レモンから分離したカンキツかいよう病菌の 炭水化物利用能による系統識別および圃場内空間分布

富村 健太[†]
(農研機構・果樹茶業研究部門)

Differentiation of strains by the utilization of some carbohydrates and spatial distribution of citrus bacterial canker collected from a grove of lemon trees. Kenta Tomimura[†] (NARO Institute of Fruit Tree and Tea Science, National Agricultural Research Organization, Okitsu, Shimizu, Shizuoka 424-0292, Japan)

Spatial pattern of citrus canker was examined in a lemon grove. Twenty-nine isolates of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* were collected from the symptomatic leaves of lemon trees. All the citrus canker isolates caused corky lesion of citrus canker by pin-prick inoculation on navel orange leaves, confirming their pathogenicity. There was a correlation between the ability of mannitol utilization and the lesion area on navel orange. The physiological properties of bacteria demonstrated that all the isolates were classified into seven strains based on the utilization of carbohydrates (mannitol, mannose, maltose, lactose and malonate). Strain 1 was the most prevalent type of strain among all the isolates and utilized all five kinds of carbohydrates, generating an aggregated distribution in a lemon grove. These results suggest that in the life cycle of citrus canker, young stem lesions of strain 1 from angular shoots would be potentially the dominant source for secondary infection.

Keywords : epidemiology, physiological properties, pin-prick inoculation, secondary infection, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

緒 言

カンキツかいよう病は、葉、緑枝および果実に中心部がコルク化した円形の病斑を形成し、とりわけ果実に発生するとその商品価値を下げる細菌病である。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ことから、カンキツの最重要病害の1つに挙げられる。本病は伝染力が強く、台風等の強風を伴う雨にさらされると普段は発生がほとんど認められていないカンキツ園でもしばしば激発することがある。

カンキツかいよう病に対する抵抗性はカンキツ品種間で大きな差があり、日本における主要カンキツ栽培種であるウンシュウミカンと比較的強いが、グレープフルーツやオレンジでは弱く、逆にポンカンやユズでは強い抵抗性を持っている (Koizumi and Kuhara,

1982)。このため、ウンシュウミカンは発病に好適な気象条件にある日本において経済的被害を受けることはほとんどなかった。しかしながら、ウンシュウミカンの需要減少と価格低下に対応するため中晩生の新品種への更新が進められているが、それら更新カンキツ品種の中には抵抗性の低い品種も含まれていることから本病抵抗性カンキツ品種の開発が望まれている。

カンキツかいよう病の第1次伝染源は夏秋梢に発生した病斑に由来することが知られている (Peitier and Neal, 1918)。さらに芹沢ら (1969) は、本病に感染したカンキツ葉の病斑が濡れている条件では、病斑から本病原細菌が溢出し、強風によって飛散することを室内実験で確認している。これらの結果は、降雨や雨粒の跳ね返りに加え強風を伴うことで本病がカンキツ園内で2次伝染し感染拡大することを示唆している。

感染植物個体の分布様式を明らかにすることは、圃場への病原体の移入や圃場内での感染拡大といった病害蔓延に至る過程を把握することにつながる。即ち、

[†] tomimura@affrc.go.jp

病原体の生態学的知見に基づいた病害防除法の開発に貢献するものと考えられる。

そこで本研究では、カンキツかいよう病菌のレモン園場内での分布動態を明らかにすることを目的に、レモンから分離したかいよう病菌の炭水化物利用能を調査し、本分離株を採集した地点に系統をプロットした。得られた本病原細菌の空間的な分布様式から、2次伝染の寄与度について考察した。

本文に先立ち、本研究の遂行に際し懇切なる御指導と御助言を頂いた塩谷浩博士（農研機構果樹茶業研究部門）、レモン園場でカンキツかいよう罹病葉のサンプリングに御尽力頂いた久保田裕貴氏、ならびにカンキツかいよう病菌の分離、単針付傷接種および炭水化物利用能の調査に御協力頂いた天野彩、川嶋美恵両氏に心より御礼申し上げる。

材料および方法

1. 調査園場の概要およびサンプリング方法

2017年5月上旬に和歌山県日高郡由良町のレモン園場よりカンキツかいよう罹病葉をサンプリングした。本レモン園場の面積は13 aで、品種「ユーレカ」が計62樹植栽されていた。第1図に示すように、まずレモン園場の東側からA, B, Cの順にA列からI列まで設定した。また、各列の番号は、北から番号順に付けた。サンプリング方法は、A, C, E, GおよびI列は奇数番号のレモン樹、B, D, FおよびH列は偶数番号のレモン樹より4～5枚の罹病葉を採集した。このようにレモン園場からまんべんなくカンキツかいよう病菌を分離できるようにサンプリングを行った。

