

## カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

塩 谷 浩

農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所

### 1. はじめに

カンキツかいよう病は世界のカンキツ栽培地で広く発生しており、カンキツにおける最重要病害のひとつである。本病ではカンキツの葉、緑枝および果実に中心部がコルク化した円形の病斑が形成される（図 1）。主な被害は病斑により果実の商品価値が低下することにあるが、激しく発病すると落葉や枝枯れを引き起こし、樹勢を著しく低下させる場合もある。

病斑内で増殖したカンキツかいよう病菌は雨水とともに風によって飛散し、傷や気孔から侵入して感染する。伝染力は強く、全てのカンキツ属とカラタチ属を含むさまざまなミカン科植物で発病するが、本病に対しては品種間で抵抗性に大きな差が認められている。幸いなことにわが国の主要種であるウンシュウミカンは比較的強く、これまで経済的被害を受けることはほとんどなかった。しかし近年、地球温暖化に伴う異常気象や度重なる台風の上陸に伴って本種においてもかいよう病が突発するようになった。また、ウンシュウミカンは需要が減退するとともに価格も低下傾向にあるため、産地では新品種への更新が急速に進んでいる。これらのなかには抵抗性の低い品種が含まれているが、効果が不十分な銅剤以外に有効な登録薬剤がないため、防除はきわめて困難である。そのため、的確な発生予察とそれに基づく薬剤防除技術の確立や抵抗性品種の開発が強く求められており、その研究開発の基盤として病原細菌のコレクションの重要性が増している。本稿では NIAS ジーンバンクに登録されたカンキツかいよう病菌の諸性質や、病原力・抵抗性の検定法とその結果について紹介したい。

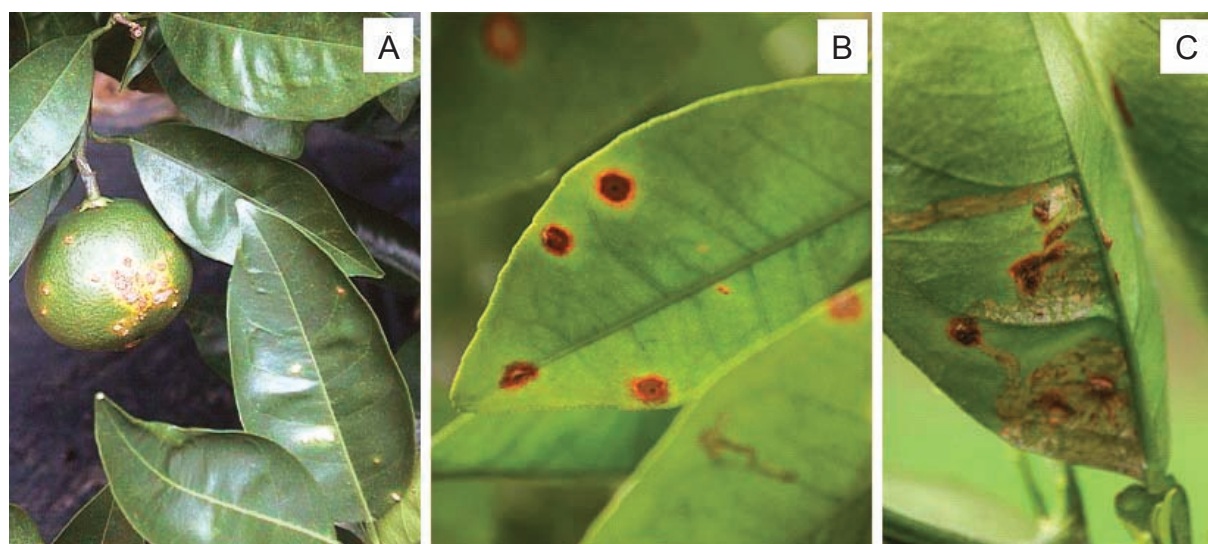


図 1. 露地栽培のネーブルオレンジに発生したカンキツかいよう病

A : 果実と葉における発病, B : 葉における病斑, C : ミカンハモグリガの食害痕に沿って形成されたかいよう病斑。

## 2. 分類

カンキツに斑点病を引き起こす *Xanthomonas* 属細菌にはいくつかのグループが存在する (Stall and Civerolo, 1991). このうち (Asiatic) citrus canker の病原として最初期に認知された病原細菌は A 群と呼ばれ、伝染力が強く、すべてのカンキツ属とそれ以外の一部のミカン科植物に強い病原力を有する. これとは別にアルゼンチン、ウルグアイおよびパラグアイでレモンを中心に発生している canker B は B 群が引き起こす. また、ブラジルのメキシカンライムでは C 群による canker C の発生が確認された. さらに、メキシコから報告された citrus bacteriosis は canker C と同様にメキシカンライムで発生するが、果実には病斑が形成されないためにその病原は D 群とされた (Rodriguez et al., 1985). なお、citrus bacteriosis に罹病した植物からは *Xanthomonas* 属細菌が稀にしか分離されないため、真の病原は糸状菌 *Alternaria limicola* (病名は citrus leaf spot) であると指摘されている (Stapleton and Garza-Lopez, 1988). 一方、アメリカ合衆国フロリダ州では citrus bacterial spot が発生し、その病徴はかいよう症状ではなく平滑な褐色斑点であったため、その病原は E 群細菌として区別された (Gottwald and Graham, 2000).

