

特集：果樹病原体の病原性検定法

カンキツかいよう病の病原性検定法

農研機構 果樹研究所 カンキツ研究領域 ^{しお}塩 ^{たに}谷 ^{ひろし}浩

はじめに

カンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri* A型) はすべてのカンキツ属とカラタチ属を含むミカン科植物に感染し、葉、緑枝および果実に中心部がコルク化した円形の病斑を形成する。果実での発病は商品価値の低下に直結するほか、激しく感染すると落葉や枝枯れを引き起こして樹勢を低下させ、長期にわたって生産を阻害する。これまで日本では本病に比較的強いウンシユウミカンを主として栽培してきたため、大きな問題になることは少なかった。しかし、近年とみに頻発する異常気象や台風がその強い風雨で著しく感染を助長し、かいよう病は多発傾向となっている。また、一段と進む嗜好の多様化に対応すべく新品種への更新が進んでいるが、抵抗性に劣る品種も含まれるため以前にも増して警戒すべき病害となっている。

カンキツかいよう病は病徴が明瞭で一目でそれとわかるため、栽培の現場で病原性検定が必要とされる場面はそれほど多くない。しかし、カンキツかいよう病菌には病原力が異なる系統が存在するほか、海外では本病に類似した斑点病を引き起こすいくつかの *Xanthomonas* 属細菌が確認されており (塩谷, 2010)、これら細菌・系統の鑑別において病原性検定は不可欠である。また、耐病性品種の開発やカンキツ品種・系統間における耐病性の差異の評価においても検定技法の活用が検討されている。本稿では、カンキツかいよう病菌の病原性検定で用いる接種並びに評価の技法を具体的に紹介していく。

I 接種源と検定用植物の準備

1 接種源

自然環境下で形成された病斑を使って直に病原性検定を行う場合は、切り取った病斑を生理食塩水 (0.85% NaCl) とともに乳鉢で摩砕した後、上澄みをそのまま接種源とする。なお、新しい病斑には高密度でカンキツかいよう病菌が存在するが、時間の経過とともに密度が低下して *Erwinia herbicola* や *Fusarium* 属菌等の雑菌が

増殖する。そのため古い病斑からは病原細菌を画線培養などで直接単離することが困難である。この場合、後述の葉肉注入接種法で検定を行えば、病原性の確認のみでなくかいよう病菌の単離が容易な新しい病斑を得ることができる。

既に単離・保存した細菌株を接種に供試する場合は、いったん酵母エキス・ペプトン寒天培地 (YP培地; 酵母エキス 0.3g, ペプトン 0.5g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000ml, pH6.8) 上で当該株を28℃下で1~2日ほど培養した後、任意の濃度で生理食塩水に懸濁して接種源とする。なお筆者が常用してきた細菌株は農業生物資源ジーンバンク (https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php) 保存の MAFF673034 (KC20株) および MAFF673037 (KC21株) である (塩谷, 2010)。

2 検定用植物

検定では目的に応じてカンキツの品種を選ぶ (後述)。切り取り葉に接種する場合は、展葉が済んで硬化した直後の成葉を葉柄ごと枝から切り取って使用する。また、接種後は保水させたスポンジに葉柄を挿し込むとともにコンテナなどに密閉して鮮度保持を図り (図-1)、28℃下で静置する。ただし、1か月以上も鮮度を保つ品種は「川野ナツダイダイ」のみであり、その他は早ければ1週間程度で葉柄間との離層から葉身が脱落するため留意する必要がある。一方、鉢植え苗の着生葉に接種する場合は濃厚感染させない限り落葉の心配はない。鉢植え苗には7号程度のポットでカラタチ台木に接ぎ木したもの



図-1 コンテナ内に静置した切り取り葉

Pathogenicity Assay for *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. By Hiroshi SHIOTANI

(キーワード: 注入接種, 付傷接種, 噴霧接種, 耐病性, 抵抗性)

を準備する。用土は果樹用として市販されているもので問題ない。接種は展葉・硬化した直後の成葉に行う。接種後の苗は温室内で育成し、接種部以外への伝染を防ぐため、灌水の際も植物体に水が被らないよう注意する。

II 接種方法

1 葉肉注入接種法

カンキツかいよう病では病徴観察のみで大抵は診断に事足りるが、それでも本病と酷似した病徴でカンキツ黒点病が発生する‘せとか’など、病原性検定が役立つ場面がある。診断にあたっては葉肉注入接種法を用いると最も簡便かつ高感度に病原性検定が行える。

