Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* WB 系統による クルミ黒斑細菌病のわが国における初発生

澤田 宏之^{1*}・横澤 志織²・上松 寛³・西口 徹³・近藤 賢一⁴

ABSTRACT

SAWADA, H.^{1*}, YOKOSAWA, S.², UEMATSU, H.³, NISHIGUCHI, T.³ and KONDO, K.⁴ (2017). First report of walnut blight caused by WB strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 83: 10–21.

Since 2014, brown to black spots have been observed on leaves, catkins, and fruits of commercially cultivated walnut (*Juglans regia*) in most walnut-growing regions of Nagano Prefecture, Japan. The causal bacterium, which was demonstrated by inoculation and reisolation to be pathogenic on walnut, was a gram-negative, aerobic rod with one polar flagellum. It formed yellow, slimy colonies and had biochemical and physiological characters similar to those of *Xanthomonas* species. On the basis of PCR assays targeting 16S rRNA gene and *qumA*, a multilocus sequence analysis (MLSA) using the concatenated sequences of seven housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* and *rpoD*), and the aforementioned phenotypes, we identified the pathogen as *Xanthomonas arboricola* Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995. Moreover, the results of the MLSA, additional PCR tests to clarify the composition of type III effector (T3E) genes, biochemical and physiological characterization using API 20NE, and inoculation tests clearly showed that this pathogen corresponds to *X. arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*). In addition, because *Xaj* strains comprise two lineages (walnut blight [WB] strains harboring *xopAH*, and vertical oozing canker [VOC] strains harboring *xopB*), we used PCR tests to investigate which T3E gene the pathogen possesses and clarified that it harbors *xopAH*. We also found that even in MLSA trees, the pathogen clusters together with WB strains and that the symptoms observed in Nagano orchards agree with those caused by WB strains. As a result, the pathogen was determined to correspond to WB strains of *Xaj*. To our knowledge, this report is the first in Japan of walnut blight caused by *Xaj*. Furthermore, although it had been shown that WB strains of *Xaj* worldwide are genetically heterogeneous, all the present isolates used proved to be highly homogeneous. This result suggests that one clone of WB strains has been expanding its distribution to most walnut-growing regions in Nagano Prefecture so far, leading to the present situation.

(Received April 18, 2016; Accepted August 26, 2016)

Key words: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, WB strains, type III effector, MLSA, walnut, blight

緒 言

クルミ科クルミ属 (*Juglans*) には果実が食用にされるものが複数存在するが、経済品種の多くは *J. regia* (ペルシャ

グルミ、テウチグルミ、シナノグルミ等と呼称されるものが含まれている) に属しており、北半球の温帯地域を中心として商業栽培が盛んに行われている。わが国では長野県の生産が際立って多く、国内生産量の約 85% を占めている

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源センター (〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2) Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

² 長野県果樹試験場 (〒382-0072 長野県須坂市小河原 492) Nagano Prefecture Fruit Tree Experiment Station, 492 Ogawara, Suzaka, Nagano 382-0072, Japan

³ 横浜植物防疫所 (〒231-0801 神奈川県横浜市中区新山下 1-16-10) Plant Protection Station, Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa 231-0801, Japan

⁴ 長野県農政部 (〒382-0072 長野県須坂市小河原 492) Agricultural Administration Department, Nagano Prefectural Government, 492 Ogawara, Suzaka, Nagano 382-0072, Japan

* Corresponding author (E-mail: sawada@affrc.go.jp)

本研究で明らかになった DNA 塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベースに accession No. LC114277–LC114290 および LC114308–LC114342 として登録した。

(農林水産省, 2015). 東御市を中心とする東信地区が長野県におけるクルミ栽培の中心地であるが、それ以外にも県内全域に栽培圃場が分散して存在している。

これら長野県内の産地では、2014 年以降、*J. regia* (品種: ‘清香’, ‘豊笑’, ‘要鈴’ など) の葉や花穂、果実に黒褐色の斑点症状が多発し、大きな問題となっている。これらの症状は、斑点からの細菌の溢出が顕微鏡観察できることから、細菌病である可能性が発生当初より指摘されていた。ただし、本研究を開始した時点で、クルミの細菌病として国内での発生記録があるのは「根頭がんしゅ病」のみであり (日本植物病理学会, 2015)、本症状に類似した既知の細菌病は国内には報告がなかった。

一方、諸外国でクルミの最重要病害の 1 つとされている walnut blight (WB) (Lindow, 2002) や vertical oozing canker (VOC) (Hajri *et al.*, 2010) と、長野県で発生している本症状との間には、病徴や発生状況に関して類似点が認められた。なお、WB と VOC を比較すると、葉や花穂、果実に黒褐色の斑点症状が形成される点では一致しているが、VOC の場合はさらに、「縦方向に伸びるかいよう病斑が主幹や主枝に形成される」という特有の症状が報告されている。また、WB と VOC はいずれも、*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* によって引き起こされる細菌病であることが判明している (Hajri *et al.*, 2010; Lindow, 2002)。ただし、本菌は遺伝的に分化しており、WB と VOC はそれぞれ、病原性遺伝子の保有パターンの異なる別系統によって引き起こされることが明らかにされている (以後、各々の病原を WB 系統と VOC 系統と表記する) (Cesbron *et al.*, 2015; Essakhi *et al.*, 2015; Hajri *et al.*, 2010; Hajri *et al.*, 2012)。一方、クルミの植物体上には非病原性の *X. arboricola* も多数生息しており、しかも、それらは遺伝的な変異に富んでいることが明らかになりつつある (Cesbron *et al.*, 2015; Essakhi *et al.*, 2015)。以上のようから、病原学的解析を実施する上で注意を要する材料であることが指摘されている。

ところで、*X. arboricola* は DNA-DNA 相同値に基づいて設けられた種であるが (Vauterin *et al.*, 1995)、種の定義・範囲や、種内に含まれる病原型 (pathovar) 間の遺伝的な類縁関係が不明確であることが問題とされていた。そこで、Fischer-Le Saux *et al.* (2015) は、このような混乱を解消することを目指して、MLSA (multilocus sequence analysis), MLST (multilocus sequence typing), および接種試験に基づいた比較解析を実施している。そして、得られた成果に基づき、9 つの病原型を含む形で *X. arboricola* の再定義を行っている。

