チャ、野菜およびモクレンから分離した氷核活性細菌の 分類学的研究

後藤 正夫*・黄 奔立*・牧野 孝宏**

後藤 孝雄***・稲葉 忠興***

Masao GOTO*, Ben Li HUANG*, Takahiro MAKINO**, Takao GOTO*** and
Tadaoki INABA***: A Taxonomic Study on Ice Nucleation-Active Bacteria
Isolated from Gemmisphere of Tea (*Thea sinensis* L.), Phyllosphere of
Vegetables, and Flowers of *Magnolia denudata* Desr.

Abstract

The ice nucleation-active bacteria (INAB) isolated from gemmisphere of tea plants belonged to three genera; *Erwinia* (23 strains), *Xanthomonas* (44 strains), and *Pseudomonas* (1 strain). The strains of *Erwinia* isolated from tea fields in Shizuoka prefecture in 1978-1980, and in Kagawa pref. in 1987 were identified as *E. ananas*. An ice nucleation-active xanthomonad detected with a high frequency in Shizuoka pref. and Tokushima pref. in 1986-1987 was, however, identified as a strain of *X. campestris* from morphological, physiological, and biochemical traits. The bacterium was also found on some vegetables in Shizuoka pref. with a low frequency, but it was not pathogenic to any carrier plants from which it was isolated. The taxonomic affiliation of this bacterium was left for future study, although the new subspecific rank was suggested to be more eligible than the pathovar rank. The strains of INAB isolated from flowers of *Magnolia denudata* and leaves of various vegetables in Shizuoka pref. and a strain isolated from tea gemmisphere in Kagawa pref. were identified as *P. syringae*. Although they were identical either with *P. syringae* pv. *delphinium* (17 strains) or *P. syringae* pv. *syringae* (1 strain) in biochemical tests, all strains were not pathogenic to any carrier plants and *Delphinium* spp. as well. However, all of six strains that were arbitrarily selected, formed water-soaked lesions on the leaves of lilac (*Syringa vulgaris* L.) through stomata and wounds. Therefore, these strains were identified as *P. syringae* pv. *syringae*. A strain of INAB isolated from Wasabi petiole was a non-fluorescent pseudomonad with positive tobacco HR. Although the diagnostic traits of the bacterium were similar to those of *P. cichorii*, it showed no pathogenicity to any plants tested including Wasabi and lettuce. Therefore, its taxonomic affiliation was left for future study. All INAB mentioned above showed the type A ice nucleation-activity, i.e. the supercooling temperature was between -2.8 and -3 C except for the Wasabi pseudomonad at -4 and -5 C.

(Received January 1, 1988)

Key words: ice nucleation-active bacteria, taxonomy.

1970年代のはじめに、水滴を $-2\sim-3$ Cで結氷する氷核活性細菌(Ice nucleation-active bacteria; INAB)の存在が発見された。INABは *Pseudomonas syringae*

など葉面居住性の高い細菌に多くみられることから、凍霜害の原因としての役割が研究され、農業や遺伝子組換え細菌を用いた防霜の可能性が検討されてき

* 静岡大学農学部 Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836, Ohya, Shizuoka 422, Japan

** 静岡県農業試験場 Shizuoka Agricultural Experiment Station, 678-1, Tomigaoka, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438, Japan

*** 四国農業試験場 Shikoku Agricultural Experiment Station, Zentsuji, Kagawa 765, Japan

た^{6,23,38)}。最近はさらに人工雪や食品工学等への利用も研究され、その重要性が広く注目されるようになってきた。

INABの植物凍霜害への関りは、その斬新な発想から植物病理学領域のみでなく、栽培学、気象学、工学、応用微生物学等、幅広い領域で活発な研究が続けられている。しかし凍霜害に占めるINABの役割については評価が分かれ、必ずしも結論に達していないのが現状である。これはおもに凍霜害発生時のINABの生息密度がつねに高いとは限らないこと^{14,15)}、植物自身も氷核活性物質を無視できないとする植物生理学者らの指摘^{1,2)}に反論するに足る十分なINABの生態的資料が得られていないことに基因する¹¹⁾。

今日、氷核活性をもつ細菌としては *P. syringae* のほか、*Erwinia herbicola*^{24,35)}、*P. viridiflava*^{30,33)}、*P. fluorescens*^{16,22,31)} および *Xanthomonas campestris*^{12,18,29)} 等が知られている。しかしそれぞれの種 (species) のなかに占めるINAB系統の割合や、それ

らの植物親和性および生態など、凍霜害の原因として欠くことのできない各種要因についてはまだ不明の点が多く残されている。

著者らは凍霜害に対するINABの役割を正しく把握するため、チャおよび野菜の実験系を使って研究を進めつつある。本報告はおもにこれらの植物から分離したINABの分類学的研究の結果をとりまとめたものである。

