〔微探収報 9 : 7-16, 1997〕

南西諸島における拮抗性シュードモナス属細菌の探索と収集

農業生物資源研究所　遺伝資源第二部
微生物評価保存研究チーム
土屋健一

Exploration and collection of fluorescent *Pseudomonas* spp. antagonistic against plant pathogens in South-Western islands of Japan

Kenichi TSUCHIYA

Laboratory of Microorganism Conservation
National Institute of Agrobiological Resources
Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

1．目的

植物病害の防除において，化学農薬は多大な役割を果たし，現場における必要性は現在もなお重要な地位を占めており，開発が続けられている。一方，農薬あるいは化学肥料の多用に対する懸念や反省から，その軽減を目指して近年志向されている環境調和型あるいは低投入持続的農業の中で，拮抗微生物（antagonistic microorganisms）や植物生育促進根圏細菌（plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR）を利用した生物防除研究が注目されている。これらの有用性が期待され，あるいは既に内外においてその効果が指摘されている微生物群は多岐にわたっているが，その中で蛍光性シュードモナス（*Pseudomonas*）群は大きな地位を占めており，有効な抗菌性物質等を産生する *P. fluorescens* や *P. putida* はその代表例として報告されている。

我が国においてもこれまで多くの探索・収集が行われ，その一部は生物防除素材としての適用性が試みられている。しかし，多様な病害の種類および普遍地域に対応可能な菌株を見い出すことは困難である。したがって，より広範かつ地域に密着した，あるいは豊富な植物種からの探索・収集を行い，それらの諸特性を解析した後，微生物遺伝資源として保存・利用を図ることが必要であり，

将来，適地適応性を考慮した有効な微生物農薬あるいは微生物資材の開発研究素材として活用されることが望まれる。

今回，土壌の種類，栽培環境あるいは植物種において本土とは異なる沖縄本島をはじめとする南西諸島からの蛍光性シュードモナスを主体に拮抗細菌の探索・収集を行うことにした。

2．実施の概要

1995年11月25日より12月4日まで南西諸島に出張し，表1および図1に示したように沖縄本島(那覇市，糸満市周辺町村，石川市，本部町および今帰仁村ほか)，宮古島（城辺町，平良市ほか）および石垣島（石垣市）において，農家圃場を中心に各種植物の根圏土壌を主に採取し，携行あるいは空路にて農業生物資源研究所に持ち帰り，微生物の分離ならびに植物病原菌に対する拮抗性等の特性調査を行った。

期間中の探索・収集の実施概要は以下のとおりである。

11月25日～26日　那覇市（琉球大学・沖縄県農業試験場）を起点として，南風原町および大里村の灰色･弱アルカリ性重粘土壌（ジャーガルと称す）地帯の農耕地において栽培されているトマト，ニガウリ，ホウレンソウおよびキウリ等の根圏土壌をサンプリングした(口絵写真)。次いで具志頭村および糸満市においては暗褐色を呈する中性ないし弱アルカリ性の石灰岩土壌（島尻マージと称す）地帯の圃場から，ナス，ニンジン，メロン等の根圏土壌を採取し，また豊見城村のジャーガル地帯からはパパヤ，クルクマ，トマト・ニラ混植より根圏土壌をそれぞれ採取した。

11月27日　琉球大学を起点として，赤色～黄色・酸性土壌（国頭マージと称す）地帯である石川市，名護市および本部町の圃場を探索し，ニンジン，ダイコン，ウコン等から根圏土壌を採取した。また，今帰仁村においてパインの根圏土壌を採取した（口絵写真)。

11月28日　琉球大学農学部植物病理学研究室において，採取した植物根圏土壌サンプルを整理し，一部を空路により農業生物資源研究所に送付した。

11月29日～30日　沖縄本島より空路，宮古島に移動し，城辺町，平良市，下地町ほかの島尻マージ地帯を主とする圃場においてトマト，ウコン，コリアンダー，white ginger 等の植物根圏土壌を採取した。

