

14. カンキツグリーニング病菌（ミカンキジラミを含む）

- ・ *Candidatus Liberibacter africanus*（カンキツグリーニング病菌アフリカ型）
- ・ *Candidatus Liberibacter americanus*（カンキツグリーニング病菌アメリカ型）
- ・ *Candidatus Liberibacter asiaticus*（カンキツグリーニング病菌アジア型）

ア 調査

【調査対象動植物】

- 1) カンキツグリーニング病（以下「CG」という。）：カンキツ属
- 2) ミカンキジラミ：カンキツ属、ゲッキツ

【調査時期】

調査は、CG及びミカンキジラミを対象に主な新梢発生期である春期～秋期（春期が望ましい）に1回実施する。

【調査方法及び調査内容】

- 1) 上記の調査対象植物の中から選定した上で、調査地点を設定する。なお、調査地点は各都道府県内で偏りが生じないように留意する。
- 2) 設定した調査地点あたり10株を対象に、病徴及びミカンキジラミの写真を参考に目視調査を実施する。ミカンキジラミに対しては、可能な範囲でピーティング調査を実施する。
- 3) CGによる感染が疑わしい場合は、発症部位や発症部位を含む枝や樹全体、周囲の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、試料を採取し遺伝子診断等を実施する。
- 4) ミカンキジラミと疑われるキジラミ類を発見した場合は、成虫等を採取する。採取した虫体は外部形態による同定等を実施する。

【調査に当たっての留意事項】

- 1) 確認する症状は、生理障害や他の虫害（アブラムシ及びアザミウマ等による）や他の病害（温州萎縮病等）と見分けることが難しい。このため、通常の栽培環境下で平時と異なる状況であった場合（すす病が多い、微小昆虫が多い、モザイク症状が多い、台風でもないのに木が枯れる等）には、CGの感染を疑い、必要に応じて試料採取、遺伝子診断等を実施する。なお、病徴写真と比較して、症状が似ている場合であっても、発生の状況が平時と同じ場合は積極的に試料を採取し遺伝子診断等を実施する必要はない。
- 2) カンキツ属及びゲッキツの新梢（新芽）に、体色が黄～黄緑色で触角の短いキジラミ類幼虫等を確認した場合は、ミカンキジラミの可能性が高いことから可能な限り成虫を見つけ採取する。幼虫等が確認されるものの、成虫が見つからなかった場合は、枝ごと持ち帰り、成虫まで飼育を行う。

3) 発見のポイント

- ア) CG (病徴・標徴) : 最も特徴的な病斑は亜鉛欠乏症に似た葉の退緑である。成熟葉では主脈間に不規則な斑紋が生じ、葉脈にのみ緑色が残る場合や、葉脈が隆起しコルク化することもある。
- イ) ミカンキジラミ : 成虫は葉裏に静止していることが多く、ミカンキジラミそのものは慣れれば見分けることができるが、アブラムシ類と同様にロウ物質(甘露)を分泌するため、気づきやすい。このため、葉上に付着したロウ物質(甘露)やそれに随伴するアリの群れ、すす病の発生が発見の目安となる。

イ 同定診断手法

採取した試料について、以下の手順で同定診断を実施する。

1) CG (遺伝子診断) (参考1)

疑似症状植物よりDNAを抽出し、既報の遺伝子診断法により同定を行う。

1例としてConventional PCR法を示す。

2) ミカンキジラミ (外部形態、遺伝子診断) (参考2)

外部形態による同定を行う。成虫態以外の態で発見された場合は、ミカンキジラミが散逸するおそれのない検定室等において、成虫まで飼育及び保管を行った後に同定を行う。なお、形態による同定が難しい場合には、DNAを抽出し、ミカンキジラミ同定用プライマーを用いたPCRも利用可能。

同定の結果、ミカンキジラミと確認された場合は、必要に応じてCGを保毒しているかを確認するため1)と同様に遺伝子診断を実施する。

(参考1) 疑似症状植物からのCGの同定

ア) 核酸抽出

a) 肉眼観察

採取した疑似症状植物の各枝から、著しい疑似症状を呈した葉を可能な限り葉柄が付着した状態で取り出す。

b) 試料調整

カミソリ等で葉の中肋(葉の中央の主脈)又は葉柄部分を切り取り、約1mmの長さに細断する。細断した試料を均一に混ぜ、DNA抽出用の試料とする。カミソリ等は試料が変わるたびに新品もしくは滅菌済みのものを用いる。

c) 核酸抽出

調整した試料からDNAを抽出する。DNA抽出は、CTAB法及び市販のキット等を用いる。キットを用いる場合には、付属のプロトコルに従って実施する。

イ) 抽出したDNAを鋳型にして、表1の各プライマーセットを用いて、表2の

反応条件によりConventional PCRを行う。なお、反応液の組成は各試薬メーカーのHP等を参照。

ウ) 電気泳動によって増幅産物のサイズが各予定長の増幅サイズであるか確認する。

表1 カンキツグリーニング病菌検出用プライマー

カンキツグリーニング病菌	名前	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ	アニーリング温度	参考文献
アジア型及び アフリカ型	OI-1	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	1,160	55°C*	Jagoueix et al., 1994
	OI-2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT			
アメリカ型	GB1	AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT	1,027	64°C	Teixeira et al., 2005
	GB3	CCAACCTTAATGATGGCAAATATAG			

