

## Species-specific PCR primers for the detection of *Sporobolomyces productus* and *S. corallinus*, the causal agents of citrus pseudo greasy spot

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): citrus pseudo greasy spot, detection, species-specific PCR, <i>Sporobolomyces corallinus</i> , <i>Sporobolomyces productus</i> 作成者: 古屋, 典子, 足立, 嘉彦, 塩谷, 浩一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00002080">https://doi.org/10.24514/00002080</a>

## 原著論文

カンキツにせ黄斑病を引き起こす担子菌系酵母 *Sporobolomyces productus*  
および *S. corallinus* の種特異的プライマーを用いた PCR 法による検出古屋典子<sup>†1</sup>・足立嘉彦・塩谷浩一<sup>†2</sup>・\*独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
果樹研究所カンキツ研究領域  
424-0204 静岡県静岡市Species-specific PCR primers for the detection of *Sporobolomyces productus* and *S. corallinus*, the causal agents of citrus pseudo greasy spot

Noriko FURUYA, Yoshihiko ADACHI and Hiroshi SHIOTANI

Citrus Research Division, Institute of Fruit Tree Science  
National Agriculture and Food Research Organization (NARO)  
Shizuoka, Shizuoka 424-0292, Japan

## Summary

Citrus pseudo greasy spot (PGS) has been prevalent in Japan since the 1960s. Two basidiomycetous yeasts, *Sporobolomyces productus* and *S. corallinus*, were identified as the causative pathogens (Furuya et al., 2012). Species-specific PCR primers were designed to detect the 2 PGS pathogenic yeasts based on sequences in the ITS regions of ribosomal RNA genes of all 6 species belonging to the *Subbrunneus* lineage in the genus *Sporobolomyces*. We attempted to detect the 2 PGS pathogens from a diseased tree in a commercial field and from artificially inoculated plants by species-specific PCR. PCR did not detect *S. productus*; however, it detected *S. corallinus* from both symptomatic and asymptomatic leaves of the diseased tree. This result indicates that the yeast pathogen in the commercial field was *S. corallinus*. PCR amplification detected *S. productus* and *S. corallinus* from the leaves of the artificially inoculated plants 1.5 months after inoculation. However, the PCR results were negative for *S. productus* and faintly positive for *S. corallinus* from them 2 months after inoculation. In the inoculated plants, chlorotic spots were observed 2 months after inoculation, and tiny black spots surrounded by chlorosis characteristic of PGS appeared 3 months later. These results suggest that PCR detection must be performed at the early stage of infection by PGS pathogens.

---

(2012年9月10日受付・2013年4月16日受理)

<sup>†1</sup> 元 果樹研究所カンキツ研究領域 静岡県静岡市

<sup>†2</sup> 果樹研究所カンキツ研究領域 (口之津) 長崎県南島原市

\*Corresponding author. E-mail:hiroshi@affrc.go.jp

**Key words:** citrus pseudo greasy spot, detection, species-specific PCR, *Sporobolomyces corallinus*, *Sporobolomyces productus*

## 緒 言

カンキツにせ黄斑病 (pseudo greasy spot; PGS) は、1965年に屋久島のポンカンで最初に発生が認められた(禧久・河野, 1972)。本病は、その後、鹿児島県を含む九州一円および四国の一部の露地カンキツへと拡大し(禧久・河野, 1972; 倉田ら, 1976)、さらに、ハウスミカン園では本病は全国的に大きな被害を与えているとされる(小泉, 2001; 田代ら, 2010)。一方、2011年現在、海外での発生は報告されていない。

禧久・河野(1972)の報告では、本病に感染すると、まず、新葉の葉裏に小粒黒点を生じ、やがて、小粒黒点の周囲に黄色ハローが透過光で観察される。さらに、小粒黒点が多数癒合すると、自然光のみで黄色ハローが明瞭に観察される。その後しばらく症状は変わらず、露地栽培では、秋になると黄色ハローが消失して小粒黒点のみが残り、一部は上部が裂開する。

