

Pseudomonas 属細菌が産生する生育抑制物質

生井 潔・須永哲央・木嶋利男・橋田弘一*

摘要：胚軸切断捕捉法を用いて、トマト組織内より分離した細菌の中に、植物の生育を抑制する菌株（2862, 2863及び2865菌株）が認められたので、生育抑制技術確立の資とするため、そのメカニズムについて検討した。

1. 2862, 2863及び2865菌株を無菌系でトマトに胚軸切断接種し、1/3 MS培地に挿木すると、トマトの生育が抑制された。その後、培地上にレタスを播種すると、レタスの生育も抑制した。これらの細菌の細菌学的性質を検討したところ、*Pseudomonas*と同定された。

2. 2862, 2863及び2865菌株接種によって生育が抑制されたトマトの培地を、100℃、10分間オートクレープし、レタスを播種したところ、生育が抑制された。また、同様の培地をアセトン抽出したところ、抽出物によるレタスの生育抑制効果が認められた。これらのことから、耐熱性の生育抑制物質の存在が明らかとなった。

3. 2865菌株を各種平板培地で培養し、アセトンによる生育抑制物質の抽出を行ったところ、サッカロースを含む培地で、細菌単独で産生されることがわかった。

4. 生育抑制物質はエタノールでも培地中から抽出でき、酢酸エチルによる分画で、両性物質であることがわかった。

キーワード：胚軸切断捕捉法, *Pseudomonas*属細菌, 生育抑制物質

Plant growth repressor produced by *Pseudomonas* spp.

Kiyoshi NAMAI, Tetuo SUNAGA, Toshio KIJIMA, Kouiti HASHIDA

Summary: Many bacteria were isolated from interior tissues of tomato plants by the hypocotyl trapping method. When the isolates were inoculated to tomato plants *in vitro* by the hypocotyl cutting inoculation, three strains of the bacteria, 2862, 2863 and 2865, repressed plant growth. These bacteria strains were identified as *Pseudomonas* spp. In order to apply this phenomenon to plant growth regulation, the mechanism of plant growth repression were studied. The strains were inoculated to tomato plants *in vitro* by hypocotyl cutting inoculation and the inoculated plants were cultured on 1/3 MS-medium. Lettuce seedling grown on these medium showed growth repression. The medium sterilized by autoclave at 100 °C for ten minutes after removal of tomato plants repressed the growth of lettuce. And also, acetone extract of the medium showed the repression. These results show that the plant growth repression is caused by thermostable substances derived from the bacteria. The repressor was also extracted from the medium on which strain 2865 was cultured with only saccharose in MS-medium. Extraction of the substances by not only acetone but also ethanol suggest that the repressor is amphipathic.

Key words: hypocotyl trapping method, *Pseudomonas* spp., plant growth repressor

I 緒言

微生物を利用した植物の生育促進については、生育促進効果を有する根圏細菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR)⁹⁾ や拮抗微生物等による効果が報告されており、PGPRが病害防除効果を合わせ持つ例や拮抗微生物が生育促進効果を示す例等、PGPRと拮抗微生物が明確に区別できない場合も多い^{7, 8, 11, 12, 16, 17)}。これは、これらの微生物が抗生物質やシデロフォア等の数種の関連物質を産生することや、その物質が病原菌やそれ以外の有害根圏細菌 (Deleterious rhizobacteria; DRB) の生育を抑制することで、植物の生育を促進するというメカニズムが要因の1つとして考えられている^{1, 2, 6, 8, 10, 13, 14, 18)}。

一方、我々は胚軸切断捕捉法⁸⁾により様々な植物を用いて土壌細菌の分離を行ってきたが、その中には病害防除効果を示す菌株⁸⁾や生育促進効果を示す菌株^{4, 5)}が含まれている。しかし、これらの細菌は抗菌活性を持たない菌株が多いこと及び植物組織内に定着することから、接種した細菌が植物体を刺激し、活性を高めることや抵抗性を誘導するという可能性も考えられているが、依然推定の域を出ない。

本稿で報告する2862, 2863及び2865菌株は、胚軸切断捕捉法⁸⁾を用いてトマト組織内より分離された細菌で、閉鎖系において胚軸切断接種法⁸⁾を用いてトマトに接種することで生育抑制効果を示した。また、これらの細菌による生育抑制は細胞の伸長抑制を伴っていることが顕微鏡観察で確認されている。植物の生育抑制に微生物を用いるという考え方は馴染みが薄いと思われるが、簡易な接種法による技術が確立できれば、使える場面は多いと考えられる。しかし、開放系でトマトに胚軸切断接種しても生育は抑制されなかった。そこで、生育抑制技術確立の資とするため、効果発現のメカニズムについて検討し、考察を加えたので報告する。なお、本稿の一部は平成8年度日本植物病理学会で報告した。

II 材料及び試験方法

1. 供試細菌及び培養法

供試細菌は胚軸切断捕捉法によりトマト組織内から分離した2851, 2852, 2859, 2862, 2863, 2865, 2890, 2892, 2893及び2895の10菌株⁸⁾で、ニュートリエント寒天培地 (NA培地) に画線して室温で培養したものを供試した。

2. 細菌接種によるトマトの生育反応

表面殺菌したトマト種子を、MS培地の無機塩成分を

1/3に減量し、シヨ糖3%及び寒天1%を加えた培地 (1/3MS寒天培地) に播種し、胚軸切断接種法⁸⁾を用いて閉鎖系で供試菌株を接種した。すなわち、本葉2葉程度に生育したトマトの胚軸部を切断し、2851, 2852, 2859, 2862, 2863, 2865, 2890, 2892, 2893及び2895菌株を各々滅菌水に懸濁した細菌浮遊液 (10^6 cfu/ml) に切り口を浸漬接種した後、1/3MS寒天培地に挿木した (第1図)。その後、15℃で60日間培養し、草丈、根長、地上部生体重及び根部生体重を調査した。対照区は胚軸切断し無接種で挿木した区を設けた。なお、トマトは桃太郎、ハウス桃太郎、T-92、カップルO及びバルカンの5品種を用い、各区3個体ずつ供試した。