以上のような問題点や研究の進展を踏まえた上で、我々

は本症状の原因を明らかにするために、*X. arboricola* の 9 つの既知病原型 (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015) との直接比較を行いながら、病原学的な解析を慎重に実施してきた。その結果、本症状は、*X. arboricola* pv. *juglandis* の WB 系統によって引き起こされた細菌病であることが判明したので、その詳細を以下に報告する。なお、本論文における *X. arboricola* 関連細菌の学名表記は、Fischer-Le Saux *et al.* (2015) の提案に従って行った。また、本研究の成果の一部は口頭発表によって既に報告した (澤田ら, 2016; 横澤ら, 2016)。

材料および方法

病原細菌の分離と保存 クルミ栽培圃場が存在する市町村を北信地区から 2 つ、東信地区から 2 つ、南信地区から 1 つ選んだ上で、各市町村から 1~2 か所の発生圃場を調査対象として抽出した。そして、2014 年 8 月と 2015 年 6~7 月に、調査対象として選定した合計 6 つの発生圃場から罹病果実を採取し、果実ごとに 1 菌株を分離した上で純化を行った。さらに、得られた菌株を用いて次項に記した接種試験を行い、病原性が確認できたものの中から、圃場ごとに 1~2 菌株を代表として選んだ。このようにして得られた 7 菌株 (MAFF 212146~212152) (Table 1) を以後の試験に供試した (以下、これらを「分離菌」と表記する)。また、比較のために、*X. arboricola* に属する 9 つの病原型 (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015) の pathotype strain (基準株)、および、*X. arboricola* pv. *juglandis* の VOC 系統の代表菌株を対照として供試した (Table 2)。以上の供試菌株は、特に記載しない限り標準寒天培地 (日水製薬) を用いて 27°C で培養した。菌株の保存は凍結保存法 (澤田, 2013) によって行った。

接種試験 分離菌の病原性は、6 号鉢に植え付けた 3 年生の ‘清香’ に対するゴムプレス接種 (澤田ら, 2011b; 高梨, 1995) によって確認した。すなわち、被検菌を平板培地で 3 日間培養し、その菌体を滅菌水に懸濁して約 10^9 cfu/ml としたものを接種源とした。そして、切断したゴム管を先端部に装着した洗濯ばさみを用意し、ゴム管部分を菌液に浸してゴム面に菌液を馴染ませてから葉身をはさみ、約 5 秒後にはさみを外した。この処理を展葉後間もない小葉 5 枚に対して 2 箇所ずつ行った後、23°C の恒温温室で 21 日間にわたって経過観察を行った。さらに、接種結果の判定後、病変部からの再分離と PCR 検定 (後述する T3E14F/T3E14R プライマーセットを使用) を実施した。なお、*X. arboricola* pv. *juglandis* や pv. *pruni* の対照菌株、あるいは滅菌水を用いて同様の処理を行ったものを対照区とした。

また、一部の菌株については、採取した果実に対する穿刺接種と、樹上の果実に対する噴霧接種も試みた。穿刺接

Table 1. Strains of the pathogen causing walnut blight isolated in Nagano Prefecture, Japan

Isolate	MAFF no. ^{a)}	Host/source of isolation ^{b)}	Year of isolation	Phenotype			PCR result ^{d)}								
				Fluorescent pigment ^{c)}	Pectolytic activity ^{d)}	API 20 NE ^{e)}	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1-1	212146	<i>J. regia</i> /fruit	2014	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–
2-4	212147	<i>J. regia</i> /fruit	2014	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–
5-5	212148	<i>J. regia</i> /fruit	2014	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–
77-26	212149	<i>J. regia</i> /fruit	2015	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–
722-5	212150	<i>J. regia</i> /fruit	2015	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–
818-1	212151	<i>J. regia</i> /fruit	2015	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–
818-10	212152	<i>J. regia</i> /fruit	2015	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–

a) Accession numbers in NARO Genebank, Japan (http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_en.php).

b) Each strain was isolated from a sunken, black spot on a fruit.

c) Fluorescent pigment production was determined on King's B medium (Schaad *et al.*, 2001).

d) Pectolytic activity was tested using potato slices (Schaad *et al.*, 2001).

e) Seven-digit numerical profile obtained using API 20 NE (bioMérieux).

f) IDs (A–I): see Table 3. +: positive; –: negative.

Table 2. Reference strains of *Xanthomonas arboricola* pathovars used in this study

Taxon ^{a)}	Strain ^{b)}	Host	Location	Phenotype			PCR result ^{d)}								
				Fluorescent pigment ^{c)}	Pectolytic activity ^{d)}	API 20 NE ^{e)}	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> (WB strain)	NCPPB 411 T	<i>Juglans regia</i>	New Zealand	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	+	–
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> (VOC strain)	CFBP 7179	<i>Juglans regia</i>	France	–	–	0476341	+	+	+	–	–	–	–	–	+
<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	NCPPB 935 PT	<i>Corylus maxima</i>	USA	–	–	0476341	+	+	+	+	+	–	+	+	–
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	NCPPB 416 PT	<i>Prunus salicina</i>	New Zealand	–	–	0472141	+	+	+	+	+	+	–	+	–
<i>X. arboricola</i> pv. <i>guizotiae</i>	NCPPB 1932 PT	<i>Guizotia abyssinica</i>	Ethiopia	–	–	0472141	+	+	–	–	–	–	+	–	+
<i>X. arboricola</i> pv. <i>arracaciae</i>	NCPPB 2436 PT	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	Brazil	–	+	0476341	+	+	–	–	–	–	–	–	+
<i>X. arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>	NCPPB 1832 PT	<i>Musa</i> sp.	New Zealand	–	+	0476341	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>	LMG 19145 PT	<i>Fragaria ananassa</i>	Italy	–	+	0476341	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>X. arboricola</i> pv. <i>zantedeschiae</i>	NCPPB 2978 PT	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	South Africa	–	+	0472341	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>	LMG 12141 PT	<i>Populus</i> sp.	Netherlands	–	+	0472341	+	–	–	–	–	–	–	–	–

a) The nomenclature of Fischer-Le Saux *et al.* (2015) was used.

b) CFBP, International Center for Microbial Resources, French Collection for Plant-associated Bacteria, France; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK. T, Type strain of the species; PT, pathotype strain.

c–f) See Table 1.

