

뽕나무가지 썩음症狀에서 分離한 氷核活性細菌의 同定, 生物檢定 및 그 分布

尹 馨 珠 · 金 永 澤 · 秦 璟 植* · 朴 仁 均

農村振興廳 蠶業試驗場, 農業技術研究所*

Identification and Bioassay of Ice Nucleation Active Bacteria from Branch Rot of Mulberry and Their Populations

Hyung Joo Yoon, Yong Taek Kim, Kyoung Sik Jin* and In Gyun Park

Sericicultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea

*Agricultural Sciences Institute, RDA, Suwon, Korea

Abstract

Isolation, indentification, bioassay and distribution of ice nucleation active(INA) bacteria were done on branch rot of mulberry which was severely developed after harvest of mulberry branches in autumn. Twelve isolates and two isolates out of thirty-six isolates had ice nucleation activity from -5°C to -10°C, and over -5°C, respectively. Isolates which formed ice nuleation from -5°C to -10°C were not inclined to injure tomato and corn seedlings. However, Two isolates, SE9316 and SE9338 which formed ice nucleation over -5°C injured mulberry, tomato and corn seedlings. SE9316 and SE9338 were identified as *Pseudomonas syringae* based on the morphological, cultural and biochemical characteristics.

Populations of ice nucleation active bacteria, fluorecent *pseudomonads*, were higer in February and April, but they decreased in May. Populations decreased as they become distant from the center of the symptom. The bacterial populations of all sampling times and sites were higer than 10^5 cfu/g which was enough to induce frost injury.

Key words : INA bacteria, mulberry branch rot, *Pseudomonas*, bacterial population.

緒 論

자연계에서 農作物霜害는 하나의 低溫에 의한 氣象災害로만 인식이 되어 그에따른 被害가 증가하면서 農作物에 큰 損失을 주게 되었다. 이에 霜害의 原因 및 被害를 줄이려고 노력한 결과 霜害의 原因이 식물체표면에서 棲息하고 있는 氷核細菌이 主要人으로 작용한다는 것이 밝혀지기 시작했다(Schenll & Vali, 1972 : Maki *et al.*, 1974 : Kozloff *et al.*, 1983 : Lindow, 1983).

氷核活性細菌에 대해서는 植物病原細菌, *Pseudomonas syringae*가 -2~-3°C에서 氷核活性을 가지고 있음이 최초로 밝혀진 후(Maki *et al.*, 1974), 옥

수수의 霜害가 2種의 氷核活性細菌(*Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*)에 의해 助長되는 것이 밝혀졌으며(Lindow *et al.*, 1978), *P. syringae* pv. *mori*의 많은 菌株가 氷核活性力에 의해서 뽕나무凍霜害의 發生에 關係하고 있음이 보고(高橋 等, 1981, 1982, 1984)되는 등 植物에서 霜害를 誘發시키는 細菌이 13種 同定되었다(高橋, 1988). 그후 凍霜害被害를 輕減시키기 위하여 氷核活性細菌에 關係하는 凍霜害의 生物的 防除(Lindow, 1985) 및 주로 氷核活性의 기작을 說明하는 것으로 氷核形成能力을 나타내는 原因이 되는 蛋白質 및 遺傳子解析을 중심으로 研究가 되고 있다(Green & Wareren, 1985 : Warren & Wolber, 1991 : Deininger *et al.*, 1988). 우리나라에서는 1987

년 단감나무와 차나무에서氷核活性이 있는 *P. syringae*를 分離報告하였으며(金 等, 1987), 벼에서는 病原性 있는氷核活性細菌 *Erwinia herbicola*(金 等, 1989)를, 그리고 호박, 매화나무, 배나무에서氷核活性細菌인 *P. fluorescens*를 報告하였다(朴 等, 1990).

본 실험은 秋期伐採 후 썩음증상에서 被害가 큰 뽕나무에서의氷核活性細菌을 대상으로 分離同定, 生物檢定 및 密度에 대한 調査로 몇가지 結果를 얻었다.

본 研究를 遂行함에 있어서 細菌凍結溫度測定에 協助하여 주신 全南大學校 農生物學科 實驗室, 金基淸 博士님 이하 여러분께 깊은 感謝를 표합니다.