2. カンキツかいよう病菌の分離

カンキツかいよう病菌の分離手順は以下の通りである。サンプリングした葉より病斑部分を切り取り、その病斑を1 mlの0.85% NaCl（生理食塩水）で磨砕し、その磨砕液を改変XCSM培地（Graham and Gottwald, 1990；尾崎・塩谷, 1999）に画線塗布した。

改変XCSM培地は、尾崎・塩谷（1999）が報告した抗生物質を除いた培地組成 [KH_2PO_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, ペプトン 2 g, デンプン 10 g, 寒天15 g, 蒸留水1,000 ml, pH 6.8] で調整、オートクレーブ後にGraham and Gottwald (1990) が報告した抗生物質（カスガマイシン16 mg/L, セファレキシン16 mg/L およびクロロタロニル12 mg/L）およびメチルグリーン（12 mg/L）を無菌的に添

加して作製した。画線塗布した改変XCSM培地は28℃のインキュベーターで培養した。約5日後に出現したカンキツかいよう病菌の青緑～緑色コロニーを新しい改変XCSM培地に再度画線し28℃のインキュベーターで培養を行った。これらの作業を経て出現したコロニーを各細菌分離株とし、スキムミルク培地（1% L-グルタミン酸ナトリウム, 10%スキムミルク）に懸濁後-80℃にて保存した。

3. 分離したカンキツかいよう病菌の病原性調査

本研究で分離したカンキツかいよう病菌がカンキツ類に対し病原性を有するかどうかを確認するために、単針付傷接種試験を行った。供試植物は、カラタチ台ネーブルオレンジ（品種：森田ネーブル）鉢植え苗を使用し、その接種葉は展葉を完了して硬化直後の着生葉を使用した。予め各供試菌株をYP斜面培地で28℃、2日間培養後、 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlに調製したカンキツかいよう病菌懸濁液約3 μl をネーブルオレンジ葉の葉裏の葉脈を避けた部位に菌株あたり主脈の左右2箇所滴下した。カンキツかいよう病菌懸濁液を滴下した部分について、昆虫針（No. 5, 志賀昆虫普及社）で液滴を貫通させ、葉裏を針先で穿刺した。単針付傷接種後の葉裏に残った細菌懸濁液滴は拭き取り、ネーブルオレンジ鉢植え苗を昼27℃-夜23℃に設定した温室内で42日間育成するとともに、単針付傷接種した各カンキツかいよう病菌の病斑形成を経過観察した。

4. 炭水化物利用能の調査

カンキツかいよう病菌の炭水化物利用能の調査には、5種類の炭水化物（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）を供試した（塩谷, 2010）。Ayres培地 [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g 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, pH 6.8] を基本培地として、上記炭水化物をそれぞれ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℃-10分）後に斜面培地とした（Goto et al., 1980）。これら5種の斜面培地にYP培地で前培養した供試細菌分離株を移植し、28℃で2週間培養した。培養開始から2週間後、培地色が黄変した場合にその培地に含まれる炭水化物が利用されたと判定した。

5. 病斑面積の計測および統計解析

単針付傷接種により形成したカンキツかいよう病菌

の病斑面積を測定するために、接種後42日目にネーブルオレンジ接種葉を回収した。回収した接種葉をフラットベッドスキャナー（EPSON GT-S650, エプソン販売株式会社）でスキャンして画像データを取得した。画像データより Assess 2.0 (The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA) を用いて病斑面積の計測を行った。本研究で供試したカンキツかいよう病菌のネーブルオレンジにおける病斑面積について、それぞれマンニトールを利用できる17分離株と利用できない12分離株の平均値を算出した。算出した平均値は、JMP version 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて student の *t* 検定により統計解析した。

結 果

1. 分離したカンキツかいよう病菌のネーブルオレンジに対する病原性とマンニトール利用能との関連性

本研究で分離したカンキツかいよう病菌29菌株について単針付傷接種試験を行った結果、全ての分離菌株でネーブルオレンジ葉に穿孔した中心部がコルク化した円形の病斑が観察された。このことから、分離したカンキツかいよう病菌がネーブルオレンジに対する病原性を有することを確認した（データ略）。後述するマンニトール利用能に着目し、供試菌株についてマンニトールを利用できる17分離株（系統1, 5および9）と利用できない12分離株（系統7, 8, 10および11）の2群に分けて病斑面積の平均値を算出した。その結果、前者の病斑面積が 2.88 mm^2 であるのに対し、後者は 4.29 mm^2 であった。さらに病斑面積とマンニトール利用能との関連性について student の *t* 検定を行った結果、両者に1%水準で有意差が認められた。即ち、ネーブルオレンジに形成した病斑面積は、マンニトールを利用できない分離株の方が利用できる分離株より大きいことを明らかにした。

