

アメリカ合衆国フロリダ州に発生した “Citrus canker”病原細菌と日本産 カンキツかいよう病菌の比較*

水野明文・川合昭
西尾健・長尾記明

横浜植物防疫所

Comparison of Causal Bacteria of “Citrus Canker” in Florida and Japanese Citrus Canker Bacteria. Akifumi MIZUNO, Akira KAWAI, Takeshi NISHIO and Noriaki NAGAO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 24: 21-25 (1988).

Abstract: In 1984, a bacterial disease of citrus was found in Florida, United States. The causal bacteria of this disease was compared with Japanese isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE) DYE. Pathogenicity of both isolates were compared by inoculation to citrus leaves of some citrus cultivars. Florida isolates produced sunken, water-soaked lesions surrounded by chlorosis on inoculated citrus leaves. These symptoms differed from that of Japanese isolates. Physiological properties of Florida isolates were same as Japanese isolates except utilization of arabinose and serobiose. Serological properties and phage susceptibility of Florida isolates differed from these of Japanese isolates. Therefore, it is considered that the causal bacteria of Florida “Citrus Canker” is different from previously described four strains of citrus canker bacteria (A, B, ML and CB strain).

はじめに

現在、カンキツかいよう病の病原細菌である *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE 1915) DYE 1978 には、世界で A, B, ML, および CB 型の4つの系統のことが知られている。A型は病原性が強く、ほとんどのカンキツ類 (*Citrus* spp.) に病原性を示し、日本をはじめアジアに広く発生している (後藤, 1962)。B型はレモン (*C. lemon* BURM. cv. Lisbon) に強い病原性を示し、その他のカンキツにはA型に比べて病原性が弱く、アルゼンチン、パラグアイ、ウルグアイに発生している (GOTO *et al.*, 1980)。ML型はメキシカンライム (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) に強い病原性、タヒチライム (*C. latifolia* TANAKA) には弱い病原性を示し、他のカンキツには病原性を示さずブラジルに発生している (NAMEKATA 1971)。CB型はメキシカンライム、グレープフルーツ (*C. paradisi* Macf.), ペルシャライム (*C. latifolia* TANAKA) に病原性を示すが、A, B, ML型ほど顕著なかいよう斑を

形成しないのが特徴で、Citrus Bacteriosis と呼ばれ、メキシコに発生している (RODRIGUEZ *et al.*, 1985)。

アメリカ合衆国では1910年に日本から導入したカンキツ苗木について侵入したカンキツかいよう病 (A型) が特にフロリダで問題となったが、その後の大規模な撲滅事業により1947年、撲滅されるという経緯があった。しかし、1984年、いくつかのカンキツ苗木園で葉にハローを伴う褐色病斑を形成する病害が発生し、“Citrus canker” とされた (SCHOULTIES and MILLER, 1985)。著者らは本病の病原細菌の性質を調べるため、農林大臣の特別許可を得て、フロリダ産 “Citrus canker” 病原細菌9菌株を導入し、日本産カンキツかいよう病菌 (A型) 6菌株とカンキツ葉での病原性、病徴、細菌学的性質を比較した。

当調査を行うに当たりフロリダ産菌の導入に際しご協力いただいた元米国農務省植物防疫課長 H.L. FORD 氏、菌株を分譲下さった米国農務省 Horticultural Science Institute, E.L. CIVEROLO 博士、日本産カンキツかいよう病菌を分譲下さった果樹試験場久原重松、小泉銘冊両博士、および電子顕微鏡写真の撮影に協力いただいた当所大和園場の各位に厚くお礼申し

* 本報告の概要は昭和61年度日本植物病理学会秋期関東部会 (1986年11月) において発表した。

上げる。

材料および方法

供試細菌

日本産カンキツかいよう病菌は、N6101, N6119 (WAKIMOTO, 1967), 6501, 7501 (果樹試験場から分譲) YT159, YS1 (当所分離菌株) の6菌株, フロリダ産“Citrus canker”病原細菌は、F-1, F-3, F-31, F-33, F-49, F-56, F-79, F-86, F-103の9菌株を供試した。継代培養はジャガイモ半合成培地 (PSA) 30°Cで行った。

接種試験

鉢植えの2年生バレンシアオレンジ, ネーブルオレンジ, ナツダイダイ, 川野ナツダイダイ, 温州ミカン, レモン菌の新葉に日本産菌6501, フロリダ産菌F-1, F-31 (48時間培養)を接種した。方法は、70% エタノールで表面殺菌した新葉に、Tween 20を添加した約 10^{10} cells/mlの細菌懸濁液を筆で塗布し、針で一回、軽く刺すことにより有傷接種した。カンキツ以外には、鉢植えのインゲンマメ, ディフェンバキア, ワタ, ベゴニア, ポインセチア, トマト, キュウリ, ゼラニウム, キクを供試し、これらへの病原性を調べた。

