

# 沖縄県におけるサトウキビから分離される細菌の 収集と特性解明

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

篠原 弘亮

## Collection of Bacteria Isolated from Sugarcane in Okinawa, Japan

Hirosuke SHINOHARA

Microbial Systematics Laboratory  
National Institute for Agro-Environmental Sciences  
Kannondai 3-1-3, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

### 1. 目的

サトウキビは、沖縄県の基幹作物の一つであり、国内でのサトウキビの細菌性病害は、白すじ病、赤すじ病、疑似赤すじ病およびわい化病が報告<sup>1)</sup>されている。*Xanthomonas albilineans*が病原である白すじ病は、サトウキビ栽培や種苗管理において重要な病害とされている。*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*が病原である赤すじ病と*Herbaspirillum rubrisubalbicans*が病原である疑似赤すじ病は、酷似した赤色条斑のため病徴観察による診断は非常に難しい。一方、*H. rubrisubalbicans*は窒素固定細菌<sup>2)</sup>でもある。これらの病害防除のための生態研究や病原細菌の検出技術の開発、あるいはその機能の有効利用の研究において複数の菌株が必要である。しかしながら、現在、微生物データベースには、これらの菌種を含めサトウキビ由来の菌株は極めて少ない。そこで、沖縄県宮古島および沖縄本島でサトウキビを収集し、それらから分離した細菌を同定するとともに特性解明を行い、微生物データベースに登録する。

### 2. 探索概要

2001年11月25日から12月1日の7日間にわたって、宮古島および沖縄本島において収集を行った(表1)。宮古島では、白すじ病、赤すじ病および疑似赤すじ病と思われる病斑を呈したサトウキビはほとんど発見できなかった。沖縄本島では、東村、糸満市、北中城村、中城村、名護市、那覇市および読谷村で、白すじ病、赤すじ病および疑似赤すじ病と思われる病斑を呈したサトウキビを取

表 1 . 沖縄県におけるサトウキビ由来細菌の探索・収集日程

年月日	行 程	行 動 内 容
H13.11.25	つくば市→那覇市	移動（空路）
26	那覇市→平良市	移動（空路）
27	平良市→那覇市	沖縄農試宮古支場圃場および 宮古島内一般圃場探索収集 宮古島内一般圃場探索収集 移動（空路）
28	那覇市→糸満市→那覇市	移動（陸路） 一般圃場探索収集
29	那覇市→中城村→北中城村→ 読谷村→名護市→東村	移動（陸路） 一般圃場探索採集
30	東村→那覇市	種苗管理センター沖縄農場圃場 探索収集 移動（陸路）
H13.12.1	那覇市→つくば市	移動（空路）

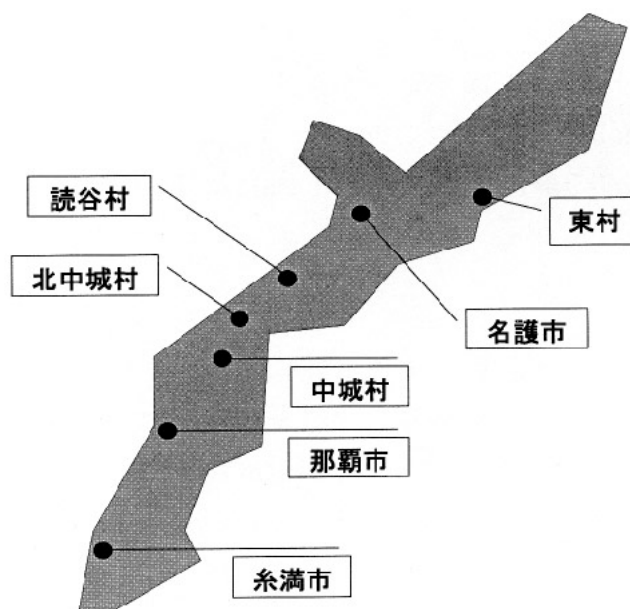


図 1 . 沖縄本島における探索収集地点

集した(図 1)。収集したサトウキビは、冷蔵した状態で農業環境技術研究所へ持ち帰り分離源とした。

### 3 . 収集成果

#### 1) 方法

##### (1) 細菌の分離・同定

白すじ病と思われる葉の白化または白色条斑を呈する罹病葉、および赤すじ病または疑似赤すじ病と思われる赤色条斑を呈する罹病葉について病斑部を位相差検鏡で観察した。検鏡下で病斑部が

ら細菌の噴出が認められた試料についてのみ、病原細菌の分離を試みた。約5 mm四方に切り取った病斑部を1 mlの滅菌蒸留水中で磨砕し、磨砕液を平板とした普通寒天培地に画線して、25°Cで培養し優占的に出現したコロニーを釣菌した。