上記 A ~ E の 5 群における分類の変遷を表 1 に示す. 当初、これらの細菌群はいずれもカンキツに病原性を有することから、すべて *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse 1915) Dye1978 に分類されていた (Gabriel et al., 1989). しかし、一連の分子生物学的解析により、種レベルの所属を *X. citri* (Gabriel et al., 1989) あるいは *X. axonopodis* (Vauterin et al., 1995) に変更すべき等の提案がなされている. さらに、Shaad et al., (2005) が行った DNA-DNA 相同性解析によると、5 群のすべてが *X. campestris* pv. *campestris* や *X. axonopodis* pv. *axonopodis* に対して 30% 以下の相同性しか示さないことから、それらとは種レベルで異なるとされた. 一方、A 群は *X. campestris* pv. *malvacearum*, また、B・C・D 群は *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, さらに E 群は *X. campestris* pv. *alfalfae* とそれぞれ 70% 以上の相同性を示した. そこで、Shaad et al. (2006) は先行研究 (Gabriel et al., 1989) や AFLP ならびに表現型解析等の結果も踏まえて、A 群菌と *X. campestris* pv. *malvacearum* をあわせて独立種 *X. citri* に位置づけるとともに下位に亜種を設け、それぞれを *X. citri* subsp. *citri* および *X. citri* subsp. *malvacearum* と分類することを提案した. また、B・C・D 群を *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* とともに種へ格上げして *X. fuscans* に位置づけ、それぞれを *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* および *X. fuscans* subsp. *fuscans* と提案した. さらに、E 群は *X. campestris* pv. *alfalfae* とともに *X. alfalfae* にまとめ、それぞれを *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* および *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* とした. これら新たに提案された学名の使用頻度は近年、次第に高くなりつつある (Euzéby, 2007).

現在までのところ最も広く世界で分布しているカンキツ病原性 *Xanthomonas* 属細菌は A 群であり、その強い病原性から大いに警戒されている. ところが近年、インドや中近東諸国において、A 群細菌のゲノム内部配列をプローブとする RFLP 解析では A 群細菌と区別できないが、血清学的性質、ファージ感受性や宿主範囲の異なるグループが確認された. 本グループは分類上 A 群と同一であるが、宿主範囲の広い A 群とは対照的にライムのみ

表 1. カンキツに斑点病を引き起こす *Xanthomonas* 属細菌の種類と分類の変遷

病名	細菌群	学名			
		Dye et al., 1980	Gabriel et al., 1989	Vauterin et al., 1995	Shaad et al., 2006
canker	A	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	<i>Xanthomonas citri</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
cankrosis B	B		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>aurantifolli</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolli</i>	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i>
cankrosis C	C				
bacteriosis <sup>a)</sup>	D				
bacterial spot	E		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citrumelo</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	<i>Xanthomonas alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>

a) 1985年の報告 (Rodriguez et al., 1985) 以降、発生が確認されない.

に病原性を有することから、A\* 群として区別されている (Vernière et al., 1998). また、アメリカ合衆国フロリダ州においても、A 群と分類上同一であるがライムにのみ病原性を持つグループが確認された. 本グループは A 群だけでなく A\* 群とも血清学的性質等が異なるため、A<sup>w</sup> 群として報告されている (Sun et al., 2004). なお、日本では今のところ A 群細菌のみが確認されており、和名の‘カンキツかいよう病菌’は事実上、本群を指している.

### 3. 培地

カンキツかいよう病菌はジャガイモ半合成寒天培地 [PSA 培地; ジャガイモ (200 g) 煎汁液 1000 ml, ペプトン 5 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2g, 蔗糖 15g, 寒天 15g, pH6.8] (Wakimoto, 1967) において良好に増殖するとともに比較的長期間生存する. しかし、本培地では細胞外多糖質 (EPS) の産生量が多く、DNA 抽出や形質転換用コンピメントセル調製のための液体培養には向かない. したがって液体培養では酵母エキス・ペプトン培地 (YP 培地; 酵母エキス 0.3 g, ペプトン 0.5 g, 蒸留水 1000 ml, pH6.8) や市販の nutrient broth (Difco laboratories) などが用いられる. なお、寒天加用 YP 培地は PSA 培地に比較して生育が早く、コロニー形成数も多くなるため、形質転換処理した菌株の培養と選抜においても利用できる.

本細菌の分離選択培地として nutrient agar にカスガマイシン (16ppm)、セファレキシム (16ppm) およびクロタロニル (12ppm) を添加した KCB 半選択培地 (Graham and Gottwald, 1990) が利用されている. また、これとは別に XCSM 培地も考案された (尾崎・塩谷, 1999). 本培地は、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g, デンプン 10 g およびポリペプトン 2 g を蒸留水 1000 ml に溶かして pH6.8 に調整し、寒天 15 g を加えてオートクレーブした後、55°C に保温して  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  1 mg, シクロヘキシミド 100mg, クロラムフェニコール 1mg, ネオマイシン 1mg, メチルグリーン 10mg を無菌的に添加して作製する. カンキツかいよう病菌は本培地上で周縁部が淡緑色から黄緑色、中心部は青緑色ないし緑色を呈する特徴的なコロニーを形成し、他の細菌と容易に識別できる (図 2A). なお、XCSM 培地から  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (環境負荷の大きい劇物) を省いても選択能力に違いは認められない. また、XCSM 培地の抗菌剤を KCB 半選択培地のものと置き換えると、選択能力も変わらずコロニー生育が良好となる. XCSM 培地は KCB 半選択培地に比べて若干、簡便性に劣るが、コロニー形状での識別がより容易である.

