

サトウキビ白すじ病菌の探索・収集

農業環境技術研究所 農業環境インベントリーセンター

微生物分類研究室

對馬誠也

Collection of the Pathogenic Bacteria of Sugarcane Leaf Scald in Japan

Seiya TSUSHIMA

Microbial Systematics, National Resource Inventory Center,

National Institute of Agro-Environmental Sciences

Kannonnai 3-1-3, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

1. 目的

沖縄県では、すでに 1429 年には、中国南部から伝わったサトウキビを栽培し、生で食べ、煮て砂糖を作っていたとの記録が残されている。サトウキビの収穫面積は、昭和 55 年には 21,800ha に増加し (宮里, 1975)、現在、沖縄県の重要な基幹作物になっている。こうした中で、独立行政法人種苗管理センターからサトウキビの葉身や葉鞘が白化する原因の解明について依頼を受けた。サトウキビでとくに葉身・葉鞘の退緑や白化を起す病害としては、国内でモザイク病や白葉病、白すじ病、わい化病などが報告されているため (岸編, 1998)、それらの情報に基づき、送付された白化症状の葉身や葉鞘から分離を試みた。その結果、ごく一部の白化葉から細菌の噴出が確認され、その部位から白すじ病菌 [*Xanthomonas albineans* (Ashby 1929) Dowson] と思われる細菌が得られた。しかし、その後、さらに確認のため送付された白化した葉身や葉鞘などのサンプルから病原菌の分離を試みたが、細菌の噴出が無いものが多く、これらの白化したサトウキビの葉身等が全て白すじ病菌によるものかどうかを特定することはできなかった。また、得られた菌株を供試した接種試験による病徴の再現も困難であった。しかし、このように分離や接種による再現が難しいことは、これまで報告されている白すじ病の特徴に適合していること (Ricaud, 1989) から、種苗管理センターでは、少なくとも白化した葉や葉鞘の一部は白すじ病菌によって引き起こされている可能性が高いと判断し、現在、著者らと共同で現場で有効な簡易診断法の確立に向けた研究を行っている。こうした状況から、今後、本病の簡易診断法等を開発する上で、各種病原菌との比較を行うため、国内の本病原細菌を収集・保存することが重要と考えられた。本病原細菌に関しては、これ

までジーンバンク登録されていないことから、とくに今回は沖縄県を中心に本病原菌を探索・収集することにした。

2. 探索概要

2002年12月9日から13日の5日間にわたって、宮古島全域、沖縄本島では沖縄県東村、名護市を中心に沖縄本島全域において葉身や葉鞘等が白化した株や、株全体がわい化して白化したサトウキビを採集した（表1、図1）。収集した植物体は、冷蔵した状態で持ち帰り分離源とした。

表1. 探索・収集日程

年月日	行程	行動内容
H14.12.9	つくば市 平良市	移動（空路）
10	平良市および島全体	宮古島内一般圃場を探索
11	平良市 那覇市	移動（空路）
12	那覇市 玉城村 知念村 名護市 東村	那覇市等一般圃場を探索 種苗管理センター場内圃場および一般圃場を調査
13	東村 那覇市	移動（陸路）
	那覇市 つくば市	移動（空路）

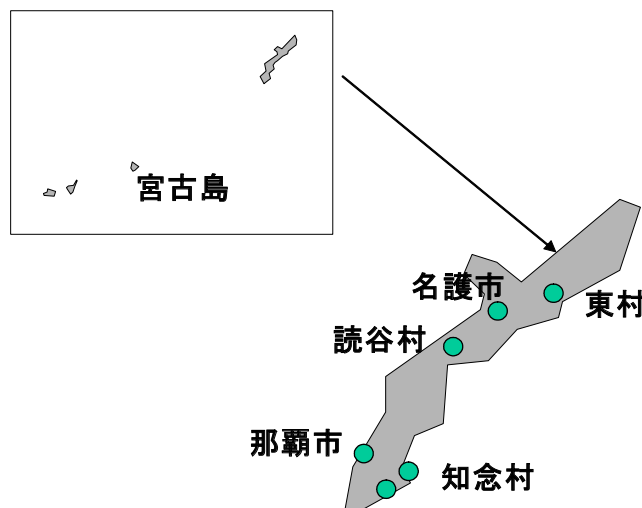


図1. 沖縄県における探索収集地点

3. 収集成果

1) 細菌の分離・同定

採集した多数の葉や葉鞘から変色した部位を切り取り、位相差顕微鏡下で菌泥の噴出を調べ、菌泥の噴出が確認された試料から細菌の分離を試みた。普通寒天培地、あるいは白すじ病菌の分離培地として報告されている Wilbrink 培地を用いて常法によって病原菌を分離した。25℃で7日間培養した後、優占的に出現した黄色のコロニーを釣菌した。

分離した黄色コロニーは、一部の菌はユニバーサルプライマー（63f および 1387r）を用いて、PCR法で16S rDNAを増幅し、その前半部分約700 bpについてシーケンスを行った。また、全ての菌について、白すじ病菌特異プライマー【5'CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG (PGBL1) and 5'GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC (PGBL2)】（Pan, Y.-B, 1999）を用いて特異的DNAの増幅を調べた。