3. トマトを培養した培地上でのレタスの生育反応

2851, 2852, 2859, 2862, 2863, 2865, 2890, 2892, 2893及び2895菌株を胚軸切断接種法を用いて閉鎖系でトマトに接種し、1/3MS寒天培地に挿木して15℃で45日間培養後、一方はトマトを抜き取り、もう一方はトマトを残した。各々の培地上に、表面殺菌したレタス (品種: ハイリック) 種子を播種し、桃太郎、ハウス桃太郎及びカップルOを培養した培地に播種したレタスは15日後に全体生体重を、バルカン及びT-92を培養した培地に播種したレタスは30日後に地上部生体重を生育調査した。また、対照区はトマトを胚軸切断し無接種で挿木した培地上にレタスを播種した区とした。

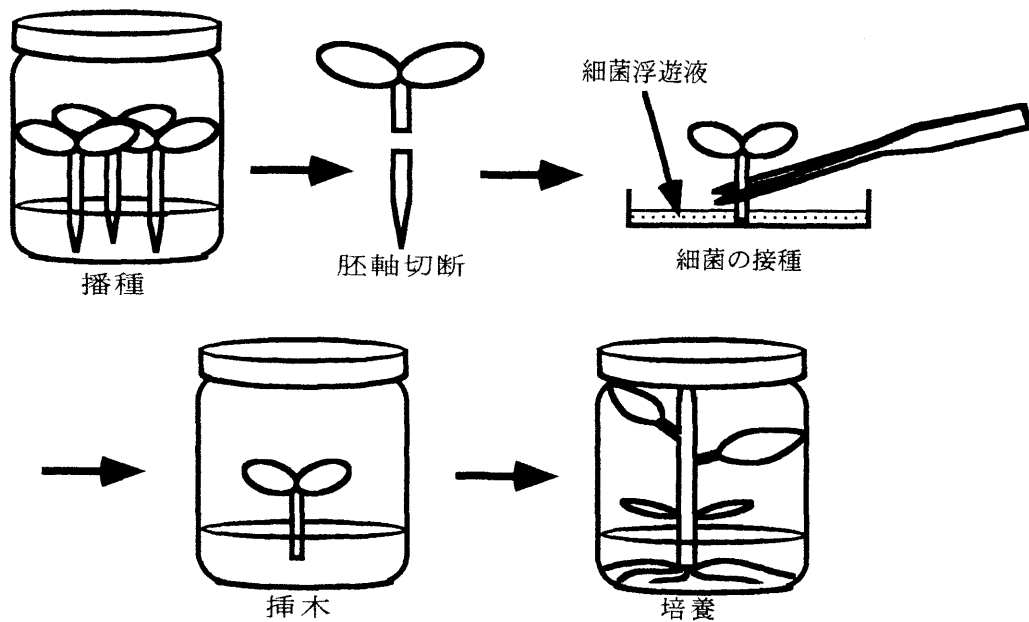
4. トマト培養後再滅菌した培地上でのレタスの生育反応

2851, 2852, 2859, 2862, 2863, 2865, 2890, 2892, 2893及び2895菌株を胚軸切断接種法を用いて閉鎖系でトマトに接種し、1/3MS寒天培地に挿木して15℃で45日間培養後、トマトを抜き取り、100℃、10分間オートクレーブ滅菌した。その後、表面殺菌したレタス種子を培地上に播種し、20℃16日間培養後に生体重を調査した。対照区はトマトを胚軸切断し無接種で挿木した培地を滅菌した区とした。なお、トマトは桃太郎を供試した。

5. 供試細菌の細菌学的性質

トマト及びレタスの生育を抑制した、2862, 2863及び2865菌株を供試した。

グラム反応はRyu¹⁵⁾の方法、OF試験はHugh and Leifsonの培地 (ペプトン: 2 g, NaCl: 5 g, K_2HPO_4 : 0.3 g, BTB: 0.3 g, 寒天: 15 g/ℓ), 利用能試験はAyers, Rupp and Johnsonの培地 ($NH_4H_2PO_4$: 1 g, KCl: 0.2 g, $MgSO_4$: 0.2 g, BTB: 0.3 g, 寒天: 15 gに各基質を1%添加/ℓ), デカルボキシラーゼはMoellerの培地 (ペプトン: 5 g, 肉エキス: 5 g, グルコース: 0.5 g, BCP: 0.01 g, クレゾール赤: 0.005 g, ピリドキサール:



第1図 胚軸切断接種法を用いた無菌植物への細菌接種法

0.005 g/ℓ), レバンの産生は5%サッカロース添加NA培地, 蛍光色素の産生はキングB培地(ペプトン: 20 g, グリセリン: 20ml, K₂HPO₄: 1.5 g, MgSO₄: 1.5 g, 寒天: 15 g/ℓ), エスクリンの加水分解はDyeの培地(ペプトン10 g, イーストエキストラクト3 g, エスクリン1 g, クエン酸鉄0.5 g)を用い, その他の性状はCowan³⁾の方法を用いた.

6. トマトを培養した培地からのアセトン抽出液によるレタスの生育反応

2862, 2863及び2865菌株を胚軸切断接種法を用いて閉鎖系でトマトに接種し, 1/3MS寒天培地に挿木して15℃で45日間培養した. その後, 培地を破碎して培地40mlに対し100mlのアセトンを加え60分間振盪し, No.2ろ紙でろ過した抽出液をロータリーエバポレーターで10ml程度に濃縮した後, 100℃, 10分間オートクレーブ滅菌して試料液とした. ろ紙を2枚敷き滅菌したシャーレに試料液0.5 ml及び滅菌水2.5 mlを加え, 表面殺菌したレタスを各シャーレ20粒ずつ3反復播種し, 20℃7日間培養後, 根長, 草丈, 生体重を調査した. 対照区はトマトを胚軸切断し無接種で挿木した培地から抽出した試料液を添加した区(無接種区)及び滅菌水のみを添加した区(水区)を設けた(第2図).

7. 有機溶媒による平板培地からの抽出液に対するレタスの生育反応

方法1: 各供試培地をシャーレに約25mlずつ分注し, 2865菌株の細菌浮遊液(10⁹ cfu/ml程度) 0.5 mlを塗布して7日間室温で培養した後, 培地を破碎して培地200mlに

対し等量のアセトンを加え60分間振盪し, No.2ろ紙でろ過した抽出液をロータリーエバポレーターで10ml程度に濃縮した. その濃縮液を100℃, 10分間オートクレーブ滅菌して試料液とし, ろ紙を2枚敷き滅菌したシャーレに試料液と滅菌水を加え, 表面殺菌したレタスを各シャーレに10粒ずつ播種し, 後に根長, 草丈及び生体重を調査した.