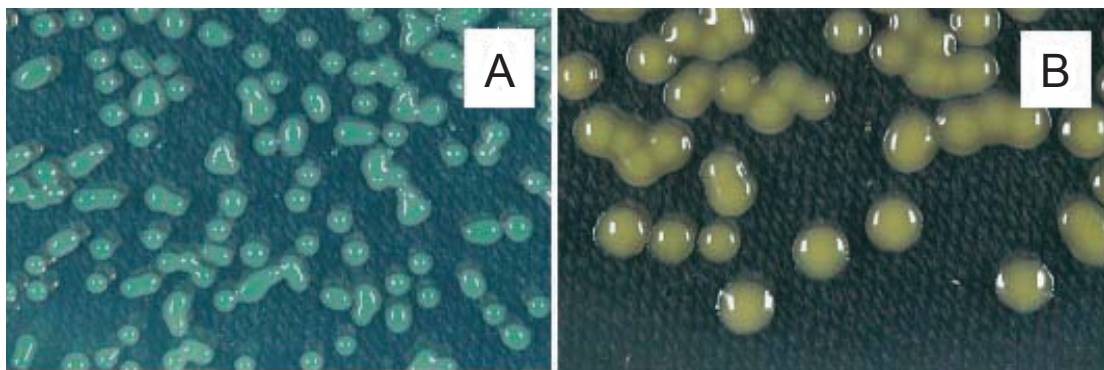


図 2. カンキツかいよう病菌の XCSM 培地 (A) および PSA 培地 (B) 上におけるコロニー

## 4. 生理・生化学的性質、遺伝学的性質に基づく同定・系統識別

### 1) 基本的な表現形質

カンキツかいよう病菌は大きさが  $1.0 \sim 2.0 \times 0.5 \sim 0.7 \mu\text{m}$  (平均  $1.4 \times 0.6 \mu\text{m}$ ) で単極毛の桿菌であり、運動性を有する. グラム陰性で芽胞を作らず、単独または 2 個連結する. コロニーはキサントモナジン色素により黄色を呈し、円形、全縁で表面は平滑、中央部で隆起して湿光を帯び、粘ちょう性である (図 2B). 好気性で培地上での生育温度は  $5 \sim 38^\circ\text{C}$  (最適  $20 \sim 30^\circ\text{C}$ ) であり、 $55 \sim 60^\circ\text{C}$  下 10 分で死滅する. 生育 pH は  $4.5 \sim 9.5$  (最適  $6.0 \sim 8.6$ ) である. ゼラチンを溶解し、デンプンを糖化する (後藤, 1962).

### 2) PCR による検出・同定

Hartung et al. (1993) は A 群細菌を検出するため、本群に特異的な DNA 配列を元に数組の PCR

プライマーを設計した。これらのうち primer-2 (5'-CACGGGTGCAAAAAATCT-3') と primer-3 (5'-TGGTGTCGTCGCTTGTAT-3') を用いると 222bp, また primer-4 (5'-TGTCGTCGTTTGTATGGC-3') と primer-7 (5'-GGGTGC GACCGTTCAGGA-3') では 468bp の DNA 断片が特異的に増幅される。

Miyoshi et al. (1998) の PCR プライマー XCF (5'-AGGCCGGTATGCGAAAGTCCCATCA-3') と XCR (5'-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3') の組み合わせでは、日本産カンキツかいよう病菌から 424bp の増幅断片が得られる。本プライマーセットを利用して、本菌の生態学的な調査が行われている (三好, 2005)。なお、本プライマーセットではごく近縁のダイズ葉焼病菌 (*X. axonopodis* pv. *glycines*) から増幅が認められる (Miyoshi et al., 1998)。

### 3) 炭水化物利用能

日本産カンキツかいよう病菌は菌株によって炭水化物 5 種 (マンノース, ラクトース, マンニトール, マルトースおよびマロン酸) の利用能が異なる (塩谷, 2007)。その調査法は以下の通りである。すなわち, Ayres 培地 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, KCl 0.2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g および 0.4% ブロムチモールブルー溶液 4 ml, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH6.8] を基本培地として上記炭水化物を 1% 濃度で加え, 寒天を加熱溶解してから 5 ml ずつ試験管に分注し, オートクレーブ (115°C - 10 分) 後, 斜面培地とする。これらの斜面培地に PSA 培地を用いて 28°C で 24 時間培養した供試菌株を移植し, 28°C で 2 週間培養する。

これまでに調査した菌株は 8 つの系統に識別できることが明らかとなった (表 2)。このうちの 47.5% が全ての炭水化物を, また, 34.6% がマンニトール以外の炭水化物を利用でき, ほとんどの株が I あるいは II 系統に属することが判明している。また, マンニトール利用能に限ると利用可能な株と不可能な株がほぼ同率に存在する (塩谷, 2007)。

表 2. 炭水化物利用能に基づく日本産カンキツかいよう病菌の系統

系統	炭水化物利用能					分離株数	比率 (%)
	マンノース	マルトース	ラクトース	マロン酸	マンニトール		
I	+	+	+	+	+	48	47.5
II	+	+	+	+	-	35	34.6
III	+	+	+	-	-	1	1.0
IV	+	-	+	+	-	5	5.0
V	+	-	+	-	+	1	1.0
VI	+	-	-	+	-	7	6.9
VII	+	-	-	-	-	3	3.0
VIII	-	-	-	-	-	1	1.0

### 4) ファージ感受性

カンキツかいよう病菌では本菌特異的なファージ Cp1 および Cp2 に対する感受性が菌株によって異なる。Wakimoto (1967) によるファージ感受性の調査法は以下の通りである。PSA 培地を用いて 28°C で 24 時間培養した菌株を滅菌水に 1×10<sup>8</sup> cfu/ml の濃度で懸濁し, この懸濁液 2 ml と 55°C に保温した溶解 PSA 培地 5 ml を混和してシャーレに流し込みプレートを作製する。このプレートに, 各ファージを 1×10<sup>9</sup> pfu/ml の濃度で懸濁した液を滴下して 28°C で 15 時間培養した後, 明瞭な溶菌斑形成の有無を観察する。なお, 本菌におけるファージ感受性と前項のマンニトール利用能は相関性が高く (後藤, 1962), Cp1 ファージ感受性の菌株はマンニトールを利用できるが, Cp1 抵抗性の株は利用できない (表 3)。

### 5) ERIC-PCR による系統識別

原核生物の類縁関係を簡易に解析する手法として rep-PCR (repetitive sequence-based polymerase chain reaction) 法が広く用いられている (Valsalovic et al., 1991)。本法では, 属・種間を越えて広く細菌ゲノムに

保存されている反復配列がプライマー設計に利用されている。反復配列はゲノム内に分散しているため、供試菌株間でゲノム構造が異なる場合、rep-PCRによってそれぞれ異なったDNAフィンガープリントが得られる。