材料および方法

供試細菌 供試細菌の来歴をTable 1に示した。これらINABの分離は、野菜の葉およびモクレンの花では約1gの組織片を滅菌水10ml中に入れて十分攪拌して洗い、洗液を適宜希釈したのち普通寒天平板に塗抹培養した。萌芽前のチャ芽は1芽を10ml滅菌水中で磨砕し、葉が展開した芽では野菜と同じ方法で得た洗液を希釈後平板培養した。ワサビから分離したNo. 54菌株は、ワサビ葉柄の褐色壊死部から植物病

Table 1. Bacteria used in the study^{a)}

Code number	No. of strain	Plant and plant part	Locality	Isolator and year of isolation
1-20, 53	21	Tea (<i>Thea sinensis</i> L.); bud	Shizuoka	Goto, M., 1986-1987
IN1-10, 12, 13, 15	13	Tea (<i>Thea sinensis</i> L.); bud	Shizuoka	Makino, 1978-1980 ^{25,26)}
8703, 8704, 8707-8712, 8717	9	Tea (<i>Thea sinensis</i> L.); bud	Kagawa	Goto, T. & Inaba, 1987
8738-8751	14	Tea (<i>Thea sinensis</i> L.); bud	Tokushima	Goto, T. & Inaba, 1987
49-51	3	<i>Magnolia denudata</i> Desr.; bud	Shizuoka	Huang, 1987
23	1	Cabbage (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.); leaves	Shizuoka	Goto, M., 1987
47	1	Cauliflower (<i>B. oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.); leaves	Shizuoka	Huang, 1987
52	1	Chinese cabbage (<i>B. pekinensis</i> Rupr.); leaves	Shizuoka	Huang, 1987
35-44	10	Chinese mustard (<i>B. chinensis</i> L.); leaves	Shizuoka	Huang, 1987
22, 45, 46	3	Turnip (<i>B. rapa</i> L. var. <i>glabra</i> Kitamura); leaves	Shizuoka	Goto & Huang, 1987
48	1	Japanese radish (<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>acanthiformis</i> Makino); leaves	Shizuoka	Huang, 1987
54	1	Wasabi (<i>Eutrema wasabi</i> Maxim.); petioles	Shizuoka	Goto, M., 1987
21	1	Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> L.); leaves	Shizuoka	Goto, M., 1987
24	1	Spinach (<i>Spinacia oleracea</i> L.); leaves	Shizuoka	Goto, M., 1987
55	1	Corn (<i>Zea mays</i> L.); leaves	Shizuoka	Takikawa, 1985
TC1-TC6 ^{b)}	6	Tea (<i>Thea sinensis</i> L.); leaves	Kagoshima	Uehara <i>et al.</i>
Camp B, E ^{c)}	2	Cabbage (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.); leaves	Shizuoka	Goto, M., 1964

a) Pathovars of *Xanthomonas campestris* tested for the ice nucleation activity include: pv. *begoniae*; pv. *campestris*; pv. *cerealis*; pv. *citri*; pv. *cucurbitae*; pv. *glycines*; pv. *nigromaculans*; pv. *oryzae*; pv. *phaseoli*; pv. *phormicola*; pv. *physalidicola*; pv. *pruni*; pv. *tardicrescens*; pv. *vesicatoria*; and pv. *vitians*.

b) *X. campestris* pv. *theicola*, the causal agent of bacterial canker of tea^{5,39)}.

c) *X. campestris* pv. *campestris*.

原細菌と同じ方法で分離した。平板培地上に発育した集落のすべてについて、次に述べる方法で氷核活性を調べ、陽性の菌株を供試細菌とした。

氷核活性の測定法 クールエース（東京理化機）を用いてメタノールを冷却し、この上にパラフィン・キシロール混液²⁴⁾を噴霧したアルミ箔を浮かべ、サーミスター（宝工業機）で表面温度を -5°C に設定した。この上に、普通寒天斜面培養（ 28°C , $24\sim 48\text{ h}$ ）から調製した細菌懸濁液（濃度約 10^8 細菌/ml）を $10\ \mu\text{l}$ ずつ 10 滴落し、30 秒以内に 100% 結氷するものを氷核活性陽性 (Type A) と判定した。

細菌培養の保存 氷核活性を確認した菌株については、馬鈴薯・ブドウ糖寒天および普通寒天培地を用いて高層培養し、流動パラフィンを重層して 4°C で保存するとともに、一部は凍結乾燥して保存した。

