は、微生物分野のほうが古い。つまり、細菌(1953年)、酵母(1957年)およびアカバシカビ(1958年、59年)から酵素的方法によりプロトプラストを分離しえたことが、プロトプラスト研究の端緒となったのである。各種細胞壁分解酵素の開発と相まって、プロトプラストの研究は新時代を迎えたのであるが、真菌類の分野では発酵関係の菌を中心に多くの研究成果が得られ、すでに総説も著されている(有馬・高野, 1979; 久能, 1983; PEBERDY, 1979; PEBERDY and FERENCZY, 1985)。しかし、話題を植物病原菌に絞ってみると、情報はごく限られた範囲にとどまっている。これは一つには、プロトプラストが作物や微生物の育種・改良の手段として利用される場合が多く、病原菌がその対象になりえなかったことに起因していると思われるが、プロトプラストの利用場面は広く、思わぬ方向への展開も期待されるので、ここでは植物病原菌を中心に、これまでの成果を整理し、今後の参考に供することとしたい。

I プロトプラストの特性

プロトプラストは、細胞膜(原形質膜)に包まれた原形質の塊(原形質体)で、細胞質、核および細胞内小器官から成っている。つまり、植物細胞に固有の細胞壁を持っていない。細胞壁は細胞を保護したり、物質交換の調節を行うなど、いくつかの大切な機能を果たしているが、これがない状態でも、プロトプラストを生かし続け、さらには完全な固体にまで再生させることが可能である。このようにプロトプラストは、遺伝的に均一な単細胞実験系としてプロトプラストならではの利点をいくつか持っている。ことにプロトプラスト相互の融合とか巨大分子の取り込みが可能なことなどは、従来の実験系では考えられなかった特性である。

II プロトプラストの分離と再生

1 酵 素

一般に真菌類の細胞壁は、多糖類、タンパク質および脂質などからできているといわれているが、詳細に見ると、例えば酵母ではマンナンとグルカンが、子のう菌、担子菌および不完全菌類ではキチンとグルカンが主構成要素になっているなど、その組成は菌の種類により少しずつ異なっている(BARTNICKI-GARCIA, 1968)。したがって、細胞壁分解酵素の選択にあたっては、このことに注意を払う必要がある。しかし、対象となる菌の細胞壁の組成を正確に把握することは必ずしも容易ではなく、また、市販の酵素には表示されたもの以外にいろいろなものが含まれていることがあるので、実際には、試行錯誤を繰り返しながら適当な酵素を見つけたす場合が多い。主な市販酵素は第1表に示すとおりである。これを酵素産生物の種類により大別すると、動物(カタツムリ)起源のものが β -グルクロニダーゼ、細菌由来のものがザイモリアーゼとキチナーゼで、他の10種はすべて真菌由来のもの、ということになる。このほか市販されていないが、*Bacillus* や *Cytophaga* などの細菌を培養して得た酵素を使う場合もある(BACON et al., 1965; TANAKA and PHAFF, 1965)。

次に、いくつかの具体例を紹介しよう。BOISSONNET-MENES と LEOCOQ (1976) はヘリカーゼを用いて、また、細川・高坂(1976)はセルラーゼ・オノズカ 20 mg/ml, ドリセラーゼ 10 mg/ml, マセロチーム R 10 5 mg/ml でいもち病菌 *Pyricularia oryzae* のプロトプラスト分離に成功したが、これはおそらく植物病原真菌としては最初の報告と思われる。その後、ザイモリアーゼ単独あるいはセルラーゼ・オノズカ、マセロチーム、ドリセラーゼあるいは β -グルクロニダーゼとの混用(浅井ら, 1986; ISHIZAKI et al., 1983; 多賀ら, 1982; 八重樫ら, 1983)や、*Bacillus circulans* 産生酵素(TANAKA et al., 1981)でいもち病菌プロトプラストを分離した例も報告されている。一方、HASHIBA と YAMADA (1982)は、セルラーゼ・オノズカ 20 mg/ml, マセロチーム R 10 5 mg/ml, ドリセラーゼ 10 mg/ml, β -グルクロニダーゼ 0.06 mg/ml を用いて紋枯病菌 *Rhizoctonia solani* のプロトプラスト分離に成功している。このほか植物病

第1表 主な市販酵素

商 品 名	主 成 分	生 産 菌 など	製 造 元 ・ 発 売 元
マセロチーム R10	ポリガラクトチュロナーゼ, トランスエリミナーゼ, ヘミセルラーゼ	<i>Rhizopus</i> sp.	ヤクルト生化学(株)
ベクトリアーゼ Y23	ベクチンリアーゼ, ポリガラクトチュロナーゼ	<i>Aspergillus japonicus</i>	キッコーマン醤油(株)
ベクチナーゼ セルラーゼ・オノズカ RS	ポリガラクトチュロナーゼ セルラーゼ, ベクチナーゼ, ヘミセルラーゼ	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma viride</i>	Sigma Chemical Co. ヤクルト生化学(株)
ドリセラーゼ	セルラーゼ, ポリガラクトチュロナーゼ, ヘミセルラーゼ	<i>Irpex lacteus</i>	協和醸酵工業(株)
メイセラーゼ セルラーゼ type 1 ヘミセルラーゼ	セルラーゼ セルラーゼ ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma koningi</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i>	明治製菓(株) Sigma Chemical Co. Sigma Chemical Co.
β -グルクロニダーゼ ザイモリアーゼ	セルラーゼほか β -1,3-グルカナーゼ, プロテアーゼ, マンナーゼ	<i>Helix pomatia</i> <i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma Chemical Co. 生化学工業(株)
ノボザイム 234	β -1,3-グルカナーゼ, α -1,3-グルカナーゼ, キチナーゼ	<i>Trichoderma</i> sp.	Novo Industri A/S
キタラーゼ キチナーゼ キチナーゼ	β -1,3-グルカナーゼ キチナーゼ キチナーゼ	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Streptomyces griseus</i>	和光純薬工業(株) Sigma Chemical Co. Sigma Chemical Co.

原菌を対象としたものとしては、 β -グルクロニダーゼ単独あるいはセルラーゼかキチナーゼとの混用で、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* (HISADA and KAWASE, 1977), 麦角病菌 *Claviceps purpurea* (KELLER et al., 1980), ばか苗病菌 *Gibberella fujikuroi* (HARRIS, 1982) およびごま葉枯病菌 *Cochliobolus heterostrophus* (LEACH and YODER, 1982) のプロトプラストを分離した例が報告されている。また、最近では、萎ちょう病菌 *Fusarium oxysporum* や立枯病菌 *F. tricinctum* にノボザイム 234 (LYNCH et al., 1985) を、雪腐黒色小粒腐核病菌 *Typhula ishikariensis* にセルラーゼ・オノズカとトリコデルマ酵素 (松本・但見, 1986) を、半身萎ちょう病菌 *Verticillium albo-atrum* には *Streptomyces* sp. が培養中に産生した酵素 (MOREHART et al., 1985) を用いて、プロトプラストを分離した例が報告されている。

2 浸透圧調整剤と pH

分離プロトプラストは細胞壁を持たないので、そのままの状態では膨圧のため破裂してしまう。それを防ぐためには、外部の浸透圧を高く保つ必要がある。真菌類プロトプラストの浸透圧調整剤としては、これまでに KCl, K₂SO₄, CaCl₂, MgSO₄, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, NaCl, マニトール, ソルビトール, グルコース, ラムノースおよびガラクトースなどが報告されている (PEBERDY and FERENCZY, 1985) が、植物病原菌にはこれまで第2表に示す調整剤が使われている。各自、供試菌に適した調整剤の種類および濃度を選定することが望まれる。また、リン酸緩衝液は浸透圧調整剤や酵素の活性に悪影響を及ぼす場合があるので、低濃度で使用するのがよいとされている。酵素液の pH も酵素活性に影響を与え、プロトプラスト収量を左右するので、あらか

第2表 酵素液の浸透圧調整剤と pH

病 原 菌	浸 透 圧 調 整 剤	pH	文 献
<i>Pyricularia oryzae</i>	0.6 モル マニトール	5.2	12), 28)
"	0.6 モル KCl	5.0, 7.0	1), 13), 27)
<i>Rhizoctonia solani</i>	0.6 モル マニトール	5.2	8)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	0.8 モル マニトール	6.1	7)
<i>Claviceps purpurea</i>	0.8 モル サッカロース	4.7	14)
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	0.8 モル マニトール+0.7 モル KCl	—	19)
<i>Typhula ishikariensis</i>	0.6 モル マニトール	5.6	21)
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.2 モル KCl	5.8	20)
<i>Fusarium tricinctum</i>	1.4 モル MgSO ₄	5.8	20)
<i>Verticillium albo-atrum</i>	0.7 モル MgSO ₄	7.0	22)
<i>Botrytis cinerea</i>	0.6 モル KCl	5.8	11)

じめ酵素液の至適 pH を把握しておく必要がある。

3 供試菌体の調製

一般に真菌類のプロトプラスト分離は、胞子より菌糸のほうが容易で、供試菌体に菌糸を用いる場合が多い。しかし、菌糸からのプロトプラストは、1細胞がいくつかに細分化されて分離されることが多いので、それらの遺伝的均一性に懸念が残る。事実、細胞内小器官の分布が様でないことによる細胞内変異が、*Phytophthora cinnamomii* (1966) や *Aspergillus nidulans* (1972) などで報告されている。その点胞子からのプロトプラストには、上記の心配が少ないばかりか、生育ステージを同調できるという利点がある。ただし、胞子はメラニンの沈着や壁組成の変化のため、分解酵素に耐性の場合が多く、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリコレートなどによる前処理を必要とする場合がある。一般的に、指数増殖期の若い菌体のほうが静止期のそれよりプロトプラスト収量が高いといわれている。*Sporotrichum thermophile* の場合のように、10 時間培養菌糸ではほとんどプロトプラスト化されるのに対し、12~16 時間培養の菌糸では収量が激減するという極端な例さえある (PEBERDY and FERENCYZ, 1985)。遺伝的に均一なプロトプラストを大量に得るため、生育ステージを同調させた若い菌体を用いるようくふうする必要がある。

4 分離操作

上記の方法で準備した菌体を酵素液に入れ、所定温度下で所定時間 緩やかに 振とうする。植物病原菌について、酵素処理温度と時間をまとめたのが第3表である。菌体を酵素処理した後、未分解残渣をガーゼやスチール製網などで除去し、プロトプラスト懸濁液を得る。これをマニトールなどの高張液で数回遠心洗浄し、酵素液を取り除く。HASHIBA と YAMADA (1982) はこれをショ糖

・マニトール二層分離法を用いてさらに精製している。

このほか 特異な例として、酵素を用いないプロトプラスト分離法がある。すなわち、SELITRENNIKOFF ら (1981) は培地にソルボースとポリオキシン B を添加する方法で *Neurospora crassa* から、BERLINER ら (1970) は 2.0 モルの $MgSO_4$ とともに $37^\circ C$ でインキュベートする方法により *Histoplasma capsulatum* から、また、BERLINER (1971) は高濃度の $MgSO_4$ と 2-deoxy-D-glucose を添加した Sabourand 培地でインキュベートする方法で *Schizosaccharomyces octosporus* から、それぞれプロトプラストを分離している。

5 再生

分離プロトプラストに適当な栄養源を与えると、細胞壁を再生し、あるものは菌糸体に戻り復帰する。再生培地は液体でも固体でもよいが、いずれの場合も浸透圧調整剤を添加しておく必要がある。いもち病菌プロトプラストの再生には、ジャガイモ煎汁や粉末酵母エキスの添加が有効で、特にサッカロースで高張した場合の再生率 (20~30%) がもっとも高い (崔ら, 1984)。紋枯病菌の場合はマニトールで高張した素寒天でも再生するが (HASHIBA and YAMADA, 1982)、サッカロースで高張したジャガイモ煎汁培地のほうがよりよい結果を示す (崔ら, 1984)。また、菌糸への再生過程には、不規則な形をした数珠状細胞を形成した後その先端に発芽管様の菌糸を出す場合と、直接菌糸を出す場合とがあり、その後菌糸は分岐してコロニーを形成することが観察されている (HASHIBA and YAMADA, 1982 ; TANAKA et al., 1981)。

III プロトプラストの融合と選抜

プロトプラストの表面は、全体が負に荷電しており、

第3表 酵素処理の温度と時間

病 原 菌	菌 体	酵 素 処 理		文 献
		温 度 ($^\circ C$)	時 間 (hr)	
<i>Pyricularia oryzae</i>	菌 糸	26, 30	1.5, 3	18), 27) ^{a)} , 28)
"	胞 子	37	4	
<i>Rhizoctonia solani</i>	菌 糸	32	3	8)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	菌 糸	27	18	7)
"	胞 子	27	6	7)
<i>Claviceps purpurea</i>	菌 糸	26	12	14)
<i>Cochliobolus heterostrophs</i>	菌 糸 ^{a)}	33	6~16	19)
<i>Typhula ishikariensis</i>	菌 糸	25	1.5	21)
<i>Fusarium oxysporum</i>	菌 糸	30	5	20)
<i>Fusarium tricinctum</i>	菌 糸	30	5	20)
<i>Verticillium albo-atrum</i>	菌 糸 ^{a)}	23	1~20	22)
<i>Botrytis cinerea</i>	菌 糸	30	1	11)

a) 胞子を培養して得た菌糸。

そのままの状態でも相互に融合することはほとんどない。真菌類では最初遠心操作という物理的方法でプロトプラスト融合が試みられたが、融合頻度がきわめて低いことから、Kaoら(1974)が開発したポリエチレングリコール(PEG)法が導入されることとなった。Ca⁺⁺(またはMg⁺⁺)を含むPEG溶液中でプロトプラストが凝集する性質を利用したもので、処理後PEG濃度を下げ、プロトプラストを洗浄すると融合するといわれている。PEGは平均分子量1,000~7,500のものを20~40%濃度で用いる場合が多く、Ca⁺⁺イオンとしてはだいたい10~100ミリモル濃度のCaCl₂が使われている。

次に大切なことは、このようにして得たプロトプラスト融合体を、どのようにして選び出すかという問題である。一般的に真菌類では、栄養要求性の突然変異体を作出し、それをマーカーにして融合体を選びだしている場合が多い。すなわち、栄養要求性が互いに補足されたものだけが増殖できるような再生用選択培地を用い、そこに生じたコロニーを拾い上げるという方法である。しかし、真菌類の生活体は単相の場合が多く、融合プロトプラストが菌糸に再生したときには再び半数体となるので、ヘテロカリオンか組換え体の状態にならないかぎり、選択培地にコロニー形成することはなく、その頻度はかなり低い場合が多い。このほか、融合させようとするプロトプラストを生体染色色素でマークする方法などがある。いずれにしても、プロトプラストにおいては細胞内変異や処理中の突然変異の懸念があるので、対照区との比較に注意しながら融合体の特性を検定する必要がある。また、できるだけ複数のマーカーでラベルすることが望ましい。

