

ISTA (国際種子検査協会) の種子病害標準検査法

種苗管理センター ^さ佐 ^{とう}藤 ^{まさ}仁 ^{とし}敏

はじめに

種子伝染性病原体に汚染された種子は、国内の農業生産に影響を及ぼす病害発生の第一次伝染源として、また海外から新たな植物病原体が持ち込まれる経路として大変重要である。近年、育苗栽培の規模拡大・分業化や種子生産の海外移行など農業を取り巻く状況が変化してきたことや種子の国際取引が活発になってきたことに伴い、流通する種子は病原体に汚染されていない健全な種子であることがこれまで以上に強く求められている(駒田・浅賀, 1998)。国内では、1998年にスイカの種子伝染性病害、果実汚斑細菌病の発生が初めて確認され、2003年3月には種子消毒剤にもかかわらず改正農薬取締法が施行されるなどの状況に伴い、種子伝染性病害に対する意識・関心ともますます高まってきている。

一方、種子の品質評価を目的とする病害検査には、高感度、再現性、簡便・迅速性、低コスト性を有する方法が求められるとともに、国際的に統一された標準検査法が必要になる。これに対応し、種子検査法の技術向上と国際標準化、適用の推進を図る国際組織である国際種子検査協会(International Seed Testing Association: ISTA)では、2002年に健全種子検査に関する規程を全面的に改訂し、病害検査法の認証・管理システムを規程上で明確化するとともに病原体ごとに策定した標準検査法をSeed Health Testing Methods (ISTA, 2003)に取りまとめ、発刊した。

このような動向をふまえ、ISTA認証の種子検査機関である(独)種苗管理センターでは、民間からの依頼に応じて実施する検査にISTA国際標準法を適用した種子伝染性病害の検査を2001年から開始している。

本稿では、ISTAが認証した種子伝染性病害標準検査法について紹介し、その中からいくつかの病原体に対する検査法を具体的に解説したい。

I ISTAの種子病害標準検査法

表-1には、本年1月から有効になった標準検査法

Seed Health Testing Methods Validated by ISTA. By Masatoshi SATO

(キーワード: 国際種子検査協会 (ISTA), 種子伝染性病害, 健全種子, 種子病害標準検査法)

(ISTA, 2003)の概要を示した。本編には18種類の病害とその検査法が記載されている。検査法には、病害と作物の組み合わせごとに供する種子の粒数、用いる資材、検査法の手順、判定基準が明示されている。病原体を検出する手法の多くは、ろ紙を用いたプロッター法や市販培地を用いた培養法など種子から病原体の検出に広く用いられている方法であり、特殊な器具や機器を必要としない。これに加え、検査で最も重要な検査の信頼性を確保するための事項が併せて明記されている。この中には、検査結果に影響を及ぼす試料間の相互汚染を排除するための器具や手袋の消毒、使用する試薬や合成培地の品質管理、対象病原体の基準菌株との比較などとともに、植物病理学に精通した管理者のもと適正な実験室の管理が求められる。

なお、検査結果は、ISTAで規定された許容誤差の検定を行った後、目的の病原体の学名および検査方法とともに供試粒数に対する汚染粒数の百分率で報告することになっている。

II 病害検査法の実際

次に、ISTA標準検査法に基づく実際の病害検査について説明する。

1 ニンジン種子における *Alternaria dauci* および *A. radicina* の検査法

ニンジン種子で検査対象となる *A. dauci* (黒葉枯病菌) および *A. radicina* (黒斑病菌) では両菌ともに検査法は同一で、凍結プロッター法と培養法の二つの方法が規定されている。検査用の種子はいずれの方法でも1ロット当たり400粒を供試する。種苗管理センターでは通常の検査法として凍結プロッター法を用いている。