接種手順は以下の通りである；①カンキツの硬化した成葉に昆虫針などで1箇所穿刺した後、②葉表側の穿刺痕を人差し指で塞ぐ一方、葉裏側の穿刺痕に病斑摩砕液（カンキツかいよう病菌懸濁液）の入ったシリンジ（1 ml 容量）を押し当てながら穏やかに液を注入する（図-2 a）。病原細菌が高濃度（ 10^7 CFU/ml 以上）で注入された場合、気温 20～30℃ 下、1週間程度で注入部全体が一体的に膨れ上がったかいよう症状として病徴が観察される（図-2 b）。また、細菌濃度が低い（ 10^3 CFU/ml 以下）と病徴発現に最大3週間程度かかるが、病斑はそれぞれ独立した斑点として形成される（図-2 c）。

供試するカンキツ品種は‘ネーブルオレンジ’や‘川野ナツダイダイ’等のかいよう病に高感受性のものとするが、ライム類（*Citrus aurantifolia*）は雑菌であっても高濃度で注入されるとかいよう病菌の場合と酷似した症状が現れるため不適である。

2 付傷接種法

(1) 単針付傷接種法

カンキツかいよう病菌は気孔などからピンポイントで感染すると斑点病斑を形成し、病勢の進展とともに同心

円状に拡大する。また、病斑の拡大は病斑内における病原細菌の増殖と相関するため、個々の菌株の病原力を簡便かつ客観的に評価する指標として病斑の大きさが利用できる。また、本法によりカンキツ品種・系統間における拡大抵抗性の差異も評価することがおおむね可能である。

接種手順は以下の通りである。細菌株個々の病原力を評価する場合、検定植物には細菌株間で宿主特異性に分化が認められないネーブルオレンジを選択し、その鉢植え苗を供試する（SHIOTANI et al., 2000）。 10^7 ～ 10^8 CFU/ml のかいよう病菌懸濁液を着生葉の葉裏に葉脈を避けつつ1葉当たり2～6箇所それぞれ10 μ l 程度滴下した後、昆虫針で液滴ごと葉を針先でわずかに穿刺することにより接種する（図-3 a）。接種後は葉裏に残った細菌懸濁液滴を拭き取り40日間供試苗を育成する。

接種から約4日後、接種部位には円形で水疱様の斑点が形成され、徐々に拡大するとともに中央部が裂開してカルス状に隆起する。さらにこの隆起は後にコルク化・褐変してかいよう症状を呈し、その周囲が約1 mm 幅の水浸状に病変した組織で縁取られる（図-3 b）。病斑の大きさは水浸状の縁取りまでとし、その直径を直接計測するか、あるいは面積を Assess 2.0 (APS press) などの画像解析ソフトで算出する。病原力の強さは病斑径の大きさに基づいて各供試株間で相対的に評価する。

カンキツかいよう病菌であれば、菌株間で病斑の大きさに違いは認められても病徴はおおむね同一である。しかし、本病とよく似た斑点病をレモンなどに引き起こす *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* およびライム類でのみ発病する *X. citri* subsp. *citri* の A* 型では、ネーブルオレンジに付傷接種しても水疱様の小斑点を形成するのみでカルスの発達には至らない。なお、*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* および *X. citri* subsp. *citri* の A* 型はいずれも国内未発生である。

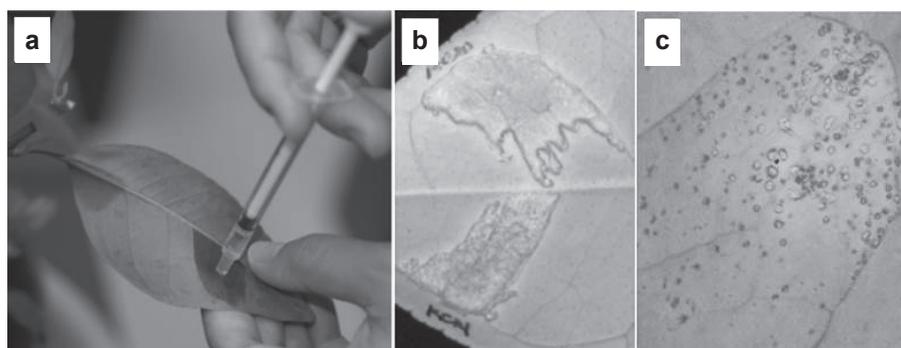


図-2 葉肉注入接種法 (a) および同法で接種後に形成された病斑 (b: 細菌濃度 10^8 CFU/ml, c: 同 10^3 CFU/ml)

