

トピックス

種子伝染性病害をめぐる最近の国際動向 V

タキイ種苗(株) ^{しお}塩 ^み見 ^{ひろし}寛
 (株)サカタのタネ ^{い がらし}五十嵐 ^{みつる}充 ^{かく}・加来 ^{ひさとし}久敏

はじめに

種子病害検査を指して欧米で使われている「seed health testing」に対して、我々は「種子健全性検査（あるいは健全種子検査）」という言葉を用いている。この種子健全性検査法とサンプルサイズを国際的に統一するために、種苗業界が中心になって1994年に組織された国際健全種子推進機構（International Seed Health Initiative : ISHI）とその活動については、本誌記事（駒田・浅賀，1998；浅賀・駒田，2000；駒田ら，2000；塩見・五十嵐，2005）で随時紹介してきた。今回はこれまでの成果を取りまとめ、新たに始まった取り組み、検査法やサンプルサイズに対するISHIの考え方を中心に紹介する。さらに、ウリ科作物で最重要の種子伝染性病害である果実汚斑細菌病について、現在用いられている検査法を比較する形で、ISHIの取り組みを具体的に紹介する。

I ISHIが策定した検査法と現在の取り組み

ISHIには野菜、穀類、牧草の3つの組織があるが、最も活発に活動しているのは野菜を担当するISHI-Vegである。以下、ISHI-Vegの活動を中心に紹介する。ISHI-Vegで実際に検査法策定作業を進める技術調整グループ（Technical Coordination Group : TCG）の会議は9ヶ月ごとの持ち回りであり、いちばん最近では2007年9月にスイスのニヨンで開催された。次回は本年6月イスラエルの予定である。メンバーは現在38名で、07年より加来が加わって、日本からは我々3名である。

ISHIが世界の種子取引の75%以上を占める5カ国（フランス、オランダ、米国、イスラエル、日本）で組織されていること、さらに種苗業界の国際組織である国際種子連盟（International Seed Federation : ISF）の傘下にあることから、ここで採択された検査法は、すなわち実質的な国際標準法といえる。しかし、さらに権威づ

けるために、各国政府機関が加盟する国際種子検査協会（International Seed Testing Association : ISTA）に送られて、ISTA検査法として採択されることになっている（SHEPPARD and WESSELING, 1998）。

これまでにISHIで策定しISTAで採択された検査法は、ニンジン黒葉枯病・黒斑病、アブラナ科黒腐病など表-1の9病害である。これらの検査法マニュアルはISTAのホームページ（www.seedtest.org）で公開され、順次、国際種子検査規定（International Rules for Seed Testing : ISTA Rules）として出版されている。

また、表-2のレタスのLMVとトマトのPepMV（Pepino mosaic virus, 国内未発生）は、すでに実施した比較試験のラボ数が少なかったり、汚染種子入手が困難で統計処理できるだけの十分なデータが取れていないため、現状ではISTAに提案できないが、ISTA提案のための比較試験を再度行うことをあえてせずにISHI法にとどめることを選んだものである。

これらのISHIで策定された検査法は、米国の種子健全性システム（National Seed Health System : NSHS）でも順次採用されており、同システムで現在までに規定された52病害の検査法のうち9件はISHI法である。

表-3が現在取り組んでいる病害と候補の検査法である。本年はトマト、トウガラシのTobamovirus（TMV, ToMV, PMMoV）の生物検定法（タバコ葉での局部壊死斑形成で確認）について、ISTA提案のための最終の比較試験が実施されることになっており、日本からは（独）種苗管理センターがこれに参加する。アブラナ科黒腐病とニンジン斑点細菌病については、すでにISTA採択されているが、検出感度の向上、あるいは検査時間の短縮のために、Bio-PCR（種子抽出液を培地上で短期間培養し、回収してPCR）の検討が進められている。

ISHIではこれらの検査法について、仮マニュアルができた段階からISFホームページ（www.worldseed.org）で公開し、意見を求めている。

II ISHIで求める種子健全性検査法

ISHIでは検査法の条件を明文化しているわけではないが、TCG会議の議論を通して次のような条件が見えてくる。

Current Status in Seed Health in the World V. By Hiroshi SHIOMI, Mitsuru IGARASHI and Hisatoshi KAKU