1) 培地の違いが生育抑制物質産生に及ぼす影響

供試培地は1/3MS寒天培地及びNA培地で, 方法1により試料液1 ml, 滅菌水2 mlを加え, レタスを3反復播種し, 15℃20日間培養後に調査した. 対照区は各々の培地に2865菌株を塗布せず, 培地のみを抽出した試料液を添加した区及び滅菌水のみを添加した区を設けた.

2) 生育抑制物質の抽出溶媒の検討

供試培地は1/3MS寒天培地で, 抽出溶媒はアセトンの代わりにメタノール, エタノール, ブタノール, アセトニトリル, 酢酸エチル, ベンゼン, クロロホルム, ジクロロメタン, ヘキサンを供試した. 方法1により試料液1 ml, 滅菌水2 mlを加え, レタスを播種し, 20℃22日間培養後に調査した. 対照区は2865菌株を塗布せず, 培地のみを各々の有機溶媒で抽出した試料液を添加した区及び滅菌水のみを添加した区を設けた.

3) 1/3MS培地中の成分が生育抑制物質産生に及ぼす影響

供試培地は1/3MS寒天培地, 1/3MS寒天培地のストック液No. 1~No.7(第1表)を1つずつ除いた培地及び3

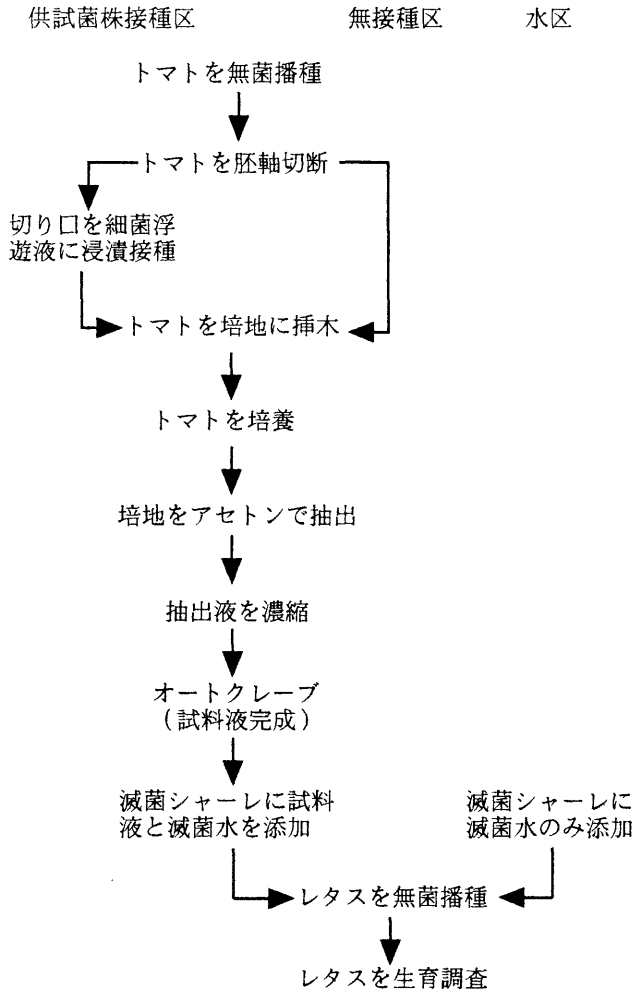
%サッカロース寒天培地で、方法1により試料液1ml, 滅菌水2mlを加え、レタスを3反復播種し、20℃30日間培養後に調査した。対照区は滅菌水のみを添加した区を設けた。

4) サッカロースが生育抑制物質産生に及ぼす影響

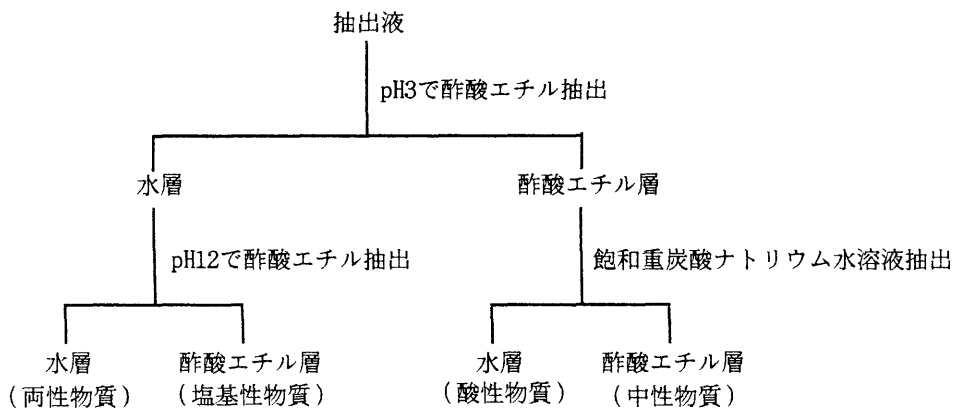
供試培地はNA培地及び3%サッカロース添加NA培地で、方法1により試料液0.3ml, 滅菌水3mlを加え、レタスを2反復播種し、20℃14日間培養後に調査した。対照区は各々の培地に2865菌株を塗布せず培地のみを抽出した試料液を添加した区及び滅菌水のみを添加した区を設けた。

8. 培地抽出液の酢酸エチルによる分画

3%サッカロース添加NA培地をシャーレに約25mlずつ分注し、2865菌株の細菌浮遊液(10⁹cfu/ml程度)0.5mlを塗布して7日間室温で培養した後、培地を破碎して等量のアセトンを加え60分間振盪し、No2ろ紙でろ過した抽出液をロータリーエバポレーターでアセトン臭が無くなるまで濃縮した。その後純水を加え50mlにし、pH3に調整して等量の酢酸エチルを加え、15分間振盪後静置して分画した。その後、水層はpH12に調整し酢酸エチルを加え同様に分画し、水層を両性物質画分、酢酸エチル層を塩基性物質画分とした。また、1回目の分画の酢酸エチル層は等量の飽和重炭酸水素ナトリウム水溶液で同様に分画し、水層を酸性物質画分、酢酸エチル層を中性物質画分とした(第3図)。なお、酸性物質画分はpH2.5に調整し、酢酸エチルに転溶した。また、分画はそれぞれ3回ずつ行った。それぞれの画分を濃縮して100℃、10分間オートクレープし、ろ紙を2枚敷き滅菌したシャーレに画分濃縮液を0.3ml, 滅菌水を3ml加え、表面殺菌したレタスを各シャーレに10粒ずつ2反復播種し、20℃25日間培養後に根長、草丈、生体重を調査した。