接種した植物は、接種後48時間温室に置き、接種後1カ月間空調装置のあるガラス室に置いて病徴の出現を観察した。

細菌学的性質

1) 形態 PSA斜面培地で24時間培養したフロリダ産菌を滅菌水に懸濁し、2.5% リンタングステン酸水溶液で染色し、電子顕微鏡(Hitachi H12)で観察した。

2) 生理的性質 主にDYE (1962)の方法に従い、富永 (1971), および西山 (1978)の方法も一部の項目で用いた。

3) 温度別生育試験 PSA斜面培地で48時間培養した日本産菌N6101とフロリダ産菌F-1をそれぞれ10 mlの滅菌水に一白金耳とり懸濁液とし、それらの一白金耳をNutrient broth (Difco社) 10 mlに移植して、0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 38°Cで7日間静置培養した。各温度別の生育程度は、分光光度計(島津製作所UV-200)を用いてNutrient brothの600 nmの吸光度を測定して数値化した。

4) 血清学的性質 日本産菌N6101抗血清を用い、寒天ゲル内拡散法(0.8%寒天)により、日本産菌、フロリダ産菌の反応を比較した。

5) ファージ感受性試験 CP1, CP2 ファージに対する日本産菌, フロリダ産菌の感受性は、ファージの段階希釈によるOBATA (1974)の方法で行った。

結 果

接種試験

カンキツではフロリダ産菌, 日本産菌とも接種3日目から病斑を形成し、接種11日目には供試カンキツのすべてに病原性を示した。日本産菌は、初期には小さなもり上がった白色のかいよう斑を形成し、後にそれは褐色のコルク状のかいよう斑となった。かいよう斑の周辺には接種20日目以降ハローを形成した。一方、フロリダ産菌は、はじめ接種部を中心としたハローを伴う褐色病斑を形成し、接種20日以上経過してももり上がったかいよう斑にはならなかった (Fig. 1)。その後、病斑の拡大はみられるが日本産菌ほど顕著な拡大はみられなかった。

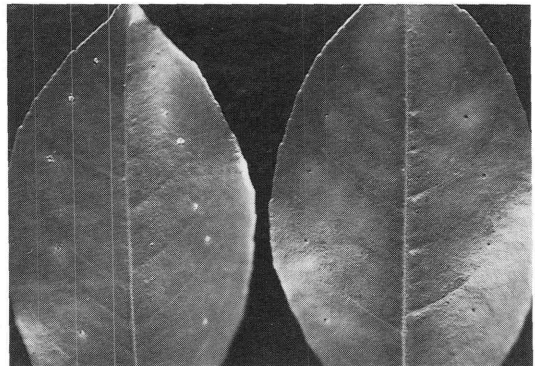


Fig. 1. Symptoms on artificially inoculated citrus leaves Right=Froliada isolate, Left: Japanese isolate.

インゲンマメ, ディフェンバキア, ワタ, ベゴニア, ポインセチア, トマト, キュウリ, ガーベラ, ゼラニウム, キクの葉には、日本産菌, フロリダ産菌とも病原性を示さなかった。

細菌学的性質

1) 形態 桿状で単極に1本の鞭毛を有していた (Fig. 2)。

2) 生理的性質 Table 1, 2に示すように、炭水化物の分解能において日本産菌がアラビノース, セロビオースで陰性を示したが、フロリダ産菌は陽性を示した。その他の性質では、日本産菌, フロリダ産菌とも

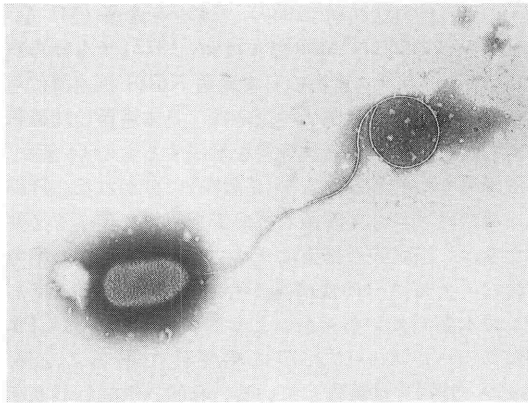


Fig. 2. Electron micrograph of “Citrus Canker” bacterium isolated in Florida.