* Fujikawa and Iwanami (2012)

表2 カンキツグリーニング病菌の反応条件

カンキツグリーニング病菌	反応条件	参考文献
アジア型及びアフリカ型	96°C 9分→(96°C 30秒, 55°C 30秒, 72°C 1分) x40 サイクル→ 72°C 7分→ 4°C ∞	Fujikawa and Iwanami (2012)
アメリカ型	94°C 2分→(94°C 45秒, 64°C 45秒, 72°C 1分) x35 サイクル→ 72°C 10分→ 4°C ∞	Teixeira et al., 2005

(参考2) ミカンキジラミの同定及びCG保毒の有無の確認

ア) 形態によるミカンキジラミの同定

ミカンキジラミが属する*Diaphorina*属は、国内ではミカンキジラミ1種しか知られていないことから成虫がa)の特徴と一致した場合は、本虫と判断して問題ない。

成虫以外の態については、b)の特徴と一致した場合は、ミカンキジラミの可能性のあることから成虫まで飼育及び保管を行い同定する。

なお、飼育は、鉢植えしたカンキツ属又はゲッキツ等の新梢(新芽)に面相筆等を用いて移動させ、移動させた部位をビニール袋で覆う等の分散防止措置を行ったうえで実施する。

a) 成虫

- ・ 寄主植物上で、下向きになって逆立ちしているような独特の姿勢をとることが多い(図1)。
- ・ 翅端までの全長が雌雄ともに約3mm。
- ・ 体色は赤褐～黒褐色(生時は白色粉で覆われる)(図1)。
- ・ 前翅に特徴的な濃褐色斑紋がある(図2)。
- ・ 頭部額錘は前方を向き、触角は短く頭幅以下(図3)。

b) 成虫以外の態

- ・ カンキツ属及びゲッキツの新梢（新芽）に、卵及び幼虫が見られる（図4及び5）。
- ・ 卵は紡錘形で、黄色～橙色。大きさ（平均）は長さ0.31mm、幅0.14mm（図4）。
- ・ 幼虫の体色は黄～黄緑色で、節片は褐色を帯びる（図5～8）。
- ・ 触角は3節で、5齢幼虫の触角は前翅芽よりも明らかに短い（図8）。
- ・ 5齢幼虫の前翅芽の肩部は強く前方に張り出す（図8）。



図1 ミカンキジラミ成虫（植物防疫所原図）



図2 ミカンキジラミ成虫前翅（植物防疫所原図）

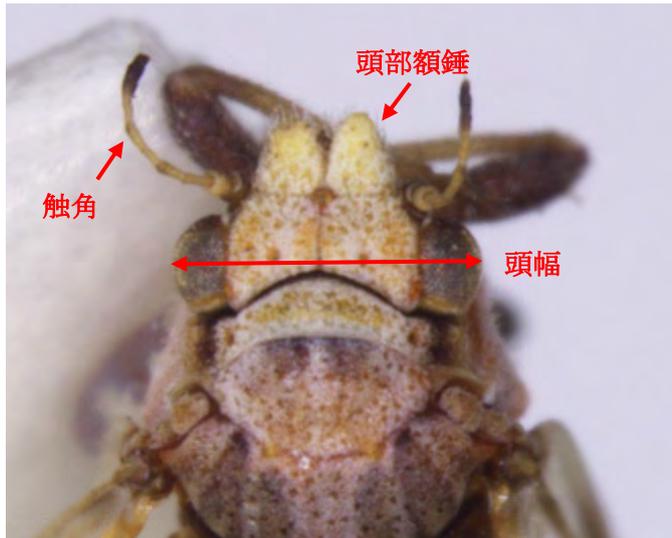


図3 ミカンキジラミ成虫頭部 (植物防疫所原図)



図4 ゲッキツ新芽に産卵されたミカンキジラミの卵 (植物防疫所原図)



図5 ゲッキツ新梢上のミカンキジラミ成虫及び幼虫 (植物防疫所原図)