12月1日～3日　宮古島より空路，石垣島に移動し，国際農林水産業研究センター沖縄支所において，探索・収集計画を打ち合わせた後，研究センター内圃場を中心にゲットウ，食用カンナ，ニラ等より根圏土壌を採取した。

12月4日　石垣島より空路，那覇経由で帰京，つくば市（農業生物資源研究所）に採取サンプルを携行した。

3．収集成果

1）方法

(1)　蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の分離

採取した根圏土壌は風乾後，それぞれ所定量を滅菌蒸留水に懸濁し，分離材料に供した。蛍光性

Pseudomonas 属細菌の分離にはキングB培地（KMB）または同培地にシクロヘキシミド100ppm，クロラムフェニコール13ppm，アンピシリン40ppm を添加した培地（KMB$^+$）（Simon and Ridge, 1974）を用いて，常法に従い希釈平板法により行った。懸濁液を塗布した寒天平板を28℃に設定したインキュベーター内で3～4日間培養した後，紫外線ランプ（波長375nm）下に置き，出現した細菌コロニーの中から蛍光を発するものを計数し，土壌1g当たりの検出濃度を算出した（表2）。代表コロニーを選抜し，さらに同培地で数回，単集落分離を行うことにより純化した。分離された菌株は最終的に1％グルタミン酸ナトリウム加用10％スキムミルクに懸濁して－30℃下で保存した。

(2) 血清反応

分離された蛍光性 *Pseudomonas* 属菌株について，既知の *Ps. fluorescens* 株をウサギに免疫して作製された抗血清に対する反応性を間接 ELISA 法で検討した。

(3) 抗菌活性試験

得られた蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の特性調査のうち，植物病原菌に対する抗菌活性を検討した。対象病原菌としては，トマトの重要病原菌である *P. solanacearum*（青枯病菌），*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*（かいよう病菌）および *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*（萎ちょう病菌）ならびに *Rhizoctonia solani* AG-8（ダイコン苗立枯病菌）の合計4種を供試した。培地上の抗菌活性は，前二者に対しては KMB 培地を用いたプレートクロロホルム法（Wakimoto *et al.*, 1986）により，また後二者では1/5PDA 培地を用いた対峙培養法により行った。抗菌活性は，検定菌と指示病原菌との間に形成される生育阻止帯の有無により判定した。

2）結果

(1) 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の検出および分離

採取した根圏土壌サンプルより調製した懸濁液を KMB 培地に塗布した結果，図2－1に示すように糸状菌の一部や多様性に富む細菌集落が出現した。一方，KMB$^+$培地では蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌がほぼ特異的に検出され，同グループ細菌の効率的な検出に適することがわかった（図2－2）。蛍光性 *Pseudomonas* の検出頻度は供試土壌サンプルによって異なり，1g土壌当たり約10^3～≧10^7生菌数の濃度範囲で検出される場合が多かった。しかしながら，採集地域，植物および土壌種類との関連性において一定の傾向は認められなかった。

比較的高い割合で蛍光性 *Pseudomonas* が検出された土壌サンプル区の KMB$^+$平板培養から無作為に80個の代表コロニーを選抜し，さらに純化した後，それぞれ前述に従い，10％スキムミルクに懸濁後，－30℃下で凍結保存した。

(2) 収集した蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌分離株の特性調査

分離・保存された80菌株の蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌について，抗-*Ps. fluorescens* 血清との反応性を検討した結果，69菌株が陽性であった。これらについて4種の植物病原菌に対する抗菌活性を試験した。それらの結果は表3に示すとおりであった。今回選抜した分離株の中では，*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* および *R. solani* の両者に抗菌活性を示すものは見い出されなかったが，*P. solanacearum* および *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* のトマト病原細菌に対して，片方あるいは両方に抗菌活性を示す菌株が認められた。特に，Im-5 および Tt-J1 の土壌サンプルからの分

