短 報

***Erwinia herbicola*: コナガ *Plutella xylostella* L.
蛹体内から分離した氷核活性細菌**

金子順一*・吉田 忠**・大和田啄也***

喜多孝一*1)・丹野皓三***

*北海道農業試験場

**北海道大学農学部

***北海道大学低温科学研究所

Erwinia herbicola: Ice Nucleation Active Bacteria Isolated from Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L. Pupae. Jun'ichi KANEKO (Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Hitsuji-gaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062, Japan), Tadashi YOSHIDA (Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060, Japan), Takuya OWADA (Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060, Japan), Kouichi KITA²⁾ (Hokkaido National Agricultural Experiment Station) and Kouzou TANNO (Institute of Low Temperature Science). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* 35: 247-251 (1991)

Key words: *Erwinia herbicola*, INA bacteria, diamondback moth

野外のキャベツ畑から採集したコナガの蛹の過冷却点 (super-cooling point, SCP) は、 -20°C 前後の値を示す。この採集個体を、キャベツで数代飼育後、ダイコンの発芽種子により飼育し、得られた蛹に、 5°C 、5 日間の予冷処理を行うと、処理のない場合と比較して -12°C 以上の高い SCP を示す個体が増加する現象をすでに報告した (金子ら, 1989)。無菌飼育やその他の調査により、その原因が、コナガ蛹内の氷核活性細菌によるのではないかと推定し (金子ら, 1989; 金子・喜多, 1989), *Erwinia* 属菌と思われる氷核活性細菌をコナガ蛹体内から分離した (金子ら, 1991)。本報では、この分離細菌の同定について述べる。

Erwinia herbicola NR1 菌株を送っていただいた農業生物資源研究所の平八重一博士および実施に当たって助言をいただいた匂坂勝之助北海道大学低温科学研究所教授、微生物工学研究所の鎌形洋一博士に対して感謝申し上げる。

材 料 と 方 法

金子ら (1991) がコナガ蛹体内から分離した 3 菌株, No. 18-3, 19-5, 20-3 を同定のために供試した。同定には、主として

BERGEY's manual of systematic bacteriology, vol. 1, section 5 "Facultatively anaerobic Gram-negative rods Family 1: Enterobacteriaceae." p. 408-516. (LELLIOTT and DICKEY, 1984) および BERGEY's manual of determinative bacteriology (LELLIOTT, 1974) を参考にした。DNA の GC 含量測定は、次のように行った。すなわち、nutrient agar (beef extract 3 g, peptone 5 g, glucose 2.5 g, agar 15 g, distilled water 1l) の前培養から、同液体培地 100 ml を入れた 250 ないし 300 ml 用三角フラスコに菌を接種し、 $25\sim 27^{\circ}\text{C}$ で 10~12 時間振盪培養した後、さらにこれを同培地約 2l で増菌し、遠心分離 (7,000 rpm, 15 分: Beckman 製, JS-21 型を使用) 後、得られた菌体から, MARMUR (1961) の方法に従って DNA を抽出した。DNA の乾燥標品は Tris-EDTA 緩衝液に溶解し、 100°C 5 分間の熱湯処理後、ヌクレアーゼ P1 を加え 50°C で 1 時間保持してヌクレオチドに分解してから、HPLC (high performance liquid chromatograph, 日立製作所製: UV monitor 655 型, Liquid chromatograph 655-A12 型, クロマトデータ処理装置 D-2000 型) で定量した。畔上ら (1983) がイネ内頸褐変病から分離して *Erwinia herbicola* とした細菌, NR1 (農業生物資源研究所ジーンバンク MAFF 03-01714) についても GC 含量を測定した。

結果および考察

供試 3 菌株はともにグラム陰性の桿菌で、胞子をつくらず、数本の周毛により運動性を持ち、半流動寒天培地で微気性を示し、半嫌気条件でも生育する通性嫌気性と判断され、catalase+, oxidase-, NO_3^- 還元性を示すことから Enterobacteriaceae 科に属する。同科には *Escherichia*, *Salmonella* 属など 14 属、および近縁 6 属が含まれるが、供試菌は citrate を利用し、 H_2S を生産して、gelatin 液化性を示すほか、glucose からガスをつくらず、KCN で生育せず、indole を生成せず、また、lysine decarboxylase をもたない、などの性質があり、DNA の G+C mol% が 54% 前後であることから、*Erwinia* 属に該当すると判断される (Table 1)。

Erwinia 属に属する 15 種のうち、黄色のコロニーを形成するのは、*Erwinia herbicola*, *E. ananas*, *E. stewartii* および *E. uredovora* の 4 種であるが、このうち、indole 産生-, NO_3^- 還元性+の性質は、*E. herbicola* に該当する。供試菌はいずれも 36°C でよく生育し、No. 18-3 株は 0.5% glucose-nutrient agar 培養で symplasmata というわれる集塊状を呈し、urease-, 5% NaCl-Nutrient agar でよく生育するなど、*E. herbicola* の記載とよく一致する (Table 2)。また、供試 3 菌株は、melibiose, inositol, raffinose, maltose, L-arabinose, sorbitol, ribose, mannose, mannitol, cellobiose, lactose, rhamnose, salicin,

