



[1] ISPM 27:2006 の草稿付属書 - *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* (カンキツかいよう病) (2004-011)

[2] 草稿履歴

[3]

本文書の日付	2013年4月4日
文書の種類	ISPM 27:2006 の新たな付属書の草稿 (規制有害動植物の診断プロトコル)
本文書の現在の段階	各国協議 (MC) のため、SC の e-decision により承認
出典	作業プログラムトピック : 細菌、CPM-1 (2006) 元のトピック : <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrii</i> (2004-011)
主要な段階	2004年11月 SC でトピックを作業プログラムに追加 CPM-1 (2006年) でトピックを作業プログラムに追加 (2004-011) 2012年11月 TDPD で草稿プロトコルを改正 2013年4月 各国協議 (MC) の用に SC で e-decision により承認 (2013 eSC 5月12日) 2013年7月 各国協議 (MC)
専門分野の先導者歴	2006-07 SC Lum KENG-YEANG (MY) 2011-05 SC Robert TAYLOR (AU)
技術レベルでの会議	本プロトコルの第1草稿は以下の者により執筆された : ・ Enrique VERDIER (General Direction of Agricultural Services, Biological Laboratories Department, Montevideo, Uruguay) ・ Rita LANFRANCHI (Plant Pests and Diseases Laboratory, National Service of Agrifood Health and Quality (SENASA), Capital Federal, Argentina) ・ Maria M. LÓPEZ (Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Spain)により執筆された。 以下の専門家も本草稿作成にあたって寄稿してくれた : ・ Jaime CUBERO (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Spain)。
診断プロトコル作成中の主な議論点	
注釈	2013-05-06 編集(AF)

[4] 1.有害動植物情報

[5] *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) は、カンキツ細菌かいよう病の病原体である。アジア、南アメリカ、オセアニア、アフリカ及びアメリカ合衆国のフロリダといった多くの国々で一般的に見られる熱帯及び亜熱帯の環境で育つ *Rutacea* (EPPO, 1979) の多くの栽培種—特に *Citrus* spp.、*Fortunella* spp.及び *Poncirus* spp.—に深刻な損害を与える—の損害は深刻である (CABI, 2006; EPPO, 2006)。特定の宿主範囲には Xcc の変異株が見られ、A\* 及び A<sup>w</sup> として同定及び指定されている。(Sun *et al.*, 2000, Vernière *et al.*, 1998;)。これらの株は、アメリカ合衆国フロリダの *Citrus aurantiifolia* (メキシカンライム) 及び *Citrus macrophylla* Webster (Alemow) にのみ影響を与えるものである (Cubero & Graham, 2002, 2004)。

[6] カンキツかいよう病は主に晩夏から秋にかけて、苗木及び若い樹で活発に生長する芽及び葉に発生する。感染宿主の葉、芽、枝及び果実にかいようの病斑が現れる。*Phyllocnistis citrella* による被害は葉の感染性を

増加させカンキツかいよう病を発生させる (Hall *et al.* 2010)。

[7] Xccは発病した植物の組織の中で、宿主及び非宿主植物に固着する着生植物として、あるいは根覆い藁又は土壌中の腐生植物として生存可能である。しかしながら、越冬する病斑、特に角度のある芽に見られる病斑は、翌シーズンの最も重要な接種物となる。近距離散布の主なメカニズムは、植物中及び植物間で風に飛ばされる雨水及び飛び跳ねる水による：細菌は病斑の表面を流れる雨水により散布され、その後健康な芽に飛散する (CABI 2006)。芽接ぎ用の若枝、台木の苗木及び芽吹いた木を含んだ感染植物体の移動は長距離散布に関与してきた。この病原体が種子伝染性であることを証明するものはない (CABI 2006)。

## [8] 2. 分類学上の情報

[9] 名前: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Hasse) Gabriel *et al.* 1989

[10] シノニム: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin *et al.* 1995

[11] *Pseudomonas citri* Hasse 1915

[12] *Xanthomonas citri* (Hasse 1915) Gabriel *et al.* 1989

[13] *Xanthomonas citri* f.sp. *aurantifoliae* Namekata 及び Oliveira 1972

[14] *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye 1978

[15] *Xanthomonas citri* (ex Hasse) nom. rev. Gabriel *et al.* 1989

[16] *Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* Gabriel *et al.* 1989

[17] 分類学上の位置: 細菌、Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae

[18] 一般名: citrus canker, citrus bacterial canker

[19] 注釈: 最近 Xcc は A 病原型 *X axonopodis* pv. *citri* から再分類された。Gabriel *et al.* (1989) による学名命名法 (1989) が復活し、現在、カンキツ細菌かいよう病の病原型は、*X. citri* subsp. *Citri* となっている (Bull *et al.*, 2010; Schaad *et al.*, 2006)。*X. axonopodis* pv. *Citri* の B 及び C 病原型は、*X. fuscans* subsp. *Aurantifolii* に再分類された (Schaad *et al.* 2006)。

## [20] 3. 検出

### [21] 3.1 病徴を表わしている植物の検出

[22] カンキツかいよう病の診断は、栄養培地上の形態的特徴の観察、血清検定 (免疫蛍光 (IF) による)、分子検定 (ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による)、葉片又は分離葉の生物学的解析及び病原性試験によって行われる。全ての検定で、陽性及び陰性コントロールが含まなければならない (参照コントロールはセクション 4 を参照)。

[23] 3.1.1 病徴

[24] この病気は特徴として、果実の皮、葉、茎及び芽にかさぶた又はクレーターのような病斑を作る。カンキツかいよう病の症状は、あらゆる季節に苗木に発生し、角度を持つ芽が増加し見られる晩夏から秋にかけて若木に発生する (CABI 2006) (図 1-4)。自然環境では、木が十分に果実を実らすまでに生長するにつれ、角度のある芽の数が少なくなり、古い葉の組織及び熟した果実はカンキツかいよう病への感染に抵抗力があるため、この病気はあまり見られなくなってくる。病気の程度は、宿主植物の種類及び栽培品種の感度により異なる (Goto, 1992)。

[25] 果実の症状。クレーター上の病斑が果実の表面に形成される。病斑は果実に単独で分散して現れることもあり、また、いくつもの病斑がまとまって現れ、不規則な模様を作ることもある。未熟な感染果実に樹脂性物質の滲出が観察されることがある。病斑が皮を突き破ることはない。

[26] 枝の症状。乾燥した環境では、かいよう病の斑点はコルク又はスポンジのような状態で、盛り上がり、表面には亀裂が生じる。しかし、湿気のある環境では、病斑は急速に拡大し、表面に亀裂が生じることはなく、端部分は油っぽい。抵抗性のある栽培品種では、病変組織と健康な組織との間でカルス層が形成されることがある。かいようのかさぶたは、荒い表面を刃物で削り、外側のコルク化した層を取り除き、健康な緑の樹皮の中の薄茶色から濃い茶色の病斑を露出することで同定され得る。変色部分の形状は様々であり、大きさは宿主植物の感受性により、5-10mm となる。

[27] 葉の症状。まず、明るい黄色の点が葉の裏側に発生する。その後、葉の両面に茶色の病斑が現れ、荒く、割れたコルク状態となる。かいよう部分の周囲は水浸状で黄色いハローによって囲まれ得る。

[28] カンキツかいよう病と、他の植物病原細菌及び糸状菌又は生理的障害を原因とするかさぶた又は葉に見られる点の症状との区別は、難しいことがある。カンキツ類に寄生しカンキツかいよう病のような症状を引き起こす他の細菌には *X. alfalfa* subsp. *citrumelonis* 及び *X. fuscans* subsp. *Aurantifolii* がある。これらの細菌の宿主範囲は両方とも限られており、あまり目立つ症状を引き起こすことはなく、果実に病斑を作成することはめったにない (Timmer et al. 2000)。*Elsinoë fawcettii* 菌を原因とするカンキツ類のそうか病は、特に、カンキツ類のそうか病に抵抗性を持つ品種で、カンキツかいよう病に似た症状が見られるという報告がされてきた (Taylor et al. 2002; Timmer et al. 2000)。しかし一般的に、そうか病の病斑はカンキツかいよう病の病斑よりも乾燥しており、不規則な形をしている。また、特徴的な黄色いハローが見られないことがある。カンキツそうか病は、細菌粘塊が観察されないことから、カンキツかいよう病と区別できる。