植物病原菌を対象としたもので、プロトプラスト融合にまで仕事を進めているものはきわめて少ない。Boissonnet-MenesとLeocoq(1976)はいもち病菌を用いて、プロトプラスト融合によるウイルスの伝染に成功し、高坂ら(1977, 1978)はレースの異なるいもち病菌の交雑を試みている。高坂らの手法は次のとおりである。約10⁷個/ml濃度に調整したプロトプラスト液に0.08モルPEG 6,000を10分間ごとに2回添加し、さらに10分後と60分後に0.7モルショ糖を加えてPEGを希釈すると、2~5時間後に融合が起り、融合率20~30%に達したという。ただし、融合の確認方法などの記載がないので、詳細については不明である。このようにして得た融合株を薬剤耐性をマーカーとして選抜し、病原性検定したところ、親株と異なる反応を示すものが得られたとしている。一方、HashibaとYamada(1984)は紋枯病菌の栄養要求性株を用いてプ

ロトプラスト融合を行っている。すなわち、0.01モルCaCl₂·2H₂Oを含む0.01モルトリス緩衝液で懸濁した約10⁷個/mlのプロトプラストを40%PEG 4,000で処理した後、再生用高張培地で培養し、生じたコロニーを分離する方法をとっている。融合株の菌核形成や病原性の検定を行っているが、詳細については原著を参照されたい。このほか植物病原菌としては、雪腐黒色小粒菌核病菌プロトプラストのPEGによる融合の概要が報告(松本・但見, 1986)されている。

IV プロトプラストの利用

プロトプラストの利用範囲の広さは、ひとえにその特性のユニークさにある。植物のプロトプラストは細胞壁を持たない単細胞系で、かつ完全な個体への復帰が可能なることから、特異な利用価値を持っている。体細胞のプロトプラストを融合して得た細胞質雑種は、核ゲノムの混合ばかりか細胞質因子の混合も可能なわけで、有性的交雑ではなしえなかった有用遺伝子の組み合わせを可能にするものである。また、プロトプラストは核酸分子やいろいろな粒子を取り込むことができるので、外来遺伝子を導入して個体の形質転換を図ることなども可能である。しかし、真菌類、特に植物病原菌の分野では、これらはまだ可能性の問題でしかない。当分は基礎データの積み重ねに努力しなければならない。

次に、少数例ではあるが、植物病理分野におけるプロトプラスト利用の実例を紹介することにする。一つは、薬剤作用機構の解明に利用した例である。すなわち、HisadaとKawase(1977)は、灰色かび病菌に対するプロンミドンの作用を菌糸プロトプラストを用いて検討し、本剤の作用が細胞壁合成阻害によるものではないことを突き止めている。また、Ishizakiら(1983)はいもち病菌プロトプラストにイソプロチオランを作用させ、20ppm以上で再生菌糸の伸長を阻害すること、50ppmで細胞壁成分の合成に影響を及ぼすことなどを明らかにした。一方、HashibaとYamada(1984)、Hashibaら(1984)は、紋枯病菌のプロトプラストを突然変異体の作出および菌体内プラスミドの抽出に利用し、意図する成果をあげている。特異な利用場面としては、プロトプラストを接種源として利用した例があげられる。Moriehartら(1985)は、ナスやトマトの半身萎ちょう病菌のプロトプラストを作成し、それをナス、トマトおよびユリノキ苗の根と茎に接種したところ、ナスとトマトだけが罹病し、罹病部位からは病原菌が再分離された。接種プロトプラストが直接道管病を引き起こしたのか、それとも菌糸に再生した後に感染したのか現時点では不明

であるが、この事例はプロトプラストが宿主内の蒸散流中で生存できることを示しており、宿主内へ搬移に果たすプロトプラストの役割に興味深いものがある。

おわりに

本稿では、主に植物病原菌に関する報告を抄録するよう心がけた。そのため、*Aspergillus* や *Saccharomyces* などを対象とした細胞生理学的、生化学的ならびに遺伝学的研究のほとんどを割愛する結果となった。これらの報告の中には、植物病理学の分野とは比較にならないほど進んだ内容のものが少なくない。しかし、それらの紹介は本誌の意図するところではないと考えられるので他誌に譲ることにしたい。

引用文献

- 1) 浅井智子ら (1986) : 日植病報 52 : 136.
- 2) 有馬賢治・高野 勇 (1979) : 醸酵工学 57(5) : 380~395.
- 3) BACON, J. S. D. et al. (1965) : Biochem. J. 95 : 28 C~30 C.
- 4) BARTNICKI-GARCIA, S. (1968) : Annu. Rev. Microbiol. 22 : 87~108.
- 5) BOISSONNET-MENES, M. and H. LEOCOQ (1976) : Pysiol. vég. 14(2) : 251~257.
- 6) 崔 庸哲ら (1984) : 日植病報 50 : 397~398.
- 7) HARRIS, G. M. (1982) : Phytopathology 72 : 1403~1407.
- 8) HASHIBA, T. and M. YAMADA (1982) : ibid. 72 : 849~853.
- 9) ——— (1984) : ibid. 74 : 398~401.
- 10) ——— et al. (1984) : J. Gen. Microbiol. 130 : 2067~2070.
- 11) HISADA, Y. and Y. KAWASE (1977) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 43 : 151~158.
- 12) 細川大二郎・高坂淳爾 (1976) : 日植病報 42 : 330.
- 13) ISHIZAKI, H. et al. (1983) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 49 : 471~480.
- 14) KELLER, U. et al. (1980) : J. Gen. Microbiol. 118 : 485~494.
- 15) 高坂淳爾ら (1977) : 日植病報 43 : 314.
- 16) ———ら (1979) : 同上 45 : 515.
- 17) 久能 均 (1983) : 日菌報 24 : 341~356.
- 18) KUNOH, H. et al. (1984) : Trans. Mycol. Soc. Japan 25 : 413~423.
- 19) LEACH, J. and D. C. YODER (1982) : Exp. Mycol. 6 : 364~374.
- 20) LYNCH, P. T. et al. (1985) : Trans. Br. Mycol. Soc. 85(1) : 135~140.
- 21) 松本直幸・但見明俊 (1986) : 日植病報 52 : 143~144.
- 22) MOREHART, A. L. et al. (1985) : Mycologia 77(5) : 784~790.
- 23) PEBERDY, J. F. (1979) : Ann. Rev. Microbiol. 33 : 21~39.
- 24) ——— and L. FERENCZY (1985) : Fungal Protoplast, Marcel Dekker, Inc., New York, 354 pp.
- 25) 多賀正節ら (1982) : 日植病報 48 : 100.
- 26) TANAKA, H. and H. J. PHAFF (1965) : J. Bacteriol. 89 : 1570~1580.
- 27) ——— et al. (1981) : Agric. Biol. Chem. 45(7) : 1541~1552.
- 28) 八重樫博志ら (1983) : 日植病報 49 : 127.

人事消息

(10月1日付)

伊藤 伝氏 (農研センター企連室) は果樹試盛岡支場病害研究室へ
 伊藤陽子氏 (茶試企連室) は茶試栽培部病害研究室へ
 相場 聡氏 (北海道農試企連室) は北海道農試病理昆虫部虫害第2研究室へ

松村正哉氏 (農研センター企連室) は北陸農試環境部虫害研究室へ

樋口博也氏 (四国農試企連室) は九州農試環境第一部虫害第1研究室へ

渡邊朋也氏 (九州農試企画調整部) は九州農試環境第一部虫害第3研究室へ

「植物防疫」専用合本ファイル

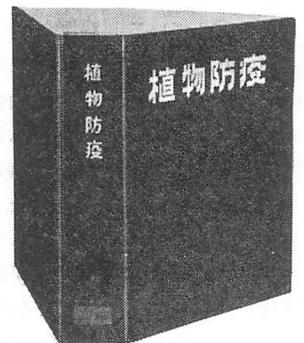
本誌名金文字入・美麗装幀

本誌B5判12冊1年分が簡単にご自分で製本できる。

- ①貴方の書棚を飾る美しい外観。
- ②穴もあけず糊も使わず合本ができる。
- ③冊誌を傷めず保存できる。
- ④中のいずれでも取外しが簡単にできる。
- ⑤製本費がはぶける。

定価 1部 500円 送料 350円

御希望の方は現金・振替・小為替で直接本会へお申込み下さい。



遺伝子操作技術利用によるウィロイド病の診断

岩手大学農学部植物病理学教室 たか はし つよし
高 橋 壮

はじめに

植物の新しい病原体としてウィロイドが発見されてから 10 数年の歳月が過ぎた。その発見の当初から、ウィロイドの基礎と応用の研究がウイルス学の延長線上で考えてよいのか、あるいはまったく新しい視点からアプローチすべきであるのか、実験研究を進める過程でさまざまな討論が交わされてきた。

今や環状の 1 本鎖 RNA からなる「ウィロイド」の正体が突き止められ、ウイルスよりもはるかに小さな病原体であることが明らかにされた。ウィロイドはまた、ウイルスと異なり何のタンパク質もコードせず、植物細胞の酵素系に依存して増殖する。これらの成果の大半は、近年の遺伝子操作技術の利用によって得られたのであるが、他方では、上述の基礎研究を踏まえて、弱毒ウィロイドによる防除とか、抵抗性植物の分子育種といった応用技術の実用化への指向が高まりつつある。このような研究の動向に視野の広い目的意識を与え、確実な成果をもたらすには、何といても病原ウィロイドとその発症過程で起こるさまざまな感染現象についての基本的理解が不可欠であることは言うまでもない。

わが国では、カンキツ、ホップ、キク、リンゴ、スモモにウィロイド病が見られる。ブドウにもウィロイドが不顕性感染していることが見つかった。これらのウィロイド病は罹病組織の汁液と接触したり、接ぎ木作業によって伝染する。それぞれの宿主がひとたびウィロイド病にかかると全身的に感染が拡大するので、化学物質による防除が困難となり予防に頼らざるをえない。そのため、ウィロイド病的確な、しかも迅速な診断法を開発し、その発生とまん延を未然に防止する方策を確立することが急がれていたのである。このような予防戦略研究の一環として、遺伝子操作技術を巧みに利用した診断がいくつかのウィロイド病で試みられ、実用化に向けて明るい見通しがつくようになった。

本稿ではその診断の原理と応用について解説してみようと思う。

I ウィロイド病診断の基本

ウィロイドの性状として、自然条件下では、増殖速度が一般に遅いのが特徴である。また、発症に至る潜伏期が長く、1~2 年から数年に及ぶものもある。こうした事情が、ウィロイド病の診断や、病原ウィロイドの検出をいっそう困難にしている理由の一つになっていた。実験的には、30°C 以上の高温条件下に置くと、ウィロイドの増殖量が多く、かつ潜伏期が短くなるので、検定植物による生物検定法は通常、高温条件下で行っているのが実状である (高橋, 1985)。

ウィロイドはまた、先に述べたように裸の RNA そのものであり、ウィロイド RNA には抗原性がないので、これまでにウイルス病診断で汎用されている血清反応による診断ができなかった。このこともウィロイド病対策を推進するうえで、重要な隘路の一つになっていた。

ウィロイド病の診断の基本は、次の二つに要約することができる (第 1 表)。

その一つは、宿主の形態変化や体内成分の変動に着目した診断である。

外部病徴による診断は、例えば、茎葉、樹幹、花器、果実、地下部などに発現する症状に基づいて行うが、外部病徴の種類や潜伏期は、ウィロイドと宿主の組み合わせによって区々である。それぞれ特有な病徴によって診断が行われている (DIENER, 1979)。

縮葉や巻縮症状を呈した感染葉の細胞を電子顕微鏡で観察すると、細胞壁が波状にうねり、かつその厚さが不斉になった細胞が多数認められる (MOMMA and TAKAHASHI, 1982; TAKAHASHI et al., 1985)。このような細胞の形状がゆがめられると、細胞配列が不規則となり葉身の伸長が悪くなる。細胞壁の波状湾曲は、例えば、ホップわい化ウィロイド (HSV) 感染ホップの茎頂分裂組織 (茎頂先端より 0.2 mm 以内) では認められないので、茎頂培養によって作出したウィロイド・フリー株の検定の一助として応用できる (MOMMA and TAKAHASHI, 1983)。

宿主成分の変動がウィロイド病診断に利用されている例としては、HSV 感染ホップの穂花に含まれる樹脂成分による診断がある。樹脂、特に苦味成分であるアル

第1表 ウイロイド病の診断法の種類

A 宿主の形態変化・体内成分変動による診断	
1) 外部病徴による診断 ¹⁻³⁾	茎 葉：葉身のわい性化・縮葉・巻縮・エ ビナスティー、茎葉の黄化・脱落、 節間の短縮、草丈のわい性化 樹 幹：樹皮の亀裂・はく脱 花 器：花卉のわい性化・しわが寄る 果 実：果実の小型化・さび果・斑入り果・ 奇形化 地下部：塊茎のやせいも化・ひび割れ、根 系のわい性化・くま手状分岐
2) 感染細胞の微細構造による診断	細胞壁の波状湾曲 (例えば、ホップ茎頂組織 ⁴⁾)
3) 体内成分による診断	樹脂成分含量の低下 (例えば、ホップ毬花 ⁵⁾)
B 病原体の検出による診断 ²⁾	
1) 検定植物による診断	
2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動による診断	
3) 高速液体クロマトグラフィーによる診断	
4) 遺伝子操作技術利用による診断	
1) DIENER, 1979	
2) 高橋, 1985	
3) YAGUCHI and TAKAHASHI, 1984	
4) MOMMA and TAKAHASHI, 1983	
5) TAKAHASHI et al., 1983	

フッ酸含量の低下が診断の指標となる (TAKAHASHI et al., 1983)。

他の一つは、ウイロイド病原体そのものの検出による診断である。

検定植物による診断は、各種のウイロイド病で実施されている。ウイロイドの生物検定は 30°C 前後、あるいはそれ以上の高温条件下で行うことが望ましい。診断結果の判定に少なくとも 30 日を要するのが難点である。20~25°C 付近の検定では、発病しなかったり、潜伏期が長引く場合が多く、このような条件での診断はきわめて困難である (高橋, 1985)。

感染植物をフェノール抽出したのち、低分子核酸を集め、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、あるいは高速液体クロマトグラフィーによってウイロイドを分別して診断する方法がある。これらの方法では、被検試料の調製を含めて診断は 1~2 日で完了する (高橋, 1985)。

遺伝子操作技術利用による診断については、次に述べる。

II 遺伝子操作技術利用による診断

(DIENER et al., 1984; OWENS and DIENER, 1984)

