

## サトウキビ側枝苗生産における サトウキビ黒穂病 PCR 検定方法の検討

杉澤 武<sup>1)\*</sup>・奥田 充<sup>2)</sup>・花田 薫<sup>2)\*\*</sup>・岩波 徹<sup>2)</sup>・中里 工<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup>種苗管理センター沖縄農場・<sup>2)</sup>九州沖縄農業研究センター)

**Examination of procedures for diagnosing *Ustilago scitaminea* infections on lateral shoot seedlings of sugarcane.** Takeshi Sugisawa<sup>1)</sup>, Mitsuru Okuda<sup>2)</sup>, Kaoru Hanada<sup>3)</sup>, Toru Iwanami<sup>2)</sup> and Takumi Nakazato<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup>Okinawa station, National Center for Seeds and Seedlings, Higashi, Okinawa 905-1202. <sup>2)</sup>National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192.)

**Key words:** lateral shoot seedling, spring crop, stalk length, sugarcane smut, summer crop

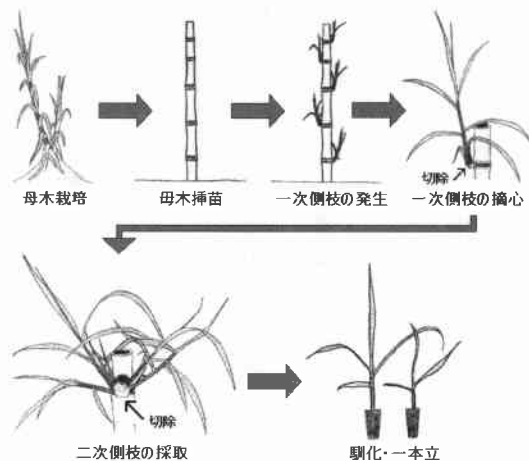
### 緒 言

サトウキビ黒穂病は *Ustilago scitaminea* によって引き起こされ、沖縄県における重要病害の一つである。本病は抵抗性品種の導入により発生が一時沈静化した、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。

サトウキビ側枝苗栽培 (第1図) は、従来の茎節苗を用いた栽培法よりも種苗の増殖率が高く、サトウキビ種苗生産の効率化や新品种の迅速な増殖等への貢献が期待されている。しかし、種苗形態が大きく変わるため、従来のサトウキビ黒穂病防除で行われてきた温湯消毒や肉眼診断による発病株の抜き取りが難しくなると考えられる。

サトウキビ側枝苗においてサトウキビ黒穂病菌の感染の有無を検定するために、より信頼性の高い特異的プライマーを用いた PCR による検出法が考案された (杉澤ら, 2002)。これによりサトウキビ黒穂病菌に感染した側枝苗からサトウキビ黒穂病菌の検出が可能になった。

サトウキビは大きく分けて春期と夏期に植付が行われる。このためサトウキビ種苗は春期と夏期に供給され、通常、その育成期間は1年程度である。これを現在検討



第1図 サトウキビ側枝苗生産工程

中のサトウキビ側枝苗を用いた栽培体系に当てはめると春に植付、翌春に収穫する場合、茎節苗植付が3月、鞘頭部切除が10月、一次側枝摘心が12月、二次側枝馴化が2月、ほ場への定植が3月となる。同様に夏に植付、翌夏に収穫する場合には茎節苗植付が10月、鞘頭部切除が5月、一次側枝摘心が7月、二次側枝馴化が9月、ほ場への定植が10月となる。以下、春に植付けて翌春に収穫する栽培体系の側枝苗生産を春植側枝苗、夏に植付けて翌夏に収穫する栽培体系の側枝苗生産を夏植側枝苗と表す。

サトウキビ黒穂病厚膜胞子の飛散ピークは5~6月と10~11月にあり、サトウキビ黒穂病は主に鱗片が硬化していない若い側芽から感染する (山内, 1989)。このため、春植側枝苗では植付から鞘頭部切除までの期間の母木に着生している側芽 (以後、一次側芽とする) が感染

\*現在 種苗管理センター西日本農場 岡山県笠岡市平成町91

\*Present address: Nishinohon station, National Center for Seeds and Seedlings, Kasaoka Okayama 714-0054

\*\*現在 農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台2-1-2

\*\* Present address: National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8602

の危険が高く、夏植側枝苗では一次側枝育成期間の一次側枝に着生している側枝（以後、二次側芽とする）が感染の危険が高くなる。それらの時期に感染したサトウキビ黒穂病菌を確実に検出する方法の確立が本病の蔓延防止に有効であると考えられる。本報では春植側枝苗区の一次側芽および夏植側枝苗区の二次側芽に接種を行い、伸長した二次側枝より効率的にサトウキビ黒穂病感染を検定する方法について検討したので報告する。