1) 現在 農業生物資源研究所

2) Present address: National Institute of Agricultural Resources, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

日本応用動物昆虫学会誌 (応動昆) 第 35 巻 第 3 号: 247-251 (1991)

1990 年 9 月 22 日受領 (Received September 22, 1990)

1991 年 2 月 21 日登載決定 (Accepted February 21, 1991)

Table 1. Characteristics of Enterobacteriaceae

Shape	Cells size (μ m)	Motility*	Oxidase	Catalase	Urease	OF	MR	VP	Citrate util.	H ₂ S prod.	NO ₃ ⁻ red.	Indole prod.	Acid from glu.	Gas	Phenylalanine-NH ₂	Lysine-COOH	Gelatin liquel.	KCN growth	Yellow pigmentation	G + C mol%
Straight rod																				
<i>Escherichia</i>	1.1-1.5×2-6	+	+	+	-	F	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	48~52
<i>Shigella</i>		+	+	+	-	O ₂ F	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	49~53
<i>Salmonella</i>	0.7-1.5×2-5	+	+	+	-		+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	50~53
<i>Citrobacter</i>	-1×2-6	+	+	+	+	O ₂ F	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	50~52
<i>Klebsiella</i>	0.3-1×0.6-6	+	+	+	+	O ₂ F	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	53~58
<i>Enterobacter</i>	0.6-1×1.2-3	+	+	+	+		-d	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	52~60
<i>Ervwinia</i>	0.5-1×1-3	+	+	+	+		(+, -) ^a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	50~58
<i>Serratia</i>	0.5-0.8× 0.9-2	+	+	+	+		(+, -) ^a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	52~60
<i>Hafnia</i>	-1×2-5	+	+	+	+	F	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	48~49
<i>Edwardsiella</i>	1×2-3	+	+	+	+	O ₂ F	d	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	53~59
<i>Proteus</i>	0.4-0.8×1-3	+	+	+	+		+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	38~41
<i>Providencia</i>	0.6-0.8× 1.5-2.5	+	+	+	+		+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	39~42
<i>Morganella</i>	0.6-0.7× 1-1.7	+	+	+	+		+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	50
<i>Yersinia</i>	0.5-0.8×1-3	+	+	+	+	O ₂ F	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	46~50
Straight rod																				
<i>Obum-</i>	0.8-2×	+	+	+	+		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	48~49
<i>bacterium</i>	1.5-100	+	+	+	+		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	43~44
<i>Xenorhabdus</i>	0.8-2×4-10	+	+	+	+	O ₂ F	+	-	-d	-	+	d	+	+	-	+	+	-d	-	55~57
<i>Kluysera</i>	0.5-0.7×2-3	+	+	+	+		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	51~56
<i>Rahnella</i>	0.5-0.7×2-3	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	48~52
<i>Cedecea</i>	0.5-0.6×1-2	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	53~54
<i>Tatumella</i>	0.6-0.8×0.9-3	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	54.2
18-3	0.6-0.8×1-3	+	+	+	+	O ₂ F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	53.5
19-5	0.6-0.8×1-3	+	+	+	+	O ₂ F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	53.9
20-3	0.6-0.8×1-3	+	+	+	+	O ₂ F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

*: +, peritrichous flagella. Symbols: +, 90%-100% strains are positive; -, 0%-10% positive; d, 26%-75% positive; O, oxidative; F, fermentative; w, weak. All data are cited from BERGEY's manual of systematic bacteriology, vol. 1 (p. 414-417) except for the data on 18-3, 19-5, 20-3. a): GRAHAM and HODGKISS (1967)

Table 2. Characteristics of genus *Eruinia*

	<i>E. amiluvora</i>	<i>E. tracheiphila</i>	<i>E. malloivora</i>	<i>E. rubrifaciens</i>	<i>E. qervina</i>	<i>E. salicis</i>	<i>E. herbicola</i>	<i>E. ananas</i>	<i>E. rhabdovici</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>E. cythripedit</i>	<i>E. nigritifluens</i>	<i>E. stewartii</i>	<i>E. uredovora</i>	18-3	19-5	20-3
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Yellow pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Synplasmata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 36°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S from cysteine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate oxidation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in KCN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenylalanine-NH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G + C mol%	53.6 ~54.1	50 ~52	49.8 ~51	52 ~52.6	54.6 ~55.1	51.3 ~51.5	52.6 ~57.7	53.1 ~54.1	51.0 ~53.1	50.5 ~53.1	55.1 ~57.1	54.1 ~54.6	56.1	54.6, 55.1	53.0 ~54.5	54.2	53.5	53.9

Symbols: +, 80% or more of strains positive; —, 20% or less of strains positive; d, 21%–79% of strains positive; blank space, insufficient or no data.
All data are cited from LELLIOTT and DICKEY (1984) except for the data on 18-3, 19-5, 20-3.