図6 ミカンキジラミの卵～幼虫（左から卵、1～5 齢幼虫）（植物防疫所原図）



図7 ミカンキジラミ幼虫（左から1 齢、2 齢及び3 齢）（植物防疫所原図）



図8 ミカンキジラミ幼虫（左：4 齢、中右：5 齢）（植物防疫所原図）

イ) 核酸抽出

a) 試料調整

無水アルコール若しくはアセトンに浸漬されているミカンキジラミは、火炎滅菌したピンセットで羽の部分をつまみ、ワイパー等で浸漬液を除去する。その際、虫体を傷つけないよう注意する。その後、チューブに1サンプル当たり1～5頭のミカンキジラミを入れ、アルコールやアセトンを完全に揮発させるため、蓋を開けた状態のまま室温（25℃前後）で20分程度静止させたものを供試試料とする。

b) 核酸抽出

供試試料からDNAを抽出する。DNA抽出は市販のキット等を用いる。キットを用いる場合には、付属のプロトコルに従い実施する。

なお、抽出の際は、供試試料を入れたチューブにキット付属の抽出用試薬等を添加し、ペレットミキサー等で供試試料を磨砕すること。

ウ) 抽出したDNAを鋳型にしてConventional PCRを、CG保毒の有無の確認をする場合は表1の、ミカンキジラミの同定を行う場合は、表3のプライマーセットを用いて行う。なお、反応液の組成は各試薬メーカーのHP等を参照し、ミカンキジラミは表4の反応条件によりConventional PCRを行う。

エ) 電気泳動によって増幅産物のサイズが予定長の増幅サイズであるか確認する。

表3 ミカンキジラミ同定用プライマー

名前	塩基配列 (5'-3')	増幅 サイズ	アニーリング 温度	参考文献
DCITRI COI-L	AGGAGGTGGAGACCCAATCT	821	60℃*	Boykin et al. (2012)
DCITRI COI-R	TCAATTGGGGGAGATTTTG			

* Fujiwara et al. (2016)

表4 ミカンキジラミの反応条件

反応条件	参考文献
94℃ 3分→ (94℃ 30秒, 60℃ 30秒, 72℃ 1分) ×35 サイクル→ 72℃ 10分→ 4℃ ∞	Fujiwara et al. (2016)

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

1) カンキツグリーンニング病菌

ア) 試料を採取する宿主植物には、CG菌が検出された場合を想定し、試料採取前に目印を付ける。

イ) 試料の採取に当たっては、異なる亜主枝から疑似症状葉を含む15～25cmの枝を計3～4本採取する。検定には葉柄または中肋（葉の中央の主脈）が

適していることから、その部分を確実に採取できるよう留意する。

- ウ) 採取した試料は、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所、写真等）を記録した試料採取票（別記様式）を添付した上で、ビニール袋に入れ、輸送するまでクーラーボックス等（4℃）に保管する。
- エ) 試料の採取部位、病徴及び採取票に記録した内容等は、調査野帳に記録する。
- オ) 採取した試料は、散逸しないように厳重に梱包し、保冷剤を入れて低温に保った保冷箱等に収容して冷温のまま送付する。

2) ミカンキジラミ

- ア) 虫体を採取するCGの宿主植物には、CG菌を保毒していた場合を想定し、採取前に目印を付ける。
- イ) ミカンキジラミと疑われるキジラミ類が確認された場合は、可能な限り成虫を採取し、無水アルコール若しくはアセトン中に保存する。
- ウ) 採取した成虫は、散逸しないように厳重に梱包し、保冷剤を入れて低温に保った保冷箱等に収容して冷温のまま送付する。
- エ) 成虫の採取ができなかった場合は、幼虫等を枝ごと採取し、散逸しないように厳重に梱包し、常温で送付する。