分離株のうちコロニー形状などから雑菌と判断できる菌株を除いた全菌株について、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、その前半約700bpについてシーケンスを行った。それらを基にBLAST検索を行い、分離株の分離学的位置を推定した。収集場所が異なる分離株を選抜して、それら分離株の細菌学的性質55項目<sup>3)</sup>について調査し分離株を同定した。

## (2) 窒素固定能の調査

*H. rubrisubalbicans*と同定した菌株については、アセチレン還元活性 (ARA)<sup>4)</sup>によって窒素固定能について調査した。

## 2) 結果

### (1) 細菌の分離・同定

葉の白化または白色条斑試料9点、赤色条斑試料25点から合計96菌株を分離した(表2)。分離株のうち80菌株について16S rDNAのシーケンスを基にBLAST検索を行った。このうち20菌株は*X. albilineans*などと相同性が99%、8菌株は*A. a. subsp. avenae*と相同性が99~100%、52菌株は*H. rubrisubalbicans*と相同性が99~100%であった。*X. albilineans*などと相同性が高い菌株のうち5菌株、*A. a. subsp. avenae*と相同性が高い菌株のうち4菌株、*H. rubrisubalbicans*と相同性が高い菌株のうち9菌株について細菌学的性質を調査した結果、それぞれ16S rDNAの相同性が高かった種と同定した(表3)。

### (2) 窒素固定能の調査

*H. rubrisubalbicans*と同定したうちの9菌株については、全ての菌株で窒素固定能が認められた。

表2. 探索収集で得られた分離株数

探索収集地	試料数	分離株数
宮古島	11	0
沖縄本島		
東村	4	20
糸満市	3	12
北中城村	1	4
中城村	6	24
名護市	2	8
那覇市	5	20
読谷村	2	8

表3. 分離後に各種調査を行った菌株一覧

分離株番号	収集場所	収集年月日	分離葉病斑 <sup>a)</sup>	rDNA <sup>b)</sup>	学名 <sup>c)</sup>	ARA <sup>d)</sup>	MAFF番号
2-1	東村	2001.11.30	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311315
2-2	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
2-3	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
2-4	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
3-1	東村	2001.11.30	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311316
3-2	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
3-3	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
3-4	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
4-1	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
4-2	東村	2001.11.30	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	NT	311317
4-3	東村	001.11.30	赤色条斑	H			
4-4	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
5-1	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
5-2	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
5-3	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
5-4	東村	2001.11.30	赤色条斑	H			
6-1	糸満市	2001.11.28	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311318
6-2	糸満市	2001.11.28	赤色条斑	H			
6-3	糸満市	2001.11.28	赤色条斑	H			
6-4	糸満市	2001.11.28	赤色条斑	H			
9-1	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311319
9-2	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
9-3	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
9-4	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
10-1	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311320
10-2	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
10-3	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
10-4	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
11-1	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311321
11-2	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
11-3	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
11-4	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	H			
12-1	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A	<i>A. a. subsp. avenae</i>		311311
12-2	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A	<i>A. a. subsp. avenae</i>		311312
12-3	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A			
12-4	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A			
13-1	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A	<i>A. a. subsp. avenae</i>		311313
13-2	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A	<i>A. a. subsp. avenae</i>		311314
13-3	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A			
13-4	那覇市	2001.11.28	赤色条斑	A			
14-1	中城村	2001.11.29	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311322
14-2	中城村	2001.11.29	赤色条斑	H			
14-3	中城村	2001.11.29	赤色条斑	H			
14-4	中城村	2001.11.29	赤色条斑	H			
16-1	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311323
16-2	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H			
16-3	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H			
16-4	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H			
17-1	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311324

分離株番号	収集場所	収集年月日	分離葉病斑 <sup>a)</sup>	rDNA <sup>b)</sup>	学名 <sup>c)</sup>	ARA <sup>d)</sup>	MAFF番号
17-2	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H			
17-3	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H			
17-4	読谷村	2001.11.29	赤色条斑	H			
18-1	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311325
18-2	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H			
18-3	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H			
18-4	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H			
19-1	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H	<i>H. rubrisubalbicans</i>	+	311326
19-2	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H			
19-3	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H			
19-4	名護市	2001.11.29	赤色条斑	H			
20-1	中城村	2001.11.29	白色条斑	X	<i>X. albilineans</i>		
20-2	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
20-3	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
20-4	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
21-1	中城村	2001.11.29	白色条斑	X	<i>X. albilineans</i>		
21-2	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
21-3	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
21-4	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
22-1	中城村	2001.11.29	白色条斑	X	<i>X. albilineans</i>		
22-2	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
22-3	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
22-4	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
23-1	中城村	2001.11.29	白色条斑	X	<i>X. albilineans</i>		
23-2	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
23-3	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
23-4	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
24-1	中城村	2001.11.29	色条斑	X	<i>X. albilineans</i>		
24-2	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
24-3	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			
24-4	中城村	2001.11.29	白色条斑	X			