第2図 トマトを培養した培地からのアセトン抽出液によるレタスの生育反応調査方法



第3図 酢酸エチルによる分画

第1表 1/3MS培地のストック液ごとの成分

ストック液番号	成分名	成分量(mg/ℓ)
No.1	KNO ₃	633
	NH ₄ NO ₃	550
	KH ₂ PO ₄	57
No.2	MnSO ₄ · 4H ₂ O	7.4
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.9
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.008
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.008
	H ₃ BO ₃	2.1
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.08
No.3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	123
No.4	CaCl ₂ · 2H ₂ O	147
No.5	KI	0.28
No.6	FeSO ₄ · 7H ₂ O	9.3
	Na ₂ EDTA	12.4
No.7	ミオイノシトール	100
	ニコチン酸	0.5
	塩酸ピリドキシン	0.5
	塩酸チアミン	0.1
	グリシン	2

III 結果及び考察

1. 細菌接種によるトマトの生育反応

胚軸切断捕捉法により分離した細菌は、胚軸切断接種法を用いて植物に接種すると、生育や病原菌に対する反応が菌株によって異なる。そこで、トマト組織内より分離した10菌株を用い、閉鎖系におけるトマトの生育反応について検討した。

供試した全てのトマト品種で、2862, 2863及び2865菌株接種区は無接種区及び他の菌株接種区と比較し、草丈、根長、地上部重及び根重の全ての調査項目において、生育抑制が認められた(第2表, 写真1)。特に根の生育抑制が著しく、培地中に伸長した根は観察されなかった。これらの結果から、トマトの生育を抑制し、根が嫌う物質が培地中に存在する可能性が示唆された。また、2862, 2863及び2865菌株は1/3MS培地上での旺盛な生育が認められたため、細菌が産生する様々な物質が培地中に蓄積されていることが考えられる。

2851, 2852, 2859, 2892, 2893及び2895菌株接種区は無接種区と比較して若干の生育差は見られるが、2862, 2863及び2865菌株接種区のような著しい生育差は認められなかった。

2. トマトを培養した培地上でのレタスの生育反応

トマトの生育を抑制する菌株が認められたため、その培地上に他感作用感受性が強いといわれるレタスを播種し、トマト以外の植物に対する生育抑制効果について検討した。

2862, 2863及び2865菌株をトマトに接種した区は、供試したトマトの品種によらず、また、トマトを抜き取った後レタスを播種するか、抜き取らず播種するかにかかわらず、レタスの生育が抑制された(第3表, 写真2)。この結果から、胚軸切断接種法を用いなくとも、生育抑制効果が認められることがわかった。また、トマトを抜き取っても結果が変わらないことから、細菌が単独で作用するか、もしくはトマトと細菌の相互作用により産生された物質が培地中に蓄積され、その物質が作用することが考えられる。また、トマト及びレタスのみならず、多くの植物の生育を抑制する可能性が考えられるため、今後検討の必要がある。

2851, 2852, 2859, 2892, 2893及び2895菌株を接種した区でのレタスの生育は、生体重では差が認められるものの、写真2の2865菌株接種区に見られるような生育抑制は認められなかった。

3. トマト培養後再滅菌した培地上でのレタスの生育反応

培地上で生育する細菌の影響を検討するため、100℃, 10分間オートクレーブ処理をした後、レタスを播種した。

2862, 2863及び2865菌株を接種したトマトを培養した培地を再滅菌し、レタスを播種した区では、無接種区と比較してレタスの生育が抑制された(第4表)。特に根の伸長が著しく劣り根の先端が褐変する、もしくは発芽初期で枯死するという症状を呈し、正常に生育した個体は認められなかった。この結果から、培地中に何らかの

第2表 トマトの胚軸切断接種苗の生育反応

調査項目	供試品種	供 試 菌 株										
		無接種	2851	2852	2859	2862	2863	2865	2890	2892	2893	2895
草丈 (cm)	桃太郎	6.2	5.4	7.4	5.8	1.7	1.2	2.2	7.5	6.5	7.2	6.3
	カップルO	5.2	4.5	5.5	6.1	1.1	1.2	1.2	6.0	6.0	5.7	5.9
	ハウス桃太郎	6.3	5.8	7.8	9.3	3.3	2.9	3.5	9.0	8.8	9.4	8.8
	バルカン	8.1	5.9	7.3	7.7	3.1	2.7	2.8	7.2	6.8	9.0	7.7
	T-92	7.9	6.8	8.9	9.1	3.6	3.4	3.3	9.0	8.1	8.1	7.4
	平均	6.7	5.7	7.4	7.6	2.6	2.3	2.6	7.7	7.2	7.9	7.2
根長 (cm)	桃太郎	13.3	8.5	13.8	12.6	1.5	1.8	3.0	8.2	9.3	10.5	13.7
	カップルO	8.5	6.1	9.6	10.9	1.9	3.4	1.9	9.3	10.7	9.0	10.5
	ハウス桃太郎	14.1	12.8	13.3	10.5	1.2	0.8	0.8	13.6	16.8	15.9	12.8
	バルカン	10.1	6.9	9.9	7.2	0.8	0.6	0.8	9.5	8.2	6.6	8.2
	T-92	21.2	10.8	16.8	11.6	2.7	0.9	0.7	13.9	13.8	10.7	13.4
	平均	13.4	9.0	12.7	10.6	1.6	1.5	1.4	10.9	11.8	10.5	11.7
地上部重 (g)	桃太郎	1.66	1.29	1.93	1.49	0.19	0.10	0.29	1.69	1.86	1.91	1.70
	カップルO	1.98	1.34	1.65	1.48	0.14	0.18	0.24	1.81	1.63	1.75	1.63
	ハウス桃太郎	1.63	1.95	1.88	1.95	0.21	0.29	0.24	2.43	2.31	2.21	2.35
	バルカン	1.58	1.14	1.43	1.23	0.13	0.16	0.20	1.63	1.38	1.60	1.49
	T-92	2.18	1.70	1.90	1.75	0.28	0.20	0.22	2.20	1.98	1.83	2.01
	平均	1.81	1.48	1.76	1.58	0.19	0.19	0.24	1.95	1.83	1.86	1.84
根重 (g)	桃太郎	0.79	0.40	0.85	1.09	0.10	0.08	0.15	0.65	0.68	0.54	1.05
	カップルO	0.42	0.27	0.54	0.74	0.09	0.14	0.14	0.47	0.68	0.76	0.57
	ハウス桃太郎	1.06	0.89	1.15	1.01	0.01	0.01	0.01	0.86	1.52	0.88	1.25
	バルカン	0.27	0.12	0.21	0.17	0.01	0.01	0.01	0.37	0.24	0.19	0.28
	T-92	0.87	0.56	0.70	0.84	0.14	0.02	0.02	1.01	0.58	0.58	0.90
	平均	0.68	0.45	0.69	0.77	0.07	0.05	0.07	0.67	0.74	0.59	0.81