本病の病原として、最初に禧久・河野(1975)は *Aureobasidium* 属菌を報告した。これに対し、Koizumi and Kuhara (1984) は *Aureobasidium* 属菌とともに、より強い病原性を持つ担子菌系酵母 *Sporobolomyces* sp. を報告した。加えて、両者のチオファネートメチルに対する感受性および生育適温に関する違いから、にせ黄斑病の主たる病原は *Sporobolomyces* sp. と推定した。

その後、*Sporobolomyces* sp. は、生理的諸性質に基づき *Sporobolomyces roseus* と同定された(Koizumi, 1986)が、近年、同属の分類体系は大きく改変された。そこで、著者らは *S. roseus* と同定されたにせ黄斑病原酵母3菌株について、分子分類学的手法を利用して現在の体系に基づいた再分類を行った(Furuya et al., 2012)。その結果、これらの菌株は *Sporobolomyces* 属 subbrunneus 群に属する2つの新種に該当することが明らかになり、*S. productus* N. Furuya et M. Takash, および *S. corallinus* N. Furuya et M. Takash と命名した。*S. productus* および *S. corallinus* の間には、リボソーム RNA 遺伝子の ITS1 および ITS2 領域における塩基配列の相同性は63%程度であり、培養初期のコロニー色が違うなど、明瞭な差異が認められるが、感染植物での病徴など、にせ黄斑病原菌として特性の違いなどはよく分かっていない。

カンキツにせ黄斑病の葉裏にハローを伴う小粒黒点を生じる初期の症状は、*Mycosphaerella citri* および *M. horii* が引き起こす黄斑病 (citrus greasy spot; CGS) と酷似しており、本病は、長らく黄斑病と混同されてきた。発生園の観察調査から両者の発生様相の相違点は、1) にせ黄斑病では、秋～冬にかけて黄色のハローが消失する、2) 黄斑病の場合、冬に褐色小円星型病斑が形成される、および3) にせ黄斑病は樹勢の強い樹で多く発生するのに対して黄斑病は樹勢が弱く、肥料切れのような樹で多発し、落葉を伴いやすい点などとされる(禧久・河野, 1972; 倉田ら, 1976)。このように、長期の経過観察によると、病徴の違いは識別できるが、簡便に診断・識別できる指標がないのが現状である。

加えて、*Sporobolomyces* 属菌は、生活環の中で菌糸もしくは偽菌糸を形成せず、出芽と射出胞子の形成のみで生息している (Last and Price, 1969)。このような一般的な病原糸状菌と異なる本菌の特性のためか、カンキツにせ黄斑病の病斑からの病原菌の分離は、Koizumi and Kuhara (1984) の最初の報告に止まっている。また、これまで本病の発生調査においては、必ずしも病原まで同定した事例はなく、症状から判定しているものがほとんどである(禧久・河野, 1972; 倉田ら, 1976; 小泉, 2001; 田代ら, 2010)。以上のような問題点を解決する手法として、我々は、カンキツにせ黄斑病原酵母 *S. productus* および *S. corallinus* についてPCR法による種特異的な、迅速で正確な検出法の開発を行った。また、本法を用いて発生園地で採集した罹病葉からの病原菌の検出・同定および病原酵母を接種したカンキツ苗からの経時的な検出を試みた。

## 材料及び方法

### 1. 菌株供試

農林水産省 (MAFF) ジーンバンクが管理するカンキツにせ黄斑病原酵母2種 *Sporobolomyces productus* No.3 菌株 (MAFF 654001<sup>T</sup>) および *S. corallinus* No. 6 菌株 (MAFF 654003<sup>T</sup>) を供試した。また、これら2種と同じ subbrunneus 群に属する *S. subbrunneus* JCM 5278<sup>T</sup>, *S. coprosmicola* CBS 7897<sup>T</sup>, *S. linderiae* CBS 7893<sup>T</sup>, および *S. dimmenae* JCM 8762<sup>T</sup> を、理化学研

究所バイオリソースセンター 微生物材料開発室 (BRC-JCM) より入手した。ガラスアンプル内で凍結乾燥保存されていた供試菌株を、24℃、YMA 平板培地 (酵母エキス 3 g, 麦芽エキス 3 g, ペプトン 5 g, グルコース 10 g, 寒天 20 g, 純水 1 L) で培養して各実験に用いた。

