

カンキツグリーニング病菌調査に利用する 2種のリアルタイムPCR法の比較

松浦貴之・藤原裕治・齊藤範彦・吉岡潤治¹⁾・秀島和幸²⁾

横浜植物防疫所調査研究部

Comparison of Two Real-Time PCR Methods for Survey of Citrus Greening Disease (Huanglongbing). Takayuki Matsuura, Yuji Fujiwara, Norihiko Saito, Junji Yoshioka¹⁾, and Kazuyuki Hidemitsu²⁾ (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10 Shin-yamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan. ¹⁾Moji Plant Protection Station and ²⁾Naze sub-station, Moji Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **48**: 1-6 (2012).

Abstract: Citrus huanglongbing (HLB), also known as citrus greening, is considered to be one of the most serious citrus diseases worldwide. Since 1988, HLB caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) has only occurred in a restricted area in Japan (Okinawa Prefecture and some of the islands in Kagoshima Prefecture). In this study, we compared and validated one nested PCR and two real-time PCR protocols for use in an HLB eradication confirmation survey on Kikai Island, Kagoshima Prefecture, where an outbreak of HLB required urgent eradication measures. The two real-time PCR protocols (Okuda *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 2010) were 10- to 100-fold more sensitive than nested PCR (Ding *et al.*, 2005). The accuracy of the two real-time PCRs was then investigated using leaf samples from an area on Okinoerabu Island where HLB occurred. Their accuracies were unreliable at very low concentration copies (1 copy/ μ l level) in some samples. However, the reproducibility of one real-time PCR (Okuda *et al.*, 2009) was higher than the other (Kawai *et al.*, 2010), and therefore we chose Okuda's real-time PCR method for the confirmation survey. Furthermore, we devised a survey flowchart including another PCR method (Jagoueix *et al.*, 1996) to confirm the results, incorporating another survey one year later to verify the reliability results at low copies/ μ l.

Key words: real time PCR method, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, citrus greening disease, comparable examination

緒 言

カンキツグリーニング病（正式名称Huanglongbing: 黄龍病、以下HLB）は、アジア地域、アフリカ地域、中米地域に発生しているカンキツ類の重要な病気の一つである。本病は、最初に一部の枝で葉脈が黄化し、その後葉全体、枝全体へと拡大し、さらに他の枝や葉に拡大し、最終的に枯死する。発生初期では外見上、他の生理障害（亜鉛欠乏等）との区別がつかないことや、ミカンキジラミ (*Diaphorina citri*) またはミカントガリキジラミ (*Trioza erytreae*) により虫媒伝染することから、罹病樹の早期発見、早期伐採が防除のうえで有効と考えられている（芦原, 2006; Bové, 2006; Halbert and Manjunath, 2004; 岩波, 2006）。

HLBを引き起こす病原細菌として *Candidatus Liberibacter asiaticus*、*Ca. L. africanus*、*Ca. L. americanus*の3種が知られている（Garnier, 2005; Teixeira *et al.*, 2005）。

国内で発生しているHLBは、現在のところ *Ca. L. asiati-*

cus

（以下Las）によるものである（加藤, 2011）。1988年に沖縄県西表島において、国内で初めて HLB が確認され（Miyakawa and Tsuno, 1989）、罹病樹は、発生翌年に焼却処分された（渡久地・河野, 1997）。その後、1993年に西表島、1994年に沖縄本島でも HLB が確認されたことから、沖縄県、農業者団体（JA）及び那覇植物防疫事務所が沖縄県全域を対象に発生調査を行ったところ、沖縄本島、伊平屋島、伊是名島、宮古島及び西表島で罹病樹が確認された（渡久地・河野, 1997）。これらの調査結果を受け、1997年に HLB 菌（カンキツグリーニング病菌）及びその媒介虫であるミカンキジラミ並びにそれらの寄主植物の未発生地域への移動規制が開始された（渡久地, 河野, 1997）。さらに、2002～2003年にかけて奄美群島の一部（与論島、沖永良部島、徳之島及び喜界島）でも本病が確認された（篠原ら, 2006）ことから、2007年から与論島、沖永良部島、徳之島も HLB 菌等の移動規制の対象となつた（川口, 2007）。