病原性 鉢植えて育苗した植物に噴霧接種および有傷接種し、24 時間湿室に保ったのちガラス室に移して発病の有無を観察した。

細菌学的性質 ポリ- β -ヒドロキシ酪酸顆粒の検出はスタンブラック B 染色法³⁶⁾で、また鞭毛染色は変法山中氏法³⁷⁾によった。オキシダーゼ、カタラーゼ、アミラーゼ、ウレアーゼ、アミノ酸脱炭酸酵素の諸反応、硝酸塩還元性およびアセトイン、2-ケトグルコン酸、インドール生成は Cowan の方法¹⁸⁾により、また H_2S 生成は同 3 によって調べた。フェニルアラニンデアミナーゼおよびフォスファターゼ反応はそれぞれ Cowan の方法 2 および 1 で調べた。リトマスミルク

反応、ゼラチン溶解性、メチルレッド反応、KCN による生育阻害、グルコース酸化・発酵試験およびエスクリン、カゼイン、Tween 80 の加水分解性も同実験書によった。唯一の炭素源および窒素源としてのアスパラギンの利用性および食塩耐性は Dye⁹⁾ の方法によった。アルギニンジヒドロラーゼ、および蔗糖からの還元物質の生成は Schaad³⁶⁾ の方法によった。レンチナーゼ反応はオクソイド卵黄液 (Oxoid Ltd.) を 10% 添加した普通寒天培地を用いて調べた。炭素源の利用性は、*Xanthomonas* および *Pseudomonas* 属細菌ではプロモチモル青を加えた Ayers ら³⁴⁾ の合成培地を、*Erwinia* 属細菌ではプロモクレゾール紫を加えた 1% ペプトン水を基本培地とし、1% の炭素源を加えて調べた²¹⁾。有機酸の利用性は Dye⁹⁾ の OY 培地を用い、ペクチンゲルの液化は Paton³²⁾ の培地を用いた。蛍光色素の生成は King B 培地¹⁹⁾で調べた。

ユビキノンの同定 Collins⁷⁾ の方法によった。

DNA の GC 比率 DNA の分離は Marmur²⁷⁾ の方法により、また GC 含量はギルホード 250 分光光度計で、*Escherichia coli* K-12 株の DNA を標準に測定した T_m 値から Marmur および Doty²⁸⁾ の式によって算出した。

結 果

細菌学的性質から、チャ、野菜およびモクレンから分離した INAB は、*Xanthomonas*, *Pseudomonas* および *Erwinia* のいずれかに入ることが明らかとなった。

Fig. 1. Ice nucleation spectra of *Pseudomonas syringae*, *Erwinia ananas*, *Xanthomonas campestris* and a pseudomonad from Wasabi. P-strain No. 42, X-strain No. 1, E-strain No. 53 and W-strain 54.

1. *Xanthomonas* 属細菌

1986 年および 1987 年に静岡県および徳島県の茶園で採集したチャ芽から分離された INAB は、茶園のいかんを問わず、大部分がこの細菌で、*Pseudomonas* および *Erwinia* 属細菌がそれぞれ 1 例分離されたにすぎなかった。本菌はチャ以外では、静岡県下のレタス、カブ、カンランおよびホウレンソウから 1986 年秋にそれぞれ 1 例ずつ分離されたのみで、その自然分布はチャ芽に特異的に高いことが明らかとなった。本菌の氷核活性は Fig. 1 に示すとおりで、*P. syringae* のそ

れと同じであった。

本菌の病原性はカンラン、ハクサイ、カブ、レタス、トマト、トウガラシ、ニンジン、チャおよびタバコに対する接種試験ではいずれも陰性で、ジャガイモ切片をわずかに腐敗させるにすぎなかった。

これら氷核活性 *xanthomonad* は、Table 2 に示すように酵母エキス・ペプトン寒天斜面培地上での褐色色素の生成、チロシン加水分解性およびリボース、キシロースからの酸生成を除き、いずれも同じ形態的、生理・生化学的性質を示した。そして増殖温度、植物

Table 2. Comparison of the bacteriological characteristics among the ice nucleation-active *xanthomonad*, *X. campestris* pv. *campestris* and pv. *theicola*