## 2. 種特異的プライマーの設計および PCR 反応

カンキツにせ黄斑病菌 2 種 *S. productus* No.3 菌株 (MAFF 654001<sup>T</sup>) と、*S. corallinus* No. 6 菌株 (MAFF 654003<sup>T</sup>)、およびこれらの近縁種 4 種 *S. subbrunneus* JCM 5278<sup>T</sup>、*S. coprosmicola* CBS 7897<sup>T</sup>、*S. linderiae* CBS 7893<sup>T</sup>、と *S. dimmenae* JCM 8762<sup>T</sup> について、DNA データベースより ITS 領域の配列 (それぞれの DNA Accession 番号は、AB638334, AB638335, AF444549, AF444576, AF444582, および AB644404) を取得し、Geneious Pro 5.1 (Drummond et al. 2009) (Biomatters, Auckland, New Zealand) を用いてアライメントを行った。これをもとにフリーソフト Tm calculator と Primer-BLAST を用いて、複数のプライマーを設計し、最適なプライマーの組み合わせを検索した。また、既報の *subbrunneus* 群共通プライマー (Hamamoto, 2005) を用いて、*S. productus* および *S. corallinus* で PCR 反応による増幅産物が得られるかについても検討した。

PCR 反応は、*Ex Taq* polymerase® Hot Start version (TaKaRa, 大津市) を用いた。PCR 反応液には、YMA 平板培地上の酵母コロニーをチップで拾い上げ、PCR 反応液 25 μl に添加し、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて PCR 増幅させた。PCR 反応は、初期変性 94℃ 5 分の後、94℃ 1 分、52～55℃ 1 分、72℃ 1 分とし、30 サイクルで行った。PCR 産物は、1.5% アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色して可視化した。

## 3. 罹病葉と健全葉の収集および DNA 抽出

長崎県南島原市南有馬町の露地カンキツ園において、2010 年 8 月に、葉裏に黄色ハローを伴う小粒黒点を生じた黄斑症状のウンシュウミカン ‘青島温州’ 1 樹から病徴のある葉およびその下方の無病徴の旧葉を採取し、さく葉標本として保存した。DNA 抽出は、コルクボーラー (直径 1cm) でそれぞれ 3 枚ずつ打ち抜いて表面積を揃えた上で、Nucleon Phytopure (GE ヘルスケア, Buckinghamshire, UK) を用いて行った。

また、2011 年 8 月に黄斑症状が未発生である果樹研究所カンキツ研究興津拠点内の圃場とガラス室内の 20

樹 (露地 15 樹, ガラス室 5 樹) より、無病徴の旧葉を採取した。これらの葉からの DNA 抽出は、生葉 0.1 g を供して、同様に Nucleon Phytopure を用いて行った。

## 4. カンキツ葉への接種試験と接種葉からの DNA 抽出

鉢植えのカンキツ苗 (ウンシュウミカン品種 ‘十万温州’) の未硬化葉 10～15 枚に対して、カンキツにせ黄斑病菌を滅菌水に 10<sup>6</sup> 細胞/ml となるように懸濁し、噴霧接種を行った。対照として、滅菌水のみを噴霧した区を設けた。接種した鉢植え苗は、昼 25℃ - 夜 23℃ の温室で管理して、病徴の経時変化を観察した。なお、接種後 4 日間は、接種葉が多湿になるようビニール袋で覆い、その後、取り除いた。

また、接種 1.5 ヶ月後、2 ヶ月後、4 ヶ月後、6 ヶ月後毎に発病葉を採集、さく葉標本を作製し、ジッパー付ビニール袋で常温保管した。試料ごと、10 病斑を含むように 0.05 g (乾燥重) をメスで切り取り、Nucleon Phytopure (GE ヘルスケア, Buckinghamshire, UK) を用いて DNA を抽出した。

## 結 果

### 1. 種特異的プライマーの設計および PCR 反応条件の確立

既報の *subbrunneus* 群共通プライマー (Hamamoto, 2005) により、*subbrunneus* 群を構成する既知 4 種 *S. subbrunneus*、*S. coprosmicola*、*S. linderiae* と *S. dimmenae* に加え、2 つのにせ黄斑病菌 *S. productus* および *S. corallinus* でも、PCR によって増幅断片が得られることを確認した (Fig. 1)。