(1) 凍結プロッター法

径9cmの滅菌シャーレに3枚のろ紙(Whatman No.1または同等品)を敷き、滅菌蒸留水(4~5ml)を加えて湿らす。この際、余分な水があると細菌の生育が旺盛になり糸状菌の生育が抑制されるので、過剰な水は捨てる。検査用の種子はシャーレ1枚当たり10粒をろ紙上に置床する。この際、培養後の菌糸が周りの種子に達してコンタミネーションを生じる場合がある。このため、種子と種子の間隔は少なくとも2cmとなるように置床する。その後、20±2°C、暗黒の恒温器内で3日

表-1 ISTA 種子病害標準検査法の概要^{a)}

対象作物	病原体	種子数	検査方法 ^{b)}	判定基準
ニンジン	<i>Alternaria dauci</i>	400 粒	①凍結プロッター法 ②培養法 (Malt agar)	分生子の形態 分生子の形態, コロニーの性状
ニンジン	<i>Alternaria radicina</i>	400 粒	①凍結プロッター法 ②培養法 (Malt agar)	分生子の形態 分生子の形態, コロニーの性状
ヒマワリ	<i>Botrytis cinerea</i>	400 粒	プロッター法 (3%麦芽エキス液の添加)	根部の腐敗, 菌糸および分生子の形態
アブラナ科 野菜	<i>Phoma lingam</i>	1,000 粒	プロッター法 (0.2% 2,4-D 液の添加)	柄子殻の形態
エンドウ	<i>Ascochyta pisi</i>	400 粒	種子表面殺菌, 培養法 (Malt agar または PDA)	白色菌糸の形態
インゲンマメ	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	400 粒	種子表面殺菌, ペーパータオルで種子を挟んで培養	黒色凹陷斑, 菌の性状
アマ	<i>Botrytis cinerea</i>	400 粒	培養法 (1%麦芽エキス加用寒天培地)	根部の腐敗, 菌糸および分生子の形態
トウヒ類	<i>Caloscypha fulgens</i>	400 粒	種子表面殺菌, 培養法 (寒天培地)	青色色素産生, 菌糸の形態
マツ類	<i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	400 粒	プロッター法 (PCNB 溶液の噴霧)	小型および大型分生子の形態ポリフィアライド
イネ	<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	400 粒	プロッター法	分生子の形態
イネ	<i>Pyricularia oryzae</i>	400 粒	プロッター法	分生子の形態
イネ	<i>Alternaria padwickii</i>	400 粒	プロッター法	分生子の形態
オオムギ	<i>Ustilago nuda</i>	200~ 400 g	エンブリオ・テスト	菌糸の形態
コムギ	<i>Septoria nodorum</i> ^{c)}	400 粒	種子表面殺菌, 培養法 (Malt agar または PDA)	コロニーの性状
フェスク, ライグラス	<i>Neotyphodium</i> spp.	400 粒	イムノプロット法	血清反応
ダイズ	<i>Phomopsis longicolla</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i>	400 粒	培養法 (酸性 PDA)	コロニーおよび菌糸の性状 分生子の形態
アマ	<i>Alternaria linicola</i> ^{d)}	400 粒	培養法 (Malt agar)	コロニーおよび菌糸の性状 分生子の形態
アマ	<i>Colletotrichum lini</i>	400 粒	培養法 (Malt agar)	コロニーの性状

^{a)} 末松 (1999) を加筆, 修正した。 ^{b)} 方法の名称は君島 (1999) を参考にした。 Malt agar および PDA (ジャガイモせん汁寒天培地) は Difco や Oxoid などの調製済みの市販培地を用いる。 PCNB 溶液は, 1,000 ml 中にペプトン 1.5 g, MgSO₄·7 H₂O 5 g, 75% PCNB 剤 1 g, ストレプトマイシン硫酸塩 1 g, ネオマイシン硫酸塩 0.12 g を含む。 ^{c)} 日本産は *S. tritici* (葉枯病) になっている。 ^{d)} 国内では未報告, 黒斑病のみ記録あり (*A. brassicae*)。