Table 3. Acid production from organic compounds by *Erwinia* species

	<i>E. herbicola</i>	<i>E. ananas</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>E. stewartii</i>	<i>E. uredoovora</i>	18-3	19-5	20-3
Melibiose	—	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	—	+	d	—	+	w	—,w	w
Raffinose	d	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	+	d	—	d	+	—	—	—
Starch	+	+	—	—	+	—	—	—
Maltose	+	+	d	—	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	—	+	+	—	+	+	+	+
Lactose	d	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	d	+	—	+	+	+	+
Esculin	d	d	+	—	d	—	—	—
Salicin	d	+	+	—	d	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	—	—	—	—	—	—	—
Glycerol	—	+	d	—	+	w	w	w
Adonitol	—	—	—	—	+	—	—	—
Dextrin	—	—	—	—	+	—	—	—
Melezitose	—	—	—	—	+	—	—	—
α -Methylglucoside	—	—	d	—	—	—	—	—

Symbols: +, 80% or more of strains positive; —, 20% or less of strains positive; d, 21%–79% of strains positive; w, weak. All data are cited from LELLIOTT and DICKEY (1984) except for the data on 18-3, 19-5, 20-3.

xylose, trehalose, glycerol から酸を生成し, inulin, starch, esculin, dulcitol, adonitol, dextrin, melezitose, α -methylglucoside から酸を生成しない。これらの性質は, melibiose, inulin, starch, cellobiose, dulcitol の酸生成で多少異なるが, *E. herbicola* の特性にはほぼ合致している (Table 3)。

上記 4 種のうち, 糖類からの酸生成能で, 供試菌に最も近いと思われるものとして *E. ananas* および黄色色素はつくらないが *E. carotovora* があるが, 前者では indole 産生+, NO_3^- 還元性—で大きく異なり, G+C mol% が後者では 50.5~53.1% であるためこれと同定できない。Melibiose, および cellobiose からの酸生成については, 畔上ら (1983) がイネ内頸褐変病から分離し *Erwinia herbicola* とした黄色細菌についても認めている。Phenylalaninedeaminase は上記 4 種のうち, *E. herbicola* のみが+で記載されているが, 供試菌株はいずれも—であった。この点についても畔上らの分離した同種の特性に一致する。なお, 畔上らは NR1 菌株の G+C mol% を測定していないが, 筆者らの測定では 53.7% で, 供試菌株とはほぼ一致した。*Erwinia* 属は主として植物微生物学者や植物病理学者によって研究されて来ており, その分離・培養・同定など種々の試験法は Enterobacteriaceae 科の他の菌属に用いられるものと異なることが多いため, 今後の十分な検討を必要とするグループであるが, 供試菌株の形態的・生理的諸性質ならびに DNA の G+C mol%

がほぼ一致するところから, 供試 3 菌株は BERGEY's manual of systematic bacteriology に記載される *Erwinia herbicola* (LÖHNIS) DYE と同定しうる。

氷核活性細菌としての *Erwinia herbicola* は, LINDOW (1978) によって, 植物体から分離したものがすでに報告されている。それによると, *Erwinia herbicola* の氷核活性は nutrient agar の glucose 含量を 2.5% に増やすと著しく大きくなり, 点滴の 50% が凍結する温度は約 -3.5°C であった。Glucose の代りに glycerol を用いるとさらに活性は増す。Nutrient agar のみでは -7°C 以上の温度でほとんど氷核活性を示さず, 50% 凍結温度は約 -7.5°C であった。 -8°C ではすべての点滴が凍結した。ただし, この場合使用している方法は, 10 μl の点滴 30 滴を約 $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$ の速さで冷却していったときに凍結した液滴を数えるものである。また, 氷核活性の検定には, 2.5% glycerol を含む nutrient agar 培地を用いており, -5°C で 30 秒間に 5 個の点滴のうち 1 個以上が凍れば活性ありとするものである。前報 (金子ら, 1991) で述べたように, 著者らの用いた氷核活性の検定方法は, nutrient broth で培養し, 5°C に 2~7 日間予冷した後, -10°C で 1 分間に 10 個の点滴の全部が凍結したときに活性ありとするもので, 分離された No. 18-3, 19-5, 20-3 の 3 菌株は 5°C の予冷がないと活性はみられなかった。使用している条件が異なるので単純に比較できないが, nutrient agar (また

は broth) のみでは活性が低いことは共通している。

Erwinia herbicola は植物体上に普通にみられる細菌で、食植性の昆虫が消化管内に取り込む機会も多いと考えられる。取り込まれた細菌が、どのような条件のときに増殖でき、氷核活性を発現できるのかは興味深い問題と思われる。

引用文献

- 畔上耕児・尾崎克己・松田 明・大畑貫一 (1983) 農技研報 c 37: 1—12.
 GRAHAM, D.C. and W. HONGKISS (1967) J. appl. Bact. 30: 175—189.
 金子順一・喜多孝一 (1989) 応動昆 33: 152—154.