1 診断法の原理

生物の細胞内に分布する DNA 分子や RNA 分子の生物学的性質が 4 種類のヌクレオチドの配列順序で決まることは周知のとおりである。ウイロイド RNA の構造も同様に、その種類や系統によって一定のヌクレオチド配列をとっている。したがって、このような性状の違いを利用して、ウイロイドの種類や系統を検出することが可能である。そのもっとも有用な方法の一つが核酸ハイブリッド形成法である。この方法は、ウイロイド RNA と鍵・鍵穴のような関係にある、いわゆる相補 DNA を遺伝子組換え技術を利用して調製し、次いで相補 DNA と被検試料中のウイロイド RNA とのハイブリッド形成の有無によって診断する手技である。これは遺伝子診断とも呼ばれ、遺伝子レベルの病気の診断に用いられている方法である。

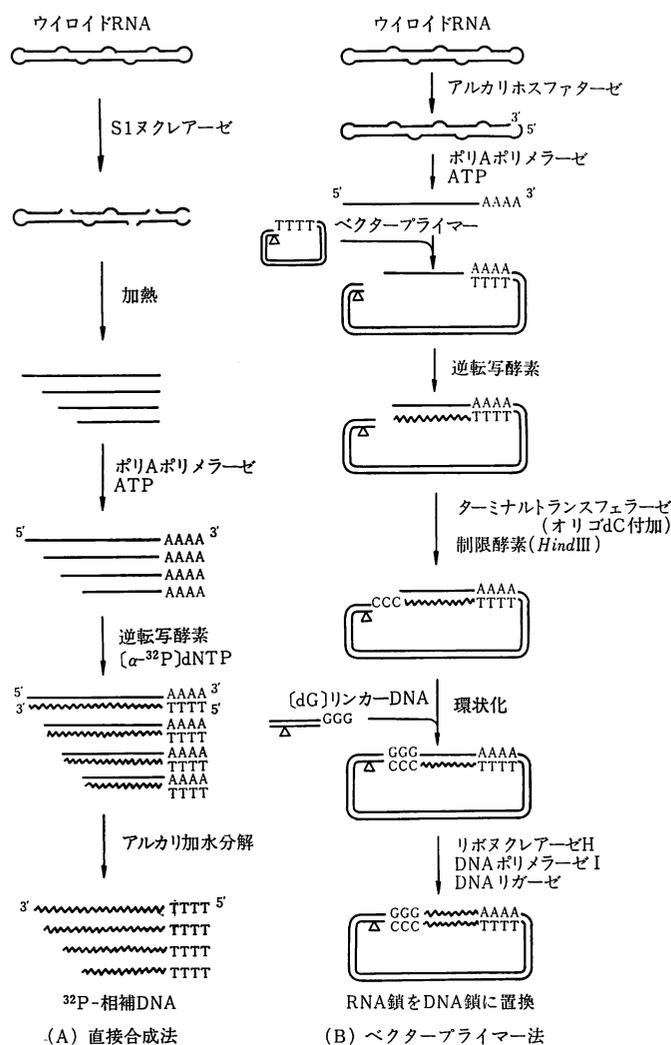
そのためには、ウイロイド病診断のプロープ (検出用試薬) となる相補 DNA を準備しなければならない。

2 ウイロイドの相補 DNA の調製

これには二つの方法がある。一つは精製したウイロイド RNA を鋳型にして、逆転写酵素によって相補 DNA を直接合成する方法である。例えば、S1 ヌクレアーゼ処理で得られたウイロイド RNA 断片の 3' 末端にポリ A を付加し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP を添加して合成が試みられたものとして、アボカドサンブロッツウイロイド (ASBV) (ALLEN and DALE, 1981; PALUKAITIS et al., 1981)、ココヤシカダンカダンウイロイド (CCCV) (RANGLES and PALUKAITIS, 1979)、キクわい化ウイロイド (CSV) (PALUKAITIS and SYMONS, 1978) がある (第1図A)。この場合、長さの異なる相補 DNA が得られるが、ウイロイド病の診断には大きな問題にならない。

ジャガイモやせいもウイロイド (PSTV) では、子ウシ胸腺 DNA 断片をプライマー (DNA 合成の始点構造) にして相補 DNA が合成された (OWENS, 1978)。オリゴデオキシリボスクレオチドをプライマーに用いて PSTV やカンキツエクソコーティスウイロイド (CEV) の相補 DNA の合成に成功した例もある (RHODE et al., 1981a, b)。

他の一つは、組換え DNA 技術を利用して調製する方法である (第1図B)。普通、ウイロイド RNA をベクターに組み込み、細菌細胞内でクローニングを行うが、mg オーダーの DNA クローンが得られること、また



第1図 ウイロイドの相補DNAの調製法

宿主由来の核酸をまったく含まないという利点があるので、各種ウイロイドで適用されている方法である。ベクターにはプラスミド pBR322 やファージ M13 がよく用いられ、PSTV (OWENS and CRESS, 1980; VAN WEZENBEEK et al., 1982), ASBV (BRUENING et al., 1982), CEV (VISVADER et al., 1982), HSV (OHNO et al., 1983) などの相補DNAが調製された。

相補DNAクローニングに関して、種々の改良法が報告されているが、ここでは代表的な方法の一つである岡山・バーグのベクタープライマー法によるHSVの相補DNAの調製について述べる(第1図B)。

ベクタープライマーは、岡山・バーグの原報 (OKAYAMA and BERG, 1982) と若干異なるプラスミド p321

より、またリンカーDNAはpXより作製する (OHNO et al., 1983)。まずプラスミド p321 および pX から、両端に *Bam*HI 部位と [dT] を持つベクター、および *Hind*III 部位と [dG] を持つリンカーDNAをそれぞれ作製する。一方、精製HSVを大腸菌アルカリホスファターゼで処理し、3'末端に水酸基を持つ線状HSVを得る。この3'末端にポリAを付加した線状のウイロイドRNAを鋳型として、逆転写反応によりベクターに直接結合した相補DNAを合成する。次いで、DNAの3'末端にターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼにより [dC] を付加した後、制限酵素処理し、*Hind*III 部位および [dC] の末端構造を持つベクター・相補DNA:RNAを合成する。リンカーDNAとアニリングして環状化させた後、リボヌクレアーゼH、DNAポリメラーゼIおよびDNAリガーゼにより、RNA鎖をDNA鎖に置換した閉環DNAを作製する。

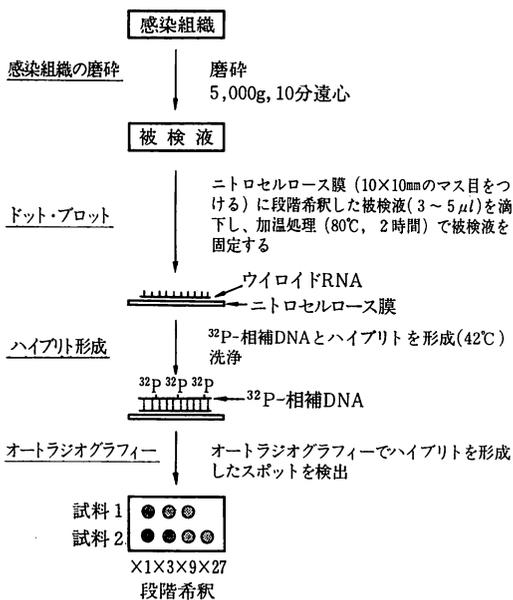
このようにして得られた閉環DNAを塩化カルシウム処理によって大腸菌 HB 101 にクローン化する。組換えプラスミドを持つ大腸菌は、アンピシリン耐性コロニーとして現れ、 ^{32}P -HSV (アルカリ処理で断片化した5'末端を ^{32}P で標識したもの)をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行い形質転換したクローンを選抜する。目的とする組換えクローンを分離した後、このクローンからプラスミドを精製し、制限酵素断片を作製する。得られた断片にHSVの相補DNAが含まれていることは、ノザンプロット法を行い、環状HSVとハイブリットを形成することから確認する。

3 ^{32}P -相補DNAプローブ法による診断

これはウイロイドRNAと相補DNAとの間に形成されるハイブリットの検出法の違いにより、ドット・プロット法および液相ハイブリット法の二つの方法に大別される。

(1) ドット・プロット法

第2図に示すように、感染組織から調製した被検液をニトロセルロース (NC) フィルター上に滴下、固定させた後、フィルター上のウイロイドRNAと ^{32}P -相補



第2図 ドット・プロット法によるウイロイド病の診断

DNA (^{32}P はニックトランスレーション法によって標識する) との特異的なハイブリット形成によって高感度に検出する方法である。

ここでは、HSV と相補 DNA のハイブリット形成に関する標準操作法の確立とその実際の応用について紹介する (高橋ら, 1984)。

① HSV の検出限界: NC フィルターに鉛筆でマス目を書き入れる。精製 HSV を $5\mu\text{l}$ 当たり 1.3, 4, 12, 37, 110, 330, 1,000, 3,000 pg に調整し, これらの試料を上述のマス目に滴下し乾燥する。次いで, 80°C に 2 時間静置し, HSV をフィルターに固定する。このフィルターと ^{32}P -相補 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液をビニル袋に入れて密封し, 42°C で一夜反応させる。その後, NC フィルターを取り出し洗浄する。乾燥後, オートラジオグラフィを行う。その結果, HSV の検出限界は 110~330 pg の範囲であった。上述の NC フィルターのほかに, ジアゾベンジルオキシメチル (DBM) ペーパーを用いて検討したが, ハイブリット形成を示す黒い染みが薄く, かつプローブが非特異的に吸着するためにバックグラウンドが高いなど, NC フィルターに比べて良い結果が得られなかった。したがって, 以後の実験から NC フィルターを用いることにした。

② 非特異反応の検討: 植物細胞由来の成分が, HSV-相補 DNA ハイブリット形成の非特異反応に関与するか否かを確認する試みとして, HSV 検出に及ぼす健全植

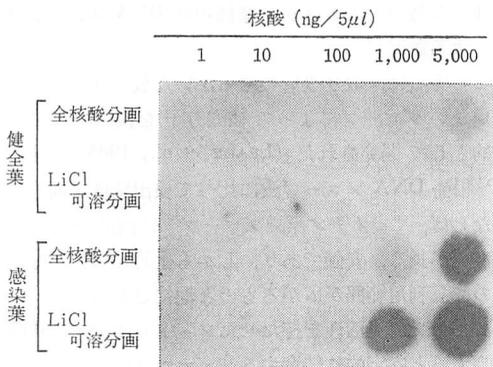
物業抽出液の添加の影響を調べた。精製 HSV の各希釈液 $5\mu\text{l}$ (1.3, 4, 12, 37, 110, 330, 1,000, 3,000 pg/ $5\mu\text{l}$) にそれぞれ健全キュウリ葉の全核酸分画 $1\mu\text{l}$ (核酸量 $1\mu\text{g}$ 含む) を加えた試料を NC フィルター上に滴下し乾燥した。上述の方法によりハイブリット形成を行ったところ, いずれの添加区においても非特異的な反応が認められた。感染葉抽出液の調製についてさらに検討する必要があるが生じた。

③ キュウリ葉抽出液を用いた実験: 感染植物の診断にあたり, 感染植物からの HSV 試料の抽出は簡便であることが望ましい。すでに述べたように, 健全キュウリ葉の全核酸分画を精製 HSV と混合してハイブリットを形成させた場合, 非特異反応が認められた。そのため種々の抽出法について比較検討した結果, 塩化リチウム (LiCl) 可溶分画 (HSV のほかに, 宿主低分子核酸が主に含まれる) を供試すると HSV 感染に特異的なハイブリット形成が起こることが明らかになった。

最初に, 健全キュウリ葉の全核酸分画および LiCl 可溶分画を供試して, 非特異反応の有無について検討した。第3図から明らかのように, $5\mu\text{l}$ 当たり 1,000 ng, すなわち $1\mu\text{g}$ 以上の濃度の全核酸が存在する場合に非特異反応が認められた。これは上述の健全葉全核酸分画の添加実験の結果とよく一致する。これに対して, 健全キュウリ葉の LiCl 可溶分画では供試したどの濃度においても非特異反応が認められなかった。同時に実験に供した感染キュウリ葉 (接種後 30 日の試料) の結果を第3図に示す。ハイブリット形成は, LiCl 可溶分画中の核酸 $100\text{ ng}/5\mu\text{l}$ 以上の濃度範囲で認められた。感染キュウリ葉の LiCl 可溶分画には HSV がおよそ 0.1% 含まれるので (YOSHIKAWA and TAKAHASHI, 1982), LiCl 可溶分画中の核酸 100 ng には 100 pg オーダーの HSV が含まれていることになる。この値は, 精製 HSV の検出限界が 110~330 pg であるという結果とよく一致する。

感染キュウリ葉の全核酸分画において HSV の存在を示唆する陽性反応が得られたが, これには非特異反応も多少関与していることが考えられる。しかし, ハイブリット形成の染みが健全葉の全核酸分画のそれに比べて濃く出ているので, 感染葉全核酸分画に HSV が存在していることが示唆された。

このように相補 DNA プローブ法の標準操作法が確立されたので, 感染植物葉抽出液中の HSV の検出とその定量化が可能となった。これらの結果を踏まえて, 次に述べるような感染ホップについての実際の診断を行い, HSV 検出法の検出精度を比較した。



第3図 キュウリ葉の全核酸分画および LiCl 可溶分画における HSV の検出

〔全核酸分画の抽出〕 ①供試葉を 10 分間磨碎する。磨碎液の組成：葉 10g に対して抽出用緩衝液 (0.1 モル トリス, 0.01 モル Na₂EDTA, 0.1 モル NaCl) 10 ml, 水飽和フェノール (0.1% 8-ヒドロキシキノリンを含む) 20 ml, 2-メルカプトエタノール 0.1 ml, ベントナイト 0.1 g, SDS 0.2 g。

②8,000 rpm, 15 分遠心。水層に等容の水飽和フェノールを加え, 60 分かしくはんする。

③遠心後, 水層に 2 容の 95% エタノールを加え, -20°C, 一夜静置する。

④10,000 rpm, 20 分遠心して沈殿を集め, 蒸留水に懸濁, これに等容の 2.5 モル K₂HPO₄ および 2-メトキシエタノールを加え, 10 分間かしくはんする。

⑤8,000 rpm, 10 分遠心の 上澄みに, 等容の 0.3 モル NaCl および 1/2 容の 1% セチルトリメチルアンモニウムブロミドを加え, 0°C, 30 分間静置する。

⑥10,000 rpm, 20 分遠心して沈殿を集め, 0.3 モル酢酸ナトリウムに懸濁, これに 2 容の 95% エタノールを加え, -20°C, 一夜静置する。