Characteristics ^{a)}	INAX ^{b)}	XCC	XCT
Growth on YP agar plate	slow	moderate	slow
Growth factor requirement	— ^{c)}	—	+
Growth temperature (C): minimum	10	7	7
optimum	33.5	28-30	28-30
maximum	42-43	37-88	35
Hydrolysis of : tyrosine	D	+	—
gelatin	+	+	—
Levan formation on : YPA ^{d)}	—	+	—
Phenylalanine deaminase	+	+	—
Lecithinase	+	+	—
Pectin liquefaction	D	+	—
Litmus milk reaction	B,D,C,P ^{e)}	B,D,C,P	—
Acid from ribose, melibiose, lactose, maltose, raffinose, sucrose, salicin, erythritol, α -methylglucoside, glycogen	+	+	—
Acid from sorbitol, melezitose	+	+	—
Mol % of DNA	67.9		nt ^{f)}
Ubiquinone	Q8	Q8	nt
Potato rot	+	+	—
Pathogenicity to tea	—	—	+

a) All bacteria were positive for: rods measuring $0.4-0.7 \times 0.7-2.1 \mu\text{m}$; motility by a polar flagellum; oxidative metabolism of glucose; production of catalase, oxidase (weak), phosphatase, DNase and H_2S ; tolerance to 4-5% NaCl; hydrolysis of esculin, Tween 80, starch, casein; ONPG; acid from xylose, L-arabinose, glucose, fructose, mannose, cellobiose and trehalose; and use of formate, acetate, malate, citrate, fumarate, tartrate, malonate, oxalate, mesaconate, saccharate, mucate, propionate, quinate, anthranilate, glycolate, butyrate and sebacate.

All bacteria were negative for: Gram reaction; accumulation of poly- β -hydroxybutyrate; spore-formation; production of fluorescent pigment, acetoin, indole, 3-ketolactose, reducing substances from sucrose, urease, arginine dihydrolase, amino acid decarboxylases; gluconate test; methyl red test; nitrate reduction; denitrification; use of asparagine as a sole source of N and C; growth in 0.1% TTC and 0.075% KCN; acid from rhamnose, inositol, adonitol, dulcitol and inulin; use of caprate, *p*-aminobenzoate; and tobacco hypersensitivity reaction.

b) INAX: ice nucleation-active *xanthomonad*, strains No. 1-24; XCC: *X. campestris* pv. *campestris*, strains Camp B, E; XCT: *X. campestris* pv. *theicola*, strains TC1-TC6.

c) +: 80% or more of strains positive; —: 80% or more strains negative; D: varied by strains.

d) YPA: yeast-extract peptone agar.

e) B: blue; D: decolorization; C: curd formation; P: peptonization.

f) nt: not tested.

に対する病原性、氷核活性およびソルビトール利用性を除き、*X. campestris* pv. *campestris* に一致した。本菌は発育が遅く、集落は透明、非粘性で、チャカイよう病菌 *X. campestris* pv. *theicola*^{5,39)} に類似してい

たが、両菌は氷核活性、細菌学的性質および病原性で明確に区別された。

2. *Pseudomonas* 属細菌

野菜類およびモクレンの花から分離した大部分の

Table 3. Bacteriological characteristics of the ice nucleation-active pseudomonads

Characteristics ^{a)}	Strains			
	41	35-40, 42 45, 46, 48	43, 44, 47, 49-52, 8717	54
Fluorescent pigment on KB	+ ^{b)}	+	+	—
Oxidase	—	—	—	+
Phosphatase	—	D	D	+
DNase	—	D	—	—
Gelatin liquefaction	+	+	+	—
Urease	+	+	+	—
Litmus milk	BDP	BDP	BDP	B
Tyrosinase	+	+	—	—
Hydrolysis of: Tween 80	+	+	+	—
starch	+	+	+	—
esculin	+	+	+	—
casein	+	+	+	—
ONPG	—	—	—	—
Use of asparagine as N and C	+	+	+	—
Growth at 35 C	+	+	+	—
Levan formation	+	—	—	—
Pectate liquefaction	—	+	—	—
Red. substances from sucrose	+	+	+	—
NaCl tolerance: max. %	4	3-4	3-4	5
Acid from: L-arabinose	+	+	+	—
xylose	+	+	+	—
sucrose	+	+	+	—
sorbitol	+	+	+	—
inositol	+	+	+	—
erithrytol	+	+	+	—
adonitol	+	+	—	—
D-arabinose	+	+	—	—
raffinose	—	—	—	+
galactose	+	+	+	—
cellobiose	+	+	+	+
ribose	+	+	+	—
melibiose	+	+	+	—
citrate	+	+	+	+
benzoate	+	+	+	—

a) All strains were positive: motility by 1-4 polar flagella; aerobic growth; oxidative metabolism of glucose; production of catalase and urease; growth inhibition by KCN; growth at 4 C; acid from glucose, fructose and mannose; utilization of malonate, succinate, malate, acetate, propionate and tartrate; and tobacco hypersensitivity reaction.

