カンキツかいよう病菌の病原力に基づく系統分化

独立行政法人農業技術研究機構果樹研究所カンキツ研究部　塩谷（しおたに）　浩（ひろし）

はじめに

カンキツかいよう病はカンキツの葉，枝および果実に発生し，表面が裂開したかいよう状斑点をつくる（図-1）。本病の被害はもっぱら果実の外観を損ねて商品価値を落とすことにあるが，激しく発生すると，落葉や小枝の枯れ込み等によって樹体の生育や着果を著しく阻害する。

カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *citri*（Hasse）Dye はすべてのカンキツ属植物に感染する。また，本細菌では明確なレース分化は確認されていない。しかし，近年，アジア南西部諸国においてメキシカンライムのみに典型的なかいよう症状を引き起こす分離株が確認されるなど，病原性の多様性が示唆されている（Gottwald et al., 2000）。また，南米諸国では，主にレモンやメキシカンライムを中心に発生するかいよう病が存在する（Gottwald et al., 2000）。

カンキツかいよう病はその強い病原性から国際的に重視されているが，我が国では本病に比較的抵抗性のウンシュウミカンが栽培の大半を占めてきたため，台風通過など本病が多発する環境に遭遇しない限り大きな問題とはならなかった。しかし，近年，ウンシュウミカンの生産過剰が価格低下を招き，産地では優良品種系統への更新および品種の多様化を迫られている。このような状況において，かいよう病が重要な阻害要因となることが懸念される。そこで，筆者らは今後の本病対策における基礎的資料を得るため，我が国で発生するカンキツかいよう病の病原細菌について病原性を異とした系統が存在するかどうか調査を行った（Shiotani, et al., 2000）。本稿では，それらの結果の概要とともに新たに見出されたカンキツかいよう病菌の系統とその識別法を紹介する。

図-1　ネーブルオレンジに発生したカンキツかいよう病

Differentiation in Aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*（Hasse）Dye.　By Hiroshi Shiotani

（キーワード：カンキツかいよう病菌，病原力，系統，rep-PCR）

I　カンキツかいよう病菌の多様性

1　カンキツかいよう病菌の種類

カンキツかいよう病（citrus canker）は世界のカンキツ栽培地帯に広く発生しているが，病原性が異なるいくつかのタイプが存在する（Gottwald, 2000）（表-1）。世界中に広く発生し，最も重要視されているのがアジア型（A型ともいう；canker A）と呼ばれるもので，病原性が強くカンキツ属のすべてと多数のミカン科植物に発生する。これとは別にアルゼンチン，ウルグアイおよびパラグアイでレモンを中心として発生しているかいよう病はB型（cancrosis B）と呼ばれている。さらに，ブラジルではC型（cancrosis C）と呼ばれるかいよう病がメキシカンライムに発生する。いずれのタイプも *Xanthomonas campestris* によって引き起こされるが，A型とBおよびC型間で病原細菌の血清学的性質，生理的性質，ファージ感受性，さらにDNA相同性等が異なり，現在，A型の病原細菌は *X. campestris* pv. *citri*，一方，BとC型は *X. campestris* pv. *aurantifolii* と異なる病原型に分類されている。

他のタイプとしてメキシコのメキシカンライムで1981年に確認されたD型およびアメリカ合衆国フロリダ州で1984年に確認されたE型がかいよう病として認

表-1　カンキツかいよう病菌の種類[a]

型	病原細菌	発病する植物
A（canker A）	*Xanthomonas campestris* pv. *citri*	ミカン亜科植物
B（cancrosis B）	*Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii*	レモン，メキシカンライム，サワーオレンジ，ブンタン
C（cancrosis C）		メキシカンライム

[a] Gottwald, 2000 による．

識されていた。しかし，D型は後に別の病原菌 *Alternaria limicola* による病害と断定された。また，E型はA，BおよびC型と病徴および病原細菌の諸性質が異なり，*X. campestris* pv. *citrumelo* によるcitrus bacterial spotとしてcankerとは別の病害に扱われている。なお，1986年よりオマーンをはじめとするアジア西南部諸国で確認されているかいよう病はメキシカンライムにのみ典型的なかいよう症状を起こす。本病原細菌はDNA解析により *X. campestris* pv. *citri* と同一と考えられている（Vernière, 1998）。