⑦10,000 rpm, 20 分遠心の沈殿を蒸留水に懸濁する。これが全核酸分画である。

〔LiCl 可溶分画の抽出〕 ①全核酸分画に等容の 4 M LiCl を加え, 4°C, 一夜静置する。

②6,500 rpm, 10 分遠心して上澄みを集め, これに 2 容の 95% エタノールを加え, -20°C, 一夜静置する。

③10,000 rpm, 20 分遠心の沈殿を蒸留水に懸濁する。これが LiCl 可溶分画である。

④感染ホップの診断：ホップ葉組織の採取時にキュウリ検定を行い, HSV に感染していないことが確認された 2 株, すなわち株 66 および株 134 を健全ホップとし, また感染が確認された株 V6 および株 V8 の 2 株を感染ホップとした。それぞれの株から葉組織 10g を

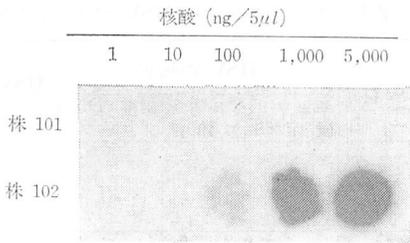
第2表 ホップにおける HSV 感染の診断^{a)}

試料	HSV の検出			HSV 感染の判定
	キュウリ検定法	ゲル電気泳動法	相補 DNA プローブ法	
健全ホップ株 66	-	-	-	-
健全ホップ株 134	-	-	+	+
感染ホップ株 V6	+	+	+	+
感染ホップ株 V8	+	+	+	+

a) 健全ホップおよび感染ホップの各株について, 1982 年 8 月の葉組織試料の採取時にキュウリ検定したところ, それぞれ陰性および陽性の結果が得られた。各試料から調製した LiCl 可溶分画について, キュウリ検定と 7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動による検定を行うとともに, 相補 DNA プローブ法による HSV 検出を試み, 三者の結果を総合して HSV 感染の判定を行った。

採取し, 診断試料に供した。各試料の LiCl 可溶分画を核酸濃度 0.5 mg/ml に調整し, 同一試料についてキュウリ検定法, ゲル電気泳動法および相補 DNA プローブ法による HSV の検出を試み, 三者による検出精度を比較した。その結果を要約したのが第 2 表である。ここで注目されることは, キュウリ検定法およびゲル電気泳動法で陰性結果が得られた株 134 が, 実は相補 DNA プローブ法によって HSV に感染している株であると判定された点である。これは, 三者の中で相補 DNA プローブ法がもっとも精度の高い検出法であることを示唆している。HSV 感染のゲル電気泳動による診断は 9 時間以内で完了するが, 宿主細胞由来の核酸が妨害する場合があります。キュウリ検定法 (1 ml 当たり 1~100 pg の HSV が検出できる) よりも一般に精度が低く, 1 ゲル当たり 10~100 ng の HSV が検出されるにすぎない。

次に, ホップほ場において, 外部病徴の診断によって感染株とみなされたホップから LiCl 可溶分画を調製し, 相補 DNA プローブ法によって HSV の検出を試みた。その結果を第 4 図に示す。供試した株 101 では HSV 感染が認められず, おそらく別の原因によって生じた症状を見誤って診断したものと理解される。一方の株 102 について, LiCl 可溶分画の核酸濃度 100 ng/5 μl 以上では明らかなハイブリット形成があり, 明らかに感染していることが確かめられた。感染ホップ (株 102) における陽性反応の検出限界が 100 ng のオーダーであることは, 第 3 図に示した感染キュウリの場合と一致しており, HSV 検出を定量的に取り扱うことができる。



第4図 ホップほ場で病徴診断によって感染株と判定されたホップの相補 DNA プローブ法による診断

以上に述べたドット・プロット法による診断操作は、多数の被検試料について短期間 (4~5 日) のうちに完了することが可能である。

ドット・プロット法によって診断が試みられた他のウィロイドには、PSTV (BARKER et al., 1985; MACQUAIRE et al., 1984; OWENS and DIENER, 1981; SALAZAR et al., 1983), CEV (BARKER et al., 1985), CSV (MACQUAIRE et al., 1984), CCCV (BARKER et al., 1985; MOHAMED and IMPERIAL, 1984), ASBV (BARKER et al., 1985), キュウリペイルフルーツウィロイド (CPFV) (SANO et al., 1984), ブドウウィロイド (GV) (FLORES et al., 1985), スモモ斑入果ウィロイド (PDV) (SANO et al., 1986) などがある。

(2) 液相ハイブリット法

上述のドット・プロット法では固相として用いた NC フィルター上でハイブリット形成を行うのに対して、この方法は溶液状態で形成させる点が異なる。被検液を ^{32}P (あるいは ^3H) で標識した相補 DNA と混ぜてハイブリットを形成させ、遊離の 1 本鎖核酸 (^{32}P -相補 DNA や宿主の 1 本鎖核酸など) は SI スクレアーゼで分解する。次いで、5% トリクロル酢酸を加えてハイブリット分子のみを沈殿させ、これをガラスフィルターで濾過するとハイブリット分子がフィルターに吸着し、SI スクレアーゼで分解した小断片核酸が除去される。フィルター上の放射能の強さの測定からウィロイド RNA を定量することができる。この方法の検出精度はドット・プロット法とほぼ同じであるが、一度に多数の試料を診断することができない難点がある。これまでに、ASBV (ALLEN and DALE, 1981; ALLEN et al., 1981; PALUKAITIS et al., 1981; SPIEGEL et al., 1984), CCCV (BOCCARDO et al., 1981; MOHAMED and IMPERIAL, 1984; RANDLES and PALUKAITIS, 1979; RANDLES et al., 1980), CSV (CHEN et al., 1982; PALUKAITIS and SYMONS, 1979) などの診断が報告された。

4 非放射性的のビオチン標識相補 DNA プローブ法による診断

この方法は、取り扱いのやっかいな放射性同位元素を用いないプローブによって核酸分子を検出することを目的として開発された (LEARY et al., 1983)。上述の ^{32}P -相補 DNA プローブ法に比べて検出精度が同じであるならば、“ビオチン標識プローブ”は商品としての貯蔵寿命が長く、安価であり、しかも生物災害の心配がないので、利用範囲が広がるものと期待される。

ビオチンに光活性を持たせたフォトビオチンは核酸と混合すると安定的に結合する。ビオチンはまた、糖タンパク質の一種であるアビジン (あるいはストレプトアビジン) と結合する性質があるので、アビジン-アルカリホスファターゼ結合体を加え、ハイブリット形成した部位を酵素反応による発色によって肉眼的に判定することができる。操作手順は NC フィルターを用いるドット・プロット法と同じで、最後の結果は、NC フィルター上の発色スポットとして得られる。酵素の基質として、5-ブロモ 4-クロロ 3-インドリルリン酸塩を、発色剤としてニトロブルーテトラゾリウムを用いる。ビオチン標識した ASBV の相補 DNA をプローブに用いて、ドット・プロット法、あるいはノザンプロット法で ASBV が検出できる精度は、 ^{32}P -相補 DNA の場合と同等であることが確かめられた (FOSTER et al., 1985)。

5 その他の方法による診断

(1) 自己核酸プローブ法

天然状態のウィロイド RNA は環状形態をとり、約 70% が相補結合していることに着目して開発された方法である (ROSNER et al., 1983)。まず線状構造にしてから 1 本鎖 RNA の 5' 末端にポリヌクレオチドキナーゼ法によって ^{32}P を標識する。この ^{32}P -ASBV-RNA をプローブとして用い、NC フィルター上に固定した被検液とハイブリット形成させてウィロイド RNA を検出する。この方法の検出精度は、すでに述べた相補 DNA プローブ法に比べて約 10 倍低い。ASBV の検出・診断に用いられている (ROSNER et al., 1983; SPIEGEL et al., 1984)。 ^{32}P 標識のウィロイド RNA は一部のウィロイドにおいて、相補 DNA を調製する際のコロニーハイブリダイゼーションの操作過程でも使用されている。

(2) 合成オリゴヌクレオチドプローブ法

これはウィロイド RNA に相補性を示す短い DNA プローブを化学的に合成した後、これに ^{32}P を標識してドット・プロット法によって診断する方法である。例えば、ASBV-RNA の #68~87 および 88~104 に相補

構造をとる 20 および 17 スクレオチドからなる相補 DNA をそれぞれ合成し、ASBV の数種の分離株の検出に用いられた (BAR-JOSEPH et al., 1985)。この方法の検出精度は、ゲル電気泳動法のそれに比べて少なくとも 64 倍高いという。

III ウィロイド病診断の問題点と展望

前節で述べた核酸ハイブリット形成を指標とする各種診断法についてその共通的な特徴と問題点をまとめると、次のようになる。

① ウィロイドの検出精度は、生物検定法やゲル電気泳動法に比べてきわめて高いが、そのことが非特異反応を生じやすい原因ともなる。検出の精度は、 ^{32}P -相補 DNA の標識部位の違い、例えばニックトランスレーション法か 5' 末端標識法かによって異なり、放射能比活性の高いプローブを用いると、検出精度も高くなる。また、非特異反応を抑えるには、被検液の調製条件、特に診断に供する宿主の種類や器官に対応して、その抽出液の組成、遠心分画の程度などについてそれぞれ検討する必要があろう。PSTV 感染ジャガイモの場合、200 m モル K_2HPO_4 、10 m モル DIECA、5 m モル ジチオスレイトル、0.1% トリトン X-100 からなる抽出緩衝液で磨砕後、低速遠心上澄みをフェノール抽出して得られた水層を被検液として用い、ドット・プロット法によって容易に診断できるという (SALAZAR et al., 1983)。しかしながら、HSV 感染キュウリでは、低分子核酸を主に含む LiCl 可溶分画を供試しなければ特異反応が得られなかった。粗汁液ほど不純物が多く含まれ、特に多糖類は粘性を高めるので ^{32}P -相補 DNA プローブを非特異的に吸着することがある。このような傾向は被検試料の濃度が高い場合に観察され、誤った診断を下しかねない。あるいはまた、宿主の種類によってハイブリット形成に干渉する細胞成分を含むことも考えられるので、被検液の調製に留意する意義は大きい。

② ウィロイドの種類や系統、あるいは分離株のスクレオチド配列順序の差がハイブリット形成の結果にどう影響するかという特異性の問題がある。ウィロイドのある系統の ^{32}P -相補 DNA は同じウィロイドの他の系統と強く結合する。したがって、核酸ハイブリット形成によって同一ウィロイドの系統間を識別することができず、すべての系統が検出されることになる。これはウィロイド RNA のスクレオチド配列の異同程度の反映であって、例えば、PSTV (359 スクレオチド) の基準系統と軽症系統との間では、3 個のスクレオチドが異なっているにすぎない (Gross et al., 1981)。軽症系統のような生物

検定法による検出の困難な場合には、核酸ハイブリット形成を指標とする診断は有用な方法であると言えよう。

次はウィロイドの種類間の特異性の問題である。PSTV グループに所属する CEV や CSV のスクレオチド配列は、PSTV のそれに対して約 73% の相同性を持ち、PSTV の ^{32}P -相補 DNA は CEV あるいは CSV 感染植物の抽出液と反応してハイブリットを形成する。このようなハイブリットは、相同配列がウィロイド分子の随所に散在しているためにできるもので、 ^{32}P -相補 DNA と結合して安定したハイブリットを形成する。そのため、PSTV、CEV、あるいは CSV が混合感染しているナス科植物、キク科植物などでは、相補 DNA プローブ法によって三者を区別して検出することができなくなる。これに対して、カンキツにおける CEV 検定には、ハイブリット形成を利用することが可能である。なぜならば、カンキツでは PSTV や CSV が複製しないからである。HSV は PSTV に対して 55% の相同配列をとるにすぎず (SANO et al., 1984)、相同性が低いためにハイブリットを形成しない。HSV の ^{32}P -相補 DNA は CEV とも反応しない (OHNO et al., 1983)。同様に、ヤシ科植物には CCCV のみが感染すること、また、ASBV は既知ウィロイドに対して相同性がきわめて低いことから、それぞれの原の宿主の抽出液を用いて診断が行われている。このように、ウィロイド RNA の一次構造がどの程度の相同性を示すのか、また、対象ウィロイドの宿主域などを考慮に入れて、相補 DNA プローブ法によってウィロイド病の診断ができるかどうか判断される。

わが国では、核酸ハイブリット形成によって新しいウィロイドが相次いで見いだされた。HSV の相補 DNA はオランダで発見された CPFV (のちに HSV キュウリ株と命名) とハイブリットを形成する (SANO et al., 1984)。また、HSV キュウリ株の相補 DNA と反応するウィロイドがブドウ (SHIKATA et al., 1984) (のちに HSV ブドウ株と命名) およびスモモ (SANO et al., 1986) (PDV) から発見された。今後も、このような手法を駆使して、未知のウィロイドの探索が行われ、ウィロイドの病原論的研究が活発に展開されることが期待される。

③ 核酸ハイブリット形成による診断法は信頼度ももっとも高い方法である。診断操作の開始から結果の判定までに要する期間も比較的短く、4~5 日である。これに対して、生物検定法は一般に、検定条件のいかんによって潜伏期が不定となり、病徴の発現様相が変化する。また、ゲル電気泳動法は 1~2 日で結果が得られるが、検

出の精度は相対的に見て高くない。ASBV や CCCV のように草本の検定植物が見つからないウイロイドでは、原の宿主であるアボカドやココヤシにおいてウイロイド濃度が低く、かつその分布が不均一であるので、検出精度の高い核酸ハイブリット形成法によって迅速に診断することが実用化されている。

上に述べたように、核酸ハイブリット形成による診断法が備えている検出精度、特異性および信頼度の三つの利点を生かし、非特異反応を抑えるくふうをすれば、ウイロイド病的確、迅速な診断が可能になるであろう。

ウイロイドの相補 DNA の利用にあたり、わが国で発生が確認されている各種ウイロイドの相補 DNA が手軽に入手、あるいは調製できるようにすれば、本法の真価が一段と発揮されるに違いない。オランダではすでに、PSTV の相補 DNA が市販されていると聞か、相補 DNA そのものに感染性があるので、輸入にあたっては、厳重な許可手続きをとらなければならない。将来は、非放射性的のビオチン標識した相補 DNA を利用する方向に進むであろう。特に、検定植物が見当たらないウイロイド病では、この方法が有用な診断法として活用されよう。ウイロイド病ではまだ報告例がないが、ウイロイドの相補 RNA (アンチセンス RNA) にビオチンを標識して診断することも、新しい試みとして評価されるのではなかろうか。