（キーワード：種子伝染性病害，種子健全性検査，国際健全種子推進機構（ISHI），国際種子検査協会（ISTA），ウリ類果実汚斑細菌病）

表-1 ISHIで策定しISTAで採択された検査法

作物	病名あるいは病原菌	検査法	採択年
ニンジン	黒葉枯病	プロッター法あるいは培地に種子置床	2002
ニンジン	黒斑病	プロッター法あるいは培地に種子置床	2002
ダイズ	フォモプシス腐敗病ほか <i>Phomopsis</i> による病害	培地に種子置床	2002
アブラナ科	黒腐病	種子抽出液を選択培地に塗布	2004
ニンジン	斑点細菌病	種子抽出液を選択培地に塗布	2005
インゲンマメ	葉焼病	種子浸出液を選択培地に塗布	2006
インゲンマメ	かさ枯病	種子浸出液を選択培地に塗布	2007
エンドウ	PSbMV	種子磨砕抽出液で ELISA	2007
エンドウ	PEBV	種子磨砕抽出液で ELISA	2007

表-2 ISHI法に留めてISTA提案していない検査法

作物	病原菌	検査法
レタス	LMV	種子あるいは発芽苗の磨砕抽出液で ELISA
トマト	PepMV	種子磨砕抽出液で ELISA

①検出感度が高いこと：例えば1万粒の中に1粒の汚染種子混入でも検出できること。②選択性が高いこと：対象病原菌のみを検出できるだけでなく、接種試験によらなくても病原性の有無が判断できればさらによい。③再現性と安定性が高いこと：検査のたびに、また検査員や検査ラボが代わっても結果がふれることなく、同じ種子ロットであればいつも同じ結果が出ること。④結果の評価方法が簡単で明確であること。⑤大きなサンプルや多くの種子ロットでも取り扱いが容易であること。⑥検査に要する（実際の作業時間だけではなく結果が出るまでの）時間が短いこと。⑦検査スペースが少なく済むこと。⑧検査費用が安いこと。

このうち検出感度と選択性は選択培地試験の場合に相反することが多く、選択性を高めると得られるコロニー数が減少したり、コロニーが小さくなって判別が難しくなることがある。また、トマトかいよう病菌のように菌株にバリエーションが大きい病原菌では、選択性を高めすぎると選択培地で生育できないことや、PCRプライマーが適合しないというように検出できない菌株が増えてくる可能性がある。

これらの8条件のほかに、検査手順が少ないことが望ましい。手順が多いと各段階でロスが生じ、病原菌回収率の低下、つまりは検出感度の低下につながる。また、試験のばらつきを生じて再現性を低下させ、さらには検査時間が長くなり、検査経費も上昇することになる。

TCGでの現在の議論の中心は、検査中の腐生菌をいかに抑えるかである。検査種子に元々腐生菌が多いときだけでなく、サブサンプルサイズ（後述）が大きい場合

や、検査手順の中で病原菌を増殖させたり遠心濃縮する場合などは、病原菌だけではなく腐生菌も増殖・濃縮することになり、それが検出感度の低下を招くことになる。

III サンプルサイズの考え方

例えば元種子ロットから1万粒サンプリングし、1,000粒×10反復に分けて検査する場合、この1,000粒をサブサンプルサイズ、総数の1万粒をサンプルサイズという。

サンプルサイズは、病原閾値 (inoculum threshold) から決定されるものである。その閾値とは、実際栽培において汚染種子が原因で発病し、経済的な被害を与えるときの最小の種子汚染程度である (KUAN, 1988)。従って、その最小種子汚染程度以下 (zero tolerance) であることを保証するためには、何粒検査をすればよいかサンプルサイズになる。本来は、圃場や実験室での試験や疫学的データに基づいて設定されるべきものである。また、気候、栽培環境、栽培方法、品種などによって異なるものであり、さらに種苗会社において、その種子ロットをどこに売るか、各社でどのようなリスクマネジメントが取られているかなどでも変わってくるものである。ISHIではこれらのデータや各社の経験値に基づいて、最小推奨サンプルサイズを規定し、あとは各社の判断で検査粒数を上乘せしてもよいとした。

一方、サブサンプルサイズはその検査法の検出感度、検査費用、さらには作業上の処理可能粒数などで決まる。種子ごとの汚染程度に違いがあるため本来単純なものではないが、検出感度だけについてみると、例えば、その検査方法によって1,000粒中1粒の汚染種子混入が検出限界ならば、最大サブサンプルサイズは1,000粒ということになる。

