

火傷病菌 (*Erwinia amylovora* (BURRILL 1882) WINSLOW *et al.*, 1920) のリンゴ成熟果実内汚染に関する野外調査

水野明文・塚本貴敬・小林慶範
佐藤成良・川合 昭
横浜植物防疫所

Field Survey Concerning the Contamination in Mature Apple Fruit with Fire Blight Bacterium. Akifumi MIZUNO, Takanori TSUKAMOTO, Yoshinori KOBAYASHI, Shigeyoshi SATO and Akira KAWAI (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shinyamashita, Yokohama 231-0801, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 38: 1-8 (2002).

Abstract: Detection of *Erwinia amylovora* was tried from internal tissues of mature apple fruits harvested from healthy trees 10, 25, 50, 100 and 300 meters from the source of fire blight in Washington, USA in the 2000 growing season. In addition, fruit blight symptoms on them were analyzed after the cold storage at 0-1°C for 70-90 days. Neither presence of *E. amylovora* nor symptom of fruit blight was confirmed in them. These results indicated that apple fruit on healthy tree 10 m or more from a source of fire blight were not infected with *E. amylovora* under their experimental climatic condition. It needs further investigation under different experimental conditions in order to prove whether mature apparently healthy apple fruits harbor *E. amylovora* and play the role as inoculum or not.

Key words: fire blight, *Erwinia amylovora*, apple fruit

緒 言

火傷病は 1780 年頃にアメリカ合衆国ニューヨーク州ハドソン川流域で発見された後、100 年後には移住民とともに太平洋側に達し、発見後 200 年間で、ほぼ北米大陸全体のナシ、リンゴ栽培地域に拡大した (BEER, 1990)。北米大陸以外では 1919 年にニュージーランドで発生が確認されて以降、現在ではヨーロッパのほぼ全域、西アジア、アフリカの一部および中央アメリカに発生が確認されている (BONN and VAN DER ZWET, 2000)。海を渡って拡大するような長距離伝播の原因については宿主植物の苗木の移動のほか、ナシの果実 (VAN DER ZWET, 1994)、果実箱 (LELLOTT, 1959)、渡り鳥 (PSALLIDAS, 1990) などの諸説があるが実証は得られていない。また、イスラエル、ギリシャ、トルコでは初発生から 2 年以内 (1985/1987) に国全体に広がったことや、1987 年以降、トルコからアルメニアへ、ギリシャからイタリア南部へ、北はブルガリアやユーゴスラヴィアへ瞬く間に拡大したことなど、火傷病が遠隔地から未発生地へひとたび侵入定着すると物理的障壁のない近隣への分布拡大はいとも容易に起こる (VAN DER ZWET, 1994)。

このような火傷病の分布拡大がリンゴ生果実の移動によって起こりうるかが、火傷病未発生国では深刻な

問題として取り上げられている。健全コントロールとして健全樹から採取したリンゴ生果実内から火傷病菌が検出され、当該果実の冷蔵貯蔵後、fruit blight を生じたとする報告 (VAN DER ZWET *et al.*, 1990) のほかにも、果実から火傷病菌が検出されたとする報告が多くある (CLARK *et al.*, 1993; GOODMAN, 1954; GOODMAN *et al.*, 1988; HALE *et al.*, 1987; HALE and CLARK, 1990; VAN DER ZWET *et al.*, 1986) にもかかわらず、リンゴ果実は火傷病菌の分布拡大に関与することはない、との主張も多い (DUECK, 1974; McLARTY 1923; ROBERTS *et al.*, 1989; ROBERTS *et al.*, 1998)。

そこで火傷病菌が伝播しうるようなリンゴ果実への寄生が園地で起こっているかどうか、および火傷病菌の園地での動向を調査するため、アメリカ合衆国ワシントン州のリンゴ園地においてリンゴ果実を指標植物として火傷病菌の飛散に関する試験を行った。

なお、当試験は、米国植物検疫当局の「商業品質のリンゴ成熟果実は火傷病を伝播することはない」とする主張に対し、当該主張が科学的根拠により裏付けられるかどうかを検証するため、日米の協力により実施されたもので、試験実施の実現に向け尽力された農林水産省植物防疫課担当官諸氏、米国植物検疫当局 John THAW 氏、当該試験に米側専門家として参画した USDA, ARS, Tree Fruit Research Laboratory の

