

野菜種子処理（消毒）剤の効果・薬害の試験法

元 タキイ研究農場 とお やま あきら
遠 山 明

我が国において、野菜の種子処理（消毒）に登録のある殺菌剤は、大半が苗立枯病を対象とするものであり、病原菌汚染種子を対象とする登録薬剤は、トマト萎凋病、キュウリ斑点細菌病・炭疽病・つる枯病・つる割病、カボチャ立枯病などごく一部の品目と対照病害に限られている。しかしながら、野菜の種子処理（消毒）は、種苗業者から生産者への優良種子供給に欠かせないばかりか、病原の第一次伝染源の遮断、農薬の環境放出量の削減などの意義からも、種子使用量の大きい葉根菜類をはじめ、できるだけ多くの品目に農業登録されることが望まれる。一方、農業登録を推進するためには適切な試験法を確立する必要があるが、水稻等に比べ、野菜の種子消毒試験法は十分に整理されていないのが現状である。このため、本稿では、野菜種子消毒（処理）剤の標準的な試験法について試案を述べてみたい。なお、ウイルス汚染種子および殺虫剤による種子処理については除外した。

I 病原菌保菌種子の消毒効果試験法

1 供試種子

原則として自然感染による汚染種子を供試する。病原菌汚染種子は、同一ロットの中でも偏在していることが多いので、供試種子をよく混合・かく拌した後サンプリングする。なお、汚染種子が入手不可能で、人工汚染種子を作成する場合は、自然感染の経路に準じて培養菌を植物体あるいは土壤に接種し、その種子を採種すればほぼ問題はない。成熟した種子に、培養菌を塗布、あるいは塗布後病原菌の増殖好適条件に保つただけの人工汚染種子の場合は、種子や病原菌の種類によって、種子における病原菌の存在部位・密度・形態など効果に影響を及ぼす要因が自然汚染種子と異なり、消毒効果の信頼性に欠けることがあるので今後検討の必要性がある。

（例1）ハウレンソウ萎凋病：病土で生育したハウレンソウを稔実期まで管理し、採種する。筆者の実験例では、この方法で採種された種子の平均9～13%が萎ちょう病菌保菌種子であった（遠山・兼久，1991）。

Tentative Protocol for Evaluating Agricultural Chemicals as Vegetable Seed-Treatment Disinfectants. By Akira TOHYAMA

（キーワード：野菜種子，種子処理，種子消毒，試験法）

（例2）アブラナ科野菜のアルタナリア病：稔実期に培養菌の分生子を噴霧接種した莢から種子の成熟後に採種する。*A. brassicae* や *A. japonica* では保菌率が必ずしも高くないが、*A. brassicicola* では高い保菌率が得られる。

2 種子処理（消毒）方法と実施すべき効果・薬害試験

種子処理（消毒）を便宜上薬剤浸漬とコーティング（粉衣，塗布，吹き付け，フィルムコート，ペレット）の2種類にわけける。プライミング（発芽の均一・促進処理）に薬剤消毒を併用する場合はコーティングに含める。

（1）効果検定

保菌量の検定（薬剤浸漬処理種子で定量可能な細菌が対象）

プロッター法（凍結法を含む，糸状菌）

土まきによる発病検定（細菌，糸状菌）

素寒天培地による検定（菌核病菌）

（2）薬害検定

濾紙まきによる発芽試験

土まきによる発芽試験

（3）保存性検定

濾紙まきによる発芽試験

土まきによる発芽試験

効果検定については、病原菌により適当な方法を選択する。プロッター法と土まき検定が可能な糸状菌については両者を行う。薬害検定は濾紙まき，土まきの両者を行う。保存性検定では，濾紙まきによって問題（発芽率の変化など）があると判断される時，確認のため土まき検定を行う。

3 効果検定

細菌の保菌量検定：現在のところ，アブラナ科野菜の黒腐病菌では，種子消毒効果の判定を目的とする保菌量検定が可能である。また，ニンジン斑点細菌病菌でも，高い精度で病原細菌の検出が可能で（大畑ら編，水野，1999）今後種子消毒効果検定の開発が期待できる。その他，種子からの検出法が明らかにされている細菌は少ない（SAETTLER ら，1992）が，まだ保菌量検定の事例が乏しく，薬剤の効果検定としての定量が可能か否かは今後の問題である。また，検定の対象種子は薬剤浸漬処

