

イネ褐条病細菌 (*Pseudomonas avenae*) の分類学的検討

塩崎 尚美・井上美由紀・松元 賢
飯山 和弘・古屋 成人・松山 宣明 (九州大学農学部)

Studies on the assignment of taxonomic status of *Pseudomonas avenae*.
Naomi SHIOZAKI, Miyuki INOUE, Masaru MATSUMOTO, Kazuhiro IYAMA, Naruto FURUYA
and Nobuaki MATSUYAMA (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812)

緒 言

イネ褐条病細菌 *Pseudomonas avenae* は, Bergy's Manual において, 蛍光色素非産生性 *Pseudomonas* 属細菌に分類され, *P. glumae* や *P. gladioli* などと共に, 生化学的類似性や系統学的類縁関係の明らかでないグループである Section V に分類されている³⁾。しかし, 近年, 分子生物学的あるいは生化学的情報が得られるようになり, 植物病原性 *Pseudomonas* 属細菌の一部や *Comamonas* 属細菌を新しい科, *Comamonadaceae* として独立させ, *P. avenae* を *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* にする提案がなされている^{5,6)}。そこで, 本研究では, 従来の分類学的方法である生理・生化学的試験と, その重要性が認識されている化学分類学的指標の一つである脂肪酸に着目し, その分析を行い, *P. avenae* の分類学的位置づけを検討した。

材料及び方法

1. 供試菌株

本実験では, *Pseudomonas avenae*, *P. gladioli* pv. *gladioli*, *P. glumae*, *P. pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci*, *P. caryophylli*, *P. rubrisubalbicans*, *P. plantarii*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. andropogonis*, *P. solanacearum*, *P. cepacia*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 及び *Comamonas acidovorans* の計14種39菌を供試した。詳細を Table 1 に示した。

2. 生理・生化学的試験

全ての試験において, 菌体は YPDA 斜面培地 (ペプトン0.6g, デキストロース3g, 酵母エキス3g, 寒天15g, 蒸留水1,000ml, pH 7.2) で培養したものを用いて, 後藤らの方法に従って行った¹⁾。

3. 脂肪酸分析

脂肪酸分析用試料の調製

a) 菌体試料の調製

供試菌株を523液体培地 (ショ糖10g, カゼイン加水

分解物6g, 酵母エキス4g, リン酸水素二カリウム2g, 硫酸マグネシウム0.3g, 蒸留水1,000ml, pH 7.0) 200ml中で, 30℃, 24時間振とう培養し, 遠心分離 (3.590×g, 30分間, 4℃) により得られた沈殿を凍結乾燥し, 試料として供試した。

b) 脂肪酸メチルエステルの調製と抽出方法

凍結乾燥試料 (約10mg) を5%無水塩酸—メタノール1ml中で100℃, 3時間加熱した (Methanolysis) 後, 室温に戻して水1mlを加え, 生成したメチルエステルを5mlの石油エーテルで2回抽出した。この石油エーテル層をあわせて等量の水で洗い, 酸を除去し, 無水硫酸ナトリウム0.5gを加えて脱水後, 窒素還流下で濃縮乾固した。これを石油エーテル0.5mlに再溶解し, 4℃で保存し試料とした。

c) ガスクロマトグラフィー (GLC) による脂肪酸の検出

全菌体からの脂肪酸の検出は, ガスクロマトグラフィー (GLC) (分光器: 島津 GC-7AG, 検出器: FID, カラム: 10% DEGS 0.45cm×3m, カラム温度: 180℃, 注入部温度: 250℃, キャリアーガス流量: 60ml/min) を用いて, 上記の操作で抽出した全菌体の脂肪酸メチルエステルを分析した。

d) 脂肪酸の同定

各ピークの脂肪酸は標準脂肪酸との相対的な保持時間の比較及びカラムの特性を考慮して同定した。また, 菌体脂肪酸の組成比はガスクロマトグラムから得られた脂肪酸のピークの面積比から算出した。

e) データ解析

各種間の類縁性を検討するために, 検出された各種の脂肪酸の組成比を平均し, これを平均変数として群平均法によりクラスター分析を行い, デンドログラム (樹形図) を形成した。