耐熱性の物質が存在し、その物質を介して生育抑制が起こると考えられた。また、根の先端の褐変や枯死が起こるのは、生育抑制物質の濃度が高いためと推察される。

また、2893及び2895菌株区は無接種区と比較して2倍以上の生体重を示した。これは、培地が軟弱になっており、根の伸長が良く、そのため生育が良好であったと考えられた。

4. 供試細菌の細菌学的性質

2862、2863及び2865菌株の細菌学的性質について検討した。

2862、2863及び2865菌株は桿状であり、極鞭毛を有し、グラム陰性、好気性、蛍光色素の産生は陰性、ポリ-β-ヒドロブチレート (PHB) の顆粒を作り、アルギニンジヒドロラーゼ陽性であることから *Pseudomonas* と同定された (第5表)。

5. トマトを培養した培地からのアセトン抽出液によるレタスの生育反応

生育抑制物質が培地中に存在すると考えられたため、アセトンによる抽出を試みた。

2862、2863及び2865菌株を接種したトマトを培養した培地の抽出液を処理した区 (2862、2863及び2865区) は、無接種トマトの培地抽出液を処理した区 (無接種

区) 及び水のみ区 (水区) と比較して、草丈、生体重は同等の生育を示したものの、根長が1/3程度に抑制された (第6表)。この結果から、培地中に生育抑制物質が存在し、アセトンにより抽出できることが明らかとなった。また、本物質は特に根の生育を抑制することから、草丈/根長の値を比較してみると、2862、2863及び2865区は無接種区及び水区の3倍以上の値を示した (第4図)。

6. 有機溶媒による平板培地からの抽出液に対するレタスの生育反応

1) 培地の違いが生育抑制物質産生に及ぼす影響

培地中に存在する生育抑制物質が、細菌単独で産生されるのか、トマトとの相互作用により産生されるのかを明らかにするため、2865菌株を単独で平板培地上で培養し、菌体を含めた培地からアセトンによる抽出を行った。2865菌株を培養した1/3MS寒天培地の抽出物を処理した区 (2865培養1/3MS) は、1/3MS寒天培地のみの抽出物を処理した区 (1/3MS) と比較してレタスの生育抑制効果が認められた (第7表)。この結果から、本菌株は細菌単独で生育抑制物質を産生することがわかった。

また、本菌株は細菌培養用培地として汎用されるNA培地上では生育するものの、その培地の抽出物を処理した区 (2865培養NA) ではレタスの生育抑制効果は認められ

第3表 胚軸切断接種したトマト培地上でのレタスの生育反応

供試菌株	トマト ¹⁾	桃太郎 (15日後調査)			カップルO (15日後調査)			ハウス桃太郎 (15日後調査)			バルカン (30日後調査)			T-92 (30日後調査)		
		播種数	生育状況	平均重量 ²⁾ (mg)	播種数	生育状況	平均重量 ²⁾ (mg)	播種数	生育状況	平均重量 ²⁾ (mg)	播種数	生育状況	平均重量 ²⁾ (mg)	播種数	生育状況	平均重量 ²⁾ (mg)
無接種	あり	12	○	19	14	○	12	9	○	21	15	○	27	15	○	26
	なし	14	○	20	13	○	15	13	○	17	15	○	23	15	○	15
2851	あり	15	○	17	10	○	14	12	○	28	18	○	24	11	○	20
	なし	10	○	16	9	○	17	9	○	57 ³⁾	15	○	35	11	○	35
2852	あり	11	○	21	13	○	12	13	○	23	15	○	30	15	○	17
	なし	13	○	21	13	○	16	16	○	47 ³⁾	15	○	39	13	○	44
2859	あり	13	○	20	11	○	14	11	○	27	16	○	23	16	○	24
	なし	15	○	16	13	○	47 ³⁾	11	○	38	14	○	26	14	○	37
2862	あり	9	×	7	11	×	9	11	×	6	13	×	10	11	×	7
	なし	10	×	6	11	×	7	18	×	7	14	×	7	14	×	7
2863	あり	14	×	10	10	×	9	13	×	8	16	×	13	14	×	7
	なし	16	×	8	11	×	8	15	×	6	13	×	7	16	×	12
2865	あり	16	×	13	10	×	10	15	×	9	16	×	11	12	×	8
	なし	12	×	8	16	×	9	21	×	7	13	×	9	13	×	10
2890	あり	11	○	19	11	○	19	14	○	28	17	○	25	12	○	19
	なし	12	○	22	12	○	22	12	○	24	13	○	23	-	-	- ⁶⁾
2892	あり	16	○	23	12	○	15	-	-	- ⁶⁾	18	○	26	14	○	19
	なし	12	○	24	11	○	18	13	○ ⁴⁾	15	14	○	43	15	○	18
2893	あり	12	○	24	10	○	15	12	○	29	18	○	22	13	○	20
	なし	13	○	24	11	○	14	16	○	33	15	○	29	12	○	15
2895	あり	14	○	20	15	○	14	11	○	28	12	○	24	13	○	26
	なし	16	○	26	13	○	17	10	○	31	14	○	31	11	○	32