離菌株の中には両病原細菌に対して明瞭な生育阻止帯を形成するものがあり，それらは有効な抗菌物質を生産している可能性が示唆された（図3，表3）。

今後，これらの分離株の細菌学的諸性質を検討することによって，分類学的所属を明らかにするとともに産生物質の同定，発病抑制効果等の特性評価を行ったのち，MAFF ジーンバンクに登録し，微生物遺伝資源として保存するとともに将来における微生物農薬開発研究素材として提供を図る予定である。

4．所感

今回の探索では，現地関係者の多大なご協力によって本土と共通の，あるいは固有の植物が栽培されている広範な地域から，また様々な土壌条件下の根圏土壌サンプルを多数採取することができ，併せて拮抗能を有する蛍光性シュードモナスが収集され，初期の目的を果たすことができた。探索前から豊富な微生物フロラの存在を予想していたが，実際の分離作業においても同一培地に出現する細菌群は多様であると実感させられた。一方，蛍光性シュードモナスは広範囲な分布が認められたものの，その検出率は思った程高くはなかった。また，高率で検出される場合もあったが，地域，土壌種類や植物の違いによる一定の傾向は明らかでなかった。

当地方では地域によって特徴ある土壌の分布が存在し，採取にあたってはできるだけそれらに特徴的な微生物相を反映できることを期待して圃場の選択に努めた。しかしながら，土地改良等の基盤整備事業から異種土壌による客土が促進されているほか，農家の意向によって各種の有機肥料や新興微生物資材等の投入により，外来微生物の混在化が固有の微生物フロラの形成に影響している可能性は否定し難いものであった。

分離された蛍光性シュードモナス菌株について，今回は4種類の植物病原菌のみに対する拮抗性を検討したが，対象とする病原菌を変えることにより新たな拮抗菌株が選抜される可能性は十分にある。また，多様な微生物種を含む採取サンプルの中から，本群菌のみの拮抗菌しか収集できなかったのは当初の目的とは言え，もったいないと考える。幸い，各土壌サンプルならびに KMB 培地によって検出された細菌についてはできるだけ分離し，凍結保存に供してある。案外，残された中に興味ある微生物遺伝資源が潜んでいるかも知れず，機会を見て再調査してみたい。

今回の調査を行うに当っては，琉球大学農学部の諸見里善一氏，沖縄県農業試験場の上原勝江女史，同宮古支場の高江州賢文氏，河村　太氏，砂川喜信氏，宮古農業改良普及センターの宮城明生氏，国際農林水産業研究センター沖縄支所の仙北俊弘氏（現在　農林水産技術会議事務局研究開発官），江川宜伸氏，菅原和夫氏の方々に多大のご協力を頂いた。ここに記して深く感謝申し上げる。

5．参考文献

1）Simon, A. and E.H. Ridge (1974) The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent pseudomonads. J. Appl. Bact. 37: 459-460.

2）Wakimoto, S., K. Hirayae, K. Tsuchiya, Y. Kushima, N. Furuya and N. Matsuyama (1986)

Production of antibiotics by plant pathogenic pseudomonads. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 835-842.

Summary

Exploration and collection of fluorescent pseudomonads antagonistic to plant pathogens were conducted in South-Western islands of Japan, including Okinawa island, Ishigaki island and Miyako island and others. Plant materials with rhizosphere soil were collected at the cultivated fields which differed in soil types such as Jagal, Shimajiri-merge and Kunigami-merge and so on from various areas of the islands.

The fluorescent *Pseudomonas* bacteria were dominantly detected from rhizosphere soil samples by using the KMB^{+} agar plates (KMB medium supplemented with cycloheximide 100ppm, chloramphenicol 13 ppm and anpicillin 40 ppm). The selected fluorescent *Pseudomonas* bacteria reacted with an antibody prepared against *P. fluorescens*.

The most isolates were antagonistic to both or either strain of tomato pathogens, *P. solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, and showed antibiosis on the KMB medium, but not to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Rhizoctonia solani*.