核酸ハイブリット形成による診断法は、ウイルス病においても適用されている (GARGER et al., 1983; MAULE et al., 1983)。ウイルスではすでに、エライザ (ELISA) 法やその変法など、血清反応を利用した方法によって実際の診断が行われているが、抗原性の弱いウイルス、不安定なウイルス、あるいは潜伏 (cryptic) ウイルスの検出には、核酸ハイブリット形成による方法が有用であると考えられる。この方法によって、RNA ウイルスの複製過程で生ずる二本鎖 RNA (RF, RI など)、サブゲノム mRNA などの検出も可能になるであろう。

おわりに

相補 DNA は本来、遺伝子の構造解析・試験管内合成・同定、遺伝子導入などに利用されているものである。これをプローブに用いて、いくつかのウイロイド病の診断法が確立されたことは、上に述べたとおりである。

核酸ハイブリット形成による診断法が実用的技術として定着するには、周辺の関連諸技術と有機的連携が必要であるが、農業生産にもさまざまなインパクトを与えつつある。例えば、有用植物の遺伝子源の確保、種苗生産、

育種計画にあたり、ウイロイド・フリー個体の検査、保管の一環として、この方法が活用されるであろう (DIENER et al., 1984)。ジャガイモでは、PSTV フリーの種いもが低温処理を併用した茎頂培養によって作出されている (LIZARRAGA et al., 1980)。この診断法はさらに、ほ場における幼植物の早期診断によって植物個体間の伝染を未然に防ぐことを可能にしてくれた。今後、本法の技術的改良がさらに加えられ、ウイロイド病の遺伝子診断法として病害防除に貢献するものと期待される。

最後に、本稿で紹介した相補 DNA プローブ法によるホップわい化病診断の研究は、東京大学理学部岡田吉美教授ならびに東京農工大学農学部大野峰司助教との共同研究の一部であることを付記する。

引用文献

- 1) ALLEN, R. N. and J. L. DALE (1981): *Ann. Appl. Biol.* 98: 451~461.
- 2) ——— et al. (1981): *Aust. Plant Pathol.* 10: 31~32.
- 3) BAR-JOSEPH, M. et al. (1985): *J. Virol. Methods* 10: 69~73.
- 4) BARKER, J. M. et al. (1985): *ibid.* 10: 87~98.
- 5) BOCCARDO, G. et al. (1981): *Phytopathology* 71: 1104~1107.
- 6) BRUENING, G. et al. (1982): *FEBS Lett.* 148: 71~78.
- 7) CHEN, W. et al. (1982): *Kexue Tongbao* 27: 660~664.
- 8) DIENER, T. O. (1979): *Viroids and Viroid Diseases*, Wiley-Interscience, New York, 252pp.
- 9) ——— et al. (1984): *Control of Virus Diseases* (KURSTAK, E. and R. G. MARUSYK eds.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 345~360.
- 10) FLORES, R. et al. (1985): *J. Gen. Virol.* 66: 2095~2102.
- 11) FOSTER, A. C. et al. (1985): *Nucleic Acids Res.* 13: 745~761.
- 12) GARGER, S. J. et al. (1983): *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 21~25.
- 13) GROSS, H. J. et al. (1981): *Biosci. Rep.* 1: 235~241.
- 14) LEARY, J. J. et al. (1983): *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 4045~4049.
- 15) LIZARRAGA, R. E. et al. (1980): *Phytopathology* 70: 754~755.
- 16) MACQUAIRE, G. et al. (1984): *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 135E: 219~230.
- 17) MAULE, A. J. et al. (1983): *J. Virol. Methods* 6: 215~224.
- 18) MOHAMED, N. A. and J. S. IMPERIAL (1984): *Phytopathology* 74: 165~169.
- 19) MOMMA, T. and T. TAKAHASHI (1982): *Phytopathol. Z.* 104: 211~221.
- 20) ——— (1983): *ibid.* 106: 272~280.
- 21) OHNO, T. et al. (1983): *Nucleic Acids Res.* 11: 6185~6197.
- 22) OKAYAMA, H. and P. BERG (1982): *Mol. Cell. Biol.* 2: 161~170.
- 23) OWENS, R. A. (1978): *Virology* 89: 380~387.
- 24) ——— and D. E. CRESS (1980): *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 5302~5306.
- 25) ——— and T. O. DIENER (1981): *Science* 213: 670~672.

26) ——— (1984) : Methods Virol. 7 : 173~187.

27) PALUKAITIS, P. and R. H. SYMONS (1978) : FEBS Lett. 92 : 268~272.

28) ——— (1979) : Virology 98 : 238~245.

29) ——— et al. (1981) : Ann. Appl. Biol. 98 : 439~449.

30) RANGLES, J. W. and P. PALUKAITIS (1979) : J. Gen. Virol. 43 : 649~662.

31) ——— et al. (1980) : Phytopathology 70 : 185~189.

32) RHODE, W. et al. (1981a) : Eur. J. Biochem. 118 : 151~157.

33) ——— et al. (1981b) : FEBS Lett. 130 : 208~212.

34) ROSNER, A. et al. (1983) : Plant Mol. Biol. 2 : 15~18.

35) SALAZAR, L. F. et al. (1983) : Am. Potato J. 60 : 587~597.

36) SANO, T. et al. (1984) : Nucleic Acids Res. 12 : 3427~3434.

37) ——— et al. (1986) : Proc. Japan Acad. 62B : 98~101.

38) SHIKATA, E. et al. (1984) : ibid. 60B : 202~205.

39) SPIEGEL, S. et al. (1984) : Phytoparasitica 12 : 37~43.

40) 高橋 壮 (1985) : 植物防疫 39 : 343~350.

41) ———ら (1984) : 日植病報 50 : 111 (講要).

42) TAKAHASHI, T. et al. (1983) : J. Fac. Agric. Iwate Univ. 16 : 141~150.

43) ——— et al. (1985) : ibid. 17 : 267~279.

44) VAN WEZENBEEK, P. et al. (1982) : Nucleic Acids Res. 10 : 7947~7957.

45) VISVADER, J. E. et al. (1982) : FEBS Lett. 137 : 288~292.

46) YAGUCHI, S. and T. TAKAHASHI (1984) : Phytopathol. Z. 109 : 32~44.

47) YOSHIKAWA, N. and T. TAKAHASHI (1982) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 48 : 182~191.

協会だより

○昭和 61 年度各種成績検討会開催のお知らせ

1. 落葉果樹農業連絡試験 11月5日(水), 6日(木)
家の光会館, 家の光ビル
2. カンキツ農業連絡試験 12月2日(火), 3日(木)
家の光会館
3. 一般及び特別委託試験, 野菜病害虫シンポジウム
別表のとおり
4. 桑農業連絡試験 12月17日(水)
家の光会館

いずれも午前 10 時より開催

家の光会館・ビル: 東京都新宿区市ヶ谷船河原町 11

電話 (03) 260-3151 (会館), 4791(ビル)

	殺菌剤 (家の光ビル)	殺虫剤 (家の光会館)
12月8日(月)	野 菜	野 菜
9日(火)	野 菜	野 菜
10日(水)	野 菜	
	合 同 会 議	
11日(木)	野菜病害虫防除研究会シンポジウム**	コガネムシ等 土壌害虫
12日(金)	水 稲	水 稲
13日(土)	イネ馬鹿苗病* (9時30分開会)	水 稲

* 病害虫緊急対策研究会

** テーマ: 軟弱野菜の病害対策

新刊!!

本会発行図書

昭和 61 年度“主要病害虫に適用のある登録農薬一覧表”(除草剤は主要作物)

農林水産省農薬検査所 監修

2,100 円 送料 300 円

B 5 判 337 ページ

昭和 61 年 9 月 30 日現在, 当該病害虫(除草剤は主要作物)に適用のある登録農薬をすべて網羅した一覧表で, 殺菌剤は索引と稲, 麦類・雑穀, いも類, 豆類, 野菜, 果樹, 特用作物, 花卉, 芝・牧草・林木について 30 表, 殺虫剤は索引と稲, 麦類・雑穀, いも類, 豆類, うり科野菜, なす科野菜, あぶらな科野菜, 他の野菜, 果樹, 特用作物, 花卉・芝, 林木・樹木, 牧草について 50 表, 除草剤は索引と水稻, 陸稲・麦類・雑穀・豆類・いも類・特用作物・芝・牧草, 野菜, 花卉, 果樹, 林業について 6 表, また今年度版よりは植物成長調整剤は索引と稲, 麦類・豆類・いも類, 野菜, 果樹, 特用作物・芝, 花卉・林木について 6 表にまとめたもの。

Agrobacterium radiobacter 利用による根頭がんしゅ病の防除

静岡県農業試験場 **まき の たか ひろ**
牧 野 孝 宏

はじめに

細菌病害の一つである根頭がんしゅ病は、非常に多くの植物に寄生し、DE CLEENE と DE LEY (1976) によれば、138 科、588 属、1,193 種の植物に接種試験の結果、60% 以上の種に感染するとされている。わが国において本病が問題となる植物は、花卉では、バラ、サクラ、キク、カナメモチ、サンザシ、ボケ、果樹では、モモ、スモモ、リンゴ、オウトウ、アンズ、ナシ、マルメロ、キイチゴ類、ビワ、カキ、クリ、ブドウなどがある(岡部, 1949)。これら多くの植物に発生する根頭がんしゅ病は、バラなどの生産者の間では、古くから難防除病害として知られてきた。根頭がんしゅ病に関する被害については、アメリカにおいて核果類についての報告があり、世界中の核果類全体で約 220 億円 (1 ドル 160 円換算) の損害がある (EI-FIKI and GILES, 1981) と見積もられた。

わが国においては、具体的な損害額の報告は見当たらないが、静岡県において、太田・西山はバラにおける本病の発病および被害の発生について報告している(太田・西山, 1984)。また筆者らは、いくつかの改植ほ場について掘り取り時に発病状況を調べたところ、平均値で約 30% の株に発病を認めた。これらのほ場の中には生産力の低下を理由に、改植時期を 1~2 年早めているケースがあり、かなりの被害があると考えられた(牧野・手塚, 未発表)。

今までほとんど防除する手段がなかった本病に対し、1972 年オーストラリアのカーらによって報告された、*Agrobacterium radiobacter* Strain 84 (以下、ストレイン 84 と省略する) は、モモ根頭がんしゅ病に対し卓効を示した (KERR, 1972; NEW and KERR, 1972)。その後世界各地で検討が行われ、多くの作物で有効事例が報告されている (MOORE, 1979; MOORE and WARREN, 1979)。

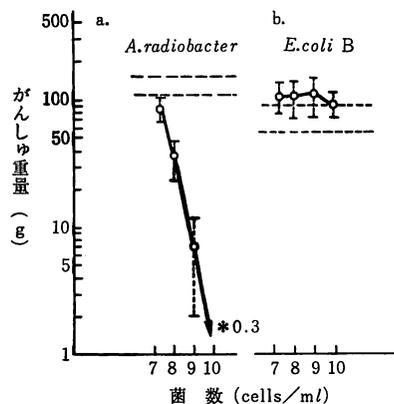
静岡農試では、1981 年からバラ根頭がんしゅ病菌の系統に関する調査および本菌の有効性に関する研究を行った。その結果、本菌は、わが国においてもバラ根頭がん

しゅ病に対し実用的防除効果のあることが明らかになった(牧野・森田, 1985a)。

ストレイン 84 は、微生物を用いた生物防除でもっとも成功した事例の一つで、そのメカニズムもある程度明らかにされている。世界中で行われた防除事例について紹介するとともに、静岡県で実施したバラ根頭がんしゅ病の、ストレイン 84 による防除試験結果について報告する。

I 根頭がんしゅ病菌に対し競合または拮抗する微生物

Ag. radiobacter は、根頭がんしゅ病菌と混合接種すると、がんしゅの形成が抑制されることが知られている (BOGERS, 1971; LIPPINCOTT and LIPPINCOTT, 1969)。第 1 図のように病原菌量を一定にして、*Ag. radiobacter* の菌量を増加すると、その程度に応じてがんしゅの重量が減少する。しかし、*E. scherichia coli* B では、菌量を増加してもがんしゅ重量は一定でまったくその効果は認められない (BOGERS, 1971)。BOGERS は、病原菌および *Ag. radiobacter* をカランコエに接種し、接種後の状況を電顕観察した。その結果 *Ag. radiobacter* は、*E. coli*



第 1 図 病原菌 (10^7 cells/ml) に対する *Ag. radiobacter* および *E. coli* B の混合菌数の増加ががんしゅ重量(カランコエに接種 6 週間後)に与える効果 (BOGERS, 1971)

横の点線は、病原菌接種対照区の平均値の信頼区間。

Biological Control of Crown Gall by *Agrobacterium radiobacter* Strain 84. By Takahiro MAKINO

第1表 ほ場における拮抗微生物のモモ根頭がんしゅ病菌に対する防除効果 (MOORE et al., 1984)

処 理 区	菌 量	発 病 株 率 (%) ^{a)}					
		病原菌無接種	病原菌接種 (グループ I)		病原菌接種 (グループ II)		
			直 後 ^{b)}	24 時間後 ^{c)}	直 後	24 時間後	
細 菌	78-11	3.0×10 ⁶	7.6X	63.2	71.9	24.6	30.8
<i>Pseudomonas</i>	78-18	3.5×10 ⁷	3.7X	69.0X	23.7	44.2X	10.2
<i>Bacillus</i>	78-102	1.3×10 ⁶	2.7	65.9	38.1	34.0	19.4
"	77-135	1.2×10 ⁶	0.0	57.1	28.3	36.7	70.6Y
<i>A. radiobacter</i>	W1	3.3×10 ⁶	12.0X	55.5	53.0	35.6	11.2
"	K84	9.0×10 ⁶	1.1	7.6	14.9	4.4	0.0
<i>Penicillium</i>	77-104	5.3×10 ⁶	0.0	62.5	32.8	4.1	8.7
<i>Aspergillus</i>	77-148	4.0×10 ⁶	4.1X	80.8X	52.2	17.6	21.1
病原菌接種対照				81.4		61.9XY	
有傷対照			9.1X				

a) モモの苗 100 株平均値。グループ I 病原菌：A49, A432, A20, A329。グループ II 病原菌：U-3, B6, B234, EU-8。病原菌濃度：グループ I：5×10⁴ cells/ml, グループ II：4.7×10⁵ cells/ml。各数値末尾の異なる文字間に有意差 (P=0.01) 有り。

b) 病原菌接種 10 分間前に、各拮抗微生物の菌液に苗を浸漬接種。

c) 病原菌接種 24 時間前に、各拮抗微生物の菌液に苗を浸漬接種。

と異なり、病原菌と同じように植物体の付傷部分への吸着が観察され、病原菌と *Ag. radiobacter* との間には、LIPPINCOTT らの報告した 1 対 1 の競合関係が成立していることが裏づけられた (BOGERS, 1971)。

