

植物防疫基礎講座：植物病原菌の分子系統樹—そのシステムと見方—細菌編(1)

総論：細菌における系統分類の発展と植物病原細菌

静岡大学農学部植物病理学研究室 ^{たき}瀧 ^{かわ}川 ^{ゆう}雄 ^{いち}一

はじめに

昨年(2005年)の植物防疫において、植物病原菌類の系統分類に関する総説がシリーズとして企画掲載され、本年度にその続編として細菌編が企画された。本稿はその総論となるものである。当然、系統分類とは何か、類縁関係の計算方法、系統樹の作成方法、確からしさの検証方法などについて、コンピュータプログラムも含めて解説すべきなのであろうが、そのようなことは既に昨年のシリーズの初回で高松先生によって詳しい解説がなされており、あえて重複して述べるようなことでもない。また、個別の、主に属・種レベルを中心とした具体的な系統分類関係については、気鋭の筆者の皆さんが本編に続いて詳細に解説をしていただく予定である。そこで、ここでは細菌における系統分類というものが真核生物におけるものと異なる点や、細菌全体の系統進化の様相とその中での植物病原細菌の位置付け、さらにその応用、注意点などについて述べたい。

なお、2005年に細菌学者待望の *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. Vol. Two, Part A, B, C* (GARRITY et al., 2005) が出版された。Vol. Two はプロテオバクテリアについての巻で3分冊であり、最新の情報が網羅されている。十分に読み込んだわけではないが、植物病原細菌についての個別の記述には不完全な項目も散見されるので、一概に本書をいわゆる細菌学のバイブルとして扱うには躊躇するものである。しかし、今後の学界をリードするものであることは間違いない。特に Part A は分類についての総論集になっており、本稿の執筆に際しても多く参考にした。専門の方には特に原本を参照していただきたい。

I 細菌分類の歴史の中での系統分類の位置付け

アリストテレスの昔から、生物の分類は外見が異なるものを区別することから始まるが、細菌の場合にはもとより球菌と桿菌、鞭毛が極毛か周毛か、コロニーの色は

なにかといった程度の区別しかつけようがなかった。そのため、早くから形態以外の表現形質、いわゆる細菌学的性状や化学組成の分析、さらには遺伝的な情報に基づいた分類が取り入れられてきた。真核生物の進化学の分野での系統学あるいは系統分類は、初め形態などの表現形質の類似性に基づいて発展してきたものであるが、細菌の場合には系統進化の概念が明らかになってきたのは遺伝子の情報が蓄積するようになってからのことである。そのため系統分類(Systematics)、系統学(Phylogeny)、分子系統分類学(Molecular systematics or Molecular phylogeny)といった真核生物の進化生物学においては、微妙に使用法が異なる用語がしばしば混用されている。いずれにせよ、細菌分類で系統的といえれば遺伝子あるいはタンパクの情報に基づいた分類を指すと考えてよい。

II 系統樹の作成

遺伝情報を比較して生物間の類縁関係を明らかにするには大きく分けて三つのステップがあり、まず、比べる2種類の相互の情報の間の類似度を求めること、次により類似しているものから順に並べるということになる。前者は相同性あるいは類似性を求めるということであり、そこから遺伝的距離をある仮定に基づいて計算する。次により類似するものを結合していくのだが、それにも近隣結合法やUPGMA法、最大節約法など複数の考え方があり。三つ目の段階として、その結果を系統樹として表現する。系統樹は類縁関係を視覚的に表す表現方法の一つで、2次元平面上に類似した生物同士を線で結んだ図形で表現する。さらに、そのもっともらしさについての検定をBootstrap Valueなどの形で表して評価を行う。これらステップの個々の特徴などについてはここで解説するのは避け、高松(2005)の総説などを参照願いたい。

よく用いられるDDBJのオンラインシステムなどで利用可能なプログラムCLUSTAL Wでは、アライメントから距離の計算、類似しているものの結合まで簡単に実行できる。さらに、TreeViewなどのソフトを使えば系統樹を簡単に作成することができ、理論などを全く知らなくても系統樹を得ることができ、それぞれの計算の段階では特定の手法が選択されて計算が実行されて

Development of Phylogenetic Analysis of Bacteria and its Relationship with Plant Pathogens. By Yuichi TAKIKAWA
(キーワード:細菌, 系統分類, 高次分類, 分類指標)

