

サトウキビ側枝苗におけるサトウキビ黒穂病菌の検出

杉澤 武¹⁾・奥田 充²⁾・花田 薫²⁾・中里 工¹⁾

(¹⁾ 種苗管理センター沖縄農場・²⁾ 九州沖縄農業研究センター)

Detection of *Ustilago scitaminea* from sugarcane seedlings with lateral shoots.

Takeshi Sugisawa¹⁾, Mitsuru Okuda²⁾, Kaoru Hanada²⁾, Takumi Nakazato¹⁾ (¹⁾ Okinawa station, National Center for Seeds and Seedlings, Higashi, Okinawa 905-1202, Japan ²⁾National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan)

Key words : ITS, PCR, seedling with lateral shoots, sugarcane smut

緒 言

サトウキビ黒穂病菌 (*Ustilago scitaminea*) によって引き起こされるサトウキビ黒穂病（以下黒穂病）は、沖縄県における重要病害の一つである。本病は日本で最初に発生が報告された1908年からの20数年間と1980年前後に大発生した。抵抗性品種の導入により発生は沈静化したが、近年、感受性品種 Ni9 の普及に伴い沖縄本島中南部を中心に発生が拡大している。

黒穂病はサトウキビの若い芽に厚膜胞子が付着することで感染する（山内・上原, 1977）。その後、4~16カ月間の潜伏期間（山内, 1989b）を経て発病し、最終的に頂部分裂組織から鞭状物を出し、再び胞子を飛散させる。沖縄県における一次発生は4~8月であり、地下の株元から発病茎が出る。また、二次発生は10~2月であり、健全様の地上部の側芽から発病する（山内, 1978）。罹病茎や感受性品種の植え付け、株出しによって発生が拡大する（Ferreira and Comstock, 1989）。

サトウキビ側枝苗（以下側枝苗）は母木の梢頭部を切り取り、各節から出てくる側芽を増殖させ、苗に仕立てる。この側枝苗増殖は増殖率が高いこと、苗の生育が早い機械化しやすいこと、サトウキビの单収が向上することなどからサトウキビ種苗生産の効率化、迅速化への貢献が期待されている。しかし、このような種苗形態の変化により、従来行われてきた温湯消毒や肉眼による病徵判定が難しくなると考えられる。

そこで無病株を確保するための信頼性の高い方法を確立するため、PCR を用いた検定法について検討した。

また本試験を行うに当たり、黒穂病厚膜胞子を分譲していただいた沖縄県農業試験場さとうきび育種研究室の伊禮信研究員ならびに謝花治研究員に対し、厚くお礼申し上げる。

材 料 及 び 方 法

1. 側枝母木への接種及び摘心

供試品種は黒穂病抵抗性が弱い Ni9 を用いた。側枝母木は種苗管理センター沖縄農場の網室内で育成した茎を用いた。10茎を採苗し、地上部が5節になるように調整した。水に一昼夜浸して催芽処理をした後、地下部になる節の側芽を切り取り、2日間高湿度下でインキュベートしさらに発芽を促した。接種は有傷接種法で行った。すなわち、発芽し始めた側芽表面に針で軽く傷を付け、ペースト状の黒穂病厚膜胞子（約10⁸胞子/ml）を塗布した。10母木中5母木は5節中1節目の側芽に接種し、残りの5母木は3節目の側芽に接種を行った。接種後2日間高湿度下でインキュベートし、菌の進入を促した。その後1/2,000a ワグネルポットに挿苗し、側枝の伸長を促した。接種90日後に1次側枝を摘心し、2次側枝を誘導した。さらに接種140日後、病徵を観察した後、2次側枝を採取した。採取した側枝は-20°C 下で保存した。

2. 側枝の病徵観察

鞭状物が出てくる前の一般的な黒穂病の初期病徵としては草丈、茎径が小さくなる。また葉幅が狭くなるのに対し茎長や節間は長く、ススキ状に細長くなる等がある。さらに鞭状物が現れる3日前頃からは出穂様の止葉が出来る（渡辺, 1975；山内, 1973）。2次側枝を採取する直前にこれらの病徵について肉眼で観察を行った。