[29] 3.1.2 サンプル分離

[30] 症状を見せる植物体から Xcc をうまく分離するためには、新しく用意されたサンプル抽出物が必須である。しかしながら、症状が非常に進んでいる場合、又は環境状態が好ましくない場合には、培養可能な Xcc 細胞の数は非常に少なく、プレートへ分離しても競合する腐生細菌又は拮抗細菌の方が多い状態となる。Xcc コロニーと *Pantoea agglomerans* とを混乱しないように、特別な注意を払うべきである。*Pantoea agglomerans* もかいよう病の病斑から共に分離され、標準細菌培地で黄色いコロニーを発生させる。

[31] 原因生物体の分離は、Xcc のコロニーが特徴的な外見を有するような適切な培地プレート上に病斑抽出物をこすりつけて行うことができる。Xcc だけに利用できる選択培地というものは、まだ存在していない

[32] 病斑を 0.5-1.0ml の生理食塩水 (NaCl を滅菌蒸留水で 0.85 % となるまで希釈する、pH: 7.0) に浸して柔らかくし、必要であれば、1% の NaClO で 1 分間消毒し、滅菌蒸留水で 3 度すすぎ、砕いて粉末状にする。抽出物のアリコート栄養培地の上にこすりつける。一般的な分離培地の中でも適しているものは、ニュートリエント寒天培地に 0.1% のブドウ糖 (NGA)、イーストペプトンブドウ糖寒天 (YPGA) (イースト抽出物 5g ; Bacto™ ペプトン 5g ; ブドウ糖 10g ; 寒天 20g ; 蒸留水 1l pH 7) 、又はワキモト培地 : じゃがいも培養液 (250 ml ; 蔗糖 15g ; ペプトン 5g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.8g ; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 7 H<sub>2</sub>O、0.5g ; Bacto™ Agar 20g ; 蒸留水 1 リットル ; pH 7.2) を補ったものである。必要であれば、培地を加圧滅菌した後、ろ過滅菌されたシクロヘキシミド (100 mg/l) が加えられる。3 つの培地全てに現れるコロニーの形

状は丸く、凸状、端はなめらかで、粘液状でクリームがかった黄色である。3～5日間、25 - 28℃で培養された後で、その生長を判断する。商業果実のサンプルでは、細菌にストレスがかかってプレートでの培養が困難となり、そのためさらに数日間の培養が必要となる場合がある。あるいは生物学的検定により、サンプルから細菌を取り出す方法が採用されることがある。

### [33] 3.1.3 血清検定 - 免疫蛍光

[34] 細菌細胞の血清検定では、プレートから1白金耳量の新鮮な培地を採取し、1mlのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (NaCl 8 g; KCl 0.2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g; 蒸留水 1 リットル; pH 7.2) で再び懸濁して約 10<sup>8</sup> コロニー形成単位 (c.f.u.) /ml とする。この懸濁液を 10,000g で 2 分間、遠心分離し、その後上澄みを捨て、100ml のコーティング緩衝液で再び細胞を懸濁し、血清検定に使用する。

[35] 植物組織の血清検定では、症状が出ているサンプルー新芽、小枝、葉及び果実 (全て壊疽病斑を持つもの)、又は小枝、枝、幹若しくはカラー上のかいよう由来の組織ーが選ばれるべきである。植物体は採取後、可能な限り分析されるべきである; 処理されるまでの間最長 2 週間、4 - 8℃で貯蔵可能である。サンプルは、使用される特定の血清検定のために奨励される一般的な手順に従って処理されるべきである。一般的に、植物組織は血清検定で使用される前に、新しく準備された酸化防止浸軟緩衝液 (ポリビニルピロリドン (PVP - 10)、20g; マンニトール 10g; アスコルビン 1.76g; 還元グルタチオン 3g; PBS 10mM 1 リットル; pH7.2; ろ過により滅菌) 又は PBS (NaCl 8 g; KCl 0.2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g; 蒸留水を加えて 1 リットル pH7.2 にする) の中で粉碎される。

[36] 細菌調合剤又は検定される植物サンプルそれぞれについて、25µl のアリコートピペットで採取し、プラスチックでコーティングされたマルチウィンドウ顕微鏡スライドに移し、空気乾燥させ、その後フレームの上で徐々に熱定着させる。別のスライドを各検定細菌用に別々に用意し、また、酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法) で使用するので陽性及び陰性コントロール用も用意する。市販の抗血清を PBS (pH7.2) で薄め、各スライドのウィンドウに適切な希釈液を加える。陰性コントロールは一度の希釈液及び PBS で正常な (免疫前) 血清から構成されるかもしれない。スライドを湿気のある室で室温で 30 分間培養する。スライドの小水滴を払い落とし、PBS ですすぎ、その後それぞれ PBS で 5 分間、3 回にわたって洗浄する。25 µl のヤギ抗ウサギ抗体ガンマグロブリン - フルオレセインイソチオシアネート結合物 (FITC) を適切に希釈して各ウィンドウにピペットで移す前に、スライドの水分を丁寧に拭う。スライドを暗所で室温で 30 分間培養し、ゆすぎ、洗浄し、水分を拭い、乾燥させる。最後に、10 µl の 0.1 mmol l<sup>-1</sup> リン酸緩衝グリセリン (pH 7.6) をフェージング防止物質と共に各ウィンドウに加え、その後カバーガラスで覆う。

[37] 液浸油を使用し、600 又は 1000 の倍率で、蛍光顕微鏡を用いてスライドを観察する。FITC は顕微鏡の紫外線を通じて、蛍光する明るい緑色に見える。分かっている細菌の陽性コントロール群が蛍光桿菌細胞を示し、正常血清及び PBS の陰性コントロール群がそうでないならば、細菌細胞壁蛍光のサンプルウィンドウを検査し、Xcc の大きさと形状を持つ細胞を探す。この方法により、ほぼ 10<sup>3</sup> cells/ml 程度ならば検出することが可能になる。

### [38] 3.1.4 分子検出

#### [39] 3.1.4.1 分子検定のコントロール

[40] 信頼性のある検定結果を得るためには、適切なコントロールー検定の種類及び要求される確実さの程度に応じるーが最も重要である。PCR では、陽性核酸コントロール、内部コントロール及び陰性増幅コントロール (コントロール鑄型ではない) が最低限使用されるべきである。それぞれ一連の核酸分離や対象とする有害動植物又は対象核酸の増幅用に検討されるべきこれらとその他のコントロールについては以下に記載される。

[41] **陽性核酸コントロール**準備前 (貯蔵された) 核酸、全ゲノム増幅 DNA 又は合成コントロール (例、PCR のクローン産物) を検定方法 (抽出は除く) 及び PCR の増幅の有効性を監視するためのコントロールとして

使用することができる。

[42] 内部コントロール

[43] 従来型及びリアルタイム PCR の場合、COX (Weller *et al.*, 2000)、16S リボソーム(r)DNA (Weisberg *et al.*, 1991) 等の植物ハウスキーピング遺伝子 (HKG) を、抽出失敗、核酸変質又は PCR 阻害物質の存在による PCR の偽陰性の可能性を排除するためのコントロールとして PCR プロトコルに組み入れるべきである。

[44] 陰性増幅コントロール (鋳型コントロールではない) 従来行われているリアルタイム PCR では、反応混合物調剤中の汚染による偽陽性を除外するため、が必要となる。反応混合物を調剤するために使用された PCR 用水が、増幅段階で加えられる。

[45] 陽性抽出コントロール このコントロールは対象物から取り出された核酸が、PCR の増幅に十分な量と質を持つこと、そして対象物の検出を確実にするために行われる。感染寄主の組織又は健康な植物組織から抽出された核酸が対象物と共に固定される。