理に限られ、コーティング種子では検定できない。アブラナ科野菜の黒腐病菌では、次の(例)で示すように、種子振とう液を段階希釈して2種の半選択培地に塗布し、発生する黒腐病菌のコロニー数から種子の保菌量 (cfu/種子g) を推定する。無処理種子と薬剤浸漬処理種子の推定保菌量を比較して、効果を判定する。

(例) 黒腐病菌保菌種子1ロット当たり1万粒(キャベツで約40g, ハクサイで約20g)×3反復。培地はmFS* およびmCS 20 ABN** の2種類を用いる。種子を100 mlの生理的食塩水(滅菌済みのTween 20を0.2%加用)に入れて、250 rpm/min, 2.5時間振とう、洗浄する。洗浄液を段階希釈(原液, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})して1シャーレ当たり0.1 mlずつ塗布し、平板培養する(1希釈液につき2シャーレ)。陽性対照菌として既知黒腐病菌株のコロニーの希釈液を同時に培養する。26~27°Cで培養し、出現した黒腐病菌と判定されるコロニーをカウント、種子gあたりに換算してcfu/gを算出する。確認のため、黒腐病菌と判定されたコロニーを10個斜面培養し、懸濁液をキャベツ苗の葉脈に接種して病原性を確認する。既知の黒腐病菌菌株を同時に接種する。

培地組成(純水1 l 当たり)

mFS 培地*: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, K_2HPO_4 0.8 g, KH_2PO_4 0.8 g, KNO_3 0.5 g, 溶性ジャガイモ澱粉 12 g, 酵母エキス 0.1 g, メチルグリーン 0.015 g (1%水溶液 1.5 ml), 寒天 15 g。

滅菌後、無菌的に以下の抗生物質を加える。

d-メチオニン 3.0 ml (30 mg/30 ml 50%EtOH), 塩酸ピリドキシン 1.0 ml (30 mg/30 ml 50%EtOH), セファレキシン 5.0 ml (200 mg/20 ml H_2O), トリメトプリン 6.0 ml (100 mg/20 ml 50%EtOH), シクロヘキシイミド 2.0 ml (1 g/10 ml 96%EtOH)。

mCS 20 ABN 培地**

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, KH_2PO_4 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.8 g, ソイペプトン 2.0 g, パクトトリプトン 2.0 g, 溶性ジャガイモ澱粉 12 g, グルコース 1.0 g, L-グルタミン 6.0 g, L-ヒスチジン HCl 1.0 g, 寒天 15 g。

滅菌後、無菌的に以下の抗生物質を加える。

バシトラシン 2.0 ml (1 g/20 ml 50%EtOH), ネオマイシン 2.0 ml (500 mg/25 ml 20%EtOH), シクロヘキシイミド 2.0 ml (1 g/10 ml 96%EtOH)。

ブロッター法: 保菌種子上に標徴が現れる病原菌と種子の組み合わせに適用する。この際、胞子の形成・形態などから病原菌が特定できることが必要であるため、例

えばフザリウム属菌汚染種子には適用できない。マメ科以外の種子では、本法の変法である凍結ブロッター法がやりやすい。プラスチックシャーレやトレーなどの容器に、純水を飽和させた濾紙を2枚敷き、その上に種子を並べる。種子の発芽適温に2~3日おいた後、 -20°C に、一晚から1日程度保つ。この容器を病原菌胞子の形成適温に移す。多くの菌は暗黒では胞子形成が乏しいので、BLB 蛍光灯 (20 W. FL 20 S・BLB) を20~30 cmの高さから、12時間サイクルで照射する。胞子形成が認められたら、双眼顕微鏡などで50倍以上に拡大して、種子を1個ずつ観察し、分生子の形成・形状、柄子殻等から、病原菌の種を特定する。病原菌別に発生率を求め、無処理・処理種子の比較から防除価を求める。

$$\text{防除価} = \left(1 - \frac{\text{農業処理区の菌検出率}}{\text{無処理区の菌検出率}} \right) \times 100\%$$