種の場合は、2014年8月19日に外観健全な‘豊笑’の果実を採取し、3%次亜塩素酸ナトリウムに5分間浸漬した後、滅菌水で3回洗浄した上で風乾した。次に、被検菌の平板培養から虫ピンで菌体をかき取り、果実の殻皮付近まで虫ピンを穿刺することによって接種した後、果実を湿室内に静置し、25°Cの暗条件下で経過観察を行った。さらに、接種17日後に穿刺部を縦断し、内部組織の褐変程度を調査した。一方、樹上の果実に対する噴霧接種では、圃場に植栽されている8年生の‘清香’を用いた。2015年5月11日に、自然感染を防ぐために花そうに果実袋を掛けた後、6月1日

に除袋し、その時点で外観健全な果実を接種に供した。そして、被検菌を滅菌水に懸濁して約 5×10^6 cfu/mlの菌液を調整し、供試果実に噴霧した後、果実袋、湿らせたペーパータオル、果実袋の順序で3重に被袋し、その後15日間にわたって経過観察を行った。

表現形質の検査 菌体の形態を確認するために、分離菌をTY液体培地（澤田ら、2015）を用いて27°Cで2日間静置培養した後、2%酢酸ウランを用いてネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察した。集落形態については、分離菌を標準寒天培地の平板に画線し、27°Cで培養しながら

ら経時的に観察を行った。基本的な生理・生化学的性質に関しては, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 第3版 (Schaad *et al.*, 2001) の手法に従って検査を実施した。また, API 20NE (シスメックス・バイオメリュー) を用いて 21 項目の生理・生化学的性質を検査し, 培養 5 日目の判定結果をもとにプロファイル番号を算出した。

PCR 検定 分離菌の属・種レベルの所属を確認するために, *Xanthomonas* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子, および, *X. arboricola* の *qumA* を標的として設計された同定用プライマーセット (Maes *et al.*, 1993; Pothier *et al.*, 2011) (Table 3 の A, B 欄) を用いて, コロニーダイレクト PCR を行った。なお, *X. arboricola* では, 病原型間や系統間, あるいは病原性菌株と非病原性菌株との間で, タイプ III エフェクター (T3E) 遺伝子の構成が大きく異なっていることが比較ゲノ

ム解析や PCR 検定によって明らかにされている (Cesbron *et al.*, 2015; Essakhi *et al.*, 2015; Hajri *et al.*, 2012)。そこで, これらの情報を利用し, T3E 遺伝子構成を解析することによって, 分離菌の病原型～系統レベルの同定・判別を試みた。まず, 病原型レベルの同定を行うために, *X. arboricola* pv. *pruni*, pv. *corylina* および pv. *juglandis* に特異的に分布していると考えられている *xopX* (Table 3 の C 欄), *X. arboricola* pv. *pruni* と pv. *corylina* に特異的とされている *xopG* と *xopAF* (Table 3 の D, E 欄), *X. arboricola* pv. *pruni* に特異的な *xopE3* (Table 3 の F 欄), *X. arboricola* pv. *corylina* と pv. *guizotiae* に特異的な *avrBs3* (Table 3 の G 欄) を標的として PCR を実施した。また, *X. arboricola* pv. *juglandis* は遺伝的に分化しており, *xopAH* は WB 系統のみ, *xopB* は VOC 系統のみに分布していることが指摘されている (Cesbron *et al.*, 2015;

Table 3. PCR primers used in this study

ID ^{a)}	Primer name	Gene name (Product name)	Specificity	Sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C) ^{b)}	Product size (bp)	Reference
A	X1 X2	16S rRNA	<i>Xanthomonas</i> spp.	AAGGATCGGGTATTAAC AGAGTTTGATCITGGCTCAG	55	480	Maes <i>et al.</i> (1993)
B	XarbQ-F XarbQ-R	<i>qumA</i>	<i>X. arboricola</i> ^{d)}	GCGAGATCAATGCGACCTCGTC GGTGACCACATCGAACCGCGCA	65	402	Pothier <i>et al.</i> (2011)
C	T3E14F ^{c)} T3E14R ^{c)}	<i>xopX</i>	<i>X. a.</i> pv. <i>pruni</i> , pv. <i>corylina</i> , pv. <i>juglandis</i>	ATGGAGATCAAGAAACAGCAAACCGC GGCGACAGGCTTTGCACATATCTGG	65	1865	Essakhi <i>et al.</i> (2015)
D	T3E15F ^{c)} T3E15R ^{c)}	<i>xopG</i>	<i>X. a.</i> pv. <i>pruni</i> , pv. <i>corylina</i>	ATCGCAGCGAGGATTACCCG AGACCATTCTCGGCACGAATAG	65	553	Hajri <i>et al.</i> (2012)
E	T3E16F ^{c)} T3E16R ^{c)}	<i>xopAF</i>	<i>X. a.</i> pv. <i>pruni</i> , pv. <i>corylina</i>	ATGACAAATGGTATAAGTCGTTATTCTTATAAC CTATTTAACAAGATCTGTTACAAACCTCAGC	60	657	Hajri <i>et al.</i> (2012)
F	T3E17F ^{c)} T3E17R ^{c)}	<i>xopE3</i>	<i>X. a.</i> pv. <i>pruni</i>	ATGGGTTGCACTATCTCAACGACAAAC TTACTGGCTCTGCTCGCCAGCTGAT	65	1071	Hajri <i>et al.</i> (2012)
G	T3E8F ^{c)} T3E8R ^{c)}	<i>avrBs3</i>	<i>X. a.</i> pv. <i>corylina</i> , pv. <i>guizotiae</i> ^{e)}	AGAGCATTTGTTGCCAGTTATCTC GTTTCGGTGACGCCACTCT	60	333	Hajri <i>et al.</i> (2012)
H	T3E19F ^{c)} T3E19R ^{c)}	<i>xopAH</i>	<i>X. a.</i> pv. <i>pruni</i> , pv. <i>corylina</i> , pv. <i>juglandis</i> WB strains	ATGAAGAACACGTCTGTCCCT CTACTTCTGCGTGGGAGGC	65	1002	Essakhi <i>et al.</i> (2015)
I	T3E10F ^{c)} T3E10R ^{c)}	<i>xopB</i>	<i>X. a.</i> pv. <i>arracaciae</i> ^{f)} , pv. <i>guizotiae</i> ^{f)} , pv. <i>juglandis</i> VOC strains	AGCATTTGGCCCAAGCGCTTT CGCTTCGGTTGTCGTCATATTGG	54	574	Essakhi <i>et al.</i> (2015)

a) PCR results obtained using the respective primer set are shown in Tables 1 and 2 as indicated by the respective ID.

b) AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) and T100 thermal cycler (BIO RAD) were used in this study.

c) Because Hajri *et al.* (2012) and Essakhi *et al.* (2015) did not name their primers in their papers, we tentatively designate them as shown.

d) Pothier *et al.* (2011) reported that no amplification was obtained from *X. arboricola* pv. *populi* by using XarbQ-F/XarbQ-R.

e) Although Hajri *et al.* (2012) reported that amplification was obtained from only *X. arboricola* pv. *corylina* by using T3E8F/T3E8R, amplified products were also obtained from *X. arboricola* pv. *guizotiae* (Sawada *et al.*, unpublished data).

f) Although Essakhi *et al.* (2015) reported that amplification was obtained from only *X. arboricola* pv. *juglandis* VOC strains by using T3E10F/T3E10R, amplified products were also obtained from *X. arboricola* pv. *arracaciae* and pv. *guizotiae* (Sawada *et al.*, unpublished data).

Essakhi *et al.*, 2015; Hajri *et al.*, 2012). そこで、系統レベルの判別のために、これら2つの T3E 遺伝子を標的として PCR を行った (Table 3 の H, I 欄). 以上の PCR 検定では、Table 2 に示した対照菌株を比較のために用いた.

MLSA 解析 Essakhi *et al.* (2015) は、101 菌株の *X. arboricola* 関連細菌を供試し、7つの必須遺伝子 (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* および *rpoD*) の配列を決定して大規模な MLSA 解析を行っている. しかも、その際の供試菌株には、それぞれ相当数の「WB 系統, VOC 系統, および、クルミから分離された非病原性の *X. arboricola*」が含まれている. したがって、このデータセット [7 遺伝子 x 101 OTU (Operational Taxonomic Unit)] とともに分離菌の MLSA を行えば、分離菌が WB 系統, VOC 系統, あるいは非病原性菌株のいずれに相当するのかを判断する上で、有用な情報が取得できる可能性がある. そこで、分離菌 7 菌株 (Table 1) を対象として、これら 7 遺伝子の部分塩基配列を、Fischer-Le Saux *et al.* (2015) や Essakhi *et al.* (2015) と同様にして両鎖解析によって決定した. そして、遺伝子ごとに、本研究で決定した配列データ (7 OTU) に、Essakhi *et al.* (2015) の配列データ (101 OTU) を加えた上で、MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) に読み込み、MUSCLE でアラインメントを行った. さらに、各アラインメントを確認・調整した後、これら 7 遺伝子のデータをすべて連結した上で、ギャップや不明確な塩基の含まれる座位を解析対象から除外した. そして、MEGA 6.06 を利用してモデル選択を行った後、選ばれた最適モデルのもとで分子系統解析を実行した. モデル選択と分子系統解析の具体的な進め方については、澤田・畔上 (2014) に示したとおりである. なお、分子系統解析の手法としては、最尤法 (ML 法), 近隣結合法 (NJ 法) および最大節約法 (MP 法) の3つを併用した.

結 果

発生状況と病徴

2014 年以降、主要産地の東信地区をはじめとする長野県内各地に植栽されたクルミ (*J. regia*) で、葉や花穂、果実に斑点症状が多発している. これらの発生圃場では、雄花開花前の 4 月下旬頃から花穂で発病が認められ始めた. 罹病した花穂は黒変するとともに、萎凋して奇形を呈した (Fig. 1-A). 5 月下旬には、葉や葉柄に褐色～黒褐色の壊死斑が形成された. 葉では始め、葉脈に囲まれた径 1 mm 程度の角斑が生じ (Fig. 1-B), その後、病勢の進展とともに拡大して互いに融合し (Fig. 1-C), 葉枯症状を呈する場合もあった. 斑点の周囲に淡黄色のハローを伴う事例も認められた (Fig. 1-D). 果実では 6 月上旬頃から、暗緑色～茶褐色でわずか

に陥没した水浸状の小斑点が外果皮に生じた (Fig. 1-E). その後、病斑部分はさらに暗色化するとともに硬化したが (Fig. 1-F), 腐敗することはなかった. 梅雨期に入ると二次伝染が急速に進み、6 月下旬には果実発病率が 9 割近くに達する激発圃場も認められた. さらに、果実の肥大に伴って病斑は拡大・融合し、内部に亀裂が生じる場合もあった (Fig. 1-G). 重度に罹病した果実は生育不良となって落果した. 収穫までに約 3 割の果実が落果し、著しく減収した圃場もあった. また、病変が果実内部にまで進行し、殻皮に褐変を生じる事例も認められた (Fig. 1-H). ただし、8 月以降に新たな病斑が果実に形成されることは稀であり、主要な果実感染時期は 5～7 月頃と推察された. 以上の症状は、県内の主要品種である「清香」, 「豊笑」, 「要鈴」のいずれにおいても認められた. また、塩基性硫酸銅水和剤による本病の防除効果は高く、農薬散布を適切に実施すれば、上記の症状が軽減できることも確認されている. なお、VOC のみに特有の病徴 (Hajri *et al.*, 2010), すなわち、縦方向に伸びるかいよう病斑が主幹や主枝に形成され、そこから黒褐色の樹液が漏出して樹皮を汚す等の症状は、今のところ長野県の発生圃場では確認できていない.

病原細菌の分離と病原性の確認

2014 年 8 月と 2015 年 6～7 月に、長野県下の 5 市町村に所在する 6 つの発生圃場から罹病果実を採取し、細菌を分離した. さらに、接種試験によって病原性が確認できたものの中から 7 菌株 (MAFF 212146～212152) (Table 1) を選び、以後の試験に供試した.

これらの分離菌を「清香」にゴムプレス接種すると、いずれも接種葉に対して、陽性対照とした *X. arboricola* pv. *juglandis* と同様な病変を誘導することが確認できた. すなわち、接種 3～5 日後に接種部位が淡黄色となり、6 日目以降にはその領域に茶褐色の壊死斑点が多数形成された. 分離菌株間で発病程度に顕著な差は認められず、ほぼ同程度の病変が誘導された. 形成された病斑から再分離を試みたところ、接種菌と集落形態が類似した細菌がほぼ純粹に分離できた. さらに、T3E14F/T3E14R プライマーセット (Table 3 の C 欄) を用いてコロニー PCR を行ったところ、再分離菌から *xopX* 由来のシグナルが確認できた. 一方、*X. arboricola* pv. *pruni*, あるいは滅菌水を用いた陰性対照区では、病変は誘導されなかった.