ほとんど異なる点はなかった。

3) 温度別生育試験 Fig. 3で示すように、日本産菌、フロリダ産菌とも 30°C 前後で最も良好な生育を示した。しかし、日本産菌が 15~25°C でも比較的生育は

Table 1. Comparison of physiological and biochemical properties between strains of citrus canker bacteria isolated in Japan and Florida

Character	Strains of		
	Japan	Florida	
OF test	0	0	
Hydrolysis of starch	+	+	
Hydrolysis of Tween 80	+	+	
Liquefaction of gelatin	+	+	
Hydrolysis of arginine	-	-	
Utilization of asparagine	-	-	
Production of lecithinase	+	+	
Hydrolysis of aesculin	+	+	
Gluconate test	-	-	
Reducing substances from sucrose	+	+	
Reduction of nitrate	+	+	
Production of hydrogen sulphide	-	-	
Production of tyrosinase	+	+	
Production of urease	-	-	
Production of acetoin	-	-	
Litmus milk reaction	BP ^{a)}	BP	
Tolerance to NaCl	3%	+	+
	4%	-	-
	5%	-	-

^{a)} B...alkaline; P...peptonization

Table 2. Comparison of the ability to utilize carbohydrates as sole source of carbon between strains of citrus canker bacteria isolated in Japan and Florida

Carbohydrates	Strains of ;	
	Japan	Florida
Arabinose	-	+
Rhamnose	-	-
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Mannose	+/- (2/4) ^{a)}	+
Lactose	-	+/- (2/7)
Trehalose	+	+
Glycerol	+	+
Sucrose	+	+
Cellobiose	-	+
Sorbitol	-	-
Inositol	-	-
Raffinose	-	-
Glycin	-	-
Dulcitol	-	-
α -methyl-D-glucoside	-	-
Malonate	+	+
Citrate	+	+
Succinate	+	+
Tartrate	+	+

^{a)} Number of Strains with respective reaction/number of strain test.

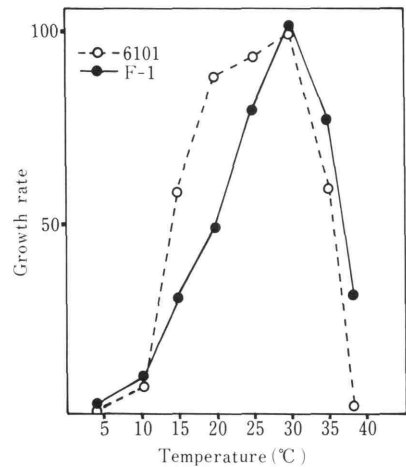
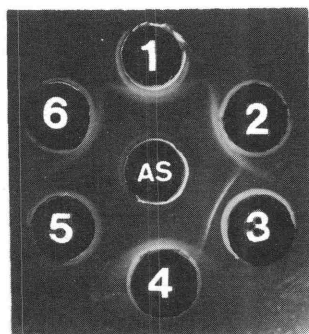


Fig. 3. Growth rate of citrus canker bacteria isolated in Japan and Florida in nutrient broth under temperature from 4 to 36°C

良好であり、38°Cでは生育しないのに対して、フロリダ産菌は15~25°Cでは生育が日本産菌に比べて悪いが、38°Cでは生育した。

4) 血清学的性質 日本産菌 N6101 抗血清に対する反応は Fig. 4 に示すように、日本産菌はすべて互いに連続する同一の沈降帯を形成したが、フロリダ産菌は日本産菌に対してスパーのある沈降帯を形成する菌株 (F-33, F-56, F-79, F-86) と全く反応を示さない菌株 (F-1, F-3, F-31, F-49, F-103) があつた。



AS: antiseram
(N6101)

- 1: N6101
- 2: N6119
- 3: F-49
- 4: 6501
- 5: F-56
- 6: YT-159

Fig. 4. Agar gel diffusion test

5) ファージ感受性試験 日本産菌は N6101, 7501 が CP1 ファージに、N6119, YT159, YS1, 6501 が CP2 ファージにそれぞれ感受性を示したが、フロリダ産菌 9 菌株はいずれのファージにも感受性を示さなかつた。

考 察

フロリダ産菌は供試したすべてのカンキツ類に対して日本産菌同様、病原性を示した。しかし、フロリダ産菌によって引き起こされる病徴は、ハローを伴う褐色病斑で日本産菌のようなかいよう斑を形成せず、病斑の拡大も日本産菌ほど顕著にみられなかつた。このことから供試カンキツに対する病原性は、日本産菌より弱いと考えられた。また、フロリダ産菌の生理的性質は、アラビノース、セロビオースを単一炭素源として利用する点を除いて、日本産菌と大きく異なる点のみみられなかつた。生育温度は、フロリダ産菌が日本産菌の生育できない 38°C で生育可能であり、10~20°C での生育は日本産菌の生育程度の約 50% であることからフロリダ産菌の生育適温域は日本産菌より高温域にあると考えられた。血清学的性質は、日本産菌とフロリダ産菌とで異なつた。このような系統間での血清学的性質の相違は、日本産菌とアルゼンチン産菌 (B