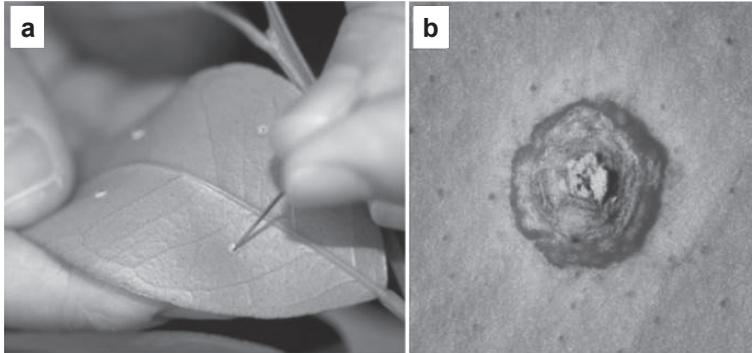


図-3 単針付傷接種 (a) およびネーブル葉裏における病斑 (接種 40 日後) (b)

(2) 多針付傷接種法

カンキツかいよう病菌にはブンタン類 (*C. grandis*) に対して、弱い病原力を示す系統 (弱病原力系統) と通常の病原力を持つ系統 (標準病原力系統) の2系統が確認されている。これらの系統間における病原力の違いは先述の単針付傷接種法でブンタン類 (‘安政柑’, ‘晚白柚’, ‘大橘’ 等) に接種することにより比較的明瞭な識別が可能である。即ち、弱病原力系統が形成する病斑は標準病原力系統によるものと比べ有意に小さくなる。しかし、単針付傷接種法では系統間で病徴にほとんど違いが認められず、病斑の大きさの差異も接種から少なくとも20日以上は経過しないと明らかとはならない。

カンキツかいよう病菌のブンタン類に対する病原力の分化は、弱病原力系統のみが保持する病原力関連遺伝子 *hssB3.0* に起因している。*hssB3.0* はカンキツにかいよう症状を引き起こす遺伝子 *pthA* (SWARUP et al., 1991) と極めて高い相同性を持つ。*pthA* は本細菌の病原性発現に必要な不可欠な遺伝子であり、微生物の感染に対して通常、宿主が発現するはずの抵抗反応を抑制する機能も認められている (FUJIKAWA et al., 2006)。ところが *hssB3.0* が存在すると、ブンタン類特異的に *pthA* の機能発現が抑制される一方、宿主に抵抗反応が誘導される。この抵抗反応の誘導は以下に紹介する多針付傷接種法を用いると接種から比較的早期に視覚的な観察が可能となる。

多針付傷接種法では先端を水平に切断した 1 ml マイクロピペット用チップに無頭昆虫針 (No.5, 志賀昆虫普及社) を 80 本程度、針先をそろえて詰め込んだ後、エポキシ系接着剤を流し込んで固定した付傷器具を作成する (図-4 a)。接種にはブンタン類の鉢植え苗を供試し、硬化した着生葉の葉裏から上述の付傷器具をスタンプのように押し付けて傷をつける。この際、折りたたんだキムワイプなどをスタンプの裏あてにして付傷器具を穏や

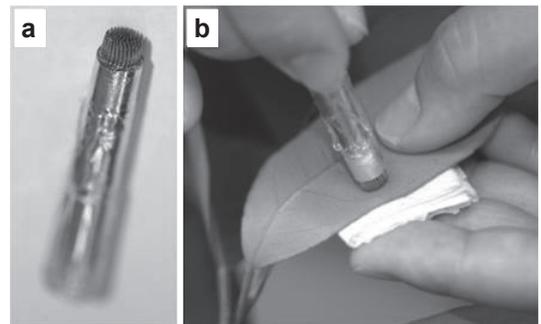


図-4 多針付傷接種に用いる付傷器具 (a) および付傷処理 (b)