2　日本産カンキツかいよう病菌における病原型の同定

我が国で発生するカンキツかいよう病は *X. campestris* pv. *citri* によることが確認されている（Goto, 1980）。しかし，最近，カンキツの栽培品種が多様化する傾向にあるため，改めて病原細菌の同定を行った。国内17県30地点より分離したカンキツかいよう病菌124菌株について本細菌の抗血清に対する凝集反応を調べた。その結果，対照に用いた *X. campestris* pv. *aurantifolli* 株はほとんど反応しなかったのに対し，すべての国内分離株は *X. campestris* pv. *citri* の標準株NCPPB 409と同様に凝集反応を示した。また，近年，開発された *X. campestris* pv. *citri* を特異的に検出するPCR法（Hartung et al., 1993）によっても同定を試みた。本PCR法で用いるプライマーは本細菌のプラスミド上の配列をもとに設計されている。この配列は他の細菌には存在しないため，*X. campestris* pv. *citri* のみをPCRで検出できる。日本産分離株について本法を実施したところ，すべての供試株で本病原型に特異的なDNA断片が増幅された。以上の結果は，日本産カンキツかいよう病菌は *X. campestris* pv. *citri* であることを示唆した。南米では，*X. campestris* pv. *aurantifolli* が発生していたカンキツ園に *X. campestris* pv. *citri* が新たに侵入した場合，徐々に置き換わって前者は全く分離されなくなるようである（Schubert et al., 2001）。したがって，すでに *X. campestris* pv. *citri* が土着している我が国では，仮に *X. campestris* pv. *aurantifolli* が存在しているとしても分離することは困難であるのかもしれない。

II　*X. campestirs* pv. *citri* で見出された病原力が異なる系統

カンキツかいよう病では病原細菌の増殖に伴って病斑が拡大する（Koizumi and Kuhara, 1982）。したがって，同一のカンキツ植物に形成される病斑の大きさを分離株ごとに比較すれば，株間における病原力の違いを明らかにできる。そこで，国産のカンキツかいよう病菌に病原力が異なる系統が存在するかどうかを明らかにするため，九つの異なるカンキツ植物と複数の分離株を用いて各株が形成する病斑の大きさを計測した。その結果，ネーブルオレンジ，グレープフルーツ，ウンシュウミカン，メキシカンライム，ユズおよびタチバナでは，全ての供試株が植物ごとにほぼ同じ大きさの病斑を形成した。一方，'オオタチバナ'，'アンセイカン'および'バンペイユ'では，株間で病斑の大きさが有意に異なった。さらに供試株数を増やして'オオタチバナ'に付傷接種したところ，本細菌は病斑の大きさの違いに基づいて明らかに二つのグループに分かれた（図-2）。'オオタチバナ'，'アンセイカン'および'バンペイユ'はいずれもブンタン類（Pummelo；*Citrus grandis* Osbeck）に属すると考えられている。したがって，*X. campestris* pv. *citri* で見出された病原力の違いは本種に特異的ではないかと考えられた。

南西アジアで確認された病原性変異株が我が国にも存

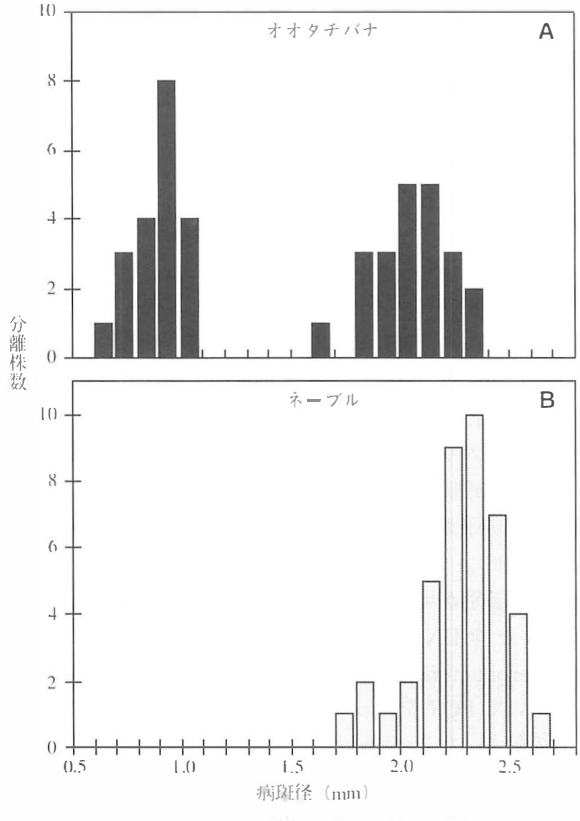


図-2　カンキツかいよう病菌分離株のオオタチバナおよびネーブルオレンジの葉における病斑の大きさの分布

在するかどうかについても関心が持たれた。しかし，我が国のカンキツかいよう病菌からはメキシカンライムのみにかいよう症状を引き起こす株は現在まで全く分離されていない。