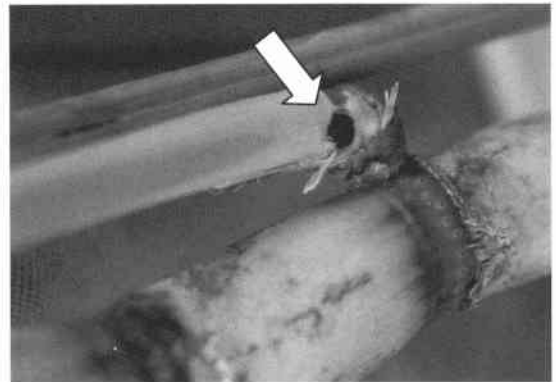
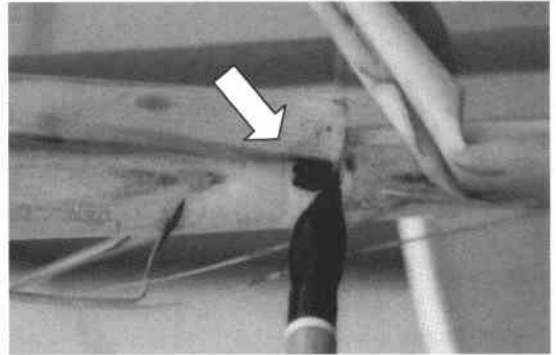
### 材料及び方法

供試品種は特性検定試験においてサトウキビ黒穂病抵抗性が「弱」のNi9を用いた。母木は種苗管理センター沖繩農場（沖繩県東村）の網室内で育成したサトウキビ茎を用いた。

春植側枝苗区には母木を10本供試した。母木は茎の梢頭部を切除し、地上部を5節に調整した。母木を水に一昼夜浸して催芽処理をした後、地下部に挿苗する節の側芽を切り取り、2日間室温・高湿度下でインキュベートし、さらに発芽を促した。その後、1節の一次側芽に接種を行った。接種は側芽に針で付傷後、サトウキビ黒穂病菌厚膜孢子懸濁液（約 $10^8$ 個/ml）を塗布する有傷接種法で行った（第2図）。その後2日間室温・高湿度下で菌の侵入を促した後、1/2000aワグネルポットに挿苗した。培土はほ場土壌（国頭マージ）を用いた。接種は11月14日に実施し、2月19日に一次側枝を摘心し、4月9日に二次側枝を採取した。

夏植側枝苗区は母木を7本供試した。採取した茎は梢頭部を切除し、地上部が6節になるように調整した。催芽処理は春植側枝苗区と同様に行った後、ワグネルポットに挿苗し、一次側枝の育成を行った。接種は挿苗後58日目に下位5節に着生した2～8芽の二次側芽の一つに行った。接種方法は春植側枝苗と同様に行った。接種は6月6日に行い、6月17日に一次側枝を摘心した。その後、7月29日に二次側枝を採取した。

春植側枝苗区、夏植側枝苗区ともに二次側枝を採取する前にサトウキビ黒穂病に特徴的な病徴（山内、1973）の観察を行った。採取した二次側枝は仮茎長を測定した後、全ての二次側枝の茎の基部からCTAB法によりDNAを抽出し、サトウキビ黒穂病菌のrDNAのITS領域を特異的に増幅するプライマー対UscITS1とUscITS2（杉澤ら、2002）を用いたPCRに供試した。さらに春植側枝苗区では全二次側枝の葉鞘基部、夏植側枝苗区では1節中で仮茎長が最長の二次側枝（以下最長側枝）の葉鞘基部からDNAを抽出し、PCRに供試した。葉鞘からのDNA抽出には、黄化していないもっとも外側の



第2図 サトウキビ側枝苗へのサトウキビ黒穂病胞子の接種

- ・上図は春植側枝苗，下図は夏植側枝苗を示す。
- ・春植側枝苗は1次側芽，夏植側枝苗は2次側芽へ接種を行った。
- ・矢印は接種部を示す。

葉鞘を供試した。PCR条件は杉澤ら（2002）に従った。反応産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動し、PCR産物を観察した。

## 結 果

### 1. 二次側枝の生産と病徴観察

春植側枝苗区では一次側芽にサトウキビ黒穂病菌を接種した10節のうち9節から合計32本の二次側枝が産生された。また、接種していない40節中26節からは合計77本の二次側枝が産生された。全ての二次側枝でサトウキビ黒穂病に特徴的な病徴は確認できなかった。