(例) ニンジンの黒葉枯病菌・黒斑病菌汚染種子サンプルは、1ロット100粒以上×3反復。

多くの場合、腐生性 *Alternaria alternata* の発生が認められるので、*A. dauci* および *A. radicina* との判別を確実に行う。時にはこれらの2種または3種が、同一種子上に胞子形成する。

土まきによる効果判定: 播種用に調整された市販の培土(あるいは滅菌砂土)を入れた種まき用セルトレーに1穴1粒ずつ播種する。トレーの代わりに播種箱を用いてもよいが、播種間隔を通常より大きくとる必要がある。種子の発芽適温・適湿におく。本葉第1~2葉の出葉期に想定される対象病害の多発環境(温度、空気と土壌湿度、光条件)に移す。必要に応じて、遮光・被覆などの処理をする。発芽勢・正常発芽率(薬害検定の項参照)、異常発芽率と発病株率を経時的に(普通1日1回)調査する。発病株は調査の都度必ず除去する。効果検定の時、薬害と見られる症状がある時は記録する。最終調査は病害の種類により異なるが、おおむね本葉の3枚目が展開開始期である。その後の発病は、空気伝染や露滴伝染のある病害の場合、二次感染による恐れが大きい。

(例) アブラナ科野菜の黒腐病菌保菌種子

1ロットから100粒以上×4反復のサンプルをとり、培土に播種する。 25°C に保ち、本葉が見えてきたら夜間はポリフィルムで被覆して多湿に保つ。子葉の発病は判別しにくいので、顕微鏡によるウーズの確認が必要である。本葉では葉脈の褐変に伴い、多くは葉縁部から水浸状~淡黒色の病斑が拡大するので、肉眼による診断ができる。無処理区と薬剤処理区の発病率から防除価を算出する。

菌核病菌汚染種子の検定: マメ類などの種子で、菌核

病菌汚染種子に対する種子処理の室内効果検定として行う。トレーなどの容器に固めた素寒天培地の上に、種子を並べ、20～23℃におく。3～4日後から、特徴のある白色綿状菌糸が汚染種子（あるいは菌核）の周囲に発生し、まもなく菌核を形成する。1ロット100×4反復検定。

4 薬害検定

供試種子：重度に糸状菌汚染された種子ロットは、発芽力（vigor）が劣り、病原菌による発芽障害が発生することがあるので、薬害検定の無処理区種子としては適当でない。このような場合、薬害の検定には、発病検定とは別に、平均的な発芽力のあるロットを供試するのが望ましい。なお、アブラナ科の野菜種子は、品種はもとより採種地・採種年度などによって、薬剤の発芽に及ぼす影響が大きく異なることがある。したがって、種子処理の実用化に際して、薬害については代表的な品種の発芽力の異なるロットについて調べておく必要がある。

濾紙まきによる薬害検定：ISTA（International Seed Testing Association）の規定（農水省種苗管理センター、1991 a）により、原則として1区100粒×4反復の試験規模とする。純水を飽和した濾紙2枚をシャーレなどの容器に敷き、種子を並べる。小型種子では吸引播種器を利用すれば簡便である。種子の発芽適温・光条件におき、通常3～4日後発芽勢、発芽締切り日（品目により異なるが、通常7～10日後）に発芽率を調査する。同時に正常芽生と異常芽生との比率を調べる。ISTAによれば、正常芽生とは「良質な土壤中で好適な水分、温度、および光の条件下に育った場合に、正常な植物体になるような発達を持続する芽生。軽微な欠陥があるものを含む」と定義されている。異常芽生とは「1つまたはそれ以上の必須構造が回復不能な欠陥を有することが原因で、好適な条件下の土壤中で生育しても正常な植物体に発育する能力を持たぬ芽生」と定義されている。なお、正常芽生と異常芽生との区別については、種子の発芽様式別にISTAによる詳しい図説（Bekendam and Crob, 1993—農水省種苗管理センターによる邦訳あり）がある。また、薬害による異常発芽の場合は、種子の欠陥による異常発芽とは異なる症状が出る場合（例えば、子葉の変色・褐変、胚軸の短小・膨大化）があるが、すべて異常発芽に含める。