All strains were negative: Gram reaction; poly- β -hydroxybutyrate accumulation; spore formation; production of amino acid decarboxylases, arginine dihydrolase, lecithinase, phenylalanine deaminase, H₂S, 3-ketolactose, indole and acetoin; gluconate test; nitrate reduction; denitrification; methyl red test; utilization of trehalose, rhamnose, maltose, lactose, salicin, α -methylglucoside, dulcitol, melezitose, inulin, glycogen and xylan; and potato rot.

b) For symbols, see Table 2.

Table 4. Comparison of the differential characteristics of the ice nucleation-active pseudomonads to those of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and pv. *delphinium*

Bacteria	Characteristics ^{a)}										
	L	O	P	A	T	2-keto-glucuronate	KNO ₃	sucrose	gelatin	esculin	tyrosine
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+,v	v
<i>P. syringae</i> pv. <i>delphinium</i>	—	—	—	—	+	—	—	+	+,v	v	—
<i>P. cichorii</i>	—	+	—	—	+	—	d,v	—	—	v	d,v
43, 44, 47, 49-52, 8717	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—
35-40, 42, 45, 46, 48	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+
41	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+
54	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—

a) Lelliott *et al.* (1966)²⁰⁾.

INAB と、徳島県産のチャ芽から分離した 1 菌株 (No. 8717) は *Pseudomonas* に属した。Fig. 1 に示したように本群の細菌も高い氷核活性を有し、過冷却温度は -3°C 付近であった。Table 3, 4 に示した細菌学的性質からこの群の細菌は次の 4 群に大別された。タイサイから分離した No. 41 菌株の性質は *P. syringae* pv. *syringae* のそれに一致した。またワサビから分離した No. 54 菌株は *P. cichorii* に類似した一般性状を示したが、蛍光色素非産生、デンプン非加水分解等の性質で異なった。*P. cichorii* の氷核活性についてはこれまで報告がないため、キク斑点細菌病菌の 10 菌株¹⁷⁾について改めて氷核活性を調べたが、すべて陰性であった。No. 41 および No. 54 を除く他の菌株はチロシン加水分解性の有無によって二つの群に分けられたが、いずれも *P. syringae* pv. *delphinium* に相当する細菌学的性質を示した。

これらの細菌はいずれもタバコに過敏反応 (HR) を起こした。そこで No. 54 菌株を除くこれらの細菌をホウレンソウ、ダイコン、カブ、ハクサイ、キョウナ、キュウリおよびトマトに噴霧接種した結果、ハクサイ、カブ、およびダイコンの葉裏の表皮細胞に壊死斑を多数生じ、とくにハクサイで顕著であった。これは接種後温室下で水浸状淡緑色を呈したが、のちに乾燥して淡紫色に変色し、葉肉部が侵されることはなかった。有傷接種でも病斑の発達はみられなかったことから、一種の HR と考えられた。また *Delphinium* spp. およびモクレンの葉に対してもまったく病原性を示さなかった。しかし任意に選んだ No. 22, 41, 44, 45, 49 および 8717 の 6 菌株はライラック (白花) の葉に対する接種試験でいずれも水浸状病斑を形成し、とくに No. 41 菌株は強い病原性を示した。ワサビから分離した No. 54 菌株は上記の各種野菜およびレタス

に対する付傷接種でまったく病原性を示さなかった。

3. *Erwinia* 属細菌

1978~80 年と 1987 年に静岡県下および香川県下で採集したチャ芽から分離した *Erwinia* 属細菌並びに瀧川がトウモロコシから分離した *Erwinia* 属細菌はいずれも高い氷核活性を示したが、静大保存菌株の *E. herbicola* 8 菌株と *E. milletiae* 5 菌株¹³⁾ はいずれも氷核活性を示さなかった。チャ芽から分離した菌株の細菌学的性状はトウモロコシ菌株のそれと一致したが、いずれもチャ芽およびトウモロコシに対して病原性を示さなかった。*Erwinia* 属の INAB は菌株間でインドール生成、メチルレッド反応、サッカロースからの還元物質の生成およびラフィノース利用性等の反応を異にしたが、その他の主要な性質は *E. ananas*²¹⁾ のそれに一致した (Table 5, 6)。

考 察

1978~80 年静岡県西部の茶園において、また 1987 年に香川県で鉢植えの幼木から分離された INAB は、香川県の 1 菌株 (8717) を除き、すべて *Erwinia ananas* と同定された。一方、1986, 1987 年の両年に静岡県中部の茶園と徳島県の茶園で分離された INAB はその大部分が *Xanthomonas campestris* と同定された。この事実は、地域やチャ樹の生育条件によって、チャの芽園で生育する INAB の種類が大きく異なることを示すものとして注目される。