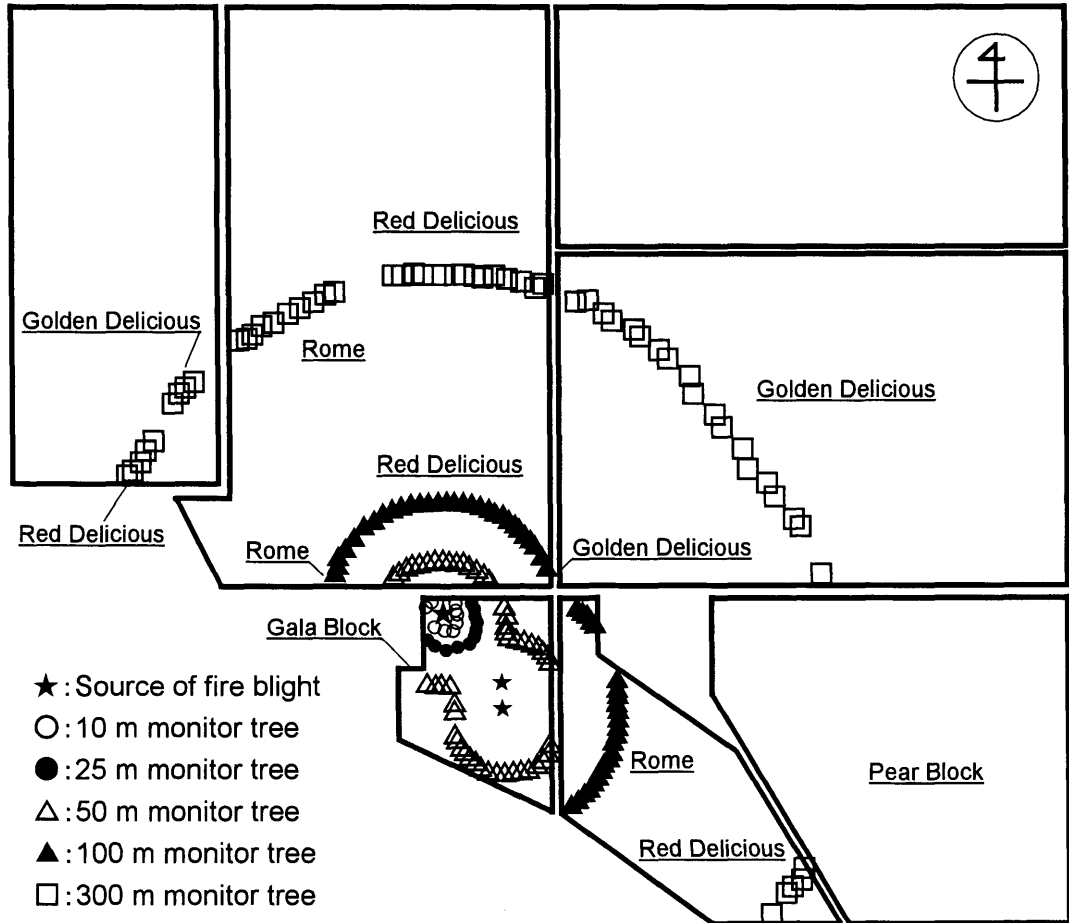


Fig. 1. Location of apple monitor trees and source of Fire Blight in the commercial orchard. Naturally infested trees were used as a source of Fire Blight. Apple fruits were harvested from each monitor tree and analyzed. (Courtesy Dr. R. G. ROBERTS)

Rodney G. ROBERTS 博士, 同 Stephen REYMOND 氏
 ほか同研究所のスタッフの方々に深謝申し上げます。

材料および方法

1. 試験園地

1) 自然発生園

試験に使用した火傷病自然発生園は、ワシントン州 Selah 郊外の商業リンゴ園で、栽培されている品種は、'Gala', 'Rome', 'Golden Delicious', 'Red Delicious' であった。このうち、'Gala' 樹 15 本において flower blight, young fruit blight, shoot blight 等の火傷病症状が認められ、分離細菌を同定して火傷病罹病樹であることを確認した。当園では、試験を実施した期間を通じて Gala 樹 15 本以外に火傷病罹病樹は確認さ

れなかった。この罹病樹を中心として、その周囲の 10 m, 25 m, 50 m, 100 m および 300 m 地点のリンゴ樹をモニター樹として設定し、供試果実を採取した (Fig. 1)。園地内の樹間距離の確認は GSP (Global Positioning System) により行った。

2) 人工汚染園

ワシントン州立大学と USDA が共同管理している Wenatchee 郊外 Columbia View 実験園内のリンゴ園を使用し、人工汚染園の試験を行った。

(1) 人工接種樹の作製

人工接種樹は鉢植えの 3 年生ナシ接木苗 (品種: Bosc) に、火傷病菌懸濁液 (約 1×10^9 cfu/ml) を注射器で新梢に注入することで作製した。接種樹は 208 本を 4 回に分け 14 日間ごとに作製した。接種に供した菌株は、第 1 回接種樹が ATCC 15580^T (基準菌