Table 1. Bacterial strains used in this experiment

Bacterial strain	Origin	Source
<i>Comamonas acidovorans</i>		
ATCC 15668 ^{Tb)}	ATCC ^{a)}	Soil
<i>Pseudomonas avenae</i>		
H8201	HAES ^{b)}	Rice
H8203	HAES	Rice
H8210	HAES	Rice
H8505	HAES	Rice
MAFF 301024	MAFF ^{c)}	Corn
MAFF 301510	MAFF	Rice
MAFF 301609	MAFF	Dallisgrass
MAFF 301754	MAFF	Rice
<i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>		
MAFF 302409	MAFF	Adzuki bean
MAFF 302418	MAFF	Oregon pea
MAFF 302424	MAFF	Cymbidium
MAFF 301064	MAFF	Freesia
MAFF 301728	MAFF	Vanda orchid
MAFF 302537	MAFF	Onion
MAFF 302544	MAFF	Rice
MAFF 301580	MAFF	Dendrobium
MAFF 302515	MAFF	Tulip
<i>P. pseudoalcaligenes</i> subsp. <i>konjaci</i>		
b-1	NIAES	Konnyaku
MAFF 301465	MAFF	Konnyaku
MAFF 301473	MAFF	Konnyaku
<i>P. cepacia</i>		
ATCC 25416 ^{b)}	ATCC	Onion
<i>P. glumae</i>		
2	KNAES ^{d)}	Rice
Ku 8122	KU ^{e)}	Rice
MAFF 301682	MAFF	Rice
MAFF 302462	MAFF	Oregon pea
<i>P. plantarii</i>		
MAFF 302387	MAFF	Rice
MAFF 302484	MAFF	Rice
<i>P. caryophylli</i>		
NIAES 1406	NIAES ^{f)}	Carnation
NIAES 1192	NIAES	Carnation
<i>P. rubrisubalbicans</i>		
MAFF 301626	MAFF	Sugarcane
MAFF 301628	MAFF	Sugarcane
<i>P. andropogonis</i>		
MAFF 301006	MAFF	Sudangrass
MAFF 301129	MAFF	Tulip
<i>P. corrugata</i>		
MAFF 301668	MAFF	Tomato
MAFF 301671	MAFF	Tomato
<i>P. fluorescens</i>		
ATCC 13525 ^{b)}	ATCC	Soil, Water
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>		
P-9	NIAS ^{g)}	Oat
<i>P. solanacearum</i>		
ATCC 11696 ^{h)}	ATCC	Tomato

a) American Type Culture Collection, USA. b) Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Niigata, Japan c) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Ibaraki, Japan d) Kyushu National Agricultural Experiment Station, Kumamoto, Japan e) Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan f) National Institute of Agro-Environmental Sciences g) National Institute of Agriculture, Ibaraki, Japan h) Type Strain

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of *Pseudomonas* species and *Comamonas acidovorans*

Characteristics	C. aci. (n=1)	P. ave. (n=8)	P. pse. (n=3)	P. cor. (n=2)	P. rub. (n=2)	P. and. (n=2)	P. glu. (n=4)	P. gla. (n=9)	P. cep. (n=1)	P. car. (n=2)	P. pla. (n=2)	P. sol. (n=1)	P. flu. (n=1)	P. syr. (n=1)
Gram reaction	- ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyocyanine on KA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluorescent on KB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 41°C	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Levan production	-	-	-	-	-	-	-	-(75%)	-	+	-	+	+	+
Oxidase activity	+	+	+	+	+	-	-	-(89%)	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-(63%)	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Tween 80 utilization	+	+	-	-	+	+	+(50%)	+	-	-	-	-	-	+
Margarine utilization	-	-(64%)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Soluble starch	-	-	-	-	-	-	-(75%)	-	-	-	-	-	+	-
Lecithinase	-	+	-	-	-	-(50%)	+	+	-	+	+	-	-	-
O/F test ^{b)}	O/-	O (75%)	O/- (67%)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Oxidation of gluconate	-	-	-	-	+	-	-	-(75%)	-	-	-	-	+	-
Potato soft rot	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Denitrification	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C. aci.: *Comamonas acidovorans*, P. ave.: *Pseudomonas avensis*, P. pse.: *P. pseudocataligenes* subsp. *konjaci*, P. cor.: *P. corrugata*, P. rub.: *P. rubra*, P. and.: *P. andropogonis*, P. gla.: *P. glutatilis* pv. *gladiali*, P. cep.: *P. cepacia*, P. car.: *P. caryophylli*, P. pla.: *P. plantarii*, P. sol.: *P. solanacearum*, P. flu.: *P. fluorescens*, P. syr.: *P. syringae* pv. *coronafractans*.

a) +: positive, -: negative.

b) O: oxidation type, F: fermentation type, O/-: alkaline reaction.