日本産カンキツかいよう病菌は、原核生物における代表的な反復配列のうちERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) 配列由来のプライマーを用いたrep-PCR (ERIC-PCR)により2系統に識別できる (Shiotani et al., 2000)。すなわち、ERIC-PCRにより0.2～2.5 kbのDNA断片が15または16本増幅され、DNAフィンガープリントは供試株間でほぼ均一となるが、約1.8kbのDNA断片の有無によって2つの系統に分けられることが認められた (図3)。さらに、増幅が認められる系統には、Cp2に感受性の分離株のみが含まれることも明らかとなった (表4)。なお、この1.8kb DNA断片の塩基配列について本菌の全ゲノム情報 (GenBank 登録番号: NC\_003919) を参照すると、この断片は可動遺伝因子と推定されるXAC1661 (ISXac3 transposase) およびXAC1662 (*repA*) の一部を含んでいることが認められた。

## 5. 病原性検定と系統識別

### 1) 病原性検定法

カンキツかいよう病菌は感染力が強いため、葉肉注入接種法を用いるときわめて低密度の病原細菌であっても発病する。そこで、病斑の磨砕液を感受性カンキツ植物の葉に直接注入すると、古い病斑からでも効率的に

表3. 日本産カンキツかいよう病菌におけるマンニトール利用能とファージ感受性の相関

マンニトール 利用能	ファージ感受性 <sup>a)</sup>			
	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>R</sup>
陽性	32	0	17	0
陰性	0	51	0	1

a) Cp1<sup>S</sup>, Cp1感受性; Cp1<sup>R</sup>, Cp1抵抗性; Cp2<sup>S</sup>, Cp2感受性; Cp2<sup>R</sup>, Cp2抵抗性.  
表中の数字は菌株数を示す。

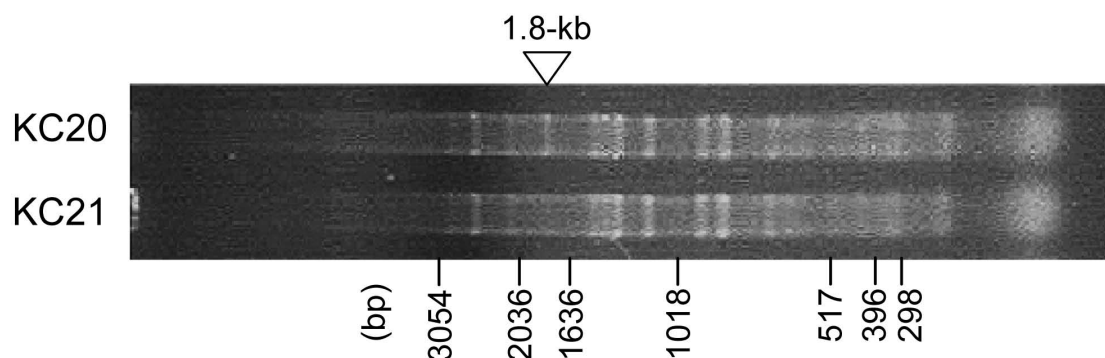


図3. カンキツかいよう病菌 [KC20 (MAFF 673034) 株および KC21 (MAFF 673037) 株] の全DNAを鋳型としたERIC-PCR

表4. 日本産カンキツかいよう病菌におけるERIC-PCRによる1.8kb DNA断片増幅、ファージ感受性およびブント類に対する病原力の相関

病原力 (対ブント類)	1.8kb DNA 断片増幅	ファージ感受性 <sup>a)</sup>			
		Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>R</sup>
標準	陽性	0	18	3	0
弱	陰性	17	0	3	1

a) Cp1<sup>S</sup>, Cp1感受性; Cp1<sup>R</sup>, Cp1抵抗性; Cp2<sup>S</sup>, Cp2感受性; Cp2<sup>R</sup>, Cp2抵抗性.  
表中の数字は菌株数を示す。

カンキツかいよう病菌を検出・分離できる（後藤ら，1970）．また，本接種法は簡便なため，分離菌株の病原性検定にも適している．

葉肉注入接種では，カンキツ鉢植え苗の着生葉を昆虫針（No. 5，志賀昆虫普及社）で1箇所穿刺した後，穿刺痕に葉裏から細菌懸濁液の入ったシリンジ（1ml 容量）を当てるとともに葉身をはさんで反対側の穿刺痕を人差し指で押えて，液が漏れないように穏やかに押し付けながら注入して接種する（図 4A）．なお，病原性検定を目的とする場合には本病に感受性の高いカンキツ植物（ネーブルオレンジ等）を宿主に用いるとよい．日平均気温が 20℃以上，接種源の細菌濃度が  $10^7$  cfu/ml 以上であれば接種から 1 週間でかいよう病斑の形成が確認されるが（図 4B），細菌濃度が低い（ $10^3$  cfu/ml 以下）と病斑形成に最大 3 週間程度必要である（図 4C）．

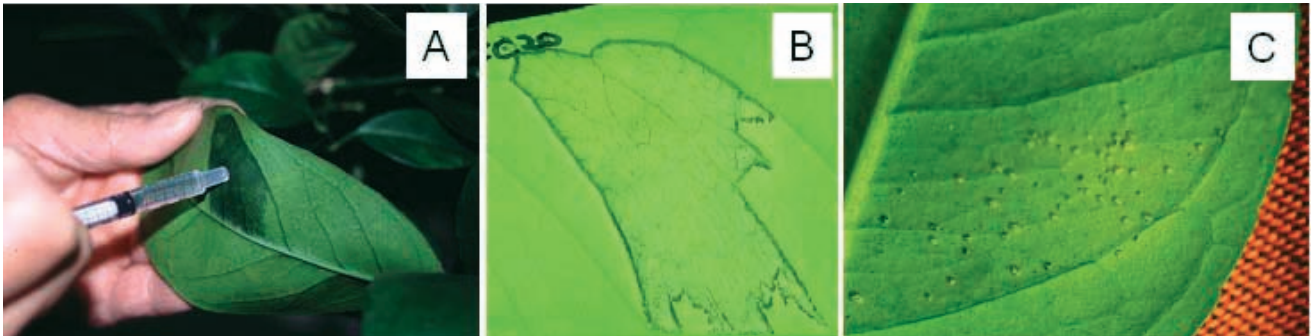


図 4. カンキツかいよう病菌の葉肉注入接種法（A），および同法で接種後に形成された病斑（B：細菌濃度  $10^8$  cfu/ml，C：同  $10^3$  cfu/ml）