3. 黒穂病菌の培養及びDNA抽出

厚膜胞子を滅菌水で希釀し、1%素寒天培地上に薄くのばした。28°C 下で一昼夜インキュベートした後、培地上で発芽している単一の胞子を顕微鏡下で寒天ごと切り出し、PDA 培地上に置床した。28°C 下で2週間培養し、単一胞子由来の菌糸体を形成させた。菌糸体をピンセットで培地から引きはがし、CTAB 法（番, 1997）により

黒穂病菌 DNA を抽出した。

4. 特異的プライマーの設計

Bakkeren et al. (2000) の方法に従い、クロボキン網に広く共通するプライマー UNUP18S42 (5'-CGTAACAAAGGTTCCGTAGGTGAAC-3') と UNLO28S576B (5' CTCCTTGGTCCGTGTTCAAGAC G-3') を用い、抽出した黒穂病菌 DNA を鋳型として PCRを行った。PCR 反応条件は 94°C 2 分間を 1 サイクルの後、94°C 45 秒間・68°C 45 秒間・72°C 45 秒間を 30 サイクル、72°C 10 分間を 1 サイクル行った。検出された増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、rDNA(リボゾーム RNA 遺伝子) の 18S - 5.8S 間と 5.8S - 28S 間の ITS (internal transcribed spacers) 領域からサトウキビ黒穂病菌に特異的なプライマー対 UscITS1 (5'-AGGTGTGGCTCGCACCTGTCTA-3'), UscITS2 (5'-ATCCTCACCAACCACCAAAGTCCTGA-3') を設計した。

5. 側枝苗からの DNA 抽出及び PCR

採取した全ての側枝苗から葉身を切り離した。茎からは 1 g、葉身基部からは 0.1 g の組織片を切り出し、CTAB 法により DNA を抽出した。それらを 10 ng/μl に調整して鋳型とし、プライマー UscITS1, UscITS2 を用いて PCRを行った。PCR 反応は 95°C で 2 分間処理後、95°C 30 秒間・68°C 30 秒間・72°C 30 秒間を 30 サイクル行い、最終伸長を 72°C 10 分間行った。反応産物を 1% アガロースゲルで電気泳動し、増幅産物を観察した。

結果

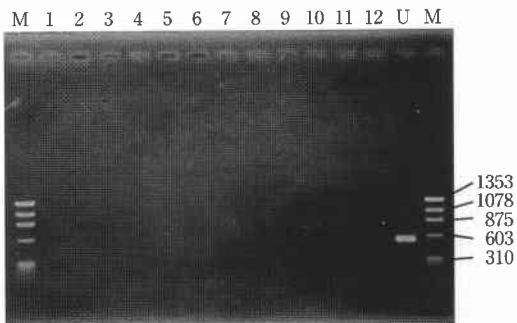
1. 黒穂病に感染した側枝苗の病徵觀察

黒穂病菌を接種した 10 母本 10 節のうち 9 節から 1 次側

枝が形成され、摘心によって 32 茎の 2 次側枝（以下接種側枝）が形成された（第 1 表）。一方、同じ 10 母本の無接種の 40 節のうち 26 節から 1 次側枝が形成され、摘心によって 77 茎の 2 次側枝（以下無接種側枝）が形成された。これら接種側枝および無接種側枝の形態の観察を採取直前に行ったが、慣行栽培に比べて植物体が極端に小さいため、草丈、茎径、葉幅、節間等に明確な差は認められず、発病の有無の判定はできなかった。仮茎長では接種側枝が無接種側枝よりやや大きくなる母本があった。しかし供試母本全体に共通する特徴とはいえない（第 1 表）。