間培養した後, -20±2°C の冷凍庫に移して 24 時間凍結する。凍結処理を行うことにより培養期間中の種子の発芽が抑えられ, 種子から出現する菌の観察は無処理の場合に比べて容易になる。次に, シャーレを重ねないように 1 枚ずつ並べて 20±2°C で再度 6 日間培養する。検査対象の両菌は, 近紫外線の照射と暗黒の反復により分生子の形成が誘起・促進されることが多いので, 培養期間中は, BL-B ランプ (ピーク波長 360 nm) を約 25 cm 上方から, 12 時間サイクル (明 12 時間-暗 12 時間) で照射する。

検査は, 倍率 30~80 倍の実体顕微鏡で種子を 1 粒ずつ観察し, 種子表面あるいは菌糸上に形成される分生子の形態から種を判別する。疑問がある場合は, 光学顕微鏡で分生子を拡大・観察して種を確定する。同一種子上に 2 種以上の *Alternaria* 菌が検出される場合が多い。*A. dauci* の分生子はオリブ色~褐色を呈し, 長い逆棍棒状や長楕円形の本体に細長い糸状の嘴部 (ピーク) をもち, 嘴部を含む大きさは 450 μm に達する (図-1)。嘴部は 1 本のものと 2 本に分枝するものがあり, その長さは本体の 3 倍に達するものも観察される。分生子は種

子表面上または気中菌糸上から生じる短い分生子柄に単生し、種子表面や幼根に数個または小さな固まりとなって観察される場合が多く見られる。*A. radicina* の分生子は通常単生であるが、分枝状に形成される場合や2~3個連鎖する場合がある。分生子は光沢を帯びた淡褐色~黒色を呈し、楕円形または樽状で、短い嘴部をもち、大きさは長いもので75 μm に達する。通常3~7個の横隔壁と1~数個の縦隔壁をもつ。分生子は種子表面や幼根、または種子上やろ紙上に伸びた菌糸上に形成される(図-2)。なお、雑菌の出現が激しく検査の妨げになった場合は数日間さらに培養を延長して再検査を行う。

このような特徴をもつ分生子が観察された種子を汚染種子と判定する。

ニンジン種子からはしばしば *Alternaria* 属菌と類似する *Stemphylium* 属菌と *Ulocladium* 属菌が出現し、判定に混乱が生じることがあるので注意する。前者の分生子は隔膜数が極めて多く中央部が少しくびれた俵形で、節には少し膨らんだ環紋と呼ばれる着色部があること、後者の分生子は *Alternaria* 属菌に比べ小型で、分



図-1 ニンジン種子上の *A. dauci*

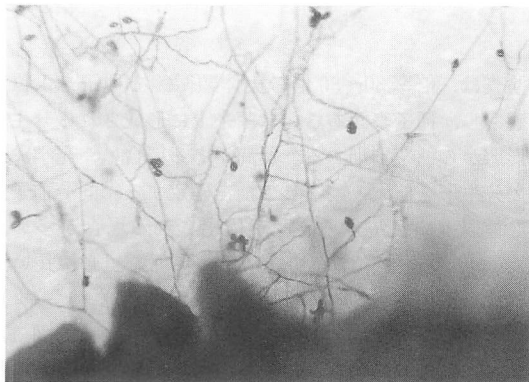


図-2 ニンジン種子から出現した *A. radicina*

生子柄に接する端が尖っていることで、判別できる。

(2) 培養法

Malt agar (Difco や Oxoid 製または同等品, yeast extract を含まない) を15~20 ml 分注した径9 cm シャーレを準備し、シャーレ1枚当たり10粒を培地上に無菌的に置床する。これを、 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、近紫外線の12時間照射と12時間暗黒の反復で10日間培養する。置床する種子の間隔および近紫外線の照射は、前述した凍結プロッター法に準じる。