材料 및 方法

1. 細菌의 分離

1993年 1月 20日 가을철에 伐採(9月初)한 蠶業試驗場 뽕밭에서 黃色과 黑色 病徵을 나타내는 뽕나무를 蒐集하여 病徵別로 表面을 얇게 칼로 벗기고 그 내부를 1% sodium hypochlorite 용액에 1分間, 70% ethanol에 40秒間 殺菌 후 殺菌水로 rinse하여 filter paper에서 물기를 除去시켰다. Sample 組織속의 細菌의 噴出을 容易하게 하기 위하여 5mm 정도로 殺菌된 칼로 자르고 5% peptone 수에 넣어서 vortex를 사용하여 잘 섞은 다음 4時間동안 靜置시켰다. 이 원액을 0.2 ml/씩 nutrient glucose agar(Beef extract : 3.0 g, Peptone : 5.0 g, Glucose : 2.5 g, Agar : 18 g, SDW : 1l)와 King's medium B agar(Protease peptone #3 : 20 g, K₂HPO₄ : 1.5 g, MgSO₄·7H₂O : 1.5 g, Glycerol : 15 ml, SDW : 1l) (Schadd, 1988)에 塗抹한 후 28±1℃의 恒溫器에서 2日間 培養시킨 후에 培地上에서 肉眼으로 보기에 다르다고 생각되는 36개의 단코로니를 分離하였다. 分離된 病原菌의 培養은 NGA培地를 이용했으며 菌의 保管은 NGA 斜面培地에 2日間 培養 후 滅菌된 liquid paraffin을 충분히 부어서 4℃ 냉장고에 보관하는 方法과 NGA 斜面培地에 1日間 培養된 菌을 殺菌水를 부어 高濃度의 懸濁液을 만든 다음 1.5 ml의 microtube에 1ml/씩 넣어서 4℃에 保管하는 方法을 사용했다.

2. 細菌의 凍結溫度 測定

細菌의 凍結溫度는 Makino(1982)의 micropipette 法으로 測定하였다. 즉 micropipette에 10 μl의 細菌懸濁液을 넣은 다음, 細菌懸濁液의 溫度가 올라가지 않도록 20 mm 정도의 空氣層을 先端部에 남기고 gas burner로 封쇄하여 전남대학교 농생물학과 실험실에서 제작한 冷却機와 전자식 디지털 溫度計를 사용

하여 冷却液인 에탄올의 溫度를 1分에 0.3℃씩 低下시킴으로써 凍結溫度를 測定하였다. 이때 micropipette내부의 液面과 에탄올의 面이 一致하도록 유지시켜 micropipette 내의 凍結狀態를 관찰하였는데 micropipette 내부에 凍結이 일어난 경우에는 體積이 8.3% 增加해서 液面의 上昇이 일어나 肉眼으로 凍結溫度를 測定할 수 있었다.

3. 氷核活性細菌의 生物檢定

氷核細菌을 2.5% NGA培地에 接種하여 48時間동안 28±1℃의 恒溫器에서 培養한 다음 10⁸ cells/ml로 細菌懸濁液을 調製하여 옥수수(播種後 17日)와 토마토(播種後 50日)는 1pot(5×15×10cm)에 3本씩, 뽕나무(播種後 60日)는 1pot에 1本の 幼苗를 移植하여 각 植物體 1本당 10 ml/씩 細菌懸濁液을 噴霧接種하였다. 對照區는 각 植物體 1本당 10 ml의 殺菌水 또는 非氷核細菌을 噴霧接種하였다. 低溫處理는 低溫恒溫器에 氷核細菌이 撒布된 토마토와 옥수수는 -5℃에서 3分, 뽕나무는 -2℃에서 3分間 處理를 한 다음 溫室에 두고 24時間 間격으로 3日동안 觀察하였다. 氷核活性程度는 각 植物體의 浸漬체가 水浸狀이 되어 밑으로 처지거나 浸漬狀을 나타낸 것을 肉眼으로 調査하였다.