a) 分離した葉の病徴。赤色条斑，赤すじ病または疑似赤すじ病；白色条斑，白すじ病

b) 16S rDNAの相同性に基づくグルーピング。A, *A. a. subsp. avenae*と相同性が高い菌株；H, *H. rubrisubalbicans*と相同性が高い菌株；X, *X. albilineans*と相同性が高い菌株

c) 細菌学的性質の調査によって同定した菌株の学名。

d) アセチレン還元活性 (ARA) による窒素固定能測定。+, 窒素固定能有り；NT, 未試験

#### 4. 所感

本探索では，サトウキビ病害の病原細菌3属3種を収集した。探索を行う直前に台風が通過したため，残念ながら宮古島では適当な試料を見つけることができず分離株を得ることができなかった。白すじ病と思われる試料からは，病斑を検鏡しても細菌の噴出が全くない試料が多く，白色で極めて細い条斑を呈していた試料からのみ分離株を得た。赤すじ病または疑似赤すじ病と思われる病斑については，名前の通り極めて病斑が酷似しており，病斑からはその判別はできなかった。分離株を検討した結果，赤色条斑を呈していた試料からの分離株のほとんどは*H. rubrisubalbicans*であった。このことから赤色条斑を呈するサトウキビの多くは，疑似赤すじ病だと推測する。非常に酷似した赤色条斑を呈するこの2つの病害は，今後，1病名2病原とする検討が必要ではないだろうか。

また、*H. rubrisubalbicans*と同一し窒素固定能を検定した菌株については、全ての菌株が窒素固定能を有していたことから、イネ科に感染する窒素固定細菌として、今後さらに収集、研究を行うことで新たな知見を得られると考える。

今回、微生物ジーンバンクに登録する価値の高い菌株が得られた。このうち*Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Manns 1909) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters and De Ley 1992 と同一した4菌株と*Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Christopher and Edgerton 1930) Baldani, Pot, Kirchhof, Falsen, Baldani, Olivares, Hoste, Kersters, Hartmann, Gillis and Dobereiner 1996 と同一した12菌株を微生物ジーンバンクに登録した。*X. albilineans*と同一した菌株は、接種試験による病原性の確認が難しくその方法の検討段階であるが、病原性が確認でき次第登録したい。

## 5. 謝辞

本探索では、多くの方々の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秋和さやか氏には、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、情報提供など多くのご支援をいただいた。ここに記して、深く感謝の意を表す。

## 6. 引用文献

- 1) 日本植物病理学会 (2000). 日本植物病名目録. p. 68, 日本植物防疫協会, 東京
- 2) Baldani, J. I., B. Pot, G. Kirchhof, E. Falsen, V. L. D. Baldani, F. J. Olivares, B. Hoste, K. Kersters, A. Hartmann, M. Gillis, and J. Dobereiner. (1996). Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 802-810.
- 3) 西山幸司・篠原弘亮 (2001). 作物の細菌病2001年追補 (西山幸司ほか編). 日本植物防疫協会. 東京.
- 4) 浅沼修一 (1992). 新編土壌微生物実験法 (土壌微生物研究会編). pp. 224-230. 養賢堂, 東京.

## Summary

Sugarcane plants were collected in order to isolate bacteria from November 25 to December 1, 2001 in Miyako island and Okinawa island, Okinawa, Japan. Nine leaves with white streaks and 25 leaves with red or mottled stripes were collected. Eighty strains of bacteria were isolated from these stripes. These strains were subjected to 16S ribosomal DNA (rDNA) sequencing for homology analysis. Twenty strains showed high homogeneity to the genus *Xanthomonas*. Eight and 52 strains had high homogeneity to *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*

and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, respectively. Nine of 52 strains showing high homogeneity to *H. rubrisubalbicans* in 16S ribosomal DNA (rDNA) sequence were identified as *H. rubrisubalbicans* by 55 bacteriological characteristics. In acetylene reduction activity test, these 9 strains were positive. These results suggest that most of leaves with red streak symptoms, e. g. red stripe and mottled stripe, were caused by *H. rubrisubalbicans*.

# 微生物の探索収集プロフィール



宜野湾市におけるタイモ腐敗塊茎の調査・収集  
(佐藤)



石垣市で観察したチカラシバ属植物の病徴  
(月星)



沖縄本島読谷村での探索収集  
(篠原)



サトウキビ疑似赤すじ病  
(篠原)



笠利町（奄美大島）で観察したチンゲンサイの病徴  
(堀田)



沖縄本島における植物病原細菌の探索・収集  
(堀田)