[46] 陽性コントロールは、DNA 抽出のために使用される植物ごとの葉の組織の全量の約 1/10 とするべきである。PCR に関しては、陽性コントロール又は陽性サンプルのエアゾール剤による二次汚染を回避するため、注意を必要とする。必要ならば、研究室で使用された陽性コントロールで配列を決定すべきである。これにより、その配列は、正確な大きさの PCR アンプリコンから分かった配列と容易に比較できる。あるいは、合成陽性コントロールには、正しい大きさの PCR アンプリコンと再び比較可能な、知られている配列を用いることができる。

[47] 陰性抽出コントロール このコントロールは、核酸抽出時の汚染及び宿主組織との交差反応を検査するために行われ、核酸抽出とその後の非感染宿主組織の増幅が必要である。多くの陽性サンプルが予測される場合には、複数のコントロールが推奨される。

[48] 3.1.4.2 感染カンキツ組織からの DNA 抽出

[49] 寄生されたカンキツの組織から抽出した DNA はもともとは Hartung *et al.* (1993) によって臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) プロトコルを用いて行われたが、他に商業的方法が存在し、イソプロパノールプロトコル (フェノールを必要としない) が、広く評価されてきていた (Llop *et al.*, 1999)。イソプロパノールプロトコルでは、病斑又は寄生が疑われる植物物質が小片に刻まれ、PBS に入れ、ロータリーシェーカーを使用して室温で 20 分間回転させる。上澄みは (植物体を除去するために) ろ過され、その後 20 分間、10,000g で遠心分離する。ペレットを 1ml の PBS に再び懸濁する。その中から 500  $\mu$ l を継続解析又は寒天培地プレートでの直接分離のために取り分けられ、500  $\mu$ l は 10 分間 10,000 g で遠心分離する。ペレットは 500  $\mu$ l の抽出緩衝液 (200 mM の Tris HCl pH 7.5、250 mM の NaCl、25 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.5% のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2% のポリビニルピロリドン (PVP)) の中で再懸濁され、ボルテックスされ、継続する振動とともに室温で 1 時間放置する。懸濁液はその後 5 分間 5000 g で遠心分離する。その後 450  $\mu$ l の上澄みを取り除き、新しいチューブに移して 450  $\mu$ l のイソプロパノールを加える。懸濁液をゆっくりとかき回し、室温で 1 時間放置する。ペレットペイント@co-precipitant (Cubero *et al.* 2001) の使用により、沈殿を加速することができる。懸濁液に 10 分間 13,000 g で遠心分離を行い、上澄みを除去し、ペレットを乾燥させる。ペレットを 100  $\mu$ l の水の中で再懸濁する。50  $\mu$ l の PCR 反応において、5 マイクロリットルのサンプルが使用される。従来型 PCR 方法で、 $10^3$  c.f.u./ml を検出できる (Hartung *et al.* 1993)。

[50] 3.1.4.3 従来型 PCR

[51] Xcc 診断用のプライマーのペアは、いくつかの種類が入手可能である。Hartung *et al.* (1993) によるプライマー 2 及び 3 は、Xcc 用に BamHI 制限断片長多型の DNA 断片を対象としており、その便利な特異性及び感度 (およそ約  $10^2$  c.f.u./ml) により、植物体の検査で最もよく使用されている。プライマー J-ph1 及び J-



pth2 は、カンキツかいよう病の症状を引き起こす *Xanthomonas* 株の中の毒性遺伝子 *pthA* に存在する核局在化シグナルの断片 197 塩基対 (bp) を対象としている。これらの株には、*Xcc*、*X. Fuscans* subsp. *aurantifolia* (以前はカンキツかいよう病の病原型株 B 及び C であった) 並びにフロリダで検出された非定型 *Xcc* 菌株 A\* 及び A<sup>w</sup> が含まれる (Cubero & Graham, 2002)。プライマーは一般的なものだが、Hartung *et al.* (1993) によるプライマーよりも感度は低い (植物体で 10<sup>4</sup> c.f.u./ml)。しかしながら、Hartung のプライマーは、非定型 *Xcc* 菌株 A\* 及び A<sup>w</sup> 又は *X. Fuscans* 亜種 *aurantifolia* を検出することはない。非定型 *Xcc* 菌株 A\* 及び A<sup>w</sup> の存在が疑われる状況—例えばカンキツかいよう病の症状が宿主である *C. aurantiifolia* (メキシカンライム) 及び *C. macrophylla* Webster (Alemow) で観察された場合—両方のプライマーセットを使用すべきである。

[52]           •   **Hartung *et al.* (1993) による PCR**

[53]   プライマーは :

[54]           •   2 (Reverse): 5'-CAC GGG TGC AAA AAA TCT-3'

[55]           •   3 (Forward) : 5'-TGG TGT CGT CGC TTG TAT-3'.

[56]   PCR 混合物は滅菌されたバイアルの中で作られ PCR 緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 9; 20 mM NaCl; 1% Triton™ X-100; 0.1% gelatin; 3 mM MgCl<sub>2</sub>)、各プライマー 2 及び 3 を 1 μM、各デオキシヌクレオチド三リン酸塩 (dNTPs) を 2 mM、及び *Taq* DNA ポリメラーゼ 25U で構成される。5μl の抽出 DNA サンプルを反応ごとに合計 50μl となるように PCR 混合物 45μl に加えられるべきである。反応条件は変性段階では 2 分間 95°C であり、その後 60 秒間 95°C、70 秒間 58°C、75 秒間 72°C のサイクルを 35 回続ける。最後の伸長段階では 10 分間 72°C を保つ。アンプリコンの大きさは 222 bp である。

[57]   Cubero and Graham(2002)の PCR プロトコル

[58]   プライマーは以下の通り :

[59]           •   *J-pth1*(Forward): 5'-CTT CAA CTC AAA CGCC GGA C-3'

[60]           •   *J-pth2* (Reverse): 5'-CAT CGC GCT GTT CGG GAG-3'.

[61]   PCR 混合物は消毒したバイアルの中に用意され、1×*Taq* buffer, MgCl<sub>2</sub> 3mM, *J-pth1* 及び *J-pth2* の各プライマー 1μl, 各 dNTPs 0.2mM, 及び *Taq* DNA polymerase 1U から構成される。抽出された DNA サンプル 2.5μl が PCR 混合物 22.5μl に加えられ、各反応ごとに合計 25μl とする。反応条件は、最初の編成段階は 94°C 5 分間、続いて 93°C 30 秒、58°C 30 秒、及び 72°C 45 秒を 40 サイクル、そして最後の伸長段階は 72°C 10 分間。アンプリコンの大きさは 197 bp である。

[62]   ネスト化 PCR、免疫捕獲及び植物の *Xcc* の直接及び感度検出のために行われるネスト化 PCR 産物の比色検出も展開される (Hartung *et al.* 1993)。異なるプロトコルでの比較感度並びに純粋培養及び果実抽出物のプライマーの検討が報告されている (Golmohammadi *et al.* 2007)。

### [63]   3.1.4.4 リアルタイム PCR

[64]   Llop *et al.* (1999)によって記述された前述のプロトコルにより植物体から DNA を抽出した後で、ペレットを 100μl の滅菌超純水の中で再懸濁し、後に使用するまで -20°C で貯蔵しておく。