かに押し付ける (図-4 b)。なお、押し付けすぎると針穴がつながって葉が切断されるため力加減に注意する。付傷したら直ちに $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml のカンキツかいよう病菌懸濁液を含ませた滅菌脱脂綿で付傷部を拭いて接種した後、供試苗を温室内で育成する。いずれの病原力系統でも接種から約 4 日後から接種部位を中心に水浸状を呈しはじめ、次第にカルスが隆起する。その後、標準病原力系統株 (KC20) では旺盛にカルスが発達を続けるが (図-5 a)、弱病原力系統株 (KC21) ではその発達は鈍く、接種から 8 ~ 12 日後に多くの付傷部の周辺が褐変する (図-5 b)。なお、抵抗反応に関連するフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子について接種部位の葉組織での転写量を調べると、接種後 8 ~ 12 日にかけて弱病原力系統では標準病原力系統に比べて顕著に多く、遺伝子レベルでも抵抗反応の活性化が確認できる。

III カンキツかいよう病耐病性の評価

カンキツ類のカンキツかいよう病に対する耐病性程度に品種間差異があることは経験的に知られていた。ま

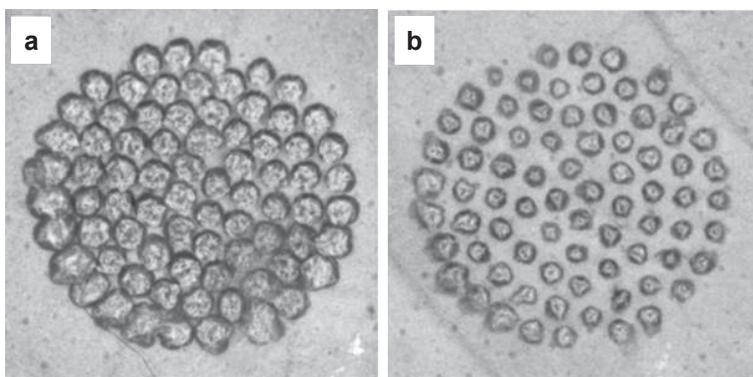


図-5 多針付傷接種から9日後の'晩白柚'葉裏における病斑 (a: KC20, b: KC21)

た、KOIZUMI and KUHARA (1982) は複数の交配組合せにおける後代の耐病性個体出現頻度を調査し、本病に対する耐病性が遺伝性のものであることを示している。本病に対する耐病性には圃場 (量的) 抵抗性のほか、ブタン類で認められるように動的 (質的) 抵抗性に由来する要素も少なからず含まれていると推察される。しかし、本病への耐病性については未だ研究途上であり、系統的に評価するまでには至っていない。

カンキツかいよう病に対する耐病性の評価は、圃場における発病程度から判定する方法が最も妥当である。その理由は、かいよう病に強いのか否かは単に植物組織そのものが発揮する抵抗力のみならず、本病に感受性の高い軟弱な新梢がどのように発育するか、すなわち、発芽数の多寡や緑化までに要する日数等によっても大きく左右されるためである。しかし、圃場調査では扱える検体数に限りがあり、また、単年度の調査では信頼性が低いため複数年にわたる継続観察が必須となる。したがって、抵抗性の評価を十分な規模で短期間に実施するには容積の小さい鉢植え苗を使った接種試験が不可欠である。

1 拡大抵抗性の評価

先述の通り、カンキツかいよう病の病斑は感染部位を中心として同心円状に拡大する。圃場観察で感受性が高いとみなされた宿主では、病斑が急速かつ長期間にわたって拡大するが、抵抗性の宿主では拡大が緩慢で早期に停止する。また、急速に拡大する病斑からは病原細菌が多数溢出するが、拡大が緩慢になるにしたがい溢出量が減少する (小泉, 1977)。これらの観察は、カンキツのかいよう病に対する総合的な抵抗力には病原細菌の侵入を許しても組織内の局部にとどめて拡大を抑制しようとする拡大抵抗性の寄与が大きいことを示唆する。したがって、先述の単針付傷接種法によって拡大抵抗性を評価

すれば、圃場における発病の程度をおおよそ推察することが可能と思われる。

単針付傷接種法によって拡大抵抗性を評価する場合、供試植物の生育条件を一定にそろえる必要がある。これは、同一のカンキツ品種であっても組織・器官の齢 (成熟度) が異なるとかいよう病に対する感受性が異なってくるためである (VERNIÈRE et al., 2003)。そのため、検定を始めるにあたってはまず供試する苗木すべてを剪定して、新梢の斉一な発生を促すことにより供試する葉の齢を均一化する。その後は先述の手順で接種と病斑の大きさの算定まで行うことにより供試植物個々の拡大抵抗性を評価する。なお、気温や日照等の環境条件が試験結果に与える影響を考慮して、統計処理に堪えうる程度まで試験を反復する。

