

種子島に発生したサトウキビ白葉病

荒井啓・氏原邦博*

(植物病理学研究室)

昭和63年7月27日 受理

Studies on Sugarcane White Leaf Disease Occurred in Tanegashima-island

Kei ARAI and Kunihiro UJIHARA*

(Laboratory of Plant Pathology)

緒 言

1986年5月、種子島のサトウキビ圃場で新葉が白色を呈した株がいくつか発見された。本症状の原因を調べたところ、これまで台湾で報告されているマイコプラズマ様微生物による白葉病^{2,7,8,9,10,12,18)}と同等されたのでその結果を報告することとする。

発生および病徴

本症状は1986年5月、鹿児島県熊毛郡中種子町阿會地区および南種子町野大野地区で発見された。6月には西之表市伊関地区で、翌年6月には中種子町竹屋野、美座、熊野の各地区でも発生が認められ、ほぼ全島で確認された (Fig. 1)。発生面積はいずれの地区も10~20 a程度である。

病徴は“株出”で白色ないし白色の条を伴った新葉が出るのが特徴である (Fig. 2, 4)。発病株では生育が比較的悪く、葉や茎が繊細となる。典型的な白葉症状株はその後枯死することがあるが、そのまま生育するものもある。そのまま生育したものは気温の上昇とともに白色の条が細くなったり、黄色を呈するものが認められた。白葉症状を呈した、いわゆる罹病株をある程度生育させた後、地上部を切り取りこれを植え付けた幼苗でも再び白葉症状を呈した (Fig. 3, 5)。このことから本症状の病原は罹病株内に存在しているものと考えられた。

材料と方法

材料：実験に用いたサトウキビ (品種；NIF 3) は種子島で自然発病していたもの、およびそれらの罹病茎から発生した幼苗で白葉症状を呈したものを使用した。

超薄切片による電顕観察：罹病葉の葉身を4%グルタルアルデヒドおよび1%オスミック酸で二重固定後、エタノールで脱水、低粘度エポキシ樹脂に包埋した。薄切後酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し電顕観察した。

蛍光顕微鏡観察：罹病葉の葉身を5%グルタルアルデヒドで1~2時間固定後、凍結ミクロトームで5~10 μmの厚さに切り、① Dienes液^{3,4,5)}、②アニリンブルー液^{4,5,18)}、③ DAPI液^{4,5,14,16,18)}でそれぞれ染色し蛍光の有無を観察した。用いた染色液の組成は以下のとおりである。

- ① 2.5 g メチレンブルー, 1.25 g アズール II, 10 g マルトース, 0.25 g 安息香酸を蒸留水100 ml に溶かし、ろ過したものを蒸留水で0.1~0.5%に希釈して使用。
- ② 0.01% アニリンブルー (1/15M リン酸二カリウム pH 8.0で希釈)
- ③ 2 μg/ml 4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール・2塩酸 (蒸留水で希釈)

テトラサイクリン系抗生物質処理：白葉症状を示した幼苗を抜取りテトラサイクリン塩酸塩および塩酸オキシテトラサイクリンのそれぞれ100および50 ppm液に24時間根部を浸漬し、その後ポットに植え付け、症状の変化を観察した。症状の変化したものについては電顕 (日本電子100C) および蛍光顕微鏡 (ニコン FT) 観察をした。

本論文の概要は昭和62年度日本植物病理学会九州部会において発表した。

* 種苗管理センター鹿児島農場、鹿児島県熊毛郡中種子町、Nat. Cent. Seeds Seedlings Kagoshima Stn., Nakatancho, Kumage-gun, Kagoshima Pref.



Fig. 1. Outbreak regions of white leaf cane in Tanegashima-island.