MAFF 212146 と 212148 を果実に穿刺接種後、17 日後に穿刺部を縦断して観察したところ、穿刺部の周囲約 1～2 mm の範囲が褐変していることが確認できた. また、これら 2 菌株を樹上の果実へ噴霧接種したところ、原病徴が再現された. すなわち、接種後 10 日目までに水浸状の微細な

Fig. 1. Symptoms of walnut blight caused by WB strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Nagano Prefecture, Japan.

A. Young, infected catkins turned dark brown or black and distorted. B. Small, brown, angular spots formed on leaves at an early stage. C. Leaf spots coalesced to form necrotic areas at an advanced stage. D. Slight chlorosis sometimes appeared around leaf spots. E, F. Slightly depressed, water-soaked spots formed on immature fruits at an early stage (E), then later darkened and enlarged rapidly (F). G. Necrotic lesions on fruits turned gray-brown, and the epidermis over the lesions sometimes ruptured at an advanced stage. H. Brown discoloration occasionally occurred on shells.

斑点が果実表面に多数形成され、その後、時間の経過とともに水浸状部分が拡大した。15 日後にはその多くが長径 1~3 mm 程度の茶褐色~黒褐色の斑点となった。また、斑点密度が高い部分では互いに融合し、黒褐色で不整形の大きな壊死斑が形成された。

表現形質の検査

分離菌はいずれも 1 本の極鞭毛を有する桿菌であり、菌体 (MAFF 212146) の大きさは $1.4 \pm 0.8 \mu\text{m} \times 0.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (平均 $\pm$ 標準偏差, $n=15$) であった (Fig. 2-A)。標準寒天培地を用いた平板培養では、2 日目には孤立集落が肉眼で認められるようになり、3 日目には直径が 1 mm、6 日目には極大 (~3.5 mm) に達し、以後は集落の大きさにほとんど変化は認められなかった。孤立集落の形状は、黄色~淡黄色、不透明、円形、全縁、やや中高、平滑で湿光を帯びていた (Fig. 2-B)。菌密度の高い菌叢部分の色調は培養 6~7 日目頃から少しずつ薄くなり、透明度が上がり始めた。水溶性色素の産生は認められなかった。以上の分離菌の基本的な集落形態は、多くの対照菌株 (Table 2) と一致していた。ただし、一部の対照菌株からは、以下のような相違点も認められた。すなわち、*X. arboricola* pv. *pruni*, pv. *fragariae*, pv. *populi* は、培養後期になると淡褐色の水溶性色素を産生した。また、*X. arboricola* pv. *pruni* と pv. *zantedeschiae* は、他の供試菌株ほど黄色色素の産生が旺盛ではなく、集落の色調は乳白色~黄白色となった。

Fig. 2. Morphology of WB strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolated in Nagano Prefecture, Japan.
A. Electron micrograph of strain MAFF 212146 (Table 1) showing rod-shaped cell and one polar flagellum.
B. Colony color and morphology of strain MAFF 212146 on standard methods agar incubated at 27°C for 5 days.

Laboratory Guide (Schaad *et al.*, 2001) の手法を用いて表現形質を検査したところ、分離菌はいずれもグラム陰性、好気性であり、King B 培地における水溶性蛍光色素の産生とジャガイモ塊茎腐敗は陰性となった。(Table 1)。対照菌株のうち、*X. arboricola* pv. *juglandis*, pv. *corylina*, pv. *pruni*, pv. *guizotiae* もジャガイモ塊茎腐敗は陰性となったが、*X. arboricola* pv. *arracaciae*, pv. *celebensis*, pv. *fragariae*, pv. *zantedeschiae*, pv. *populi* では陽性となった (Table 2)。

API 20NE を用いて対照菌株の生理・生化学的性質を予備的に検査したところ、検査培地における生育が遅い、あるいは、弱い反応が遅れて現れる等の事例が多く認められた。さらに、検査培地への接種量のわずかな違いにより、陽性反応が現れるまでの日数に差が生じる場合のあることも確認できた。そこで本研究では、いずれの対照菌株でも安定した結果が観察できるようになる培養 5 日目に判定を行い、その結果をもとにプロファイル番号を算出することにした。この条件下では、分離菌 7 菌株から斉一な結果を得ることができた。すなわち、いずれの分離菌でも培養 5 日目までに、グルコース、D-マンノース、D-マンニトール、*N*-アセチル-D-グルコサミン、マルトース、dl-リンゴ酸およびクエン酸ナトリウムの利用、エスクリンの分解、ゼラチンの分解、β-ガラクトシダーゼが陽性となったが、L-アラビノース、グルコン酸カリウム、*n*-カプリン酸、アジピン酸および酢酸フェニルの利用、硝酸塩の還元、インドールの産生、グルコースの発酵、アルギニンジヒドロラーゼ、ウレアーゼ、オキシダーゼは陰性であった。以上の結果をもとに分離菌のプロファイル番号を算出すると、0476341 となった (Table 1)。

対照菌株では、D-マンニトールとマルトースの利用において菌株間で異なる結果が認められたため、プロファイル番号は以下の 3 パターンに分かれた (Table 2)。すなわち、*X. arboricola* pv. *juglandis*, pv. *corylina*, pv. *arracaciae*, pv. *celebensis* および pv. *fragariae* に関しては分離菌 (Table 1) と同じ 0476341、*X. arboricola* pv. *pruni* と pv. *guizotiae* は 0472141、*X. arboricola* pv. *zantedeschiae* と pv. *populi* は 0472341 となった。

PCR 検定

Xanthomonas 属細菌に特異的なプライマー (Table 3 の A 欄) を用いて PCR を行ったところ、すべての分離菌から明瞭なシグナルが得られた (Table 1 の A 欄)。また、*qumA* を標的 (Table 3 の B 欄) とした場合も、*X. arboricola* に特異的な増幅がいずれの分離菌からも確認できた (Table 1 の B 欄)。さらに、*xopX* を標的 (Table 3 の C 欄) とした場合も、すべての分離菌から該当する増幅産物が得られた (Table 1 の C 欄)。一方、*xopG*, *xopAF*, *xopE3*, *avrBs3* (Table 3 の D~G 欄) に関しては、いずれの分離菌からも PCR シグナ

ルが認められなかった (Table 1 の D~G 欄). また, 分離菌から *xopAH* 由来のシグナルは得られたものの, *xopB* の増幅は確認できなかった (Table 1 の H, I 欄). 以上の結果は, *X. arboricola* pv. *juglandis* の WB 系統と一致していた.