型)の間 (GOTO *et al.*, 1980), ブラジル産菌 (ML 型) と他の系統の間 (NAMEKATA *et al.*, 1972) でも知られているが、フロリダ産菌の日本産菌 N6101 抗血清に対する寒天ゲル内拡散法での反応は、日本産菌の沈降帯に対してスパーのある沈降帯を形成するもの (4 菌株) と沈降帯を形成しないもの (5 菌株) に分かれた。詳細な血清型はフロリダ産菌の抗血清を用いて調べる必要があるが、当試験の結果はフロリダ産菌 9 菌株の中でも少なくとも 2 つの血清型が存在することを示唆した。日本産のカンキツかいよう病菌の 98.6% は CP1, CP2 ファージのいずれかに感受性であることを OBATA (1974) は報告している。今回、供試した 6 菌株の日本産菌もいずれかのファージに感受性であったが、フロリダ産菌 9 菌株はアルゼンチン産菌 (GOTO *et al.*, 1980) と同様に感受性を示さなかつた。

以上のように、フロリダ産菌は、接種試験に供した植物に限ってはカンキツ以外に病原性を示さず、生理的性質で日本産菌と大きな相違点がみられないことから、*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE 1915) DYE 1978 と考えられたが、病徴、血清学的性質等で日本産菌と異なつた。また、フロリダ産菌の病徴、カンキツ類での寄生範囲は、アルゼンチン産菌、ブラジル産菌、メキシコ産菌 (CB 型) のそれぞれの報告とも異なつた。このことから、フロリダ産菌は、これら既存の系統とは異なる系統の *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE 1915) DYE 1978 と考えられた。

摘 要

1984 年、米国フロリダ州において、スイートオレンジ等のカンキツ苗木に褐色病斑を生ずる病害が発生し、“Citrus canker” とされた。この病原細菌 9 菌株を導入し日本産カンキツかいよう病菌と比較した。本菌は有傷接種でバレンシアオレンジ等のカンキツ類にハローを伴う褐色病斑を形成し、日本産菌のようなかいよう病斑を形成しなかつた。本菌は炭水化物の分解能でアラビノース、セロビオースを分解する点で日本産菌と異なつたが、その他の生理的性質等はほぼ同様であつた。ゲル内拡散法による日本産菌抗血清との反応では、本菌 9 菌株のうち 4 菌株がスパーを形成し、5 菌株は反応せず、両菌は血清学的に異なつた。CP₁, CP₂ ファージに対する感受性では、日本産菌はいずれかのファージに感受性を示したが、本菌は感受性を示さなかつた。以上の結果から、フロリダ産 “Citrus canker” の病原細菌は、既存のカンキツかいよう病の 4 つの型、A, B, ML, および CB 型とは異なるものと考えられ

た。

引用文献

- DYE, D.W. (1962) The inadequacy of the usual determinative tests for the identification *Xanthomonas* spp. N.Z.J. Sci. 5: 393-416.
- 後藤正夫 (1962) カンキツ潰瘍病に関する研究 I. 静岡大学農学部研究報告 12: 3-72.
- 後藤正夫 (1980) 新植物細菌病学. ソフトサイエンス社 272 p.
- 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 cancrisis B in Argentina. Ann. Phytopath. Soc. Japan 46: 329-338.
- NAMEKATA, T. (1971) Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do “cancro citrico” e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., N.F. Sp. aurantifolia, agente causal da “cancrose do limoeiro Galego”. Tese apresentada a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. pp. 65.
- NAMEKATA, T. and de OLIVEIRA, A.R. (1972) comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. Proc. 3rd Internat'l Conf. Plant Path. Bact., Wageningen, 14-21, April 1971: 151-152.
- 西山幸司 (1978) 植物病原細菌簡易同定法の試案. 植物防疫 32: 283-288.
- OBATA, T. (1974) Distribution of *Xanthomonas citri* strains in relation to the sensitivity to phages Cp 1 and Cp 2. Ann. Phytopath. Soc. Japan 40: 6-13.
- RODRIGUEZ, G. and J.G. GARZAL (1985) Citrus Bacteriosis in Mexico. Plant Disease 69: 808-810.
- SCHOULTIES, C.L. and MILLER, J.W. (1985) A New Outbreak of Citrus Canker in Florida Plant Disease. 69(4): 361.
- 富永時任 (1971) 日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究. 農技研報 C 25: 206-306.
- WAKIMOTO, S. (1967) Some characteristics of citrus canker bacteria, *Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON, and the related phages isolated from Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 33: 301-310.