## 2) 病原力の評価法

カンキツかいよう病菌は気孔および傷口から感染して斑点病斑を形成した後，病勢の進展にしたがって同心円状に拡大する（図 1B）．本細菌の場合，病斑の拡大は病斑内における病原細菌の増殖と関連するため，個々の菌株の病原力を簡便かつ客観的に評価する指標として病斑径を利用することができる．

病斑径は以下の手順で測定する（Shiotani et al., 2000）．2 年生以上のカラタチ台ネーブルオレンジ鉢植え苗を供試し，展葉を完了して硬化直後の着生葉を接種に使用する． $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml のカンキツかいよう病菌懸濁液を葉裏の葉脈を避けた部位に 1 葉あたり 2～6 箇所点滴した後，昆虫針（No. 5）で液滴を貫通しながら葉を針先でわずかに穿刺することにより接種する（以下，これを単針付傷接種法と呼ぶ）（図 5A）．接種後，葉裏に残った細菌懸濁液滴は拭き取り，接種葉にかん水等による水滴がかからないようにしながら供試苗を昼 28℃－夜 25℃に設定した温室内で 40 日間育成する．接種から約 4 日後，接種部位には円形の盛り上がった水浸状斑点が形成され，徐々に同心円状に拡大するとともに中央部がカルス状に隆起する（図 5B）．この隆

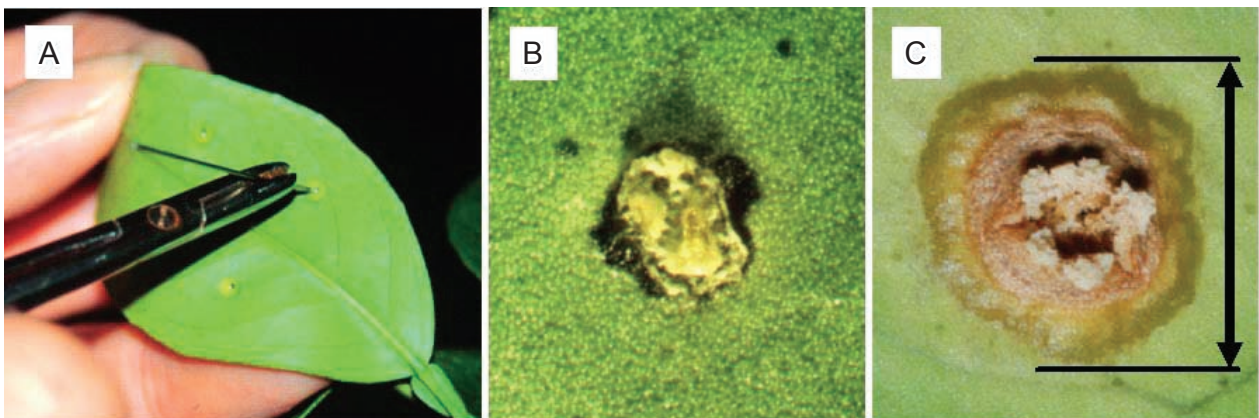


図 5. カンキツかいよう病菌の単針付傷接種法

A：単針付傷による接種，B：ネーブル葉裏における病斑（接種 8 日後），C：ネーブル葉裏における病斑（接種 40 日後）と病斑径の測定範囲（両矢印線）．

起は後に褐変・コルク化してかいよう状を呈し、その周囲が約 1 mm 幅の水浸状に病変した組織で縁取られる (図 5C). 病斑の大きさは水浸状の縁取りまでとし、その直径をノギス等で計測する. 病原力の強さは病斑径の大きさに基づいて各供試菌株間で相対的に評価する.

### 3) ブンタン類を利用した *hssB3.0* の検出

カンキツかいよう病菌では、ブンタン類カンキツ *Citrus grandis* に対する病原力の違いに基づき、弱い病原力を示す系統 (弱病原力系統) と通常の病原力を持つ系統 (標準病原力系統) の 2 系統が確認されている. 上述の単針付傷接種法によりブンタン類 (アンセイカン, パンペイユおよびオオタチバナ) では弱病原力系統は標準病原力系統よりも有意に小さい病斑を形成する (Shiotani et al., 2000). これは弱病原力系統のみが保持する病原力関連遺伝子 *hssB3.0* がブンタン類に抵抗反応を誘導し、病原力発現が宿主特異的に抑制されるためであると考えられる (Shiotani et al., 2007). なお, *hssB3.0* は本菌が病原性を発揮してかいよう症状を引き起こすために必須な遺伝子 *pthA* (Swarup et al., 1991) ときわめて高い相同性を持つ.

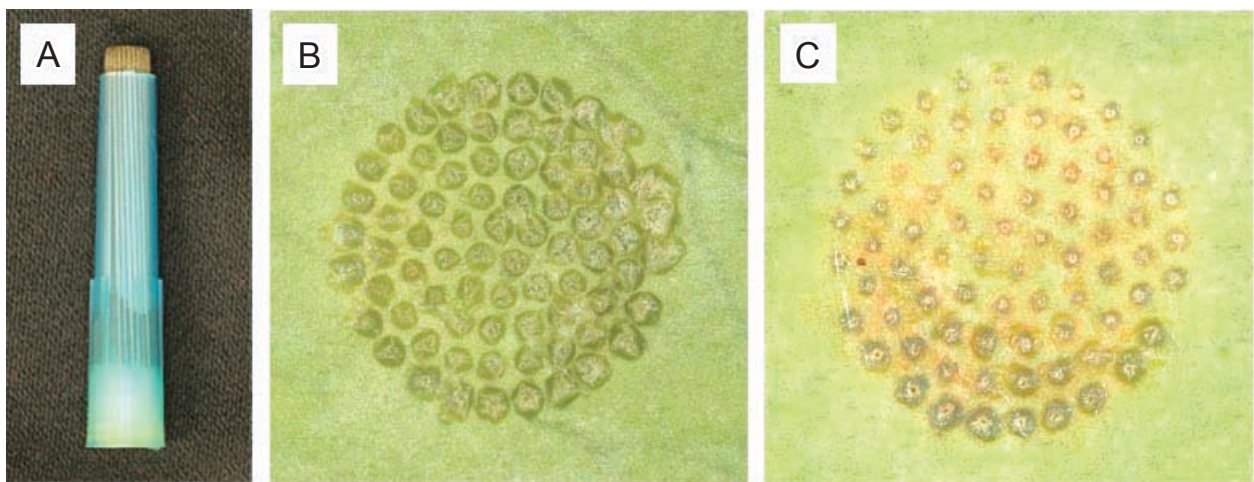


図 6. カンキツかいよう病菌の多針付傷接種法

A: 昆虫針を束ねた付傷器具, B: オオタチバナ葉表における病斑 (標準病原力系統 KC20 株の接種から 8 日後), C: オオタチバナ葉表における病斑 (弱病原力系統 KC21 株の接種から 40 日後).