ユウガオ、マメ類などの大型種子で、シャーレを用いた発芽試験では、発根や根の発育が十分に観察できない場合、濾紙まきの一種であるロールペーパー法を用いる。純水を飽和した長方形の大型濾紙の長辺上端から3～4 cmの位置に種子を等間隔に並べて、種子を濾紙の

間に挟むように固く巻く。これを底に純水を入れた長筒形の蓋つきシャーレに立てて密閉し、発芽させる。調査時には濾紙を広げて発芽、とくに根の生育・細根の発生、異常を経時的に調べる。

土まきによる発芽検定：土まき発芽検定では、砂まきが一般的であるが、薬害検定では、発芽後一定の生育段階まで観察する必要があるため、種まき用に調整された市販の培土を用いる方が、水分調整も簡単で実用的である。通常、培土を入れたセルトレーに1穴1粒ずつ播種する。発芽好適環境において、発芽勢ならびに正常・異常発芽率を経時的に調査する。薬剤処理によると判定される異常芽生が観察された時は、本葉が3枚になるまで観察を継続し、薬害が実用的に問題となるか否かを検討する。

濾紙まき（ロールペーパー法も含めて）と土まきによる発芽試験の結果から、薬害の発生程度を次の基準により判定する。

薬害発生程度基準

－：薬害なし

±：発芽がわずかに遅れる程度の軽微な薬害があるが、実的に問題なし

+1：薬害があり実用上の問題がある

+2：薬害が著しく、そのままでは実用困難あるいは実用不可能

5 保存性検定

薬剤処理（消毒）済みの種子は保存性の検定が必要である。とくにコーティング種子では、薬剤またはコーティング基剤の種類が保存性に影響する。薬剤処理種子および無処理種子を布袋または紙袋に入れて、種子倉庫や店頭などを想定したやや不良な条件（例：室温25℃、相対湿度約70％）で保存する。原則として種子処理直後、3、6、9、12月後の5回、濾紙まき（ロールペーパー法を含む）による発芽試験を行う。最低でも3、6月後の発芽試験は欠かせない。これらの試験で、薬剤処理区の発芽が無処理区の発芽より良好または不良であれば、追試として土まきによる発芽試験を行う。これらの結果から、薬剤処理種子の保存可能月数を確定する。

II 苗立枯病を対象とする種子処理効果試験法

供試種子：発芽のよい種子を供試する。

種子処理の方法と実施すべき検定：通常コーティング処理、とくにベレット種子が対象となる。

効果検定は苗立枯病菌汚染土壌で行う。薬害検定と保存性検定は病原菌保菌種子の項と同様に実施する。

効果検定：対象病害は各種野菜の苗立枯病菌

(*Rhizoctonia solai* および *Pythium debaryanum* などの立枯病病因 *Pythium* 属菌) が主な対象であるが、苗立枯れの病因となる *Fusarium* 属菌 (例えばホウレンソウ萎凋病菌, タマネギ乾腐病菌, トウモロコシ苗立枯病菌など) も対象となる。病原菌による自然汚染土壌が入手できない場合は人工汚染土壌を作成する。作り方は成書 (大畑ら編, 1995 a) を参照されたい。

病土をセルトレーまたは播種箱 (プラスチック製または木製で底に水抜きのあるもの) に入れ, 処理種子と無処理種子を播種する。1 処理 100 粒以上, 3 反復とする。

R. solani あるいは *Fusarium* 属菌の場合, 播種直後から土壌温度 25~26°C, 発芽適湿条件に保ち, 過湿にはしない。*Pythium* 属菌の場合には, 土壌温度 27~28°C, 土壌湿度は発芽がほぼ出揃うまで適湿とする。発芽揃い後一晩容器の底部を水槽に入れて, 土を過湿とするが, 次の日は適湿に戻す。この操作によって, 適湿・過湿を繰り返す。播種後常時過湿に保つと発芽自体が悪くなるばかりでなく, 発病も抑制される (大畑ら編, 1995 b)。