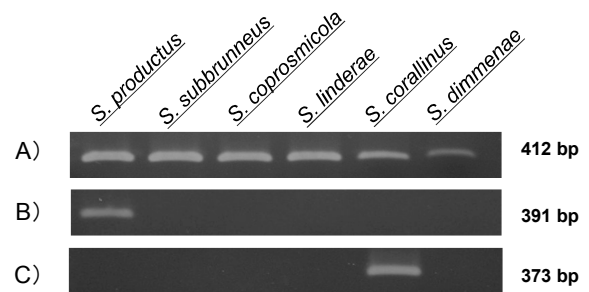


Fig.1 PCR detection of citrus pseudo greasy spot yeasts and the related species. A) *Subbrunneus* lineage-common primer (Hamamoto, 2005), B) *Sporobolomyces productus* species-specific primer, C) *S. corallinus* species-specific primer.

種特異的プライマーの組み合わせを検討した結果, *S. productus* は ITS-SpF (5' -CGG TCT CTT TTA GAC TCG AAG TGA A-3' ) および ITS-SpR-4 (5' -GGT CGA ATA AAT AGG TTT GA-3' ) を用い, アニーリング温度 55°C で PCR 反応することで, 該当種のみ目的とする 391 bp のバンドが得られた (Fig. 1). *S. corallinus* については, ITS-ScF (5' -GTC TTA ATA CGA AAG AAA ACA ATC T-3' ) および ITS-ScR (5' -GTT AAT GAT ATA GAG CTG AAG CT-3' ) を用いて, アニーリング温度 52°C の条件で, 該当種のみ 373 bp の DNA 断片が増幅された (Fig. 1). なお, これらの PCR 条件で, 非特異な DNA 断片は増幅されなかった.

## 2. 現地で発生した罹病葉からの病原菌の検出

典型的なカンキツにせ黄斑病の症状が発生している露地ウンシュウミカン園の罹病葉から種特異的 PCR による病原菌の検出を試みた. その結果, 症状が軽い罹病葉から *S. productus* の増幅産物は得られなかったが, *S. corallinus* が検出された (Fig. 2). また, その罹病葉と同じ樹の無病徴旧葉からも, *S. corallinus* が検出された (Fig. 2).

一方, カンキツにせ黄斑病が未発生のカンキツ研究興津拠点内で採集した 20 樹の旧葉からは, 2 組の種特異的プライマーおよび subbrunneus 群共通プライマー (Hamamoto, 2005) を用いても, 2 種の病原菌を含め *Sporobolomyces* 属 subbrunneus 群に属するいずれの菌種も検出されなかった (データ省略).

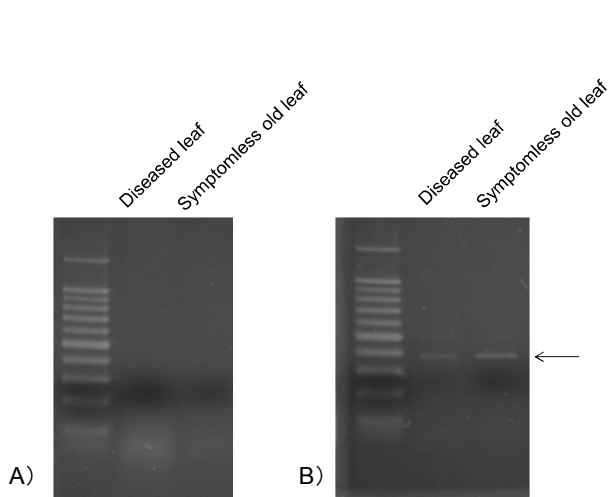


Fig.2 PCR detection of citrus pseudo greasy spot yeasts from leaves with or without disease symptoms in an open field in Minamishimabara, Nagasaki. A) *Sporobolomyces productus* and B) *S. corallinus*.