検査は、倍率30~80倍の実体顕微鏡を用い、前述した病原菌の菌糸および分生子の形態やコロニーの形態を観察して種を判定する。*A. dauci* のコロニーは淡灰色の気中菌糸を伴う褐色~暗褐色を呈し、培地内に褐色の色素を生産する。*A. radicina* のコロニーは豊富な気中菌糸を伴う暗灰色~灰黒色の不規則形または円形で、培地裏面から見ると青みがかった黒色を呈する。合成培地を用いる本法では菌の生育が旺盛で、プロッター法に比べて形成される分生子数が非常に多い。しかし、用いる培地は非選択性であるため、種子のロットによっては激しい雑菌の生育により目的とする菌の生育が妨げられ、検査の判定が困難な場合があるので注意が必要である。

2 エンドウ種子における *Ascochyta pisi* の検査法

褐斑病の病原菌、*A. pisi* に対する検査では培養法が用いられる。検査には400粒の種子を供試する。

検査用種子は有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬する。径9 cm (高さは2 cm のものがよい) のシャーレに市販のジャガイモせん汁寒天培地(PDA) または Malt agar を15~20 ml 分注した後、表面殺菌処理した種子をシャーレ1枚当たり10粒ずつ培地上に無菌的に置床する。これらを $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、暗黒下で7日間培養する。

検査は種子1粒ずつ肉眼で観察し、種子表面に現れる白色の菌糸や菌叢の有無によって判定する。本菌の特徴はコロニー周縁部の菌糸が波状にカールするという点にあり、疑わしい場合には倍率25倍の実体顕微鏡でコロニー周縁部を観察する(図-3)。罹病した種子では白色菌糸が種子の表面を覆う場合がしばしば見られるが、培地上のコロニーは直径20~30 mm 程度と小さい。PDA におけるコロニーを培地の裏側から見ると、中心付近部は暗いオレンジ色~褐色でムラがなく、周縁部はクリーム色を呈する。種子と培地が接する付近には大きさ100~250 μm で褐色の柄子殻が見られる場合があり、柄付き針などで押しつぶすと柄胞子が放出される。この柄胞子は、大きさ約 $12 \times 4.5 \mu\text{m}$ 、無色で両端が丸みを帯び、少し湾曲した円筒状で、隔膜を一つもち、隔膜部

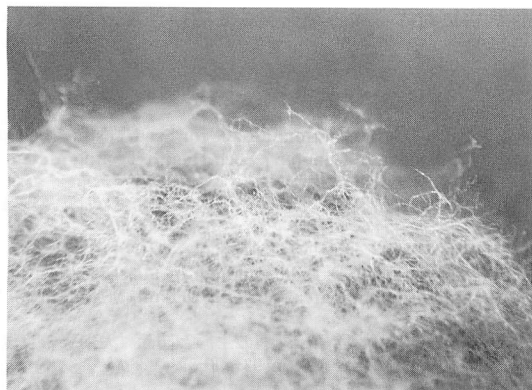


図-3 エンドウ種子上の *A. pici* の菌糸

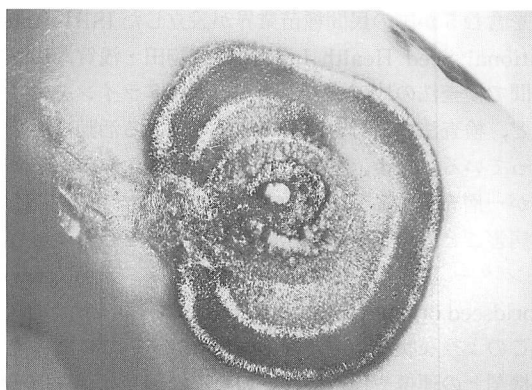


図-4 インゲンマメ子葉上の炭疽病斑と胞子粘塊

で少しくびれる。罹病種子の中には菌糸の生育が遅く、種子表面にわずかに伸長した菌糸が実体顕微鏡下で観察されることがある。この場合には、培養期間を延長して再検査を行うことが望ましい。