喜界島では、発生が局所的であったことから、2007年、

¹⁾ 門司植物防疫所

²⁾ 門司植物防疫所名瀬支所

鹿児島県が中心となってHLB根絶に向けた緊急防除が開始された。HLBの感染が確認されたカンキツ類は、罹病樹及びその半径5m以内のすべてのカンキツ類が買い上げられ、伐採された。また、ミカンキジラミの好適寄主植物であるゲッキツは、住民の協力を得て、発生地域の28地点においてすべて伐採された。さらに、年3回(4、7、12~1月)、発生地域のミカンキジラミの一斉防除が行われている(篠原ら, 2009)。緊急防除の発生調査は、罹病樹を中心半径500m範囲内のすべてのカンキツ樹及び500m範囲外においては、罹病率0.1%を仮定して、消費者危険率(山村, 2011)が5%未満となるように必要樹数を算出して、全島からランダムサンプリングを行い(坂巻ら, 2011)、Jagoueixら(1996)のPCR法を用いて検定が行われた。これらの調査において、3年間、HLBの発生が確認されなかった場合には、鹿児島県の要請により、植物防疫所による駆除確認調査が行われる。そこで、本試験では、駆除確認調査に利用するために、現状使用されているJagoueixら(1996)のPCR法より高感度、高精度かつ迅速な検定方法について検討を行った。

Lasを検出する各種PCR法(Ding *et al.*, 2005; Jagoueix *et al.*, 1996; 川合ら, 2007; Zhou and Gabriel, 2007)及びLAMP法(Okuda *et al.*, 2005)により、自然感染樹を用いて予備試験を行ったところ、Dingらのnested-PCR法が最も検出率が高いことが示された(未発表)。また、近年、Lasを検出する新しい手法として2種のリアルタイムPCR法(川合ら, 2010; 奥田ら, 2009)がより高感度及び迅速にHLBを検出できるとの報告があったことから、この2種のリアルタイムPCR法及びDingらのnested-PCR法について、HLBの検出率、検出感度、再現性、迅速性について検討することとした。

材料及び方法

カンキツ葉からのDNAの抽出

DNAの抽出は、房安ら(2006)のCTAB法を改変して行った。カンキツ葉の中肋0.05gを滅菌カミソリで細断し、2.0mlチューブ内で、タングステンビーズ、CTAB緩衝液(200mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA, 1.4M NaCl, 0.5% PVP, 1% CTAB)100μlとともにミキサー(ミルMM300(Retsch))を用いて磨碎し、磨碎後にCTAB緩衝液900μlを加え、65°Cで30分間処理後、等量のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、遠心分離(15,000rpm: 20,000×g, 10min. 以下同じ)を行った。得られた上清に等量の2-プロパノール(イソプロパノール)を加え、軽く混和した後、室温で5分間静置した。さらに、遠心分離を行い、沈殿を70%エタノールで洗浄した後、0.1×TE溶液(10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA)100μlに溶解し、供試DNA試料とした。

nested-PCR法及び2種のリアルタイムPCR法

nested-PCRはDingら(2005)の方法に準じて行った。2

種のリアルタイムPCRであるインターラーカー法(奥田ら, 2009)とTaqManプローブ法(川合ら, 2010)は、標準試料のみ、次に記した方法で作製して用いた。それ以外は、それぞれ報告されている方法に準じて行った。

2種のリアルタイムPCR法用標準試料の作製

奥田ら(2009)のインターラーカー法の陽性コントロールとして使用されている組換えプラスミドの分譲(九州沖縄農業総合研究センター 奥田氏より)を受け、M13プライマー(最終濃度0.2μM, Invitrogen)とTaKaRa Ex Taq Hot Start Version(タカラバイオ)を用いてPCR(94°C 30秒, 50°C 30秒, 72°C 1分を35サイクル)を行った。PCR反応液の組成はマニュアルに従った。PCR産物をマイクロコン-PCR(MILLIPORE)で精製し、Qubit(Invitrogen)を用いて、精製したPCR産物のDNA濃度を測定し、以下の式で、コピー数の濃度を算出した。

$$\text{コピー数の濃度(コピー数/μl)} = D \times 6.02 \times 10^{23} / M / 10^9$$

D=PCR産物のDNA濃度(ng/μl)、M=PCR産物分子量(M)

得られたコピー数を元に、上記PCR産物を10ng/μlのλDNA(タカラバイオ)入りの0.1×TE溶液で10倍段階希釈を行い、標準試料とした。得られたPCR産物のコピー数の濃度は、 3.7×10^{11} (コピー数/μl)であった。これを1/10ずつ希釈し、 $3.7 \times 10^0 \sim 3.7 \times 10^{10}$ (コピー数/μl)を得た。