エ 病徴写真等

1) 宿主植物における病徴

ア) カンキツ



図9 カンキツグリーンング病菌罹病樹（防疫指針委託事業成果）

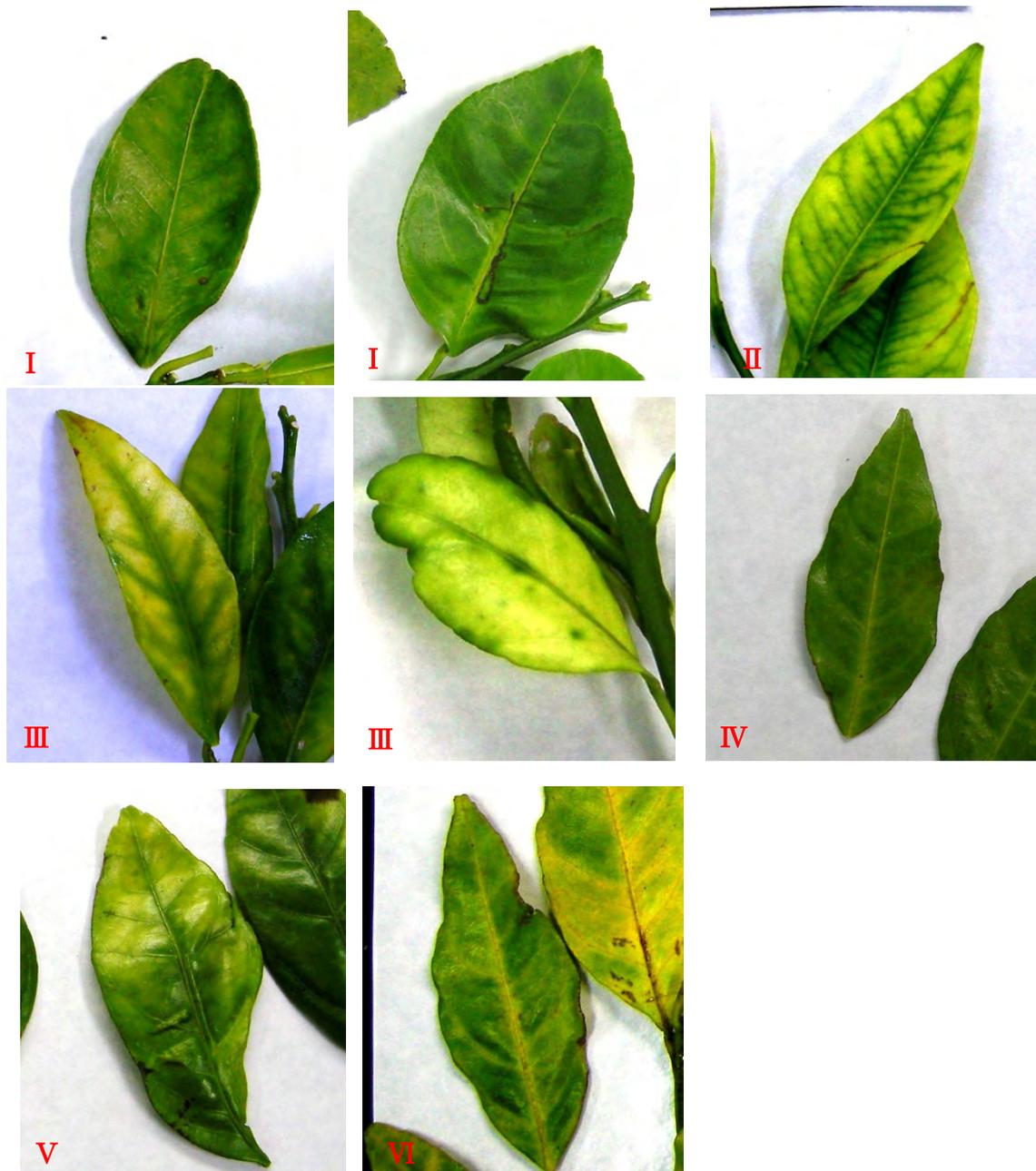


図10 カンキツグリーンング病菌罹病葉の症状（I：退緑斑紋、II：葉脈が網目状に残る退緑黄化、III：主脈が綠色に残る退緑化、IV：葉脈黄化、V：黄色斑紋、VI：葉脈黄化+黄色斑紋）（房安ら，2014を一部改変）（植物防疫所原図）



図11 カンキツグリーンニング病菌罹病樹（主脈が緑色に残る退緑化）
（防疫指針委託事業成果）



図12 カンキツグリーンニング病菌罹病樹（葉脈が網目状に残る退緑黄化）
（防疫指針委託事業成果）



図13 カンキツグリーンング病菌罹病樹 (防疫指針委託事業成果)

2) ベクター

ア) ミカンキジラミ



図14 葉裏に静止したミカンキジラミ成虫 (防疫指針委託事業成果)



図15 ミカンキジラミ成虫及び白色ロウ物質を分泌した幼虫 (防疫指針委託事業成果)



図16 新梢上のミカンキジラミ成虫 (防疫指針委託事業成果)



図17 新梢上に密集したミカンキジラミ幼虫 (防疫指針委託事業成果)

イ) ミカントガリキジラミ (参考)



図 18 ミカントガリキジラミ (成虫)

S.P. van Vuuren, Citrus Research International, Bugwood.org. Creative Commons License licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 License.) (CC BY-NC 3.0 US) (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/us/>)



図 19 ミカントガリキジラミ (幼虫)

Peter Stephen, Citrus Research International, Bugwood.org. Creative Commons License licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 License.) (CC BY-NC 3.0 US) (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/us/>)

オ 対象病害虫の解説

1) カンキツグリーニング病菌

学名

: *Candidatus Liberibacter africanus* corrig. Jagoueix et al. 1994

: *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis* Garnier et al. 2000

: *Candidatus Liberibacter americanus* Teixeira et al. 2005

: *Candidatus Liberibacter asiaticus* corrig. Jagoueix et al. 1994

英名等 : Citrus huanglongbing、Citrus greening、Huang long bing (yellow dragon disease)、greening、leaf mottling、dieback、vein phloem degeneration

分布 : インド、インドネシア、カンボジア、スリランカ、タイ、台湾、中華人民共和国、ネパール、日本 (鹿児島県及び沖縄県の一部) ※、パキスタン、バングラデシュ、東ティモール、フィリピン、ブータン、ベトナム、マレーシア、ミャンマー、ラオス、イエメン、イラン、オマーン、サウジアラビア、アフリカ、アメリカ合衆国、アルゼンチン、キューバ、グアテマラ、コスタリカ、コロンビア、ジャマイカ、ドミニカ、ドミニカ共和国、トリニダード・トバゴ、ニカラグア、パナマ、パラグアイ、ブラジル、ベネズエラ、ベリーズ、ホンジュラス、メキシコ、パプ