III　病原力が異なる系統の識別

1　病原力の違いと相関するファージ感受性

ブンタン類に対して病原力が異なるカンキツかいよう病菌の系統が新たに見出されたが，接種試験によって系統を識別することは手間と時間がかかる。そこで，簡便な系統識別を行うことを目的に病原力の違いと相関する細菌の形質を探索した。日本産カンキツかいよう病菌分離株について本細菌に特異的なファージ Cp 1 および Cp 2 に対する感受性を調査した結果，ファージ感受性の違いと病原力の違いが相関することが判明した。すなわち，Cp 1 に感受性で Cp 2 に抵抗性の株は全て弱い病原力を，一方，Cp 1 に抵抗性で Cp 2 に感受性の株は全て強い病原力を示した（表-2）。また，両者のファージに抵抗性の株は強病原力系統であったことから，Cp 1 抵抗性が強病原力系統の指標となるのではないかと考えられた。しかし，両ファージに感受性の株が双方の系統に存在するため，ファージ感受性の調査のみでは正確な系統識別は困難である。

表-2　カンキツかいよう病菌の病原力とファージ感受性の相関

病原力	ファージ型[a]			
	Cp 1^S/Cp 2^R	Cp 1^R/Cp 2^S	Cp 1^R/Cp 2^R	Cp 1^S/Cp 2^S
強	0	17	1	2
弱	17	0	0	3

[a] Cp 1^S：Cp 1 感受性，Cp 1^R：Cp 1 抵抗性，Cp 2^S：Cp 2 感受性，Cp 2^R：Cp 2 抵抗性．数字は分離株数．

2　rep-PCR による系統識別

近年，細菌の属・種・系統間の類縁関係を解析する手法として rep-PCR（repetitive sequence-based polymerase chain reaction の略）が開発された（Valsalovic et al., 1991）。rep-PCR では，属・種間を超えて広く細菌ゲノムに保存されている反復配列をプライマーに用いる。反復配列はゲノム内で分散して存在しているため，供試しようとする細菌間でゲノム構造が異なる場合，rep-PCR によりそれぞれ異なった DNA フィンガープリントが得られる。rep-PCR は *Xanthomonas* 属細菌でも利用され，同一病原型内における異なる遺伝子型を識別できることが示された（Louws et al., 1996）。そこで，本法によりカンキツかいよう病菌の系統識別が可能かどうか調べた。本細菌分離株から抽出した全 DNA を鋳型とし，プライマーに ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) 配列を用いて PCR を行った（これを ERIC-PCR と呼ぶ）。その結果，0.2～2.5 kb の大きさの DNA 断片が 15 または 16 本増幅された。DNA フィンガープリントは供試株間でほぼ均一であったが，強病原力系統株においてのみ約 1.8 kb の DNA 断片が特異的に増幅されることが確認された（図-3）。この特異的な DNA 断片は，両

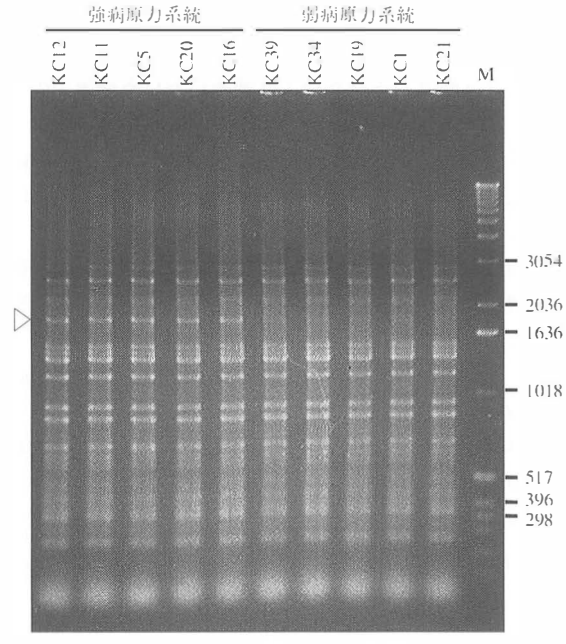


図-3　カンキツかいよう病菌各系統分離株の全 DNA を鋳型とした ERIC-PCR（矢印は 1.8 kb DNA 断片を示す）

ファージに感受性であっても病原力が強い株であれば例外なく増幅された。したがって，rep-PCR を用いれば接種試験を行わずに正確な系統識別が可能であると考えられた。

IV　今後の研究課題

1　各系統の伝染力の比較

先にも述べたが，カンキツかいよう病では病斑の拡大に病斑中における細菌の増殖が反映する。したがって，系統間で病原力に違いが認められたブンタン上では，病斑形成後にそこから溢出してくる細菌数が系統間で異なり，結果として伝染力にも違いが生じると推測される。もしそうであれば，ブンタン類を新たに栽培するに当たって強病原力系統が存在する園地を避けるなど，本病の有効な対策が期待できるかもしれない。そのためには，各系統の伝染力について具体的に比較し，差異を明確に