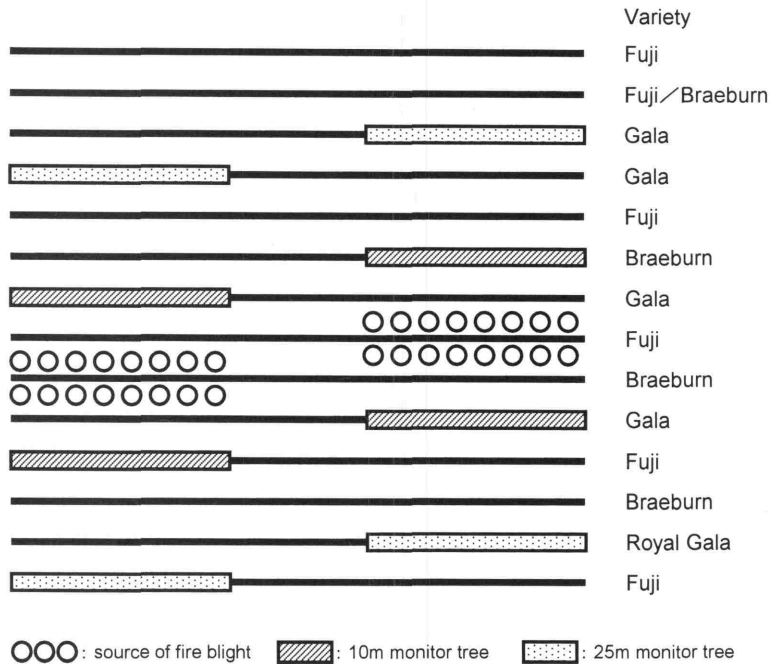


Fig. 2. Location of monitor apple trees and source of Fire Blight in the experimental orchard. Artificially inoculated trees were used as a source of Fire Blight. Apple fruits were harvested from each monitor tree and analyzed.

株), 第2回目以降は88-38株(ワシントン州の'Red Delicious'種のリンゴ樹で1987年に分離された菌株)を使用した。接種樹を加湿した温室内で約1週間保管した後, 園地内の所定の位置に移植した。移植は開花から幼果期にかけ2週間おきに行った。

(2) モニター樹の設定

使用したリンゴ園には, 'ふじ', 'Braeburn', 'Gala', 'Royal Gala'の各品種が計14列栽植されていた。リンゴ園中央部の'ふじ'樹および'Braeburn'樹の列に沿って, 人工接種樹を両側に設置した。それぞれの列を基点として左右10mおよび25mの列のリンゴ樹をモニター樹として設定した(Fig. 2)。

(3) 人工接種樹設置園の観察

試験園地に設置した人工接種樹の病斑の進展, 菌泥の漏出状況および試験園地内のリンゴ樹への感染を, 週3回, 定期的に観察した。感染が疑われたリンゴ樹の病斑からはCCT培地(Ishimaru and KLos, 1984)により火傷病菌の分離を試み, 分離菌株は火傷病菌の抗血清(末次ら, 1981)を用いたスライド凝集反応とGUILFORDら(1996)のプライマーを用いたPCRで火傷病菌であるかどうかを確認した。

2. 幼果表面および内部から火傷病菌の検出

人工汚染園においては, 中心果が直径3~4cm程度に生育したときに接種樹に隣接するリンゴ樹から'ふじ'5果, 'Braeburn'5果, 10m試験区から'ふじ'3果, 'Braeburn'2果, 'Gala'5果, 25m試験区から'ふじ'2果, 'Gala'5果, 'Royal Gala'3果の合計30果の幼果を無作為に採取し, 採取果の表面洗浄液と果実内部から火傷病菌の検出を試みた。検出にはMILLER-SCHROTH培地(1972)を一部改変したModified-MS平板培地(M-MS: ソルビトール40g, 0.25%クリスタルバイオレット液0.8mL, ニコチン酸0.5g, 2%ニトリロ三酢酸液10.0mL, L-アスパラギン1.5g, 1N水酸化ナトリウム液5.0mL, リン酸水素二カリウム2.0g, 1%硝酸タリウム液1.75mL, 硫酸マグネシウム0.2g, 14mM塩化コバルト50.0mL, タウロコウルク酸ナトリウム2.5g, シクロヘキシミド50.0mg, ドデシル硫酸ナトリウム100.0mg, 寒天15.0g蒸留水を加えて総量1,000mL)(水野ら, 2002)を使用した。分離菌株は前述の方法により火傷病菌であることを確認した。