アニューギニア等（農林水産省，2021）

※ 日本では、北緯27度10分以南の南西諸島（大東諸島を含み、与論島を除く。）並びに北緯27度58分以南、北緯27度10分以上の南西諸島及び与論島に*Candidatus Liberibacter asiaticus* が発生している。

宿主植物：カンキツ属、カラタチ属、キンカン属など（農林水産省，2021）

生態：CGの病原体は、師部局在性、難培養性のグラム陰性細菌で、

Candidatus Liberibacter africanum（アフリカ型）、アフリカ型の亜種である*Ca. L. africanus* subsp. *capense*、*Ca. L. asiaticus*（アジア型）、*Ca. L. americanus*（アメリカ型）が報告されている（農林水産省，2021）。

本細菌の感染植物の初期症状は、一部の枝の葉に症状が現れ、亜鉛欠乏症のように葉脈やその隣接組織が黄化し、のちに葉全体が黄化する。やがて他の枝にも発病し、進行すると落葉、落果、枝枯れなどが生じる。最終的には、植物全体が衰弱し、枯死することが多い。症状は感染植物の一部の枝にだけに現れることもある。本細菌による感染植物の症状は植物の衰弱症状であるため特異性が低く、微量要素の欠乏症状やゴマダラカミキリの被害等と類似している（農林水産省，2021）。

潜伏期間は長く、数箇月から1年以上までと様々である（EFSA，2019）。

生果実では、発育不良、奇形、着色不良が生じ、酸味や渋味が増す。種子は不稔となる。生果実表面を指で押すと、外皮表面に灰白色のロウ状の痕が残ることがある。生果実表面に緑色が残ったままとなることから、greening という名前が付けられた（農林水産省，2021）。

本細菌は、オレンジ、マンダリン及びタンジェリンで激しい症状を示し、レモン、グレープフルーツ及びサワーオレンジ等はやや軽度であり、ライム、ブンタン（ポメロ）及びカラタチは耐性が高い（芦原，1997；EFSA，2019）。

自然環境下においては、アフリカ型はミカントガリキジラミ（*Trioza erytreae* del Guercio：日本未発生の検疫有害動物）により、アジア型及びアメリカ型はミカンキジラミにより媒介され、実験条件下においては、それぞれのキジラミはアジア型及びアフリカ型の両細菌を媒介可能との報告がある（農林水産省，2021）。

分散：

1) 自然分散

本細菌は感染植物に寄生したミカンキジラミ及びミカントガリキジラミが師管液を吸汁した後、健全植物への吸汁活動により媒介される。本

細菌は媒介昆虫であるキジラミのリンパ節及び唾液腺で増殖することが可能であり、一度虫体内に入ると永続的に生存及び増殖し、吸汁行動に伴い、新たな宿主植物へ感染（移動）する（農林水産省，2021）。

2) 人為分散

接ぎ木、苗木等の移動（植物防疫所，2003）。

防除：感染植物の伐採及び除去。健全な苗木の供給及びミカンキジラミの防除（農林水産省，2021）。

2) ミカンキジラミ

学名：*Diaphorina citri* Kuwayama

英名等：Asian citrus psyllid

分布：インド、インドネシア、カンボジア、シンガポール、スリランカ、台湾、中国、日本（鹿児島県及び沖縄県の一部）※、パキスタン、 Bangladesh、フィリピン、ブータン、ベトナム、マレーシア、ミャンマー、ラオス、アフガニスタン、アラブ首長国連邦、イエメン、イラン、オマーン、サウジアラビア、エチオピア、ケニア、タンザニア、アメリカ合衆国、メキシコ、キューバ、ジャマイカ、ドミニカ、ドミニカ共和国、アルゼンチン、ブラジル、エクアドル、パラグアイ、ベネズエラ等（CABI, 2021）

※ 日本では、鹿児島県（奄美群島以南）及び沖縄県に分布。

寄主植物：ゲッキツ、オオバゲッキツ、カンキツ属、カラタチ属、キンカン属、イチジクなど

生態：成虫は寄主植物の新梢に黄色紡錘型の卵を産み付ける。幼虫は新葉で発育し、5 齢を経て成虫となる。摂食中にロウ物質で覆われた甘露（ハニーデュー）を分泌する。成虫の生存期間は2 か月以上、1 雌当たり産卵数は約200～800個である（芦原，1997）。発育零点及び有効積算温度は、卵は13.66℃で46.93日度、幼虫は11.56℃で192.27日度、卵から成虫は12.16℃で232.26日度である（Nakata, 2006）。冬季でも新梢が発生する地域では全発育態が越冬するが、葉が硬化するところでは、成虫しか越冬できない（芦原，1997）。