MLSA 解析

本研究で決定した配列データ (7 遺伝子×7 OTU) (DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベースに accession No. LC114277-LC114290 および LC114308-LC114342 として登録した) を, 遺伝子ごとに, Essakhi *et al.* (2015) の配列データ (7 遺伝子×101 OTU)に加えてアラインメントを行った. その上で, これら 7 遺伝子の配列データを連結し, 得られたデータセット (108 OTU, 4620 bp) からギャップや不明確な塩基の含まれる座位を除去した後, 残った 4615 bp のデータセットを対象としてモデル選択を行った. その結果, 「田村-根井のモデル (TN93) +G+I」(Tamura and Nei, 1993) が最適モデルとして選ばれた.

そこで, TN93+G+I モデルのもとで ML 解析を行うとともに, 比較のために NJ および MP 解析も実施した. その結果, 得られた 3 つの系統樹のトポロジーはほぼ一致していた. また, これらの基本的なトポロジーは, Essakhi *et al.* (2015) の系統樹とも同じであった. 特に, 病原型単位のまとまりについては, Essakhi *et al.* (2015) の結果と完全に一致していた. すなわち, *X. arboricola* pv. *pruni*, pv. *corylina*, pv. *juglandis*, pv. *populi* に関しては, それぞれが病原型ごとに単系統群を形成して独立したのに対し, *X. arboricola* pv. *celebensis* と pv. *fragariae* は多系統となった (Fig. 3). 以上の結果は, 本研究で構築した系統樹は信頼性が高く, 病原型レベルの所属の判定を行う上で有効な基準になることを示している. そこで, ここでは MLSA 解析の代表として ML 系統樹のみを示すことにした (Fig. 3). なお, この系統樹の右側には, 各クラスター・菌株がどの病原型に相当するのかが表示してある. 一方, そのような病原型名の表示のない場合は, その菌株が「クルミから分離された非病原性 *X. arboricola* (Essakhi *et al.*, 2015)」であることを示している.

解析に供した分離菌 7 菌株 (Fig. 3 において★を付した) は, この系統樹において, *X. arboricola* pv. *juglandis* の単系統群に含まれることが明らかとなった. また, 分離菌 7 菌株の間に変異は認められず, 7 遺伝子の配列が完全に一致していた. 対照配列の中では, CFBP 7244 と CFBP 2632 (いずれも WB 系統) の配列が分離菌と同一であった. 一方, VOC 系統 (●を付した) は, *X. arboricola* pv. *juglandis* の単系統群内で密に集合したが, その位置づけは分離菌とは離れていた.

考 察

病原細菌の同定と病名の提案

供試した分離菌 7 菌株 (Table 1) はコッホの原則を満たすことから, 本症状の病原であることが確認できた. また, 長野県の発生圃場で観察されている病徴 (Fig. 1)・発生状況, 接種試験の際に確認できた発病経過・再現された病徴, 分離菌の集落形態 (Fig. 2B) は, いずれも諸外国における WB や VOC の記載 (Hajri *et al.*, 2010; Lindow, 2002) と一致している. そこで本研究では, WB 系統や VOC 系統の特徴とされている表現型・遺伝型を中心に, 分離菌の性状を検査した. そして, *X. arboricola* に属する 9 つの病原型 (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015) の基準株, および, *X. arboricola* pv. *juglandis* の VOC 系統の代表菌株 (Table 2) との直接比較を行うとともに, 文献上の記載 (Cesbron *et al.*, 2015; Essakhi *et al.*, 2015; Fischer-Le Saux *et al.*, 2015; Hajri *et al.*, 2010, 2012; Lindow, 2002; Maes *et al.*, 1993; Pothier *et al.*, 2011; 澤田ら, 2011a, 2011b; Schaad *et al.*, 2001) も参照しながら分離菌の同定を試みた.

その結果, 分離菌の菌体や集落の形態 (Fig. 2-A, B), 基本的な生理・生化学的性質 (Table 1), 同定用プライマーセットによる PCR 検定 (Table 1 の A, B 欄), および MLSA 系統樹における分離菌の位置づけ (Fig. 3) から, これらの分離菌が *Xanthomonas arboricola* Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995 に属することが明らかとなった.

そこで, 次の段階として, 分離菌の病原型レベルの所属について検討を行った. まず, *X. arboricola* の 9 つの既知病原型のうち, クルミにおける自然発病の記載があるのは, 今のところ *X. arboricola* pv. *juglandis* のみであるとされている (Essakhi *et al.*, 2015; Fischer-Le Saux *et al.*, 2015). また, ジャガイモ塊茎腐敗や API 20NE の検査結果 (Table 1), PCR 検定によって明らかになった T3E 遺伝子構成 (Table 1 の C~G 欄), MLSA 系統樹における位置づけ (Fig. 3) のいずれに関しても, 分離菌と *X. arboricola* pv. *juglandis* の結果は一致していた. 以上のことは, 分離菌が *X. arboricola* pv. *juglandis* の枠組みに含まれることを示している.