表1　探索・収集日程表

年月日	行程	行動内容
1995. 11. 25	つくば～羽田～那覇	移動（空路） 琉球大学で探索・収集打ち合わせ
26	沖縄県農試―南風原町―大里村―具志頭村―糸満市―豊見城村―琉球大学	那覇市および南部地区周辺で植物根圏土壌採取
27	琉球大学―石川市―名護市―本部町―琉球大学	本部町ほか中部地区で植物根圏土壌採取
28	琉球大学農学部	収集サンプルの整理
29	那覇～宮古島	移動（空路）
30	宮古島（城辺町―平良市―下地町―上野村）	島内各地で植物根圏土壌採取
12. 1	宮古島―石垣島	移動（空路）
2	石垣島（石垣市真栄里）	国際農林水産業研究センター沖縄支所で探索・収集打ち合わせ，研究所内圃場および島内各地で植物根圏土壌採取
3	石垣～西表島～石垣	西表島で土壌採取
4	石垣～那覇～東京～つくば	移動（空路）

表2　南西諸島において採取した根圏土壌サンプル一覧

サンプル番号	採集地（○番号は図1参照）	植物	土壌の種類	蛍光性[a] シュードモナス
	沖縄本島			
Ga — S1	具志頭村安里 ①	ナス	島尻マージ	++
Ga — S2	〃	ニガウリ	〃	+/−
Ga — S3	〃	ピーマン（青枯病）	〃	++
Hy — J1	南風原町山川 ②	トマト	ジャーガル	++
Hy — J2	〃	ニガウリ	〃	+
Hy — J3	〃	ヘチマ	〃	−
Hy — J4	〃	ホウレンソウ	〃	−
I — K1	石川市 ③	マンゴー	国頭マージ	—
I — K2	〃	ニンジン	〃	++
I — K3	〃	アルゼンチンチシャ	国頭マージ	−
Ik — S1	糸満市喜屋武 ④	ニンジン	島尻マージ	+/−
Ik — S2	〃	サツマイモ	〃	+/−
Ik — S3	〃	メロン	〃	++
In — 1	糸満市名城	ナス	砂土	−
In — 2	〃	ニンジン	〃	−
Mi — K1	本部町伊豆見 ⑤	ウコン	国頭マージ	−
Mi — K2	〃	ダイコン	〃	++
Mi — K3	〃	アルゼンチンチシャ	〃	−
Na — K1	今帰仁村嵐山 ⑥	パイン	〃	−
Oi — J1	大里村稲峰 ⑦	キウリ	ジャーガル/有機	+/−
Oi — J2	〃	キウリ（萎凋症状）	〃	++
Tn — J1	豊見城村の波 ⑧	クルクマ	ジャーガル	−
Tn — J2	〃	トマト/ニラ	〃	−
Tt — J1	豊見城村渡橋名	パパヤ	〃	++
	宮古島			
Gh — S1	城辺町比賀 ⑨	トマト	島尻マージ	−
Gh — S2	〃	トマト	〃	−
Gu — S1	城辺町砂川	ウコン	〃	++
Gu — S2	〃	インゲン	〃	+
Gu — S3	〃	ニンニク	〃	+/−
Gu — S4	〃	コリアンダー	〃	++
Gu — S5	〃	ピーマン	〃	+/−
Hh — S1	平良市久松 ⑩	キク（萎凋症状）	不明	+/−
Hi — S1	平良市池間島	ニンニク	〃	+/−
Hi — S2	〃	ラッキョウ	〃	+/−
Ho — S1	平良市大野	ウコン	〃	+/−
Ho — S2	〃	ネギ	〃	+/−

サンプル番号	採集地（○番号は図1参照）	植物	土壌の種類	蛍光性[a] シュードモナス
Ho－S3	平良市大野	ニンニク	不明	+/−
Hs－S1	平良市荷川取下崎	ピーナツ	島尻マージ	+/−
Hs－S1	下地町洲鎌 ⑪	スイカ	〃	−
Su－S1	下地町上地	インゲン(cvサーベル)	〃	+/−
Sy－S1	下地町与那覇	white ginger	〃	−
Sy－S2	〃	white ginger	〃	−
U－S1	上野村新里	ピーマン	〃	+/−
	石垣島			
Im－1	石垣市真栄里 ⑫	ネギ	国頭マージ	+/−
Im－2	JIRCAS構内	ペパーミント	〃	+/−
Im－3	〃	食用カンナ	〃	+
Im－4	〃	ニガナ	〃	+
Im－5	〃	ゲットウ	〃	++
Im－6	〃	キャベツ	〃	+/−
Im－7	〃	ラッキョウ	〃	+/−
Im－8	〃	ニラ	〃	+

