

タイ・カセサート大学研究協力計画

フェイスII

専門家業務報告書(1)

平成元年4月

国際協力事業団

タイ・カセサート大学研究協力計画

フェイズII

専門家業務報告書(I)

2005

JICA LIBRARY



1077871101

平成元年4月

国際協力事業団

国際協力事業団

20055

序 文

本プロジェクトは、タイ国のカセサート大学のカンペンセン・キャンパスに我が国の無償資金協力で建設された総合研究所（CLGC）及び農業機械化センター（NAMC）においてその研究機能の強化のため、「作物改良のための生物工学及び育種」、「農業環境と品質保証技術」及び「農業機械化技術の開発」の3分野において'87年4月16日から5年間の協力を実施しているものである。

協力開始後、約2年を経過した現在、派遣された専門家数は、長・短期あわせて25名、受入れた研修員数も7名にのぼる。これまでに、協力課題に関する十数編の研究論文が作成され、さらに昨年11月に開催されたセミナーにおいては、各国立大学、研究機関の代表者約200名を集め、28件の研究報告がなれる等両研究所の研究活動が活性化しつつある。

本報告書は、協力開始から'89年3月の期間に派遣された専門家の業務報告をとりまとめたものである。本書が今後の協力活動のみならず、農業研究の参考資料として広く活用されることを願ってやまない。

最後に、業務に当たられた専門家の方々及びプロジェクトの推進にご尽力頂いた両国の関係者に謝意を表する次第である。

1989年4月

国際協力事業団

農業開発協力部長

宮 本 和 美

目 次

協力課題一覧表

プロジェクトⅠ（作物改良のための生物工学と育種）

1) 浅 平 端	（組織培養）	（87. 7. 10～87. 8. 20）	3
2) 獅 山 慈 孝	（生物工学）	（87. 12. 21～88. 1. 20）	13
3) 山 本 浩 文	（組織培養）	（88. 7. 10～88. 8. 31）	27
4) 永 富 成 紀	（遺伝資源保存）	（88. 11. 25～88. 12. 24）	33
5) 位 田 晴 久	（育 種）	（88. 12. 6～89. 1. 13）	45
6) 山 田 哲 治	（遺伝子工学）	（89. 1. 16～89. 2. 17）	75

プロジェクトⅡ（農業環境と品質保証技術）

1) 山 下 律 也	（品質保証技術）	（87. 7. 10～87. 8. 13）	81
2) 高 橋 英 一	（農業環境）	（87. 12. 15～88. 1. 20）	91
3) 小 清 水 弘 一	（農業環境）	（87. 12. 21～88. 1. 20）	99
4) 鍛 塚 昭 三	（農薬土壌分解）	（88. 7. 31～88. 8. 26）	113
5) 加 藤 宏 郎	（アフラトキシン防御）	（88. 9. 30～88. 10. 31）	129
6) 古 川 久 雄	（土壌生態学）	（88. 12. 1～88. 12. 29）	147
7) 池 田 善 郎	（包装貯蔵技術）	（88. 12. 12～89. 1. 13）	151

プロジェクトⅢ（農業機械化技術の開発）

1) 糸 川 信 弘	（移植技術）	（88. 1. 30～88. 3. 16）	177
2) 市 戸 万 丈	（収穫技術）	（88. 1. 30～88. 3. 16）	189
3) 我 妻 幸 雄※	（コーンシェラー改良）	（88. 9. 21～88. 11. 20）	197
4) 小 林 恭	（脱 穀 機）	（88. 10. 28～88. 12. 21）	209
5) 市 戸 万 丈	（さとうきび全茎収穫）	（89. 1. 20～89. 2. 19）	225

※「タイ・とうもろこし品質向上計画」専門家

專 門 家 名 : 淺 平 端

指 導 科 目 : 組 織 培 養

派 遣 期 間 : 87. 7. 11 ~ 87. 8. 20

所 属 先 : 京 都 大 学 農 学 部

業務状況報告

タイ国カセサート大学研究協力計画フェーズⅡ実施協議チーム調査報告書（国際協力事業団昭和62年6月、以下報告書と略す）に基づいて、プロジェクトⅠの今後の研究実施計画について、関係者と細部の検討を行った結果と、滞在中の業務の概要は次のとおりである。

1. プログラムⅠ 組織培養

組織培養については、二つのトピックが当面の研究課題として提出された。

トピック1. サトウキビ無病苗生産のための茎頂培養による栄養系繁殖

- 1) 研究目的 報告書に見られるとほぼ同じであるが、このトピックでは、特にサトウキビのモザイクウイルス（SCMV）無病苗の大量急速増殖が研究される。
- 2) 研究組織 リーダー Mr. Kruick Naritoom
共同研究者 報告書にある全員（実質的研究者はMiss. Rongrongと思われる）
- 3) 研究の現状と問題点

本トピックについては、すでに基本的実験技術が確立しており、かなりの研究成果が得られている。しかし、次のような問題について、技術的解決が要望されている。

- i) 数代の継代培養後における黄化水浸状カルスの苗条分化能の低下
- ii) 苗条分化後多数の短かい葉のみが形成され、正常幼植物に発育しない
- iii) 再生幼植物の土壌栽培にいたるまでの順化の困難性

4) 意見

以上の問題は、組織培養により無病苗を大量増殖を行う場合、いずれの植物についても共通にみられることである。サトウキビについて5年間着実な研究を実施することにより、研究目的の達成は期待できる。

トピック2. パパイア優良株の組織培養による栄養系増殖

- 1) 研究目的
 - i) 優良株の選抜と組織培養による栄養系増殖
 - ii) 組織培養におけるマルチプル・シュート形成による急速増殖
 - iii) カルス大量増殖によるパイナップル生産
- 2) 研究組織 リーダー： Mrs. Siriwan Burikam
共同研究者： 報告書にある全員（プログラムリーダーを除く）

3) 研究項目と研究予定年次

- | | |
|--------------------------------|------|
| i) 組織培養における培地栄養と器官発育 | 1987 |
| ii) 組織培養による優良株の急速増殖 | 1988 |
| iii) 組織培養で増殖された個体の圃場栽培における形質検討 | 1989 |
| iiii) 生殖質銀行に保存する優良細胞系統の収集 | 1990 |
| v) 育種のための薬培養の研究 | 1991 |

4) 意見

現在組織培養による幼植物再生について基本的研究技術ができており、個体再生の培養条件について、いくつか成果が得られているが、トピック1と同様再生個体の順化の困難性の解決が望まれる。それについていくつかの示唆を与えたが、機材や設備の不備がある。

また、幼植物が増殖されてもその個体の性表現は開花しなければ判定得ず、形質判定に長時間を要する点に問題がある。年次計画通り研究が進展するか疑問のある点であるが、研究の方向には誤りはないと考えられる。

II. プログラムII 遺伝資源保存

このプログラムについては、滞在中リーダーあるいは責任ある関係者と面談の機会が得られず、別紙資料3が提出されたのみであった。

トピック1. サトウキビ及びパイアの組織培養と組織の凍結保存

1) 研究目的 両植物の優良品種、地方品種並びに関連野生種の収集と低温保存

2) 研究組織 リーダー： Mr. Kasem Sooksata, Ph. D.

サブリーダー： Mr. Sonthichai Chanprem (報告書に記名なし)

共同研究者： 報告書記載のMr. Adisuk Buankeeyapanの名がなく、新にプログラムIのMiss. Rongrong WisessuwanとMrs. Siriwan Burikamが参加

3) 研究項目と研究予定年次

i) 両植物の組織培養における培地組成と器官発育

1987

ii) 両植物組織の凍結保存方法の確立

1988～1989

4) 意見

報告書では二年次より研究が実施されることになっているが、今回提出された計画では初年次より実施されるよう変更され、初年度には組織培養研究が実施されることになり、プログラムIの研究担当者が参加することになった。この点は妥当である。しかし、報告書にある遺伝資源収集と圃場での保存について具体的な方法と計画が示されてなく、5年間での収集保存がどの程度達成されるのか、明らかでない。収集の現状についてもみる機会がなかった。

なお、このプログラムからは、1987年度の要望機器名が提出されているが、後述のプロジェクトI全体の要望リストには記載がない。凍結保存研究用機器は現在CLGCにないので、それが設置されなければ来年度からの組織保存の研究は不可能と思われるが、機材供与計画と研究計画の調整が望まれる。

III. プログラムIII. 病虫害防除のためのバイオテクノロジー

報告書ではこのプログラムは2年次より実施されることになっているが、今回二つのトピック計画が提出された。

トピック1. *Sclerotium rolfsii* 拮抗微生物によるトマトの根及び茎ぐされ病の生物学的防除

- 1) 研究目的 *S. rolfsii* 防除に有効な拮抗菌及びバクテリアの検索
2) 研究組織 リーダー: Mr. Chiradej Chaswarng (Jamsawang), Ph. D.
共同研究者: Mrs. Kanitta Sangkoho

3) 研究項目と研究予定年次

- i) トマト栽培地の植物体や土壌からの病原菌の収集, 分離と拮抗微生物の分離
1987~1988
ii) 拮抗微生物の拮抗性の検定と有望微生物の保存 (主として実験室内) 1988~1989
iii) 拮抗性の検定 (栽培条件下), 拮抗微生物の施用方法や土壌中における生存に及ぼす環境の影響
1989~1990
iiii) 予想外の問題生起に対する対処法並びに拮抗微生物施用による病原菌密度変化の定量的測定
1990~1991
v) 拮抗微生物の大量生産
1991~1992

4) 意見

専門外であるので, 正しい評価はできない。知る限りでは, 病原菌の防除に拮抗菌を利用することは, 理論的に可能性はあるが, 多くの未知・未解決の問題があるといわれる。本年末派遣が予定されている短期専門家の獅山慈孝教授 (京大農・植物病理学) の見解に期待する。

トピック2. 野菜の虫害防除に利用するための核ポリヘドロシスウィルス (NPV) の遺伝子工学

1) 研究目的

- i) タイ国で分離されたNPVの遺伝子同定
ii) 虫害防除に対するウィルス利用効果改善のための昆虫の組織培養並びに遺伝子工学

- 2) 研究組織 リーダー: Mrs. Tipvadee Attathom, Ph. D.
共同研究者: Mrs. Sudawan Chaeychomsri
Mrs. Pissawan Chiemsombot, Ph. D.
Mrs. Sukuntaros Tada-kitisaran Jariya
Jariya Chanpaisaeng, Ph. D.

3) 研究項目と研究予定年次

- i) NPVの同定と特性調査
1988
ii) 制限酵素と電子顕微鏡によるウィルスゲノムの解析
1988~1989
iii) ウィルス新ゲノムの再構成に対する組織培養と遺伝子工学の利用
1989~1990
iiii) 虫害防除に対するウィルス利用の有効性の決定
1990~1991

4) 意見

専門外であり計画の妥当性の評価はできない。

NPVはすでに外国でも発見されているといわれているので、それを虫に有効に作用させるためにウィルスの遺伝子転換をめざす研究であり、先端的な生物学の知識と技術を必要とするものと考えられる。5年間で研究目的を達成するのではなく、将来のための研究力の向上をめざすものと考えべきであろう。

IV. プログラムⅣ. 育 種

このプログラムについては、滞在中リーダーのDr. Chairick Saguansupayakorn と面談する機会が得られず、全体の計画については資料が得られなかった。度々面談したDr. Kasem Piluekから提出されたトピック(サブプロジェクト) 1, 4, 5, の概要のみを記す。

トピック1. 桃色果トマトの品種改良

1) 研究目的

- i) 種々の供給源からの桃色果トマトの収集と形質評価
- ii) 西部地域の栽培に適した品種の育成

2) 研究組織

リーダー: Mr. Kasem Piluek, Ph. D.

共同研究者: Mr. Krung Sitathani (報告書に記名なし)

3) 研究項目と研究計画年次

地方品種とAVRDC/TOP収集品種について、特性調査と評価、遺伝形質の変異創成、遺伝形質の選抜と利用

1987~1989

4) 意見

在来の育種方法による品種改良であり特に問題はない。

トピック4. 胚培養によるブラシカ属種間雑種の育成

1) 研究目的

- i) 胚培養による種間交雑不和合性の解除
- ii) 地方種優良形質の他種への導入
- iii) 胚培養により得られた新しい変異の在来育種への利用

2) 研究組織

Mr. Julapak Khunwong (報告書に記名なし)

Mr. Kasem Piluek, Ph. D.

3) 研究項目と研究計画年次

熱帯地方で採種可能なブラシカ属野菜の地方種及び導入種を収集し、育種材料とする。

胚培養技術，子房培養技術の発展

1987～1989

4) 意見

研究項目については，日本で研究成功例があり，技術的困難はないが，この研究期間に新品種の作出はむづかしい。しかしブラシカ属の育種を発展させるためには必要な研究技術である。筆者の研究についての情報から新たに課題として取上げたものであろう。プログラムリーダーの諒解については不明である。

トピック 5. 薬培養を利用したナス属及びブラシカ属野菜の純系育成

1) 研究目的

- i) 薬培養に適した種の検索
- ii) 花粉からのカルス形成能の検討
- iii) 半数体再生について検討

2) 研究組織

Mr. Julapak Khunwong (報告書に記名なし)

Mr. Kasem Piluek, Ph. D.

3) 意見

ナス属，ブラシカ属では薬培養による半数体育成は比較的容易である。研究計画の詳細は不明であるが，野菜の品種改良の手段として研究を進めることは望ましいことである。新しい計画であるので，プロジェクト内あるいはトピック内での調整が充分行われるべきであろう。

V. プロジェクト・リーダー Dr. Malee Suwanna-Adth の提出資料

1. プロジェクト推進の人的機構と研究重点事項

特に意見のあるところは，次の点である。

1) 研究重点植物

- i) プログラムⅢのパパイア・三尺ササゲについては研究担当者の研究計画が未提出である。
- ii) プログラムⅣのスイート・コーンについても同様である。なお，前述のように新たにブラシカ属，ナス属についての計画が提出された。リーダーとしてどの程度了解しているのか。

2) 研究重点病原体

今後派遣が予定される植物病理学者の検討を要望する。

3) 発展させるべきテクノロジー

- i) プログラムⅢについては、専門外で判断は保留する。
- ii) プログラムⅣについては、研究担当者から具体的案の提出がない。特にプロトプラスト融合や遺伝子導入ベクターの研究は、このプログラムとしては漸新すぎる。必要あるなら、プログラム全体の変更と研究担当者の入換えが不可欠であろう。むしろ、担当者から提出された胚培養や薬培養などの技術の確立が先決であろう。

2. 初年度における要望機器のリストと優先順位

17項目概算 3,000,000 Bahts のリストが提出されたが、これはプロジェクト全体として検討し、推進に共通して必要な基本的なものに重点がおかれているとの意見である。カタログや型式などについて、資料は未提出である。

なお、プログラムⅡのリーダーからは初年度要望機器としてプログラム式凍結機のカタログが提出された。その他 2, 3 の研究参加者から緊急に必要な機器の個人的希望もある。プロジェクトの研究担当者間での調整は十分であろうか。

3. 次年度派遣研修員リストと研修要望事項

- i) Miss. Rongrong Wisessuwan の研修については、今回専門家として滞在中最もよく実験指導で接しており、その研修希望内容からみて、京大・農・蔬菜花卉園芸学講座（担任 浅平 端教授）で受入可能である。
- ii) Mrs. Pissawan Chiemsombat の研修は、その研修希望内容からみて、京大・農・生物化学講座（駒野 徹教授）、同細胞生産制御センター（大山莞爾助教授）が受入れ可能ではないかと考えるが、不明確である。
- iii) Mrs. Sudawan Chaeychomsri については考えはない。

VI. 実験指導

主として在室した CLGC の組織培養ユニットにおいて、二人のリサーチャの現在実施中の組織培養実験について助言を行った。その主要なものは次の 2 点である。

- i) 再生した幼植物を容器外に植え出すにあたって、発根を促進する方法並びに土壌栽培までの順化方法の改善。
- ii) この研究ユニットではプロトプラスト単離技術に経験がないため、携行機材として持参した薬剤や滅菌用濾過器を用いて、デモンストレーションを行った。他のユニットからも 2 名の参観があった。

その他、持参した組織培養に関する英文文献は当地で入手困難であるため、多くのリサーチャーが複写を希望し、好評であった。

Ⅶ. セミナーでの講演

CLGCの希望に基づいて、セミナーでの話題提供を行った。

話 題： 園芸学研究における果実培養の利用

日 時： 8月6日午前11時から1時間

内 容： 京大・農・蔬菜花卉園芸学研究室で行われた次の二つの研究を中心とした。

- i) オーキシン処理によりトマトの着果促進を行った場合に発生しやすい空どう果を矯正する方法を研究するために、トマトの果実培養が有効な研究手段であること。
- ii) イチゴ果実の成熟の植物ホルモン調節機構を解明するのにイチゴ果実の培養が有効な研究手段であること。

約40名の参加者があった。このプロジェクトでは組織培養を繁殖や育種に利用するよう考えられているが、組織や器官の培養は植物の生理機構解明の研究方法としても有用であることを示したので、強い興味をひいた。

專 門 家 名 : 獅 山 慈 孝

指 導 科 目 : 生 物 工 学

派 遣 期 間 : 87. 12. 21 ~ 88. 1. 20

所 属 先 : 京 都 大 学 農 学 部

I. Project 1, Topic 3, Sub-Topic 1

Resistant Mechanisms of Tomato Plants to Tomato Yellow Leaf Virus (TYLCV) infections

協議者: Dr. Attathom, S., Dr. Kositratana, W. and Dr. Chiemsombat, P.