3. 収穫期の果実内部からの火傷病菌の検出

1試験区当たり6,100果の成熟果実をモニター樹か

Table 1. Results of analysis of internal population of *E. amylovora* in apple fruit

Distance from source of FB ^a	Orchard A*				Orchard B*			
	Gala	Rome	Red Delicious	Golden Delicious	Gala	Fuji	Royal Gala	Braeburn
10 m	0/100 ^b	—	—	—	0/50 (0/3,000) ^c	(0/1,500)	0	0/50 (0/1,500)
25 m	0/100	—	—	—	0/50 (0/2,900)	0/25 (0/3,100)	0/25	—
50 m	0/89 (0/4,600)	—	0/11 (0/1,400)	—	—	—	—	—
100 m	—	0/52 (0/2,700)	0/46 (0/3,100)	0/2 (0/200)	—	—	—	—
300 m	—	0/23 (0/1,500)	0/31 (0/1,700)	0/46 (0/2,800)	—	—	—	—

* Orchard A: naturally infected trees were used as a source of FB.

Orchard B: artificially infected trees were used as a source of FB.

^a: FB=fire blight.

^b: Number of fruit infected with FB/Number of fruit analyzed after harvest

^c: () means results of analysis after cold storage.

ら無作為に採取した。このうち、6,000 果については70~90 日間の低温貯蔵 (0~1°C, RH85~95%) を行い、残りの各 100 果については6~14 日間低温保管後、果実内部から火傷病菌の検出を試みた。なお、10 m および 25 m 試験区は自然発生園および人工汚染園の両方の果実で実施した。品種ごとの供試果実数は Table 1 のとおりである。

検出は次の方法で行った。果実を 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム液に 5 分間浸漬し、水道水で 3 回洗浄後、蒸留水で 1 回洗浄し風乾した。直径約 2 cm のコルクボーラで果実の芯をくり抜き、がくあ部とへた(梗窪)部を切り落とし、厚さ約 5 mm の輪切りにし 50 ml の遠心管に入れた後 25 ml の滅菌水を加え、25°C, 160 rpm で 1 時間振とうした。振とう液を原液、10⁻¹、10⁻² の 3 段階に希釈し、その 0.25 ml を M-MS 平板に滴下し、コンラージ棒で広げて、25°C で 7~8 日間培養した。M-MS 平板上に細菌の集落が形成していた場合は、実体顕微鏡で集落の性状を確認し、各性状ごとに 1% sucrose を含む YNA (Sucrose-YNA: ショ糖 10 g, 肉エキス 3 g, 酵母エキス 5 g, ペプトン 5 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1,000 ml pH 7.2) に釣菌し、25°C で一晩培養した。本培地上に白色で多量の粘質物を産生する細菌集落(火傷病菌の特徴を示す集落)が観察された場合、前述の方法により火傷病菌かどうかを判定した。

4. 低温貯蔵後の調査

低温貯蔵後の果実は火傷病菌による fruit blight の

発生の有無を肉眼で調査した。各試験区 6,000 果の果実を一つずつ手に取り、腐敗果(外観異常果を含む)と切開調査のための健全果(300果/試験区)を採取した。なお、自然発生園の 10 m, 25 m 試験区は 4 年生樹のため各 6,000 果を収穫できなかった。このため、これらの試験区は人工汚染園だけで実施した。

腐敗果については、果実を塩素濃度 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム液に 5 分間浸漬後、水道水で 1 回洗浄し、最後に蒸留水で洗浄後、ナイフで切開、果実内部の腐敗の有無を調査後、切開面に 1 回白金耳を付けて M-MS 平板に画線し、果実内部から火傷病菌の分離を試みた。健全果実の切開調査は腐敗果と同じ方法で表面殺菌した後、切開し腐敗果内部の腐敗を肉眼で観察することで行った。なお、切開調査を行った各試験区 300 果のうち 100 果については、切開面から腐敗果と同じ方法で火傷病菌の分離を試みた。培養 7~8 日目に細菌集落が形成されていた場合は、実体顕微鏡で集落の性状を確認した。

また、腐敗果は火傷病菌が分離されなかった場合、腐敗原因を顕微鏡観察あるいは培養試験で調査した。

結 果

1. 自然発生園の観察

2000 年 6 月および 9 月に園地の調査を行った結果、自然発病樹の病斑が進展した形跡は観察されず、枯死しているリング樹も観察されなかった。また、隣接した健全樹を含め、発病樹周辺のリング樹に新たな