いるのであり、どのような方法を用いているのかオプションの設定などを知ったうえで出てきた系統樹を評価する必要がある。枝分かれしているそれぞれの分岐（クラスター）について Bootstrap Value が低い場合には、それらが本当にクラスターとして成立するのか、見掛けだけなのかなどについて、複数の系統樹作成法などを用いて確認することも必要になってくる。しかし、後にも述べるように一つの遺伝子についての情報のみでいろいろ検討するよりも、複数の遺伝子を用いて比較したり、あるいは生物学的な諸性質がそれらのクラスターと対応しているのかなどの検証のほうが重要であると考えられる。CLUSTAL W や TreeView については斉藤 (2002) の簡易な解説がある。

III 系統分類に用いられる指標

現在、系統分類の指標として用いられる最も主要な情報は、16S リボソーム RNA の塩基配列情報である。なぜ 16S リボソーム RNA が指標として用いられるようになったのかについては、すべての生物（真核生物では 18S として）に普遍的に存在し生存に不可欠であること、保存性が高く進化の過程で急激な変化はなかったと考えられるのでアライメントが容易であることなどの理由が付けられている。しかし、実際には、ある程度の情報量があったこと（例えば、5SrRNA の解析もかなり早くから行われていたが、情報量が少ないのでそれ単独で多くの生物の解析に向かなかつた）、PCR による増幅法が開発され解析されたデータが急速に蓄積されたことなどにより結果的にスタンダードになってしまったという面は否定できない。

16S リボソーム RNA (Small subunit ribosomal RNA SSUrRNA, 16SrRNA) は約 1,600 ヌクレオチドからなり、通常は染色体上でこの 16SrRNA をコードしている遺伝子領域の 16SrDNA について PCR で増幅した産物をシーケンスしている。他の rRNA (5S, 23S (Large subunit LSU)) の遺伝子とともに *rrn* オペロンを構成し、複数のコピーをもつ。大腸菌では 7 コピー、*Pseudomonas syringae* などでは 5 コピーが知られている。これらのコピー間でシーケンスは通常同一であるが、放線菌の中には同一菌株の中のコピー間で 98 ベースもの違いがある例が知られており (WANG et al., 1997)、また欠失や挿入で差があるものもあるので、このような株の 16SrDNA をダイレクトシーケンスするとあるところから先が読めなくなるといったことが起こる。逆に読めなくなった場合には差があることを疑う。これらの変異の多くは variable region と呼ばれる可変領域に起こるも

のであり、そこをはずせば系統関係の考察において大きな問題が生じることはないとされている。しかし、どこが variable region であるのか大きな分類群単位で系統立って調査された例はなく、逆にそれが明らかになれば、16SrRNA 遺伝子間の水平移動など菌のダイナミックな進化が解明されることが期待される。16SrRNA 遺伝子の水平移動の可能性は実際に示されており (WANG and ZHANG, 2000)、時に注意が必要であろう。逆に、極めて近縁な 16SrRNA シークエンスをもつ菌株同士の類縁関係の解析は、それだけで同種か異種かを判定することは不可能である。特に相同値が 97% を超えるようなときには (約 1,600 ベースの中で 5 ベース以下の差)、同種か異種かの判定は DNA-DNA 交雑試験を行わないと結論できない。しかし、このパーセントも分類群によって DNA-DNA 交雑試験の結果との対応は異なっており、ケースバイケースで結論を導かねばならない。

16SrRNA 遺伝子以外の指標としては、*gyrB*, *rpoD*, *recA*, 23SrRNA など様々な遺伝子の指標が用いられる。その多くは後述する Multilocus Sequence Typing に用いられており、そちらにリストアップする。現在までのところ、これらのシーケンス解析の結果は 16SrRNA と目立った矛盾はない。16SrRNA も機能による制約があるが、タンパクには翻訳されないので全長にわたって変異が見られ、情報量は多い。一方、他の多くの指標はタンパクに翻訳されるのでタンパクとしての情報が系統解析に多く用いられる。タンパク自身は機能による制約がかかり、それが直接的に淘汰圧の対象になる。その DNA 情報では特にコドンの 3 番目の塩基に差異が集積するが、そこも細菌によって特定の好み (codon preference) があり、全くの自由な変異であるわけではない。例えば EF-Tu などでは 300 個ほどのアミノ酸からなり、それぞれが 20 種類のアミノ酸が考えられるので理論上は情報量は多いが、機能の制約より大部分の位置は 2~3 種類のアミノ酸しか入らず実際の情報量は多くはない。これらの事情を勘案すると、16SrRNA より特に情報量の多い情報高分子は 23SrRNA ぐらいしかない。