また、川合ら(2010)のTaqManプローブ法で陽性コントロールとして使用されている組換えプラスミドの分譲(那覇植物防疫事務所より)を受け、組み込まれた領域を増幅するプライマー(kawaiplasmidF 5'-CGATGACGAC-GACAAGA-3', kawaiplasmidR 5'-ACACGTGTGGTCTA-GAG-3')を設計し、上記と同様にPCR(94°C 30秒、50°C 30秒、72°C 30秒を35サイクル)及びコピー数の濃度の算出を行い、標準試料を作製した。得られたPCR産物のコピー数の濃度は、 1.7×10^{11} (コピー数/μl)であった。これを1/10ずつ希釈し、 $1.7 \times 10^0 \sim 1.7 \times 10^{10}$ (コピー数/μl)を得た。

各標準試料の $10^0 \sim 10^7$ (コピー数/μl)を用いて、リアルタイムPCRを行ったところ、インターラーカー法、TaqManプローブ法とともにFig. 1Aのような増幅曲線が得られた。また、この増幅曲線から計算された標準曲線(Fig. 1B)から、これらの標準試料は十分にそれぞれのリアルタイムPCRに利用可能であることが示された。

3種のPCR法のLas検出率の比較

徳之島及び沖永良部島のHLB発生調査で、Jagoueixら(1996)のPCR法でLasの感染が確認された樹(徳之島10樹、沖永良部島13樹)から病徵を示した葉及び無病徵の葉を無作為に、島ごとに100葉ずつ採取し、それぞれの葉からDNAを抽出した。抽出したDNAについてnested-PCR

法と2種のリアルタイムPCR法を用いて検定を行った。

3種のPCR法の検出感度の比較

上記沖永良部島の試料から、無作為に選定した8試料を供試した。タンカンの健全葉から抽出したDNA試料で段階希釈し、nested-PCR法と2種のリアルタイムPCR法の検出限界を調査することで検出感度の比較を行った。

HLB発生地域の試料を用いた2種のリアルタイムPCR法の再現性比較

沖永良部島のHLB発生調査において、同調査で採取された樹の中から27地点35樹を選び、同調査方法に準じ、類似・疑似症状を呈した葉を含む6～8枚着葉した枝3～4本を採取した。

得られた樹ごとの試料は、1樹当たり6～7枚の葉について、それぞれの葉からDNAを抽出し、計216試料を、2種のリアルタイムPCR法に供試し、結果の再現性につい

て調査した。

結果

3種のPCRのLas検出率の比較

徳之島の100試料の検定では、nested-PCR法では62試料で、またインターラーテー法及びTaqManプローブ法ではともに65試料(同じ試料)で陽性反応を示した(Table 1.)。nested-PCR法で陽性反応を示した試料62試料は、2種のリアルタイムPCR法すべて陽性反応を示した。

沖永良部島の100試料の検定では、nested-PCR法では65試料で陽性反応を示し、インターラーテー法で67試料、TaqManプローブ法では、66試料が陽性反応を示した(Table 1.)。TaqManプローブ法及びnested-PCR法で陽性を示した試料はインターラーテー法すべて陽性を示した。また、TaqManプローブ法で陽性を示したがnested-PCR法では陰性を示した試料が2試料あった。さらに、nested-PCR法で陽性を示したがTaqManプローブ法では陰性を示した試料が1試料あった。

3種のPCR法の検出感度の比較

段階希釈による検出限界を調査した結果、インターラーテー法及びTaqManプローブ法では最大 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 倍の希釈率で增幅が確認され、またnested-PCR法では最大 10^{-2} 倍の希釈率で增幅が確認された(Table 2.)。

HLB発生地域の試料を用いた2種のリアルタイムPCR法の再現性比較

216試料について、2種のリアルタイムPCR法を行ったところ、両手法で2樹の12試料が陽性と判定された。また、インターラーテー法では14試料が、TaqManプローブ法では63試料が1コピー数/ μ l程度の値を示した。さらに、インターラーテー法で23試料、TaqManプローブ法で20試料が1コピー数/ μ l未満の値を示した(Table 3.)。