2. 炭水化物利用能に基づくカンキツかいよう病菌の系統

本研究で供試した29分離株について炭水化物利用能を調査した結果、7つの系統に識別できた（Table 1）。塩谷（2010）が先に報告した8つの系統のうち、本研究で調査した29分離株においては系統1, 5, 7および8の4つの系統が観察された。本研究で新たに判明した3つの系統については、塩谷（2010）が先に報告した系統に続き系統9, 10および11とした。最も優占した系統は系統1（11分離株）で、本研究で調査した

全ての炭水化物を利用できる細菌分離株であった（Table 1）。次いで多い系統は、系統1と大きく異なる全ての炭水化物を利用できない系統8、マンノースおよびラクトースを利用できる系統10であり、それぞれ5分離株が属した（Table 1）。

3. カンキツかいよう病菌の圃場内分布

上述の炭水化物利用能の結果を踏まえ、各供試細菌分離株について分離したレモン圃場にプロットした。その結果は Fig. 1に示すとおり、最も優占した系統1が最も大きなパッチ状の集中した分布を示し、レモン圃場内に2つのパッチが観察された。さらに系統1以外にも、系統5および10の細菌分離株で構成される小さなパッチが観察された（Fig. 1）。

考 察

本研究では、レモン圃場から分離したカンキツかいよう病菌についてネーブルオレンジに対する病原性および炭水化物利用能を調査するとともに、炭水化物利用能の調査により明らかになった系統について分離したレモン圃場にプロットすることを試みた。その結果、レモン圃場から分離したカンキツかいよう病菌は全てネーブルオレンジに対する病原性を有しており、マンニトール利用能の違いとネーブルオレンジにおける病斑面積の間に相関があることを明らかにした。さらに、これら細菌分離株の一部はレモン圃場内にパッチ状に集中した分布を示すことが明らかとなった。

カンキツかいよう病菌は、炭水化物利用能の調査により8つの系統に識別でき、とりわけ系統1と2で全体の約8割を占めることが明らかになっている（塩谷, 2010）。本研究では7つの系統に識別できることを明らかにしたが、本研究で観察された7つの系統全てが、塩谷（2010）が報告した8つの系統に含まれなかった。少なくとも日本国内においては、塩谷（2010）が報告した8つの系統に加え、本研究で明らかとなった3つの系統を合わせた11の系統が存在するようである。本研究と塩谷（2010）の結果が異なった理由として、カンキツかいよう病菌の分離を試みたカンキツ品種の違いが考えられる。本研究ではレモンからカンキツかいよう病菌を分離したが、塩谷（2010）が調査した菌株は日本各地で栽培されているカンキツ品種から分離されたものであることから、分離したカンキツ品種だけでなく、地理的な違いを反映しているかもしれない。

ブクタン類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）と通常の病原力を示

Table 1. Comparison of the ability to utilize carbohydrates as a sole source of carbon among *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates isolated in this study

Isolates	Carbohydrate ^{a)}					Strain ^{b)}
	Mannitol	Mannose	Maltose	Lactose	Malonate	
2017YR-A-3	+	+	+	+	+	1
2017YR-A-5	—	—	—	—	—	8
2017YR-A-7	—	+	—	+	—	10
2017YR-B-2	+	+	+	+	+	1
2017YR-B-4	+	+	+	+	+	1
2017YR-B-6	+	+	—	+	+	9
2017YR-C-1	+	+	+	+	+	1
2017YR-C-3	+	+	+	+	+	1
2017YR-C-5	+	+	+	+	+	1
2017YR-C-7	—	—	—	—	—	8
2017YR-C-9	+	+	—	+	—	5
2017YR-D-2	+	+	—	+	—	5
2017YR-D-4	+	+	+	+	+	1
2017YR-D-6	—	+	—	+	—	10
2017YR-E-1	—	—	—	—	—	8
2017YR-E-3	—	+	—	+	—	10
2017YR-E-5	—	+	—	+	—	10
2017YR-E-7	+	+	—	+	—	5
2017YR-F-2	—	—	—	+	—	11
2017YR-F-4	+	+	+	+	+	1
2017YR-F-6	—	—	—	—	—	8
2017YR-G-1	+	+	+	+	+	1
2017YR-G-3	+	+	+	+	+	1
2017YR-G-5	+	+	+	+	+	1
2017YR-H-2	—	+	—	+	—	10
2017YR-H-4	—	—	—	—	—	8
2017YR-H-6	+	+	—	+	+	9
2017YR-I-1	—	+	—	—	—	7
2017YR-I-3	+	+	—	+	—	5

a) The results on the utilization of carbohydrates are shown as capable (+) or not (—).

b) Strains 1 to 8 were designated by Shiotani (2010), and subsequent strains (9 to 11) were designated in this study.