MAIDEN et al. (1998) は、単一の遺伝子に基づいた系統関係の類推ではなく多数の遺伝子を同時に用いた解析を行う Multilocus Sequence Typing (MLST) を提唱した。単独の遺伝子での情報は限られているが、複数の遺伝子についてその情報を結合して解析すれば情報量はかなり増大し、得られた系統関係の推定も信頼度は増す。この考え方は近年多くの研究者の支持を集めはじめており、以下のような遺伝子またはタンパクが解析された応用例がある (PARAIS et al., 2005; MORSE et al., 2002; ZHAO

et al., 2005; MAIDEN et al., 1998; BALDWIN et al., 2005; 澤田, 2005 等)。

a. リボソーム関連：5S rRNA, 23SrRNA (Large subunit (LSU) rRNA), ITS (internal transcribed sequence: 16S と 23S の間にあつて tRNA 遺伝子を含み 5S, 16S, 23S と同一のオペロンとして転写される), ribosomal proteins (50 種ほどある)。

b. RNA 合成, タンパク合成：RNA polymerase subunits (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*), Sigma factor σ^{70} (*rpoD*), RNaseP (maturation of mRNA in histidine biosynthesis), Elongation factor Tu (EF-Tu), EF-G。

c. DNA 複製, 修復関係：DNA polymerase III subunits, UvrA UvrB UvrD DnaE (PolC) (DNA replication and repair), DNA gyrase B (*gyrB*), Recombinase A (*recA*, general recombination and DNA repair)。

d. シャペロン, 熱ショックタンパク類：Hsp70 family (DnaK, etc.) Hsp60 family (GroEL chaperonin, etc.), Hsp40 family (DnaJ, etc.), GrpE (protein working together with DnaK), HrcA (heatshock protein in *dnaK* operon)。

e. エネルギー代謝関連：F-ATPase β -subunit (*atpD*), GTP binding protein (*lepA*)。

f. 基質代謝関連：Fructose-bisphosphate aldolase (*fba*), 6-phosphofructokinase (*pfk*), Phosphoglycerate kinase (*pgk*), Pyruvate kinase (*pyk*), Adenylate kinase (*adk*), Shikimate dehydrogenase (*aroE*), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (*gdh*), Monofunctional peptidoglycan transglycosylase (*mitg*), Pyruvate dehydrogenase subunit (*pdhC*), Phosphoglucomutase (*pgm*), Polyphosphate kinase (*pilA*), 3-phosphoserine aminotransferase (*serC*), Carboxyltransferase in lipid synthesis (*accD*), Glutamate synthase subunit (*gltB*), Acetoacetyl-CoA reductase (*phaC*), Tryptophan synthase subunit B (*trpB*)。

g. 分泌関連：SecA SecY SRP54 SRPR (Protein secretion components), Putative ABC transporter (*abcZ*)。

これらの遺伝子あるいはタンパクは、ほぼすべての細菌に広く存在し生存に不可欠なものであり、急激な変化を行った可能性が低く菌の系統関係を正しく反映している可能性が高いという理由で選択されたものが多い。その解析により、菌種によっては 16rRNA の解析で不可能だった種レベルの区別も可能であるとされており、今後、種の同定方法が一変することが期待される。しかし、それぞれの遺伝子の間で系統関係に大きな矛盾がない限りこの方法は有効であるが、そうでない場合は水平移動が

考えられるので区別して慎重に考察する必要がある。

一方、病原性関連遺伝子や 2 次代謝関連遺伝子などのように、生存に不可欠ではなく水平移動などの可能性も高い遺伝子についての系統関係の解析も始められている。その結果を他の指標の結果と比較することにより、病原細菌などがどのように病原性などの能力を獲得したのかなど、個々の菌の成立の様相が明らかになることも期待される。病原細菌や特種能力をもった細菌については、こういった観点からの解析が重要になってくるであろう。