[a] KMB⁺培地での検出結果：++；$>10^7$/g 土，+；$>10^5$/g 土，+/−；$<10^3$/g 土，−；検出されず。

表3　根圏土壌から分離された蛍光性シュードモナスの植物病原菌に対する抗菌活性

根圏土壌サンプル	分離された蛍光性 *Pseudomonas* 菌株	血清[a]反応	培地上における抗菌活性（陽性株数／検定株数）[b]			
			PSOL	CMM	FOL	RS
Ga－S1	No. 1 ～No. 3	3／3	2／3	3／3	0／3	0／3
Ga－S3	No. 1 ～No.15	5／5	2／5	5／5	0／5	0／5
Hy－J1	No. 1 ～No.10	10／10	3／10	3／10	0／10	0／10
I－K2	No. 1 ～No. 5	5／5	5／5	5／5	0／5	0／5
Ik－S3	No. 1 ～No. 5	5／5	0／5	3／5	0／5	0／5
Mi－K2	No. 1 ～No. 5	5／5	0／5	3／5	0／5	0／5
Oi－J2	No. 1 ～No. 6	6／6	1／6	6／6	0／6	0／6
Tt－J1	No. 1 ～No. 6	8／8	2／8	8／8	0／8	0／8
Gu－S1	No. 1 ～No. 5	5／5	0／5	5／5	0／5	0／5
Gu－S4	No. 1 ～No. 2	2／2	1／2	2／2	0／2	0／2
Im－5	No. 1 ～No.15	15／15	11／15	11／15	0／15	0／15

[a] 抗-*Ps. fluorescens* ウサギ抗体との間接ELISA法による反応。陽性株数／検定株数。

[b] PSOL；*Ps. solanacearum* MAFF 301520（トマト青枯病菌），CMM；*C.m. michiganensis* MAFF 301271（トマトかいよう病菌），FOL；*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*（トマト萎ちょう病菌），RS；*R. solani* AG-4（ダイコン苗立枯病菌）。