4. 氷核活性細菌의 同定

細菌의 形態는 1% uranyl acetate로 染色하여 전자현미경 하에서 形態, 鞭毛配列, 鞭毛數를 觀察하였고, 生理生化學의 特性은 Schaad(1988) 및 Manual of methodes for general bacteriology(Gerhardt *et al.*, 1981)의 實驗方法에 따라서 gram染色, 色素生成, PHB 蓄積, arginine dihydrolase, 窒素還元, O/F 檢定, oxidase, catalase, gelatin液化, 담배過敏反應, 감자腐敗, levan生成, pectolytic enzyme 試驗, 4℃, 41℃에서의 生長與否, mannitol의 13種의 炭素源 利用試驗을 수행하였으며, 病原菌의 形態 및 주요 生理生化學의 特性을 Baygey's manual(Palleroni, 1984)의 기록과 Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria(Schaad, 1988)와 比較檢討하여 氷核活性細菌을 同定하였다.

5. 氷核細菌 密度調査

蠶業試驗場 圃場에 秋期伐採 후 1月初 黃色과 黑色의 病徵을 나타내는 罹病가지를 蒐集하여 病徵部位, 病進展部位, 病斑에서 5 cm, 病斑에서 10 cm, 病斑에서 15 cm로 나누어서 1993年 1월부터 5월까지 한달 間격으로 *Pseudomonas*屬 氷核細菌의 密度를 調査하

Table 1. Freezing temperature(FT) and bioassay on corn, tomato and mulberry seedling of isolates obtained from branch rot of mulberry¹

Isolates	FT(°C) ²	Bioassay of freezing injury on		
		tomato	corn	mulberry
SE 9301	-8.2	+ ³	+	-
SE 9303	-9.2	-	+	-
SE 9304	-9.0	-	±	-
SE 9307	-5.8	+	±	±
SE 9310	-8.5	+	+	-
SE 9316	-3.0	+	+	+
SE 9319	-8.1	±	±	±
SE 9321	-7.3	±	+	-
SE 9328	-9.0	±	+	-
SE 9330	-8.7	±	-	-
SE 9338	-4.6	+	+	+
SE 9340	-8.5	-	±	-
S D W	-21.8	-	-	-

- 1) Listed isolates above -10°C on freezing temperature
 2) Bacterial suspensions were used 10^8 cells/ml.
 3) - : no freezing injury, ± : weak, + : very strong

였다.

調査方法은 각 時期別과 部位別로罹病뽕나무와 對照로서 건전한 뽕나무를 殺菌된 칼로 1 cm 길이로 잘라서 무게를 달은 다음 表面殺菌 후 5 mm 정도로 조각을 내어서 5% peptone수가 10 ml 들어 있는 cap tube에 넣어서 vortex를 행하였다. 4時間 후에 King's B培地에 10^5 , 10^6 , 10^7 농도의懸濁液을 0.2 ml씩 각각 3反復으로塗抹한 다음 $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 恒溫器에서 2~3日 培養한 후 調査하였다. 氷核細菌은 King's B培地에서 螢光을 발하는 colony를 計數하여 *Pseudomonas*屬 氷核細菌으로 하였다.

結 果

1. 뽕나무에서 分離한 細菌의 凍結溫度 測定 및 生物檢定

蠶業試驗場 圃場에서 秋期伐採 후에罹病뽕나무로부터 總 36개 細菌을 分離하여 각 細菌懸濁液(10^8 cells/ml)의 凍結溫度를 측정하여 본 결과, -10°C 以上에서 凍結하는 菌株은 12개였으며 그중에서 -5°C 以上에서 凍結하는 菌株은 2개로 SE9316은 -3.0°C 에서 SE9338는 -4.6°C 에서 凍結하였다(Table 1). 生物檢定에 있어서는 $-5^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ 사이에서 凍結되는 菌株에서는 일정한 傾向을 볼 수 없었으나 -5°C 以上에서 凍結되는 菌株에서는 토마토, 옥수수, 뽕나



Fig. 1. A. Freezing injury of ice nucleation active bacteria to mulberry seedlings for 3 minutes at -2°C .