図2. 宮古島で見られた葉身の一部が白化したサトウキビ（菌泥噴出はみられなかった）

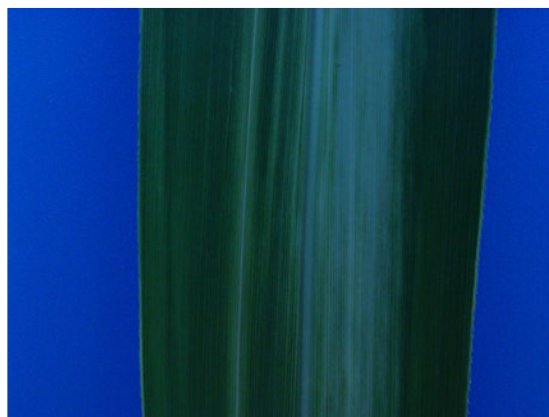


図3. 宮古島で採取された幅1~2 mmの白色ラインが見られるサトウキビの葉身（菌泥噴出は見られなかった）

2) 結果

宮古島および沖縄本島で主として葉身、葉鞘が白化したサトウキビの探索を行った（表2）。その結果、株の一部の葉身、葉鞘等が白化した株と、株全体が白化しているものが認められた。株全体が白化したサトウキビの多くは全体の生育が抑制され、わい化症状を呈し、新葉はすべて抽出しながら白化していた。また、一部の葉身が白化したサトウキビもときに全体の生育が抑制されていた。これらの葉身の一部に本病の特徴の一つと言われている葉脈に沿って白色ライン（ペンシルライン）が認められたが、この白色ラインにも幅や長さでサンプルによって違いが見られるとともに、菌泥噴出がみられるものと無いものがあつた（表1）。宮古島でもこれらの症状を呈するサトウキビが多数見られたが、葉身全体に広がる白色部、白色ラインとも菌の噴出は見られず、本病原細菌も分離されなかった（図2、3）。

そこで、症状別に葉身、葉鞘から細菌の検鏡観察と分離を行ったところ、本病の葉身における特徴的な症状の一つとされる「ペンシルライン症状」を呈するいくつかの葉身から菌泥が大量に噴出するのが認められた。これらの部位の磨砕液をシャーレに画線したところ、画線の高濃度区に黄色コロニーのみが多数出現した（図4、5）。これらの細菌について、16S rDNAやPCRによる特異バンドの検出を行ったところ、黄色コロニーの細菌は16S rDNAで白すじ病菌と高い相同性を示すとともに、PCRでも特異バンドが検出された。症状別菌泥噴出および本病原菌の分離結果と分離菌株一覧を表3、4に示した。

表2. 宮古島、沖縄本島での採集数と分離株数

採取地	試料数	分離株数
宮古島	20	0
沖縄本島		
東村	23	5
知念村	34	8
玉城村	41	7

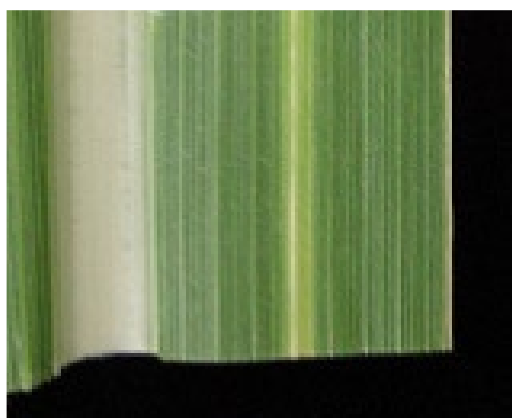


図4. 沖縄本島で見られた白色ラインのあるサトウキビの葉身（菌泥噴出あり。白すじ病菌が分離された。）

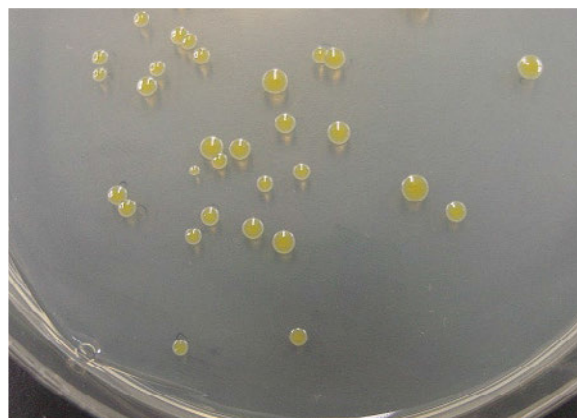


図5. 白色ラインから分離された白すじ病菌のコロニー

表3. サトウキビの症状と白すじ病菌分離状況

サンプル No.	採取場所	症 状	サブサンプル No.	検鏡、分離部位	細菌の噴出1)	白すじ病菌の分離
1	宮古島	全体に生育が悪くわい化し、とくに新葉の基部が白化している	1	白化した葉身	-	-
			2	白化した葉鞘	-	-
4	宮古島	上位葉はすべて葉身の一部ないし全体が白化している。白色ライン(幅1mm程度)と白色の中に褐色の条斑がみられる。	1	白化した葉身	-	-
			2	葉身の白色ライン	-	-
			3	葉身の褐色条斑	-	-
5	知念村	葉脈に沿って白色ライン(幅1mm程度)が見られる葉身	1	葉身の白色ライン	+	+
6	東村	葉脈に沿って白色ライン(幅1mm程度)が見られる葉身	1	葉身の白色ライン	-	-
7	玉城村	全体に生育が悪くわい化し、葉身の一部ないし全体が白化している。白化部位に所々褐色の条斑が見られる。	1	白化した葉身、葉鞘の中の褐色条斑	-	-