インターラーテー法とTaqManプローブ法で1コピー数/ μ l程度の値を示した試料をすべて含めた72試料について再度、リアルタイムPCR法を行ったところ、インターラーテー法で12試料(そのうち、1回目と同じ結果だったのは10試料)、TaqManプローブ法で40試料(そのうち、1回目と同じ結果だったのは38試料)が1コピー数/ μ l程度の値を示した。さらに、インターラーテー法で14試料、TaqManプローブ法で4試料が1コピー数未満の値を示した(Table 3.)。

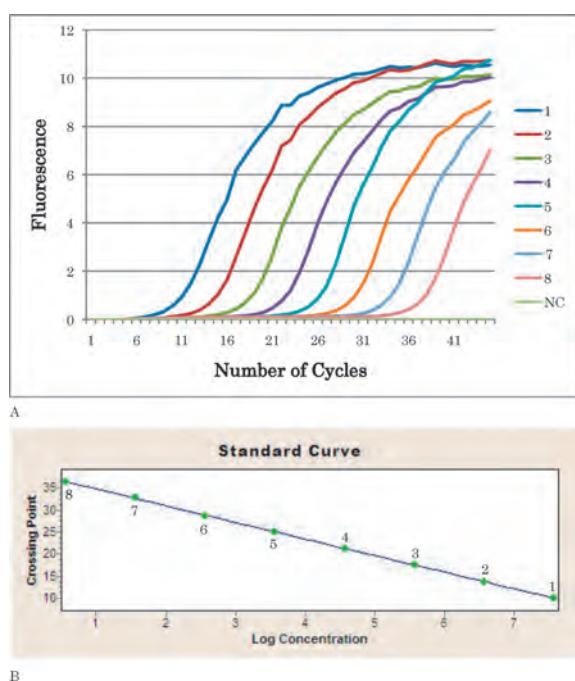


Fig. 1. Detection of the standard DNA in 10-fold dilution series (3.7×10^0 to 3.7×10^7 copy/ μ l) using Okuda's method (Okuda *et al.*, 2009). (A) Amplification curves; (B) Standard curves. 1: 3.7×10^7 , 2: 3.7×10^6 , 3: 3.7×10^5 , 4: 3.7×10^4 , 5: 3.7×10^3 , 6: 3.7×10^2 , 7: 3.7×10^1 , and 8: 3.7×10^0 (units: copies/ μ l). NC, Negative control (sterilized distilled water).

Table 1. Comparison of detection rates of *Candidatus Liberibacter asiaticus* from leaf samples on HLB infected trees with three methods.

Sampling location	Number of trees sampled	Number of leaves sampled	Number of positive samples		
			Method A ¹⁾	Method B ²⁾	Method C ³⁾
Tokunoshima	10	100	65	65	62
Okinoerabujima	13	100	67	66	65

¹⁾Method A (Okuda *et al.*, 2009), 2) Method B (Kawai *et al.*, 2010), Method C (Ding *et al.*, 2005).

Table 2. Comparison of detection limits of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in 10-fold dilution series from HLB infected leaf samples with three methods.

Sample No.	Method	Results of DNA serial dilution					
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	A ¹⁾	+	+	- ⁵⁾	-	-	-
	B ²⁾	+	+	-	-	-	-
	C ³⁾	+	+	-	-	-	-
2	A	+	+	+	-	-	-
	B	+	+	+	-	-	-
	C	+	+	+	-	-	-
3	A	+	+	-	-	-	-
	B	+	+	-	-	-	-
	C	+	+	+	-	-	-
4	A	+	+	+	-	-	-
	B	+	+	+	-	-	-
	C	+	+	+	-	-	-
5	A	+	+	+	-	-	-
	B	+	+	-	-	-	-
	C	+	+	-	-	-	-
6	A	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	-
	C	+	+	+	-	-	-
7	A	+	+	+	+	+	-
	B	+	+	+	+	+	-
	C	+	+	+	-	-	-
8	A	+	+	+	+	+	-
	B	+	+	+	+	+	-
	C	+	+	+	-	-	-

¹⁾Method A (Okuda *et al.*, 2009), ²⁾Method B (Kawai *et al.*, 2010), Method C (Ding *et al.*, 2005), ⁴⁾+: Specific DNA amplification confirmed, ⁵⁾-: Specific DNA amplification not confirmed.

Table 3. Comparison of detection rates of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in HLB survey on Okinoshima Island with two real-time PCR methods.