1) 研究計画の概要

現在までに約50種のトマトを用いてTYLCVに対する抵抗性の圃場試験(12月24日, 29日に圃場調査)を行ってきたが, すべての品種が感受性であった。若い苗の時期にコナジラミで媒介され感染するとトマトの収穫は皆無である。病徴には葉巻, 萎縮, 黄化, 落花などがみられ, 本病がTYLCVのみによるものか, 2, 3 ウィルスの複合感染によるものかは今後検討を要する。本病は74品種の植物を侵すので媒介昆虫の防除が肝要であるが, コナジラミは殺虫剤散布の繁用によって耐性化が起こり, 殺虫剤散布は有効でない。現在防虫網による試験が行われているが, それによると被害は30%軽減される。しかし, この他にとられる手段がないので, 弱毒ウィルスによる防除法が考えられ, 生物工学的手法が試みられるようである。CLGCにおける生物学はとくに遺伝子工学の領域においては全く行われていないが, 基礎研究としてこの分野の研究を推進するためとり挙げられることについては意義があるであろう。TYLCVは ss-DNA ウィルスであってジェミニウィルス群に属しており, 植物ウィルスでは数少ないウィルスである。種子伝染も土壌伝染もせず, 昆虫で伝染する。吸汁時間は15~30分, 20~24時間で増殖し, 2~3週間後に病徴が発現する。このウィルスに関して, 日本で研究を行っているのは東京農業大学の池上正人氏1人であり, 世界的にも著名である。

2) 研究の実施計画

フェーズⅡプロジェクト※ p 20に書かれたように, TYLCVゲノムの解析, トマト組織培養および弱毒ウィルスゲノムのトマトへの導入である。とくにゲノム解析を行うには設備もなく従来の研究もない状態である。トマトの組織培養についてはProject 1, Topic 1で行われているので問題はないが, 弱毒ウィルスの導入については実際に行ってみないと成否は明らかでない。しかし試行する必要がある。

3) 研究に対する評価と所見

タイの遺伝子工学分野における研究の一つとしてとり挙げられることについては異議はない。しかしこれが5カ年間でできるか否かは疑問である。遂行に当たってはまず, ジェミニウィルスの分子生物学, ウィルス学を池上正人氏と相談して, 研修する必要がある。こ

れはできれば1988年度中に行う必要がある。つぎにトマトカサネの培養にゲノムを導入しようとしているが、これは不成功に終ることが多いので、プロトプラストの方法も考えるべきである。Ti-plasmidを用いるときは若い細胞を選択し、マーカー遺伝子を何にするかをも考慮しておく必要がある。一方、この研究はトマトの防除として重要であるので、病理の基礎分野からも行って欲しい。例えば、作型の検討、間作（インタークロッピング）による昆虫の回避、雑草の防除（圃場衛生として）抵抗性トマトの作出、浸透性殺虫剤（新農薬）の開発などである。

この研究を実施するための機器としては初年度（1988年）には超遠心、とくにスイングローター（13 ml用と33 ml用付）を付属品として購入する必要がある。他の2件については研究の進捗状況をみた上でよいと考える。

II. Project 1, Topic 3, Sub-Topic 2

Genetic Engineering of the Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) for the Control of Vegetable Insect Pest

協議者： Dr. Attathom, S., Dr. Attathom, T., and Mrs. Chaeychomsri

1) 研究計画の概要

野菜を食害する昆虫に昆虫ウィルス（多角体ウィルス，NPV）を与えて死滅させようとするものであるが、現場を観察していないので、よく内容がつかめない。この種の研究では、カナダにおいてBT蛋白をタバコに導入して食害する昆虫を殺そうとする研究が行われ、1987年にゲノムの導入に成功している。しかし昆虫体内で増殖するウィルスの合成機作については専門外であるためよくわからないが、日本において多角体ウィルスの増殖機作については元京大生化助教授（現東京農工大教授，4月から大阪府大に転勤予定）が最も詳しい。ただ本研究の意図は遺伝子工学に重点がおかれており、防除については甚だ理解困難の点が多い。まず、昆虫体内に昆虫を死滅させるゲノムを入れるのはよいが、それが雌虫か雄虫か、また、研究協力者はウィルスを圃場に散布するといっているが、家畜、人などに二次的害作用がないか否か、バイオハザードの問題として疑問がある。ただ、このプロジェクトでは昆虫細胞内でNPVを増殖させることを第1目的としていると考える。

2) 研究の実施計画

フェーズIIプロジェクト^{*}p23に書かれているように、まずNPVを昆虫から分離して、多角体ウィルスのゲノムを決定し、昆虫の細胞培養技術を習得した上で、純粋培養法を確立する。その後NPVのゲノムに修正を加えて昆虫を殺す有効なウィルスを作成したいというのが目的である。NPVのゲノムを解析するのは常法通りであるが、その方法については実施されておらず、技術者もない。現在は昆虫を飼育して、それにウィルスを処理して死亡するか否かを研究している。

3) 研究に対する評価と所見

まず、供試昆虫のいかなるステージで増殖するかを決定しなければならない。つぎに NPV の遺伝子を決定しようとしているが、分離と増殖法が解決すれば決定はできるであろう。この手段として、昆虫細胞の培養法を研修する必要があるが、現在この領域で研究しているのは、農林水産省生物資源研の柝原氏のみである。京大ではその細胞を分譲してもらい、イネ萎縮病ウィルスの媒介昆虫の細胞培養を行っているが、昆虫は扱っていない。NPV ゲノムの解析は TYLC の場合を適用できるので、とくにこの分野で日本に派遣する必要はないが、両分野に共通して日本人のエキスパートが、来年度 1989 年位に来る必要がある。必要機器として超遠心があるが、これは先の TYLC と共同で使用すればよい。ただ、ウィルスストック用に Deep Freezer を希望しているが、現在ほとんどフルに活用されているので必要であると考え。Biohazard Cabinet は本年度は必要でないと考え。むしろ、病理の研究棟を改造して無菌室、ストックルームなどつくる必要がある。

III. Project 1, Topic, Sub-Topic 3

Control of *Heliothis armigera* in Cotton by Insect Pheromone

研究に対する所見

この研究に関しては全く専門外であって、具体的にコメントすることができない。また、sub-topic Leader その他の者が海外出張その他で面談することができなかった。小清水教授の方が多少専門家として理解度も深いと考えるが、二人の意見としては以下のようなものである。

まず第一に、sex pheromone として学問的には興味深いと考えるが、化学物質の構造決定が困難である（ボラタイルなものが多いので）。さらに、そのようなものは日本でも石井博士らによってすぐれた研究はあるが、圃場での効果は現われない。むしろ、不妊雄虫を放飼することによって 2 年前に沖縄(?)で成功し、昆虫が全滅したという例があるので、それを考えるべきである。個人的所見としては評価することはできない。高速液クロを購入したいようであるが再検討すべきである。

IV. Project 1, Topic 3, Sub-Topic 4

Biological Control of Root and Stem Rot of Tomato Caused by *Sclerotinia rolfsii*

協議者： Dr. Attathom, S. and Mrs. Sangkaha, K.

1) 研究計画の概要

本病は 6 月から 10 月の雨期に多発するが、これは菌核から生育した菌糸によるもので、越夏、越年は菌核によると考えられる。1987 年から研究が始まり、現在病原菌の分離を終えたところである。本病の生物防除法として、土壌中の拮抗菌を選抜し、それによる病原菌の抑制を考えている。その一つとして *Trichoderma* sp. と芽胞形成細菌 *Bacillus*

sp. と *Pseudomonas* sp. を分離し、室内実験的に *in vitro* で本菌との間で拮抗作用を調べている。

このような土壌病害の拮抗菌による防除は日本においても連作圃場でよく発生し、この種の研究や防除も行われてきたが、いずれも失敗に終り、現在では“抑止土壌”とは何かということが研究されている。したがって、本研究のプロジェクトは学問的に意義はあっても、防除法としては意味がないと考える。また、本研究において菌核形成の生物工学的研究すなわち、菌核形成遺伝子の研究、例えばプラスミドの存在の有無を調べるのであれば *Biotechnology* のプロジェクトとして意義は認められるが、この問題は *Biological control* であって、*Biotechnology* のカテゴリーには属しないと考える。

2) 研究の実施計画

フェーズⅡ プロジェクト [※]p27 に書かれている通りで、一部は 1987 年に実施され、結果も出ている。しかし、タイ国土壌と日本土壌との差や根圏微生物に差はあるとしても、4~11 迄の項目は甚だ幼稚である。病害として大きい被害を与えているとすれば、全面的に再考を要する研究であろう。したがって、実施するとしても、要望機器として挙げられているものについてはさし控え、むしろ後述するように、病理学、保護学の研究を行う部屋として 1989 年には是非改造する必要がある。

3) 研究に対する評価と所見

タイ国におけるトマトの病害は p13 で述べたように TLYCV によるものが甚大であって、それをまず解決すべきである。この病害も大きいと考えられるが、TLYCV に侵されているから発病し易い可能性もある。もし本病を生物学的に防除するとすれば、以下のことを参考にして検討すべきであろう。このことについては調査団とのミーティングで Dr. Attathom が覚書交換会で、Dr. Stabutra が一考することもほのめかしていた。

専門家として防除に関し検討すべき課題は以下のようなものである。

- (i) 連作を回避する。移植時にロックウール栽培苗を用いる。
- (ii) 雨期に湛水状態にして、圃場をビニールで被覆し、太陽熱による菌核の殺菌を行う。水温が 60℃ になり、1 カ月も行えば、発生は減少する筈である。菌核は殆ど地表面に生息しているから。
- (iii) 畑の畝を高くして畝間に水を入れ、重油を入れ菌核を窒息死させる。
- (iv) 土壌に有機質肥料を入れ、天地返しを行う。温度と酸素欠乏で菌核は死滅する。
- (v) 拮抗菌をワラなどで培養し、土中にすきこむ。

以上 (i)~(iv) について実験し、発生が抑えられないときは (v) について行ってみる。

病理の実験室は上述のように、設備上、安全性を欠きたり人体に対するバイオハザードの面で劣悪である。したがって、現在の 4 部屋のドアを外から入れぬようにして、まず、無菌室 (恒温 20~25℃)、定温培養室 (15℃)、菌株保存室 (0~5℃)、殺菌兼培地調製

室（現在のオートクレーブは危険である）などをつくり、改装されるよう希望する。このようにすれば、このプロジェクトで要求されているものはほとんど満され、かつ恒久的である。

V. Project 1, Topic 3, Sub-topic 5

Pre-immunization of Papaya Seedling to Control Papaya Ringspot Virus

協議者： Dr. Attathom, S., Dr. Kositratana, W., Dr. Taweechai, N., and Mrs. Bureekam, S.

1) 研究計画の概要

本病は台湾で発生し、この10年間にまんえんしタイではとくに被害が激甚となり、健全なものがみあたらない程である。本ウイルスに対する抵抗性品種がみつからず防除に困惑している。本ウイルスの宿主範囲は狭く、パパイヤ以外のウリ科のみを侵すようである。当面の防除として交差防衛反応によるものが唯一と考えられ、発病圃場から弱毒性、無病徴のウイルスを分離することに努力することである。Dr. Taweechaiは8系統を分離しているが、それらによる圃場試験は行っていない。

一方、 HNO_2 による変異ウイルス二系統（PRVHA 5-1 および 6-1）を分離しているが、それらのウイルス学的性質は明らかでない。

圃場調査の結果、播種2年後のものでは全滅の状態栽培を中止し、すべて切り倒している。また開耕初年度の圃場においても2～3個の果実が数カ月のパパイヤで収穫されるが、その後はおそらく収穫皆無となるであろう（Rachaburi 周辺圃場）。したがって、Economic Plantsとして考えられる本病の被害は致命的で、研究の必要性は充分にあると考える。

2) 研究の実施計画

フェーズⅡ プロジェクト[※]p29に書かれているとおりであるが、1の項目と3の項目とを並行して、本年度はまず温室レベルで実験すべきであろう。2の項目は多少遅れてもよいのではないか。

本病に関する研究も上述のSub-Topic 4と同様、生物防除に属するものと考えが、ウイルスの変異株を用いて遺伝子導入を考えるとすれば生物工学の領域となる。また、ウイルスの分離精製用として超遠心を必要とするが、これはSub-Topic 1と2で購入すれば必要はない。ただし、1987年の研究の進捗状況からみて、Phytotronの必要性は充分に考えられる。

3) 研究に対する評価と所見

本病は昆虫媒介性ウイルス病であると称しているが、汁液接種が可能であるので、接触

伝染病または種子伝染病であるか否かを抗血清（現在あるとっている）を用いて調べる必要がある。また、1年生のパパイヤでは多少の収穫が認められるので、パパイヤの栽培を1年生に限定することも考えられる。同時に果実ができるまでの苗木の間、防虫網でカバーするとか、間作作物を植えることを検討すべきである（当面の防除として虫の飛来、接触を防ぐため）。当然のことであるが、種子消毒をも行う必要がある。

つぎに研究について、まず現在分離している弱毒ウィルスによる交差防衛反応を室内実験（ファイトトロン）と圃場で検討する。それが明らかになったあと、1989年以降にPRVのゲノムを解析し、パパイヤの細胞に弱毒ウィルスRNA（cDNA）を導入することを考えてみてはどうか。実施項目の3,4はむしろ本年から実施すべきであろう（cross protectionに限って）。Cell cultivator については本年度購入する必要はないと考える。

VI. Project 1, Topic 3, Sub-Topic 6

Control of Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus in Yard Long Bean by Cross Protection

協議者： Dr. Attathom, S., Dr. Chiemsombat, P. and Mrs. Kinkong, S.
（旧姓 Nateewatana）

1) 研究計画の概要

本ウィルスはもともとタイ国由来のものでなくマレーシアで発生した。Yard Long Beanにはこのほかに、Soybean M. V., Peanut Mottle V., Mung bean Yellow M. V., Mung bean M. V., Soybean Yellow Mottle V., Ground nut M. V. などがあり、昆虫媒介性のものが多い。本病はほとんどのマメ類にみられ、輸出の際も問題となっている（検査上）。本ウィルスは700 nm のひも状ウィルスでポテトウィルス Y に属する昆虫媒介性のものである。本病を上述の場合と同様にHolmesによって発見された交差防衛反応を用いて防除しようとするものであるが、現在のところ実験結果はえられていない。圃場からの弱毒性ウィルスまたは変異原試薬あるいは熱処理によって弱毒ウィルスが選抜できれば防除法として可能性はある。今のところ抗血清のみがえられているので、弱毒ウィルスによる強毒ウィルスの定量は可能であろう（ただし、弱毒ウィルスと反応しない抗血清の場合）。

2) 研究の実施計画

フェーズⅡプロジェクト[※]p31に書かれているとおりである。計画の内容は可としても計画の進め方として、項目の2-4を同時に並行して進めるべきで、とくに3については本年度から、分離システムを用いて行うべきである。計画性として欠けている。変異システムについても来年度中に終わらなければ5カ年では決着がつかない。本ウィルスについて日本で行っているのは北大の四方教授か、診断学としては大阪府大の井上教授であるので、研修先も当然のこと乍ら決定されるであろう。また、エキスパートとしては大阪府大の若い人が

よいと考える（野崎助手，ただし，1989年は国際学会のため無理であろう）。必要機器としての超遠心は重複しているので，全体のプロジェクトとして考えればよいと思う。電顕用のエンラジャーが全く使用できない（イタリー製）ので，購入する必要がある。

3) 研究に対する評価と所見

変異原としてHNO₂による方法のみを考えているようであるが，これによると核酸ベースのかなりの箇所に変異が起こるので，熱処理（75℃，10分位）法についても一考すべきである。また，圃場における本病の病徴が一定していないため，上述のウィルスの複合感染も考えられるので，ウィルスの同定をすることが先決である。そのため検定植物を用いて基礎実験を行っておくことが肝要であろう。これはウィルス病学を研究するものとしての初歩的なことである。さらに，本病は種子伝染も多少するので，他ウィルスとの関係を種子においても調べておく必要がある。研究用の機器として要求されているものについては上述のとおりである。

Ⅶ. Sub-Project 11A, Topic 1

Pesticide Residues Deminishment in the Soil and their Microbial Degradations

協議者： Dr. Korpraditskul, V. and Korpraditskul, R.