系統関係の解析では塩基やアミノ酸の置換が計算のターゲットであるが、遺伝子の情報は置換以外に挿入 (insertion) や欠失 (deletion) があり、それがあつた時点で生じてそれ以降分岐した分類群に保存されている場合があり、系統関係を明らかにするのに重要な指標とされている。GUPTA (1998) はこれを indel と名付け、古細菌や真核生物の起源などの研究に応用したが、indel はもっと小さな分類群でも応用されはじめており、系統関係を考察する重要な武器になると考えられる。

IV 高次分類

さて、以上のような新たな指標も含め、次第に生物全体の系統関係が解明され、従来全く不明確であった細菌における高次の類縁関係の様相が明らかになってきた。まず、生物全体は真核生物 (Eukaryote)、真正細菌 (Bacteria, eubacteria)、古細菌 (Archaea) の三つの系統に大別され、このレベルでの分類群をドメインという最上位ランクとして扱っている。その下には門 (phylum)、綱 (class)、目 (order)、科 (family)、属 (genus)、種 (species) と、既存の動物、植物にならって分類群が設定されている。真正細菌門には 24 の門が設定されており、それぞれの門の間の類縁関係は必ずしも確定しているわけではない。しかし、便宜的にそれらを四つのグループ、すなわち太古に分岐したグループ (deep branched groups) (9 門)、シアノバクテリア (1 門)、グラム陽性グループ (2 門)、グラム陰性グループ (プロテオバクテリア 1 門、その他 11 門) に分けて考えると考えやすい。この中で植物病原が所属するのはグラム陽性菌グループの 2 門とプロテオバクテリア門中の 3 綱であり、それぞれ科までの高次分類について図-1, 2 に示した。

これらの分類群の関係はほとんどが 16SrRNA シークエンスに依存して決定されたものであるが、基本的な相互の類縁関係は今後多少の変動があろうとも大きな変化はないものと考えてよい。多くの遺伝子の水平移動が知

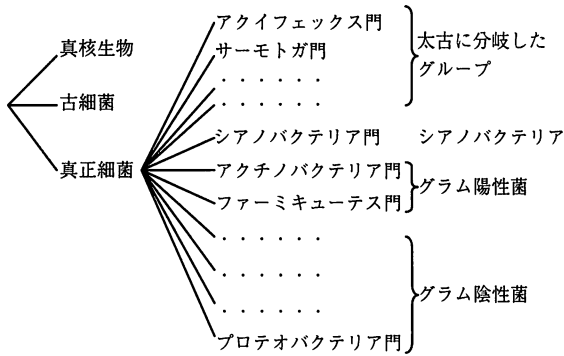


図-1 生物界の大別

られているが、細菌の系統関係を根本的にくつがえすような事例は今のところ知られていない。ただ、これから多くの遺伝子が調査検討されるにつれて、高次になればなるほど相互の類縁性やあるいはどのランクの分類群にするのかについて変化する可能性もある。というのも、これら高次の分類群については、もとよりその基準がないからであり、例えば細菌における目 (order) や科 (family) とは何なのかについて明確な定義や合意があるわけではない。それにしても、高次分類がある程度定まってきたことにより、植物病原細菌は、*Xanthomonas* のようにそれだけで一つの目の大部分を形成しているような例外を除いて、広く一般細菌の中に散らばって存在しており植物病原という特別なグループを作るものではないことがより一層明らかになってきた。このようなことは光合成細菌の進化でも明らかにされてきたが、多様な細菌群集のなかである特定の環境ニッチに適応して特有の機能をもった集団が多発的に進化してきたのだと考えられる。ということは、これからも未知の全く新しい植物病原細菌が見つかる可能性もあるということである。

おわりに (問題点と展望)

PCR により遺伝子を増幅させる手法は、培養できない微生物の分類同定を可能にしてきた。*Mollicutes* 綱に属する “*Phytoplasma*” の位置付けもそのようにして解明されてきたが、現在ではさらに土壌や水圏など環境由来の DNA (eDNA) サンプルから 16SrRNA 遺伝子を増幅させ、その系統解析や多様性解析がなされている。この分野は急速に拡大しつつある。培養では引掛からないが植物病原に近縁と推定される微生物の存在も示唆されており、今後植物病原の進化の解明に大きな影響を与えるものと考えられる。