Table 3 Carbohydrate assimilation by *Pseudomonas* species and *Comamonas acidovorans*

Sugar	C. aci. (n=1)	P. ave. (n=8)	P. pse. (n=3)	P. cor. (n=2)	P. rub. (n=2)	P. and. (n=2)	P. glu. (n=4)	P. gla. (n=9)	P. cep. (n=1)	P. car. (n=2)	P. pla. (n=2)	P. sol. (n=1)	P. flu. (n=1)	P. syr. (n=1)
D-glucose	— ^{a)}	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—
Salich	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—
Cellobiose	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
Galactose	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—
D-Ribose	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Sucrose	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
meso-Inositol	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Mannose	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Trehalose	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+
Maltose	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
L-Rhamnose	—	—	—	+	—	+	—	—	+	+	+	—	—	+
Raffinose	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—
D-Arabinose	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
L-Arabinose	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
D-Xylose	—	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+
D-Arabitol	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+

C. aci. : *Comamonas acidovorans*, P. ave. : *Pseudomonas arenae*, P. pse. : *Pseudocauligenes* subsp. *kanjaci*, P. cor. : *P. corrugata*, P. rub. : *P. rubrisubalbicans*, P. and. : *P. andropogonis*, P. glu. : *P. glutinae*, P. gla. : *P. glutoli* pv. *glutoli*, P. cep. : *P. cepacia*, P. car. : *P. caryophylli*, P. pla. : *P. plantarii*, P. sol. : *P. solanacearum*, P. flu. : *P. fluorescens*, P. syr. : *P. syringae* pv. *coronafaciens*.

a) + : positive, — : negative.

結果及び考察

1. 生理・生化学的試験

供試菌株は全てグラム陰性菌で、蛍光色素を産生せず、カタラーゼ活性が陽性であった。*Pseudomonas avenae*, *P. glumae* 及び *P. gladioli* は、41℃の生育性、Tween 80の分解、レシチナーゼ及びゼラチン液化試験において共に陽性反応を示した。しかし、生理試験の項目で重要とされているオキシダーゼ活性では *Comamonas acidovorans* と *P. avenae* が陽性反応を示したのに対し、*P. glumae* と *P. gladioli* は陰性反応を示した (Table 2)。

有機酸の分解試験では、供試した菌株は全て L-アスパラギンを利用した。又、*C. acidovorans*, *P. gladioli*, *P. cepacia* 及び *P. plantarii* は、多種類の有機酸を利用する

点で類似していた。

糖の分解試験では、供試した菌株は全てフルクトース及びグリセロールを利用し酸を生成した。*P. glumae*, *P. gladioli*, *P. cepacia* 及び *P. plantarii* は、本実験で供試した糖の大部分を利用し、その種類も極めて類似していた。さらに、*P. caryophylli*, *P. corrugata* 及び *P. fluorescens* も多種類の糖を利用し酸の生成が認められた。一方、これらの菌株に対して *C. acidovorans* は、フルクトース、グリセロール及び D-マンニトールの3種の糖だけを利用した。この利用できる糖の種類が少ないという性質³⁾は、*P. avenae* 及び *P. pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* と極めて類似していた。以上の結果から、*P. avenae* は *P. pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* と共に、*P. glumae*, *P. gladioli*, *P. cepacia* 及び *P. plantarii* とは異なる糖の利用性を示し、*C.*

Table 4. Cellular fatty acid composition of *Pseudomonas* species and *Comamonas acidovorans*

Bacterial strain	Percentage of fatty acid ^{a)}											
	2.2	3.4	5.6	6.6	7.2	8.6	10.2	11.3	13.1	17.8	23	32(min) ^{b)}
<i>C. acidovorans</i>	2.62	4.10	42.43	34.64	0.00	1.01	0.00	12.20	3.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. avenae</i>	1.81	2.05	46.40	37.06	0.96	0.24	0.00	11.20	0.00	0.00	0.00	0.29
<i>P. pseudoalcaligenes</i> subsp. <i>konjaci</i>	2.41	3.75	36.79	40.75	0.00	0.00	0.00	15.73	0.00	0.00	0.00	0.57
<i>P. rubrisubalbicans</i>	2.47	0.00	27.96	31.81	0.00	1.11	4.35	24.92	5.71	0.56	0.74	0.38
<i>P. syringae</i>	3.03	0.00	35.38	35.22	3.19	0.00	5.82	17.37	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. andropogonis</i>	0.00	3.92	18.87	15.43	0.00	0.00	0.81	46.54	0.00	6.89	4.24	3.31
<i>P. gladioli</i>	0.00	4.49	33.54	4.28	4.26	6.03	5.93	3.31	12.37	8.81	9.29	7.69
<i>P. glumae</i>	0.00	3.77	29.82	4.17	0.83	2.96	3.26	20.52	5.28	9.04	7.92	12.45
<i>P. plantarii</i>	0.00	4.75	40.81	0.57	2.80	8.35	5.01	1.26	12.44	9.70	6.02	8.31
<i>P. cepacia</i>	0.00	6.41	43.55	0.00	3.90	2.06	2.46	14.75	0.00	12.10	8.84	5.92
<i>P. caryophylli</i>	0.00	3.35	33.09	7.29	2.09	0.94	0.96	30.45	2.65	7.48	4.99	6.73
<i>P. solanacearum</i>	0.00	2.83	34.80	18.22	0.00	6.96	0.00	24.31	3.37	9.51	0.00	0.00
<i>P. corrugata</i>	3.20	0.55	53.46	12.92	1.40	0.59	6.37	14.81	4.94	1.37	0.43	0.00
<i>P. fluorescens</i>	3.42	1.06	56.62	9.64	1.47	2.00	17.80	0.00	5.07	1.73	0.61	0.57