	First		Second	
	Method A ¹⁾	Method B ²⁾	Method A	Method B
Total number of samples	216	216	72	72
Number of positive samples	12	12	0	0
Number of samples with about 1 copy/μl	14	63	12(10) ³⁾	40(38) ³⁾
Number of samples under 1 copy/μl	23	20	14	4
Number of negative samples	167	121	46	28

¹⁾Method A (Okuda *et al.*, 2009), ²⁾Method B (Kawai *et al.*, 2010), ³⁾Number of samples where the result is the same as the first test.

考 察

リアルタイムPCR法は、PCR反応中に増幅するDNA量を経時的に計測する定量PCRの1種である。本試験では、奥田ら (2009)、川合ら (2010) に準じ、定量方法として、絶対検量線法による絶対定量を用いた。絶対定量はPCRを行うたびに既知濃度のDNA試料が必要であることか

ら、リアルタイムPCR法を検定手法とした際は、安定した標準試料の供給が不可欠である。本試験では、既報 (奥田ら, 2009; 川合ら, 2010) で使われているプラスミドの代わりにPCR産物を標準試料として作製し、その有効性を確認すると共に安定的に供給できる体制を整えることが可能となった。

nested-PCR法と2種のリアルタイムPCR法を用いた自

然感染樹からの葉の試料の検出率を調査したところ、3種の手法での検出率は62～67%を示した。インターラーカレーター法とTaqManプローブ法は、徳之島の試料での差はなく(65%)、沖永良部島の試料では1%のみの差であり、ほぼ同等の検出率を示した。一方でnested-PCRは2種のリアルタイムPCRと比較するとやや低い結果(徳之島試料:62%, 沖永良部島試料:65%)を示した。なお、自然感染樹からの試料を用いたのにもかかわらず、検出率が100%にならないのは、HLB菌が偏在していることが理由と考えられ、樹内でのPCRによる検出率の違いも報告されている(岩波ら, 2009)。

また、沖永良部島の罹病葉より抽出したDNAを健全葉のDNAで段階希釈して、3種の手法の検出感度を比較した際には、用いた試料により違いはあったものの、インターラーカレーター法及びTaqManプローブ法は、nested-PCR法と比較して、同等か10～100倍検出感度が高かった。これらのことから、nested-PCR法は、リアルタイムPCR法と比較して検出感度がやや低いことが示され、それに加えて、2回のPCRを行う必要があること、電気泳動によりPCR産物を確認する必要があることから、リアルタイムPCR法より時間がかかり、作業効率も低い。さらに、2回目のPCRを行う際には、1回目のPCR産物を移し替える必要があるため、コンタミネーションのリスクがあることから、これ以降の試験では、2種のリアルタイムPCR法について比較した。

沖永良部島の27地点35樹の216試料について、2種のリアルタイムPCR法で調査したところ、2樹は、確実に陽性であることが確認された(これらの樹については、発生調査におけるPCR検定(Jagoueix *et al.*, 1996)でも陽性であることが確認された)。残りの33樹の試料の中で1コピー数/ μ l程度を示した試料がインターラーカレーター法で14試料、TaqManプローブ法で63試料存在した。これらが検出感度の違い(TaqManプローブ法が高感度で微量のLasを検出している)によるものであるのか、それとも非特異反応によるものであるのか不明であったことから、再度、これらの試料を含んだ72試料について2種のリアルタイムPCR法を行った。

その結果、1回目と2回目共に1コピー数/ μ l程度を示した試料がインターラーカレーター法で10試料(再現率71%)、TaqManプローブ法で38試料(再現率60%)しか存在せず、両手法とも、1回目の結果を確実に再現することはできなかった。このことから、検出限界と考えられる1コピー数/ μ l程度の検定結果については、両手法とも正確性が低いこと、さらに、インターラーカレーター法とTaqManプローブ法とを比較した場合、インターラーカレーター法のほうが再現性が高いことが示唆された。

このことから、駆除確認調査においては、インターラーカレーター法を用いて、最初の検定を行い、その後、異なる検定(他のPCR法等)を用いることで、検出限界付近での結果の不確実性を補う必要が生じた。また、異なる検定