C : Control, 16 : SE9316, 11 : SE9311.

B. Freezing injury of ice nucleation active bacteria to corn seedlings for 3 minutes at -5°C .

S : Control, 33 : SE9333, 16 : SE9316.

무에서 肉眼으로 확실한 凍霜害被害를 볼 수 있었다 (Table 1, Fig. 1).

2. 氷核細菌의 同定

氷核活性이 확인된 SE9316, SE9338 2菌株 모두 gram 反應이 陰性이고 鞭毛의 配列이 極毛이며 細菌形態가 桿狀形, 鞭毛數가 1개 이상을 가진 細菌들로서 細菌學的 性質은 Table 2와 같다. 즉 King's B培地에서 螢光色素를 形成하고, 好氣의 成長을 하며, catalase 反應에 陽性이고 담배過敏感反應이 있었으나, oxidase, levan生成, 41°C 에서의 자람, nitrate reduction, 감자腐敗, arginine dihydrolase에는 陰性이었다. 그러나 arabinose, glucose, inositol은 2개의 菌株간에 差異가 있었다. 이상의 結果를 종합적으로 볼 때 分離된 氷核細菌들은 Bergey's manual(Palleroni, 1984)에 따라 2菌株 모두 *P. syringae*로 推定되었다.

Table 2. Bacteriological characteristics of ice nucleation active bacteria isolated from branch rot of mulberry

Characters	Bacterial isolates of		Ps ¹
	SE9316	SE9338	
Gram stain	-- ²	-	-
Morphology	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+
Flagella number	>1	>1	>1
Flagella arrangement	polar	polar	polar
Yellow pigment on YDC	-	-	-
Fluorescent pigment on KB	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Catalase	+	+	+
Levan formation	-	-	d
Gelatin liquefaction	-	+	d
Growth at ;			
4°C	--	--	--
41°C	--	--	--
Nitrate reduction	-	-	-
Potato soft rot	-	-	-
Tabacco hypersensitivity	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-
Pectolytic enzyme	-	-	-
Utilization of ;			
mannitol	+	+	+
xylose	+	+	d
arabinose	--	+	d
glucose	--	+	+
mannose	+	+	d
sucrose	+	+	d
trehalose	-	-	-
sorbitol	+	+	d
inositol	--	+	d
benzoate	-	-	-
raffinose	--	-	d
glycerol	+	+	+
cellobiose	-	-	-
geraniol	-	--	d

1) Description of *Pseudomonas syringae* from Bergey's Manual.

2) + : Positive, - : Negative, d : Difference depending on strains.

3. 氷核細菌 密度調査

秋期伐採 후 罹病가지에 *Pseudomonas*屬 氷核細菌의 密度를 알아보기 위하여 時期別과 部位別로 密度를 조사한 결과, 對照區인 건전주에서는 細菌이 거의 없는데 반하여 5 cm罹病가지에서의 氷核細菌은 病徵部位와 病進展部位에서는 10⁷ 以上の 높은 密度를 나타내었으나 病進展部位에서 멀어질수록 初期에는 菌密度가 적었지만 시간이 갈수록 增加하였다(Fig. 2).

10 cm罹病가지에서의 氷核細菌密度는 5 cm 罹病가지와 비슷한 傾向이었다(Fig. 3). 또한 時期別로 보면 2月과 4月이 비슷한 密度로 가장 높았으며, 5月에는 減少하는 傾向이었다(Fig. 2, 3).

考 察

氷核活性細菌이란 ice-nucleation active bacteria

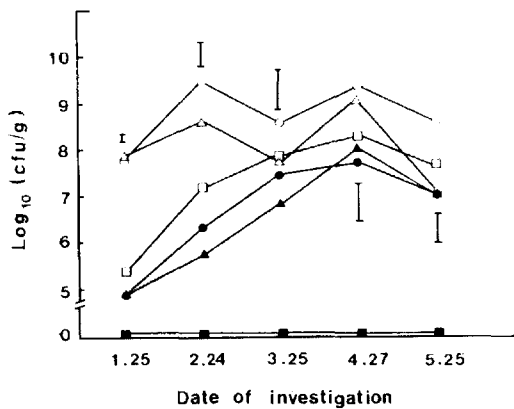


Fig. 2. Frequency of fluorescent *Pseudomonads*(INA) from 5cm symptom of branch rot of mulberry. Vertical bars presented LSD 0.01. ■—■ : control, △—△ : symptom, ○—○ : margin of symptom, □—□ : 5cm from margin of symptom, ▲—▲ : 10cm, ●—● : 15cm.