検査種子からは、本菌に類似した白色菌糸をもつ *Mycosphaerella pinodes* (褐紋病菌) と *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (すそ腐病菌) が出現することがある。判定に迷った場合は、PDA または 10% オートミール加用寒天培地に移植し、BLB ランプまたは蛍光灯を 12 時間照射しながら 20°C で培養する。*A. pisi* を含む 3 種の菌は PDA 上で容易に柄子殻を形成する (LAWYER, 1984)。*P. medicaginis* var. *pinodella* の柄胞子は *A. pisi* のそれに比べて明らかに小さく、そのほとんどが単胞であることから、両者を識別できる。一方、*M. pinodes* と *A. pisi* の柄胞子は大変似ており明確に区別するのは困難であるが、柄子殻から浸出する胞子塊が前者では淡黄色であるが後者ではニンジン色を呈した赤色 (carrot red) であることで識別可能である。

本検査で用いる培地は非選択性であるため、ニンジン種子の場合と同様に雑菌により判定が困難な場合があるので注意が必要である。

3 インゲンマメ種子における *Colletotrichum lindemuthianum* の検査法

炭疽病の病原菌、*C. lindemuthianum* に対する検査では、ペーパータオルの間に種子を挟んで培養する方法が用いられている。検査には 400 粒の種子を供試する。

検査用種子は有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 10 分間浸漬し、あらかじめ表面殺菌しておく。滅菌水で湿らせた 2 枚重ねた横長のペーパータオル (大きさ 350×450 mm) の上に種子 50 粒を置床し、その上を湿らせたペーパータオル 1 枚で覆う。種子とペーパータオルを密着させた後、ペーパータオルを端をそろえる

ようにして横に折り畳み、さらに縦にもう一度同様に折り畳む。ペーパータオルはあらかじめ折り目を付けておき、この折り目を避けるように種子を並べるとよい。折り畳んだペーパータオルを容器に入れ、保湿のためにポリエチレン製シートで上を覆い、20±2°C、暗黒下で 7 日間培養する。

検査は、ペーパータオルから種子を取り出して種皮を取り除いた後、肉眼で子葉を観察し、明瞭な縁をもつ黒色で凹陷した斑点を探す。この黒色斑点が見つかったらただちに、あるいは 20°C、12 時間の近紫外線照射下で 1~2 日間培養した後、倍率 25 倍の実体顕微鏡で黒斑部を観察する。本病原菌による病斑であれば斑点上に鮭肉色の胞子粘塊が見られ (図-4)、さらに粘塊の中に黒褐色の剛毛 (約 6×100 μm) が見られる場合がある。この胞子粘塊部を柄付き針でかき取り光学顕微鏡で観察すると、無色、単胞で 1~2 個の油滴をもつ長楕円形 (約 20×5 μm) の分生子が認められる。

これらの特徴をもつ黒色の陥没斑点が認められる種子を汚染種子とする。

種皮を除去した子葉では、淡褐色~褐色の不規則で陥没程度の軽い斑点がしばしば見られるが、本病原菌による黒色・凹陷病斑とは明らかに区別できる。おそらく種子精選時の打撲によるものであろう。

おわりに

種子の取引で「健康証明」が求められている病害は多いものの、ISTA が認証している国際標準検査法は作物および病害の種類ともに十分とはいえない状況にある (表-1)。我が国の種苗会社からも、野菜や花きの病害検査の要求が多いのが現状である。標準検査法を検討する ISTA の植物病害委員会 (Plant Disease Committee) では新たに病害検査法認証プログラムを策定し、また日

本を含む5か国の民間種苗業界が設立したISHI (International Seed Health Initiative; 駒田・浅賀, 1998) の間で検査法の比較試験に関するガイドラインを設けるなど、検査法の改訂や病害の追加に関する活動を活発に行っている。今後、ISTA Rulesに記載される標準検査法が一層充実することを強く期待する。なお、ISHIでは病害ごとの検査法を独自のマニュアルとしてまとめ、インターネット上で公表している (<http://www.worldseed.org/phytosanitary.htm>)。

このような状況の中、種苗管理センターでは関係する諸機関との連携や種苗会社との交流を図りながら種子伝

染性病害に対する検査を充実させていきたいと考えている。

参考文献

- 1) ISTA (2003): International Rules for Seed Testing, Edition 2003, Annexe to Chapter 7 Seed Health Testing Methods, ISTA, Switzerland.
- 2) 君島悦夫 (1999): 種子伝染病の生態と防除 (大畑貫一編), 日本植物防疫協会, 東京, p. 97~105.
- 3) 駒田 且・浅賀宏一 (1998): 植物防疫 52(1): 23~30.
- 4) LAWYER, A. S. (1984): Compendium of Pea Disease, American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA, p. 11~15.
- 5) 末松章男 (1999): 種子伝染病の生態と防除 (大畑貫一編), 日本植物防疫協会, 東京, p. 92~96.