結 果

蛍光顕微鏡観察

白葉症状を示した葉の横断切片を蛍光顕微鏡観察したところ、DAPI液で染色した試料で師部に特異的な黄白色の蛍光部分が認められた (Fig. 6)。健全株の葉切片ではこのような蛍光部分は認められなかった。Dienes液、アニリンブルー液染色ではこのような特異的染色部分は認められなかった。

電子顕微鏡観察

白葉症状を示した葉の超薄切片を電顕観察したところ、師部柔細胞、師管にマイコプラズマ様微生物 (MLO) が認められた。Fig. 8~13は師管内に散在または集団で認められる MLOs である。Fig. 14, 15は師部柔細胞に見いだされた MLOs である。Fig. 16は MLOs の微細構造を示したもので、多形性で単位膜に囲まれ内部にリボソーム様顆粒が認められ典型的な MLO を呈していた。本実験で観察された MLOs の大きさは約 80~500 nm で球形~長楕円形のもが多かった (Fig. 13, 15, 16)。一方、葉身部分の葉肉細胞には葉緑体がほとんど認められず、原形質分離が顕著であった (Fig. 17)。

抗生物質処理

テトラサイクリン塩酸塩および塩酸オキシテトラサイクリンの水溶液 (それぞれ 100, 50 ppm) にそれ

ぞれ 3 個体ずつ浸漬した結果、約 1 カ月後に症状の回復するものが認められた。すなわち、白色を呈していた葉に緑色の条がはいるものや、葉全体が黄色味を帯びたり、新しく展開した葉が緑色を呈する個体が認められた (Fig. 7)。抗生物質によるこのような変化は用いた抗生物質の種類や処理濃度間に大差なく、いずれの組み合わせでもほぼ 50% のものに回復が認められた。症状の回復したものを蛍光顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察したところ、特異蛍光や MLOs は認められなかった。一方、白葉症状株を高温 (30°C 以上) のガラス室に放置しておいたものにも一部症状の回復するものが認められた。

考 察

種子島で発生したサトウキビの白葉症状は本実験の結果 MLO によるものと同定された。すなわち、罹病葉から病原と考えられるような糸状菌や細菌が分離されず、ウイルスも検出されなかった。しかしながら、罹病葉の超薄切片による電顕観察では師部に典型的な MLOs が見いだされた。さらに、本症状はテトラサイクリン系の抗生物質処理により症状が回復し、それらの組織には MLOs が認められなかった。

サトウキビに白葉症状を示す病害としては白すじ病 (leaf scald, white streak)^{11,13,20)}、白葉病 (white

leaf)^{8,9,17,18}), grassy shoot 病^{6,15})などが報告されている。白すじ病は *Xanthomonas albilineans* による細菌病で、あとの2つはMLOによる病害である。本実験の結果から、本病は grassy shoot 病か白葉病のいずれかと考えられた。

Grassy shoot 病はアブラムシで伝搬され、grassy shoot や yellowing や albino などの様々な病徴を示し、発生はインドおよびタイである^{6,15}。一方、白葉病はヨコバイで伝搬され、病徴は albino が主体で、発生は台湾である^{2,7,8,9,10,12,17,19}。本実験では媒介虫による伝搬試験を行っていないが、発生の状況や病徴が grassy shoot 病と若干異なるように思われる。したがって本病は白葉病とするのが妥当と考えられた。

白葉病類似症状として1969年に石垣島で発生した疑似白葉病はテトラサイクリン系抗生物質による治療効果が認められず、電顕によるMLOの確認がされていない²¹。したがって、白葉病の発生はわが国で初めてと思われる。

近年蛍光顕微鏡の使用によるマイコプラズマ病の診断がいくつか報告されている。本実験でも文献上良好な結果が得られている3種類の染色液^{3,4,5,14,16,18})を用いて観察した。そのうちDAPI液を用いた場合に比較的良好な結果が得られたが、Dienes液やアニリンブルー液では特異的な蛍光は認められなかった。この原因ははっきりしないが本実験に用いた材料にMLOsが少ないことが一因とも思われる。同じ葉位から作製した超薄切片組織の電顕観察でもMLOsの数や所在個所が比較的少なかった。

白葉病が種子島に発生した理由については良くわからないが、台湾で白葉病の媒介虫として知られているタイワンマダラヨコバイ (*Epitettix hiroglyphicus* Mats.)^{2,7,12})の本島における棲息状況を調べるとともに、台湾ではギョウギシバや *Brachiaria distachya* などのイネ科雑草に白葉症状が認められ、これらにMLOの存在が認められている¹⁾ので、他の植物での白葉症状の発生調査を更に行う必要があると考えられる。