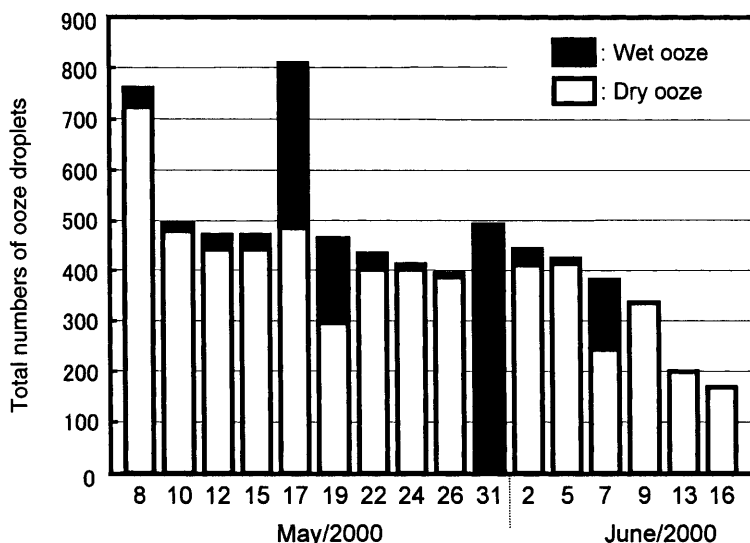


Fig. 3. Total numbers of ooze droplets on the inoculated pear trees and its condition.

発病は認められなかった。

2. 人工汚染園の観察

1) 接種樹

接種樹上に見られた病斑は、接種樹が園地に設置された後、ほとんど進展しなかった。また、伝染源として重要な細菌泥は第1回目に設置された接種樹は多量の菌泥を漏出していたが、2回目以降に設置した接種樹は接種時期に新梢が成熟し始めて固くなっており菌泥の漏出は少なく、さらに園地は乾燥していたため、設置から7日程度で菌泥はすべて乾燥していた。細菌泥の推移、乾燥状況は Fig. 3 に示した。

2) リンゴ樹への感染

第1回目の接種樹が設置されてから約50日後に第3回目と4回目の設置接種樹の間のリンゴ樹(ふじ)1本に flower blight が発生していた。試料を採取し、顕微鏡観察した結果、花柄の維管束から多量の菌泥漏出が認められた。CCT 平板で分離した菌株について火傷病菌の抗血清と PCR による反応を調査した結果、陽性であった。人工汚染園では上記以外の火傷病発病樹は認められなかった。

3) 園地状況

開花期の火傷病菌の花器感染に重要な訪花昆虫については、4月17～27日(開花期)の間、養蜂箱が設置され受粉のために蜜蜂が放飼されていた。灌水は週2回(月、木)に各4時間ずつ under tree 型のスプリンクラーで接種樹の根元に行われていた。ただし、園地の乾燥は激しく灌水後2時間程度で地表面は乾燥していた。

3. 幼果からの火傷病菌の分離

接種樹の隣接樹から採取した10幼果のうち、第1回目設置接種樹の隣接樹から採取した2幼果および第2回目設置接種樹の隣接樹から採取した2幼果の計4幼果(‘ふじ’2果, ‘Braeburn’2果)の表面洗浄液試料から分離された菌株は、血清反応と PCR の結果から火傷病菌と確認された。10 m 試験区、25 m 試験区の幼果表面洗浄液からは火傷病菌を検出できなかった。また、幼果内部からはいずれの試験区においても細菌は検出できなかった。

4. 収穫期の果実内部からの火傷病菌の分離

自然発生園の10 m 試験区8果、25 m 試験区5果、50 m 試験区4果、100 m 試験区3果および人工汚染園の10 m 試験区4果、25 m 試験区2果では M-MS 平板上に細菌集落が形成されたが、Sucrose-YNA 上で火傷病菌のように白色で多量の粘質物を産生する集落はなかった。念のため、スライド凝集法で火傷病菌の抗血清との反応を調査したが、すべて陰性であった (Table 1)。

5. 低温貯蔵後のリンゴ果実上での発病

1) 外観検査

腐敗果(外観異常果を含む)は10 m 試験区32果(‘Braeburn’2果, ‘ふじ’4果, ‘Gala’26果), 25 m 試験区43果(‘Gala’26果, ‘ふじ’17果), 50 m 試験区3果(‘Gala’1果, ‘Red Delicious’2果), 100 m 試験区4果(‘Rome’4果)および300 m 試験区4果