## 3. 接種葉における病徴の変遷および PCR による病原菌の検出

病原酵母を接種したカンキツ苗を用いて, 病徴の進展とともにどの時期に種特異的 PCR によって病原菌の検出が可能か検討した. 初期病徴は, *S. productus* および *S. corallinus* ともに, 接種 25 日後, 葉の 1 - 3mm の退緑斑として透過光下で認められた (Fig. 3). 接種 1.5 ヶ月後には, 退緑斑は次第に明瞭になり, 接種 2 ヶ月後には, 自然光下でも明瞭に確認された. その後, 退緑斑の中心に小粒黒点を生じ, 接種 3 ヶ月後には, 小粒黒点は葉表まで達して, 葉表では葉脈の裂開とコルク化が認められた. 接種 4 ヶ月後には, 小粒黒点を中心に黄色いハローが明瞭となった. ハローは, やがていくつかが癒着し, さらに明瞭になった. なお, *S. productus* と *S. corallinus* の間で, 病徴の特徴や進展速度に明瞭な違いは見られず, また, 滅菌水のみを噴霧した対照区では, いかなる症状も認められなかった. 病徴の経過観察は接種 6 ヶ月後まで行ったが, 本試験では, 現地で観察される黄色ハローの消失および激しい落葉は観察されなかった.

種特異的プライマーを用いた PCR によって, 接種 1.5, 2, 4 および 6 ヶ月後に採取したそれぞれの罹病葉から *S. productus* と *S. corallinus* の検出を試みた (Fig. 4). 接種 1.5 か月後では両種ともに明瞭な陽性反応を示したのに対し, 2 ヶ月後には *S. productus* は陰性, *S. corallinus* は陽性を示したものの増幅 DNA 産物は明らかに減少していた. さらに, 接種 4 ヶ月以降, 両種共



Fig.3 Symptom progression of citrus pseudo greasy spot on plants inoculated with A) *Sporobolomyces productus* isolate No.4 and B) *S. corallinus* isolate No. 6 under transmitted light. Small chlorotic lesions, 1-3 mm in diameter, were produced on the leaf surface (1.5 months after inoculation). Tiny black-brown spots appeared at the center of the chlorotic lesions (3 months after inoculation). Chlorotic lesions with black-brown spots coalesced (6 months after inoculation).

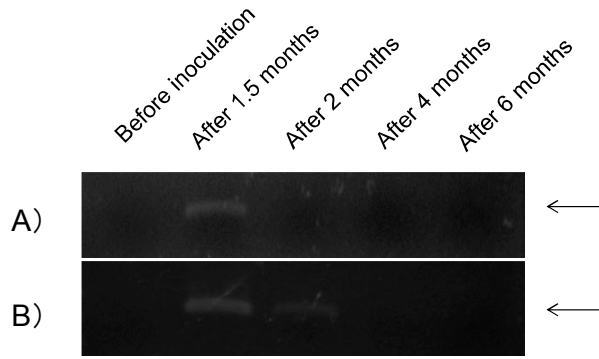


Fig.4 PCR detection of citrus pseudo greasy spot yeasts from inoculated leaves over time. A) *Sporobolomyces productus* strain No. 3, B) *S. corallinus* strain No.6.

に増幅断片は全く検出されなくなった。

## 考 察

本研究では、カンキツにせ黄斑病菌 2 種 *S. productus* および *S. corallinus* について、迅速で確実な PCR 検出を可能とするために、種特異的プライマーの作出を試みた。現在までに *Sporobolomyces* 属 subbrunneus 群に分類される種は、カンキツにせ黄斑病菌 2 種以外では本試験で供試した 4 種のみが知られており、さらに subbrunneus 群は 18S rDNA の塩基配列に基づく系統解析では、他の *Sporobolomyces* 属とは明らかに独立した系統群であることが明らかとなっている (Furuya et al., 2012; Nakase, 2000; Hamamoto, 2005)。したがって、本試験では subbrunneus 群 6 種全てを供試して種特異的プライマーを設計することとした。これら 6 種の ITS 領域の相同性は、*S. productus* と *S. subbrunneus* が 96.2%、*S. corallinus* と *S. dimmenae* が 98.1% と高い値を示すが (Furuya et al., 2012)、幾つかの種特異的プライマーを設計し、それらを組み合わせて検討した結果、にせ黄斑病菌 2 種の特異的検出を可能とすることができた。