播種後は毎日発芽率と苗立枯率を調査し, 新しい立枯れの発生がほぼ終息するまで継続する。立枯れ株は調査の都度除去する。同時に無病土を入れた播種箱 (またはセルトレー) に処理・無処理種子を 100 粒×3 箱ずつ播種し, 病土区と同一の管理を行って, 発芽率と苗立枯率を調査する。効果の評価は次の 3 項目について行う。

出芽前立枯率 (%) : 「無病土での最終発芽率」- 「病土での最終発芽率」

出芽後立枯率 (%) : 「発芽後立枯数 ÷ 播種種子数」× 100

立枯率 (%) : 出芽前立枯率 + 出芽後立枯率

防除価 = $\left(1 - \frac{\text{処理区の立枯率}}{\text{無処理区の立枯率}}\right) \times 100\%$

保存性の検定 : 保菌種子の場合と同様に行う。

III 対照薬剤について

苗立枯病対照薬剤は, 登録のある薬剤から選択する。病原菌保菌種子消毒用薬剤で, 登録薬剤のない場合は, 強いて対照薬剤区を設定する必要はないと考えられるが, 参考薬剤として用いる場合は, 糸状菌対象として, チウラム剤, キャプタン剤, チウラム・ベノミル剤, チウラム・チオファネートメチル剤, 細菌対象として, 次亜塩素酸カルシウムが考えられる。

おわりに

今日, 野菜種子処理 (消毒) は, 大部分が供給者である種苗業者によって行われており, 各社のノウハウがある。しかし, その効果・薬害の検定は, 共通の認識のもとで, なるべく標準的な方法に基づいて行われることが望ましい。本文がその叩き台の一つともなれば幸いである。

この試案の作成に当たり, 多大のご助言, ご指導を頂いた駒田旦氏 (タキイ種苗), 木曾皓氏 (武蔵野種苗園) ならびに浅賀宏一氏 (サカタのタネ) に深謝する。

引用および参考文献

- 1) Association of official seed analysts (1993) : Journal of technology 16 (3) : Rules for testing seeds, 113 pp.
- 2) BEKENDAM, J. and CROB, R. (1993) : 国際種子検査協会 (ISTA) 発行, 農水省種苗管理センター訳, 芽生評価ハンドブック第 2 版, p. 116.
- 3) 中村俊一郎 (1985) : 農林種子学総論, 養賢堂, 東京, 280 pp.
- 4) 農水省種苗管理センター (1991 a) : 国際種子検査規程, p. 13.
- 5) ——— (1991 b) : 同上 pp. 99~105.
- 6) 大畑貫一他編 (1995 a) : 作物病原菌研究技法の基礎, 日植防, 東京, pp. 17~18.
- 7) ——— (1995 b) : 同上, pp. 288~292.
- 8) 大畑貫一他編 (1999) : 種子伝染病の生態と防除, 日植防, 東京, pp. 113~114.
- 9) SAETTLER, A. W. et al. (1992) : Detection of bacteria in seed and other planting material, APS, 112 pp.
- 10) Seedling Evaluation Committee of the association of official seed analysts (1992) : Seedling evaluation handbook, 101 pp.
- 11) 遠山 明・兼久あゆみ (1991) : 滋賀県立短期大学学術誌 40 : 27~34.

学 界 だ よ り

○「日本における農業の歴史」刊行される。

日本農業学会名誉会員の松中昭一氏は, (株)学会出版センターから「日本における農業の歴史」を刊行した。

内容は, I 章「農業とは」, II 章「農業の変遷 (概説)」, III 章「戦後の日本農業における農業および農業科学の貢献」, IV 章「国産新農業の開発」, V 章「農業の安

全性確保」, VI 章「問題となった農業とその対応経過」, VII 章「農業の抵抗性 (体制) 発現問題」, VIII 章「環境ホルモンおよびバイオテクノロジーと農業」, IX 章「農業の研究・開発体制の歴史」, X 章「農業の流通機構」, XI 章「国際的産業としての農業企業 (農業の輸出入状況)」, XII 章「過去の反省から将来への展望」, 補遺 : 関連国内学会について

A 5 判上製 290 頁定価 4,200 円 (本体 4,000 円) 電話 03-3814-2001