金子順一・喜多孝一・丹野皓三 (1989) 応動昆 33: 82—91.

金子順一・喜多孝一・丹野皓三 (1991) 応動昆 35: 7—11.

- LELLIOTT, R.A. (1974) Genus ERWINIA. In: BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology. R.E. BUCHANAN and N.E. GIBBONS, eds., Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 332—340.
 LELLIOTT, R.A. and R.S. DICKEY (1984) Genus VII. *Erwinia* Winslow, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, 209AL. In: BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 1. N.R. KRIEG and J.G. HOLT, eds., Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 469—476.
 LINDOW, S.E. (1978) Phytopathology 68: 523—527.
 MARMUR, J. (1961) J. Mol. Biol. 3: 208—218.

合成性フェロモンと殺虫剤を混用した アリモドキゾウムシの誘殺板

瀬戸口脩*・中村洋**・久保義昭**

*鹿児島県農業試験場大島支場

**サンケイ化学株式会社

A Fiberboard Formulation of the Sweet-Potato Weevil, *Cylas formicarius* (FABRICIUS), Sex Pheromone and an Insecticide for Mass-Trapping. Osamu SETOKUCHI (Ohshima Branch, Kagoshima Agricultural Experiment Station, Naze, Kagoshima 894, Japan), Yoichi NAKAMURA and Yoshiaki KUBO (Sankei Chemical Co., Ltd., Kagoshima 890, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* 35: 251—253 (1991)

Key words: sweet-potato weevil, sex pheromone, insecticide

アリモドキゾウムシ *Cylas formicarius* (FABRICIUS) は熱帯、亜熱帯地域に分布するさつまいもの大害虫で、日本では、トカラ列島以南の南西諸島と小笠原諸島に分布する。本種の幼虫は、さつまいもの茎や塊根の内部に食入して加害するためにこの時期の殺虫剤による防除が困難である。これまで成虫を対象にした殺虫剤散布や抵抗性品種の導入による防除が試みられてきたが、有効な防除法は確立されていない (杉本, 1990; 瀬戸口, 1990)。

最近、雌成虫が放出する性フェロモンが同定され (HEATH et al., 1986)、雄に対する強力な誘引性が明らかにされた (PROSHOLD et al., 1986; 安田・杉江, 1990)。そこで筆者らは、大量誘殺法の可能性を明らかにするための手始めとして、合成

性フェロモンと殺虫剤を混用した簡単な誘殺板を試作し、誘引性と殺虫力の持続性について評価試験を行ったので報告する。

本文に先だち、多くのご助言をいただいたサンケイ化学㈱の嶋田治一、竹村薫両氏、本稿を校閲していただいた近畿大学杉本毅教授に対し感謝の意を表する。

材料および方法

1. 供試虫

アリモドキゾウムシは、鹿児島農試大島支場 (鹿児島県名瀬市) の飼育室において、さつまいもの塊根を餌にしてポリプロピレン製容器 (岩崎工業㈱製, 40 cm × 30 cm, 高さ 15 cm) を用いて、室温下で累代飼育したものを供試した。

2. 合成性フェロモンと殺虫剤

合成性フェロモン、(Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenate は信越化学工業㈱より供与された純度 95% のものをゴムセブタム (長径 0.8 cm, 短径 0.5 cm, 長さ 1.5 cm) に 100 µg ずつ含浸 (安田・杉江, 1990) させるか、テックス板 (後述) に同量の合成性フェロモンを、殺虫剤と混合して含浸させた。

殺虫剤は MEP, chlorpyrifos-methyl, permethrin, diazinon, MPP, pyridaphenthion, ethofenprox, BRP および CVMP で、原体を溶剤で希釈し、permethrin と ethofenprox は 2% 溶剤、他の剤は 5% 溶剤に調整した後、テックス板に 10 g ずつ含浸させた。したがって、テックス板 1 枚当たり成分量は、permethrin と ethofenprox は 200 mg、他の剤は 500 mg である。

3. 誘殺板

潮ら (1982) がミカンコミバエ用誘殺板の素材として用いたファイバーボード (さとうきびの繊維やラワン材屑を原料とした厚さ 0.9 cm の建材用合板; 商品名, ダイケンボード, 大建工業