E. ananas は日和見病原菌の一種で、通常は植物体表面で生息するが、環境条件によっては植物組織を侵して病気を起こす。病原菌としてはこれまでパイナップル心腐病²¹⁾、イネ内穎褐変病²²⁾、メロン果肉の褐変⁴⁰⁾の原因として報告されている。本細菌はイネでは茎葉および穂に普遍的にみられる表生細菌として知ら

Table 5. Bacteriological characteristics of the ice nucleation-active *Erwinia*

Characteristics ^{a)}	IN1-10, 12, 13, 15	8703, 8704, 8707-8712	53	55
Reducing substances from sucrose	D ^{b)}	D	+	+
Methyl red test	—	D	—	—
Indole test	D	+	—	—
DNase	D	D	±	+
Hydrolysis of: Tween 80	—	+	+	+
esculin	+	D	+	—
Growth at 40 C	D	—	—	—
Acid from: raffinose	D	+	+	+
glycogen	—	—	—	—
Use of: benzoate	+	+	—	+

a) All strains were positive for: straight rods; peritrichous flagella; yellow colonies; fermentative metabolism of glucose; production of catalase, H₂S, acetoin; hydrolysis of casein; gelatin liquefaction; growth at 35 C; growth inhibition by KCN; ONPG; red, coagulation, peptonization and reduction of litmus milk; utilization of asparagine as a sole source of N and C; utilization of L-arabinose, xylose, glucose, fructose, mannose, rhamnose, cellobiose, maltose, lactose, trehalose, melibiose, sucrose, sorbitol, inositol and salicin; use of formate, acetate, malate, fumarate, tartrate, malonate, oxalate, mesaconate, saccharate, propionate, caprate, caproate, quinate, anthranilate, mucate, glycolate, butyrate, maleinate, sebacate, benzoate, *p*-aminobenzoate and protocatechuate.

All strains were negative for: Gram reaction; spore formation; poly- β -hydroxybutyrate accumulation; production of oxidase, urease, arginine dihydrolase, tyrosinase, lecithinase, amino acid decarboxylases, phenylalanine deaminase, levan, 3-ketolactose; nitrate reduction; denitrification; gluconate test; hydrolysis of starch; pectate liquefaction; growth at 4 C; acid from erythritol, adonitol, α -methyl-glucoside, dulcitol, melezitose, inulin and xylan; potato rot; tobacco hypersensitivity reaction; and pathogenicity to tea.

b) For symbols see Table 2.

Table 6. Comparison of the differential characteristics of the ice nucleation-active *Erwinia* strains to those of *E. herbicola* and *E. ananas*^{a)}

Characteristics	53	55	IN1-10, 12, 13, 15	8703, 8704 8707-8712	Eh ^{b)}	Ea ^{c)}
Phenylalanine deaminase	— ^{d)}	—	—	—	+	—
Indole test	—	—	D	+	—	+
Reduction of KNO ₃	—	—	—	—	+	—
Acid from: cellobiose, glycerol inositol, melibiose	+	+	+	+	—	+
Acid from: dulcitol	—	—	—	—	+	—

a) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (1984).

b) *Erwinia herbicola*.

c) *Erwinia ananas*.

d) For symbols see Table 2.

れている³⁾。このためチャから分離された *E. ananas* は数わら等で茶園にもち込まれ、葉面で生息する形態に入ったものが分離されたものと考えられなくもない。そこで 1987 年早春—初夏に静岡県伊ネわらまたは初穀を敷いた茶園からくり返し INAB の分離を試みたが、*Xanthomonas campestris* 以外には分離できなかった。一方、香川県で *E. ananas* が分離された

鉢植え幼木では、付近にイネわらはまったくみられなかった。この事実は *E. ananas* がチャ樹の生育条件によって、*X. campestris* と同様に安定した葉面で生息する形態に入りうることを示唆している。このように *P. syringae* を含め 3 種の相異なる INAB が、それぞれ別の地域または茶園から独立して分離されたことが、たんなる偶然かあるいはチャ樹の生理と何らかの

因果関係を示すものであるかは興味あるところで、非氷核活性細菌を利用した防霜戦略上からも、今後の研究課題の一つとなろう。

チャの芽には通常1芽あたり $10^6 \sim 10^7$ 個の細菌が生息しているが、葉の展開とともに急減する。この細菌の種類は地域、時期を問わずほぼ一定しており、白色、黄色および橙色集落を形成する数種の非蛍光性 *Pseudomonas* (後藤・黄: 未発表) によって占められている。*E. ananas* および *X. campestris* の INAB はこれら芽圏細菌の一構成員と考えられるが、通常の分離法による検出結果に関する限り、細菌集団中に占める比率は一般に低く、しかもこれを保菌するチャ芽の割合も低かった。しかしこの方法では、その検出精度から $10^3 \sim 10^4$ 細菌/芽以下の INAB の存在を否定することはできない。このような培養法による検出限界以下の低密度 INAB の霜害に果たす役割は、その検出方法とともに、チャの霜害誘発源としての役割を検討する上で、今後重要な研究課題となろう。