ミカンキジラミはCG菌の媒介昆虫として知られており、CG菌はミカンキジラミのリンパ節及び唾液腺で増殖し、一度虫体内に入ると永続的に生存及び増殖し、昆虫の吸汁行動に伴い、新たな宿主植物へ感染（移動）する。経卵伝染は起こらない（農林水産省，2021）。

- 分散：1) 自然分散
成虫が飛翔する（芦原，1997）。
- 2) 人為分散
苗木等の移動に伴い分散する。

防除：ミカンキジラミに適用のある農薬（MEP乳剤、イミダクロプリド水和剤、クロチアニジン水溶剤、チアメトキサム粒剤など）を登録内容に従って散布する。

<参考文献>

- 芦原亘（1997）カンキツグリーニング病の媒介昆虫ミカンキジラミ *Diaphorina citri* の生態と防除. 植物防疫51(7)10-13.
- Boykin, L. M., P. De Barro, D. G. Hall, W. B. Hunter, C. L. McKenzie, C. A. Powell and R. G. Shatters, Jr. (2012) Overview of worldwide diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama mitochondrial cytochrome oxidase 1 haplotypes: two Old World Lineages and a New World invasion. Bulletin of Entomological Research 102:573-582.
- CABI (2021) *Diaphorina citri* (Asian citrus psyllid). Crop Protection Compendium. (online), available from <<https://www.cabi.org/cpc/>>, (accessed 2022-8-24).
- EFSA (European Food Safety Authority), S. Parnell, M. Camilleri, M. Diakaki, G. Schrader, and S. Vos (2019) Pest survey card on Huanglongbing and its vectors. EFSA Supporting Publications16(4):1574E.
- Fujikawa, T. and T. Iwanami (2012) Sensitive and robust detection of citrus greening(huanglongbing) bacterium ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ by DNA amplification with new 16S rDNA-specific primers. Molecular and Cellular Probes 26: 194-197.
- Fujiwara, K., N. Uechi, Y. Shimizu, S. Toda, H. Inoue, T. Yamaguchi, T. Iwanami and T. Fujikawa (2016) Effective molecular detection of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in bulk insect samples from sticky traps. Journal of Applied Entomology 141(1-2):61-66.
- 房安聡司、秀島和幸、永喜大士、藤田武利、松浦貴之（2014）奄美群島におけるカンキツグリーニング病罹病葉の病徴型による病徴診断の検討. 植物防疫所調査研究報告50:83-88.
- 井上広光（2004）キジラミ類の分類と生態（2）－生態および害虫種－. 植物防疫58(1):29-32
- 井上広光、篠原和孝、奥村正美、池田綱介、芦原亘、大平喜男(2006)、九州本土

- および屋久島の植栽ゲッキツ（ミカン科）で新たに発生したハマセンダンキジラミ（半翅目：キジラミ科）. 日本応用動物昆虫学会誌 50(1):66-68.
- Jagoueix, S., J. M. Bové and M. Garnier (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 379-386.
- Nakata, T. (2006) Temperature-dependent development of the citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea), and the predicted limit of its spread based on overwintering in the nymphal stage in temperate regions of Japan. *Applied Entomology and Zoology* 41(3):383-387.
- 農林水産省 (2021) *Candidatus Liberibacter africanus*, *Ca. L. americanus* 及び *Ca. L. asiaticus* (カンキツグリーンング病菌) に関する病害虫リスクアナリシス報告書(令和3年12月22日改訂版). <
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/keneki/kikaku/attach/pdf/pratable2-13.pdf>>
- 植物防疫所 (2003) ミバエ類等侵入警戒調査実務参考資料. pp. 71.
- Teixeira, D. C., J. L. Dane, S. Eveillard, E. C. Martins, W. C. Jesus Jr, P. T. Yamamoto, S. A. Lopes, R. B. Bassanzi, A. J. Ayres, C. Saillard and J. M. Bové (2005) Citrus huanglongbing in Saõ Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* 19: 173-179.

15. *Spiroplasma citri* (以下、「*S. citri*」という。)

ア 調査

【調査対象植物】

カンキツ属

【調査時期】

調査は、生育期間中に年1回以上行うこととする。なお、可能であれば、比較的高温期を中心に調査を実施することが望ましい。

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査は、上記の調査対象植物の中から選定した上で、調査地点を設定し、実施する。なお、調査地点は都道府県内で偏りが生じないように留意する。
- 2) 設定した調査地点あたり10株を対象に、病徴写真を参考にしつつ、*S. citri*に感染したカンキツ属でみられるような生育不良、若枝の叢生、葉の黄化、果実の着色不良、小玉化等の症状の有無を目視で調査する。
- 3) 本細菌はヨコバイによる伝染が知られているため、ヨコバイを園地で発見した場合には、特に注意して調査を行う。
- 4) 感染が疑わしい場合は、診断の一助として関係機関に送付できるよう、発症部位、発症部位を含む枝及び樹全体についてデジタルカメラ等で撮影した上で、試料採取、遺伝子診断等を実施する。