1) 研究計画の概要

タイ国ではほとんどの作物が年中栽培されているため，雑草を含め，昆虫の発生が多く，それらによる媒介によって，プロジェクト I において計画されているように病虫害の被害が多い。その防除の手段として，除草剤，殺虫剤ついで殺菌剤が多く散布され，かつての日本における農薬公害が起こりつつある。この農薬の残留を微生物の分解によって軽減しようとするのがこのトピックの目的である。現在は研究が始められたばかりで，農薬処理土壌（トモロコシ圃場）を1カ月毎に採取し，土壌微生物を分離しているが，顕著な結果はえられていない。農薬（除草剤）としてはグラモキソン，メトリン，アトラジンである。この種の研究は日本において過去20年にわたって行われ，各種農薬がいかなる経路で代謝分解されるかはほとんど明らかである。ただ日本と異なるのは気候が異なるので差はあるであろうが，土壌微生物の質的变化に期待することは無理であろう。Vichai は病理であるが，Roongnapa は理学部出身の微生物専門家であるため，理学的思考が強い。計画中に Beneficial organism というのがあるが，何を以て Beneficial とするのか，よく理解していない。彼等に言わせると，研究の結果からでてきたものを Beneficial にしようとしているようであるので，農学の見地からはとくに土壌微生物では最初から Beneficial と Inbeneficial とに分けて分離する必要のあることを指摘した（野菜用殺虫剤にはパラチオン，カルボフラン，アルドリノを使用）。

2) 研究の実施計画

フェーズⅡプロジェクト^{*}p42に書かれてあるとおりである。まず、1については日本のデータを参考にし、ここではやっても意味がない。2の項目については一応分離を行い、*in vitro*の実験で農薬分解能をシャーレでしらべ、分解能菌の消長を調べる。さらにVA菌根菌、リゾビウムなど有益菌と病原菌としてリゾクトニア、フザリウム、フィトフトラなどの消長を調べる。さらに、室内実験でえた分解物の作物に対する影響を発芽から苗の時代迄について調べるよう、変更を求め了承した。

3) 研究に対する評価と所見

このような農業に関する試験は既にメーカーによってよく行われている筈である。したがって、余り評価はできないが、タイの特殊状況下でどのようになるかは実験しないとわからない。年中高温下にある土壌微生物にひょっとしてよい分解菌が存在するかもしれない。そこで上述のように研究実施計画として適当でないものもあるので、以下の項目を示唆した。

- (i) 作物に対して有益と考えられる菌根菌の消長をみる。マメ科では *Rhizobium* をみる。トウモロコシでは根圏が深いので *Nematodes* について調べる。
- (ii) 作物に対して有害となる *Fusarium moniliformae*, *Rhizoctonia solani* などについても同様調べる。
- (iii) 除草剤、殺虫剤の分解菌を室内実験によって分離する。すなわち、処理土壌から分離した細菌、糸状菌を薬剤含有培地で培養し、徐々に濃度をあげて分解に対する適応性をしらべ、分離・保存する。
- (iv) つぎに分解菌による分解物を抽出分離し、作物の発芽、生育に対し、抑制、促進、分解などの影響を調べる。

以上の項目をあげ、(i)~(iii)について本年から実施するよう依頼した。なお、土壌菌の分離培地として現在3種類しか用いていないので、選択培地として種々の抗生物質を含むものを用いるよう指摘した。タイにない場合には日本のエキスパートに依頼すればよいと考える。

本年度に購入すべき機器として、クロマト用の機器があるが、上述の実験を行うには必要がない。必要となるのは2年後であろう。分離菌の保蔵庫は必要であるかもしれない。なお、Roongnapaは真面目な研究者であるので、京大農業研の津田助教授のところかまたは雑草研に研修してみるのもよいのではなかろうか。

VIII. Project II, Sub-Project II-B, Topic 3

Control of Aflatoxin in Economic Crops

協議者: Mrs. Chintana Chana

研究に対する評価と所見

Asp. flavus は戦後から米で問題となってきたことから考えると、本菌がタイの農地または自然においてごく普通の腐生菌として生息していることが考えられる。丁度日本の農地における *Aspergillus*, *Penicillium*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Nigrospora*, *Curvularia* などと同様に穂枯れ、モミ枯れを起こすものと考えられる。したがって、本研究の実施計画書（フェーズⅡプロジェクト [※]p61）に書かれているように、第1項目の実験をまず実施して収穫後よりむしろ収穫前の発生条件を検討すべきであろう。そのため、本菌の栽培圃場における密度、飛散状況、発生地または発生植物遺体について季節的に調査すべきである。また、同時にトウモロコシの各部位、果実、雌・雄花など、成育期毎に体内・外別に分布密度を調べる必要がある。この調査によって、いかなる方法で貯蔵した場合に発生が多いかを検討すべきである。現在までに考えられているのは、貯蔵条件や、種子水分とアフラトキシン含量との関係のようであるが、それらは後の問題で、まず本菌が、いつ、どこに、どれ程付着しているのかを解決するのが先決である。要は圃場でいつ感染（潜在的に）するかを明らかにすべきである。この問題を解決するに当たっては、上述の実験のほか、以下の試験を行ってみよう指摘した。

まず実験区として3区を設定して行う。すなわち、①は自然のままのもの（Control）②はトウモロコシの開花前から（受精は人工的に）果実にかバーをして本菌が飛来しないようにして育てるもの、ただし、かバーを1カ月毎に取り去っていく（Controlとして全期間かバーしたものを作る）。③実験的に本菌胞子を生育各期に各部位に接種するものである。

以上の試験によってえた種子についてアフラトキシンがいかなる実験区で多いかを定量してみる。この実験について2カ年程実施すれば、計画の第1項目の問題が解決されるのではなかろうか。収穫・貯蔵時の機器も検査する。

この実験に平行してアフラトキシンの迅速定量法を行えばよいと考える。この実験結果に基づいて原因が解明されれば、当然のことながら、第3項目についての問題は氷解するであろう。

※〔註〕

本報告書で、本文中にフェーズⅡプロジェクトとして頁を入れたものは下記のテキストである。

" Tentative Implementation Program for the Strengthening Research Activity (Phase II) Project at Kasertart University, Thailand. Issued on December, 1987. "

Ⅸ. その他設備, 備品に関する所見

1) 既設機器の故障について

下記の機器が故障または使用できない状況にあるので, フェーズⅡにおいてはそれらのメンテナンスまたは新品との取り換えについて考慮されるとよいと考える。

(i) Automatic Bomb Calorimeter (島津 CA-3) 故障

(ii) 日立超遠心機 (85P) バキュームメーター故障

(iii) サポール超遠心機 (U.S.) 故障 (ローターはあっても日立には使用不能)

(iv) アミノ酸アナライザー (日本電子) カラム破損

(v) オープン (ISUZU BL-13S)

温度調節器働かず (6台分, 搬入当初から)

(vi) 真空凍結乾燥器 (東京理化, EYELA)

2台のうち1台故障, 真空ポンプの故障のため凍結せず, リークは調べたようである。

(vii) 透過型電子顕微鏡 (JEOL 100S)

80kV以上がでない, その他クーリングシステム不良, パーツ不良。

(viii) スキャン電子顕微鏡 (JEOL 35CE)

1万倍以上ピント調整不能, 不安定画像

(ix) 写真用エンリジャー

以上の通りであるが, 手入れ不足はあるとしても, 今後納入の折はアフターケアのよい業者のものを入れるべきである。

2) 今後必要と考える機器

(i) アイスメーカー (フレーク用)

蛋白・核酸などの実験を行うのに必要

(ii) 写真用エンリジャー (日本製のものがよい)

(iii) 乾熱乾燥器 2台 (温度調節のできるもの)

(iv) オートクレーブ 2台 (なるべく大きいものと小型のもの, 電気用がよい, 現在1台しか使用できない, とくに病理にあるのは, プロパンボンベ用で, パッキングなく危険である)

(v) 超遠心機 1台 (日立) とスイングローター 13ml用と33ml用 2コ。使用頻度が高い上, 現有のもののメンテナンスが悪い。

(vi) 低速遠心機 2台 (5,000 rpm以下, 低温用)

このようなものは当然なければならないが, ないので至急納入すべきである。

(vii) Continuous flow cell set

デングラ用チューブをそのまま吸収光でバンドをチェックするのに不可欠。

(viii) アミノ酸アナライザー用標準試薬

バイテク用研究に必要。

(ix) Deep freezer 1～2コ, とりオフィライザー1～2コ

現在ストッカーが満杯のため追加必要。

(x) 微生物培養用インキュベーター 4コ

20, 25, 28, 30℃位の実験に必要。

(xi) 温・湿度計(レコーダー付) 3コ

(xii) 除湿器 1コ

(xiii) 貯蔵用冷蔵庫(以下に示す, 部屋の改造がある場合には不用) 2コ

以上のものは, プロジェクト1, Topic3のBiotechnologyの研究を推進するためには是非必要と考える。

3) 部屋の改造

(i) Plant Pest Clinic and Quarantine Laboratoryの改造

現在の部屋は40～50年以前の機能しかもっていない。外の廊下側のドアを一つにして, ドアをしめ, その内側に, 無菌室(除菌予備室付, エアフィルター, 殺菌灯付), 低温貯蔵兼実験室(0～5℃, control), 培地調製兼殺菌室, 培養室(15℃定温, インキュベーターをこの中に入れる), 計測室などに分けて改造する。

(ii) Biochemistry Laboratoryに低温実験室とRI用実験室を作ること。

低温室と貯蔵室がないため冷蔵庫の要求が多いと考える。また, RI実験をすることが多くなるにも拘らず, RI実験室とRI貯蔵庫(廃棄物処理を兼ねる)が設置されていないので設置が望まれる。

4) 外国図書の購入

研究結果を投稿しないのは, 外国雑誌がないことも原因の一つと考えられる。できれば専門分野毎に少なくとも一つは入れておくべきである。

X. 一般的感想

一般的な所見としては以下のものを挙げておく。

- 1) 研究計画者と実験リーダー, 補助者のコミュニケーションが少ない。もっとリーダーシップを発揮して欲しい。
- 2) 機器のみに頼ることなく, 創意工夫することを指導すべきである。
- 3) 1988年の研究結果をシビアーに評価し, 研究の進捗しないトピックについては協力を打ち切るようにしてはどうかと考える。
- 4) プロジェクトIについて横の連絡を密にする。とくにTissue culture, Breeding,

Biotechnology など一つずつのトピックスより大きい研究班とする。また、アフラトキシンについては各専門分野が参加して大きいプロジェクトチームを作ることが必要である。

- 5) バイオテクノロジーのエキスパートとして1988年中に派遣できるのは10月以降が望ましい。8月19~29日まで京都で国際学会が開催されるため。現在、池上、古沢氏などが候補者としてあげられているが、両氏とも不可能である。京大農植病研から派遣することも無理と考えるので、卒業生の中から適人者を選びたい。
- 6) CLGCで機械の故障が多いのは停電が時々起こることによるようである。停電時の対策を講ずること。使用機器のスイッチオフの徹底。安全装置付きの機器の購入。停電後送電されたときの電圧調整用スタビライザーの購入・設置。研究者の訓練など。
- 7) JICAからエキスパートとして日本人がバイテクまたは遺伝子工学の指導を行うときはとくに実験機器が揃っていないといけない。例えば超遠心器、デンシティグラジェント用セット、電気泳動装置など。また、実験用に消耗品費として1カ月100万円位を必要とする。これはタイ側から日本に研修する場合も同様で、消耗品費の補助がなければ受入れは困難である。通常の経費だけではまかなえないから。
- 8) 聞くところによればタイでも工業化が進んでいるが、農業振興と工業化とをどのように考え、JICAは援助しようとするかを、5カ年間の計画で討議しておく必要がある。
- 9) 1月15・16日の2日間、Dr. Sinchaisri の案内で、チェンマイのKings Project 圃場を見学した。アヘン追放の将来計画として、農民定住のため果樹・野菜による農業を振興させようと努力していることについては敬意を表したい。しかし、折角の苗木生産圃場における病害の発生が多く、多いときは90%以上被害をうけている。病理関係者の巡回指導に期待するとともに本プロジェクトの発展を祈るものである。

專 門 家 名 : 山 本 浩 文

指 導 科 目 : 植 物 組 織 培 養

派 遣 期 間 : 88. 7. 10 ~ 88. 8. 31

所 屬 先 : 岐 阜 藥 科 大 学

1 業務状況報告

昭和63年7月10日から8月31日まで、タイ国カセサート大学研究協力計画フェイズⅡにおける植物細胞学短期専門家として、カセサート大学カンペンセンキャンパス内CLGCに派遣される。

出発前の打ち合わせにおいては、プロジェクトⅡ、トピック1、サブトピック3、“Papain production by papaya cell culture”において研究に用いる細胞系の確立及びパパインの検出方法の技術指導が任務であったが、着任後のカウンターパートとの打ちあわせにより以下のように追加変更される。

- 1) パパヤ培養細胞からの酵素の抽出及び活性測定
- 2) パパヤ細胞系の確立及びパパイン生産
- 3) 植物細胞培養系による物質生産
- 4) トマト葉肉細胞由来のプロトプラスト培養
- 5) 等電点電気泳動

これらの指導内容は以下の通りである。

1) パパヤ培養細胞からの酵素の抽出及び活性測定

抽出方法に関しては、マニュアル(別添1)を作製し、それに従って指導した。また酵素活性の測定に関しては、カウンターパートがすでに他の酵素を用いて経験していたため、何ら問題なくスムーズに行う事ができた。実際の実験では細胞系の確立がまだできていないために、デモンストレーション及びカウンターパート単独による実験各1回を行なうにとどまったが、培養細胞より酵素活性を検出することにより、今後異なる細胞系統間、異なる培養条件下における酵素活性の比較検討により多くの結果が得られるものと思われる。しかし、現在培養細胞中で生成されるプロテアーゼはパパインと同一の作用機作を有する別種の酵素である可能性が高く、免疫学的手法、生化学的手法による確認同定が必要であろう。また、今後、得られた酵素の生産性向上に努めるのか、あるいは、あくまでもパパイン生産を目的とするか、タイ側研究者内において十分な討議がなされておらず、今後検討を要すると思われる。

なお、今回の実験結果は別添2に示す。

2) パパヤ細胞系の確立及びパパイン生産

3) 植物細胞培養系による物質生産

項目2)、3)は実質上同じであるためまとめて述べる。

カウンターパート側から、誘導したパパヤカルスの継代、さらには振盪培養系への移行が不可能である事が指摘され、これらへの対策の指導を求められたが、時間的制約より十分な指導はできなかった。即ち、通常カルスの誘導には1~2カ月、培養系の確立には半年~1年、振盪培養系にはさらに半年が必要であるとされるが、派遣期間が約2ヶ月であったため、具体的な対応がまったくできず、口頭による指示のみにとどまった。また実際上の対応においても、細胞系の状態を見ながら臨機応変に行なう必要があり、現行の短期専門家のシステムによる十分な指導は極めて困難であると思われる。すでに細胞系を有する日本の研究機関へのタイ側研究者の長期派遣による技術習得、もしくは長期専門家による指導が望ましいと思われる。