- [65] *J-pth3* (5'-ACC GTC CCC TAC TTC AAC TCA A-3') プライマー及び *J-pth4* (5'-CGC ACC TCG AAC GAT TGC-3') プライマーセット並びに 5'方向に 6-カルボキシフルオレセイン (FAM) 及び 3'方向にテトラメチルローダミンのラベルを持つ TaqMan®反応プローブ (*J-Taqpth2*) (5'-ATG CGC CCA GCC CAA CGC-3') が、*pth* 遺伝子の結果に基づいて作られた。*pth* 遺伝子とは、他の研究、特に Xcc 菌株の検出のために使用される主な毒性遺伝子である (Cubero & Graham, 2005)。これらの株は、Xcc, *X. Fuscans* 亜種 *aurantifolii* (以前はカンキツかいよう病原原型菌株 B 及び C) 並びにフロリダで検出された非定型 Xcc 菌株 A\* 及び Aw が含まれる。
- [66] リアルタイム PCR は、12.5 µl の QuantiMix イージーキットを含む反応混合物に 2 µl の鋳型 DNA を加えて、行われる。QuantiMix イージーキットは、Quantimix イージーマスターミックス<sup>1</sup>、MgCl<sub>2</sub> (50mM)、1 µl の 10 µM 順方向プライマー (*J-RTpth3*)、1 µl の 10 µM 逆方向プライマー (*J-RTpth4*)、0.5 µl の 10 µM TaqMan® プローブ (*J-Taqpth2*) から成り、滅菌蒸留水で採集反応量を 25µl とする。リアルタイム PCR は、ABI<sup>2</sup> PRISM® 7000 Sequence Detection System によって完了する。全てのプライマー及びプローブの増幅条件は、95°C で 15 分間の最初の活動段階の後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分のサイクルを 40 回実施することである。
- [67] リアルタイム PCR は、従来の PCR 法 (Cubero & Graham 2002, 2005) に使用される *pth* 遺伝子プライマーと類似する特殊性を提供するものであり、罹患した葉の病斑及び培養栽培の希釈物から信頼性をもって約 10 c.f.u. の Xcc を検出することができる (Mavrodieva *et al.*, 2004)。最近、この方法は標準及びネスト化 PCR と比較され (Golmohammadi *et al.*, 2007)、感度は非常に良いことが分かった (10 c.f.u./ml)。
- [68] **3.1.5 従来型リアルタイム PCR 検定結果の判断**
- [69] **従来型 PCR**
- [70] 病原体特異的な PCR が有効とされるのは、以下の場合のみである：
- [71] 陽性コントロールが、細菌について正しい大きさの産物を形成する：
- [72] 陰性抽出コントロール及び陰性増幅コントロールでは、細菌に対する正しい大きさのバンドが形成されることはない。
- [73] 16S rDNA 内部コントロールプライマーも使用される場合、陰性 (健康な植物の組織) コントロール (使用された場合)、陽性コントロール及び検定サンプルそれぞれは、1.6 キロベース (kb) バンド (16S rDNA) を必ず形成することになる。合成又はプラスミド陽性コントロールは、1.6 kb バンドを形成することはないことに注意。サンプルが内部コントロールプライマー増幅を失敗したならば、それは、例えば DNA 抽出の失敗、核酸が反応混合物に含まれていなかったか、PCR 抑制物質である混合物が DNA 抽出物に存在していたか、又は DNA が変質したことを意味する。
- [74] 正しい大きさのアンプリコンが形成されるならば、サンプルは陽性と考えられる。
- [75] **リアルタイム PCR**
- [76] リアルタイム PCR が有効となるのは、以下の場合のみである：
- [77] 陽性コントロールが、病原体特異的なプライマーに増幅曲線を形成する；及び
- [78] 陰性抽出コントロール及び陰性増幅コントロールに、増幅曲線は見られない (つまり、サイクル閾値

(Ct) は 40)。

[79] COX 内部コントロールプライマーも使用されるならば、陰性コントロール (使用された場合)、陽性コントロール及び検定サンプルそれぞれは、増幅曲線を形成するはずである。サンプルが内部コントロールプライマーで増幅曲線を形成しないならば、それは、例えば DNA 抽出の失敗、DNA が反応混合物に含まれていなかった、PCR 抑制物質の混合物が DNA 抽出物に存在していた、又は核酸が変質していたことを示す。

[80] サンプル検定により典型的な増幅曲線が形成されたならば、サンプルは陽性と考えられる。検定を始めて行う際には、各研究室でサイクルのカットオフ値を確認する必要がある。

### [81] 3.1.6 生物学的解析

#### [82] 3.1.6.1 葉片の接種検定

[83] この検定は、Xcc への感度が高いカンキツ類の葉の組織で、検定時に罹患サンプル抽出物による接種を受け、細菌の増幅及び病気の初期のう胞の形成に適切な条件のもとで培養されたものを使用する。

[84] この生物学的検定のプロセスは、ELISA プレート電子レンジで 15 分間滅菌することから始まる。その後、室温でクリーンベンチを使用しながらウェルに 200  $\mu$ l の 1.5% 滅菌寒天水を加える。若い *Citrus paradisi* var. *Duncan* (グレープフルーツ) の葉を 1% の NACIO に 1 分間浸して表面殺菌する。滅菌蒸留水で葉を 3 度ゆすいだ後、葉の表面をグリーンベンチで乾燥させる。温度は室温である。葉片には穴が開けられ (96° のエタノールで殺菌済)、裏面を上にして寒天水が入っている各ウェルに置く。柔らかくしたカンキツかいよう病の病斑 50  $\mu$ l (各サンプルに 4 反復) を加える。

[85] 10<sup>5</sup> c.f.u./ml の Xcc 懸濁液を陽性コントロールとして、無菌食塩水を陰性コントロールとして使用する (それぞれについて 4 反復)。プレートは Parafilm® でシールし、相対湿度をほぼ 100% とし、常に光を当て 12 日間、28°C で培養する。各葉片での初期白色のう胞の形成の観察は第 3 日目から行われ、セクション 3.1.2. に記載されるように、Xcc には立体顕微鏡及び分離方法を使用する。症状の見られない葉片は、半選択培地に分離し、生きている細菌の存在のために、継続解析が行われる (Verdier *et al.* 2008)。12 日後、Xcc が存在するならば、植物組織の中で細菌細胞が増加し、より多くの数の細胞を培地に分離することができる。この生物学的検定は非常に特別かつ感度の高い (10<sup>2</sup> c.f.u./ml) 診断方法である (Verdier *et al.* 2008)。

#### [86] 3.1.6.2 切断葉濃縮

[87] *Citrus paradisi* var. *Duncan* (グレープフルーツ) の傷ついた切断葉を使用して、Xcc を選択して濃縮することも可能である。温室栽培の植物から採取した若い末端葉を水道の流水で 10 分間洗い、1% の NACIO で表面を 1 分間殺菌し、滅菌蒸留水で十分に無菌リンスする。各葉の下面に、針により穴をあけ、又はメスによる小さな切り込みを入れて無菌の傷を作る。葉面全体を下面を上にして、ELISA プレートのウェル中の 1% の滅菌水寒天培地に置く。柔らかくなったカンキツかいよう病斑の水滴 10-20  $\mu$ l を加える。葉片生物学的検定用の陽性コントロール及び陰性コントロールを使用する。培地は 25°C に設定し、光を当て、7-12 日後にはこのう胞の発育が観察される。前述のようにして Xcc を分離する (EPPO, 1998)。

### [88] 3.2 無症状植物における検出

[89] 半選択培地上の無症状植物から Xcc を分離するには、ペプトン緩衝液で葉または果実を洗浄し、上澄みを遠心分離し、その後培地で培養する (Verdier *et al.* 2008)。10 の葉又は 1 つの果実が 1 サンプルとなる。

[90] 室温の 50 ミリリットルのペプトン緩衝液 (NaCl, 8.5 g ; ペプトン, 1 g ; Tween® 20, 250  $\mu$ l ; 蒸留水, 1 l ; pH : 7.2) の中で、サンプルを 20 分間振動させる。サンプルが大量である場合には、200ml のペプトン緩衝液に入れた 100 枚の葉が使用され得る。果実であれば、50ml のペプトン緩衝液が入った滅菌袋にそれ



ぞれの果実を入れ、室温で20分間振動を与える。

[91] その後、懸濁液を20分間6,000gで遠心分離する。上澄みをデカンタに移し、ペレットを0.85%の生理食塩水10mlの中で再懸濁する。1/100及び1/1000の希釈液のアリコート(100 µl)をそれぞれ懸濁し、XOS半選択培地に3本の画線をつける(蔗糖、20g; ペプトン、2g; グルタミン酸ナトリウム、5g; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、0.3g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2g; EDTA Fe、1mg; シクロヘキシミド、100mg; セファレキシム、20mg; カスガマイシン、20mg; メチルバイオレット2B、0.3mg; Bacto®Agar、17g; 蒸留水、11; pH: 7.0;) (Monier, 1992)。28°Cで5-6日間培養した後で生長、コロニー型及び形態が診断される(セクション3.1.2を参照)。