【調査に当たっての留意事項】

- 1) 本細菌による病徴は生理障害や他の病害等と混同しやすいため、病徴写真と症状が似ている場合であっても、発生の状況が平時と同じ場合には、積極的に試料を採取し、遺伝子診断等を実施する必要はない。一方、通常の栽培環境下で平時に比べて症状の発生が異常と考えられる場合には、*S. citri*の感染を疑い、試料採取、遺伝子診断等を実施する。
- 2) 発見のポイント
 - ア) 葉：退緑斑、黄化、小葉化
 - イ) 果実：奇形、着色不良、小玉化
 - ウ) その他：萎縮、若枝の叢生、枝の節間のつまり等。

イ 試料採取及び送付時の注意事項

- 1) 試料を採取する宿主植物には、*S. citri*が検出された場合を想定し、試料採取前に目印を付ける。
- 2) 試料の採取に当たっては、罹病部を中心になるべく広い範囲で採取ができるよう、可能な限り枝ごと採取する。
- 3) 調査を実施した園地内に病徴を示す樹木が複数ある場合は、樹木ごとに手

袋を交換し、せん定ばさみ等の器具類についても、樹木ごとに70%エタノール又は有効塩素濃度1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液等により消毒して使用する。

- 4) 採取した試料は、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所等）を記録した試料採取票（別記様式）を添付した上で、ビニール袋に入れ、輸送するまで冷暗所に保管する。
- 5) 試料の採取部位、病徴及び採取票に記録した内容等は、調査野帳に記録する。
- 6) 採取した試料は、散逸しないように厳重に梱包し、郵送時に極度に高温にならないように注意し、送付する。

ウ 同定診断手法

採取または送付された試料について、以下の手順で同定を実施する。

ただし、生物学的診断法は判定までに時間を要し、血清学的診断はELISAキットを常備しておくことが困難と考えられることから、簡易同定は、原則、遺伝子診断（PCR検定）にて行う。

1) 生物学的診断

スイートオレンジ（品種：Madame Vinous）への接木検定により行う。（CABI, 2014; Nejat *et al.*, 2011）。

Madame Vinous に芽接ぎ後、日中 32°C、夜間 27°C 程度で管理し、病徴を観察する（CABI, 2014）。接木後、8～12 週間後から新芽及び新葉が萎れ始め、葉の小型化、葉先端や葉縁の退緑斑、節間のつまり、矮化等が認められる（Roistacher, 1991）。

2) 血清学的診断

症状が認められた部位を用いて、参考 2 に示す *S. citri* に特異的な血清を用いた ELISA 等を実施する。

3) 遺伝子診断

症状が認められた部位より核酸を調整・抽出し、参考 3 に示す本細菌に特異的なプライマーを用いた PCR を実施する。

(参考 1) *Spiroplasma citri* の血清学的診断

ELISA 用の検定キットが各社より販売されている。ELISA はキット添付のプロトコルに従って行うこと。

(参考 2) *Spiroplasma citri* の遺伝子診断

本細菌の遺伝子診断法については様々なプライマーが報告されているが、Yokomi ら（2008）が設計した P58 adhesin-like gene をターゲットとした PCR 法が感度、精度、反復性に優れるとされている（Loiseau *et al.*, 2019）ことか

ら、ここでは本プライマーを記載する。

- ・ *Spiroplasma citri* 検出用プライマー (Yokomi ら、2008)
P58-6f (5' -GCG GAC AAA TTA AGT AAT AAA AGA GC-3')
P58-4r (5' -GCA CAG CAT TTG CCA ACT ACA-3')

【引用文献】

Loiseau *et al.* (2019) Detecting *Spiroplasma citri*: a comparison of PCR methods to be used for quarantine diagnostics. *European Journal of Plant Pathology* 155: 71-80.

Yokomi RK, Mello AFS, Saponari M, Fletcher J (2008) Polymerase chain reaction based detection of *Spiroplasma citri* associated with citrus stubborn disease. *Plant Disease* 92: 253-260.

エ 病徴写真等 (カンキツ属における病徴)



図1 葉における症状 (Eppo; J. M, Bove 氏提供)
葉はカップ状に巻く。



図2 果実の奇形 (EPP0; J. M. Bove 氏提供)



図3 種子の発達不良 (EPP0; J. M. Bove 氏提供)

下段：感染種子 上段：健全種子



図4 樹の生育不良 (EPP0; J. M. Bove 氏提供)

左：感染樹 右：健全樹

(その他写真) ※転載の許諾が得られなかったことから URL 等を示す。

- ・若木における症状及び果実における症状

CABI (2014) Crop Protection Compendium (*Spiroplasma citri*). (online), available from <http://www.cabi.org/cpc/datasheet/50977> (Last modified: 16. Nov. 2022).