同定の最後の段階として, 分離菌が *X. arboricola* pv. *juglandis* 内に存在する 2 つの系統 (WB 系統と VOC 系統) のいずれに相当するののかについて検討を試みた. まず, VOC のみに特有の病徴 (Hajri *et al.*, 2010) は, 長野県の発生圃場では確認できていないという事実がある (横澤ら, 2016; 横澤ら, 未発表). なお, VOC 系統は遺伝的にも特異なグループであることが, 比較ゲノム解析やさまざまな多型解析によって明らかにされている (Cesbron *et al.*, 2015; Essakhi *et*

Fig. 3. Maximum-likelihood (ML) tree based on concatenated sequences of seven housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *efh*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* and *rpoD*), showing the relationships among strains of the walnut blight pathogen isolated in Nagano Prefecture, Japan (indicated by ★) (Table 1) and 100 reference strains belonging to *X. arboricola* (Essakhi *et al.*, 2015). *X. campestris* pv. *campestris* CFBP 5241 was used as an outgroup. VOC (vertical oozing canker) strains of *X. arboricola* pv. *juglandis* are indicated by ●. The data sets used here were the same as those used by Essakhi *et al.* (2015), except for 49 sequences determined in the present study (DDBJ accession numbers LC114277–LC114290 and LC114308–LC114342). Neighbor-joining and maximum-parsimony trees obtained in the present study showed almost the same topologies as the ML tree. Numbers at nodes are bootstrap values ($\geq 60\%$) from 1000 repetitions. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

al., 2015; Hajri et al., 2010, 2012). 本研究における MLSA 系統樹でも, *X. arboricola* pv. *juglandis* のクラスターの中で, VOC 系統は密に集合することが確認できた (Fig. 3 の●). それに対して分離菌 (Fig. 3 の★) は, VOC 系統からやや離れた位置で, 他の WB 系統とともにクラスターを形成した. また, 分離菌の T3E 遺伝子構成 (Table 1 の H, I 欄) も, WB 系統 (Table 2 の H, I 欄) (Cesbron et al., 2015; Essakhi et al., 2015; Hajri et al., 2012) と一致していた. 以上の結果に基づき, 本研究の分離菌 (Table 1) を, *X. arboricola* pv. *juglandis* の WB 系統と同定することができた. なお, これまでに日本国内で *X. arboricola* pv. *juglandis* が確認された報告はなく (日本植物病理学会, 2015), 本研究が初めての検出事例となる.

ところで, 我々は, *X. arboricola* 関連細菌が本病に関与している可能性が見出された時点で, 暫定的に, 本病を「*X. arboricola* による新病害 (病名: クルミ黒斑細菌病)」として提案している (横澤ら, 2016). そして, その後もさらに検討を続けた結果, 上記のように, *X. arboricola* pv. *juglandis* の WB 系統が本病の病原であることが証明できたという経緯がある (澤田ら, 2016). 一方, 病名目録には, 諸外国における発生事例の紹介という形で, *X. arboricola* pv. *juglandis* によるクルミの病害が, 「病名: 細菌病, 病名異名: 褐色腐敗病・腐爛病」として既に記載されている (日本植物病理学会, 2015). このうち, 「細菌病」(村田, 1915, 1916) は漠然とした表現であり, 病名としては不適切である. また, 病名異名とされている「褐色腐敗病」(石山・向, 1941) や「腐爛病」(村田, 1916) についても, 本病の病徴が的確に表現できているとは言い難い. すなわち, 本病によってクルミの植物組織が腐敗するという事例は, これまでのところ, 長野県の発生圃場では全く確認できていない (横澤ら, 2016; 横澤ら, 未発表). 以上のことから, *X. arboricola* pv. *juglandis* が病原であることが判明した本病に対して, 実態に即した「クルミ黒斑細菌病 (英名: walnut blight)」を病名として適用することを改めて提案したい.

今後の課題

X. arboricola pv. *juglandis* は, 本研究で実施したような MLSA 解析では 1 つの単系統群としてまとまるものの (Fig. 3), 解析の指標である個々の遺伝子の配列には多型が認められている (Essakhi et al., 2015; Fischer-Le Saux et al., 2015). その中でも特に WB 系統からは, 遺伝的な変異が比較的多く見出されることが指摘されている (Essakhi et al., 2015; Hajri et al., 2010). ところで, 本研究で供試した分離菌 7 菌株 (Table 1) は, 長野県の北信, 東信, 南信地区に分散して存在する 6 つの発生圃場に由来している. しかし, 地理

的に多様な来歴を有しているにも関わらず, WB 系統に属するこれらの分離菌からは配列の変異がまったく検出できなかった (Fig. 3). このことは, 長野県内には, 遺伝的に均一性の高い WB 系統が分布している可能性を示唆している. 以上のことから, WB 系統の中のある 1 つの菌系が, 長野県内の各地へと分布を拡大するような経緯があったために, 現在の発生状況がもたらされたのではないかと推測することができる.

なお, 今回の MLSA 解析によって, CFBP 7244 と CFBP 2632 の配列が, 分離菌の配列と完全に一致していることが判明した (Fig. 3). このうち, CFBP 7244 は 1978 年にフランスで分離された WB 系統, CFBP 2632 は 1984 年にスペインで分離された WB 系統である. ただし, 今回の MLSA 解析に供した *X. arboricola* pv. *juglandis* の対照配列 (Essakhi et al., 2015) は, 大部分がヨーロッパの分離菌株に由来しており, それ以外の来歴を有しているのはニュージーランド産の 1 菌株のみである. また, 供試した分離菌 (Table 1) に関しても, 分離源の採集地は長野県内の各地に分散しているものの, 菌株数は決して多くはない. したがって, 今回の解析結果のみを根拠として, 長野県における分布拡大の経緯を具体的に推測することは避けるべきであると判断した. この問題を明らかにするには, 来歴の異なる多数の菌株・データをさらに収集して多角的な解析を行うとともに, 県内における発生調査, 疫学・生態学的研究, 関連する農業資材の来歴・流通経路の調査等も併行して実施する必要がある.

上記のような大規模な調査・解析を効率よく進めるためにも, また, 更なる病気の拡大を防ぐためにも, 本病に関連した精度の高い診断・検出技術を開発することがきわめて重要となる. 本研究によって, *X. arboricola* pv. *juglandis* に特徴的な表現型・遺伝型を整理することができた (Table 1~3, Fig. 2, 3). これらの情報や, これまでに報告されてきた多くの研究成果 (Cesbron et al., 2015; Essakhi et al., 2015; Fischer-Le Saux et al., 2015; Hajri et al., 2012 など) を利用することによって, 今後, 診断・検出のための技術開発に取り組むたいと考えている.