(‘Rome’ 3果, ‘Golden Delicious’ 1果)であった。なお、果実内部の腐敗はほとんど見られなかった。

2) 腐敗原因

いずれの腐敗果からも火傷病菌は分離されなかった (Table 1)。腐敗原因は糸状菌によるものが72果 (*Penicillium* sp. 47果, *Alternaria* sp. 10果, *Cladosporium* sp. 1果, *Botrytis* sp. 11果, *Aureobasidium* sp. 2果, *Penicillium* sp. と *Botrytis* sp. の混合感染1果)で、その他に虫害、傷、日焼けなどによるものが14果であった。

3) 切開調査

外観健全果の内部腐敗はいずれの果実も認められなかった。

4) 切開果からの火傷病菌の分離

50 m 試験区の1果実から蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の集落形成が観察されたが、他の腐敗果および健全果の内部からは細菌が分離されなかった。

考 察

火傷病菌の生活環は、主にアメリカ合衆国で広範囲に調査され、広く紹介されており (THOMSON, 1992; THOMSON, 2000; VAN DER ZWET and KEIL, 1979; VAN DER ZWET and BEER, 1992), その全貌はかなり明らかにされている。本病の伝染環は、春に高温、多湿の気候条件が整った場合、越冬病斑であるかいよう斑に包含されている火傷病菌が活動的になり、第一次伝染源として機能する菌泥を漏出し始める。この細菌泥が昆虫または風雨で花に運ばれ、そこで柱頭表面上で表生的に増殖し、その後、気孔、蜜腺あるいは傷を通じて植物体に侵入する。あるいはあまり効率的ではないが芽に生息する火傷病菌が第一次伝染源として機能する。花器組織内の細胞内で増殖後、花は壊死し、エピナスティーを現し枯死する。枝や幹の感染部位は新しいかいよう斑となり、そこが火傷病菌の越冬病斑となる。二次感染は、一次伝染源や一次感染で発病した部位から、遅延して開花した花や二次開花した花への感染、剪定、風の擦れ、雹、昆虫による損傷を通じての感染などが挙げられている。

リンゴ成熟果実の火傷病菌感染に関連する報告として、果樹園における火傷病菌の表生的生存は一般的に短命であるとの報告がある。(DUECK, 1974; DUECK and MORAND, 1975)。ROBERTSら(1989)は、収穫期にワシントン州の成熟果実の内部および外部から火傷病菌の検出を行っているが火傷病菌は検出されていない。リンゴ生果実が火傷病菌に感染することを示唆す

るものとして、未成熟のリンゴ果実が火傷病に罹病し、細菌粘液を漏出して腐敗することがあるとの報告 (VAN DER ZWET and BEER, 1992), 収穫期に病徴のないリンゴ果実から火傷病菌が検出されたとする報告 (HALE *et al.*, 1987; HALE and CLARK, 1990; SCHOLBERG *et al.*, 1988; VAN DER ZWET *et al.*, 1986; VAN DER ZWET *et al.*, 1990)がある。これらについては、リンゴ生果実の内部ではなく表生している火傷病菌であったり、激しく感染した樹から採取したリンゴ生果実であったり、他の激しく感染した宿主、通常は罹病ナシ樹のすぐ近くにあったものである。さらにリンゴ成熟果実が火傷病菌に感染する可能性を肯定するものとしては、ANDERSON (1952), GOODMAN (1954) および McLARTY (1924, 1925, 1926) の報告がある。しかしながら、ANDERSON (1952) および McLARTY (1924, 1925, 1926) は、針により火傷病菌を接種し、冷蔵貯蔵した果実から火傷病菌が再分離されたことを報告しているに止まり、GOODMAN (1954) の報告では自然感染した2個の‘Jonathan’種のリンゴから真冬に火傷病菌が分離されたことを報告している。しかし、これらの報告の中でも、VAN DER ZWETら(1990)の報告では、無病コントロールとして健全樹から採取した Rome Beauty の外観健全な成熟果実に、貯蔵病害との区別は困難としながらも、冷蔵貯蔵後1ヶ月および2ヶ月後に火傷病症状が確認されされたことを示している。さらに7月に健全樹から健全コントロールとして採取した‘York’種果実内部から火傷病菌を検出したことが述べられており、リンゴ生果実により火傷病が伝播する可能性を議論する場合極めて注目される報告と考えられる。