夏植側枝苗区では二次側芽にサトウキビ黒穂病菌を接種した35節中34節から119本、接種しなかった7節中6節から21本の二次側枝が産生された。以下、側芽に接種した節からの二次側枝を接種側枝、側芽に接種していない節からの二次側枝を無接種側枝とする。病徴観察の結果、接種側枝28節39本でサトウキビ黒穂病の病徴と判断される、茎長や節間が長くススキ状に細長くなる症状

(山内, 1973) が観察された。無接種側枝苗ではこの症状は観察されなかった。

## 2. PCR による検定

春植側枝苗区で産生された二次側枝109本の茎および葉鞘から抽出したDNAを用いてPCRを行った。茎から抽出したDNAでは31本の二次側枝からサトウキビ黒穂病菌に特異的な増幅が検出された。無接種側枝からは、特異的な増幅は検出されなかった。この結果、供試した10母木中8母木から、サトウキビ黒穂病菌が検出された。

夏植側枝苗区で特徴的な病徴が確認された二次側枝39本の茎から抽出したDNAを用いたPCRでは全て特異的な増幅が検出された。また接種は、節にある複数の二次側芽の1つのみに行ったが、接種していない二次側芽由来の二次側枝58本からも特異的な増幅が検出された。

## 3. PCR による検出と仮茎長の相関

春植および夏植側枝苗区でPCRにより特異的な増幅が検出された二次側枝と特異的な増幅が検出されなかった二次側枝(無接種側枝及び感染が成立しなかった接種側枝)の仮茎長を母木ごとに比較した(第3図)。その結果、サトウキビ黒穂病に感染した二次側枝の仮茎長は感

染していない二次側枝の仮茎長に比べて有意に長いことが示された(第1表)( $P < 0.01$ ;  $t$ -test)。

## 4. PCR による代表検定とDNA抽出部位

1母木内の最長側枝1本を代表検定サンプルとした「母木ごと」と、1節内の最長側枝1本を代表検定サンプルとした「節ごと」で、PCRによるサトウキビ黒穂病検出母木数を調査した(第2表, 第3表)。母木内に感染した二次側枝が1本以上存在する母木の検出精度を比較した結果、夏植側枝苗区では検出精度に差がなかったのに対し、春植側枝苗区では「母木ごと」と「節ごと」では検出精度に差がみられた。それぞれの区で茎から抽出したDNAと葉鞘から抽出したDNAを用いたPCRの検

第2表 サンプル部位による黒穂病検出率の違い

	供試母木数	最長側枝茎 PCR		最長側枝葉鞘 PCR	
		母木ごと <sup>a)</sup>	節ごと <sup>b)</sup>	母木ごと <sup>a)</sup>	節ごと <sup>b)</sup>
春植側枝苗	10	7	8	7	8
夏植側枝苗	7	7	7	7	7

a) 母木ごとの最長側枝を代表サンプルとしたPCR検出。

b) 節ごとの最長側枝を代表サンプルとしたPCR検出。

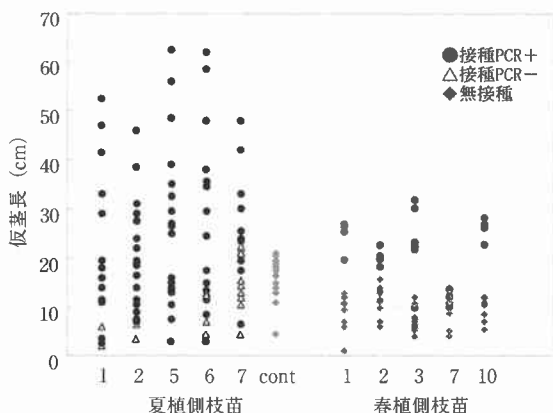
第3表 最長側枝の葉鞘を用いた黒穂病菌の検出

	母木No.	最長側枝葉鞘 PCR	
		母木ごと <sup>b)</sup>	節ごと <sup>c)</sup>
春植側枝苗 <sup>a)</sup> 1次側芽接種	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	-	-
	5	-	-
	6	+	+
	7	-	+
	8	+	+
	9	+	+
	10	+	+
夏植側枝苗 2次側芽接種	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	+
	7	+	+