根頭がんしゅ病は、スポット状に発生すること、また土壌消毒を行った場合に増加することがあることなどから、天敵の存在が示唆されていた (MOORE and WARRREN, 1979)。COOKSEY と MOORE (1980) によって、苗木土壌から *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Bacillus* などが、根頭がんしゅ病菌に対する拮抗微生物として分離された。この中で、*Penicillium*, *Bacillus* 属の菌株は、第 1 表のように、浸漬接種後自然汚染土壌に定植した場合には、発病を完全に抑制した。しかし、浸漬接種後病原菌を接種した場合には、ストレイン 84 の防除効果をもっとも優れていた (COOKSEY and MOORE, 1980)。

また、病原菌を接種するまでの各拮抗微生物の処理時間を変えてその防除効果を見ると、直前処理よりも、24 時間前処理によって防除効果が高まる場合が認められた。その原因として彼らは、苗根部の傷口に拮抗菌が定着し、より多くの抗菌性物質を生産する。感染部位に対してより有効な競合作用が働く、あるいは拮抗菌の接種によって植物体側に病原菌の増殖を阻害するような物質の生産が刺激されるなどの理由が考えられるとしている (COOKSEY and MOORE, 1980)。

II 外国におけるストレイン 84 による生物防除の事例

1972 年ストレイン 84 は、モモの種子処理 (KERR, 1972) および苗木の浸漬処理 (NEW and KERR, 1972) によってきわめて高い防除効果が認められた。その後世界各地で検討が行われ、その結果の一部を示すと第 2 表のとおりである (DU PLESSIS et al., 1985 ; MOORE, 1979 ; MOORE and WARREN, 1979)。花卉では、バラ、キク、ダリア、ニシキギ属、果樹では、モモ、アーモンド、リンゴ、キイチゴ類、オウトウなどの試験例が認められる。

防除効果を国別に見ると、オーストラリア、ニュージーランド、カナダ、イギリスでは対象植物に関係なく高い防除効果が見られている。一方、ヨーロッパやアメリカでは場所や対象とする植物によって防除効果に振れがあり、全体としては前者に比べ劣る傾向である。各植物ごとに防除効果を検討してみると、モモではアメリカ、ギリシャを除いて防除効果が高い。アーモンドは、全体に防除効果が低い傾向で、ギリシャでは本種から Biovar 2 (現在根頭がんしゅ病菌には、Biovar 1, 同 2, 同 3 の生理型が知られている) のアグロシン 84 抵抗性病原菌株が得られている (KERR and PANAGOPOULOS, 1977)。リンゴはアメリカにおける試験例が多いが、8 例中 6 例の防除効果が高く、防除効果の認められない 2 例は、病原菌がアグロシン 84 に対して抵抗性である (MOORE and WARREN, 1979)。オウトウ、ナン、スモモでは、南アフリカの一部を除き、すべて高い防除効果

第 2 表 各国で行われたストレイン 84 による根頭がんしゅ病の生物防除試験成績 (1972~85, 主として MOORE より改変)

植 物 名	国 名	試験例	防 除 価 ^{a)}
モモ	オーストラリア	3	100, 61, 70~100
	カナダ	2	85, 100
	ギリシャ	1	0
アーモンド	アメリカ	1	53
	ギリシャ	2	60, 21
リンゴ	アメリカ	2	52, 63
	アメリカ	8	63, 80, 93, 90, 21, 94, 5, 94
キイチゴ類	ハンガリー	4	40, 83, 49, 87
オウトウ	アメリカ	1	77
	イギリス	3	85, 100, 93
	アメリカ	8	79, 97, 73, 90, 97, 91, 76, 74
スモモ	南アフリカ	1	50
	イタリア	1	95
	アメリカ	3	78, 83, 84
	南アフリカ	1	100
アンズ	イタリア	1	96
	アメリカ	1	55
	アメリカ	2	72, 91
	オーストラリア	1	70~100
	ニュージーランド	1	96
ブドウ	アメリカ	5	100, 25, 0, 17, 0
	イタリア	1	70~100
	ギリシャ	1	0 ^{b)}
	南アフリカ	2	27, 45
ホップ	ニュージーランド	1	70~100
キク	アメリカ	3	70~100, 64, 92
ダリア	南アフリカ	1	53
	南アフリカ	1	31
	アメリカ	1	100

a) 防除価 = (無処理 - 処理区) 発病株率 / 無処理区 発病株率
 b) トマトによる検定

第 3 表 バラから分離された病原菌の Biovar

採 集 地	菌 株 数	Biovar		
		1	2	中間型 ^{a)}
清水市	12	0	12	0
静岡市	2	0	2	0
島田市	22	0	21	1
大井町	2	1	1	0
掛川市	6	0	6	0
湖西市	6	0	5	1
合 計	50	1	47	2

a) biovar 3 とは異なる中間型。

が認められている。アンズは試験例が 1 例しかないが、防除効果が低い。バラは、オーストラリア、ニュージーランドではきわめて高い防除効果が認められるが、アメ

第 4 表 ストレイン 84 によるバラ根頭がんしゅ病の防除効果

供 試 菌 株 ^{a)}	処 理 区 ^{b)}	供 試 株 数 ^{c)}	発 病 株 率 ^{d)}	株 当 たり ゴ ー ル 数 ^{d)}
R 8(+)	病原菌 // +84菌	10 10	85 10	3.1 0.1
R 73(-)	// // +84菌	10 10	65 5	1.5 0.1
R 75(+)	// // +84菌	12.5 10	56 15	1.7 0.2
R 77(±)	// // +84菌	10 10	70 5	1.8 0.1
R 78(+)	// // +84菌	10 10	65 5	1.7 0.2
R 97(±)	// // +84菌	10 10	80 5	1.8 0.3
R 173(±)	// // +84菌	10 10	30 10	0.8 0.2
R 177(+)	// // +84菌	10 10	45 5	0.9 0.1
R 202(±)	// // +84菌	10 10	85 0	2.2 0
R 257(+)	// // +84菌	10 10	85 20	3.3 0.3

a) 静岡県各地のバラ園の発病株から分離、() 内はアグロシン 84 感受性
 b) 病原菌は、定植直前に土壌混和 (10⁷ cells/g)、ストレイン 84 はバラ苗に浸漬接種 (10⁹ cells/ml)
 c) 2 年生ノイバラ苗を根部および地上部を切断、整理して供試。
 d) 2mm 以上のゴールの形成されたものを調査し、2 区平均値で示した。

リカでは 5 例中 4 例までが、ほとんど防除効果が認められていない。ブドウでは、ブドウから分離される病原菌が、Biovar 3 (KERR and PANAGOPOULOS, 1977)、アグロシン 84 に対し抵抗性であるため、ギリシャ (KERR and PANAGOPOULOS, 1977)、南アフリカ (Du PLESSIS et al., 1985) と同防除効果がまったく認められないか、または低い。

以上のように、外国における防除試験結果は、全体的に見ると高い防除効果の認められた事例が多い。

III 静岡県におけるストレイン 84 による生物防除

静岡県では、バラ根頭がんしゅ病に対するストレイン

第5表 現地におけるストレイン 84 のバラ根頭がんしゅ病に対する防除効果 (1985)
(牧野・手塚, 未発表)

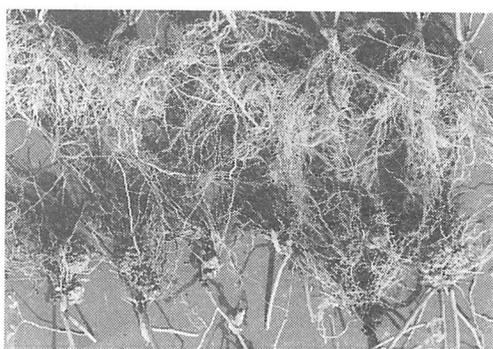
試験地	処理区	調査株数	発病株率 (%)			
			I	II	III	平均
菊川町 ^{a)}	st. 84 処理	100	12	13	5	10
	無処理	100	25	22	20	22.3
島田市 ^{b)}	st. 84 処理	60	18.3	26.6	—	22.5
	無処理	60	36.7	36.7	—	36.7
韮山町 ^{c)}	st. 84 処理	43	6.8	11.6	—	9.2
	無処理	43	34.9	58.1	—	46.5
沼津市 ^{d)}	st. 84 処理	50	12	14	—	13
	無処理	50	26	34	—	30
袋井市 ^{e)}	st. 84 処理	50	14	10	—	12
	無処理	50	14	12	—	13

- a) ①品種：スターダム, ②苗の種類：切り接ぎ, 自家生産, ③処理時期：接ぎ木前, 1984. 12, ④前作の発病：多い, ⑤供試苗の発病：不明, ⑥発病調査：1985. 12
- b) ①エンジュリック, ②切り接ぎ, 購入, ③定植直前, 1984. 5, ④約15%, ⑤不明, ⑥1985. 3
- c) ①アールスメールゴールド, ②切り接ぎ, 購入, ③鉢上前, 1983. 12, ④67%, ⑤5%, ⑥1985. 3
- d) ①トボネ, ②切り接ぎ, 購入, ③鉢上前, 1984. 2, ④37%, ⑤少発, ⑥1985. 3
- e) ①バスカリ, ②切り接ぎ, 購入, ③定植直前, 1984. 4, ④不明, ⑤約 50%, ⑥1985. 1

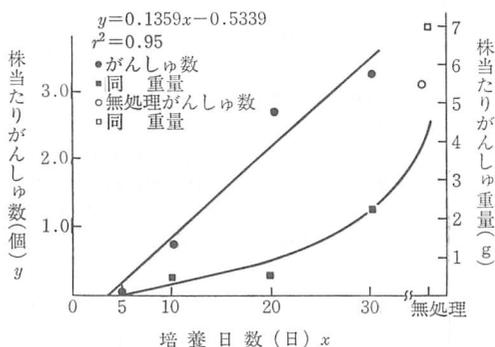
84 の防除効果を検討した。各地のバラ園の発病株から病原菌を分離し, Biovar を調査した (牧野・森田, 1985a)。第3表のように, 50 菌株の病原菌のうち1菌株が Biovar 1, 47 菌株が Biovar 2, これらの中間的な性質を示す菌が2菌株得られた。これらの中には, ブドウなどから分離された Biovar 3 に一致する菌株はなかった。

また, 病原菌のアグロシン 84 に対する感受性は, 62% が感受性, 26% が弱感受性, 12% が抵抗性であった。

これらの病原菌の一部を用いて, ノイバラの実生苗における, ストレイン 84 の防除効果を調べた。第4表のように, 本菌を浸漬接種した区ではいずれも 20% 以下の低い発病であったのに比べ, 無処理区では R 173 を除き 65~85% と高い発病率となり, 防除効果が明らか



第2図 ストレイン 84 の草炭培養菌によるノイバラの根頭がんしゅ病防除効果
上：ストレイン 84 処理, 下：無処理



第3図 ストレイン 84 の培養日数と防除効果との関係
培養日数は寒天平板培養した日から起算した日数。

である。

静岡県各地において行った現地防除試験の一部を第5表に示した。現地では, 苗はほとんど購入しており, 自家生産農家は少なかった。購入苗の中には, すでに袋井市のように定植前に多発しているケースも認められた。

防除効果は, 韮山町においてもっとも高く, ストレイン 84 処理区は, 無処理区に比べ, 約 80% 発病が減少した。菊川町, 島田市, 沼津市においては, 無処理区に比べて, ストレイン 84 処理区は, 40~50% 発病が減少した。しかし, ストレイン 84 接種前に, がんしゅが多く形成されていた袋井市では, まったく防除効果が認められなかった。

IV 培養形態と防除効果および有効期間

ストレイン 84 は, ニュージーランド, アメリカ, イタリア, ハンガリーなどで製品化され, ピート培養, 寒

第6表 ストレイン 84 の培養形態とバラ根頭がんしゅ病の防除効果

〔実験Ⅰ〕 がんしゅ混入土壌における防除効果^{a)}

培養形態	処理濃度	供試株数	発病株数	発病株率 (%)	株当たりがんしゅ数 (個) ^{b)}				株当たりがんしゅ重量 (mg)
					大	中	小	計	
草炭培養菌処理	9×10^8	20	0	0	0	0	0	0	0
寒天	3×10^8	20	2	10	0.05	0.15	0	0.2	425
液体	3×10^8	20	4	20	0	0	0.2	0.2	25
無処理		20	17	85	0.35	0.95	0.8	2.1	3,625

〔実験Ⅱ〕 がんしゅ混入および病原菌接種土壌における防除効果^{d)}

培養形態	処理濃度	供試株数	発病株数	発病株率 (%)	株当たりがんしゅ数 (個) ^{b)}				株当たりがんしゅ重量 (mg)
					大	中	小	計	
草炭培養菌処理	2×10^8	20	3	15	0	0.1	0.05	0.15	70
寒天	1.5×10^8	22	3	14	0	0	0.14	0.14	27
液体	6.0×10^7	24	8	33	0.04	0.04	0.75	0.83	217
無処理		20	16	80	0.65	0.35	1.15	2.15	3,505

a) 木箱 (60×95×20 cm) に約 100 l の未殺菌土壌を入れ、箱当たり 300 g の新鮮なバラがんしゅを 1 l の蒸留水とともにミキサーで砕き土壌に打ち込み混和した (5月14日), ストレイン 84 処理 (5月14日).

b) 1年生台木用ノイバラ (*R. multiflora* の刺無系). 10月26日: 発病調査

c) 大: 20 mm 以上, 中: 10~20 mm, 小: 2~10 mm.

d) a) の処理に加えて, 病原菌 R97, R202, R257 の寒天培養 (9cm ペトリ皿) を箱当たり, 各1枚蒸留水に懸濁 ($6 \sim 9 \times 10^8$ cells/ml) し, 土壌に混和した (7月13日). ストレイン 84 処理 (7月13日).