또는 ice-nucleating bacteria로 불려지며 氷晶核을 가진 細菌으로(小幡, 1987), 현재까지 알려진 氷核活性細菌은 13餘種이 보고되었으며(高橋, 1988), 뽕나무에서는 1種의 *P. syringae* pv. *mori*가 表生하고 있는 반면에 배추에서는 4種의 氷核活性細菌이 表生하고 있는 경우도 있다(Kozloff & Schofield, 1983; 高橋, 1989). 氷核活性細菌은 -2°C ~ -3°C 에서 凍結을 일으키는 것이 많지만 10^8 cells/ml, -5°C 이상에서 凍結을 일으키는 것을 標準으로 하고 있다(高橋, 1988a).

본 실험에서는 가을에 伐採 후 罹病가지에서 細菌의 氷核活性이 10^8 cells/ml 懸濁液을 기준으로 할 때 -3.0°C 와 -4.6°C 에서 凍結하는 2菌株을 同定하여 본 결과 *Pseudomonas syringae*로 밝혀졌다. *P. syringae*의 pathovar는 약 50%가 氷核活性이 있으며 *P. fluorescens*와 *E. herbicola*는 10% 이하라고 報告하였는데(高橋 等, 1981, 1982, 1984; 高橋, 1985; 佐藤守 等, 1985, 高橋, 1988a, b), 본 실험에서 分離同定된 *P. syringae*菌株중 2개의 菌株만이 氷核活性을 나타낸 것은 뽕나무의 新梢과 葉面에서 分離하지 않고 罹病가지에서 分離했기 때문인 것으로 생각된다. 小幡 & 德山(1987)은 차나무에서 分離한 氷核活性細菌 *P. fluorescens*를 옥수수에 -5°C 에서 8分間 처리했을 때, 無處理苗는 生存했지만 INA細菌을 撒布한 苗는 凍死한다고 보고하였으며, 桑苗의 葉面에 약 10^8 細菌/ml의 INA細菌液을 噴霧結露시켜 -2°C ~ -3°C 에서 수분간 처리하면 凍害를 일으키지만 非 INA菌株 및 증류수만을 처리한 경우에는 過冷却狀態로 된다고

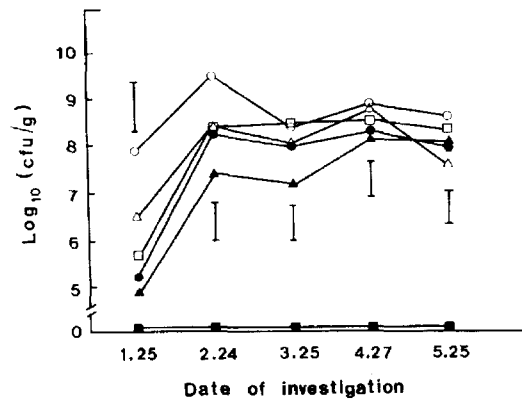


Fig. 3. Frequency of fluorescent *Pseudomonads*(INA) from 10cm symptom of branch rot of mulberry. Vertical bars presented LSD 0.01. ■—■ : control, △—△ : symptom, ○—○ : margin of symptom, □—□ : 5cm from margin of symptom, ▲—▲ : 10cm, ●—● : 15cm.

報告(高橋, 1985, 1988b)하였다. SE9316, SE9338菌株을 옥수수와 토마토에 -5°C 에서 3分間, 뽕나무 幼苗에 -2°C 에서 3分間 처리하였을 경우, 對照區와 非 氷核細菌을 처리한 경우에는 토마토, 옥수수, 뽕나무 幼苗가 잘 자랐지만 氷核細菌을 처리한 區에서는 심한 凍害를 일으킴으로서 위의 結果와 잘 일치하였다. 그러나 SE9338은 뽕나무幼苗에서는 SE9316보다 凍害가 약함을 확인할 수 있었다.