Fig.1. Schematic representation of a lemon grove analyzed in this study. Lemon trees which were not analyzed are shown as dotted-line circles. Clusters comprised of the same strain are enclosed with thick lines.

す系統（標準病原力系統）の2系統が確認されている（Shiotani et al., 2000）。本研究では、分離したカンキツかいよう病菌が病原性を有しているかどうかを確認するために、ネーブルオレンジ葉に単針付傷接種試験を行うとともに、形成した病斑面積の計測を行った。その結果、マンニトール利用能の違いとネーブルオレンジにおける病斑面積の間に相関があることを明らかにした。即ち、ネーブルオレンジに形成した病斑面積は、マンニトールを利用できない分離株の方が利用できる分離株より大きいことを明らかとした。また今回調査した炭水化物のうち、マンニトール利用能とカンキツかいよう病特異的ファージCp1には相関があり、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抵抗性の菌株は利用できないことが知られている（後藤, 1962; 塩谷, 2010）。さらに、Cp1ファージ感受性とブント類に対する病原力の間には、Cp1に感受性の菌株は弱病原力系統、逆にCp1抵抗性の菌株は標準病原力系統の相関を示す傾向が観察されている（Shiotani et al., 2000）。本研究の結果は、カンキツかいよう病菌の宿主に対する系統分化が、ブント類のみではなくネーブルオレンジ類においても見いだされる可能性を示唆している。マンニトール利用能、かいよう病特異的ファージCp1およびネーブルオレンジに対する病原力の3者にどのような関連性があるのかについて今後検討する必要がある。

炭水化物利用能の違いはカンキツかいよう病菌分離株を識別できることを意味しており、本菌の生態学的な見地から研究を進めていく上で1つのツールとして

利用できると思われた。さらに本研究では、炭水化物利用能の調査により明らかになった系統について、分離したレモン圃場内にプロットし空間的な分布について考察を試みた。カンキツかいよう病の第1次伝染源として、前年の夏秋梢に発生したカンキツかいよう病菌に由来することが知られている（Peitier and Neal, 1918）。即ち、前年の夏秋梢に形成したカンキツかいよう病斑にはカンキツかいよう病菌が生存し、越冬することを意味する。本研究では2017年5月上旬にカンキツかいよう病菌を分離し、レモン圃場における本菌の圃場内分布を調査した結果、系統1、5および10の3系統がパッチ状の集中した分布を示した。これら系統の中でも系統1が最も大きなパッチ状の集中した分布を示し、レモン圃場内に2つのパッチが観察された（Fig. 1）。この結果は越冬したカンキツかいよう病菌が気温の上昇とともに活動を開始し、圃場内で本菌の二次伝染が拡大し始めていることを示唆している。つまり、罹病した夏秋梢を除去する等の栽培管理が本病の耕種的防除に重要であることを示唆する結果である。

本研究では、カンキツかいよう病菌のレモン圃場における空間的な分布について調査したが、さらに空間的な分布と同様に、時間的な分布についても今後検討する必要がある。時間的な分布を明らかにすることで、例えば病原菌の蔓延速度を把握することが可能になり、より具体的な耕種的防除の策定に貢献するものと思われる。

引用文献

- 後藤正夫（1962）カンキツ潰瘍病に関する研究Ⅰ．静大農研報 12：3-72.
- Goto, M., T. Takahashi and M. A. Messina (1980) A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and canker B in Argentina. Ann. Phytopath. Soc. J. 46：329-338.
- Graham, J. H. and T. R. Gottwald (1990) Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. Phytopathology 80：190-196.
- Koizumi, M. and S. Kuhara (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.
- 尾崎克巳・塩谷 浩（1999）カンキツかいよう病細菌の分離選抜培地．日植病報 65：362.（講要）

- Peltier, G. L. and D. C. Neal (1918) Overwintering of the citrus-canker organism in the bark tissue of hardy citrus hybrid. J. Agric. Res. 14 : 523-524.
- 芹沢拙夫・井上一男・後藤正夫 (1969) カンキツかいよう病に関する研究 (第1報). *Xanthomonas citri* (Hase) Dowson の伝染距離. 静岡柑試研報 8 : 81-85.
- 塩谷 浩 (2010) カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 微生物遺伝資源利用マニュアル29.
- Shiotani, H., K. Ozaki and S. Tsuyumu (2000) Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of Pummelo (*Citrus grandis*). Phytopathology 90 : 1383-1389.
- (2018年4月30日受領, 7月10日受理)