系統解析が簡易化される一方で、シークエンサーで出たデータを生のままで検索にかけ、返ってきた相同性の

- Domain *Bacteria*
- Phylum *Firmicutes*
- Class *Mollicutes*
- Order *Acholeplasmatales*
- Family *Acholeplasmataceae*
- Candidatus 'Phytoplasma'*
- Order *Entomoplasmatales*
- Family *Spiroplasmataceae*
- Spiroplasma*
- Phylum *Actinobacteria*
- Class *Actinobacteria*
- Order *Actinomycetales*
- Suborder *Micrococcineae*
- Family *Microbacteriaceae*
- Clavibacter, Curtobacterium, Rathayibacter*
- Suborder *Corynebacterineae*
- Family *Nocardiaceae*
- Rhodococcus*
- Suborder *Streptomycineae*
- Family *Streptomycetaceae*
- Streptomyces*
- Phylum *Proteobacteria*
- Class *Alphaproteobacteria*
- Order *Rhizobiales*
- Family *Rhizabiaceae*
- Rhizobium (Agrobacterium)*
- Class *Betaproteobacteria*
- Order *Burkholderiales*
- Family *Burkholderiaceae*
- Burkholderia, Ralstonia*
- Family *Comamonadaceae*
- Acidovorax*
- Class *Gammaproteobacteria*
- Order *Xanthomonadales*
- Family *Xanthomonadaceae*
- Xanthomonas, Xylella*
- Order *Pseudomonadales*
- Family *Pseudomonadaceae*
- Pseudomonas*
- Order *Enterobacteriales*
- Family *Enterobacteriaceae*
- Erwinia, Brenneria, Pectobacterium, Pantoea*

図-2 植物病原細菌を含む高次分類

数値をそのまま実験結果として報告するような初心者の例を見たことがある。適切なアライメントや読み間違えの十分なチェックなしに検索を行い、最後の相同性の数値だけが一人歩きするのは大変に危険であり、誤った解釈を与えかねない。得られた結論が妥当かどうかについて、シークエンスタータのみならず表現形質や生物学的な特徴と併せて十分な考察が求められる。

ゲノム情報の解析が進み、多くの遺伝子についてそれを増幅するようなプライマーの開発が可能になって系統

関係が明らかになるにつれ、おおよその系統関係は16SrRNAの解析によって得られたものと矛盾がないとすると、分類のために菌株間の相違を厳密に調べる場合以外、例えば同定するのに必要な遺伝情報というのは限定されたもので十分である。むしろ、応用面から考えれば、どのような病原性関連遺伝子をもっているのか、どのようにして新たな病原細菌が出現したのかなどについての疑問に答えられるような「それぞれの遺伝子」の系統解析が重要になってくると考えられる。この関係は車に例えればシャーシとボディーのようなもので、シャーシが駆動部の基本でありそれがどのように形成されたかは重要であるが、それがおおよそがわかってきた現在では、その上にどのような装備を積んだボディーが乗っているのか、荷物をたくさん積める大型ワゴンなのか快適に飛ばすスポーツカータイプなのか、それらはどのようにモ

デルチェンジしてきたのかを見極めることが次のターゲットになってくると考える。

引用文献

- 1) BALDWIN, A. et al. (2005) : J. Clin. Microbiol. 43 : 4665 ~ 4673.
- 2) GARRITY, G. M. et al. (2005) : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. Vol. Two, Part A, Springer, N. Y., 304 pp.
- 3) GUPTA, R. S. (1998) : Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 : 1435 ~ 1491.
- 4) MAIDEN, M. C. J. et al. (1998) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 3140 ~ 3145.
- 5) MORSE, R. et al. (2002) : Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 : 1477 ~ 1484.
- 6) PARAIS, S. et al. (2005) : ibid. 55 : 2013 ~ 2025.
- 7) 斉藤成也 (2002) : あなたにも役立つバイオフィーマティクス (菅原秀明編), 共立出版, 東京, p. 32 ~ 36.
- 8) 澤田宏之 (2005) : 日本植物病理学会第23回植物細菌病談話会論文集: 98 ~ 110.
- 9) 高松 進 (2005) : 植物防疫 59 : 116 ~ 121.
- 10) WANG, Y. et al. (1997) : J. Bacteriol. 179 : 3270 ~ 3276.
- 11) _____ and Z. ZHANG, (2000) : Microbiology 146 : 2845 ~ 2854.
- 12) ZHAO, Y. et al. (2005) : Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55 : 2131 ~ 2141.