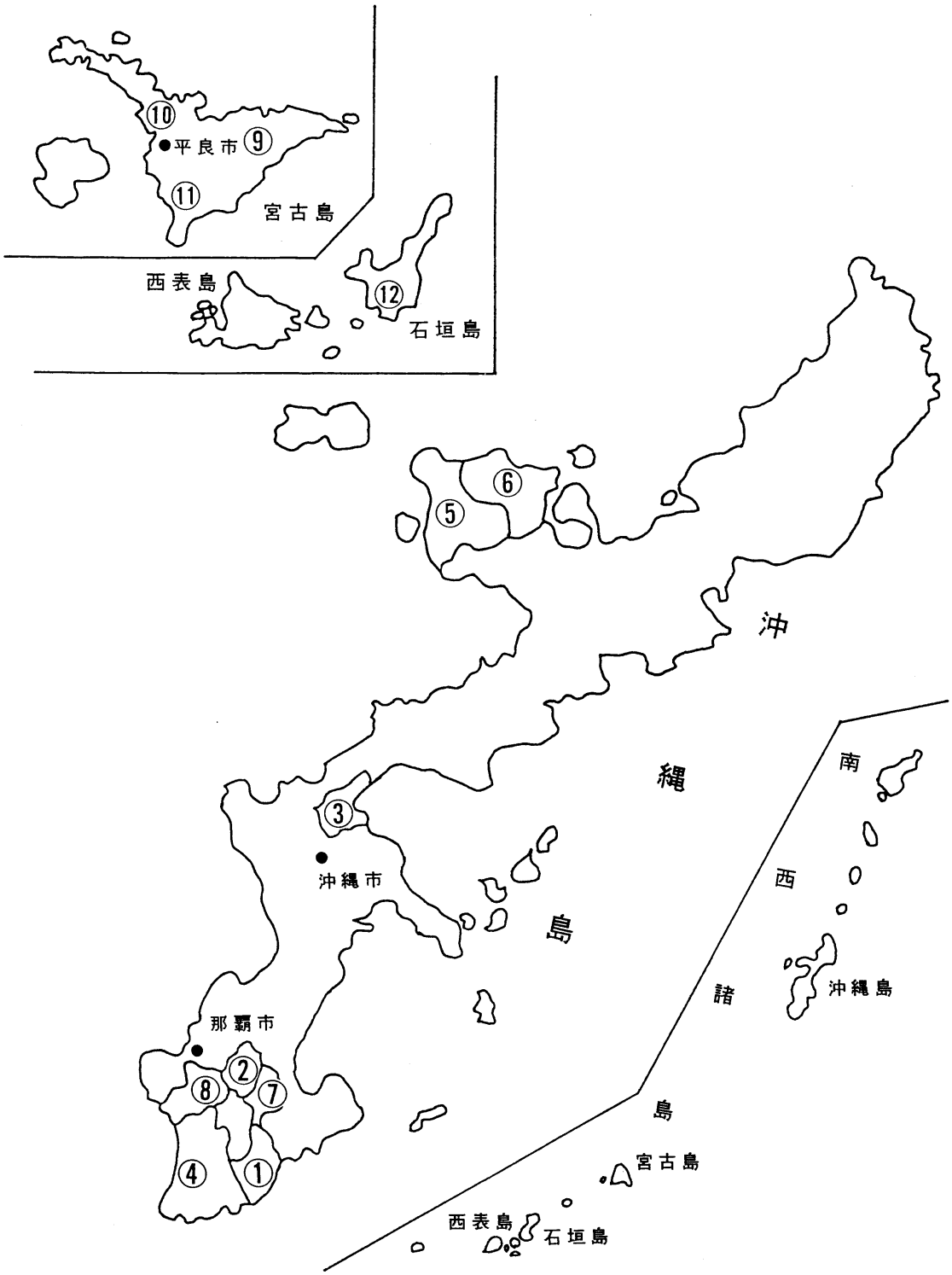


図1　南西諸島における探索・収集地点

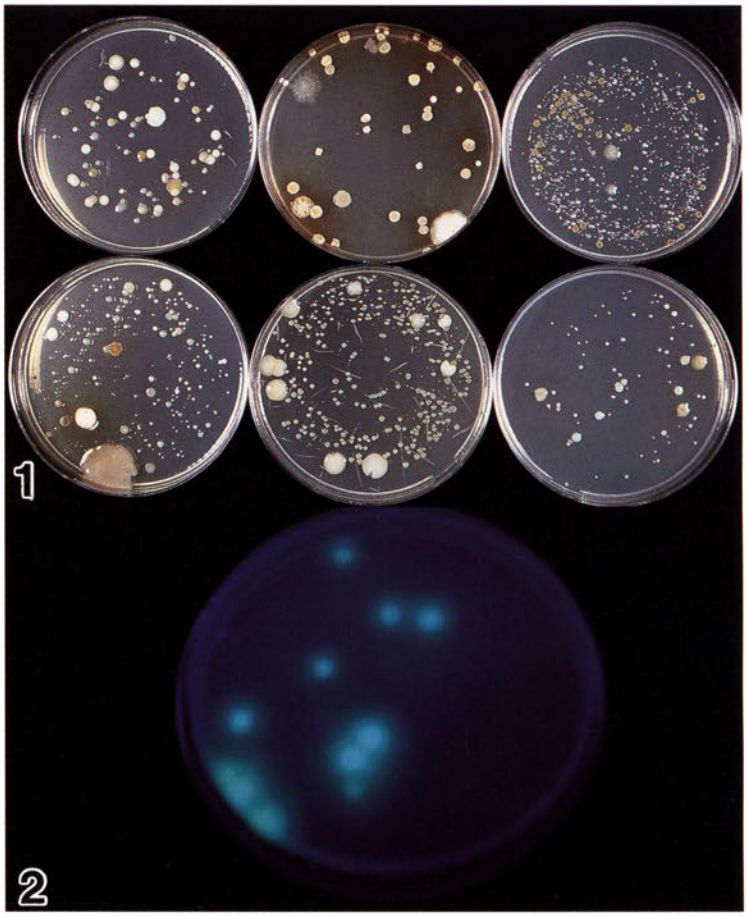


図 2　植物根圏土壌サンプルから検出された細菌コロニー
1．KMB 培地に出現した各種細菌
2．蛍光性シュードモナス細菌の検出（紫外線ランプ下）

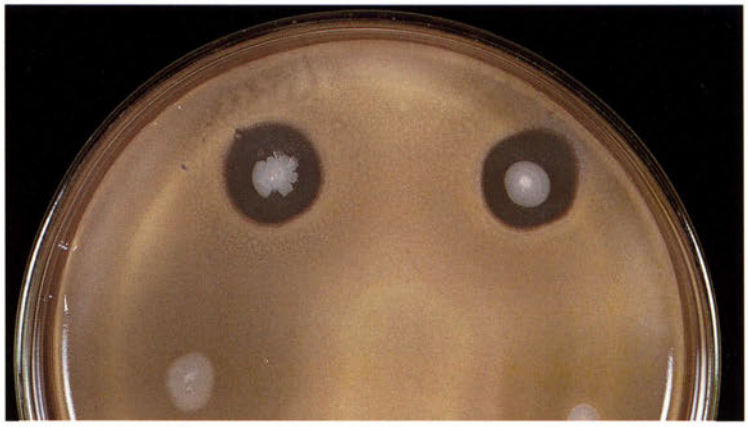
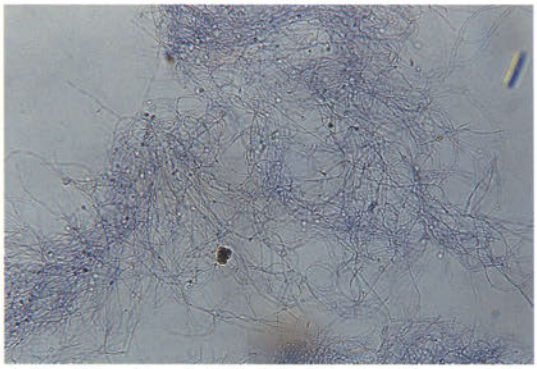


図 3　蛍光性 *Pseudomonas* の抗菌作用により形成された