ブンタン類における抵抗反応の誘導は以下に紹介する多針付傷接種法により視覚的に観察することができる. すなわち、先端を水平に切断した 1 ml マイクロピペット用チップに無頭昆虫針 (No. 5) を 80 本程度、針先をそろえて詰め込んだ後、エポキシ系接着剤を流し込んで固定した付傷器具を作成する (図 6A). 接種には単針付傷接種法と同様に鉢植え苗を供試し、硬化直後の着生葉の葉裏から上述の付傷器具をスタンプのように押し付けて傷をつける. この際、葉身をはさんだスタンプ面の反対側には折りたたんだキムワイプ等で裏あてし、かつ、適度な力で付傷器具を押し付けるとよい (力を入れすぎると針穴がつながって葉が切断されてしまう). 付傷後、直ちに  $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml のカンキツかいよう病菌懸濁液を含ませた滅菌脱脂綿で付傷部を拭うことにより接種を行い、供試苗を昼  $28^\circ\text{C}$  - 夜  $25^\circ\text{C}$  に設定した温室内で育成する. ブンタン類への接種の場合、弱病原力/標準病原力系統いずれとも単針付傷接種の場合と同様、接種から約 4 日後に接種部位を中心に水浸状となり、次第にカルス状に隆起する. 以降、標準病原力系統株では旺盛にカルス状隆起が発達を続ける (図 6B) が、弱病原力系統株では隆起の発達は鈍く、接種から約 12 日後までに病斑の多くは褐変する (図 6C). なお、接種部位の葉組織におけるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の転写活性を調べると、接種後 8 ~ 12 日にかけて弱病原力系統では標準病原力系統に比べて顕著に高く、抵抗反応の活性化が認められる.

ブンタン類への病原力に基づく系統の違いは、前述の ERIC-PCR によっても識別可能である. すなわち、ERIC-PCR により 1.8 kb 断片が増幅される菌株はこれまでのところ例外なく標準病原力系統と同定されている (図 3, 表 4). また、サザンハイブリダイゼーション解析で *hssB3.0* を検出することによっても系統の識別が可能である (図 7).

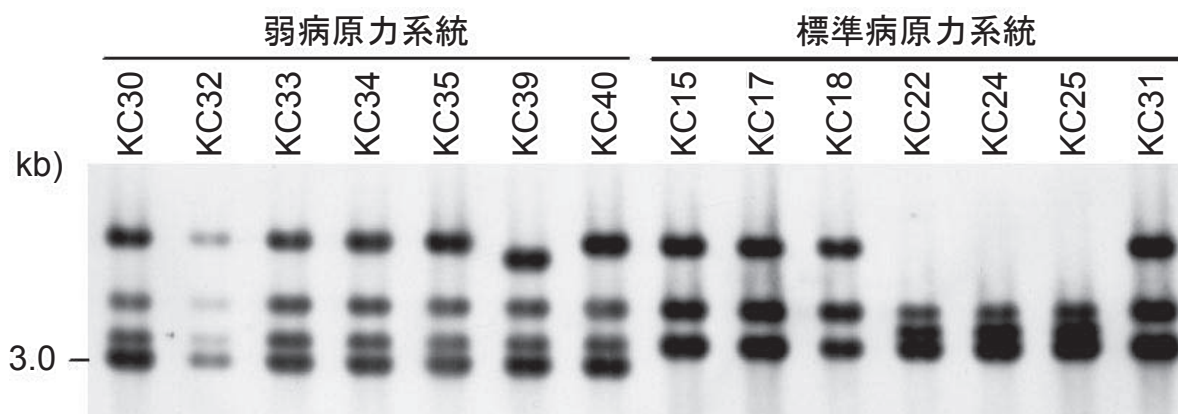


図7. カンキツかいよう病菌の *Bam*HI 切断全 DNA に対するサザンハイブリダイゼーション解析  
 プローブは *pthA* 内部配列. 弱病原力系統のみに *hssB3.0* の存在を示す 3.0 kb のシグナルが検出される.

## 6. カンキツ品種の抵抗性検定

カンキツ類のカンキツかいよう病に対する抵抗性程度に品種間差異があることは古くから知られていた。また、Koizumi and Kuhara (1982) は複数の交配組合せにおける後代の抵抗性個体出現頻度を調査し、本病に対する抵抗性が遺伝性のものであることを示している。本病に対する抵抗性には圃場（量的）抵抗性のほか、ブント類で認められるように動的（質的）抵抗性に由来する要素も少なからず含まれていると推察される。しかし、本病に対する抵抗性については未だ研究途上であり、系統的に評価するまでには至っていない。

カンキツかいよう病抵抗性の評価では圃場における発病程度から推察する方法が現時点ではもっとも実際的である。しかし、圃場調査は扱える検体数に限りがあり、また、単年度の調査では信頼性が低いため複数年にわたる継続観察が必要となる。したがって、抵抗性評価を迅速かつ大量に実施するためには実験室内における接種試験による調査方法が望ましい。先述のとおり、カンキツかいよう病の病斑は感染部位を中心として同心円状に拡大する。抵抗性の低い宿主では病斑が急速かつ長期間にわたって拡大するが、抵抗性宿主では拡大が緩慢で早期に停止する。また、急速に拡大する病斑からは病原細菌が多数溢出するが、拡大が緩慢になるに伴い溢出量が減少する（小泉, 1977）。すなわち、抵抗性程度は病斑の拡大と相関するため、先述の単針付傷接種法によって形成された病斑を観察することにより、おおよその抵抗性を推定することが可能である。