リンゴ生果実により火傷病が伝播するか否かを論じたこれらの報告のうち、リンゴ生果実の火傷病菌媒介の可能性を否定または無視できるとするものについて共通していることは、「無病徴の成熟果実」、「見かけ上健全な生果実」、「火傷病の病徴のない園地から収穫した果実」であれば安全とされていることである。今回の試験では、試験園の中での火傷病罹病樹の増加は、人工接種樹に接触していた隣接のリンゴ樹が1本のみ人工接種樹の設置が原因で伝染したと思われる発病を確認したのを除いては皆無であった (Table 1)。すなわち、伝染源からの一次感染、あるいは二次感染と思われる現象がほとんど起こらなかったと考えられた。

ワシントン州における火傷病の発生は、春先に高温、多湿の気候が続いた年に多発することであり、このような気候の年は1987年と1994年で、そ

の年には火傷病が多発したとのことである(私信)。このような年にはリンゴやナシの開花前に越冬病斑の火傷病菌が活動を始め、風雨によって周囲のリンゴ、ナシに感染し、flower blight, shoot blight あるいは young fruit blight を引き起こし、果樹園内の菌濃度は高くなっていると推察される。今回の試験を行った Wenatchee の 2000 年の気象記録 (Western Regional Climate Center, <http://www.wrcc.dri.edu/>) を調べると、当年の年間平均降水量が 4.78 インチで、記録を取り始めて以来の同地区の平均年間降水量 8.85 インチの約半分であり、最近の 20 年間の平均年間降水量 (8.66 インチ) と比べてもかなり特異な年であったことがうかがえる。特に、4 月の降水量は 0.03 インチ (同月 20 年間平均 0.556 インチ) と極端に乾燥しており、5 月 0.27 インチ (同 0.541 インチ)、6 月 0.31 インチ (同 0.755 インチ) と乾燥状態が続いたため、リンゴ樹に flower blight, shoot blight あるいは young fruit blight が発生することがほとんどなかったものと考えられる。また、今回の試験を行うに当たっての事前の園地調査において、Yakima 近郊のリンゴ園で受粉樹の品種に火傷病の越冬病斑と思われるかいよう斑はいくつも発見できたが、実際に細菌泥の漏出などにより越冬病斑上の火傷病菌の活動が肉眼で観察できた樹はほとんどなかった。これらの越冬病斑はおそらく、1987 年や 1994 年のように火傷病の多発に適した年になるまで肉眼により確認できるような火傷病菌の活動はないものと推察する。また、人工汚染園として使用した Columbia View 実験園地は、近隣のナシ園で過去に火傷病の発生が記録されているが、リンゴでの火傷病の発生記録はなく環境的にも園地の乾燥が激しく、本試験に適した園地とは言いがたい。

本試験は、平年と比較して乾燥したワシントン州の気象条件下に実施されたことから、ワシントン州における火傷病の多発年ではないシーズンの微発生園で罹病樹から 10 m 以上離れた樹の外観上健全なリンゴ果実の内部には火傷病菌が存在しないこと示す一つの事例を試験的に示したに過ぎない。本試験の結果をもって、火傷病無発生果樹を担保するためにその周囲に設定される緩衝地帯の幅の大小を評価することには問題がある。火傷病の発生・まん延は、第一次感染源の存在は言うまでもなく、当該シーズンの気象や土壌などの環境条件に影響される。そのため、火傷病の伝染源からどれくらいの距離を置くとリンゴの果実が火傷病菌に汚染されることがないかを実証するためには、火傷病の多発する地域の複数の園地で反復して試験を実