なお、パパイヤ培養細胞によるパパイン生産は、植物細胞培養系における物質生産において最もむずかしいとされる例の一つであり、また、もし培養細胞によるパパイン生産が可能になったとしても、その生産性を極めて現実的に眺めた場合、コスト的に割が合わないというのが実状であろう。従って学術的な見地から研究を行なうのでなければ、クローン増殖による高生産品種の育種、あるいは遺伝子操作によるウイルス病抵抗性品種の確立等によるパパイン生産性向上を試みる方が良いと思われる。

また、他の化合物生産に関しては、現在の所、培養細胞による物質生産は偶然に左右される部分が大きく、計画的に研究を行なえないため、材料となる植物を一種類に限定するのではなく、多数の植物による検討を同時に行なうべきであろう

4) トマト葉肉細胞由来のプロトプラスト培養

この項目は当初の要請にはなかったものであり、準備をまったくしていなかったため、具体的な指導ができず、概論の説明のみに終わった。即ち、プロトプラストの培養条件は植物によってまったく異なるものであり、培地成分、培養方法、プロトプラスト濃度等を変更することにより試行錯誤を行ないながら条件の設定を検討していく必要がある事を指摘し、2、3の培養方法の紹介及び細胞の生死の判別方法の指導を行なった。また、このプロジェクトはトマト耐病性品種の作製が目的であるとのことであったのでプロトプラスト培養系の確立のみならず、トマトカルスからの植物体再生系の確立についても検討を行なうよう指導した。

なお、プロトプラスト培養に関して、カウンターパートはすでに技術そのものを習得していると判断され、今後関連文献の収集による培養条件等の情報収集及び実地への応用検討が必要であろう。

5) 等電点電気泳動

この項目も当初の予定にないものであり、関連文献を至急日本より取り寄せたが、試薬の入手が間にあわず、原理の説明及びマニュアル作製による指導にとどまった。しかし、タイ側研究者はすでに通常の電気泳動による分析技術は習得しており、試薬入手により、まったく問題なく研究が行なえる状態である。(マニュアルは別添3)

2 CLGCにおける講演要旨

8/24 CLGCの希望により、植物細胞培養による物質生産に関し約1時間にわたって講演を行なった。内容は京都大学薬学部において行なわれた物質生産と細胞の分化及び細胞内機能分化との関係に関するもので、培養細胞系が二次代謝系の生理学的解明に応用できる事を示したものである。分野が違いすぎるために理解できないのではないかと懸念したが、講演終了後要旨及び関連文献の複写を求められ、十分に話題提供ができたものと思われる。

3 感想

出発前、タイ側研究者について“のんびりしている”という風に聞いていたが、実際には皆熱心で知識欲も深く、短期間の間にできるだけ多くの事を吸収しようという態度が見られ、彼らの潜在的能力の高さを示すものと思われた。

しかし、一部において本来の研究目的を忘れていたり、データの整理・解析を行なわない、また、本

来研究者が自分で解決すべき問題点の解答を直接専門家に要求するあるいは依頼するという例も認められた。

個人的にはこれらはタイ側研究者の研究活動の未熟さによるものではないかと思う。即ち、研究目的の設定、方向づけ等に対する十分な考察、各研究段階における試行錯誤、及びその結果のフィードバックといった一般的な研究活動をほとんど経験する事なく技術指導を受けるため、必要以上に専門家に依存するという結果を生じるのではないかと思われる。

従って、今後単なる技術指導のみならず、タイ側研究者及び次期指導者の啓蒙を目的とした指導を行ない、これらの問題を解決する必要があると思われる。

日本側にも問題がないわけではない。第一に赴任前における情報不足があげられる。私が指導したサブトピック3に関しては、日本において聞いた状況と、タイにおける現状にかなりの差があり、用意した携行機材の中には不要なものがあり、また、不足しているものも多かった。また報告中に述べた、当初予定していなかった指導内容に関しても、あらかじめ情報があれば十分に対応できる内容であっただけにまことに残念である。

短期専門家の場合、赴任期間が短いために出発前、特に機材準備前の段階で十分な情報交換を行なっておかないと、現地での任務遂行に大きな支障をきたす。今後専門家派遣要請の段階で、タイ側から研究報告書（状況を把握するためのものであり、成果の有無にかかわらず）、希望、要望等の提出、さらに専門家から試薬及び器材の確認等、JICA当局、専門家、タイ側研究者の三者間でスムーズな情報交換が行われるよう希望する。

もう一つの問題点は、携行機材の納入に時間がかかるという事である。これはタイ国通関における問題であるが、発送側、受取側相方にも問題があると思われる。専門家着任後一週間以内に指導が開始できるよう発送、受取相方の配慮を要請する。また、今後研究目的から考えて冷蔵品、冷凍品の輸送が多くなると思われるが、これらの輸送保管に関しても一考をお願いしたい。

なお、CLGC内に、報告書作製のパーソナルコンピューター、ワードプロセッサーや、英和、和英、生物学、理化学、生化学辞典等、専門家がひんばんに使用する機材の設置を希望する。

專 門 家 名 : 永 富 成 紀

指 導 科 目 : 遺 傳 資 源 保 存

派 遣 期 間 : 88. 11. 25 ~ 88. 12. 24

所 屬 先 : 農 林 水 產 省 生 物 資 源 研 究 所 放 射 線 育 種 場

1 業務状況報告

1 研究目的

昭和63年11月25日より同年12月24日まで1カ月間にわたり、タイ王国カセサート大学キャンペンセンキャンパス（以下ku-kpsと略称）内、中央研究所（Central Laboratories and Greenhouse Complex - 以下CLGCと略称）において実施中の、「タイ・カセサート大学研究協力phase II計画」に参加するために、短期専門家として派遣された。

今回の研究協力分野は、研究協力プロジェクト1「作物改良のためのバイオテクノロジーと育種」の中の、Topic2「遺伝資源保存」であり、さとうきびの野生種および近縁属の探索と収集について、技術移転をおこなった。

2 さとうきび野生種の探索の意義

サトウキビ属（*Saccharum* spp.）は、発生の起原には2つのセンターの存在が明らかにされている。1つは栽培種の原種（*Saccharum officinarum*）で高貴種（noble cane）と通称されるが、ニューギニアに第1次分布のセンターがあり、スンダ列島、マライ半島を経て、その一部はタイ国にも食用蔗（Chewing cane）の用途で栽培種として分布がみられている。

他の1つは、サトウキビ野生種（*Saccharum spontaneum*）があり、インドのインダス川流域を起原として、西南アジア、東南アジア、中国、一部は日本にまで分布域を拡げており、タイ国も2次分布の領域内にある。

近代の交雑育種による栽培品種群はすべて高貴種と野生種の種間交配に由来するものであるが、少数の祖先種を基盤とするために、血縁度が高くなり、種々の問題を生じているのが現状である。それは、栽培品種間の交配からは増収性が限界に達し、また世界的な規模で病害虫が発生したり、不良環境に適応力が乏しくなるなどの現象が各国ともに問題となっている。

以上の問題を克服するには、経済品種に新遺伝質を導入する必要があり、有用な遺伝質の探索と収集が重要な課題として取り上げられている。

期待される遺伝特性として、一般には、高貴種には高糖性、多汁性、大茎などの栽培特性がある。野生種と近縁種には、病虫害抵抗性、耐旱ばつ性、耐湿性など種々の不良環境に対する耐性が期待されている。

3 遺伝質収集の方針

今回の収集の重点は、サトウキビ属を最優先とし、次いで近縁種の中でもさとうきびと近い形態を有するものを優先して収集することにした。サトウキビ属では、タイ国全土に分布し固有の風土に適応し多様な遺伝変異を包含する*S. spontaneum*を重視し、近縁種では*Erianthus*属を重点に採取することにした。

探索地域としては、メコン水系に属し、標高差の大きい北部地域を最優先とし、ついで低湿地帯の中部、丘陵地帯の東部を中心に収集をおこなった。

収集にあたっては、異なる地域生態の変化に伴って、野生種や近縁種の形態がどのように変化するか、その結果、育種に有用な遺伝質をいかに広く集めうるかを念頭に置きながら実施した。

この収集の方針は、当地域の探索の経験をもつDr. KasemやMr. Jarayとの意見の一致をみて、彼等のスケジュールに沿って行動し、収集現地において、適宜技術上の示唆を述べた。

4 収集の方法

収集した標本には、現場での記録が不可欠であり、最短時間内に必要最少限の項目の記録を完了しなければならない。従来の収集では記録がなかったので、収集野帳の必要性を説明し、収集方法、記録方法の技術移転をおこなった。収集野帳の様式は、わが国でさとうきびの野生種の収集に使用した様式とIBPGR（国際植物遺伝資源委員会）の様式を併用して、タイ国の実態に合わせた収集記録様式（別紙1）と集計様式（別紙2）を作成し、協力者に提案してこれに従って項目の記載を現地でおこなった。

記載項目は、収集番号、種属名、地方品種名、収集材料、収集地点、標本特性(病虫害、生態、地勢、地質、排水状況、塩類集積、共存植物、標本特徴、その他)、写真番号、保存場所等である。

その他、全標本について、収集番号プレートを掲げ、写真撮影を行なった。

標本の採取は、栄養茎に芽子を有するサトウキビ属は茎を5～6茎採り、*Erianthus*は茎と地下茎の双方を収集した。

5 探索経路

探索は次の3経路に分けて実施した。（別紙3参照）

1) 中部地域（12月2日）

Kamphaeng Saen→Ban Pong→Photharam→Damnoen Saduak→Nakhon Pathom
→Kamphaeng Saen

2) 東部地域（12月6～8日）

Bangkok→Chonburi→Trat→Rayong→Bangkok

3) 中北部地域（12月10～16日）

Bangkok→Nakhon Sawan→Chiang Mai→Ang Khang→Chiang Mai→Chiang Rai→Chiang Saen→Mae Sai→Chiang Rai→Chiang Mai→Lam Pang→Sukhothai→Kamphaeng Phet→Ayuttaya→Bangkok

6 収集標本

全収集標本は別紙4に示すとおり123点であり、地域別の内訳では中部15点、東部47点、中北部61点であった。

種属別では、*S. spontaneum* 86点、*Erianthus* spp. 27点、*S. officinarum* 4点、*Sclerostachya fusca* 2点、*Thimidia australis* 1点、*Thysanotus maxima* 1点、未同定種2点であった。

これらの標本は今年度収集された49点に加えて、88-50-88-172の収集番号を附して、KPS Campus内に設置予定のさとうきび遺伝質保存園（1989年JICA予算にて新設予定）において保存されることに

なる。

7 遺伝資源の分布状態

さとうきび野生種はインドを起源として、恐らくはビルマ山岳地帯からメコン川水系を經由して、一部がタイ北部からメナム水系を経てタイ平原に南下したとの仮説を立ててみた（別紙3参照）。

今回の限られた範囲の情報では、タイ国最北部Chiang Raiを中心とする盆地はメコン水系に属し、ラオス国境に沿ってメコン川が東進するが、この地域が国内では最も野生種の密度と変異高かった。この地域には出穂時期、茎の変異が幅広くみられ、水田地帯の水路、河川敷には密度の高い群落が全域で観察された。

Chiang RaiとChiang Maiの間には、熱帯自然林に覆われた山脈が東西に伸び、メコン水系とメナム水系の分水嶺となり、Chiang Mai以南の地域はすべてメナム川支流として南下する。この地域では河川敷の限られた空間に野生種の群落が発達するが、出穂期は同一で変異は最北部に比べて狭いとみられた。この北部地域は山脈をぬって多くのメナム支流が南下しており、各支流ごとに野生種の変異が異なる可能性も高く、今後の探索の要点になろう。Chiang Maiの盆地は水田地帯が開け、灌漑水路に沿って並木状に野生種の群落が発達し、早期出穂型と晩期出穂型の2型が分布していた。

更に南下し、Sukhothai地域から南は平原地となり、湿地帯が多くなり、沼沢地には野生種の大群落が発達する。早期と晩期出穂型があるが、晩期型が優占種となる。本種は極長太茎で極めて強勢ではあるが、茎内部には髓孔が発達し、Water floatingの条件下に極めて適応したタイプと考えられる。これより以南のバンコックまでの平野部にも、湿地適応型が大きな群落を形成していた。しかし水田や圃場の基盤整備が完成した地域には群落もほとんど姿を消し、開発に伴って貴重な遺伝質が永久に失われる事態となり、早急に遺伝資源を収集する必要性を感じた。

東部地域は丘陵地帯で、メナム水系とは独立して河川も短かく、野生種の分布は極めて少なかった。この地域には塩類集積土壌も分布しており、十分な調査を行えば耐塩性の特性を有する貴重な遺伝質も期待されると思われた。

高貴種 (*S. officinarum*) は各地域の民家の庭先に食用蔗、観賞用、または薬用として栽培されており、純粹の高貴種のみならず交雑品種も栽培されていた。今回は従来収集されていなかった高貴種のみを対象とした。収集標本には“Oy dum”と称する紫色茎で中肋や葉身にも紫色を呈するタイプと“Oy hok”と呼ばれる高貴種を収集した。なお、民家、とくに農村部では高貴種が温存され、種々の品種群がみられるので、遺伝資源の保存園と思える程であった。

*Eriathus*は、全域の平地から丘陵地帯に至るまで広い範囲で分布がみられ、普遍的な属でさとうきび野生種より分布の歴史は長いものと考えられた。変異は出穂時期、花穂の色、茎や葉のサイズ、葉鞘の毛群などに幅広くみられ、一般に生育が旺盛で、茎の太さや伸長性の良い株が収集された。

*Sclerostacuya*は中北部の丘陵地帯で僅かに分布がみられた。特性はさとうきび野生種とススキ属 (*Miscanthus* spp.) の中間型を呈し、茎は細く海綿組織が発達し、節には芽子が存在するが根茎を欠く点で、ススキ属に類似する。日本の山野に普遍的に分布するススキ属はタイ国では全く分布がみられなかった。

8 収集遺伝質に期待される特性

*S. spontaneum*の顕著な標本としては、ビルマ国境標高1,500m Ang khang附付と標高960m 地点に生育していた極長太茎の強勢な野生種が収集された。収集番号88-122、88-123、88-126がそれぞれ該当し、低温伸長性、多収性の遺伝質が期待され、育種利用の観点から、世界の遺伝質の中でも第1級の素材と考えてよい。

長太茎で強勢なSpontaneumは湿地帯からも発見され、88-54、88-59はPhotharam、88-114はNakhon Sawan、88-166はSukhothaiのそれぞれ沼沢地に生育し、Water floating条件下で旺盛な生育を遂げる特異な遺伝質である。88-114はとくに茎の全長7.5 mにも達した。タイ国中部の平野部に栽培されるさとうきびは湿害のため生育不良や枯死株が多く観察されるが、栽培品種にこれら野生種からの耐湿性の遺伝質が導入できれば、湿害も克服でき、またさとうきびと水稻との輪作や間作も可能となり、生産性の向上に寄与できよう。一般にさとうきびは乾燥には耐える作物であるが、湿害には弱い。タイ国の多湿条件に適合したこれらの遺伝質は、世界的にみて貴重な育種素材となろう。

現在、地球規模で蔓延しているサトウキビ病 (*Puccinia* spp.) はタイ国の栽培圃場でも罹病しているが、野生種には本病の発生は極めて少なく、抵抗性の遺伝質が期待される。Erianthusには、サビ病徴を呈する標本がみられ、また黒穂病 (Smut disease) の発生がみられたが、さとうきびの病原との共通性を確認する必要がある。

高貴種は高糖性、多汁質および太茎などの遺伝質が期待され、自然出穂をみる標本もあり、野生種の特性の補完関係にあるので、今後の育種素材として利用性の高い素材と考えられる。

9 今後の問題点と方向性

1) 今後の探索活動

今回の探索の結果、さらに精査の必要な地域としては、野生種の起源に近いビルマ国境の山岳地帯があり、さらにメコン川流域に沿ったラオス国境地帯があげられる。この地域には遺伝質の密度、変異性ともに高く、詳細な探索によって有用な遺伝資源が期待できよう。次には、北部のメナム支流に沿った水系ごとの探索と東部塩類集積土壌地帯の精査を挙げたい。

今回の未踏査である東北部と南部半島地域が残されている。

2) 遺伝資源の保存

遺伝資源の収集は一定期間をかければ可能であるが、問題は保存にある。保存は永久に継続すべき連続作業であることを認識する必要がある。種子保存が可能な作物は保存施設があれば半永久的保存ができるが、栄養体作物の保存は年々栽培管理や改植を要し、労力や経費も累積すれば莫大な額になる。したがって、栄養体の保存は永久保存に耐える保存施設と保存すべき材料の厳選が必要である。