Xanthomonas 属細菌で氷核活性をもつものとしては、フロリダでカンキツ葉から分離された1例²⁹⁾ と *X. campestris* pv. *translucens* の一部菌株の例¹⁸⁾ が知られているのみである。前者は氷核活性を除くと非病原性 *X. campestris*¹⁰⁾ の一般性状をもつといわれているが、チャ芽に存在する氷核活性 *X. campestris* との関係は現段階では明らかでない。著者がチャ芽から分離した氷核活性 *xanthomonad* の性質は、*X. campestris* のそれに一致したが、病原性は弱いジャガイモ切片腐敗能を除いて認められなかった。このため本菌の分類学的位置づけは、病原型よりむしろ亜種が適当と考えられるが、学名については機会を改めて発表したい。また静岡保存菌株の *X. campestris* 15 pathovar について氷核活性を調べた結果では、pv. *theicola* を含むすべてがこれを欠いていた。このことからチャ芽から分離された INA *xanthomonad* がきわめて特殊な細菌であることがわかる。

一般緑葉野菜から INAB を分離した報告例は少ない。分離菌株数は比較的少ないが、今回野菜から *P. syringae* pv. *syringae* が高頻度で分離され、*P. fluorescens*、*P. viridiflava*、*E. ananas*、*E. herbicola* が分離されなかったことは注目される。Kaneda¹⁶⁾ はカナダでインゲンおよび *Brassica napus* の葉から分離される INAB がすべて *P. fluorescens* で、黄色 *Erwinia* はまったく検出されないことを報告し、Obata *et al.*³¹⁾ もインゲン葉から氷核活性をもった *P. fluorescens* を分

離している。Baca *et al.*⁴⁾ はモクレンの花を含む木本植物から分離した INAB が大部分 *P. syringae* 群細菌であり、*P. fluorescens*、*E. herbicola* の分離頻度はわずかであることを報告している。これらの結果は、植物と表生 INAB との間に一定の親和関係が存在することを示唆するものとして注目される。

ワサビから分離された No. 54 菌株の細菌学的性質は、LOPAT 試験²⁰⁾ など *P. cichorii*¹⁷⁾ のそれと共通する点多かったが、蛍光色素非産生、ガラクトースなど数種糖類の非利用性、レンチナーゼ反応陰性等相違点も多く認められた。本菌株はワサビの葉柄褐変部から分離されたが、ワサビ、ハクサイ、カンラン、レタス等の葉片に対する接種ではいずれも病原性が認められなかった点から、*P. cichorii* とは異なる細菌と判定した。その分類学的所属については改めて検討したい。

摘 要

静岡県、香川県および徳島県でチャ芽、野菜およびモクレンの花から分離した氷核活性細菌について分類学的研究を行った。1978~80年静岡県で、1987年香川県でチャ芽から分離した氷核活性細菌は、後者の1菌株を除きすべて *Erwinia ananas* と同定された。これに対し、1986年および1987年の両年に静岡県で、また1987年に徳島県で分離された氷核活性細菌は前者の1菌株を除き、すべて *Xanthomonas* 属細菌であった。この *xanthomonad* は最高生育温度等2,3の性質を除き、形態、生理・生化学的性質から *X. campestris* と同定されたが、チャをはじめ供試した数種野菜には病原性を示さず、ジャガイモ切片をわずかに軟化したのみであった。この結果、本菌を *X. campestris* の新亜種と位置づけるのが妥当と考えた。タイサイ等の緑葉野菜、チャ芽およびモクレンの花から分離した氷核活性 *pseudomonad* はすべて *Pseudomonas syringae* と同じ細菌学的性質を示した。これらは分離した植物、野菜類、*Delphinium* spp. に病原性を示さなかったが、ライラックに対しては接種した菌株のすべてが病原性を示したことから *P. syringae* pv. *syringae* と同定した。ワサビから分離した *pseudomonad* は *P. cichorii* に類似した性質を示したが、蛍光色素非産生、非病原性等からこれとは異なる細菌と判定した。これらの氷核活性細菌は、いずれも高い氷核活性を示し、過冷却温度は $-2.8 \sim -3.0^\circ\text{C}$ にあったが、ワサビ菌株は $-4^\circ\text{C} \sim -5^\circ\text{C}$ であった。