2. 特異的プライマーによる PCR 増幅産物

単胞子由来の菌糸体から抽出した黒穂病 DNA を鋳型



第 1 図 サトウキビ黒穂病菌及びサトウキビ品種の PCR 増幅

M : size marker (ϕ X174DNA/BsuRI), U : *Ustilago scitaminea*

1 : NCo310, 2 : F161, 3 : F172, 4 : F177, 5 : IRK67-1,
6 : NiF4, 7 : NiF6, 8 : NiN7, 9 : NiF8, 10 : Ni9,
11 : NiTn10, 12 : Ni11

第 1 表 接種側枝と無接種側枝の 2 次側枝形成数と仮茎長

母木 No.	2 次側枝形成数	接種側枝		2 次側枝形成数 / 側枝形成節数	無接種側枝		
		仮茎長 (cm)					
		最小	最大		最小	最大	
1	5	19.7	26.9	9/2	1.0	12.9	
2	4	18.3	22.7	10/4	6.1	15.8	
3	6	9.9	31.8	10/3	4.0	12.1	
4	0	-	-	9/3	2.4	17.4	
5	1	13.3	13.3	8/2	10.7	14.9	
6	4	25.6	29.8	5/3	7.5	12.5	
7	4	10.1	13.8	9/3	4.1	14.0	
8	2	12.4	19.3	7/2	10.6	16.0	
9	2	3.3	27.8	0/0	-	-	
10	4	22.8	28.2	10/4	5.5	12.2	
計	32			77/26			

にし, UscITS1およびUscITS2を用いてPCRを行った結果, 約550bpの単一の増幅産物が検出された(第1図)。同じプライマー対を用いて, 健全なサトウキビ12品種のDNAを鑄型にPCRを行った結果, いずれの健全サトウキビDNAからも増幅産物は全く検出されなかった(第1図)。

3. 側枝苗からの黒穂病菌検出

側枝苗の茎より抽出したDNAを鑄型にしてPCRを行った結果, 接種側枝32茎中31茎から約550bpの増幅産物が検出された(第2表, 第2図)。無接種側枝77茎からは増幅産物は検出されなかった。

次に側枝苗の葉身基部より抽出したDNAを鑄型にしてPCRを行った結果, 接種側枝32茎中30茎から約550bpの増幅産物が検出された(第2表)。茎と同様, 無接種側枝からは検出されなかった。

第2表 黒穂病特異的プライマーを用いた検出

発生側枝数	特異的増幅産物検出数 ^{a)}	
	側枝	茎
無接種節	77	0 (0%)
接種節	32	31 (97%)

a) カッコ内は発生側枝数における特異的増幅産物検出数の割合



第2図 接種側枝苗からのサトウキビ黒穂病菌の検出

M : size marker (φ X174DNA/BsuRI)

U : *Ustilago scitaminea*, H : healthy sugarcane

a~e : 接種側枝, f~l : 無接種側枝

考 察

採取直前に行った2次側枝の病徵観察では接種側枝と無接種側枝に明確な差は認められなかったが, 設計したプライマー対を用いたPCRではほとんどの接種側枝から増幅産物が検出された。よって, 慣行の肉眼検定基準では黒穂病罹病側枝を検出することは難しいことが示唆された。これは側枝苗が摘心を繰り返すことによって増殖させる体系であるため, 慣行栽培の立毛株よりも極端

に小さくなり, 茎が細くなる, 節間が長くなる等の茎における初期病徵の確認が難しくなるためである。同様に葉数, 葉の発達が制限されるため, 葉における初期病徵の確認も難しくなる。接種側枝で仮茎長が大きくなつた節は接種時に側芽表面を針で傷つけたことが側枝伸長の刺激になったものと推察される。

供試した側枝以外の有傷接種を行った側枝苗では鞭状物を出したものがあった。その中のいくつかではやや立葉気味の草姿が数茎観察された(第3図)が, 健全側枝との明確な違いは確認されなかった。