- 注1) トマトあり：トマトをそのままレタスを播種
なし：トマトを抜き取りその後レタスを播種
2) 平均重量
桃太郎、カップルO、ハウス桃太郎：全体生体重
バルカン、T-92：地上部生体重
3) 培地が軟弱になっていた。
4) レタス13個体中1個体生育不良
5) 生育状況は観察により
○：写真2の無接種と同様な生育正常
×：写真2の2895接種と同様な生育異常
6) -：雑菌混入により調査できず。

第4表 再滅菌培地上でのレタスの生育反応

供試菌株	播種数	生育状況			平均生体重 (mg)
		正常	抑制	枯死 ¹⁾	
無接種	16	16			13
2851	15	15			20
2852	13	13			18
2859	15	15			23
2862	17		7	10	10 ²⁾
2863	19		16	3	9 ³⁾
2865	18		16	2	8 ³⁾
2890	18	18			26
2892	18	18			24
2893	16	16			33
2895	15	15			40

- 注1) 枯死：発芽初期で枯死
2) 生育した7個体の平均生体重
3) 生育した16個体の平均生体重

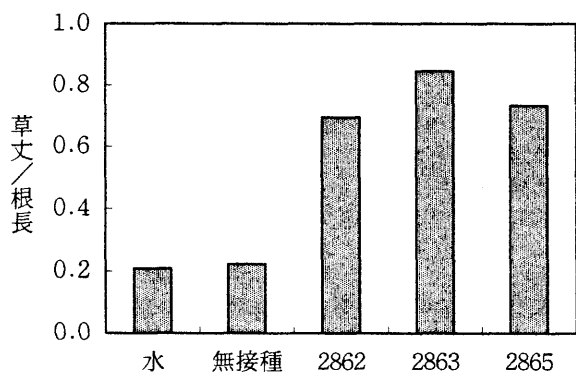
第5表 供試菌株の細菌学的性質

性 質	2862	2863	2865	性 質	2862	2863	2865
形	桿	桿	桿	利用能試験			
鞭毛	+	+	+	フマル酸	+/K	+/K	+/K
グラム反応	-	-	-	コハク酸	+/K	+/K	+/K
OF試験	0	0	0	イタコン酸	-	-	-
蛍光色素の産生	-	-	-	α-D-ガラクトツロン酸	+/K	+/K	+/K
カタラーゼの活性	+	+	+	安息香酸	-	G/-	G/-
硝酸塩の還元	W	W	+	サッカリン酸	+/K	+/K	+/K
硫化水素の産生	-	-	-	D-酒石酸	G/-	G/-	G/-
デカルボキシラーゼ				L-酒石酸	+/K	+/K	+/K
オルニチン	+	+	+	アントラニル酸	-	G/-	G/-
アルギニン	-	-	-	シトラコン酸	+/K	+/K	+/K
グルタミン	W	W	+	アゼライン酸	+/K	+/K	+/K
アスパラギン	+	+	+	馬尿酸	+/K	+/K	+/K
オキシダーゼの活性	-	-	-	プロピオン酸	-	G/-	G/-
アンモニアの産生	+	+	+	リンゴ酸	+/K	+/K	+/K
ゼラチンの液化	D	D	-	マロン酸	+/K	+/K	+/K
ツイーン80の加水分解	+	+	+	m-ヒドロキシ安息香酸	-	-	-
レシチナーゼの活性	+	+	+	しゅう酸	-	-	W
レバンの産生	W	-	-	ピメリン酸	+/K	+/K	+/K
エスクリンの加水分解	+	-	-	ピルビン酸	+/K	+/K	+/K
BCPミルクの反応	KD/+	KD/+	KD/+	没食子酸	W	-	-
カゼインの加水分解	W	+	+	β-アラニン	+/K	+/K	+/K
ジャガイモの腐敗	-	-	-	ベタイン	+/K	+/K	+/K
炭素源からの酸の産生				トレオニン	+/K	+/K	+/K
ガラクトース	+	+	+				
ズルシトール	+	+	+				
アドニトール	G/-	+	+				
D-ソルビトール	+	+	+				
イヌリン	-	-	G/-				
リボース	+	+	+				
トレファロース	+	+	+				
α-メチル-D-グルコシド	-	-	-				
L-アラビノース	+	+	+				
メリビオース	-	-	-				
D-セロビオース	+	+	+				
スターチ	-	-	-				

注 +:陽性, -:陰性, W:弱陽性
 0:酸化的にグルコースを分解, F:発酵的にグルコースを分解
 K:アルカリを産生, A:酸を産生, D:消化
 G/-:生育するが酸やアルカリは産生しない

第6表 胚軸切断接種したトマト培地の抽出液によるレタスの生育反応

処理区	供試個体数	根長(mm)	草丈(mm)	生体重(mg)
水	60	37.7	7.8	9.0
無接種	60	37.4	8.3	10.3
2862	60	13.1	9.1	8.6
2863	60	9.7	8.2	7.6
2865	60	12.4	9.1	9.2



第4図 草丈/根長

なかった。これは、NA培地上では生育抑制物質が産生されないか、もしくは産生されても極少量であるためと思われる。

これらの結果から、NA培地には含まれず、1/3MS培地に含まれる成分が、生育抑制物質産生に関与することが考えられる。

2) 生育抑制物質の抽出溶媒の検討

生育抑制物質はアセトンによって抽出できることがわかっているが、物質の性質を知るため、他の有機溶媒についても検討した。

抽出溶媒にエタノールを用いた場合、2865菌株を培養

第7表 培地の違いが生育抑制物質産生に及ぼす影響

処 理 区	供試個体数	根長(mm)	草丈(mm)	生体重(mg)
水	30	31.2	9.1	8.7
1/3MS	30	16.4	11.1	8.9
2865培養1/3MS	30	5.0	6.5	4.8
NA	30	30.1	8.8	6.4
2865培養NA	30	24.6	10.3	9.6