従来、FAOの援助によるタイ国内のさとうきび遺伝質収集に2回のミッションが派遣され、約250種余の標本が収集されたとの報告がある (Sadakorn, 1982; Sreenivasan & Sadakorn, 1983)。しかし、保存体制の不備のため多くの標本が失われた。安定した保存園の設置は不可欠であり、1989年に完成予定のJICA援助によるさとうきび保存園は、遺伝質の永続的保存に役立つものであ

る。

3) 遺伝質の分類

標本の収集は現地でも選択を行うが、なお類似の遺伝質の重複があり、永久保存に備える標本の選別が必要である。そのためには、収集標本を同一条件で栽培し、各種の形質を調査して標本を類別する。類似した材料の類別は多くの場合人智を超え、電子計算機の機能を活用した統計的手法が合理性をもち、大きな助けとなる。次回に機会があれば、この分野での技術移転が必要かと考えられる。

4) 遺伝質のデータベース化

遺伝質の究極の目的は保存ではなく、育種への利用であり、それには品種改良の必要に応じた遺伝質が即座に選別できなくてはならない。各標本の形質や特性を調査し、データベース化する作業が重要である。今後、データに要する調査形質の選択、調査方法、形質の数量化、プログラミングなどの技術移転を要すると思われる。

5) 遺伝質の特性検定

上述の遺伝質の分類やデータベース化とも一部共通するが、育種上特定形質が要求されることがある。例えば、病害抵抗性、耐旱ばつ性、耐湿性、耐塩性など、外見上は認知できない生理的形質は、特定の条件設定や検定法を適用することによって、有用遺伝質の存在を明らかにできる。

今後、タイ国のさとうきび育種に要する特性の検討と検定方法の開発が必要になろう。検定効率を向上させうるバイオ技術の導入を含めて、今後の課題に挙げられる。

10 講演の概要

12月19日(月)、CLGC会議室において、KPSキャンパス、バンケーンキャンパス、農務省試験研究機関からの研究スタッフと学生約50名余りが参集して、次の演題で講演を行なった。なお、日本側スタッフはプロジェクト合同委員会が併行して開催中のため、出席はできなかった。

演題は「組織培養を利用した熱帯作物の放射線育種」として、試験材料はサトウキビ、パインアップル、パパイヤ、キク、チャなどタイ国でも重要作物をとり上げ、従来の放射線育種法と対比しながら組織培養による放射線突然変異の拡大をはかる方法について、スライドを用いて講演した。組織培養を用いた放射線育種は、交雑による品種改良が難しい作物に適した改良方法であり、カルス培養により変異の頻度も種類も大きく拡大できる点では、とくに熱帯作物に適した方法であることを説明した。

また、今回の研究協力の課題に関して、「日本のさとうきび野生種利用の育種方法」について、さとうきび野生種の探索、収集、分類、交雑方法、高貴化、選抜方法、育種年限などをスライドを使用して説明を行なった。この分野では外国より10年間ほど先に育種事業を進めてきているわが国の研究状況は、方向性を得るのに役立ったとの話であった。いずれにしても、さとうきび野生種の育種利用は最短期間に完成しても15~20年間を要し、将来にわたる研究計画と継続性が不可欠なことを説明した。

午前中2時間を講演に、午後2時間を質疑応答として、熱意ある質問が多く、この研究分野への関心の高さが伺えた。

11 感 想

さとうきび遺伝質の探索と保存は、豊富ではあるが未知数の遺伝資源を有するタイ国として重要かつ緊急な課題である。野生種の起原に近い位置にあって、ビルマ、ラオス、カンボジアなど近隣諸国が共に国情不安で、探索活動も困難な情勢から、国際的にもタイ国内の探索の要望が出されていた。今回の探索により、ビルマ国境沿いまで踏査でき、有望な標本が多数得られ、短期間の滞在にしては期待以上の成果であったと考えている。

これら探索活動において、現地スタッフの積極的に活動し、当方の準備した技術も有効に活用してもらい、有意義な滞在であった。収集記録や標本など今回の成果はすべてタイ側に引渡し、有効に育種事業に役立てられるであろう。

カウンターパートのDr. kasemは、国際甘蔗技術者学会 (I.S.S.C.T.) のタイ国会長を務め、10年来の知己を得ていたが、今回の旅行では公私にわたり懇切なお世話をいただいた。協力者のMr. KriukはCLGCのDirectorを勤める多忙な役職にありながら、終始探索に係っていただき、同様にご厚情をいただいた。また、御専門は作物の放射線育種で、当方の現研究分野でもあることから、タイ国の放射線育種研究について得る所が大きかった。協力者のMr. Jarayは農務省勤務であるが、過去のさとうきび探索を行なった経験と植物分類学の専門的観点から、多くの示唆を得た。

プロジェクトに関する感想について、当方の関係した限りではタイ側スタッフは教職、研究者、管理者など多忙な役職にかかわらず、十分な対応をいただいたことを感謝したい。

なお、KU-JICAプロジェクト全体を通じてみれば、課題が多岐にわたり、各研究者が数課題にも関連するなど、時間的にも労力的にも十分な対応が不可能な状況にあるように伺えた。プロジェクトの効果的な推進のためには、各年度における実施課題の厳選と各担当者の責任分担を明確にする必要があるかと思われた。

技術協力をする立場からすれば、研究協力内容の具体化と年次的計画を可能な限り明らかにしていただければ、もっと効率的な対応ができると思われる。

12 参考文献

1. Sadakorn, Jaray(1982) Exploration and collection of Saccharum in Thailand. IBPGR Regional Committee for Southeast Asia Newsletter;6(4)5-7.
2. Sreenivasan, T.V. and Jaray Sadakorn(1983) Exploration and collection of Saccharum germplasm in Thailand --Phase II. IBPGR Regional Committee for Southeast Asia Newsletter;7(4)7-10.
3. Sookthasan, Kasem(1988) Germplasm collection of Sugarcane. Progress Report of Research Activities --The strengthening research activities at Kasetsart University Phase II(1987-1992). Kasetsart University, Thailand and Japan International Cooperation Agency.

FIELD COLLECTION FORM (Sugarcane)

K.U.-JICA Project,

COLLECTION No.: _____ DATE: ____/____/____ PERSON: _____

GENEUS and SPECIES: S. spontaneum, S. officinarum, S. sinense,
Saccharum sp. Erianthus, Sclerostachya, Others()

LOCAL NAME(CULTIVAR NAME): _____

SAMPLE: seed, vegetative, indiv, quantity _____ pieces herbarium: yes no

STATUS: cultivar, weed, wild, market, farm, institute(

landrace pure-line mutant improved() / lowland rainfed upland _____

LOCALITY: _____ / _____ km. of _____

altitude: _____ m

CULTURAL PRACTICES: _____

USAGE: _____

NOTES

1. DISEASE and PESTS: rust, yellow spot, downey mildew, red rot, borer, Others()

2. TOPOGRAPHY: swamp, flood-plain, plain, undulating, hilly, mountainous _____

3. SITE: level, slope, summit, depression 4. TEXTURE and STONINESS _____

5. DRAINAGE: poor, moderate, good, excess 6. Salinity: none, moderate, excess

7. ASSOCIATED PLANTS: _____

8. CHARACTERISTICS: plant height _____ tassel length _____ tasseling date _____

_____ leaf colour _____ leaf size _____ stalk colour _____

stalk size _____ stalk shape _____ Pithiness _____)

spongy _____ juiciness _____

9. FARMER'S NAME and ADDRESS _____

10. PHOTO NO. etc.: _____

11. ACCESSION NO. _____ COL. NO. _____ LOCAL NAME: _____

12. SITES OF CONSERVATION

K.U.

Word Collection

Others

COL. NO

COL. NO.

COL. NO.

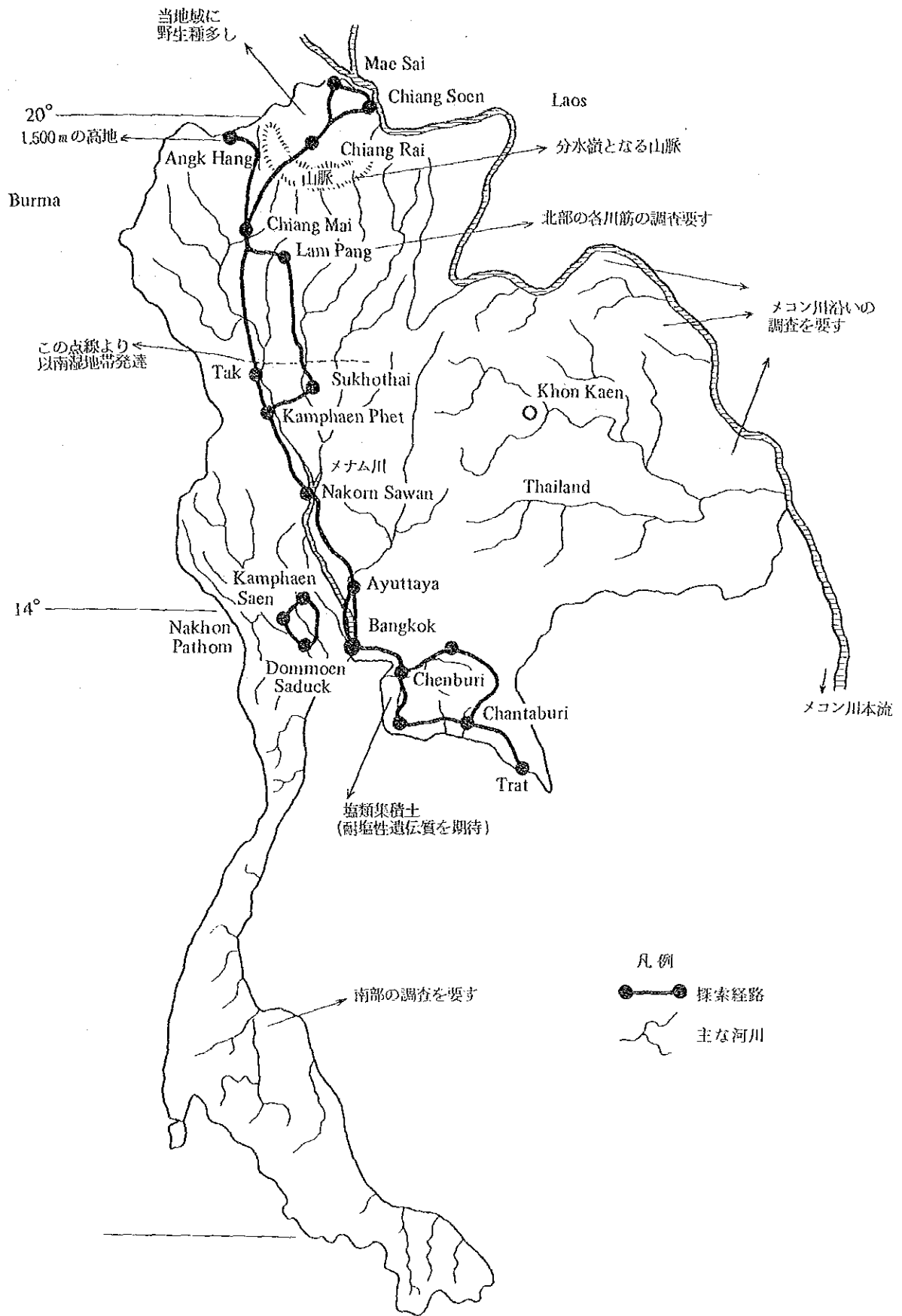
COL. NO.

別紙 2. : さとうきび選伝質集計様式

Crop : Sugarcane LIST OF COLLECTED MATERIALS (K.U.-JICA Exploration on Sugarcane Germplasm Collection in Thailand 1988)

Collection No.	Date Month	Genus & Species	Cultivar local name	Sample 1)	Status 2)	Locality (Pr. Vill., km) & Altitude (m)	Tasseling date	Cultural practice	Usage	Diseases & pests	Topog- raphy 3)	Site 4)	Drain- age 5)	Plant height	Character- istics	Notes Name & address, etc.

- Notes : 1) Sample: (1) Stalk, (2) Stool, (3) Seed
2) Status: (1) Wild, (2) Weedy, (3) Landrace, (4) Improved, (5) Breeder's line, (6) Others
3) Topography: (1) Swamp, (2) Flood plain, (3) Plain level, (4) Undulating, (5) Hill, (6) Mountainous, (7) Others
4) Site: (1) Level, (2) Slope, (3) Summit, (4) Depression
5) Stoniness: (1) None, (2) Low, (3) Medium, (4) Rocky



別紙3：タイ国内のさとうきび遺伝資源探索経路
(1988年 K. U. - JICAプロジェクト)

別紙4：タイ国におけるサトウキビ遺伝資源の収集標本の内訳
(1988年K.U.-JICAプロジェクト)

地 域	収集月日	収集番号	全収集 点数	植 物 学 的 分 類								
				Spont	Offici	Erian	Sclero	Thimidia	Thysomo	Others		
<中部地域>												
Ban Pong	12月2日	88-50~64	15	14	-	1	-	-	-	-	-	-
<東部地域>												
Chantaburi	12月6日	88-65~82	18	9	-	7	-	-	-	-	2	-
Trat	7日	88-83~93	11	1	-	10	-	-	-	-	-	-
Rayong	8日	88-94~111	18	14	-	4	-	-	-	-	-	-
		(小計)	(47)	(24)	(0)	(21)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)
<北部・中部地域>												
Nakhon Sawan	12月10日	88-112~118	7	6	-	-	-	1	-	-	-	-
Ang Khang	11日	88-119~128	10	7	-	1	-	-	1	1	-	-
Chiang Mai	12日	88-129~134	6	4	-	2	-	-	-	-	-	-
Mae Sai	13日	88-135~153	19	15	1	2	-	1	-	-	-	-
Chiang Rai	14日	88-154~159	6	3	3	-	-	-	-	-	-	-
Sukhothai	15日	88-160~169	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Ayuttaya	16日	88-170~172	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		(小計)	(61)	(48)	(4)	(5)	(2)	(1)	(1)	(1)	(0)	(0)
		総計	123	86	4	27	2	1	1	1	2	2

專 門 家 名 : 位 田 晴 久

指 導 科 目 : 育 種

派 遣 期 間 : 88. 12. 6 ~ 89. 1. 13

所 属 先 : 京 都 大 学 農 学 部

業務状況報告

1. 研究目的

昭和63年(1988年)12月6日より平成元年(1989年)1月13日までの約40日間にわたり、タイ王国カセサート大学カンペンセンキャンパス内 中央研究所 (Central Laboratory and Greenhouse Complex, CLGC) において実施中の、「タイ・カセサート大学研究協力フェイズⅡ計画」に参加するために、短期専門家として派遣された。

今回の研究分野は、研究協力プロジェクト1「作物改良のためのバイオテクノロジーと育種」のトピック4「育種」であり、育種計画、育種素材の評価選定法、栽培管理法、交配法について、専門的な提言及び具体的な技術の紹介をした。また、品種間差異同定法としての電気泳動による解析技術の指導や、特性検定のための標準培地栽培装置の試作指導も行った。

2. 業務状況報告

別紙英文のとおり。

3. CLGCに於ける講演

① Varietal Classification of the Japanese Bunching Onion

② Applications in Plant Tissue Culture

上記2つの演題について講演を行い、合わせて延べ80名の教官、研究員、学生が参集した。両テーマに対する関心は高く、追加質問、議論の場を設けるよう依頼されたので日を改めて対応した。

4. 調査旅行の概要

現地調査は週末を利用し自分でアレンジしたのを含めると計12日出かけたが、ここではカウンターパートのDr. Kasem Piluek が手配してくれた調査視察旅行の内、泊りがけのもののみについて述べる。

12月23日から24日にかけてはタイ中西部の野菜栽培農家、Chia Tai 種苗会社及び種子生産圃場、ロイヤルプロジェクト現地圃場の調査視察ならびに指導を行った。栽培農家では生育障害の診断を依頼され、診断法や対策について説明した。種苗会社では、栽培管理法、日本における野菜育種の現状および今後タイが自前で種子生産を行うにあたっての留意点等を指導した。