要 約

本実験は、種子島で発生したサトウキビの白葉症状の原因を調べたものである。得られた結果を要約すると以下のとおりである。

本病は1986年5月に始めて認められ、翌年も発生

が確認された。病徴は新葉全体が白色ないし白色の条を伴ういわゆる albino 症状である。ひどい場合はその後枯死するが、気温の上昇とともに病徴が回復するものも認められる。発生は種子島のほぼ全域(6か所)におよび、発生面積はそれぞれの地域で10~20a程度である。

病原について調べたところ、罹病葉の超薄切片の電顕観察で師部に特異的にマイコプラズマ様粒子(MLO)が認められた。MLOの大きさは約80~500nmで師管および師部柔細胞に局在していた。これらの粒子は健全植物組織には認められなかった。テトラサイクリン系抗生物質処理により病徴の回復した組織にはMLOの消失が認められた。また、最近利用されている蛍光顕微鏡観察法によるMLO病の診断の結果、DAPI液染色で罹病植物の師部に特異的な蛍光部分が認められた。

以上の結果より、本病は台湾などで発生している「白葉病」と同定された。

謝辞 本実験を行うにあたり抗生物質を提供していただいた台糖ファイザー株式会社に謝意を表す。

文 献

- 1) Chen, C. T., Lee, C. S. and Chen, M. J.: Mycoplasma-like organisms in *Cynodon dactylon* and *Brachiaria distachya* affected by white leaf diseases. *Rep. Taiwan Sugar Expt. Stn.*, **56**, 49-55 (1972)
- 2) Chen, C. T.: Insect transmission of sugar cane white leaf disease by single leafhoppers, *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Rep. Taiwan Sugar Res. Inst.*, **60**, 25-33 (1973)
- 3) Deeley, J., Stevens, W. A. and Fox, R. T. V.: Use of Dienes' stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, **69**, 1169-1171 (1979)
- 4) Hiruki, C.: Little leaf disease of *Brugnansia candida*, new disease associated with mycoplasma-like organisms. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **52**, 675-682 (1986)
- 5) Hiruki, C.: Witches'-broom of *Hibiscus heterophyllus*, a mycoplasma occurring in Australia. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **53**, 1-6 (1987)
- 6) Hughes, C. G. and Abbott, E. V.: Grassy shoot. in *Sugarcane Diseases of the World*. Hughes, C. G. et al. (eds.), p. 162-170, Elsevier Pub. Co., Amsterdam (1964)
- 7) Lee, C. S. and Chen, C. T.: Preliminary studies on transmission characteristics of sugarcane white leaf disease by *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura. *Rep. Taiwan Sugar Expt. Stn.*, **56**, 57-62 (1972)
- 8) Lin, S. C. and Lee, S. C.: *Mycoplasma* or mycoplasma-like microorganism in white leaf disease of sugarcane.