(参考) ベクター (ヨコバイ)

以下、ベクターとなるヨコバイについて、例として日本未発生種（2種）の画像を掲載する。ただし、これら以外のヨコバイについてもベクターとなり得る点に注意すること。



図5 *Neoliturus haematoceps* (EPP0; J. M. Bove 氏提供)



図6 *Circulifer tenellus* (和名：テンサイヨコバイ、EPP0;
A. C. Magyarosy 氏提供)

オ 対象病害の解説

学名：*Spiroplasma citri* Saglio *et al.*, 1973

英名：Citrus stubborn disease

分布：パキスタン、マレーシア、アラブ首長国連邦、イスラエル、イラク、イラン、オマーン、サウジアラビア、シリア、トルコ、ヨルダン、レバノン、イタリア、キプロス、スペイン、フランス、アルジェリア、エジプト、スーダン、チュニジア、モロッコ、アメリカ合衆国、ベネズエラ、メキシコ、ニュージーランド等

宿主植物：カンキツ（ミカン）属、キンカン属、カラタチ属、セイヨウワサビ、ニチニチソウ、ゴマ、ニンジン、セロリー等

生態：*Spiroplasma citri*は、師管の師細胞のみに影響し、カンキツ類を含み幅広い宿主範囲を持つ。カンキツ属のオレンジ、レモン、マンダリン及びグレープフルーツは本細菌に特に感受性が高い（CABI, 2014）。

ミカン科以外の栽培種や野生植物において感染報告があるが、潜在感染で、発病の確率も低い（CABI, 2014）。暑く乾燥した環境で発生する病気で、カンキツ属植物の品質や生産量に大きく影響を及ぼす（CABI, 2014）。感染樹は葉の退緑斑、モットル、奇形、小葉化、枝の節間のつまり、若枝の叢生、枝の直立、季節外の開花、結実が見られる。感染した樹では果実の発達は抑制される。果実では小果、変形等の症状が見られ、種子形成が阻害される（CABI, 2014）。

カンキツ類では28-32°Cの高温で発症し、高温下では数ヶ月症状が続くが、低温下では目に見える症状は現れない（CABI, 2014）。

分散：

1) 自然分散

ヨコバイ類により媒介される。地中海地域では*Neoaliturus haematoceps*、テンサイヨコバイ (*Circulifer tenellus*) が、米国では *Scaphytopius nitridus*, *Scaphytopius acutus*, テンサイヨコバイが媒介（永続伝搬）した報告がある。ヨコバイが摂食時に保毒した*S. citri*は10-20日後に感染可能となる（CABI, 2014; Breton *et al.*, 2010）。

*S. citri*を獲得後30日経過したテンサイヨコバイを用いたニンジン及びニチニチソウへの伝搬試験では、10-45日後に明らかな病徴が観察された（Mello *et al.*, 2009）。

*Circulifer haematoceps*は、トルコ、モロッコ、シリア、コルシカ島（フランス）を含む地中海エリアでの本細菌の主要なベクターである。トルコでは他の5種のヨコバイが*S. citri*を媒介することが知られるが、

*Circulifer opacipennis*のみがニチニチソウへ伝染させた。米国での本細菌の主要なベクターはテンサイヨコバイであり、本細菌はテンサイヨコバイの体内で増殖することが報告されている (Towsend *et al.*, 1977)。

なお、*Neoaliturus*属、*Circulifer*属、*Scaphytopius*属は日本に発生していない。

2) 人為分散

接ぎ木による伝搬が知られている (CABI, 2014)。

防除：健全な穂木の生産 (CABI, 2014)、感染樹の伐採・伐根等。

<参考文献>

- Breton, M., S. Duret, J. Danet, M. Dubrane, and J. Renaudin (2010) Sequences essential for transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector, *Circulifer haematoceps*, revealed by plasmid curing and replacement based on incompatibility. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3198-3205
- CABI (2014) Crop Protection Compendium (*Spiroplasma citri*). (online), available from <http://www.cabi.org/cpc/datasheet/50977> (Last modified: 16. Nov. 2022).
- Mello, A. F. S., A. C. Wayadande, R. K. Yokomi and J. Fletcher (2009) Transmission of different isolates of *Spiroplasma citri* to carrot and citrus by *Circulifer tenellus* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Econ Entomol.* ;102(4):1417-22.
- O`Hayer, K. W, G. A. Schultz, C. E. Eastman, J. F. Fletcher and R. M. Goodman (1983) Transmission of *Spiroplasma citri* by the aster leafhopper, *Macrostelus fascifrons* (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Appl. Biol.*, 102: 311-318.
- Towsend, R., P. G. Markham and K. A. Plaskitt (1977) Multiplication and morphology of *Spiroplasma citri* in the leafhopper *Euscelis plebejus*. *Ann. Applied Biol.* 87: 307-313.