1月3日から7日にかけてはタイ北部の大学、研究施設、種子生産圃場、ロイヤルプロジェクト現地圃場の調査視察ならびに情報交換、指導を行った。タイ北部の気象条件は日本に比較的似ているため、わが国の園芸作物が積極的に導入されており、それらの作物の特性、適正な栽培管理法について長時間にわたり説明した。F₁ 採種は緒についたところであり問題点も見られたので指摘した。

一般的にタイの大学のスタッフは現地へ出ることが少なく実際的な知識に乏しいと聞いていたけれども、Dr. Kasem は現場のわかる研究者の育成という観点からこの調査旅行に研究員や学生を引率し、現場を見せ、さらに短期専門家からインパクトを受けさせたいという希望を表明していた。したがってそれに応じるべく、彼らにもわかりやすく説明し、また各人の研究テーマについてもいろいろと話し合った。

5. 所 感

育種というテーマに対しわずか約40日という短期の派遣で対応できるであろうかという不安が無くはなかったが、カウンターパートのDr. Kasem Piluekは、バンケンおよびカンペンセンでの授業、専攻生指導、出張と多忙の中、精一杯の協力をしてくれ、Miss Panie やMiss Chuanpis も熱心に対応してくれたので、それなりの成果をあげることが出来たと思う。研究協力者の一人が出発前に来日し、研究協力の具体的内容、すなわちどのようなテーマにつき指導を希望しているのかを十分ではないにしろある程度知ることが出来たのも幸いであった。さらにこれまでほとんど使えなかったCLGCの温室の改善と利用を提言し、所長のMr. Kruick やMr. Akradet の支援が得られたのも大きかった。温室担当の人も初めて自分なりの研究テーマを持つことが出来たと喜んでくれた。

a. CLGCについて

CLGCの各ユニット内で各リサーチャーの研究の進め方について検討する体制が十分でないような話を聞いた。これはもちろんタイ側の問題で立ち入るべきではないかも知れぬが、もしタイ側の依頼が有れば専門家の中からアドバイジングスタッフを組織しトピックについて継続的な指導を行う。そして出来れば協同研究のレベルまで高められればと思われた。専門家のいた間だけの研究という例も有るように聞いたが、実効をあげるためには、カウンターパートに日本で研修して頂き、フォローの形での短期専門家の派遣もあって良いのではないだろうか。その場合、研究目的にかなった機材の選定さらには機材への習熟も容易になり、機材のより有効な活用が図れると考えられる。また担当した研究の進捗状況の検討、さらに出来ることならそれを論文として取りまとめてもらうためにも、ごく短期で構わないから専門家の再度の訪タイもご配慮願えればと思う。

b. JICAプロジェクトについて

短期でありかつプロジェクトのごく一部を垣間見たに過ぎないのにあえて申し上げさせて頂くとすれば、トピックの数が余りに多すぎ、さらにカセサート大学の組織の複雑さが絡んで、担当者でありながら自分の位置づけを十分理解していない人も一部あるように思われた。実験機材については欲をいえばきりの無いものであり、JICAの3本柱の残り2つ、日本人専門家の派遣、対手国研究者の研修員としての受け入れ、特に後者の比率をもっとあげることがより望ましいと思われた。現在日本は世界で最も多い100億ドルに及ぶ海外援助を拠出しているものの、とかく日本の利益優先と受け取られがちで、わが国が将来にわたり世界に対しいかに貢献し発展していけるかを考えるならば、若い時に日

本に留学したとか研修したというような人間的な絆が大きな意味を持つであろう。これについては受け入れ機関としての日本の大学等の研究室への助成措置も含めた総合的な配慮を願いたいものである。またローカルコストの不足もタイ側研究者からよく耳にした。他国の援助の方式との比較も踏まえ、供与機材も含めプロジェクトリーダーの裁量権を拡大し柔軟な対応をしていければよりJICAの評価が高まると思われた。

Part I

Discussions on Vegetable Crop Breeding

The discussions were aimed to exchange ideas, experiences and problems among colleagues involving the breeding works. These were informally arranged by means of conversations with the expert in his office as well as on field trips. However, there had been two surprising presentations by Dr. Haruhisa Inden according to the willingness of the speaker. Topics under discussions are summarized as below.

1. Varietal Classification of the Japanese Bunching Onion:

This presentation gave ideas for the new system of cultivar classification of the Japanese bunching onion and a hypothetical model on varietal differentiation of that estimated from the multivariate analysis.

At the time of discussion, not only visual descriptions of morphological and physiological characters but also the use of isozymes had the advantage in genetic identification were shown.

Some of slides were requested to use for lecture in Kasetsart University. (See Appendix 1)

2. Applications in Plant Tissue Culture:

The presentation gave ideas for importance of culture conditions so as gas, light, temperature and medium; how to

conduct, prepare and achieve the new biotechnological research works. Suitable combinations of traditional practical work and new biotechnological work were emphasized. So many researchers including the other research units wanted to ask, so the discussion was done till overnight on the artificial seeds, characters of media, acclimatization, acts of growth regulators, cellfusion and so forth. (See Appendix 2)

3. General Discussions on Crop Breeding:

a. Evaluation Techniques for Tomato Fruit Quality.

This activity was done by conversation between the expert and a particular colleagues which brought about the following ideas.

Fruit evaluation works will be performed using appropriate techniques and procedures. Classification of tomato fruit quality will be depended on types of tomato.

We mentioned more than 30 characters of outlook as well as component, and checked and decided which character was necessary to evaluate for breeding new cultivars suitable for Thailand. Evaluating techniques and procedures were discussed from both preharvest and postharvest points of view.

b. Investigations on Germplasm Seed Storage.

Accelerated aging technique was investigated on the aim to find out appropriate condition and methodology for storing

vegetable seeds of breeding materials as well as seeds of commercial varieties. The deterioration for sweet corn seed was observed at conditions of 43°C, 100% relative humidity with the exposure period of 48 hours, while seeds of chilli pepper attained deterioration at 43°C, 100% relative humidity with the exposure period of 60 hours. In the meantime, an experiment on accelerated aging for tomato and cucumber seeds are conducting. The following experiment will carry out on changes in physiological and biochemical manifestations. For physiological changes would be based on delay germination, reduction in germinability and seedling growth, increasing in the number of abnormal seedlings, whereas biochemical changes based on respiration quotient, changing in food reserves including enzymes.

c. Techniques for Embryo Rescue in Crucifers.

This activity was done mainly on how to get nice plant materials. Arrangements for vernalization were closely suggested because low temperature requirement for flowering was different according to species. The methods of ovary culture, ovule culture and embryo culture were shown. These were already explained in 2, so we would not write here to avoid repeating.

d. Techniques for Pollen Storage

To synchronize flowering is most desirable for cross pollination. But it is difficult in many cases owing to the lack of facilities for environmental control of flowering.

If we can store pollen for long time with high viability of pollens, crosses will be achieved in wide range. Some methods for preservation so as using organic chemicals or putting in liquid nitrogen condition and some methods for checking pollen viability were advised.

e. Techniques for Maintaining Female Cucumber.

Sex expression in cucurbits is determined by the genetic background of the plant. Most of commercial hybrids of cucumber use a bynoecious (female) line as the female parent. The difficulty of maintaining high female lines is the lack of male flowers as a pollen source. Gibberellin is suggested to apply in order to increase the number of staminate flowers in monoecious cucumber. Appropriate concentrations of the growth regulator could be carried out by experiment, because it depends on varieties and environmental condition. For example, the application of 100 ppm GA to young pickling-type cucumber seedlings (cultivar Wisconsin SMR 12) during two weeks of short-day exposure (a condition favoring the development of female flower). The effect of the short photoperiod in hastening female flower formation was found reduced by this GA application. In some cases 25-50 ppm GA is effective for male flower induction.

All activities under Part I brought about ideas and guidances for operating research in various field of vegetable breeding, and will lead to the strengthening research activities at Kasetsart University.

PART II

SLAB GEL ELECTROPHORETIC TECHNIQUE FOR
IDENTIFICATION OF SWEET CORN HYBRIDNESS

Poenkeo Hasdiseve

and

Panie Temiesagdie

Slab Gel Electrophoretic Technique for Identification of Sweet Corn Hybridness

Sweet corn breeding program has been used by many genes to provide high sugar maize for human consumption as waxy (wx), shrunken (sh_2) and brittle 1 (bt_1). The breeders will take a long time to clarify which genes are belong to a particular genotype. Moreover, to check the correct F_1 hybrid seeds is time consuming. Therefore, the use of electrophoretic technique of enzymes is thought to be helpful.

Material and Method

1. Study for suitable stage of sweet-corn seedling:

Sweet corn seeds were sown in water soaked papers at $25^{\circ}C$. Imbibed seeds were swelled up in twenty hours thereafter. Forty hours later, most of the seeds had 2 mm radicals and the well developed one attained 5 mm long. We checked for which stage and which part of the seedling that would be suitable for the electrophoretic analysis. Also the sample size and the sample concentration were examined.

2. Preparing slab gel:

2.1 Separating gel

Separating gel stock solution	2.85	ml.
1.5 M Tris (pH 8.8)	5.00	ml.
60% Glycerine	2.65	ml.
Distilled water	8.45	ml.
Sucrose		

1.5% Ammonium persulfate 500 μ l.

Mixed and degassed with aspirator for 4 minutes, and then added 20 μ l. TEMED immediately before introduction of separating gel into the gel cast.

2.2 Concentrating gel

Concentrating gel stock solution	3.00 ml.
0.5 M Tris (pH 6.8)	3.00 ml.
60% Glycerine	0.64 ml.
Distilled water	5.00 ml.
1.5% Ammonium persulfate	300 μ l.

Mixed and degassed with aspirator for 2 minutes, and then add 12 μ l. TEMED immediately before introduction of concentration gel upon the separating gel. Then the well forming combs were inserted between the glasses and incubated about one hour for polymerization.

3. Electrophoretic analysis:

After loading samples into the well, the BPB was added as marker and the constant voltage was applied at 80V for concentrating gel and then at 160 V for separating gel.

4. Staining gel:

Preparing staining solution before finishing electrophoresis by mixing:

distilled water	45 ml.
0.5 M Tris (pH 8.5)	5 ml.
β -NAD ⁺	50 mg.

Et OH	250	μ l.
NBT 1% (W/V)	1	ml.
PMS 1% (W/V)	1	ml.

Stained for 10 minutes in this solution and then rinsed with water about 10 minutes and dried.

Results and Discussions

1. The plant material of 20 hours after sowing showed more alcohol dehydrogenase activity than that of 40 hours. Using the whole seedling at those stages in 10 μ l of material buffer was thought to be too much.
2. Diluted sample of whole seedling in 100 μ l of material buffer, only plumule of 10 μ l of material buffer and only shoot tip of plumule in 10 μ l of material buffer were examined. However, all of these methods showed streak bands because of crude extract material. Then using only shoot tip of plumule in 50 μ l of material buffer and absorbing only solution with filter paper, still a few of crude extract interfered the result. The last trial, we used 100 μ l of material buffer and divided seedling into radical and plumule, centrifuged at 13000 rpm for 10 minutes and used only 10 μ l of supernatant for loading gel resulted in clear band.
3. This analyzing method was thought to be very useful because the plant sample necessary for analysis was little amount. We may use also for identification of plantlet through in vitro culture.