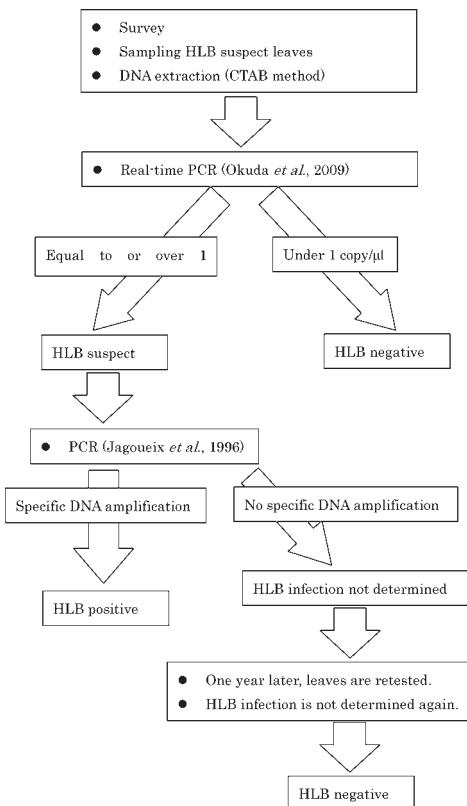


Fig. 2. Survey flowchart for confirmation of HLB eradication.

を行うことで、インターラーカレーター法の結果を担保することが可能となると考えられた。

インターラーカレーター法は、HLB菌の *tufB* 遺伝子領域を標的としており(奥田ら, 2009)、本試験に利用した他のPCR法(川合ら, 2010; Ding *et al.*, 2005)もその近傍の *secE-nusG-rplKAL-rpoB* 遺伝子領域を標的としていることから、異なる検定で用いるPCR法は、これらとは全く異なる16S rRNA 遺伝子領域を標的としているJagoueixら(1996)のPCR法を行うこととした。

そこで、インターラーカレーター法で1コピー数/ μ l以上の試料については、Jagoueixら(1996)のPCR法を行い、DNAの増幅が確認された試料については、陽性とすることとし、DNAの増幅が確認されなかった場合は、1年後に再検定を行うこととした。再検定を行っても2種のPCR法で、確実な増幅が確認されなかった試料については、陰性と判断することとした(Fig. 2)。

フロリダにおける調査で、HLBの感染から発病までの期間は、7～10年生のカンキツにおいて1～2.5年と見積もられており(Gottwald, 2010)、鹿児島県の試験においても、HLB罹病樹の近傍に栽植したタンカンは、1年間で半数の樹のHLB感染がリアルタイムPCR(インターラーカレーター法)で確認されている(データ未発表)。さらに、駆除確認調査以前の3年間の緊急防除の調査でHLB罹病樹が確認されていないことから、1年後の再検定を行うことで、根絶の確実性は十分であると考える。

謝 辞

本研究を推進するに当たり、多くの技術的指導及び助言を賜った九州沖縄農業研究センター（現農林水産省農林水産技術会議事務局）の奥田 充博士、果樹研究所の岩波徹博士、宮田伸一博士、また、試料採取の際にご協力いただいた鹿児島県職員及び奄美群島市町村役場の方々に厚く御礼申し上げます。

摘要

カンキツグリーニング病として知られている黄龍病（英名Huanglongbing以下HLB）は、世界中のカンキツで最も重要な病気の一つである。*Candidatus Liberibacter asiaticus*（以下Las）によって引き起こされるHLBは、我が国では1988年以降、限られた地域（沖縄県及び鹿児島県の島嶼の一部）においてのみ発生している。本研究では、HLB発生地域の一つであり、緊急防除が行われている鹿児島県喜界島で実施する駆除確認調査において用いるために、nested-PCR法（Ding *et al.*, 2005）と2種のリアルタイムPCR法（奥田ら2009, 川合ら2010）について、比較及び評価を行った。2種のリアルタイムPCR法は、nested-PCR法より10～100倍検出感度が高かった。そこで、2種のリアルタイムPCR法の正確性について沖永良部島で採取した葉を用いて調査したところ、両法とも、いくつかの試料の低濃度のコピー数において信頼性が得られなかった。しかしながら、両法の再現性において奥田ら（2009）のリアルタイムPCR法が川合ら（2010）のリアルタイムPCR法より優れていたことから、喜界島の調査は、奥田らのリアルタイムPCR法を用いることとし、それに加えて、リアルタイムPCR法で陽性反応を呈した試料に対して、その結果の正確性を担保できるJagoueixら（1996）のPCR法を行い、両手法で検定を行うこととした。また、Jagoueixら（1996）のPCR法で陽性とならなかった試料については、1年後に再検定を行うこととした。