#### [92] 4. 同定

[93] 推定Xccコロニーの同定には、複数の方法によって検証されるべきである。なぜならば、*X. fuscans* subsp. *aurantifolia* 及び *X. alfalfa* subsp. *citrumelonis* 等の *Xanthomonas* の他の種類がかんきつ類から分離可能であるためである。方法には、栄養培地での形態特徴の観察、血清学的検定、分子検定、葉片又は切断葉の生物学的検定及び病原性試験がある。

[94] 同定の最低条件は、細菌の分離及び3つの手法それぞれから得られる陽性結果である: (1) 2セットのプライマーを使用するPCR(セクション4.1を参照)、(2) 特定の単クローン抗体を使用する二抗体サンドイッチ(DAS)-ELISA法又は間接ELISA法(セクション4.2及び4.2.1を参照)、(3) Kochの原則を満たすためのかんきつ宿主への接種による病原性試験(セクション4.3及び3.1.5を参照)。存在する菌株を更に詳しく特徴付けるため、追加検定(セクション4.4及び4.5を参照)が可能である。全ての検定において、陽性コントロール及び陰性コントロールに含めなければならない。推奨される方法は、以下のセクションに記載されている。

[95] 特に以下に挙げる収蔵物とはとりわけ、Xcc参考株を提供してくれる(要請コントロールとしての使用が推奨されるXccの分離株が提供される)

[96] National Collection of Plant Pathogenic Bacteria からの NCPPB 3234, Central Science Laboratory, York, UK;

[97] Collection Française de Bactéries Phytopathogènes からの CFBP 2911, INRA Station Phytobactériologie, Angers, France;

[98] The International Collection of Microorganisms from Plants からの ICMP 24, Landcare Research(Manaaki Whenua), New Zealand Ltd, Auckland, New Zealand;

[99] The American Type Culture Collection からの ATTC 49118, Manassas, VA, USA

[100] Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria からの IBSBF 1594, Centro Experimental Central do Instituto Biológico - Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, Brazil.

[101] 培養収蔵物から直接入手した場合のみ、株の信用性は保証される。

#### [102] 4.1 PCR 方法

[103] Cubero and Graham (2002) は、毒性に関する *pthA* 遺伝子(全てカンキツかいよう病株)及び、Xcc 特異性を持つ 16S 及び 23S rDNAs の内部転写スペーサー(ITS)用のPCRプライマーを開発した。ITS配列のバリエーションにより、Xccの特定のプライマーを形成することが可能であり、これらのプライマーは、非定型菌株 A\*及び A<sup>w</sup>を検出する(Cubero & Graham, 2002)。プライマーは以下の通り:

[104] *J-Rxg*: 5'-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3'

[105] *J-RXc2*: 5'-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3'.

[106] PCR は 1× Taq buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.04 μM primer *J-RXg*, 0.04 μM primer *J-RXc2*, 各 dNTP 0.2 mM 及び 1 U Taq DNA polymerase を含む反応混合物 25μl の中で実施される。PCR 増幅条件は、セクション 3.1.4.1 で記述されている *pthA* プライマーで使用されているものと同じである。

[107] セクション 3.1.4.2 に記載されている PCR プロトコルに加え、予想される菌株の純粋培養の同定には、rDNA 及び *pthA* 遺伝子 (Cubero & Graham 2002) に基づいて 2 セットのプライマーを使用して確認することが勧められている。DNA 抽出プロセスの中で、プライマー分類及び PCR 法に関してはセクション section 3.1.4.2 に説明されている。同定は、PCR アンプリコンの結果を整理し、その配列と NCBI GenBank のデータベースに保存されている *Xcc* 株との比較を継続することで確認される。

## [108] 4.2 DAS-ELISA

[109] DAS-ELISA では、マイクロタイタープレートの各ウェルを 200 μl の炭素塩コーティング緩衝液 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.59 g ; NaHCO<sub>3</sub>, 2.93 g ; NaN<sub>3</sub>, 0.2 g ; 蒸留水, 1 l ; pH 9.6) でコーティングする。緩衝液には適切に希釈された抗 *Xcc* 免疫グロブリン (IgG) が含まれており、4°C で一晩培養する。PBS-Tween (NaCl, 8 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, 2.9 g ; KCl, 0.2 g ; NaN<sub>3</sub>, 0.2 g ; Tween®-20, 0.25 ml ; 蒸留水, 1 l ; pH 7.4) を使用してプレートを 3 回洗浄した後で、テストサンプル、陰性コントロール (健康な植物体) 又は陽性コントロール (*Xcc* の参考株) を加える (200 μl/well)。洗浄後、PBS-Tween で適度に希釈されたアルカリホスファターゼと結合した抗 *Xcc* IgG をウェルごとに加え (200 μl/well)、37°C で 2 時間、プレートで培養する。洗浄後、P-ニトロフェニルリン酸ナトリウム基質緩衝液 (1 mg/ml) を加え (200 μl/well)、プレートを室温で 30 分から 60 分培養する。吸光度は 405 ナノメーターのフィルターが装備された分光光度計で計測される。陽性としてのサンプル判定の基準は、健康な植物物質コントロール群の光学濃度 (OD) の 2 倍である。DAS-ELISA 法の検出限度は、10<sup>4</sup> から 10<sup>5</sup> c.f.u./ml (Civerolo & Fan 1982) である。この方法は植物組織の直接検出には推奨されていない

[110] モノクローナル抗体は、ELISA 法で使用可能だが、植物組織検出の感度は低いいため、純粋培養の同定のためだけに使用することが望ましい。ELISA 法で *Xcc* を検出するための市販のキット (例えば Agdia) が利用可能である。特定のデータのためには、製造会社による技術情報を参考にする。モノクローナル抗体の中には、*Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*、*Xanthomonas campestris* pv. *Zinnea*、*Xanthomonas citromelo* 及び *Xanthomonas hortorum* pv. *Pelargonii* と交差反応を起こすものがある;しかしながら、これらの病原型がカンキツ類に現れる可能性は少ない。

### [111] 4.2.1 間接 ELISA 法

[112] Alvarez *et al.* (1991) により解説されているモノクローナル抗体を使用する間接 ELISA 法が培養同定に使用できる。*Xcc* 同定のために必要なもの全てが含まれている ELISA キットが、市販されている (例、Agdia, Inc<sup>3</sup>)。理論的には、全ての *Xcc* 株が同定可能であるが、東南アジアで分離された形態上異なる株の中には、利用可能なモノクローナル抗体に反応しなかったものがあるという報告がされている (Vernière *et al.* 1998)。

[113] 純粋培養懸濁液は、2 分間約 10,000g で遠心分離され、上澄みは除去される。1ml の 1×PBS 緩衝液が加えられ、細胞はコーティング緩衝液の中で渦巻き状に再懸濁される。細菌濃度は、OD<sub>600</sub>0.01 (約 2.5 × 10<sup>7</sup> c.f.u./ml) まで分光光度法により調整される。サンプルアリコートがマイクロタイタープレートに注がれる (1 サンプルにつき、2 ウェル, 100 μl/well)。陽性コントロール (参考コントロール又は製造会社により提供されるサンプル) 及び他の細菌を持つ陰性緩衝液コントロールが含まれるべきである。プレートは乾燥するまで 37°C の場所に一晩培養される。ブロッキング溶液 (PBS 中の 5% の脱脂粉乳粉) が加えられる (200 μl/well)。プレートを室温で 30 分培養し、その後 1×PBS-Tween を使用して 2 回洗浄する。PBS-Tween

に 2.5%の粉乳粉を入れたもので適切に希釈した一次抗体を加える(100 $\mu$ l/well)。プレートは室温で 1 時間培養し、その後 1 $\times$  PBS-Tween で 3 度洗浄する。PBS-Tween に 2.5%の粉乳粉を溶解したもので適切に希釈した酵素結合体を加える(100 $\mu$ l/well)。室温でプレートを 1 時間培養し、その後 1 $\times$  PBS-Tween で 5 回洗浄する。ジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)に 1 mg/ml の P-ニトロフェニルリン酸を加えた基質溶液を新しく用意し、加える (100  $\mu$ l/well)。室温でプレートを 30 - 60 分間培養する。405 ナノメーターのフィルター付きの分光光度計を使用して OD を計測する。陽性サンプルは、DAS-ELISA 法と同様に決定される。