天培養の菌体が市販されている (牧野・森田, 1985b). ノイバラにおける, 本菌の培養形態と防除効果について調べた結果は第6表のとおりで, 根部浸漬時の菌濃度が十分高ければ, いずれの培養形態でも十分な防除効果が得られるものと考えられた (第2図参照). 寒天培養は, 培養が確実で, 数量管理, 輸送にも便利であるが, 実用的有効期間が第3図のように10日間と短く (発病抑止効果は培養30日後の処理においても認められる), 最適時期に農家が本菌を使用することは, かなり困難が伴う。しかし草炭に特定の添加物を加えることにより, 有効期間が3か月以上となり, 農家の要請に十分対応できると思われる (牧野・手塚, 未発表)。

V ストレイン 84 の性質

本菌は, 根頭がんしゅ病菌の Biovar 2 の系統にきわめて近縁で, Ti プラスミドを持たないため, 植物に対する病原性は認められない。

また本菌は, 根部に処理されると, 根部で増殖する。オウトウの苗に本菌を接種して, 1か月後に根部の菌量を調べると, 側根の根の先端部では, 3.3×10^8 cells/g 根の菌量が検出され, 接種時の 3,000 倍にも達している。また発病すると植物体がかつとも大きな影響を受ける根頭部では, 1.8×10^6 cells/g 根で接種時の 100 倍と

なっている。根全体としては, $10^5 \sim 10^6$ cells/g 根の菌量が検出される。このように本菌は根に定着増殖し, モモでの調査結果によれば, 少なくとも2年間は, 根部を病原菌から防御するとされている (MOORE and WARREN, 1979)。

ノイバラにおける根面および根部のストレイン 84 の菌量を経時的に調べた結果, 第7表のように, 接種後4か月までは比較的高い濃度が維持されるが, 8か月後には, 根面からの本菌の検出菌量が急減し, 12か月後にはほとんど検出が困難となった。またノイバラ苗をストレイン 84 に浸漬後ポットで育苗し, 10か月後に病原菌液 ($10^6, 10^7$ cells/ml) にポットごと浸漬し, ほ場に定植した場合には, 防除効果は著しく低下した。

以上のことから, ストレイン 84 の根部への定着は, 植物の種類または品種によって差があることが示唆される。

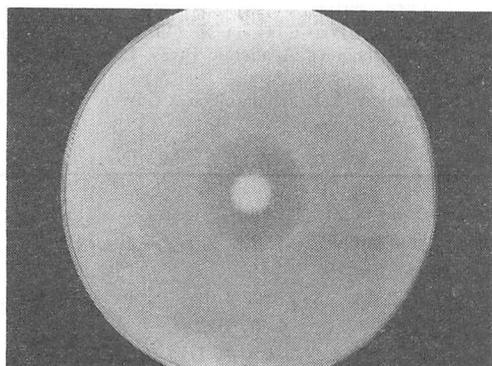
VI ストレイン 84 による防除のメカニズム

ストレイン 84 は, 特殊なアグロシン 84 と呼ばれる抗菌性物質を産生し, 大部分の根頭がんしゅ病菌の生育を第4図のように阻害する。本物質は第5図のようなアデニンスクレオチド類似体で, エタノール可溶, 酸性, 分子量 1,000 mol wt 以下で, pH 4 または 9 以上で活

第7表 ストレイン 84 接種後のノイバラ根部からの検出 (1985) (牧野・手塚, 未発表)

株 No.	根部におけるストレイン 84 の菌量 (根 1g 当たり)			
	1 か 月 後 (1984 年 8 月)	4 か 月 後 (1984 年 11 月)	8 か 月 後 (1985 年 3 月)	12 か 月 後 (1985 年 6 月)
1	3.74×10^6	1.3×10^6	1.9×10^3	1×10^3
2	4.56×10^6	0.95×10^6	1.7×10^3	1×10^3
3	1.70×10^6	0.75×10^6	0.4×10^3	0
平均	3.33×10^6	1×10^6	1.3×10^3	0.67×10^3

a) New and KERR の培地により検出され、指示菌 (R 257) に生育阻止円を形成する菌株のうち、ストレイン 84 と同定される菌株は、1 か月後、4 か月後、8 か月後、12 か月後となるに従って、100%、90%、35%、10% と減少し、12 か月後には、ストレイン 84 の検出がかなり困難であった。

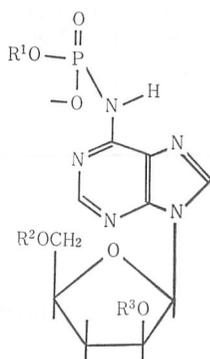


第4図 ストレイン 84 による感受性菌の阻止円の形成 (Spot-on-lawn method)

性が低下する (MOORE and WARREN, 1979)。ストレイン 84 の二つのプラスミドのうち 30×10^6 ダルトンの小プラスミドによって、アグロシン 84 の生産性および免疫性がコードされている (MOORE and WARREN, 1979)。一方、根頭がんしゅ病菌は、Ti プラスミド (ノバリン利用性) とアグロシン 84 の感受性との間には高い相関が見られる。

アグロシン 84 は、感受性菌の DNA 合成を阻害し、また、病原菌の細胞壁の合成を阻害し、植物体への吸着を阻止する。以上のように、ストレイン 84 の根頭がんしゅ病防除効果は、アグロシン 84 の殺菌効果と、先に述べた植物の付傷部分への吸着における病原菌との 1:1 の競合作用によって説明される。このことは、マイトマイシン D 処理により、アグロシン 84 生産能を除去した菌株を用いて、病原菌接種 24 時間前に接種することにより防除効果が認められたことで裏づけられた。

また、ストレイン 84 抵抗性菌株の出現については、ギリシャにおいて、ストレイン 84 処理を行ったモモに形成されたがんしゅから検出された。分離された菌株の 16.5% は、病原性でアグロシン 84 を生産し、したがってアグロシン 84 に対して抵抗性であった (PA-



第5図 アグロシン84 の構造式

NAGOPOULOS et al., 1979)。

しかし、アメリカのオレゴン州では 10 年近く本菌が使用されているが、防除効果が低下した事例は出ていない。またオーストラリア、ニュージーランドにおいても抵抗性菌が出現した報告は聞かない。ストレイン 84 に対する抵抗性菌が出にくい理由として KERR は、病原菌とスト

ラスミドが移行する。しかしノバリンが存在しない場合には、レプレッサー遺伝子のために接合が起こりえない、と考えている (KERR, 1980)。したがって、ギリシャでの試験のように、高濃度の病原菌を接種することにより、病原菌を十分防除できず、形成されたがんしゅからノバリンが産生され、プラスミドの移行が起こり、アグロシン 84 抵抗性菌株が出現したと推定した。

おわりに

ストレイン 84 は、多くの植物の根頭がんしゅ病に対し有効であるが、前述したようにブドウや一部の植物に対しては効果が期待できないケースも認められている。このような問題に対し、新たに防除効果の認められる非病原性の *Ag. tumefaciens* Biovar 3 の検討 (STAPHORT et al., 1985) が行われている。またアグロシン 84 と同様なヌクレオチド型のバクテリオシンを産生する、ユカリのがんしゅから分離された D 286 菌株 (HENDSON et al., 1983) についても、がんしゅ形成阻止効果の検討が行われ、ノバリン、オクトピン、アグロピン型の Ti プラスミドを持つ菌株に対しても発病抑制効果を認めている。今後このような研究が進めば、今までストレイン

84 により防除できなかったブドウなどの作物に対しても、新しい展望が開けるものと思われる。

引用文献

- 1) BOGERS, R. J. (1971) : Proceedings of the Third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Center for Agricultural Publishing and documentation, Wageningen, pp. 239~250.
- 2) COOKSEY, D. A. and L. W. MOORE (1980) : Phytopathology 70 : 506~509.
- 3) ——— (1982) : ibid. 72 : 919~921.
- 4) DE CLEENE, M. and J. DE LEY (1976) : The Botanica. Rev. 42 : 389~466.
- 5) DU PLESSIS, H. J. et al. (1985) : Plant Disease 69 : 302~305.
- 6) EI-FIKI, F. and K. L. GILES (1981) : In International Review of Cytology, Supplement 13. Academic Press, NY. pp. 15~58.
- 7) HENDERSON, M. et al. (1983) : Appl. and Env. Microbiol. 45 : 1526~1532.
- 8) KERR, A. (1972) : J. Appl. Bacteriol. 35 : 493~497.
- 9) ——— (1980) : Plant Disease 64 : 25~30.
- 10) ——— and C. G. PANAGOPOULOS (1977) : Phytopathol. Z. 90 : 172~179.
- 11) LIPPINCOTT, B. B. and J. A. LIPPINCOTT (1969) : J. Bacteriol. 97 : 620~628.
- 12) 牧野孝宏・森田 偉 (1985a) : 静岡農試研報 30 : 45~52.
- 13) ——— (1985b) : 同上 30 : 53~59.
- 14) MOORE, L. W. (1979) : In Soil-Borne Plant Pathogens, Academic Press, London, pp. 553~568.
- 15) ——— and G. WARREN (1979) : In Annu. Rev. Phytopathol. 17 : 163~179.
- 16) NEW, P. B. and A. KERR (1972) : J. Appl. Bacteriol. 35 : 279~287.
- 17) 岡部徳夫 (1949) : 植物細菌病学, pp. 227~233.
- 18) 太田光輝・西山幸司 (1984) : 日植病報 50 : 197~204.
- 19) PANAGOPOULOS, C. G. et al. (1979) : In Soil-Borne Plant Pathogens, Academic Press, London, pp. 569~578.
- 20) STAPHORT, J. L. et al. (1985) : Current Microbiol. 12 : 45~52.

(17 ページより続く)

バリダマイシン液剤

バリダマイシン 5.0%

バリダシンエアー (61.9.13)

16519 (武田薬品工業), 16520 (サンケイ化学), 16521 (北興化学工業)

稲: 紋枯病: 14 日—: 空中散布

銅・バリダマイシン粉剤

塩基性塩化銅 8.4%, バリダマイシン 0.30%

バリダボルドー粉剤 DL (61.9.13)

16523 (北興化学工業), 16524 (武田薬品工業)

稲: 紋枯病・稲こうじ病: 出穂 10 日前—

『殺虫殺菌剤』

MTMC・トリシクラゾール・バリダマイシン粉剤

MTMC 2.0%, トリシクラゾール 1.0%, バリダマイシン 0.30%

ビームツマバリダ粉剤 DL (61.9.8)

16472 (武田薬品工業)

稲: いもち病・紋枯病・ツマグロヨコバイ・ウンカ類: 21 日 3 回

BPMC・DEP・EDDP 粉剤

BPMC 2.0%, DEP 4.0%, EDDP 2.5%

ヒノディップバッサ粉剤 25DL (61.9.8)

16473 (八洲化学工業)

稲: いもち病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・ニカメイチュウ・カメムシ類: 21 日 4 回

BPMC・フサライド・EDDP 粉剤

BPMC 3.0%, フサライド 1.5%, EDDP 2.0%

ヒノラブバッサ粉剤 35DL (61.9.8)

16474 (日本特殊農薬製造), 16475 (呉羽化学工業), 16476 (北興化学工業), 16477 (八洲化学工業), 16478 (三共), 16479 (九州三共)

稲: いもち病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・ツマグロヨコバ

イ・ウンカ類: 21 日 4 回

カルタップ・MTMC・トリシクラゾール・バリダマイシン粉剤

カルタップ 2.0%, MTMC 2.0%, トリシクラゾール 1.0%, バリダマイシン 0.30%

バダンサイドバリダビーム粉剤 DL (61.9.8)

16480 (武田薬品工業)

稲: いもち病・紋枯病・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・ニカメイチュウ・コブノメイガ・イネツトムシ: 21 日 3 回

クロルピリホスメチル・BPMC・フサライド粉剤

クロルピリホスメチル 2.0%, BPMC 2.0%, フサライド 2.5%

レルダンバッサラサイド粉剤 DL (61.9.8)

16482 (日産化学工業)

稲: いもち病・ニカメイチュウ・ウンカ類・ツマグロヨコバイ・コブノメイガ・イネツトムシ: 45 日 2 回

マラソン・XMC・バリダマイシン・フサライド粉剤

マラソン 2.0%, XMC 2.0%, バリダマイシン 0.30%, フサライド 2.5%

ラブバリダフォスマク粉剤 DL (61.9.8)

16484 (北興化学工業), 16485 (武田薬品工業)

稲: いもち病・紋枯病・ツマグロヨコバイ・ウンカ類: 21 日 5 回, 但し穂ばらみ期以降は 4 回

クロルピリホスメチル・XMC・フサライド・EDDP 粉剤

クロルピリホスメチル 2.0%, XMC 2.0%, フサライド 1.5%, EDDP 2.0%

ヒノラブレルダンマク粉剤 35DL (61.9.8)

16488 (北興化学工業), 16489 (呉羽化学工業), 16490 (日本特殊農薬製造)

稲: いもち病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・ニカメイチュウ・コブノメイガ・ツマグロヨコバイ・ウンカ類: 45 日 2 回

(49 ページへ続く)

(48 ページより続く)

MPP・NAC・フサライド・EDDP 粉剤

MPP 2.0%, NAC 2.0%, フサライド 1.5%, EDDP 2.0%

ヒノラブバイナック粉剤 35DL (61.9.8)

16491 (北興化学工業)

稲: いもち病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・ニカメイチュウ・ツマグロヨコバイ・ウンカ類: 21 日 4 回

BPMC・PAP・フサライド粉剤BPMC 3.0%, PAP 2.0%, フサライド 2.5%
ラブサイドエルサンバッサ粉剤 30DL (61.9.8)

16497 (日産化学工業)

稲: いもち病・ニカメイチュウ・イネツトムシ・カメムシ類・ウンカ類・ツマグロヨコバイ: 21 日 4 回

BPMC・PAP・フルトラニル粉剤BPMC 3.0%, PAP 2.0%, フルトラニル 1.5%
モンカットエルサンバッサ粉剤 DL (61.9.8)

16498 (日産化学工業), 16499 (日本農薬)

稲: 紋枯病・ウンカ類・ツマグロヨコバイ・ニカメイチュウ・イネツトムシ・カメムシ類: 14 日 3 回

PAP・フルトラニル粉剤PAP 2.0%, フルトラニル 1.5%
モンカットエルサン粉剤 DL (61.9.8)

16500 (日産化学工業), 16501 (日本農薬)

稲: 紋枯病・ニカメイチュウ・ウンカ類・ツマグロヨコバイ: 14 日 3 回

MPP・バリダマイシン・フサライド・EDDP 粉剤

MPP 2.0%, バリダマイシン 0.30%, フサライド 1.5%, EDDP 2.0%

ヒノラブバイバリダ粉剤 35DL (61.9.8)

16502 (北興化学工業), 16503 (武田薬品工業), 16504 (日本特殊農薬製造)

稲: いもち病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・紋枯病・ニカメイチュウ・ツマグロヨコバイ・ウンカ類・カメムシ類: 21 日 4 回

ダイアジノン・NAC・バリダマイシン・フサライド粉剤

ダイアジノン 3.0%, NAC 1.5%, バリダマイシン 0.30%, フサライド 2.5%

ラブバリダ ND 粉剤 30DL (61.9.8)

16505 (北興化学工業), 16506 (武田薬品工業)

稲: いもち病・紋枯病・ニカメイチュウ・コブノメイガ・イネツトムシ・ツマグロヨコバイ・ウンカ類: 21 日 4 回

XMC・カスガマイシン・バリダマイシン・フサライド粉剤

XMC 2.0%, カスガマイシン 0.11%, バリダマイシン 0.30%, フサライド 1.5%

カスラブマクバリダ粉剤 DL (61.9.8)

16509 (北興化学工業), 16510 (武田薬品工業)