する必要がある。

2　系統間の病原力の違いに関わる因子の同定

病原力が異なる系統の発見は，カンキツかいよう病菌の病原力発現機構を解明する上においても重要な知見をもたらすと期待される。

本細菌系統間の病原力の違いは *C. grandis* に属するカンキツ品種上でのみ認められるため宿主特異的と考えられる。*Xanthomonas* 属細菌を含むいくつかの植物病原細菌では，宿主特異性に非病原力（*avr*）/病原力（*pth*）遺伝子が関与することが知られている（Gabriel, 1999）。*avr* は非親和性の植物で特異的に抵抗性反応を引き起こすのに対し，*pth* は親和性の宿主植物に対して病原性を発現する。カンキツかいよう病菌でも既報の非病原力遺伝子 *avrBs3* と高い相同性を持つ遺伝子が少なくとも三つ確認されている（Kanamori, 1998）。しかし，いずれの遺伝子もカンキツに過敏感反応などの抵抗性反応を引き起こさず *avr* としての機能は認められていない。また，本細菌系統間の病原力の違いに *avr* が関与しているならば，弱病原力系統はブンタンに対し速やかな壊死などの過敏感反応を引き起こすはずである。しかし，高濃度（10^8 CFU/ml）の細菌懸濁液をブンタン葉に注入接種してもかいよう症状のみが引き起こされ，接種試験では *avr* の関与を示す証拠は得られなかった。そこで，関与する遺伝子を直接，単離・同定するためにトランスポゾンタギング実験を行った。その結果，興味深いことにレシピエントに弱病原力系統株を用いたときにのみ，ブンタンに特異的な病原力のみが変異した株が得られた。この結果は，本細菌にも *avr* のごとく病原力発現を宿主特異的に抑制する遺伝子が存在することを示唆すると思われる。現在，トランスポゾン挿入により破壊された遺伝子を単離するとともに変異相補実験により同定を進めている。

おわりに

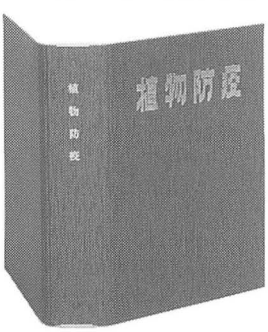
カンキツかいよう病菌においてこれまで未確認であった系統が確認されるとともに，その識別法が確立された。系統の確認により，今後，本病の防除対策を一層合理的なものにすることが期待される。また，抵抗性育種，特にブンタン類を素材とした育成にあたっては有用な選抜指標となろう。さらに，病原力発現機構の分子レベルでの解明が微生物と植物の特異的な相互作用の理解に役立ち，新たな防除手段の開発につながることを願っている。

最後に，カンキツかいよう病菌の採集にご協力いただいた関係各位に厚く御礼申し上げる。

引用文献

1) Gabriel, D. W. (1999) : Plant-Microbe Interactions Vol. 4. APS Press, pp. 39～55.
2) Goto, M. et al. (1980) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **46** : 329～338.
3) Gottwald, T. R. and J. H. Graham (2000) : Compendium of Citrus Diseases. APS Press, pp. 5～7.
4) Hartung, J. S. et al. (1993) : Appl. Environ. Microbiol. **59** : 1143～1148.
5) Kanamori, H. and S. Tsuyumu (1998) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **64** : 462～470.
6) Koizumi, M. and S. Kuhara (1982) : Bull. Fruit Tree Res. Stn. **D4** : 73～92.
7) Louws, F. J. et al. (1994) : Phytopathology **85** : 528～536.
8) Schubert, T. M. et al. (2001) : Plant Dis. **85** : 340～356.
9) Shiotani, H. et al. (2000) : Phytopathology **90** : 1383～1389.
10) Valsalovic, J. et al. (1991) : Nucleic Acid Res. **19** : 6823～6831.
11) Verniere, C. et al. (1998) : Eur. J. Plant Pathol. **104** : 477～487.

便利にご利用いただけます。『植物防疫』専用合本ファイル



本誌1年分（12冊）が簡単に製本できます。

〈本誌名金文字〉

定価 733 円（本体 699 円＋税）

送料 390 円

■書棚を飾る美しい外観　■冊誌を傷めず保存ができる

■取り外しが簡単にできる　■ビニールクロスで長期保存ができる

ご希望の方は，現金・郵便振替で直接本会へお申し込み下さい