2 侵入抵抗性の評価

圃場での耐病性と例外なく相関するのであれば、拡大抵抗性を評価するのみで耐病性系統を選抜しても問題ない。しかし、露地では極めて強い耐病性を示すが、付傷接種すると容易に感染して比較的大きな病斑が形成されるユズのような品種も存在する。このような品種では、いったん感染が成立してしまうと病原細菌のさらなる増殖を阻止するに十分な拡大抵抗性に欠ける一方、宿主への侵入および感染過程では発病を阻止しうのではないかと考えられる。したがって、かいよう病への耐病性をより正確に推察するには拡大抵抗性のみでなく、病原細菌の侵入・感染に抗する性質、すなわち侵入抵抗性も評価することが望まれる。

カンキツかいよう病菌の懸濁液をカンキツの枝梢に噴霧すると、圃場での耐病性が低い品種・系統ほど傷口がないにもかかわらず感染して発病する。一方、耐病性の高いカンキツでは発病しないか、発病してもその程度は

穏やかで一葉あたりの病斑数も少ない。おそらく、噴霧により発生する風・水圧が病原細菌を気孔に押し込むことで低耐病性のカンキツでは宿主への侵入と感染が達成されるが、高耐病性カンキツではこの段階が隘路となり、すなわち侵入抵抗性に優れているものと推察される。

圃場観察では新梢発芽後に成葉時の葉長の70～90%まで新葉が伸長した時期が最もカンキツかいよう病に対する感受性が高く、気孔感染に最適と考えられている。そこで噴霧接種により侵入抵抗性を評価する際にも先述した拡大抵抗性の場合と同様、供試する苗木すべてをいったん剪定して新梢の斉一な発生を促す必要がある。しかし大抵の場合、斉一な生育は見込めず、供試植物ごとに新梢伸長のペースが異なる場合がほとんどである。拡大抵抗性の場合ではすべての供試植物で新葉が硬化するまで待ってから付傷接種を施すうえ、確実に感染する。一方、噴霧接種では時機を逸すると格段に感染率が低下するため接種のタイミングが計りづらい。したがって、評価の信頼性を高めるには付傷接種以上に試験を反復する必要がある。ところが耐病性の低い品種・系統では、噴霧接種により新梢だけでなく前節の成葉まで感染してしまい、樹勢が低下して再度の供試に耐えられないことも珍しくない。

噴霧接種による侵入抵抗性の評価を実用化するためにはまず感染適期に接種することが必須である。新梢の生

育を斉一化させることは極めて困難なため、新梢への噴霧接種は1回にとどめず、伸長期間全般にわたって定期的に接種を繰り返すべきだろう。しかし、接種を反復すると低耐病性の供試植物では感染が累積していつそう樹勢が低下する恐れが高い。このような問題は、接種圧を低くすることにより解決できると考えられる。そこで現在、自然突然変異により宿主非特異的に病原力が低下したカンキツかいよう病菌を接種源とし、これを 10^3 CFU/ml程度の低密度で手押し噴霧器により反復して接種を行い、侵入抵抗性を評価できないか検討を行っている。これまでのところ、この病原力低下変異株を耐病性の低いカンキツに噴霧接種しても、成葉のみならず新葉でさえもいったん硬化してしまうと感染はせず、感染期間をその好適期に限定できること、さらに、極端な樹勢低下には至らないことを確認している。

引用文献

- 1) FUJIKAWA, T. et al. (2006): *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 342～349.
- 2) 小泉銘册 (1977): *日植病報* **43**: 129～136.
- 3) KOIZUMI, M and S. KUHARA (1982): *Bull. Fruit Tree Res. Stn. D* **4**: 73～92.
- 4) 塩谷 浩 (2010): *微生物遺伝資源利用マニュアル* 29, 独立行政法人農業生物資源研究所, つくば, p. 1～11.
- 5) SHIOTANI, H. et al. (2000): *Phytopathology* **90**: 1383～1389.
- 6) SWARUP, S. et al. (1991): *ibid.* **81**: 802～809.
- 7) VERNIERE, C. J. et al. (2003): *ibid.* **93**: 832～843.