新しく登録された農薬 (21 ページから続き)

●還元澱粉糖化物液剤
 21597 : エコピタ液剤 (協友アグリ) 2005/12/14
 21598 : あめんこ 100 (ヤシマ産業) 2005/12/14
 還元澱粉糖化物 : 60.0%
 かんきつ : ミカンハダニ, きゅうり, いちご : ワタアブラムシ, パセリ : モモアカアブラムシ, ばら : アブラムシ類 : 収穫前日まで
 ●ジノテフラン水溶剤
 21607 : スタークルエアー 50 (三井化学) 2005/12/14
 21608 : スタークルメイトエアー 50 (三井化学クロップライフ) 2005/12/14
 ジノテフラン : 50.0%
 稲 : カメムシ類, ウンカ類 : 収穫 7 日前まで : 無人ヘリコプターによる散布, 空中散布
 ●リン化アルミニウムくん蒸剤
 21612 : ユーピーエルエピヒューム (ユーピーエル) 2005/12/27
 リン化アルミニウムくん蒸剤 : 55.0%
 倉庫, サイロ, 船舶 : 穀物類, 豆類, 飼料, 種子 : コクゾウムシ, ヒラタコクヌストモドキ, マメゾウムシ類等, 倉庫, 葉たばこ : タバコシバンムシ, チャマダラノメイガ : くん蒸
 ●リン化アルミニウムくん蒸剤
 21613 : ユーピーエルエピヒューム小球 (ユーピーエル) 2005/12/27
 リン化アルミニウム : 55.0%
 倉庫, サイロ, 船舶 : 穀物類, 豆類, 飼料, 種子 : コクゾウムシ, ヒラタコクヌストモドキ, マメゾウムシ類等, 倉庫, 葉たばこ : タバコシバンムシ, チャマダラノメイガ : くん蒸
 ●エチプロール・シラフルオフエン水和剤
 21614 : キラップジョーカーフロアブル (バイエルクロップサイエンス) 2005/12/27
 21615 : ホクコーキラップジョーカーフロアブル (北興化学) 2005/12/27
 エチプロール : 3.0%, シラフルオフエン : 7.0%
 稲 : ウンカ類, カメムシ類, ツマグロヨコバイ, コブノメイガ, イナゴ類 : 収穫 14 日前まで

「殺菌剤」

●シメコナゾール水和剤
 21603 : サンリット DF (三共アグロ) 2005/12/14
 シメコナゾール : 50.0%
 おうとう : 灰星病
 ●テトラコナゾール・銅水和剤
 21617 : ホクコーホクガード C 顆粒水和剤 (北興化学) 2005/12/27
 テトラコナゾール : 8.0%, 銅 : 67.3%
 てんさい : 褐斑病
 ●カスガマイシン・TPN 粉剤
 21618 : ホクコーフタバロン A 粉剤 (北興化学) 2005/12/27
 カスガマイシン塩酸塩 : 4.6%, TPN : 9.0%
 稲 (箱育苗) : いもち病 (苗いもち), 苗立枯病 (リゾープス菌), もみ枯細菌病, 苗立枯細菌病, 褐条病 : 育苗箱 : 覆土前 : 覆土に均一に混和する

「除草剤」

●イマズスルフロン・カフェンストロール・ベンズピシクロン粒剤
 21599 : イッテツジャンボ (住化武田) 2005/12/14
 21600 : SDS イッテツジャンボ (エスディーエス バイオテック) 2005/12/14
 21601 : 協友イッテツジャンボ (協友アグリ) 2005/12/14
 イマズスルフロン : 2.25%, カフェンストロール : 7.5%, ベンズピシクロン : 5.0%
 移植水稲 : 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離 (東北, 北陸, 関東・東山・東海を除く)
 ●イマズスルフロン・フェントラザミド・プロモブチド粒剤
 21602 : ドニチ S1 キロ粒剤 (住化武田) 2005/12/14
 イマズスルフロン : 0.90%, フェントラザミド : 3.0%, プロモブチド : 9.0%
 移植水稲 : 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離

(42 ページに続く)