単針付傷接種法によって抵抗性を推定する場合、供試植物の生育条件を一定にそろえる必要がある。これは、同一のカンキツ品種であっても組織・器官の齢（成熟度）が異なるとかいよう病に対する感受性が異なってくるためである（Vernière et al., 2003）。松本・奥代（1988）は多胚性カンキツについては珠心胚実生を、また、単胚のカンキツについては台木に接木した苗木をそれぞれ供試することにより生育を均一化し、試験の再現性を確認している。

## 7. 引用文献

- Euzéby, J. (2007). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 57: 893-897.
- Gabriel, D. W., Kingsley, M. T., J. E. Hunter, J. E. and Gottwald, T. (1989). Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 14-22.
- Gottwald, T. R. and Graham, J. H. (2000). Canker. In: Timmer, L. W., Garnsey, S. M. and Graham, J. H. [eds] *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd ed. pp 5-7. APS Press, St. Paul, MN.
- 後藤正夫 (1962). カンキツ潰瘍病に関する研究 I. 静岡大学農学部研究報告 12: 3-72.
- 後藤正夫・芹沢拙夫・森田正人 (1970). カンキツかいよう病に関する研究 II. 葉肉注射法による *Xanthomonas citri* (Hasse) Dawson の検出, 特にファージ法との比較について. 静岡大学農学部研究報告 20: 1-19.
- Graham, J. H. and Gottwald, T. R. (1990). Variation in Aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. *Phytopathology* 80: 190-196.



- Hartung, J. S., Daniel, J. F. and Pruvost, O. P. (1993). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1143-1148.
- 小泉銘册 (1977). カンキツかいよう病の病斑拡大過程における病原細菌の行動と罹病組織の変化. *日植病報* 43: 129-136.
- Koizumi, M. and Kuhara, S. (1982). Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to the lesion extension. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. D* 4: 73-92.
- 松本亮司・奥代直巳 (1988). 付傷接種によるカンキツかいよう病抵抗性の幼病検定について. *果樹試報 D* 10: 11-23.
- Miyoshi, T., Sawada, H., Tachibana, Y. and Matsuda, I. (1998). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by PCR using primers from the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 249-254.
- 三好孝典 (2005). 樹冠流下雨水中の病原細菌量によるカンキツかいよう病防除薬剤の評価. *植物防疫* 59: 513-516.
- 尾崎克巳・塩谷 浩 (1999). カンキツかいよう病細菌の分離選択培地 (講演要旨). *日植病報* 65: 362.
- Rodríguez, G. S., Garza, L., Stapleton, J. J., and Civerolo, E. L. (1985). Citrus bacteriosis in Mexico. *Plant Dis.* 69: 808-810.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., Vidaver, A. K. (2005). Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 494-518.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. and Vidaver, A. K. (2006). Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 690-695.
- 塩谷 浩 (2007). カンキツかいよう病菌における細菌学的性質と非病原力/病原力遺伝子に関する研究 (博士論文). 岐阜大学.
- Shiotani, H., Fujikawa, T., Ishihara, H., Tsuyumu, S. and Ozaki, K. (2007). A *pthA* homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *J. Bacteriol.* 189: 3271-3279.
- Shiotani, H., Tsuyumu, S. and Ozaki, K. (2000). Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of Pummelo (*Citrus grandis*). *Phytopathology* 90: 1383-1389.
- Stall, R. E. and Civerolo, E. L. (1991). Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 399-420.
- Stapleton, J. J. and Garza-Lopez, J. G. (1988). Epidemiology of a citrus leaf-spot disease in Colima, Mexico. *Phytopathology* 78:440-443.
- Sun, X., Stall, R. E., Jones, J. B., Cubero, J., Gottwald, T. R., Graham, J. H., Dixon, W. N., Schubert, T. S., Chaloux, P. H., Stromberg, V. K., Lacy, G. H. and Sutton, B. D. (2004). Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Dis.* 88: 1179-1188.
- Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R. H. and Gabriel, G. W. (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* 81: 802-809.
- Varsalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
- Vernière, C. J., Gottwald, T. R. and Pruvost, O. (2003). Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. *Phytopathology* 93: 832-843.
- Vernière, C. J., Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Civerolo, E. L., Alvarez, A. M., Maestri, P. and Luisetti, J. (1998). Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southeast Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 477-487.
- Wakimoto, S. (1967). Some characteristics of citrus canker bacteria, *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, and the related phages isolated from Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 33: 301-310.