1) +: 位相差顕微鏡下でサンプルからの菌泥噴出が見られた、-: 噴出が見られなかった。

表4. 分離菌株一覧

菌株番号	採集場所	採集年月日	分離葉病徴	コロニー色 ¹⁾	16SrDNA ²⁾	学名	MAFF
A-1-1	知念村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	311358
A-2-1	知念村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	
A-2-2	知念村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	311359
A-2-3	知念村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	
C-2-1	玉城村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	311360
C-2-2	玉城村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	
C-2-3	玉城村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	
C-3-1	玉城村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	311361
C-3-2	玉城村	2002.12.12	ペンシルライン様症状	黄色	X.a	<i>Xanthomonas albineans</i>	311362

1) NA培地上でのコロニーの色。

2) 16SrDNAの塩基配列に基づき, *Xanthomonas albineans*

4. 所感

本探索では、沖縄県の宮古島と沖縄本島においてサトウキビ白すじ病菌の探索・収集を行った。本病は、近年品種の変遷等に伴い、とくに沖縄本島では増加傾向にあると考えられている。しかし、本病原細菌は分離しにくいことや接種による発病の再現が極めて難しいこともあり、現場で有効な迅速診断法などの開発が望まれている。しかし、これらの研究を行うためには多数の菌株を用いた比較試験等を行う必要があるが、これまで本病原細菌はジーンバンクの他、国内の保存機関にも登録されていない。

そこで、今回白化症状を呈するサトウキビを多数採集し、位相差顕微鏡観察による菌泥の噴出を確認後に病原細菌の分離を行った。その結果、サンプル病葉数に対して得られた菌株数は少なかったが、今回初めて白すじ病菌をジーンバンク登録することができた。しかし、分離菌数はまだ少ないため、今後もさらに沖縄県で探索・収集を行うとともに、サトウキビ栽培地帯である鹿児島県南部においても発病調査および病原細菌の収集を行う必要がある。

5. 謝辞

本探索では、多くの方々にご支援とご協力をいただいた。(独)種苗管理センター沖縄農場中里 工氏、同場杉澤 武氏には、沖縄本島での探索に同行していただき、多大なご協力をいただいた。沖縄県農業試験場宮古支場園芸研究室小禄博昭氏、澤岬哲也氏には宮古島での探索に同行いただき、多大なご協力をいただいた。沖縄県関係者および生産者の方々には、探索期間中多くの情報とご助言をいただいた。ここに記して、深く感謝の意を表す。

6. 参考文献

- 1) 宮里清松 (1975). サトウキビとその栽培. 日本分蜜糖工業会. p. 358.
- 2) 日本植物病害大辞典 (1998). 岸国平編. pp. 170-176. 全国農村教育協会. 東京.
- 3) Ricaud, C. and Ryan, C.C. (1989). Leaf scald. Pages 39-58 in: Diseases of Sugarcane. C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillispie, Jr. and C.G. Hughes, eds. Elsevier, Amsterdam.
- 4) Pan, Y.-B., Grisham, M.P., Burner, D.M., Legendre, B.L., Wei, Q. (1999). Development of Polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. Plant Dis. 83: 218-222.

Summary

For isolation of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albineans* (Ashby 1929) Dowson, 20 and 59 sugarcane samples showing the chlorosis or pencil-line streak were collected in Miyako island and Okinawa island, respectively. However, the bacterial pathogen was not isolated from all the samples collected from Miyako island. For the samples collected in Okinawa island, the bacterial colonies with buff yellow-color, a typical of the pathogen, were recovered only from leaves with 'pencil-line' symptom producing bacterial ooze. The bacterial isolates were subjected to the 16S rDNA analysis and PCR using *X. albineans*-specific primers. These bacterial isolates showed high homology with *X. albineans* in 16S rDNA sequence and produced the specific PCR band, indicating that the bacteria is *X. albineans*. In this investigation, the pathogen of sugarcane leaf scald was first registered in MAFF Genebank.

微生物の探索収集プロフィール



キクの立枯症状 (築尾)



長野県塩尻市のダイズシストセンチュウ発生圃場
(相場・水久保・伊藤)



沖縄本島で見られた葉白症状を呈する
サトウキビ (對馬)



箱入り麴 (柏木)



麴製品 (柏木)



サトウキビ白すじ病 (ペンシルライン)
(對馬)



漬物の路上販売 (稲津)