引用文献

- 芦原 亘（2006）カンキツグリーニング病と媒介昆虫ミカンキジラミの分布と研究の現状. 植物防護 **60**: 291-294.
- Bové, J. M. (2006) Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* **88**: 7-37.
- Ding, F., G. Wang, G. Yi, Y. Zhong, J. Zeng and B. Zhou (2005) Infection of Wampee and lemon by the citrus huanglongbing pathogen '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in China. *J. Plant Pathol.* **87**: 207-212.
- Garnier, M. (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition. Vol. 2. The Proteobacteria Part C. The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria* (Garrity, G. M. ed.). Springer: 400-402
- Gottwald, T. R. (2010) Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 119-139
- 房安聰司・佐藤哲二・清水宏昭（2006）カンキツグリーニング病菌（*Candidatus Liberibacter asiaticum*）のLAMP法による検定方法の検討. 植防研報 **42**: 75-81.
- Halbert, S. E. and K. L. Manjunath (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* **87**: 330-353.
- 岩波 徹・奥田 充（2006）カンキツグリーニング病の高精度検定法の開発. 植物防護 **60**: 308-310.
- 岩波 徹・上地奈美・河野伸二（2009）カンキツグリーニング病に感染したシーカワーシャー樹体内におけるPCR検出率の季節変動. 九病虫研会報 **55**: 68-75.
- Jagoueix, S., J. M. Bové and M. Garnier (1996) PCR detection of the two '*Candidatus Liberibacter* species associated with greening disease of citrus. *Mol. Cell. Probes* **10**: 43-50.
- 加藤 寛（2011）カンキツグリーニング病原細菌の系統判別. 植物防護 **65**: 599-604.
- 川合崇之・菊川華織・佐々木智基・河津裕一・横山 亨・渡久地 章男（2007）カンキツグリーニング病菌検出のためのnested-PCR. 植防研報 **43**: 27-32.
- 川合崇之・菊川華織・筑木秀毅・板尾正俊・横山 亨（2010）カンキツグリーニング病菌保毒ミカンキジラミの季節変動. 植防研報 **46**: 79-84.
- 川口嘉久（2007）カンキツグリーニング病の検疫措置. 植物防護所病害虫情報 No. 82. (オンライン), 入手先 <http://www.maff.go.jp/pps/j/guidance/pestinfo/pdf/PestInfo_82_01.pdf>, (参照 2007-7-15)
- Miyakawa, T. and K. Tsuno (1989) Occurrence of citrus greening disease in the southern islands of Japan. *Am. Phytopath. Soc. Japan* **55**: 667-670.
- Okuda, M., M. Matsumoto, Y. Tanaka, S. Subandiyah and T. Iwanami (2005) Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Dis.* **89**: 705-711.
- 奥田 充・河野伸二・澤垣哲也・岩波 徹（2009）低濃度に感染した野外試料から*Candidatus Liberibacter asiaticus*を検出する場合における遺伝子増幅法による陽性率の違い. 九病虫研会報 **55**: 62-67.
- 坂巻祥孝・篠原和孝・湯田達也・川島俊次・山村光司（2011）喜界島カンキツグリーニング病根絶確認のための必要PCRサンプル数推定. 第81回九病虫研究発表会（講要）
- 篠原和孝・湯田達也・西本周代・濱島朗子・橋元祥一・時村金愛・佐藤哲治（2006）奄美諸島におけるカンキツグリーニング病の発生調査（第1報 奄美諸島における分布の特徴）. 九病虫研会報 **52**: 6-10.
- 篠原和孝・上室剛・都外川総明・堀江宏彰・尾川宜広・松比良邦彦・宮路克彦・上福元彰（2009）鹿児島県喜界島における「カンキツグリーニング病菌緊急防除」への取組（2年目の経過）. 植物防護 **63**: 503-507.
- Teixeira, D. C., C. Saillard, S. Eveillard, J. L. Danet, P. I. Da Costa, A. J. Ayres and J. Bové (2005) '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1857-1862.
- 渡久地章男・河野伸二（1997）沖縄県におけるカンキツグリーニング病の発生状況および防除対策. 植物防護 **51**: 565-570.
- 山村光司（2011）農学と統計学. 計量生物学 **32** (Special Issue): S19-S34.
- Zhou, L. J. and D. W. Gabriel (2007) First report of dodder transmission of Huanglongbing from naturally infected *Muraya paniculata* to citrus. *Plant Dis.* **91**: 227.