引用文献

1. Andrews, P.K. and Proebsting, E.L., Jr. (1986). J. Am. Soc. Hortic. Sci. 111: 232-236.
2. Asworth, E.N. (1985). *Ibid.* 110: 287-291.
3. 畔上耕児・尾崎克己・松田 明・大畑貢一 (1983). 農技研報 C 37: 1-12.
4. Baca, S., Canfield, M.L. and Moore, L.W. (1987). Plant Disease 71: 412-415.
5. Bradbury, J.F. (1987). Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB Int. Myc. Inst. Kew, England.
6. Cody, Y.S., Gross, D.C., Proebsting, E.L., Jr. and Spotts, R.A. (1987). Phytopathology 77: 1036-1044.
7. Collins, M.D. (1985). In Methods in Microbiology (Gottschalk, G., ed.). Vol. 18. Acad. Press, New York. pp. 329-366.
8. Cowan, S.T. (1974). Cowan and Steel's Manual of the Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Camb. Univ. Press, Cambridge.
9. Dye, D.W. (1968). N. Z. J. Sci. 11: 590-607.
10. Gitaitis, R.D., Sasser, M.J., Beaver, K.W., McInnes, T.B. and Stall, R.E. (1987). Phytopathology 77: 611-615.
11. 後藤正夫 (1987). 今月の農業 31(10): 92-95.
12. 後藤正夫・稲葉忠興・後藤孝雄 (1987). 日植病報 53: 408-409 (講要).
13. 後藤正夫・高橋敏房・岡島徳岳 (1980). 同上 46: 185-192.
14. Gross, D.C., Cody, Y.S., Proebsting, E.L., Jr., Rademaker, G.K. and Spotts, R.A. (1983). Appl. Environm. Microbiol. 46: 1370-1379.
15. Gross, D.C., Proebsting, E.L., Jr. and Andrews, P.K. (1984). J. Am. Soc. Hortic. Sci. 109: 375-380.
16. Kaneda, T. (1986). Appl. Environm. Microbiol. 52: 173-178.
17. 川久保幸雄・後藤正夫 (1987). 日植病報 53: 404 (講要).
18. Kim, H.K., Orser, C., Lindow, S.E. and Sands, D.C. (1987). Plant Disease 71: 994-997.
19. King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. (1954). J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.
20. Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C. (1966). J. appl. Bact. 29: 470-489.
21. Lelliott, R.A. and Dickey, R.S. (1984). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg, N.R. ed.). Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 469-476.
22. Lindemann, J. and Suslow, T.W. (1987). Phytopathology 77: 882-886.
23. Lindow, S.E. (1982). In Phytopathogenic Prokaryotes (Mount, S.E. and Lacy, G.H. eds.). Vol. 1. Acad. Press, New York. pp. 335-362.
24. Lindow, S.E., Army, D.C. and Upper, C.D. (1982). Phytopathology 68: 523-527.
25. 牧野孝宏 (1982). 日植病報 48: 452-457.
26. 牧野孝宏 (1983). 同上 49: 32-37.
27. Marmur, J. (1961). J. Mol. Biol. 3: 208-218.
28. Marmur, J. and Doty, P. (1962). *Ibid.* 5: 109-118.
29. Minsavage, G.V. and Stall, R.E. (1986). Proc. 6th Int. Conf. Plant Path. Bact., Maryland. pp. 994-1004.
30. 小幡 齊・谷下準一・中井剛史・徳山 泰 (1987). 日本農芸化学会昭和62年度大会講演要旨集 p. 374.
31. Obata, H., Sacki, Y., Tanishita, J., Tokuyama, T., Hori, H. and Higashi, Y. (1987). Agric. Biol. Chem. 51: 1761-1766.
32. Paton, A.M. (1959). Nature 183: 1812-1813.
33. Pauline, J.-P. and Juisetti, J. (1978). Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Vol. II, Angers. pp. 725-731.
34. Pelczar, M.J., Jr. ed. (1957). Manual of Microbial Methods. McGraw-Hill Co., New York.
35. Phelps, P., Giddings, T.H., Prochoda, M. and Fall, R. (1986). J. Bacteriol. 167: 496-502.
36. Schaad, N.W. ed. (1980). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society, St. Paul.
37. 白田 昭・後藤正夫 (1981). 植物防疫 35: 325-326.
38. 高橋幸吉 (1985). 同上 39: 8-13.
39. 植原一雄・荒井 啓・野中寿之・佐野岩男 (1980). 鹿児島大農学報 30: 17-20.
40. Wells, J.M., Sheng, W.-S., Ceponis, M.J. and Chen, T.A. (1987). Phytopathology 77: 511-514.