#### [114] 4.3 病原性試験

[115] Xcc およびその病原性は、診断確認のために、*Citrus paradisi* var. Duncan (グレープフルーツ)、*Citrus sinensis* (バレンシアスウィートオレンジ) 又は *Citrus aurantiifolia* (メキシカンライム) 等の指標宿主のパネルで、病原性により同定される。

[116] 葉の検定は、カンキツ類宿主の感受性栽培品種に注射器 (針の有無は関係ない) で注入することで、細菌コロニーの病原性を示すことができる。無傷の葉又は切断葉に接種し、高湿度の中、25 $^{\circ}$ C で培養した後で、7 - 14 日後に病斑の生長が観察される (Francis *et al.* 2010; Koizumi, 1971)。これらの検定により、Xcc の発疹性カルス状反応を容易に区別することができる。液体培地で生長する細菌又は寒天プレートの新しい画線から生まれたコロニーは、滅菌蒸留水で再懸濁され、宿主への接種のために、濃度は 10<sup>6</sup> から 10<sup>8</sup> c.f.u./ml に調整される。陰性コントロール及び陽性コントロールは、常に含まれるべきである。陽性コントロール株が接種された植物は、検定植物とは常に隔離されるべきである。

#### [117] 4.4 説明及び生物化学的特徴

[118] Xcc はグラム陰性のまっすぐな桿菌細胞であり、大きさは 1.5-2.0 $\times$ 0.5-0.75  $\mu$ m である。単極べん毛のため、運動可能である。他の *Xanthomonas* 属の仲間と、多くの生理学的生物化学的特徴を共有している。ブドウ糖の酸化代謝により有機栄養性かつ絶対的好気性である。黄色い色素はキサントモナジンである。Xcc を同定する生物科学的特徴のいくつかは表 1 に掲載されている。

[119] 表 1 *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* の主な生化学的特徴

	<i>X. c.</i> subsp. <i>citri</i>
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	- 又は弱い
ニトロセルロース還元	-
加水分解:	
スターチ	+
カゼイン	+
Tween 80	+
エスクリン	+
ゼラチン液化	+
液化ペクチン酸塩ゲル	+
アスパラギン利用	-
成長条件	
メチオニン	+
システイン	+
0.02%TTC(w/v)	-

[120] Xcc の細菌学的及び生化学的特徴のより詳細な情報については Goto (1992) を参照。

#### [121] 4.5 分子同定

[122] Xcc 及び *Xanthomonas* 属全体を含めての、カンキツ類に影響を与えるキサントモナドの特徴は、簡易かつ正確な再分類及び同定方法の開発のため、分子レベルで特徴づけられてきた。その方法には DNA-DNA 交配

法 (Vauterin *et al.* 1995)、ゲノムフィンガープリント法 (Lazo *et al.* 1987)、multilocus 配列分析法 (Young *et al.* 2008) 及び rep-PCR (Cubero & Graham, 2002; 2004) がある。

#### [123] 4.5.1 Rep-PCR フィンガープリント法

[124] Rep-PCR フィンガープリント法は、遺伝子外回文反復配列 (REP)、elements – enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) 配列及び BOX element (Louws *et al.* 1994) を使用する。特定の PCR 条件で、株同定及び特徴付けに使用できる (Cubero & Graham, 2002)。

[125] フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコール、エタノールでの沈殿及び超純水中での再懸濁のサイクルを一度行い、その後、細菌性の懸濁液から (0.2 から 0.5 で、600 ナノメートルの吸収) DNA の抽出が可能。使用されるまで、DNA は -20°C で保存される。セクション 3.1.4.1 で説明される DNA 抽出法も可能である。

[126] BOX PCR は 1× Taq 緩衝液、6 mM の MgCl<sub>2</sub>、2.4 μM の BOX1R プライマー (5'-CTACG-GCAAGGCGACGCTGCAG-3') (Louws *et al.*, 1994)、0.2 mM の dNTP、Taq ポリメラーゼ 2 U 及び Xanthomonas 属の株から抽出された 5 μl の DNA を含む 25-μl の反応混合物の中で行われる。反応条件は、初めに 94°C 5 分間、続いて 94°C (30 秒)、48°C (30 秒) 及び 72°C (1 分) を 40 サイクル行い、最終段階では 72°C で 10 分間とする。PCR 産物は 1× Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (40 mmol/litre Tris-acetate; 1 mmol/litre EDTA; pH 8.0) 中の 3% のアガロースゲルで 110V で 2 時間分析され、エチジウムブロマイドで染色する。

[127] ERIC PCR は、1× Taq buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 μM の ERIC1R プライマー (5'-ATGTAAGCTCCT-GGGGATTCAC-3') 及び ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACT-GGGGTGAGCG-3') (Louws *et al.*, 1994), dNTP 0.2 mM, Taq polymerase 2 U、及び Xanthomonas 属の株から抽出された 5 μl の DNA を含む 25-μl の反応混合物の中で行われる。反応条件は BOX-PCR 反応と同じである。PCR 産物の視覚化は、BOX-PCR と同様である。

[128] フィンガープリント (バンド模様) は、目視で比較及び分析され、類似性を確認することができる。しかし、模様は峰型に変形することもあり、株は Bionumerics (Applied Maths NV, Belgium) といったコンピューターソフトウェアプログラムを使用して分析される。同定は、コントロール/参考株の模様の類似性を基にして行われる (セクション 4 を参照)。

#### [129] 4.5.2 ゲノム DNA フィンガープリント法

[130] ゲノム DNA フィンガープリント法は、地理的に異なる場所由来の Xcc 株の特徴づけのために使用され得る (Hartung & Civerolo, 1987)。

#### [131] - DNA 抽出 (Berman *et al.*, 1981)

[132] 検定細菌及び Xcc の陽性コントロールを含むルリアベルターニ (LB) 液体培地 10 ml 2 つを 50 ml のフラスコに入れ、27°C で 18 時間ゆっくりと回転させて生長させる。ゲノム DNA の準備は以下のようにして行う。20ml の培地を集め、10,000g で 10 分間遠心分離を行う。ペレットを 10ml の PBS の中で再懸濁する (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer 20 mmol/l、pH 6.9、NaCl 150 mmol/l を含む)。2 度目の遠心分離後、ペレットを EDTA 50 mmol/l 含有の 50 mmol/l トリス 5 ml、pH 8.0 に再懸濁する。卵白リゾチームを 1 mg/ml の最終濃度に加え、チューブを 0°C の状態で 30 分培養する。その後、新しく準備した 1 ml の溶液 (5% の SDS、50 mmol/l の Tris-HCl、pH 7.5、400 mmol/l の EDTA 及び 1 mg/ml のプロナーゼ) を各チューブに加え、チューブを懸濁液がきれいになるまで 50°C の状態で培養する。フェノール飽和トリス緩衝液 (pH 7.8) と同量の溶解物を抽出する。遠心分離 (10 分間 9,000 g) 後、水性上澄みをきれいなチューブに移し、酢酸ナトリウムを 0.3 mmol/l になるまで加える。2 倍のエタノールを加え、逆方向に混合した後、核酸をガラスのピペットで巻き取って移動させる。それらを Ribonuclease (RNase) A (50 μg/ml) 含有の 3 ml の Tris-EDTA (TE) buffer

(10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA) 緩衝液に溶かす。37°C の状態で 30 分置き、クロロフォルムと同量の溶液を抽出し、2 度目のエタノール沈殿までに、その溶液から DNA を巻き取る。DNA を最少量の TE 緩衝液で溶解し、使用されるまで 4°C で保存する。サンプル中の DNA 濃度は分光光度法により測定される。