a) The percentage of each fatty acid was automatically calculated by an integrator (Shimadzu C-RIA).

b) Retention time. GLC (Column : 10% DEGS, 0.45 cm×3m, Column temp. : 180°C, Inj. temp. : 250°C, N₂ flow rate : 60 ml/min).

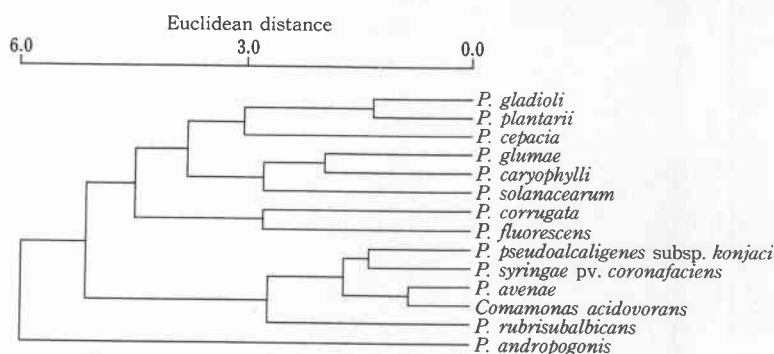


Fig. 1 Dendrogram derived from the cluster analysis on cellular fatty acids of *Pseudomonas* species and *Comamonas acidovorans*

acidovorans に高い類縁性があるものと推察される (Table 3)。

2. 脂 肪 酸 分 析

供試した菌株は、全てパルミチン酸 (R. t. 5.6) の含量が高いことから、*Comamonas* 属及び *Pseudomonas* 属細菌の共通した重要構成成分であると推察される。*C. acidovorans*, *P. avenae* 及び *P. pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* の主要な脂肪酸は、パルミチン酸、パルミトレイン酸 (R. t. 6.6) 及びバクセン酸 (R. t. 11.3) であり、これら3種の菌株の脂肪酸組成比が、極めて類似していることが報告^{2,4)}されているが、本試験においてもこれらの結果と一致した (Table 4)。また、クラスター分析の結果、パルミトレイン酸の含量が高い *C. acidovorans*, *P. avenae* 及び *P. pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* から成るクラスターとパルミトレイン酸の含量が著しく低い *P. gladioli*, *P. cepacia*, *P. glumae*, *P. plantarii* 及び *P. caryophylli* などから成るクラスターが形成された (Fig. 1)。以上のことから、*P. avenae* は病原性が類似しているとされる *P. gladioli* 及び *P. glumae* よりも *C. acidovorans* により類縁性があると

推察された。今後は、供試菌株を増やすと共に、分子遺伝学的及び他の化学分類学的指標等の詳細な検討を行い、*P. avenae* の分類学的位置づけをより明確にする予定である。

引 用 文 献

- 1) 後藤正夫・瀧川雄一 (1984) 植物防疫 38 : 339-344, 385-389, 432-437, 479-484.
- 2) IKEMOTO, S., KURAIISHI, H., KOMAGATA, K., AZUMA, R. and SUTO, T. (1978) J. Gen. Appl. Microbiol. 24 : 199-213.
- 3) MURRAY, R. G. E., BRENNER, D. J., MARVIN, P. B., JOHN, G. H., NOEL, R. K., JAMES, W. M., NORBERT, P. P. H. A. S. and JAMES, T. S. (1984) BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology 1 : 2029-2033.
- 4) URAKAMI, T., YOSHIDA, C., ARAKI, H., KIJIMA, T., SUZUKI, K. and KOMAGATA, K. (1994) Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 235-245.
- 5) WILLEMS, A., DELEY, J., GILLIS, M. and KERS-TERS, K. (1991) Int. J. Syst. Bacteriol. 41 : 445-450.
- 6) WILLEMS, A., GOOR, M., THIELMANS, S., GILLIS, M., KERS-TERS, K. and DELEY, J. (1992) Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 107-119.

(1995年4月27日 受領)