- Annu. Rep. Taiwan Sugar Expt. Stn.* 1967-1968, p. 17-22 (1968)
- 9) Lin, S. C. , Lee, C. S. and Chiu, R. J. : Isolation and cultivation, and inoculation with, a mycoplasma causing white leaf disease of sugarcane. *Phytopathology*, **60**, 795-797 (1970)
- 10) Ling, K. C. and Chuang-Yang, C. : A preliminary study on the white leaf disease of sugarcane. *Rep. Taiwan Sugar Expt. Stn.* , **28**, 139-172 (1962)
- 11) 松田敏男：奄美群島におけるサトウキビの病害(予報). 九病虫研報, **11**, 40-41 (1965)
- 12) Matsumoto, T. , Lee, C. S. and Teng, W. S. : Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan, with special reference to the transmission by a leafhopper, *Epitettix hiroglyphicus* Mats. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **35**, 251-259 (1969)
- 13) 岡部徳夫：サトウキビ白条病. 植物細菌病学, p. 186-188, 朝倉書店, 東京 (1949)
- 14) Petzold, H. and Marwitz, R. : Improved fluorescence microscopic detection of mycoplasma-like organisms in plant tissue. *Phytopath. Z.* , **97**, 327-331 (1980)
- 15) Rishi, N. , Okuda, S. , Arai, K. , Doi, Y. , Yora, K. and Bhargave, K. S. : Mycoplasma-like bodies, possibly the cause of grassy shoot disease of sugarcane in India. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **39**, 429-431 (1973)
- 16) Russel, W. C. , Newman, C. and Williamson, D. H. : A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*, **253**, 461-462 (1975)
- 17) 劉錫彬・李新民：白葉病—甘薯新毒素病害—。台湾糖業試驗場特刊, **22**, 1-25 (1963)
- 18) Schaper, U. and Converse, R. H. : Detection of mycoplasma-like organisms in infected blueberry cultivars by the DAPI technique. *Plant Disease*, **69**, 193-196 (1985)
- 19) Shikata, E. , Teng, W. S. and Matsumoto, T. : Mycoplasma or PLT like microorganisms detected in leaves of sugarcane plants infected with white-leaf disease and the suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetracycline group. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* , **56**, 79-93 (1969)
- 20) 田部井英夫・田上義也：薩南諸島におけるサトウキビの病害. 九病虫研報, **11**, 38-40 (1965)
- 21) 津止健市：石垣島に発生したサトウキビ疑似白葉病に関する調査報告. 沖縄甘蔗糖年報, **13**, 14-17 (1969)

Summary

In 1986, a white leaf symptom of sugarcane, *Saccharum officinarum* L. , was observed in Tanegashima-island (Kagoshima Prefecture). Investigation was carried out to find out the identity of the causal agent of the disease.

It was ascertained that the disease had occurred at 6 districts (belonging to Nishinoomote-shi, Nakatane-cho, and Minamitane-cho) of this island (Fig. 1). The symptoms of this disease show pure white color or white stripes on young leaves which has germinated from seed cane, that is called an albino. No causal fungus, bacterium, and virus could be isolated from the infected tissue. So, ultra-thin sections and fluorescent stained sections were observed under an electron microscope and a light microscope, respectively. Mycoplasma-like organisms (MLOs) were specifically detected in sieve elements or phloem parenchyma cells of the infected tissues under an electron microscope. In fluorescence microscopy with DAPI (4', 6-diamino-2-phenyl-indole · 2HCl), these fluoresced specifically. MLOs and fluoresced spots could not be detected in healthy ones.

Antibiotics of tetracycline group were treated against the infected plants. The symptom of this disease was restored about one month after antibiotics treatments and MLO could not be detected in those tissues.

From these views of the present results, the causal agent of this disease was identified as mycoplasma-like organism and this disease was concluded to be "White Leaf Disease of Sugarcane"

Explanation of figures

- Fig. 2. White leaf symptoms of the plant cane (arrows) in the ratoon field.
- Fig. 3. Pure white leaf symptom of first year plant in the pot.
- Fig. 4. White stripe symptom of plant cane in the field.
- Fig. 5. White leaf symptom of the first year plant and dwarf of new expanded leaf (arrow).
- Fig. 6. A fluorescence micrograph of transverse section of sugarcane leaf treated with DAPI. A section infected plant in which distinctive fluorescent foci (arrows) are seen in phloem region.
- Fig. 7. First year plant treated tetracycline (100ppm). Recovery of symptoms (arrows) is recognized and leaf color becomes partially green.
- Fig. 8. An electron micrograph of ultra-thin section of infected sugarcane leaf. Sieve elements (S) observed mycoplasma-like organisms (MLOs).
- Fig. 9. Ditto.
- Fig. 10. MLOs in sieve elements (arrows).
- Fig. 11. Several MLOs (arrows) are observed in sieve elements (S).
- Fig. 12. MLOs scattered in sieve element.
- Fig. 13. Ditto.
- Fig. 14. MLOs (arrows) observed in the inner space of cell wall of a phloem parenchyma cell.
- Fig. 15. Ditto. High magnification. Typical MLOs are observed and their shapes are noted variously.
- Fig. 16. A micrograph of high magnification of MLOs in a sieve element.
- Fig. 17. Plasmolysis and degenerated mesophyll cells. Cytoplasm became of high density and chloroplast was not observed.