施する必要がある。

引用文献

- ANDERSON, H. W. (1952) Maintaining virulent cultures of *Erwinia amylovora* and suggestion of overwinter survival in mummified fruit. *Plant Dis. Rep.* **36**: 301-302.
- BEER, S. V. (1990) Fire Blight In Compendium of apple and pear diseases (Jones, A. L. and H. S. Aldwinckle, eds.), pp. 61-63. APS Press, Minnesota, U. S.A.
- BONN, W. G. and T. VAN DER ZWET, (2000) Distribution and economic importance of fire blight In Fire Blight—The Disease and Causative Agent, *Erwinia amylovora*. (Vanneste, J. L. ed.), pp. 37-53. CABI Publishing, Oxon, UK.
- CLARK, R. G., C. N. HALE and D. HARTE (1993) A DNA approach to *Erwinia amylovora* detection in large scale apple testing and in epidemiological studies. *Acta Horticulturae* **338**: 59-66.
- DUECK, J. (1974) Survival of *Erwinia amylovora* in association with mature apple fruit. *Can. J. Plant Sci.* **54**: 349-351.
- DUECK, J. and J. B. MORAND (1975) Seasonal changes in the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on apple and pear. *Can. J. Plant Sci.* **55**: 1007-1012.
- GOODMAN, R. N. (1954) Apple fruits a sources of overwintering fire blight inoculum. *Plant Dis. Rep.* **38**: 414.
- GUILFORD, P. J., R. K. TAYLOR, R. G. CLARK, C. N. HALE and R. L. S. FORSTER (1996) PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* **411**: 53-56.
- HALE, C. N., E. M. MCRAE and S. V. Thomson (1987) Occurrence of *Erwinia amylovora* on apple fruit in New Zealand. *Acta Horticulturae* **217**: 33-40.
- HALE, C. N. and R. G. CLARK (1990) Detection of *Erwinia amylovora* from apple tissue by DNA hybridization. *Acta Horticulturae* **273**: 51-55.
- ISHIMARU, C. and E. J. KLOS (1984) New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* **74**: 1342-1345.
- LELLIOTT, R. A. (1959) Fire blight of pears in England *Agriculture* **65**: 564-568.
- MCLARTY, H. R. (1923) Report on fire blight and the longevity of *Bacillus amylovora* in honey and in the mature fruit. *Can. Dep. Agric. Domin. Bot. Rep.* **1923**: 31-32.
- MCLARTY, H. R. (1924) Longevity of fire blight bacteria in immature fruit. *Can. Dep. Agric. Domin. Bot. Rep.* **1924**: 73.
- MCLARTY, H. R. (1925) Longevity of fire blight bacteria in immature fruit. *Can. Dep. Agric. Domin. Bot. Rep.* **1925**: 105-107.

- McLARTY, H. R. (1926). Longevity of fire blight bacteria in immature fruit. *Can. Dep. Agric. Domin. Bot. Rep.* **1926**: 134-136.
- MILLER, T. D. and M. N. SCHROTH (1972) Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* **62**: 1175-1182.
- 水野明文・塚本貴敬・川合 昭 (2002) リンゴ生果実内部からの火傷病菌 (*Erwinia amylovora* (BURRILL 1882) WINSLOW *et al.*, 1920) の検出方法. 植防研報 **38**: 9-12.
- PSALLIDAS, P. G. (1990) Fire blight of pomaceous trees in Greece-Evolution of the disease and characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* **273**: 25-32.
- ROBERTS, R. G., S. T. REYMOND and R. J. McLAUGHLIN (1989) Evaluation of mature apple fruit from Washington state for the presence of *Erwinia amylovora*. *Plant Dis.* **73**: 917-921.
- ROBERTS, R. G., C. N. HALE, T. VAN DER ZWET, C. E. MILLER, and S. C. REDLIN (1998) The potential for spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via commercial apple fruit; a critical review and risk assessment. *Crop Protection* **17**: 19-28.
- SCHOLBERG, P. L., A. P. GAUNCE and G. R. OWEN, (1988) Occurrence of *Erwinia amylovora* on pome fruit in British Columbia in 1985 and its elimination from the apple surface. *Can. J. Plant Pathol.* **10**: 178-182.
- 末次哲雄・佐藤成良・高山睦雄・山内淳司 (1981) 植物検疫重要細菌病の診断技法に関する研究・第II報 *Erwinia amylovora* の検出について. 植防研報 **17**: 77-85.
- THOMSON, S. V. (1992) Fire blight of apple and pear. In *Plant Disease of International Importance*. Vol. III. Diseases of Fruit Crops. (Kumar, J. *et al.*, eds.), pp. 32-65. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- THOMSON, S. V. (2000) Epidemiology of fire blight. In *Fire Blight—The Disease and Causative Agent, Erwinia amylovora*. Vanneste, J. L. ed.), pp. 9-36. CABI Publishing, Oxon, U.K.
- VAN DER ZWET, T. and H. L. KEIL (1979) Fire blight. A bacterial disease of Rosaceous plants, U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 510, 200 pp. Washington, D.C.
- VAN DER ZWET, T., S. V. THOMSON, R. P. COVEY and W. G. BONN (1986) Endophytic *Erwinia amylovora* not recovered from core tissues of apples from apparently healthy trees. *Phytopathology* **76**: 1140. (abstract)
- VAN DER ZWET, T., S. V. THOMSON, R. P. COVEY and W. G. BONN (1990) Population of *Erwinia amylovora* on external and internal apple fruit tissues. *Plant Dis.* **74**: 711-716.
- VAN DER ZWET, T. and S. V. BEER (1992) Fire blight—its nature, prevention, and control. A practical guide to integrated disease management. USDA Agriculture Information Bulletin 631, 83 pp., VA.
- VAN DER ZWET, T. (1994) The various means of dissemination of the fire blight bacterium *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin* **24**: 209-214.