摘 要

長野県内に所在するクルミ (*Juglans regia*) の産地では, 2014 年以降, 葉や花穂, 果実などに黒褐色の斑点症状を生じる病害が多発し, 問題となっている. その罹病果実からは, やや中高で湿気を帯びた黄色集落を形成する細菌が分離された. 分離菌をクルミに接種すると原病徴が再現され, そこからは接種菌が再分離できた. 本菌はグラム陰性, 好気

性で 1 本の極鞭毛を有する桿菌であり、その主要な表現形質、16S rRNA 遺伝子や *qumA* を標的とした PCR 検定、および 7 つの必須遺伝子 (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* および *rpoD*) を用いた multilocus sequence analysis (MLSA) の結果に基づき、*Xanthomonas arboricola* Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995 と同定できた。また、API 20NE による表現形質の検査、PCR に基づくタイプ III エフェクター (T3E) の遺伝子構成の解析、MLSA 解析、および接種試験の結果を精査すると、本菌は *X. arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*) に相当することが明らかとなった。なお、*Xaj* には 2 つの系統 [walnut blight (WB) 系統と vertical oozing canker (VOC) 系統] が存在するが、長野県の発生状況は前者の場合と一致していた。また、T3E 遺伝子構成に関しても、本菌から WB 系統に特異的な *xopAH* は PCR 検出できるのに対し、VOC 系統特異的な *xopB* の増幅は認められなかった。さらに、MLSA 系統樹においても、本菌は WB 系統とクラスターを組むことが確認できた。以上より、本菌は *Xaj* の WB 系統に相当すると判断した。*Xaj* によって引き起こされる walnut blight が日本国内で見出されたのは本研究が初めてであることから、本病の病名として、その発生状況や病徴の実態に即した「クルミ黒斑細菌病」を適用することを提案したい。なお、WB 系統は遺伝的に多様であるとされているが、本研究に供試した分離菌は均一性が高いことが確認できた。このことは、WB 系統の中のある 1 つの菌系が、長野県内の各地へと分布を拡大するような経緯があったために、現在のような発生状況がもたらされた可能性を示している。

謝 辞

本研究を行うにあたり、瀧川雄一教授 (静岡大学)、富岡啓介氏 (農業・食品産業技術総合研究機構 西日本農業研究センター) には有益なご助言を賜った。川合康充氏、森田信一郎氏 (長野県上小農業改良普及センター)、小笠原理世氏 (長野県佐久地方事務所農政課) には、調査に際してご協力頂いた。また、青柳千佳氏、中島比呂美氏 (農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター)、峯村和哉氏、穂坂美幸氏 (長野県果樹試験場) にはご支援・ご協力を賜った。ここに記して深く感謝の意を表する。

引用文献

Cesbron, S., Briand, M., Essakhi, S., Gironde, S., Boureau, T., Manceau, C., Fischer-Le Saux, M. and Jacques, M.A. (2015). Comparative genomics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* unveil molecular and evolutionary events linked to pathoadaptation. *Front Plant Sci.* 6: 1126.
Essakhi, S., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Jacques,

M.A. and Manceau, C. (2015). Phylogenetic and variable-number tandem-repeat analyses identify nonpathogenic *Xanthomonas arboricola* lineages lacking the canonical type III secretion system. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 5395–5410.
Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Essakhi, S., Manceau, C. and Jacques, M.A. (2015). Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 4651–4668.
Hajri, A., Meyer, D., Delort, F., Guillaumes, J., Brin, C. and Manceau, C. (2010). Identification of a genetic lineage within *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* as the causal agent of vertical oozing canker of Persian (English) walnut in France. *Plant Pathol.* 59: 1014–1022.
Hajri, A., Pothier, J.F., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Poussier, S., Boureau, T., Duffy, B. and Manceau, C. (2012). Type three effector gene distribution and sequence analysis provide new insights into the pathogenicity of plant-pathogenic *Xanthomonas arboricola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 371–384.
石山信一・向 秀夫 (1941). *Bacterium juglandis*. 植物病原細菌誌. pp. 315–318, 明文堂, 東京.
Lindow, S.E. (2002). Walnut Blight. In *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones* (Teviotdale, B.L., Michailides, T.J. and Pscheidt, J.W., eds.). pp. 81–82, APS Press, St. Paul, Minnesota.
Maes, M. (1993). Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 161–166.
村田壽太郎 (1915). 北米オレゴン州に於ける果樹の病害 (其の二). 病蟲害雑誌 2: 352–354.
村田壽太郎 (1916). 胡桃細菌病. 病蟲害雑誌 3: 24–28.
日本植物病理学会 (2015). 日本植物病名目録 (2015 年版). 日本植物病理学会, 東京.
農林水産省 (2015). 平成 25 年主要品目別生産動向 (更新 2015 年 1 月 29 日). 特用林産物生産統計調査, <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001129283>. 農林水産省, 東京 (参照 2016 年 1 月 18 日).
Pothier, J.F., Pagani, M.C., Pelludat, C., Ritchie, D.F. and Duffy, B. (2011). A duplex-PCR method for species- and pathovar-level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *J. Microbiol. Methods* 86: 16–24.
澤田宏之・功刀幸博・綿打享子・工藤 晟・佐藤豊三 (2011a). *Xanthomonas arboricola* によるブドウ斑点細菌病 (新称). 日植病報 77: 7–22.
澤田宏之・綿打享子・功刀幸博 (2011b). ブドウ斑点細菌病菌 (*Xanthomonas arboricola*) と核果類せん孔細菌病菌 (*X. arboricola* pv. *pruni*) の多相的な比較. 日植病報 77: 265–277.
澤田宏之 (2013). 細菌の保存. 土壤微生物実験法第 3 版 (日本土壤微生物学会編). pp. 27–30, 養賢堂, 東京.
澤田宏之・畔上耕児 (2014). ククモピン型 Ri プラスミドを保持した *Rhizobium radiobacter* によるトマト毛根病 (新称). 日植病報 80: 98–114.
澤田宏之・清水伸一・三好孝典・篠崎 毅・楠元智子・野口真弓・成富毅誌・菊原賢次・間佐古将則・藤川貴史・中畝良二 (2015). わが国で分離された *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 の特徴. 日植病報 81: 111–126.
澤田宏之・横澤志織・上松 寛・西口 徹 (2016). クルミ黒

- 斑細菌病の原因菌 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* WB 系統の特徴. 平成 28 年度日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集 p. 151. (講要)
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- 高梨和雄 (1995). 作物病原菌研究技法の基礎 (大畑貫一ほか編). pp. 242–243, 日本植物防疫協会, 東京.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512–526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472–489.
- 横澤志織・上松 寛・西口 徹・近藤賢一 (2016). *Xanthomonas arboricola* によるクルミ黒斑細菌病の国内での発生. 日植病報 82: 29. (講要)