ISHIでは検査法策定対象病害のうち17病害において、最小推奨サンプルサイズと最大サブサンプルサイズを規定し、検査法マニュアルに明記している。

表-3 ISHIで検査法策定中の病害と候補の検査法

作物	病名あるいは病原菌	検査法など
インゲンマメ	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	PCR
エンドウ	つる枯細菌病	選択培地
アブラナ科	黒腐病	選択培地法 (ISTA 法) を処理 種子検査のため改良 Bio-PCR
ニンジン	斑点細菌病	Bio-PCR の追加
コーンサラダ	べと病	Grow out, 洗浄液検鏡
	<i>Acidovorax valerianellae</i>	プロッター, Grow out
タマネギ	灰色腐敗病	選択培地
トマト, トウガラシ	斑点細菌病	選択培地
	Tobamovirus	生物検定
トマト	かいよう病	選択培地, Bio-PCR
ウリ類	果実汚斑細菌病	Sweat-box, IMS-PCR
	つる枯病	プロッター
	SqMV	ELISA

IV ウリ類果実汚斑細菌病 (BFB) の 種子健全性検査法

ウリ科作物で最重要の種子伝染性病害である本病の種子健全性検査において、世界で最も信頼されているのが米国の種子検査会社 STA Laboratories の検査である。同社は Greenhouse grow out 法を採用しており、これは温室で箱播きし、発芽後は湿度 70% 以上、24 ~ 35℃ (最適は 29℃) を維持して、18 日目あるいは第 1 本葉展開まで発病を確認する方法である (図-1)。水浸状病斑、立枯れやその他の疑わしい発病株については、イムノストリップ、ELISA や PCR、さらに菌株を分離して陽性対照菌株とのコロニー比較、最終的には接種試験で病原性の確認が行われる。日本を含めて世界の種苗会社が STA に BFB 検査を依頼しており、専用の温室数棟がこれに充てられている。

一方、オランダの種子検査機関 Naktuinbouw は 05 年からスイカとメロンを対象に Sweat-box 法での検査を開始した。これは密閉できる専用容器に播種し、28℃で密閉して 12 日目まで苗での発病を確認するものである (図-2)。こちらも疑わしい発病株は、IF (蛍光抗体法)、PCR と接種試験で確認される。

BFB は各国がその発生、まん延を警戒している病気であるため、Greenhouse grow out 法は国によっては許可されない可能性があること、また、発病最適環境を維持するのが難しいことから、ISHI においては Sweat-box 法での標準法策定を目指している。一方で ISHI 米国メンバーは、IMS (Immuno-magnetic separation : 免疫磁性体による分離) (WALCOTT and GITAITIS, 2000) に



図-1 STA Laboratories での Greenhouse grow out 法による BFB 検査

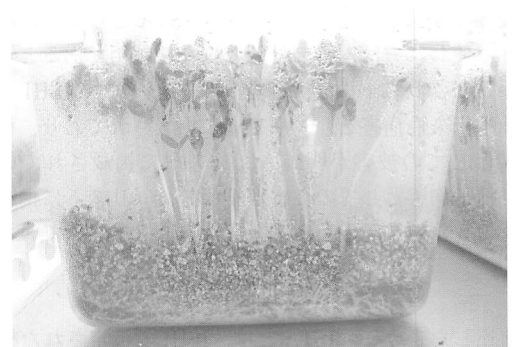


図-2 Naktuinbouw での Sweat-box 法による BFB 検査

取り組んでおり、次回 TCG 会議でこれら検査法のデータを解析することになっている。

さらに種苗管理センター佐藤検査役が Sweat-bag seedling 法 (佐藤ら, 2006) について、06 年 (京都) および 07 年 (ニヨン) の TCG 会議で紹介し、出席者

の注目を集めた。この方法は、種子を密閉した袋の中で28～30℃において発芽・生育させ、10～14日後にそこから回収した抽出液について、選択培地あるいはPCRで検査するというものである。発病で判断するのではなく、発芽苗を増菌に使っているのがポイントである。幼苗期に病徴が見えにくく、接木時に穂木に伝染させるおそれのある台木カボチャや台木トウガンの検査に向くと考えられる。ISHIが検討対象とする検査法に取り上げるようアピールを続けている。