牧野(1983, 1985)는 차나무에서 氷核細菌이 11월부터 檢出되기 시작해서 12월~4월에 發生이 많아 50% 이상의 圃場에서 檢出되었으며 2월 및 3월의 檢出細菌數는 生芽重 1g당 약 10^6 개, 晚霜이 問題가 되는 4월 및 5月上旬에는 10^6 이상이었다고 報告하였고, 高橋(1988, a, b)는 氷核活性細菌 *P. syringae* pv. *mori*가 芽에 表生越冬해서 봄에 霜害發生時期에 증가하는 傾向을 나타내고 芽葉에서 檢출된 菌의 양은 凍結을 일으키기에 충분한 양이었다고 한다. 黃色과 黑色을 띠는 罹病가지를 1993년 1월부터 5월까지 한 달 간격으로 時期別, 部位別로 *Pseudomonas*屬 氷核細菌의 密度를 조사한 結果, 時期別이나 部位別로 2월과 4월에 10^5 ~ 10^9 으로 아주 높았고, 5월부터는 減少하는 傾向이었으며 病斑에서 멀어질수록 密度는 減少하였다. 그러나 分離되었던 모든 細菌이 氷核細菌의 數라고 하기는 어렵다. 왜냐하면 King's B培地에서 螢光을 발하는 모든 細菌을 취해서 細菌의 數를 계산했기 때문에 氷核活性이 없는 *P. syringae*, *P. fluorescens* 系統이 포함될 수 있으므로 실제로 *Pseudo*

monas屬 氷核細菌의 密度는 더 낮을 것으로 생각되지만, 高橋(1988b)에 의하면 뽕나무에서 6年間 걸쳐 芽葉의 表生細菌의 調査結果 INA細菌의 거의가 *Pseudomonas syringae* pv.mori이고 이 菌의 50% 이상이 INA 能力을 가지고 있고, 또한 *P. fluorescens*의 여러 系統도 고도의 氷核細菌을 가지고 있기 때문에 氷核細菌의 動態追跡이 가능하다고 생각된다. 따라서 供試材料가 다르기는 하지만 위의 結果들로 볼 때에 뽕나무에 있어서 氷核細菌이 霜害를 조장하는 原因으로 推定되며, 가을철 伐採 후 罹病뽕나무가지의 發病은 表生細菌이면서 동시에 病原性 細菌이기도한 氷核活性細菌 *P. syringae*에 의해서 直,間接적으로 影響을 받은 것으로 생각된다.

摘 要

뽕나무 秋期伐採 후 被害가 큰 가지썩음 症狀에서 氷核活性細菌의 分離, 生物檢定 및 同定과 密度를 조사하여 본 結果

1. 總 36개의 分離細菌 중 -10°C 以上 溫度에서 凍結이 되는 細菌은 12개였으며, -5°C 以上の 溫度에서는 2개菌株였다.

2. 供試細菌의 生物檢定에 있어서 토마토와 옥수수에서는 -10°C 以上の 凍結菌株에서는 일정한 傾向을 볼 수 없었으나 뽕나무에서는 -5°C 以上에서 凍結이 되는 細菌에서만 肉眼으로 확실한 凍霜害被害를 볼 수 있었다.

3. 뽕나무, 옥수수, 토마토幼苗에 霜害를 주며 -5°C 以上에서 氷核活性이 있는 菌株 SE9316, SE9338을 同定해 본 결과 gram陰性, 桿狀形, 運動性이 있고 極毛를 가지며 好氣性菌인 *Pseudomonas syringae*로 同定되었다.

4. 5 cm, 10 cm 罹病뽕나무가지에서 *Pseudomonas*屬 氷核活性細菌의 密度는 2月과 4月이 가장 높았고, 5月에는 減少하는 傾向이었으며 病斑에서 멀어질수록 密度는 減少하였다. 또한 그 密度는 10^5 cfu/g 以上으로서 凍霜害를 誘發시키기에 충분한 密度였다.