第8表 生育抑制物質の抽出溶媒の検討結果

抽 出 溶 媒	2865培養の有無	不発芽数/供試個体数	根長(mm)	草丈(mm)	生体重(mg)
メタノール	有	7/10	2.7	6.0	4.3
	無	9/10	16.0	10.0	10.0
エタノール	有	6/10	3.8	5.5	4.0
	無	1/10	14.4	10.3	9.7
ブタノール	有	0/10	15.9	6.9	4.9
	無	0/10	23.9	8.8	7.8
アセトニトリル	有	9/10	4.0	7.0	4.0
	無	9/10	16.0	8.0	7.0
酢酸エチル	有	0/10	36.5	8.9	8.0
	無	1/10	36.8	9.7	9.1
ベンゼン	有	1/10	34.9	9.2	9.3
	無	1/10	38.4	8.7	8.4
クロロホルム	有	0/10	39.9	9.5	9.3
	無	2/10	37.3	10.0	9.9
ジクロロメタン	有	0/10	34.5	9.0	8.4
	無	0/10	34.9	9.1	8.5
ヘキサン	有	0/10	38.8	8.9	9.5
	無	0/10	33.9	8.9	9.5
水のみ処理	—	1/10	37.0	8.6	8.1

注 根長、草丈、生体重は不発芽個体を除いた平均値

した培地の抽出物を処理した区は、培地のみの抽出物を処理した区と比較してレタスの生育抑制効果が認められた(第8表)。この結果から、エタノールによる抽出が可能であることがわかった。また、2865菌株を培養した区は6個体不発芽であったが、培養しない区が1個体のみの不発芽であることから、生育抑制物質の濃度が高かったためと考えられる。

ブタノールの場合は生育抑制効果は認められたが、低いので、本物質がブタノールに転溶される量が少ないためと思われる。

酢酸エチル、ベンゼン、クロロホルム、ジクロロメタン及びヘキサンを抽出溶媒として用いた場合、生育抑制効果が認められなかった。これらの溶媒は本物質の抽出には適さないと考えられた。

メタノール及びアセトニトリルの場合は、培地のみの抽出物を処理した区でも9個体が不発芽であった。これは溶媒がレタスの生育に影響したと考えられるため、抽出溶媒としての適性は判断できなかった。

3) 1/3MS培地中の成分が生育抑制物質産生に及ぼす影響

1/3MS培地中の成分が生育抑制物質産生に関与することが示唆されたので、その成分を特定するため、1/3MS培地の各ストック液を1つずつ除いた培地を用いた。

供試した全ての培地の抽出物を処理した区で不発芽もしくは発芽初期で枯死した(第9表)。この結果から、生育抑制物質の産生は、ストック液中の成分ではなく、サッカロースが関与すると考えられた。

4) サッカロースが生育抑制物質産生に及ぼす影響

サッカロースが生育抑制物質産生に関与することが示唆されたため、NA培地にサッカロースを加え、生育抑制物質が産生されかどうか検討した。

2865菌株を培養した3%サッカロース添加NA培地の抽出液を処理した区(2865培養SacNA)では、2865菌株を培養したNA培地の抽出液を処理した区(2865培養NA)及びサッカロース添加NA培地のみの抽出液を処理した区(SacNA)と比較して、明らかな生育抑制効果が認められた(第10表、写真3)。この結果から、本物質はサッカロースの存在下で産生されることが明らかとなった。

第9表 1/3MS培地成分が生育抑制物質産生に及ぼす影響

処 理 区	供試個体数	不発芽	発芽後枯死	根長(mm)	草丈(mm)	生体重(mg)
水	30	2	0	36.2	10.6	11.7
1/3MS	30	30	0	—	—	—
No.1なし1/3MS	30	25	5	—	—	—
No.2なし1/3MS	30	28	2	—	—	—
No.3なし1/3MS	30	30	0	—	—	—
No.4なし1/3MS	30	28	2	—	—	—
No.5なし1/3MS	30	30	0	—	—	—
No.6なし1/3MS	30	30	0	—	—	—
No.7なし1/3MS	30	30	0	—	—	—
3%Sac	30	21	9	—	—	—

注 根長、草丈、生体重は生育した個体の平均値

第10表 サッカロースが生育抑制物質産生に及ぼす影響

処 理 区	供試個体数	根長(mm)	地上部長(mm)	生体重(mg)
水	20	38.9	9.3	10.0
NA	20	34.3	11.4	11.1
2865培養NA	20	43.3	10.6	11.9
SacNA*	20	47.8	17.7	18.8
2865培養SacNA*	20	不発根	6.6	4.0

注 ※SacNA: 3 %サッカロース添加NA培地

第11表 培地抽出液の酢酸エチル画分によるレタスの生育反応

処理区	供試個体数	不発芽数	根長(mm)	草丈(mm)	生体重(mm)
水	20	0	34.0	9.2	8.6
酸性画分	20	1	54.5	10.6	9.3
中性画分	20	1	37.6	9.4	7.7
塩基性画分	20	1	40.1	10.7	10.0
両性画分	20	19	3.0	6.0	5.6

注 根長、草丈、生体重は発芽した個体の平均値

7. 培地抽出液の酢酸エチルによる分画

生育抑制物質の性質を調べるため、酢酸エチルによる溶媒分画を行った。

両性画分を処理した区は19個体のレタスが発芽せず、発芽した1個体は生育が抑制された。これは、生育抑制物質の濃度が高かったためと考えられる。また、塩基性画分、中生画分及び酸性画分を処理した区は水のみと比較して生育抑制は認められなかった(第11表)。これらの結果から、本物質は両性物質であることが明らかとなった。なお、様々な有機溶媒による抽出結果と併せて考えると、本物質が水に溶解し、その水がアセトンやエタノールに溶解して抽出されることが示唆される。

細菌が産生する物質は、菌体外に排出されるエクソ型の物質と、菌体内に蓄積され溶菌することによって初めて菌体外に出てくるエンド型の物質がある。今回の試験で、トマトを培養した培地上でのレタスの生育反応試験と、再滅菌した培地上での生育反応試験とを比較すると、生育抑制物質が産生される条件としては大きな違いはないと考えられるが、再滅菌培地上で枯死個体が認め

られ、再滅菌培地の方が本物質の濃度が高いと思われる。これは、本物質がエンド型で、オートクレーブすることにより培地上の全ての菌が溶菌し、結果として培地中の物質の濃度が高くなったということが考えられる。