第3図 接種側枝苗の草姿
接種5ヶ月後の3次側枝

第1図よりプライマー対 UscITS1と UscITS2はサトウキビDNAを増幅せず, 罹病株から黒穂病菌DNAのみを増幅することが確認された。山内(1989a)によつて日本における黒穂病菌は單一系統であることが示唆されていることから, 本プライマー対は国内におけるサトウキビ黒穂病罹病株に適応できると考えられる。

この増幅産物は仮茎長が僅か3.3cmの接種側枝からも検出された(第1表)。これにより未発達の側枝であつても茎からは黒穂病検出が可能であることが示唆された。母木No.5で形成された側枝一本で増幅産物が検出されなかつたが(第1, 2表), 原因として接種したもののが感染

に到らなかったことが考えられた。

また、茎で検出されたものの葉身で検出されなかつた接種側枝は、仮茎長が3.3cmの側枝のみ（第1、2表）であったことから、黒穂病菌が未発達な葉身には未移行であるか、葉内の菌濃度が検出可能なレベルに達していないことが推察された。しかし、その他の接種側枝葉身からは黒穂病菌が検出できたことにより、側枝苗を破壊することなく検定することが可能であることが判明した。また、黒穂病菌が分裂組織から葉鞘を通して葉身に拡がっていくことを考えると葉鞘基部からDNAを抽出した方が検出精度が高いと推察された。

ほとんどの接種側枝で葉身から増幅産物が検出されたにもかかわらず、隣接する無接種側枝からは増幅産物が検出されなかつた。これは黒穂病菌が接種側枝内での移行に比べ、側芽から母木への移行が非常に遅い（山内、1989b）ことを裏付けるものでもある。このため生育期間が慣行苗よりも短い側枝苗においては感染した側芽から隣接する側芽への菌糸の移動は難しいものと考えられた。また、母木の節間は梢頭部を除去しているために維管束部の消耗が早いこともその一因と考えられる。

現行の側枝苗の栽培体系では地上部が5～6節で増殖率が50～60倍（大田、2001）であり、1節につき平均10～12の側枝が生産される。よって一芽の感染から次代の罹病苗が10～12倍に増殖することになり、慣行栽培よりも急速に黒穂病が拡がることが危惧される。

そのための検定法として特異的なプライマーを用いた本PCR法が有効であり、摘出部位は側枝苗を破壊しない葉鞘基部が適していると考えられた。

引用文献

- Bakkeren, G., Kronstad, J. W., Levesque, C. A. (2000) Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia* 92 : 510-521.
- 番 保徳 (1997) イネのDNA・RNAの単離法、新版植物のPCR実験プロトコール (島本 功・佐々木卓治監修) 秀潤社 : pp. 34-37.
- 大田守也 (2001) 側枝苗増殖技術の確立、さとうきび新種苗増殖技術報告書 (沖縄総合事務局農林水産部編) : pp. 2-7.
- Ferreira, S. A., Comstock, J. C. (1989) Smut. In : Disease of Sugarcane Major Diseases. (Ricaud, C. eds) Elsevier (Amsterdam) : pp. 211-230.
- 渡辺文吉郎 (1975) サトウキビ黒穂病. 南西諸島病害虫調査報告書 (九州農試研究資料) 50 : 37-39.
- 山内昌治 (1973) 沖縄県におけるサトウキビ黒穂病の発生. 植物防疫27 : 194-196.
- 山内昌治 (1978) 沖縄県におけるサトウキビ黒穂病の発生推移. 沖縄甘蔗糖年報18 : 43-47.
- 山内昌治 (1989a) サトウキビ黒穂病の発生生態ならびに防除に関する研究. 沖縄農試特研報3 : 12-17.
- 山内昌治 (1989b) サトウキビ黒穂病の発生生態ならびに防除に関する研究. 沖縄農試特研報3 : 31-41.
- 山内昌治・上原勝江 (1977) サトウキビ黒穂病菌の植物組織内侵入について. 沖縄甘蔗糖年報17 : 5-8.

(2002年3月15日受領；6月29日受理)