別表1. NIAS ジーンバンクが保存しているカンキツかいよう病菌（その1）

MAFF 番号	株名	ファージ感受性	分離源	採集地	採集年	同定者
301077	N6101	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	レモン	神奈川	1961	脇本哲
301078	N6110	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ナツミカン	和歌山	1961	脇本哲
301079	N6121	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	ウンシュウ	佐賀	1961	脇本哲
301080	N6129	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	ワシントンネーブル	大分	1961	脇本哲
302101	OGA-2	未調査	ミカン属	熊本	1987	R.M. Sonoda
302012	FuA-1	未調査	ミカン属	長崎	1987	R.M. Sonoda
302103	KMB-1	未調査	グレープフルーツ	長崎	1987	R.M. Sonoda
302104	KNA-1	未調査	ナツミカン	長崎	1987	R.M. Sonoda
302105	NAJA-1	未調査	ミカン属	長崎	1987	R.M. Sonoda
302106	NIB-1	未調査	ブンタン	長崎	1987	R.M. Sonoda
311001	NS 387	未調査	ミカン属	沖縄	1992	西山幸司
311002	NS 388	未調査	ミカン属	沖縄	1992	西山幸司
311127	EXC94001	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311128	EXC94003	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311129	EXC94020	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311130	EXC94021	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311131	EXC94043	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311132	EXC94044	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311133	EXC94052	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311134	EXC94072	未調査	ナツミカン	愛媛	1994	三好孝典
311135	EXC94077	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311136	EXC94092	未調査	ナツミカン	愛媛	1994	三好孝典
311137	EXC94128	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311138	EXC94183	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311139	EXC94187	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
311140	EXC94200	未調査	イヨ	愛媛	1994	三好孝典
673001	9011	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	熊本	1991	大津善弘
673002	KC2	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	バンペイユ	熊本	1994	尾崎克巳
673003	KC3	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	‘不知火’ <sup>a)</sup>	熊本	1994	尾崎克巳
673004	94020	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ハッサク	宮崎	1994	尾崎克巳
673005	KC9	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	スイートオレンジ	鹿児島	1994	尾崎克巳
673006	94032	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	鹿児島	1994	尾崎克巳
673007	94034	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	オオタチバナ	鹿児島	1994	尾崎克巳
673008	94107	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	スイートオレンジ	宮崎	1994	尾崎克巳
673009	94108	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	熊本	1994	尾崎克巳
673010	94118	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	‘清見’ <sup>a)</sup>	福岡	1994	尾崎克巳
673011	KC23	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	レモン	愛媛	1995	尾崎克巳
673012	95003	未調査	スイートオレンジ	愛媛	1995	尾崎克巳

a) カンキツ育成品種.

別表1. NIAS ジーンバンクが保存しているカンキツかいよう病菌（その2）

MAFF 番号	株名	ファージ感受性	分離源	採集地	採集年	同定者
673013	95011	未調査	ヒュウガナツ	高知	1995	尾崎克巳
673014	95014	未調査	スイートオレンジ	大分	1995	尾崎克巳
673015	95028	未調査	スイートオレンジ	福岡	1995	尾崎克巳
673016	95034	未調査	バンペイユ	福岡	1995	尾崎克巳
673017	95042	未調査	ナツミカン	熊本	1995	尾崎克巳
673018	95048	未調査	‘不知火’ <sup>a)</sup>	熊本	1995	尾崎克巳
673019	95057	未調査	ナツミカン	長崎	1995	尾崎克巳
673020	95091	未調査	ナツミカン	愛媛	1995	尾崎克巳
673021	KC4	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	レモン	熊本	1994	尾崎克巳
673022	KC5	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ハッサク	愛知	1994	尾崎克巳
673023	KC6	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ラフレモン	愛知	1994	尾崎克巳
673024	KC7	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	ウンシュウミカン	愛知	1994	尾崎克巳
673025	KC8	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	カボス	大分	1994	尾崎克巳
673026	KC10	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ヒュウガナツ	鹿児島	1994	尾崎克巳
673027	KC11	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	‘サザンレッド’ <sup>a)</sup>	沖縄	1994	尾崎克巳
673028	KC13	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	‘ありあけ’ <sup>a)</sup>	沖縄	1994	尾崎克巳
673029	KC14	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	石頭柑	神奈川	1994	尾崎克巳
673030	KC15	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	‘サザンレッド’ <sup>a)</sup>	高知	1994	尾崎克巳
673031	KC16	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ナツミカン	鹿児島	1994	尾崎克巳
673032	KC17	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	福岡	1994	尾崎克巳
673033	KC18	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	愛知	1994	尾崎克巳
673034	KC20	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ナツミカン	和歌山	1994	尾崎克巳
673035	KC22	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	‘セミノール’ <sup>a)</sup>	和歌山	1995	尾崎克巳
673036	KC19	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	ウンシュウミカン	和歌山	1994	尾崎克巳
673037	KC21	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	ナツミカン	和歌山	1994	尾崎克巳
673038	KC26	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	ウンシュウミカン	福岡	1995	尾崎克巳
673039	KC27	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	スイートオレンジ	福岡	1995	尾崎克巳
673040	KC28	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>R</sup>	スイートオレンジ	愛媛	1995	尾崎克巳
673041	95027	未調査	ウンシュウミカン	沖縄	1995	尾崎克巳
673042	95021	未調査	マーコット	沖縄	1995	尾崎克巳
673043	95022A	未調査	ポンカン	沖縄	1995	尾崎克巳
673044	KC24	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	‘ありあけ’ <sup>a)</sup>	沖縄	1995	尾崎克巳
673045	KC25	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	沖縄	1995	尾崎克巳
673046	97009	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	長崎	1997	塩谷 浩
673047	97011	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	長崎	1997	塩谷 浩
673048	97021	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	ウンシュウミカン	長崎	1997	塩谷 浩
673049	97027	Cp1 <sup>R</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	イヨ	長崎	1997	塩谷 浩
673050	97035	Cp1 <sup>S</sup> /Cp2 <sup>S</sup>	イヨ	長崎	1997	塩谷 浩

a) カンキツ育成品種。

生 物 研 資 料

平成 22 年 12 月

December, 2010

微生物遺伝資源利用マニュアル (29)

2010 年 12 月 24 日 印刷

2010 年 12 月 25 日 発行

編集兼  
発行者 独立行政法人農業生物資源研究所

National Institute of Agrobiological Sciences

〒 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

微生物遺伝資源利用マニュアル No.29  
カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

正誤表

● 3 ページ「3.培地」10 行目から

【誤】

本培地は、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g, デンプン 10 g およびポリペプトン 2 g を蒸留水 1000 ml に溶かして pH6.8 に調整し、寒天 15 g を加えてオートクレーブした後、55°Cに保温して  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  1 mg, シクロヘキシミド 100 mg, クロラムフェニコール 1 mg, ネオマイシン 1 mg, メチルグリーン 10 mg を無菌的に添加して作製する.

【正】

本培地は、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1 g, デンプン 10 g, ポリペプトン 2 g を蒸留水 1000 ml に溶かして pH6.8 に調整し、寒天 15 g を加えてオートクレーブした後、55°Cに保温して  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  1 mg, シクロヘキシミド 100 mg, クロラムフェニコール 1 mg, ネオマイシン 1 mg, メチルグリーン 10 mg を無菌的に添加して作製する.