### [133] - DNA 分解産物

[134] 抽出された DNA (3-5 µg) は、制限エンドヌクレアーゼ *EcoRI* により分解される。反応量は 35 から 55 µl の間で変化し、緩衝液の条件は製造会社により奨励されるものとし、37°C で 4 時間培養する。サンプルを厚さ 1.5mm、長さ 14cm、5% のポリアクリルアミドゲル縦型に入れ、Tris-borate-EDTA(TBE)buffer (89 mmol/l のトリス、89 mmol/l のホウ酸及び 2 mmol/l の EDTA) の中で 14 時間、14 mA の電流を一定して流し、電気泳動により断片を分離する。電気泳動の間、電圧を 50 V から 90 V に上げる。ゲルは 60 分間、臭化エチジウム (2 µg/ml) で着色される。その後、オレンジ色と黄色のフィルター両方を使用して、ゲルをトランスイルミネーターの上で写真撮影する。検体及び参考抽出物のゲノムフィンガープリントは、写真を使用して、又は陰性コントロール及び拡大写真を使用して比較される。

### [1135] 5. 記録

[136] 記録及び証拠は、ISPM 27:2006 のセクション 2.5 で説明されている通りに保存されるべきである。

[137] 他の加盟国が診断の結果により影響を受ける可能性がある場合、特に不適合 (ISPM 13:2001, 不適合及び緊急措置の通知のためのガイドライン) となる場合及びある国または地域で初めて有害動植物が発見された場合には、有害動植物の培養物のオリジナルのサンプル (トレーサビリティのためのラベルが貼られている)、保存又は標本見本又は検定素材 (例、ゲルの写真、ELISA 法の結果の印刷物、PCR アンプリコン) を少なくとも 1 年間保存することが推奨される。

### [138] 6. 詳しい情報の入手先

[139] General Direction of Agricultural Services, Biological Laboratories Department, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo Uruguay (Enrique F. Verdier, e-mail: emvermar@adinet.com.uy; tel.: +598 23043992).

[140] Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López, e-mail: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax: +34 963424001).

[141] Instituto Nacional de Investigación Agraria y Tecnología Alimentaria, INIA, Ctra de La Coruña km 6, Madrid, Spain (Jaime Cubero, e-mail: cubero@inia.es, tel : +34 913473900 ; fax +34 913572293)

### [142] 7. 謝辞

[143] 本プロトコルの第 1 草稿は、以下の者により作成された : E.F. Verdier, General Direction of Agricultural Services, Biological Laboratories Department, Uruguay (詳細はセクション 6 を参照), and revised by R. Lanfranchi, Plant Pests and Disease Laboratory, National Service of Agrifood Health and Quality, SENASA, . Av. Ing. Huergo 1001 CP 1107, Buenos Aires, Argentina (Rita Lanfranchi, e-mail: [ritalanfranchi@hotmail.com](mailto:ritalanfranchi@hotmail.com), tel.: +5411 43621177 int. 118), Ed Civerolo, USDA, United States and M.M. López, IVIA, Spain (詳細はセクション 6 を参照)。また、J. Cubero, INIA, Spain (詳細はセクション 6 を参照) は、本プロトコルの作成に大きく貢献してくれた。

### [144] 8. 参照



- [145] **Álvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, C.Y., Pollard, L.W. & Civerolo, E.L.** 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X.c.* pv. *citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 81: 857- 865.
- [146] **Bradbury, J.F.** 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Wallingford, UK, CABI. 332 pp.
- [147] **Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E. & Takikawa, Y.** 2010 Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980 – 2007. *Journal of Plant Pathology* 92(3): 551-592.
- [148] **CABI.** 2006. *Crop protection compendium*. Wallingford, UK, CABI.
- [149] **Civerolo, E.L. & Fan, F.** 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 66: 231-236.
- [150] **Civerolo, E.L. & Helkie, C.** 1981. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In *Proceedings of the Fifth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Cali, Colombia, August 16 – 23 pp. 105–112.
- [151] **Cubero, J. & Graham, J.H.** 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1257–1264.
- [152] **Cubero, J. & Graham, J.H.** 2004. The leucine-responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 429–437.
- [153] **Cubero, J. & Graham, J.H.** 2005. Quantitative real time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95: 1333–1340.
- [154] **Cubero, J., Graham, J.H. & Gottwald, T.R.** 2001. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2849–2852.
- [155] **EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 1979. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Data Sheets on Quarantine Pests. EPPO A1 list No. 1.
- [156] **EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 1998. Phytosanitary procedure *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Inspection, test and survey methods. EPPO Standard PM 3/27(1).
- [157] **EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2006. PQR database (version 4.5). Paris, EPPO.
- [158] **Francis, M.I., Pena, A., Graham, J.H.** 2010 Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology* 127(4): 571-578.
- [159] **Golmohammadi, M., Cubero, J., Peñalver, J., Quesada, J.M., López, M.M. & Llop P.** 2007. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker in commercial fruits by isolation and PCR based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2309–2315.
- [160] **Goto, M.** 1992. Citrus canker. In *Plant diseases of international importance*, Vol. III, *Diseases of fruit crops*. J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay, eds. pp. 170 – 208. Upper Saddle River, NJ, USA, Prentice Hall.

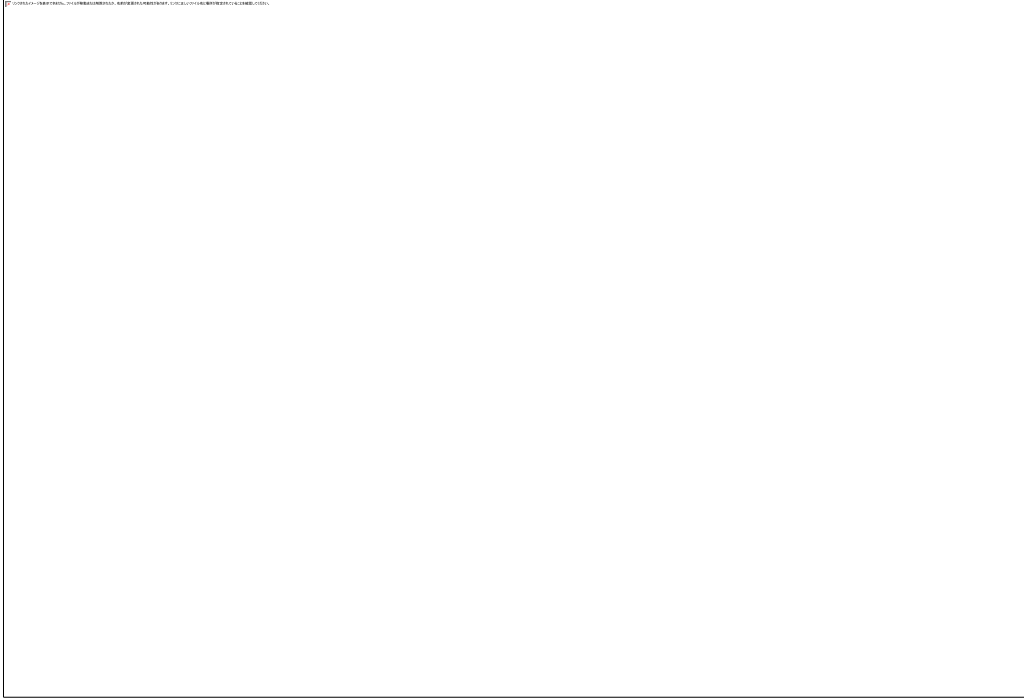
- [161] **Goto, M., Takahashi, T. & Messina, M.A.** 1980. A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancris B in Argentina. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 46: 329-338.
- [162] **Hall, D.G., Gottwald, T.R., & Bock, C.H.** 2010. Exacerbation of citrus canker by citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* in Florida. *Florida Entomologist*, 93 (4): 558 - 566.
- [163] **Hartung, J.S. & Civerolo, E.L.** 1987. Genomic fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America and Florida. *Phytopathology*, 77: 282-285.
- [164] **Hartung, J.S., Daniel, J.F., Pruvost, O.P. & Civerolo, E.L.** 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (4): 1143-1148.
- [165] **Koizumi, M.** 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. *Bulletin of the Horticultural Research Station (Japan), Series B*, No. 11: 167-182.
- [166] **Kuo, T.T., Chiang, C.C., Chen, S.Y., Lin, J.H. & Kuo, J.L.** 1994. A long lytic cycle in filamentous phage Cf1tv infecting *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Archives of Virology*, 135: 253-264.
- [167] **Lazo, G.R., Roffey, R. & Gabriel, D.W.** 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 214-221.
- [168] **Louws, F.J., Fulbright, D.W., Taylor Stephens, C. & Bruijn, F.J.** 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286-2295.
- [169] **Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology Methods*, 37: 23-31.
- [170] **Mavrodieva, V., Levy, L. & Gabriel, D.W.** 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, 94: 61-68.
- [171] **Monier, L.** 1992. *Contribution à la mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif pour la détection de Xanthomonas campestris pv. citri, agent du chancre bactérien des agrumes*. Angers, France, École Nationale d'Ingénieurs des Travaux de l'Horticulture et du Paysage d'Angers, Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA). 62 pp.
- [172] **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. rev.; *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. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 494-518.
- [173] **Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. & Vidaver, A.K.** 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 690 -695.
- [174] **Sun, X., Stall, R. E., Jones, J. B., Cubero, J., Gottwald, T. R., Graham, J. H., Dixon, W.D., Schubert, T.S., Peacock, Chaloux, P.H., Stromberg, V.K., Lacy, G.H. & 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 Disease*, 88 (11): 1179-1188.