トマトかいよう病菌の生育阻止帯

微生物の探索収集プロフィール

トキワギョリュウの根粒
（山中）

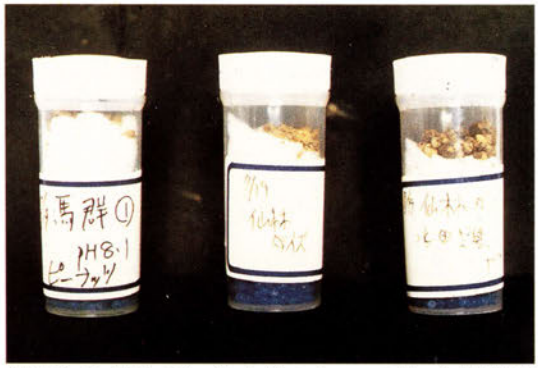


トキワギョリュウより分離されたフランキア菌。
菌糸先端に小胞体（vesicles）が形成
（山中）

ニガウリ圃場での根圏細菌の探索収集
（具志頭村安里，島尻マージ土壌地帯）
（土屋）

国頭マージ土壌地帯のパイン畑
（沖縄本島中北部・今帰仁村）
（土屋）

広大なダイズ畑でのサンプリング
（横山・村上）



採取した根粒のシリカゲルチューブによる保存
（根粒は時間とともに乾燥し，小さくなっていく。）
（横山・村上）