稲: いもち病・紋枯病・ツマグロヨコバイ・ウンカ類: 21 日 5 回, 但し穂ばらみ期以降は 4 回

BPMC・バリダマイシン・フサライド・EDDP 粉剤

BPMC 2.0%, バリダマイシン 0.30%, フサライド 1.5%, EDDP 2.0%

ヒノラブバッサバリダ粉剤 35DL (61.9.8)

16511 (北興化学工業), 16512 (武田薬品工業), 16513 (呉羽化学工業), 16514 (日本特殊農薬製造)

稲: いもち病・穂枯れ (ごま葉枯病菌)・紋枯病・ツマグロヨコバイ・ウンカ類: 21 日 4 回

BPMC・PAP・カスガマイシン粉剤BPMC 3.0%, PAP 2.0%, カスガマイシン 0.23%
カスエルバッサ粉剤 30DL (61.9.13)

16516 (日産化学工業)

稲: いもち病・ニカメイチュウ・ツマグロヨコバイ・カメムシ類・ウンカ類・イネツトムシ: 14 日 4 回

MEP・フサライド・ポリオキシン粉剤MEP 3.0%, フサライド 2.5%, ポリオキシン 0.23%
ラブポリスミ粉剤 DL (61.9.13)

16517 (科研製薬)

稲: いもち病・紋枯病・ニカメイチュウ: 21 日 3 回

BPMC・MEP・ポリオキシン粉剤BPMC 2.0%, MEP 3.0%, ポリオキシン 0.23%
ポリスミバッサ粉剤 DL (61.9.13)

16518 (科研製薬)

稲: 紋枯病・ニカメイチュウ・ウンカ類・ツマグロヨコバイ: 14 日 3 回

『除草剤』

プロメトリン・DCMU 水和剤

プロメトリン 35.0%, DCMU 10.0%

タウバック水和剤 (61.9.8)

16487 (トモノ農薬)

大豆・枝豆: 畑地一年生雑草: 播種覆土後～発芽前: 1 回

DBN・DCMU 粉粒剤

DBN 1.0%, DCMU 0.50%

ホクバック細粒剤 F (61.9.8)

16494 (北興化学工業)

小麦: 畑地一年生雑草: 麦 2~3 葉期 (スズメノテッポウ 1.5 葉期まで): 1 回

『植物成長調整剤』

コリン液剤 [MGC-140]

コリン 2.0%

サンキャッチ液剤 (61.9.13)

16525 (三菱瓦斯化学)

かんしょ: 発根促進及びいもの早期肥大: 苗の植付時

○出版部より

☆『昭和61年度“主要病害虫に適用のある登録農薬一覽表”(除草剤は主要作物)』が出来上がりました。今年度は、昨年に引き続き、殺虫剤につきましても“その他登録農薬の少ない作物”について新たに1表を起こし、いわゆるマイナー作物についても引けるよう工夫しました。また、新たに“植物成長調整剤”の項を起こし、索引と稲、麦類・豆類・いも類、野菜、果樹、特用作物・芝、花卉・林木の6表を掲載しております。41ページの広告をご覧のうえ、是非ご利用下さい。

(B5判, 337ページ, 2,100円, 送料300円)

☆『農作物有害動物発生予察事業調査実施基準(複製)』を作製・販売しております。本書は、本年5月に大幅に改正され通達として出されたものを、関係者の皆様方の手に入りやすくするため、複製して販売するものです。書店では購入できませんので、直接本会出版部にご注文

下さい。

(B5判, 384ページ, 実費1,600円, 送料300円)

☆6月号で「植物防疫」に対する皆様方のご意見を広くお伺いするため、「アンケート」をお願いしましたところ、多数の有益なご意見、ご感想が寄せられました。ここに謹んで御礼申し上げます。お寄せいただきました貴重なご意見、ご感想は、協会内部並びに編集委員会の場で充分検討し、誌面に反映させてゆくとともに、今後の企画、編集方針を立てるうえでの参考にさせていただきます。有難うございました。

なお、厳正な抽選の結果20名様に「植物防疫合本ファイル」を送らせていただきました。当選者の発表は品物の発送をもって代えさせていただきますので、ご了承願います。

今後とも「植物防疫」に皆様の声をお寄せ下さい。よろしくお願い致します。

人事消息

このほど、10月1日付で、社団法人全国植物検疫協会が発足した。概要は下記のとおり。

名称 社団法人全国植物検疫協会
所在地 (本部事務局)

〒108 東京都港区海岸3丁目18番15号
電話 (03) 453-5935

会長 石倉 秀次

なお、本部事務局のほかに、横浜支部 ((045) 201-2378)、中部支部 ((052) 661-5446)、神戸支部 ((078) 391-5901) が設けられている。

次号予告

次12月号は下記原稿を掲載する予定です。

特集：野菜ハダニ類の発生予察法

野菜ハダニ類の特殊調査について 横田 敏恭

イチゴのハダニ類の密度推定法 合田健二・中村利宣

イチゴの葉の食害痕によるハダニ類の簡易密度推定法 井上雅央・杉浦哲也

イチゴのハダニ類の発生活動と要防除密度 沢木忠雄・佐藤允通

スイカのハダニ類の密度推定法と要防除密度 矢野貞彦・森下正彦・谷口達雄

ナスのハダニ類の密度推定法と要防除密度

久保田篤男・高橋兼一

パラコート抵抗性雑草 田中 喜之

リンゴ赤衣病の発生 広間 勝己

ネギさび病の発生活動と防除 竹内 妙子

植物防疫基礎講座

作物保護におけるマイコン利用(9)

AMeDAS データの取り込みと予察への利用

棟方 研

定期購読者以外のお申込みは至急前金で本会へ

定価1部500円 送料50円

植物防疫

第40巻 昭和61年10月25日印刷
第11号 昭和61年11月1日発行

定価550円 送料50円 1か年6,100円
(送料共概算)

昭和61年

編集人 植物防疫編集委員会

—発行所—

11月号

発行人 遠藤 武雄

東京都豊島区駒込1丁目43番11号 郵便番号 170

(毎月1回1日発行)

印刷所 株式会社 双文社印刷所

社団法人 日本植物防疫協会

電話 東京(03)944-1561-6番

振替 東京1-177867番

—禁 載—

東京都板橋区熊野町13-11

日本曹達が 独自の技術で開発した新農薬!

増収を約束する

日曹の農薬

黒星病・赤星病・うどんこ病などの防除に
—強力殺菌剤—

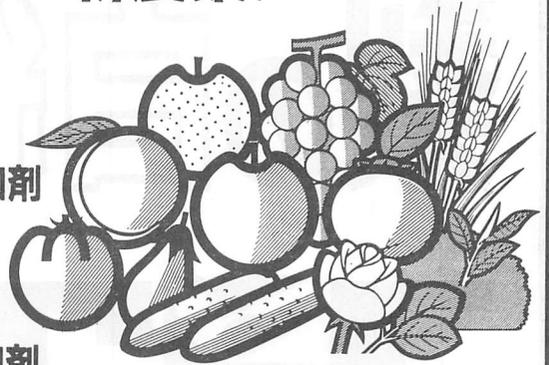
トリフミン[®]水和剤

果樹・いちごのダニ防除に
—強力殺ダニ剤—

ニッソラン[®]水和剤

茶・メロン・すいか・花のハダニ防除に
—強力殺虫・殺ダニ剤—

ニッソラン[®]V 乳剤



畑作イネ科雑草の除草に
—生育期処理除草剤—

ナブ[®]乳剤



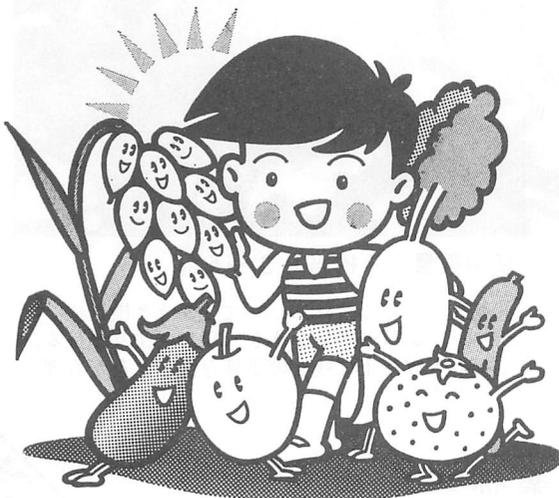
日本曹達株式会社

本社 〒100 東京都千代田区大手町2-2-1
支店 〒541 大阪市東区北浜2-90
営業所 札幌・仙台・信越・東京・名古屋・福岡・四国・高岡

豊かな収穫が見えてくる。



三 共 の 農 薬



●粒剤タイプで省力的!
土壌センチウ・ミナキイロアザミウマ防除剤

バイデート^{*}粒剤

●天然物誘導型総合殺虫剤
カルホス[®]乳剤・粉剤
微粒剤F



三共株式会社 北海三共株式会社
九州三共株式会社

難防除病害

梨の白紋羽病に

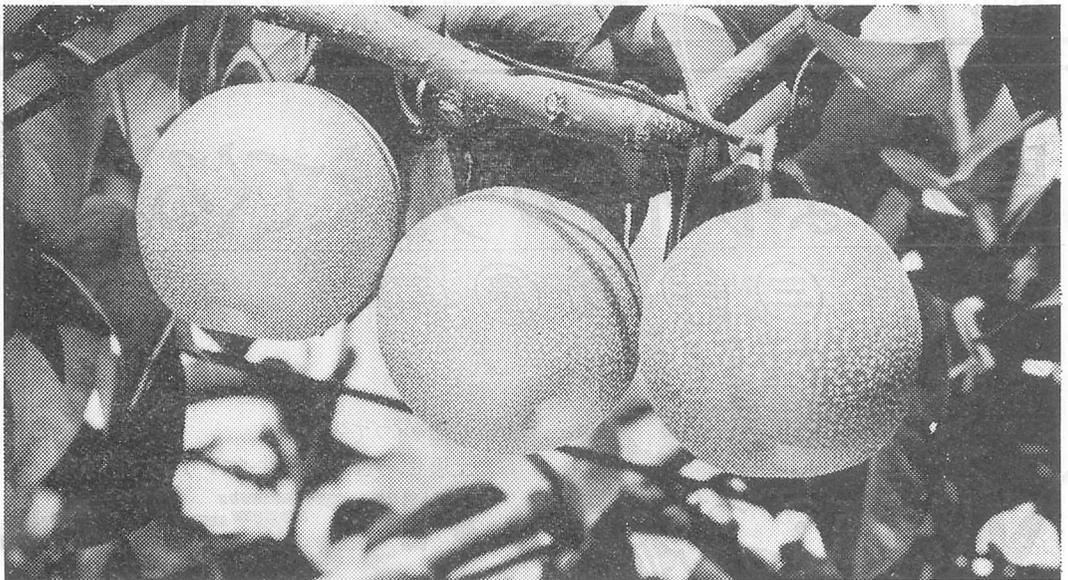
フジワン[®] 粒剤

®は日本農薬の登録商標です。

紋羽病の防除は、早期発見・早期防除が基本です。

——特 長——

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



使用時期：収穫後から翌年の落花直後まで。

使用薬量：1樹当り3～5kg

使い方

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

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



日本農薬株式会社
東京都中央区日本橋1丁目2番5号

資料請求券
フジ・紋羽

連作障害を抑え健康な土壌をつくる!

花・タバコ・桑の土壌消毒剤

パスアミド

微粒剤

❖いやな刺激臭がなく、民家の近くでも安心して使えます。

❖作物の初期生育が旺盛になります。

●安全性が確認された使い易い殺虫剤

❖広範囲の土壌病害、センチュウに高い効果があります。

❖粒剤なので簡単に散布できます。

●各種ハダニにシャープな効きめのダニ剤

マリックス 乳剤
水和剤

●ボルドーの幅広い効果に安全性がプラスされた有機銅殺菌剤

バイデン 乳剤

●澄んだ水が太陽の光をまねく！
水田の中期除草剤

キノンドー 水和剤80
水和剤40

モゲブロン 粒剤



アグロ・カネショウ株式会社

東京都千代田区丸の内2-4-1

農業技術 B5判 定価400円(〒45円) (1年〒共4,800円)

昭和21年創刊 農業技術についての月刊総合雑誌

農業技術研究の課題と展望

第I巻 農業技術研究の原点を求めて 第II巻 21世紀の農業技術をめざして 川嶋良一著 A5判 各約300頁 定価各1700円 各250円(2冊で300円)

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

農林水産研究とコンピュータ

斎尾乾二郎他編著 A5判上製 定価3,800円 300円

農林水産研究の各分野におけるコンピュータ利用の現状と展望、およびコンピュータ利用技法についての解説

【新刊】野菜種類・品種名考

西 貞夫監修 22氏執筆 B6判 406頁 定価2,200円

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

最新作物生理実験法

北條良夫・石塚潤爾編 大学・試験研究機関
新進気鋭の研究者24氏執筆

A5判(上製) 416頁 定価3,500円 300円

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

実験以前のこと—農学研究序論

小野小三郎著 B6判 定価1,600円 250円

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

作物品種名雑考

農業技術協会編 B6判 定価1,800円 250円

普通作物・工芸作物の品種名の由来、命名の裏話等を、育種専攻19氏が解説した品種改良の裏面史

果樹品種名雑考

農業技術協会編 B6判 定価1,800円 250円

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

Pesticides

柑橘の 秋ダニ防除に

散布：9月下旬～11月の間に1回



クミカの柑橘殺ダニ剤

New
Acaricide



殺ダニ剤
PANOCON
シンボルマーク

パノコン散布により、ハダニが破滅していく様子を、PANOCONの頭文字「P」をアレンジして象徴的に表わしたもの

ハダニ防除に励む人・応援します

新登場

新殺ダニ剤

パノコン[®]乳剤

PANOCON EC.

パノコン乳剤の特長

- 柑橘のハダニ防除にすぐれた効果
- 9月下旬～11月の低温時にすぐれた効果
- ミカンハダニの卵、幼虫に特効
- ミカンハダニ産卵抑制効果
- 他剤抵抗性ハダニにも卓効
- 薬害少なく混用薬剤の幅広し
- 収穫3日前まで使用可

- 秋の低温時で効果的
- 収穫3日前まで散布できる



農協・経済連・全農

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
TEL.03-823-1701

ゆたかな実り—明治の農薬

稲・いもち病、白葉枯病、もみ枯細菌病、
きゅうり・斑点細菌病防除に……………



オリゼメート粒剤

きゅうり、トマト、てんさい、かんきつ、ピーマン、すいか、
メロン、茶、ばら、たまねぎ、稲、レタス、キャベツの
病害防除に……………

カッパーシン水和剤



明治製菓株式会社
104東京都中央区京橋2-4-16



昭和六十一年十月九日 第九三三行(毎月) 郵便 便回 一物 日認 発行 可

定価 五五〇円 (送料 五〇円)