a) 春植側枝苗の母木No.4は接種側枝がなかったため最長側枝が無接種側枝であった。春植側枝苗の母木No.5は接種したが感染しなかったものと考えられた。

b) 母木ごとの最長側枝を代表サンプルとしたPCR検出。+, -はそれぞれ黒穂病感染特異的な増幅の有無を示す

c) 節ごとの最長側枝を代表サンプルとしたPCR検出。+, -はそれぞれ黒穂病感染特異的な増幅の有無を示す



第3図 母木ごとの二次側枝仮茎長とPCR反応

- ・ X軸は各二次側枝を産生した母木No.を示す。
- ・ 夏植側枝苗のcontは画面の都合上、各母木の6節目(無接種側枝)を別途示したものである。

第1表 母木ごとの最大側枝の仮茎長

	春植側枝苗	夏植側枝苗
感染側枝 <sup>a)</sup>	25.0 ± 6.0	54.9 ± 7.0
非感染側枝 <sup>b)</sup>	14.2 ± 1.9	15.8 ± 5.9

数値は平均値 ± 標準偏差を示す。

春植・夏植側枝苗ともに感染側枝と非感染側枝において対応のあるt検定による有意差(1%)が認められた。

a) PCR産物が検出された2次側枝。

b) PCR産物が検出されなかった2次側枝(無接種を含む)。

出率に差はなかった。

## 考 察

種苗管理センター沖縄農場では年間で約160万本のサトウキビ原原種を配布している。よってPCR検出を用いたサトウキビ黒穂病検定を事業として導入した場合、導入する増殖段階によって規模は異なるが、検定数が膨大になる。このため効率の良いサンプリング方法を確立することは重要である。今回、サトウキビ黒穂病に罹病しているか否かを効率的に検定する条件がいくつか判明した。

二次側枝採取直前におこなった病徴観察において、春植側枝苗区では、PCR検出によりサトウキビ黒穂病菌の感染が確認された二次側枝においてサトウキビ黒穂病の特徴的な病徴は確認できなかった。一方、夏植側枝苗区では約40%でススキ状に茎が細長くなる初期病徴が確認された。この違いは接種後の平均気温の違いによって生じたと考えられた。すなわち春植側枝苗区が接種した梢頭部切除期以降は馴化するまで11～2月の低温期にあるのに対し、夏植側枝苗区は接種した一次側枝摘心期以降が7～8月の高温期にある。このため、サトウキビおよびサトウキビ黒穂病菌の生育が旺盛な時期に側枝育成期間がある夏植側枝苗区では特徴的な病徴が明確に現れたと考えられた。

PCRを用いたサトウキビ黒穂病菌感染検定において、春植側枝苗区では接種側枝以外からはサトウキビ黒穂病菌の特異的増幅が検出されなかった。これはサトウキビ黒穂病菌が側芽から母木への移行が非常に遅い(山内, 1989)ことを裏付けるものである。夏植側枝苗区では接種した二次側芽に隣接していた同一節内の二次側枝からも特異的増幅が検出された。これは夏植側枝苗区では一次側枝に着生している複数の二次側芽の間には十分な節間組織が形成されていないため、サトウキビ黒穂病菌が同一節内の無接種側芽にも侵入したものと推察された。

またサンプリング部位については、二次側枝の茎から抽出したDNAと葉鞘から抽出したDNAでは検出精度に差がなかった。このため、側枝苗を採取する必要のない葉鞘がDNAのサンプリング部位として適当であると考えられた。

夏植側枝苗区では感染側枝と非感染側枝の仮茎長の差が大きいため、供試した7母木全てで、母木内の最長側枝が感染側枝であった。このため夏植側枝苗区では母木内の最長側枝を母木全体の代表としてPCRに供試することで母木内の感染側枝の有無を検定することができると考えられる。

春植側枝苗区では母木ごとの感染側枝と健全側枝の最長側枝には有意な差があるが、最長側枝が感染側枝ではない母木があった。これは春植側枝苗区では側枝育成期間が低温期にあるためサトウキビとサトウキビ黒穂病菌の生育が抑制され、感染側枝と非感染側枝の仮茎長の差が小さくなったためであると考えられた。以上のことから、PCR検出を用いたサトウキビ黒穂病感染を効率的に検定する方法として、春植側枝苗においては、①節ごとの最長側枝をサンプルとする、②母木ごとに複数の二次側枝をサンプルとする、③側枝育成期間にマルチやトンネル等による加温措置により、感染側枝と健全側枝の仮茎長差を拡大させる等の対策が必要であると考えられる。

## 引用文献

- 杉澤 武・奥田 充・花田 薫・中里 工 (2002) サトウキビ側枝苗におけるサトウキビ黒穂病の検出. 九病虫研会報48: 14-17.
- 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 (1989) 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. 沖縄県試特研報3: 18-41.
- (2003年4月25日受領; 7月5日受理)