引用 文 獻

Deininger, C. A., Mueller, G. M., Wolber, P. K. (1988) Immunological characterization of ice nucleation proteins from *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia herbicola*. Journal of Bacteriology 170(2) : 669~675.

Gerhardt, P. G., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. (1981) Manual of methods for general bacteriology. American Society of Microbiology, Wa-

shington.

Green, R. L. Warren, G. J. (1985) Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. Nature 317 : 645~648.

小幡齊·徳山泰 (1987) 氷核活性細菌. 日本農芸化學云誌 61(9) : 1136~1138.

金永哲·金基濤·趙白皓 (1987) 韓國에서 分離한 *Pseudomonas syringae*의 氷核活性. 韓植病誌 5 : 72~79.

金永哲·金基濤·趙白皓 (1989) *Erwinia herbicola*에 의한 木 內頰褐變病과 病原細菌의 氷核活性. 韓植病誌 5 (1) : 72~79.

Kozloff, L. M., Schofield, M. A., Lute, M. (1983) Ice nucleating activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. J. Bacteriol. 153 : 222~231.

Lindow, S. E. (1983) The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Ann. Rev. Phytopathol 21 : 680~685.

Lindow, S. E. (1985) Intergrated control and role of antibiosis in biological control of fireblight and frost injury in Biological control on the phylloplane, ed. by Windles, C.E. and S.E. Lindow. American Phytopathological Society, pp 83 ~115.

Lindow, S. E., Army, D. C., Uppar, C.D. (1978) *Erwinia herbicola*: An active ice nucleus incites frost damage to maize. Phytopathology 68 : 523~527.

牧野孝宏 (1983) チャ樹의 芽圈細菌의 氷核活性. 日植病報 49 : 32~37.

牧野孝宏 (1982) 毛細管による細菌의 氷核活性測定法とその應用. 日植病報 48 : 452~457.

Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M., Caldwell, D. E. (1974) Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. Appl. Microbiol. 28 : 456~460.

Palleroni, N. J. (1984) Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984. In. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.1.(eds) by N. R. Krieg and J. G. Holt Williams and Wikins, Baltimore, London.

朴石奎·宋東業·金基濤 (1990) 胡麥, 매화나무, 배나무에서 分離한 *Pseudomonas fluorescens*의 氷核活性. 韓植病誌 6(1) : 91~98.

佐藤守·片桐幸逸·高橋幸吉 (1985) クワ 縮葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. mori の プラスミドパタンと病原性, 氷核能力等との關係. 蠶絲試驗場報告 30(1) : 101~121.

Schadd, N. W. (1988) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd edition. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Schenell, R. C., Vail, G. (1972) Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. Nature 236 : 163~165.

高橋幸吉 (1985) クワ의 東霜害と氷核活性細菌研究의 動向. 植物防疫 39(1) : 8~13.

高橋幸吉 (1988a) 霜害防止-葉面の氷核活性細菌의 生物的防除.-Bioindustry 5(1) : 44~52.

高橋幸吉 (1988b) 氷核活性細菌と桑의 凍霜害. 蠶絲試驗場ニコス 73(短信).

- 高橋幸吉 (1989) 氷核活性細菌の制御. 蠶絲科學と技術 **28** (5) : 64~67.
- 高橋幸吉・片桐幸逸・佐藤守 (1981) クワの凍傷害と細菌の氷核能力に聯する研究(2) *Pseudomonas syringae* pv. *mori* の氷核活性. 日蠶聯東 **6**(講要).
- 高橋幸吉・片桐幸逸・佐藤守 (1982) クワの凍傷害と細菌の氷核能力に聯する研究(1)1981年 に 多發した 不發技術について. 日植病報 **48** : 77(講要).
- 高橋幸吉・片桐幸逸・佐藤守 (1985) クワの凍霜害と細菌の氷核能力に聯する研究(4) 桑園における芽葉の表生細菌の消長と氷核活性. 日植病報 **51** : 97(講要).
- Warren, G., Wolber, P. (1991) Molecular aspects of microbial ice nucleation. *Molecular Microbiology* **5** (2) : 239~243.