- [175] Taylor, R.K., Tyson, J.L., Fullerton, R.A. & Hale, C.N. 2002. Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: A case study involving canker-like symptoms on citrus. *New Zealand Plant Protection*, 55: 53–57.
- [176] Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472-489.
- [177] Verdier, E., Zefferino, E. & Méndez, S. 2008. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on the surface of citrus fruit after postharvest treatment *Fitopatologia* 43: 24-31.
- [178] Vernière, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, E.L., Álvarez, A.M., Maestri, P. & Luisetti, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 477-487.
- [179] Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., & Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2853–2858.
- [180] Weisberg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, B.A., & Lane, D.J. 1991 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173: 697–703.
- [181] Wu, W.C., Lee, S.T., Kuo, H.F. & Wang, L.Y. 1993. Use of phages for identifying the citrus canker bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in Taiwan. *Plant Pathology*, 42: 389-395.
- [182] Wu, W.C., Chen, T.T. & Wang, Y.R. 1996. Characterization of five filamentous phages from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Plant Pathology Bulletin*, 5: 1-14.
- [183] Young, J.M., Park, D.C., Shearman, H.M., & Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31(5): 366-377.

[184] 9. 図

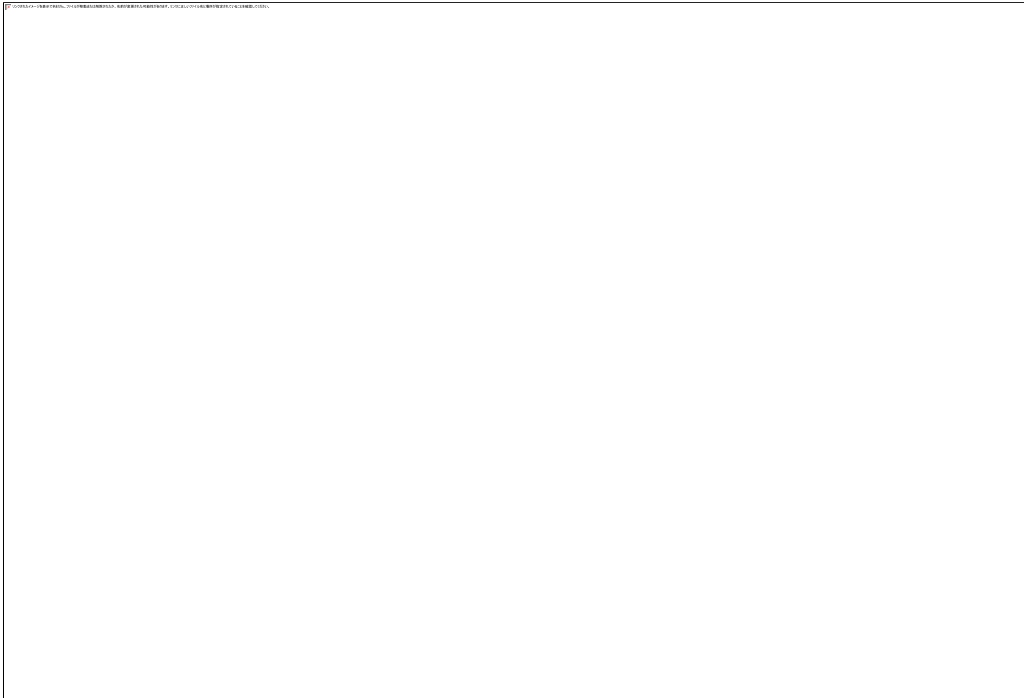
[185] 図 1. グレープフルーツの葉、茎、果実に見られる典型的なカンキツかいよう病の症状

[186]



[187] 図 2. 枝に出たカンキツかいよう病の症状：グレープフルーツの早期の病斑。

[188]



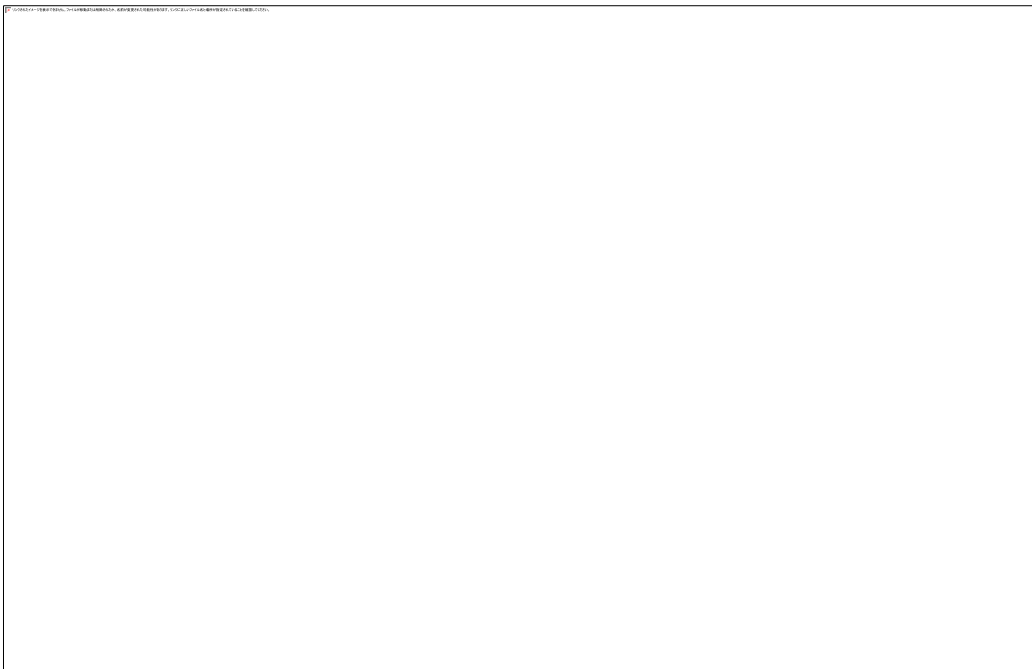
[189] 図 3. カンキツかいよう病の果実に出た症状。スイートオレンジ（左）及びグレープフルーツ（右）。

[190]



[191] 図 4. レモンの葉に現れたカンキツかいよう病の症状。カンキツ類の葉に現れた小さな傷が悪化した。

[192]



[193] 脚注 1. 本診断プロトコルでは QuantiMix という銘柄の商品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する CPM の保証を意味するものではない。同じ



結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。

[194] **脚注 2.** 本診断プロトコルでは ABI という銘柄の商品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する CPM の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。

[195] **脚注 3.** 本診断プロトコルでは Agdia, Inc. という銘柄の商品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する CPM の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。