登録が失効した農薬 (15.10.1~10.31)

掲載は、種類名、登録番号: 商品名 (製造業者又は輸入業者) 登録失効年月日。

〔殺虫剤〕

- エチルチオメトン・チオシクラム粒剤
15843: エカマート粒剤 (三共アグロ(株)) 2003/10/31
16361: エカマート粒剤 (北海三共(株)) 2003/10/31
- カルタップ・ブプロフェジン粉剤
17936: 日農アブロードパダン粉剤DL (日本農薬(株)) 2003/10/21
- シフルトリン液剤
17109: バイスロイド液剤0.5 (バイエルクロップサイエンス(株)) 2003/10/25
- スタイナーネマ・クシダイ水和剤
19756: 芝市ネマ ((株)クボタ) 2003/10/21
- ダイアジノン粉剤
15232: 日農ダイアジノン粉剤3 DL (日本農薬(株)) 2003/10/8
15331: サンケイダイアジノン粉剤3 DL (琉球産経(株)) 2003/10/21
- チオジカルブ水和剤
17088: 日産ラービン水和剤75 (日産化学工業(株)) 2003/10/25
17091: トモノラービン水和剤75 (シンジェンタ ジャパン(株)) 2003/10/25
- チオジカルブ粉剤
17096: 三明ラービン粉剤3 DL (三明ケミカル(株)) 2003/10/25
- チオジカルブ粒剤
17104: シオノギ・ラービンペイト2 (バイエルクロップサイエンス(株)) 2003/10/25
- テトラジホン・マラソンくん煙剤
6557: テデオンの煙霧剤 (アグロ カネショウ(株)) 2003/10/22
- フェンプロパトリンくん煙剤
17119: 住化ロディーくん煙顆粒 (住友化学工業(株)) 2003/10/25
- フェンプロパトリン・MEP 水和剤
17927: アグロスミロディー水和剤 (住友化学工業(株)) 2003/10/8

- ホサロン・DDVP 乳剤
14196: ランベック乳剤 (シンジェンタ ジャパン(株)) 2003/10/16
- モノクロトホス粒剤
14179: サンケイアルフェート粒剤 (サンケイ化学(株)) 2003/10/12
14180: 日農アルフェート粒剤 (日本農薬(株)) 2003/10/12
- D-D・クロルピクリン剤
12966: シェルネマクロペン油剤 (シー・エス・ジェイ(株)) 2003/10/1

〔殺菌剤〕

- 水和硫黄剤
17947: イオウゾル (三菱商事(株)) 2003/10/21
18820: バイエルサルファーゾル (バイエルクロップサイエンス(株)) 2003/10/20

〔殺虫殺菌剤〕

- エトフェンプロックス・MEP・イソプロチオラン粉剤
19731: フジワンスミチオントレボン粉剤DL (日本農薬(株)) 2003/10/21
- カルタップ・ブプロフェジン・フルトラニル粉剤
17941: アブロードパダンモンカット粉剤DL (日本農薬(株)) 2003/10/21

〔除草剤〕

- イマザビル・テトラピオン粒剤
18817: ACCブッシュロン粒剤 (BASFアグロ(株)) 2003/10/20
- MCPA プチル乳剤
13173: 石原ヤマクリーンM乳剤 (石原産業(株)) 2003/10/30

〔植物成長調整剤〕

- オキシエチレンドコサノール水和剤
14188: ミドリナール (東邦化学工業(株)) 2003/10/15