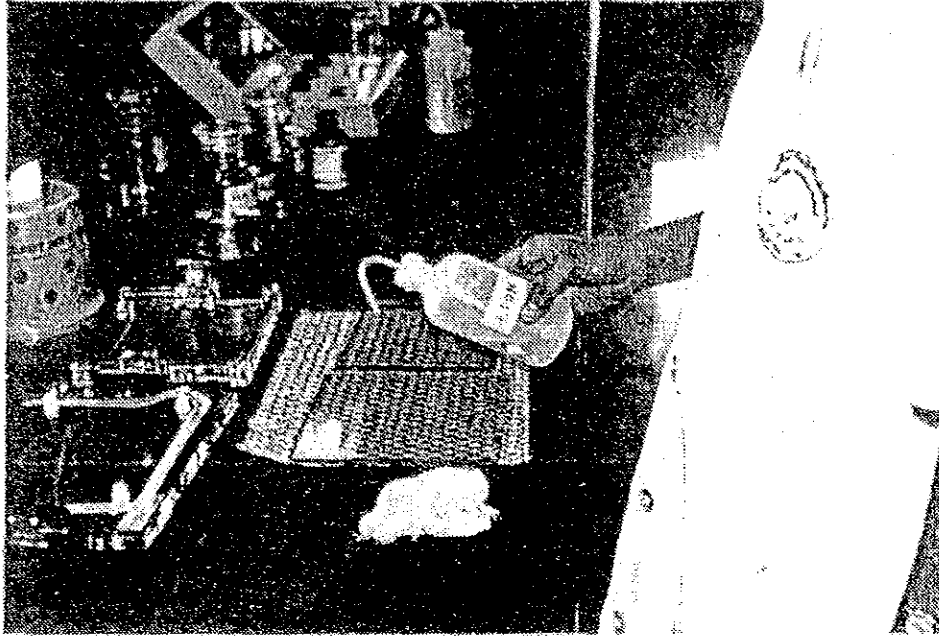


Figure 1 Wash the glass with ethanol

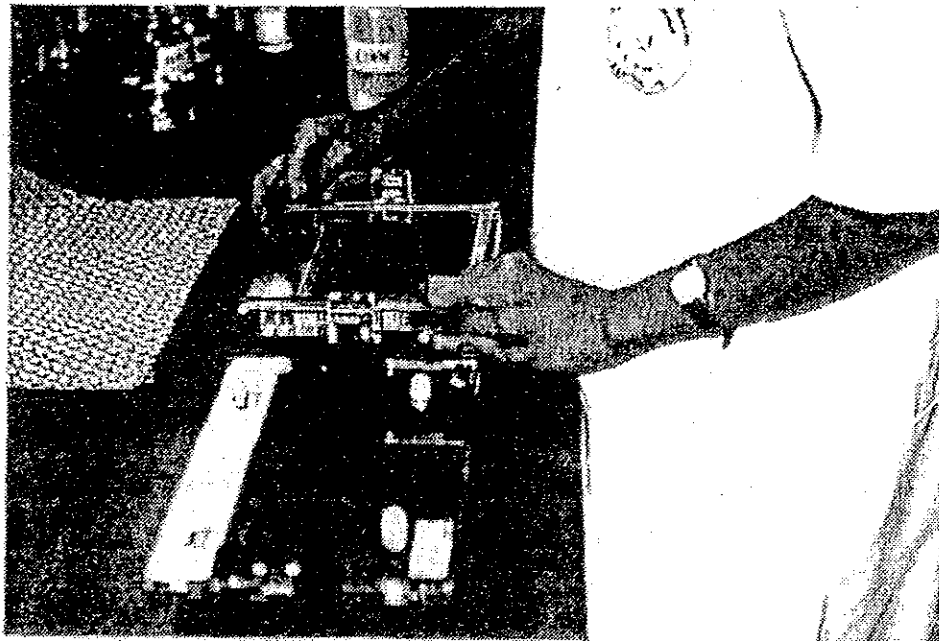


Figure 2 Set in the slab gel cast

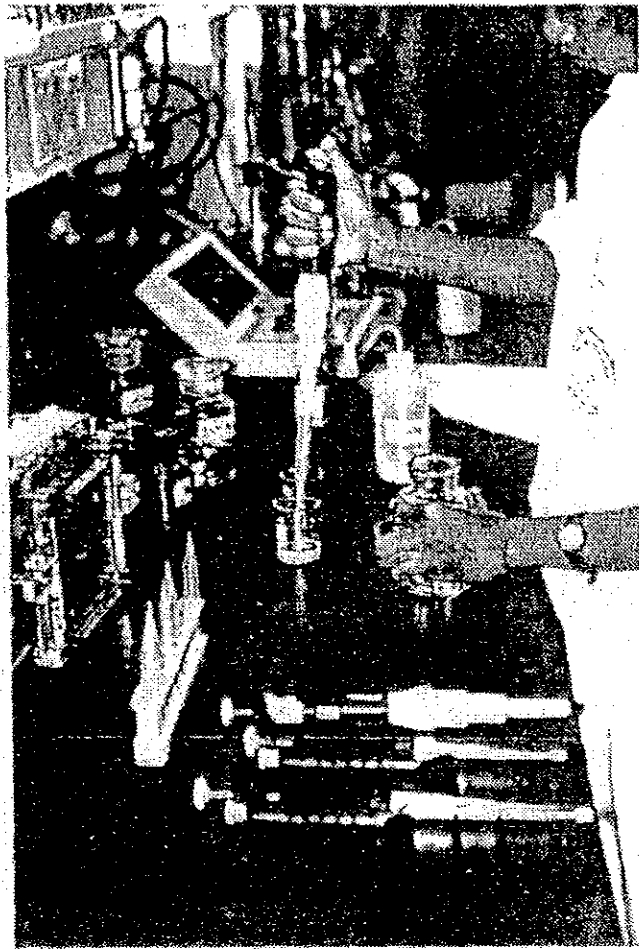


Figure 3 Preparing separating and concentrating gel

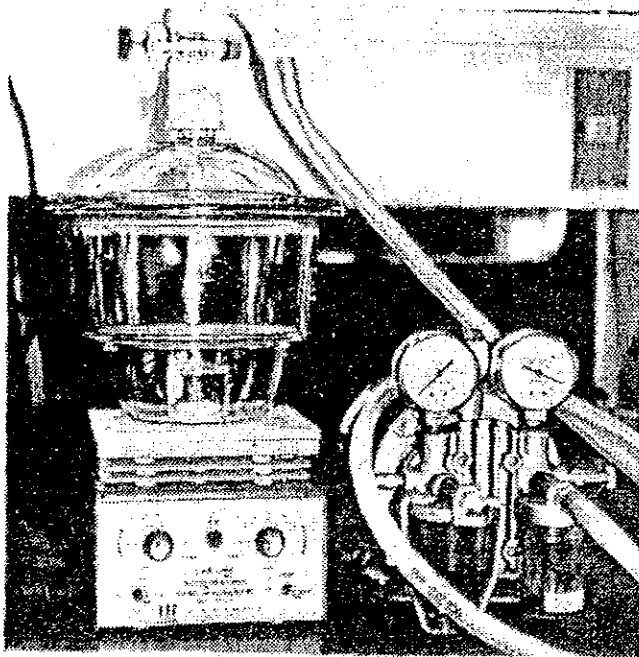


Figure 4 Degas gel solution with aspirator

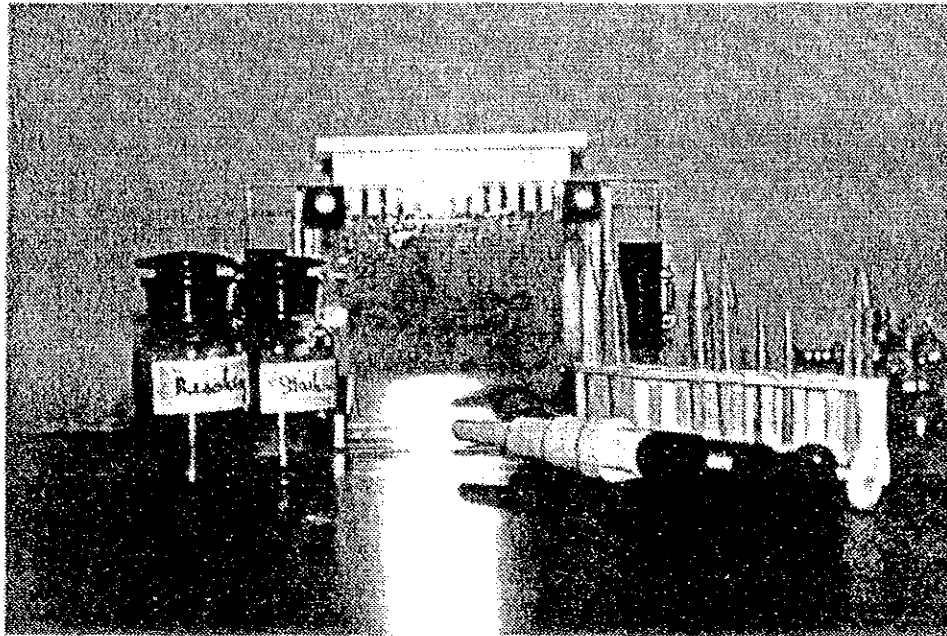


Figure 5 Add gel solution in slab gel cast and polymerization

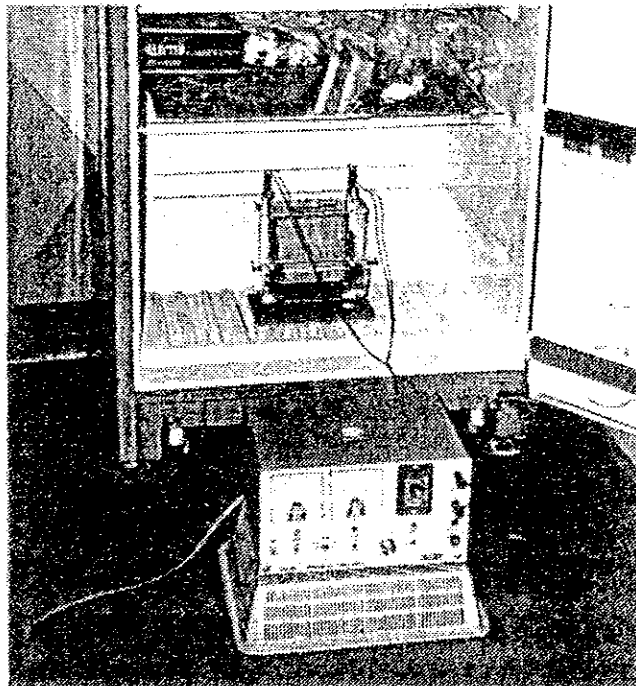


Figure 6 Constant voltage is applied to the gel in a refrigerator

PART III
NUTRIENT FILM TECHNIQUES (NFT)
IN PLANT CULTURE

Udom Keasuvan
and
Panie Temiesagdie

Improvement of the Glasshouse

One part of breeding program in KU-JICA project has been done in a glasshouse of Headhouse Unit for breeding lines selection. That glasshouse cannot be used efficiently, due to increasing temperature during the day time especially in Summer season. Furthermore, soil salinity is also the problem in that glasshouse.

We attempted to improve this glasshouse on two main points.

1. Improvement of glasshouse condition.
2. Set the special culture bed

1. Improvement of glasshouse condition

1.1 Setting the shading

- one layer inside glasshouse
- double layer (In the next future)

1.2 Opening angle of top roof in 100 % (Fig. 1)

1.3 Take off some part of glass in North-South direction.

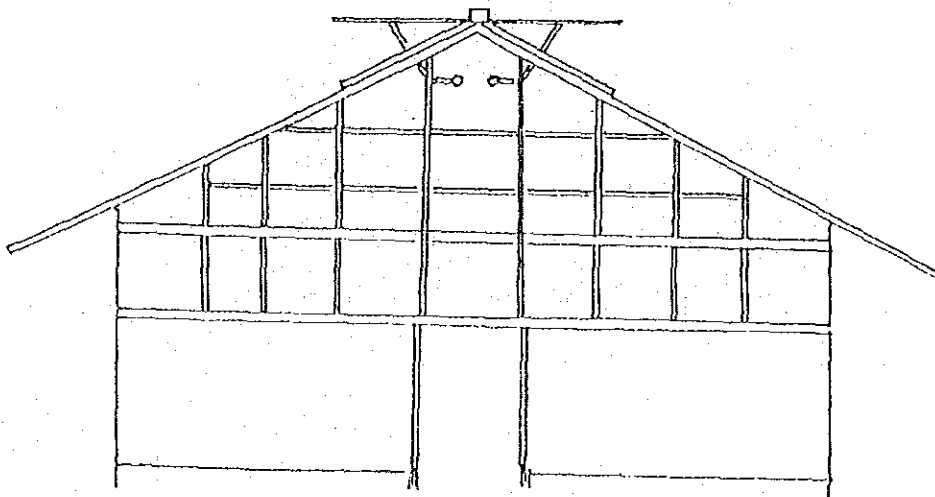


Figure 1. Diagram of top roof and North-South direction.

The climatic condition of inside of the shading glasshouse were recorded comparing with those of inside of glasshouse without shading or outside of the glasshouse, on light intensity, relative humidity and temperature. After shading light intensity was reduced about 54% and temperature was reduced about 5°C.

Table 1 Light intensity, relative humidity and temperature in glasshouse with and without shading and outdoor

Date	Treatment	Light intensity(Lux)			Relative Humidity		Temperature	
		10 am	2 pm	4 pm	max	min	max	min
5 Jan	shading	63,000	150,000	110,000	99	45	32	19
	without shading	120,000	350,000	170,000	99	60	37	22
	out door	180,000	700,000	300,000	99	56	40	-
6 Jan	shading	120,000	80,000	72,000	99	45	32.5	20
	without shading	250,000	120,000	150,000	99	60	39	22
	out door	450,000	240,000	300,000	98	54	40	-

Table 2 Average day temperature and electrical conductivity of different kinds of culture beds.

Treatment	EC * $\mu\text{S/cm}$	EC ** $\mu\text{S/cm}$	Average Temperature °C
1. Rockwool	995.50	1001.02	26.90
2. Coconut shale (A)	374.00	510.5	27.53
3. Sand (B)	52.40	43.5	29.50
4. Rice hull (C)	132.50	245.5	27.57
5. Burned rice hull (D)	513.00	530.0	28.07
6. A:C = 1:1	166.50	183.5	27.27
7. A:D = 1:1	345.50	463.5	28.17
8. B:D = 1:1	92.35	362.5	29.13
9. A:B:D = 1:1:1	150.00	372.5	29.33
10. A:B:C = 1:1:1	89.50	138.5	28.57

* before application of fertilizer

** 5-day after application of fertilizer

Table 3 Day temperature at different kinds of culture beds

Treatment	Temperature °C		
	10 am	2 pm	4 pm
1. Rockwool	24.9	27.3	28.5
2. Coconut shale (A)	25.2	26.3	31.1
3. Sand (B)	26.8	31.1	30.5
4. Rice hull (C)	25.0	28.4	29.3
5. Burned rice hull (D)	25.5	29.3	29.4
6. A:C = 1:1	25.8	27.6	28.4
7. A:D = 1:1	25.4	29.6	29.5
8. B:D = 1:1	25.6	30.6	31.2
9. A:B:D = 1:1:1	26.7	30.5	30.8
10. A:B:C = 1:1:1	25.7	29.7	30.3

Nutrient Film Techniques

(NFT)

The simple nutrient film techniques (NFT) has been set as shown in Figure 1, 2, 3, 4 and 7.

1. Preliminary study

Although rockwool is said to be nice material for culture, it is expensive. So we attempt to use other local materials (Figure 6) instead of rockwool. The various combinations of local materials (coconut shale, rice hull, burned rice hull, sand) have been set to compare with rockwool culture bed.

1.1 Materials

1.1.1 Materials of culture bed

1. Rockwool bed (30x92x75 cm.)
2. Coconut shale (A)
3. Sand (B)
4. Rice hull (C)
5. Burned rice hull (D)
6. A:C = 1:1
7. A:D = 1:1
8. B:D = 1:1
9. A:B:D = 1:1:1
10. A:B:C = 1:1:1

1.1.2 Fertilizer

The slow releasing fertilizer (Nutricote $N:P_{2O_5}:K_2O = 14:12:14$) has been used in rate 50 gm/m^2 (15 gm/rockwool bed)

1.1.3 Plant material

: Tomato (5 weeks-seedling)

: Gerbera

Summary

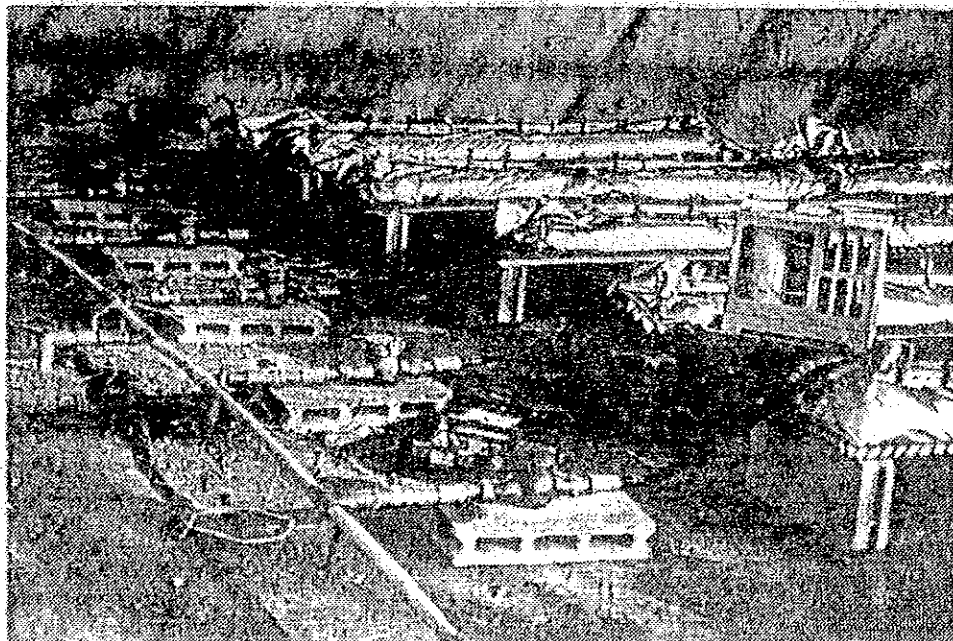
Culture of tomatoes and gerberas was carried out in a rockwool culture system and other different combinations of local materials such as sand, coconut shale, rice hull and burned rice hull.

Each plant was raised in a cubic rockwool pot and then put on rockwool bed in a density of 5 plants/bed and 7 plants/bed for tomato and gerbera, respectively. The plant density in other media kept the same linear of rockwool.

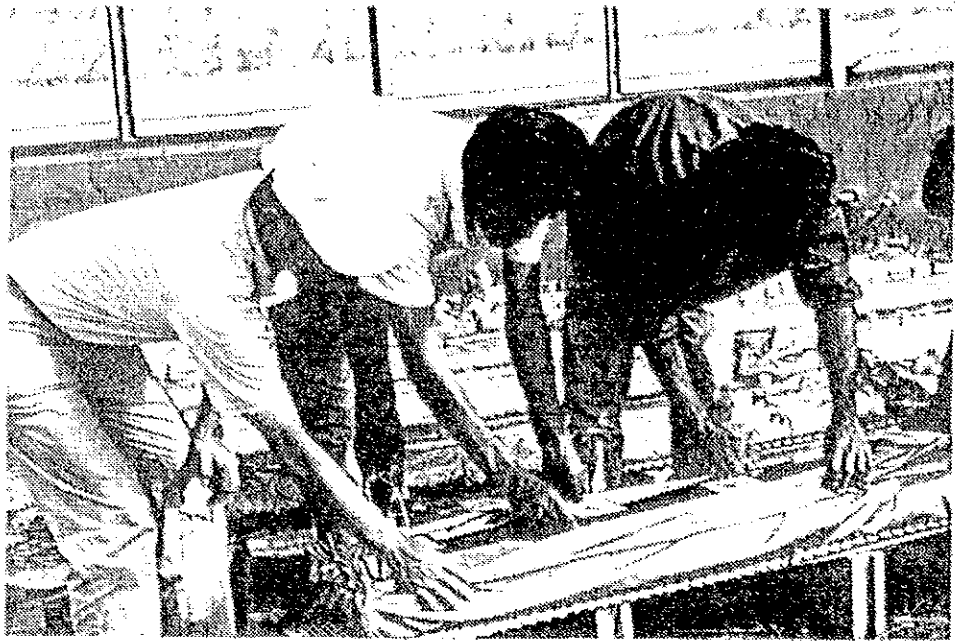
The slow releasing fertilizer ($N:P_{2O_5}:K_2O = 14:12:14$) was topdressed with 15 gm/rockwool bed. The growing character and changing of electrical conductivity and temperature of each media have been recorded.