今後は、本物質の性質を明らかにするとともに、精製及び同定を行い、濃度と生育抑制効果との関係を解明する必要がある。また、他の植物への効果や開放系での効果発現の制御法及び病原菌との相互作用等、明らかにすべき課題も多い。

引用文献

1. Becker, J. O. and Cook, R. J. (1988) Role of Siderophores in Suppression of Pythium Species and Production of Increased-Growth Response of Wheat by Fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology* 78: 778-782.
2. Caesar, A. J. and Burr, T. J. (1987) Growth Promotion of Apple Seedlings and Rootstocks by Specific Strains of bacteria. *Phytopathology* 77: 1583-1588.
3. Cowan, T. S. (1974) Identification of medical bacte-

- ria 2nd Ed. Cambridge Uni. Press: pp238.
4. 郷間秀夫・木嶋利男 (1993) 胚軸切断接種法によって細菌を定着させたキュウリの生育・収量の増加. 日植病報59: 723.
 5. 郷間秀夫・木嶋利男 (1994) 胚軸切断接種法によって細菌を定着させたトマトの生育・収量の変化. 日植病報59: 723.
 6. 橋本典久・吉川正巳 (1992) 蛍光性*Pseudomonas*属細菌によるタラノキ立枯疫病の発病抑制. 土と微生物40: 17-21.
 7. HOMMA, Y., SATO, Z., HIRAYAMA, F., KONNO, K., SHIRAHAMA, H. and SUZUKI, T. (1989) PRODUCTION OF ANTIBIOTICS BY *PSEUDOMONAS CEPACIA* AS AGENT FOR BIOLOGICAL CONTROL OF SOIL-BORN PLANT PATHOGENS. Soil Biol. Biochem. 21: 723-728.
 8. 本間善久 (1993) *Pseudomonas*属細菌の拮抗物質生産能. 土と微生物41: 7-15.
 9. 石原宏・高次賢二・景山幸二・百町満朗 (1994) 植物生育促進菌*Trichoderma*の*Rhizoctonia*病に対する発病抑制機構: 抗菌物質産生の可能性. 日植病報60: 780.
 10. 岩松哲哉・浦川早苗・渡辺直道 (1993) *Gliocladium*菌の作物種苗に対する生長促進作用. 日植病報59: 280-281.
 11. 木嶋利男・天谷正行・郷間秀夫・米内貞夫・大橋一夫・生井潔・須永哲央・小栗尚子・橋田弘一・熊田欽丈・小林光子 (1995) 組織内共生微生物を用いた生育及び病害の制御. 栃木農研報43: 47-86.
 12. Kloepper J. W., Schroth, M. N. and Miller, T. D. (1980) Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield. Phytopathology 70: 1078-1082.
 13. Kraus, J. and Loper, J.E. (1992) Lack of Evidence for a Role of Antifungal Metabolite Production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in Biological Control of Pythium Damping-Off of Cucumber. Phytopathology82: 264-271.
 14. Liu, L., Kloepper J. W. and Tuzun, S. (1995) Induction of Systemic Resistance in Cucumber Against Fusarium Wilt by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Phytopathology 85: 695-698.
 15. Liu, L., Kloepper J. W. and Tuzun, S. (1995) Induction of Systemic Resistance in Cucumber Against Bacterial Angular Leaf Spot by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Phytopathology 85: 843-847.
 16. Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J-P. and Defago (1994) Induction of Systemic Resistance of Tobacco to Tobacco Necrosis Virus by the Root-Colonizing *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0: Influence of the *gacA* Gene and of Pyoverdinin Production. Phytopathology 84: 139-146.
 17. Rosales, A. M., Thomashow, L., Cook, R. J. and Mew, T. W. (1995) Isolation and Identification of Anti-Fungal Metabolites Produced by Rice-Associated Antagonistic *Pseudomonas* spp. Phytopathology85: 1028-1032.
 18. Ryu, E. (1974) A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. Kitasato Arch. Exp. Med. 1 7: 58-63.
 19. 吉川正巳・若林晃次・杉崎晴之・平井伸博・岩村俣 (1993) アスバラガス株腐病拮抗細菌*Pseudomonas putida* RSA9 の産生する有機酸による根の成長促進. 日植病報59: 282-283.
 20. Yoshikawa, M., Hashimoto, Tuchiya, K. and Komoto, Y. (1995) Biological Control of Fusarium moniliforme var. intermedium on Asparagus Plant with Fluorescent *Pseudomonas*. Soil Microorganisms 46: 71-78.
 21. Yuen, G. Y. and Schroth, M. N. (1986) Interaction of *Pseudomonas fluorescence* strain E6 with Ornamental Plants and Its Effect on the Composition of Root-colonizing Microflora. Phytopathology 76: 176-180.



写真1 胚軸切断接種によるトマトの生育反応
(左: 2865 菌株接種, 右: 無接種)

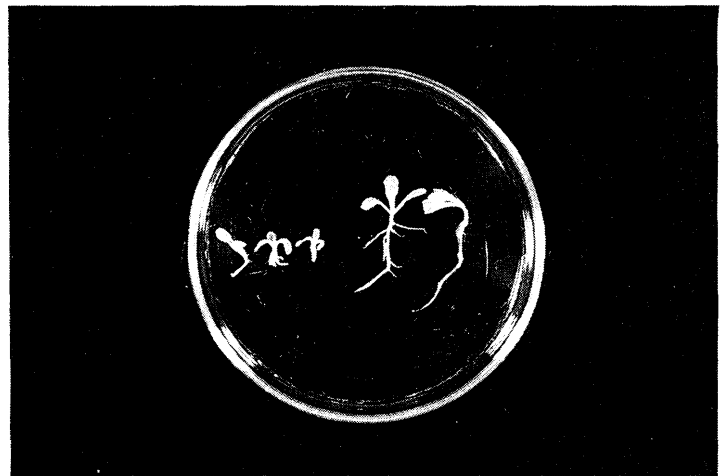


写真2 トマトを培養した培地上でのレタスの生育反応
(左: 2865 菌株接種トマトを培養した培地上のレタス)
(右: 無接種トマトを培養した培地上のレタス)



写真3 2865 菌株を培養した培地の抽出物がレタスの生育に与える影響
(左: 2865 菌株を培養した3%サッカロース添加NA培地
抽出物を添加)
(右: 2865 菌株を培養したNA培地抽出物を添加)