V そのほかの取り組み

1 種子健全性検査における種子処理の扱い

処理種子（消毒済み）で、内部に残存している病原菌までは検出できなかったという事例が明らかとなった。ISTAではどの検査法にも無処理（無消毒）の種子を用いることと規定しているが、実際には処理種子を検査する必要が出てくる。そこで、ISHIでは各病害検査法でどのような処理種子ならば検査対象にできるか、また、逆に検査中の腐生菌増殖を抑えるためには、どのような処理ならば適用してもよいかを明確にし、検査法マニュアルに明記した。

一方で、アブラナ科黒腐病検査法のように、ISHIの規定でも処理種子が検査できないものについて、処理種子を対象にした検査法への改良を進めている。

2 ISTA 種子病害リストを再分類

ISTAが出版している“An Annotated List of Seed-borne Diseases” (RICHARDSON, 1990)は、種子病害に関する情報を取りまとめたリストであるが、これに掲載されていることだけを根拠に、特に途上国から種子検査や検疫要求が出されることがある。ISTAとしては、このような使われ方は本来の目的ではなく誤用であると考えているが、リスト改定の予定はない。そこでISHIとして種子伝染性病害を、①リストに掲載されており、種子病害としての被害が明確、②リストに掲載されているが、種子病害としての被害が不明確、③リストに掲載なし、の3分類し、現在、第一次案を取りまとめている。

VI ほかの国際機関との関係

前述したように、ISTAとは、ISHIで策定された検査法をISTA検査法として採択する流れができており、これまでに9病害が採択、さらに今後も次々と増えていく。その結果としてISTA検査法が充実することになり、これをISTAとしても歓迎している。両者の関係は良好であり、検査法策定のための比較試験を共催するケースも出てきている。ISTAとしても検査法の充実以外に、種

子健全性シンポジウムの定期開催、検査会社や種苗会社の検査室の認証などの積極的な取り組みを行っている。

国連食糧農業機関（Food and Agriculture Organization of the United Nations : FAO）に対しては、99年の植物防疫委員会会議のロビー活動で、ISHIで策定した種子健全性検査法を種子品質検査と輸出入検疫で共通して用い、共通様式の証明書を用いるよう提案を行った。また、国際植物防疫条約（International Plant Protection Convention : IPPC）に対しては、05年の植物検疫措置に関する暫定委員会（International Commission for Phytosanitary Measures : ICPM）において、ISHIの活動を紹介し、植物検疫においてもISHI検査法を採用するように提案した。このように関係する機関が多く、それらとの協調が求められている。

おわりに

種子伝染病の重要性の高まりとともに設立され、国際的に統一された標準検査法とサンプルサイズの策定を中心に取り組んできたISHIの活動は、同時期に活発化したISTAの活動、各国での種子健全性システム確立の動きなどと同調しながら進んできた。欧米から遅れていた国内の検査体制においても、種苗管理センターでISTA認証検査病害と依頼検査対象病害の充実が図られつつあり、早期に欧米の検査機関（会社）並みの検査体制が確立されることを望んでいる。また、野菜茶業研究所の白川氏を中心に、BFB防除に関する農林水産研究高度化事業（06～08年度）が進行中であり、その中では健全種子の採種法、種子健全性検査法、種子消毒法の開発など種子の側からの取り組みが行われており、その成果に期待している。

種子病害の分野は国内ではまだまだマイナーであり、今後も、種子健全性検査に関する世界の動向を国内関係者に伝える努力を続け、国内の種子病害研究および種子健全性検査の向上のため、少しでもお役に立てればと思っている。

引用文献

- 1) 浅賀宏一・駒田 旦 (2000) : 植物防疫 54 : 429 ~ 433.
- 2) 駒田 旦・浅賀宏一 (1998) : 同上 52 : 23 ~ 30.
- 3) ————ら (2000) : 同上 54 : 518 ~ 522.
- 4) KUAN, T. L. (1988) : *Phytopathology* 78 : 867 ~ 868.
- 5) RICHARDSON, M. J. (1990) : *An Annotated list of seed-borne diseases, 4th edition, ISTA, Zurich, Switzerland.*
- 6) 佐藤仁敏ら (2006) : 日植病報 72 : 311 ~ 312.
- 7) SHEPPARD, J. M. and J. M. B. WESSELING (1998) : *Seed Sci. & Technol.* 26 : 237 ~ 255.
- 8) 塩見 寛・五十嵐充 (2005) : 植物防疫 59 : 76 ~ 78.
- 9) WALCOTT, R. R. and R. D. GITATIS (2000) : *Plant Dis.* 84 : 470 ~ 474.