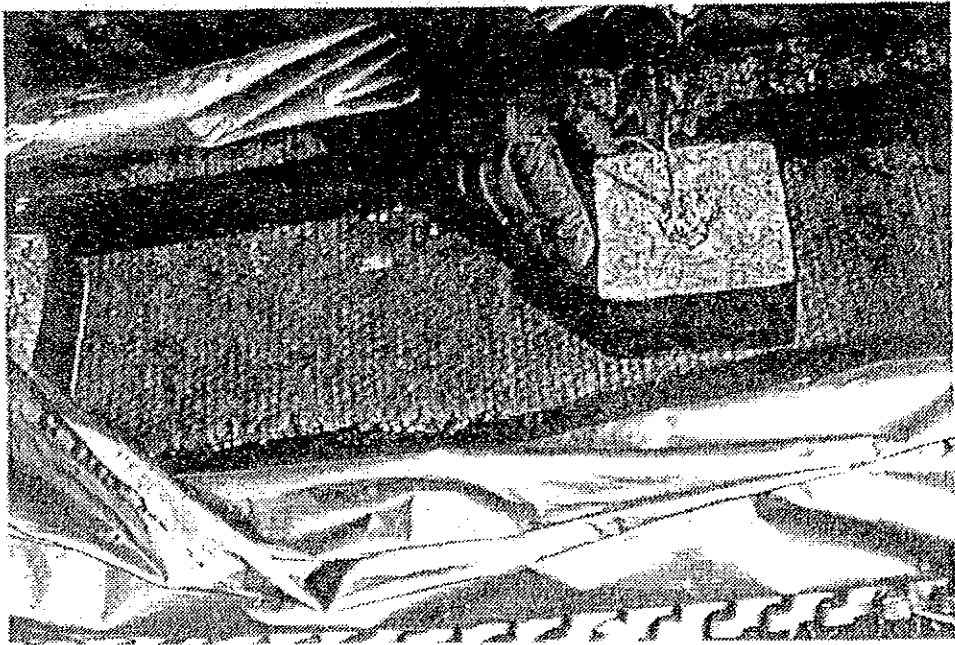
1



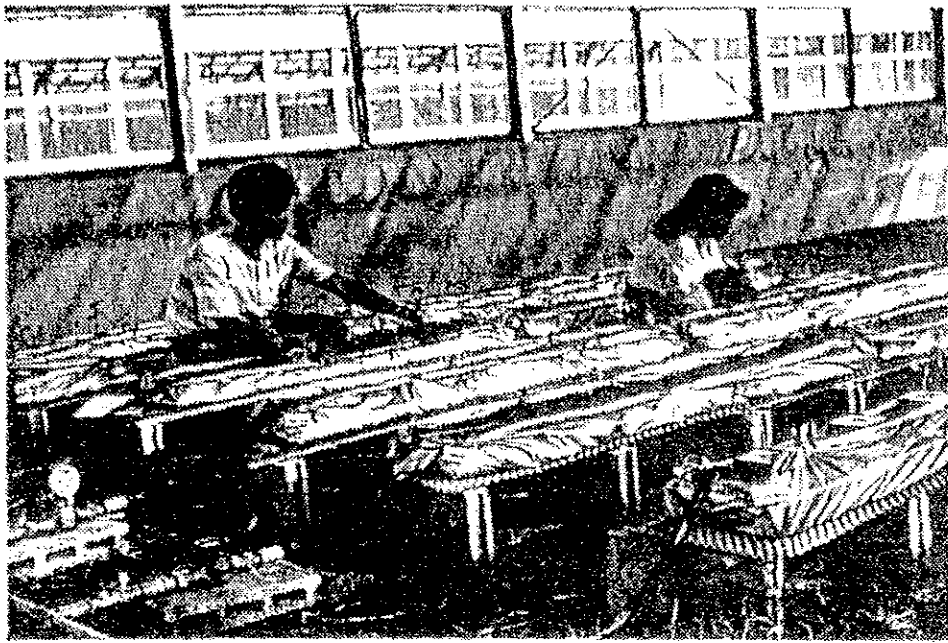
2



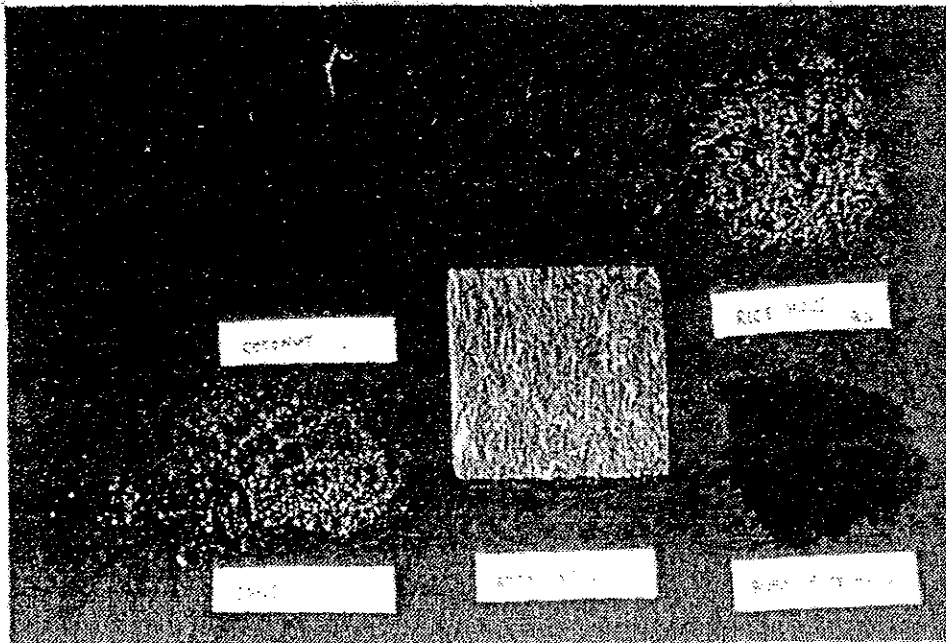
3



4



5



6

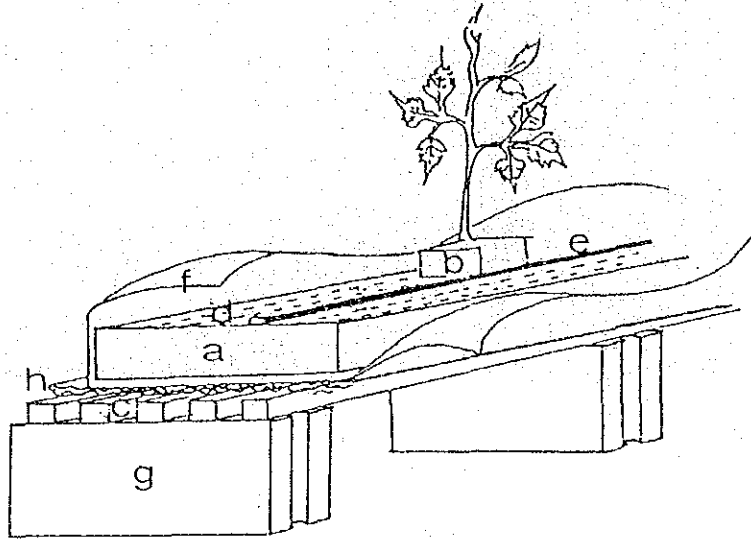


Figure 7. Diagram of rockwool culture bed

- a. Rockwool bed (30x92x7.5 cm)
- b. Rockwool pot (7.5x7.5x5 cm)
- c. Bamboo
- d. Slow releasing fertilizer
- e. Irrigation tube
- f. Silver polyethylene film
- g. Concrete brick
- h. Plastic net

REMARK

The counterpart and his co-workers wish to express their deep gratitude and sincere appreciation to the following :

Dr. Haruhisa Inden, a short-term expert, for his helpful advice, assistance and encouragement which he so freely rendered throughout the research activities; for his constructive criticisms, valuable suggestions and continued interest and help in preparing of report and in all above research techniques.

The Government of Japan through JICA, for providing equipments and informations, as well as KURDI for funding support and encouragement during the ongoing activities.

Finally, many thanks and very appreciation must go to staffs of CLGC for their hospitality, support and co-operation.

專 門 家 名 : 山 田 哲 治

指 導 科 目 : 遺 伝 子 工 学

派 遣 期 間 : 89. 1. 16 ~ 89. 2. 17

所 属 先 : 岡 山 大 学 農 学 部

業務状況報告

I 研究目的

本プログラムはタイにおける作物改良のための最新技術、特に遺伝子操作技術を用いて、植物のウイルスやその他病原菌に対する免疫、或いは抵抗性を高め、特定作物の病虫害を生物学的にコントロールすることを目的とする。

今回の研究協力分野は、研究協力プロジェクト I 「作物改良のためのバイオテクノロジーと育種」の中のプログラム IV 「病虫害防除のためのバイオテクノロジー」 Topic 3 - PRSV (パパイヤ輪紋病ウイルス) 抵抗性 - というテーマを中心に遺伝子操作の基本原則と DNA 塩基配列決定の技術を紹介した。

II 実施事項

A. 特別講義 (遺伝子工学)

CLGC A-02 室において以下の如く講義を行なった。

日 時	演 題
1 月 19 日	9.00 - 10.30 DNA 塩基配列決定法の紹介 13.00 - 14.30 DNA 分離・精製と制限酵素消化
1 月 20 日	9.00 - 10.30 遺伝子クローニング 13.00 - 14.30 DNA 塩基配列決定の原理

CLGC 研究スタッフを中心として、バンケーン・キャンパス等から 50 余名が参集した。講義内容は遺伝子操作の基本原則を中心に農業方面での応用や将来的な可能性について論じた。獣医学部や昆虫学部の教授陣も参加し、遺伝子工学への関心の強さがひしと肌身に伝わる程の熱意が伺えた。

B. ワークショップ

CLGC Plant Genetic Engineering & Biochemistry の研究棟で遺伝子クローニングと DNA 塩基配列決定のワークショップを実施した。

日 時	実 験 内 容
1 月 23 日(月)	9.00 - 16.30 DNA 塩基配列決定用ポリアクリルアミドゲルの装置と作成 (LKB システムとアトーのデモンストレーション)
1 月 24 日(火)	9.00 - 17.30 1) シークエンシング反応と電気泳動分析 2) ゲル乾燥 3) X 線フィルムのセッティング
1 月 25 日(水)	9.00 - 16.30 1) M13 mp19 ベクター DNA と、パパイヤ輪紋病ウイルス、サブクローン DNA の EcoRI による切断と精製 2) クローニング

1月26日(休)	9.00 - 16.30	1) 大腸菌 7118 又は JM 109 へのクローン化 DNAの形質導入
1月27日(金)	9.00 - 15.00	コンピュータによるDNAシーケンシングの解析 演習

ワークショップには人数の制限上、CLGCとパンケンキャンパスから選択された研究スタッフ20名余りが参加した。又、オブザーバーとして、チェンマイ大学のBIOCHEMISTRY Departmentより、Dr. Kriengsakが参加した。夫々の実験項目の初めに操作法や基本原理について説明しながら、まずデモンストレーションを行ない、続いて4グループに分かれて演習を行なった。

C. 研究推進補助

1. パパイヤ輪紋病ウイルス (Papaya ring-spot virus) DNA塩基配列決定の意義。

農作物のウイルス病に対する防除法として特に効果が期待される技術には 1) cross-protection や 2) coat protein (外被タンパク) 遺伝子の植物体への形質転換が挙げられる。特にウイルス病や土壌病害では農薬による直接防除は困難である。というのは、ウイルスの本体はRNAやDNAという核酸であり、これらは宿主植物にとっても生命の本質をつかさどる遺伝子で、ウイルスの核酸合成を阻害するような薬剤は、宿主植物に対しても薬害があるからである。

1) Cross-protection (交互防衛) は干渉効果、獲得抵抗性などとも呼ばれ、特にウイルス病の場合、弱毒ウイルスを健全植物に接種することにより、ウイルス抵抗性の誘導された病原性ウイルスに強い植物体を得ることを目的としている。いわゆる動物における病気予防に各種ワクチンが投与されるのと同じ原理である。しかし、植物におけるこれらの効果は、動物における抗原-抗体反応のように特異的でなく、弱毒性ウイルスによる誘導抵抗性の仕組みは現在完全に判明しているわけではない。

パパイヤ輪紋病ウイルスの防除法でも本Cross-protection法を用いることは可能である。しかし乍ら弱毒ウイルスをパパイヤ園から探索するのは大変な作業である。しかし、現在の遺伝子操作技術を用いることにより人為的に弱毒ウイルスを作り出すことができる。Oligonucleotide -- directed mutagenesis法がそれで専門的な説明は避けるが、本法を応用するためには、病原体ウイルスのDNA塩基配列を知る必要がある。即ちDNA合成装置により変異を生じさせたい塩基配列の一部のオクゴヌクレオチドを合成し、M13ベクターDNAの一部にアニーリングを起こさせ、DNAポリメラーゼで変異体DNAを合成させる。その後、変異体クローンと病原体クローンをブランク・ハイブリダイゼーション法により選択し、変異体ウイルスを獲得するわけである。

更に、2) 外被タンパク遺伝子の植物体への形質転換は、ワシントン大学のDr. R. Beachyらの研究室で確立された方法であるが、彼らの発見はタバコモザイク・ウイルス (Tobacco Mosaic Virus: TMV) の外被タンパク遺伝子を植物体 (タバコやトマト) に形質導入させ発現型にするともはや病原体TMVの感染に対して抵抗性に

なっている事実である。本法を応用するに際しても coat protein (外被タンパク) をコードする遺伝子領域を明らかにする必要がある、PRSVのDNA塩基配列決定を避けることができない。

2. DNA塩基配列決定の方法

詳細は別添のプロトコールを参照されたい。以下に実験方法の概要を記す。

- i) PRSV-subclone と mp 19 vector の Eco RI 消化
- ii) MB mp 19 Eco RI 消化ベクターの脱リン酸化 (CIP Alkaline phosphatase)
- iii) フェノール/クロロホルム抽出
- iv) 95%エタノール沈澱と70%エタノール洗浄
- v) リガーゼ反応
- vi) 大腸菌 JM 109 への M13 mp 19 クローン DNA の形質導入
- vii) 形質導入体プラークのスクリーニング
- viii) クローン M13 mp 19-PRSV DNA の同定
- ix) 一本鎖 DNA の精製
- x) Dideoxy-chain termination 法による DNA シーケンシング反応

D. セミナー講演

平成元年 2 月 13 日 (月) 午後 1:30-3:00

「Gene Expression in Plant-Microbe Interaction」と題して当方の研究プロジェクトの紹介を中心に植物病理学領域における分子遺伝・遺伝子操作研究の最近の動向について講演した。植物病理の大学院のクラスを併用したため、大学院学生、CLGC 研究スタッフが多数参加し、活発なディスカッションが行なわれた。

E. フィールド・トリップ

平成元年 2 月 11 日~12 日にわたって Nakorn Pathom と Kantana-buri 地方の sugarcane, rice, banana, papaya 等の農業の実体と種々の病気を観察した。Rice blast は日本と同様大きな病害であると伺ったが、農薬が普及しているせいかな今回のフィールド・トリップではみうけられなかった。パパイヤ輪紋病はいたるところで発生していた。

F. Paper presentation

平成元年 2 月 14 日 (Valentine Day)。Extension center, Green Carpet Rm. において Paper presentation を実施した。小生主催のパーティーも兼ねたので和気合々のムードの中楽しく行なわれた。

III 感想

当大学研究者、とりわけ生物科学に携わる研究者の Genetic Engineering に対する感心度が非常に高く、特別講演・ワークショップでの彼らの熱意に感銘した。タイ国における農業の将来的展望から鑑みてもこの時期に Genetic Engineering の基礎を固めていくことは非常に重要であると思われる。研究設備・研究スペース面では日本の平均的な大学研究施設

に比べ、とりわけ劣るところかむしろ恵まれ過ぎているようにも伺えた。しかしこれら設備の維持面で大きな問題が見受けられる。高価で且つ日常茶飯時使用されるべき超高速遠心分離機は2台とも故障したままであるし、その他の備品の故障も見受けられた。特に不備を感じたのは停電の頻度である。せっかくの実験も30分-1時間の停電でダメになることもしばしば、特に遺伝子操作実験はシリーズの酵素反応と細胞培養、細胞操作が要求され、このような状況では円滑な研究推進は困難を極める状況である。次に挙げられるのはR I設備である。分子生物学の研究にはR Iは必須でガイガーカウンターさえまともなものがない状況では安全面においても論外であると思われる。

JICAの支援のもと当カセサート大学のCLGC研究体制も次第に進歩しているように思われた。現時点で要求されるのはまず第一に研究者のレベルアップであろう。素質的には優秀であると思われるし、やはりしっかりした指導体制のもとで最新の研究を学んだ研究者の数を増やしていくことであると思われる。