黄斑症状のみられる長崎県南島原市南有馬町のウンシュウミカン園で、本法を用いて病原菌の検出を試みたところ、*S. productus* は検出されず *S. corallinus* のみが得られた。したがって、この園地におけるにせ黄斑病の病原は *S. corallinus* と考えられた。さらに、同園では罹病葉のみならず、同じ樹の無病徴の旧葉からも *S. corallinus* が検出された。一方、にせ黄斑病未発生の果樹研究所カンキツ研究興津拠点内のカンキツ旧葉から両種は検出されなかった。一般に *Sporobolomyces* 属菌は、

植物表生菌として知られているが (Boekhout, 1991; Last and Price, 1969)、カンキツ類における知見はほとんど得られておらず、*S. productus* および *S. corallinus* が本来表生菌か否かも全く不明である。今回の結果は、*S. productus* および *S. corallinus* がわが国のカンキツ類に普遍的に生息する表生菌ではない可能性を示唆するものと考えられるが、今後さらに多くの地域や栽培条件のもとで検証し、両種の分布とにせ黄斑病の発症との相関を明らかにしていく必要がある。

次いで、特異的プライマーを用いた PCR 検出法によって、*S. productus* および *S. corallinus* の接種植物から病原菌の経時的検出を試みた。接種 25 日後頃から、接種葉には透過光に当てると微小な退緑斑が観察され、2 ヶ月後には自然光下で退緑斑は明瞭に観察された。以降、にせ黄斑病の初期症状とされる小粒黒点症状が、3 ヶ月後までに観察されるようになった。一方、PCR 法を用いた病原菌の検出では、両病原菌とも 1.5 ヶ月後では陽性を示したが、接種 2 ヶ月後で *S. productus* は既に陰性となり、*S. corallinus* では増幅産物は検出されたものの、明らかに減少していた。これらの結果は、病徴の進展が進む一方、病原菌自身は病斑から減少していることを示唆している。カンキツ葉に接種した病原酵母の感染様式を観察した Koizumi (1986) は、本菌がカンキツ葉表面で増殖、その一部が気孔から葉組織内に侵入し、細胞間隙で増殖するが、病徴が現れる接種 30 日後には高電子密度の物質によって細胞間隙に封じ込められ、やがて壊死することを報告しており、本試験の結果は、このような観察事例とも一致する結果と推定された。以上のように病徴が進展する一方、病斑中では病原菌の消失が進行するというにせ黄斑病の特性が、これまで病原酵母の分離・検出を困難にしている要因と考えられる。今後は、さらに接種初期からの病原菌の動態を定量 PCR 等によって詳細に解析する必要がある。なお、本研究では、現地で観察される黄色ハローの消失および激しい落葉は認められなかった。現地のカンキツ樹は 6~7 月の初発生から 10~11 月頃まで長期間、気温や降雨などの気象要因や着果ストレス等の影響を受けており、本試験での接種苗の管理条件と大きく異なることが要因の一つと考えられるが、詳細は不明である。

本試験で明らかとなった本病の特性を考慮した場合、この PCR 検出法については、病原酵母の感染初期の段階での適用が示唆され、病徴が既に明瞭に現れたサンプルや時期では検出困難になる可能性がある。前述した結果で、にせ黄斑病発生園では無病徴の旧葉でも病

原酵母を検出できたことと併せて、診断のサンプリングについては、採集時期として発生初期を選択することや罹病葉だけでなくその周辺部も検定することなど、さらに検討を加える必要がある。

酵母は分類学上の呼称ではなく、生活環の一部で栄養体が単細胞性を示す真菌類に与えられた総称である。現在のところ、にせ黄斑病菌 *S. productus* および *S. corallinus* は、植物の葉に病原性を示す唯一の酵母であり、その生態や感染機構についてはほとんど明らかにされていない。本研究で作出した種特異的プライマーによって、迅速かつ正確な検出が可能となった。今後、この手法が、診断・同定の場面だけでなく、にせ黄斑病の様々な研究に活用されることを期待する。

## 摘 要

1960年代より、日本において流行しているカンキツにせ黄斑病 (pseudo greasy spot; PGS) の2種の病原酵母 *Sporobolomyces productus* および *S. corallinus* について、種特異的プライマーを用いた迅速で正確なPCR検出法を確立した。種特異的プライマーは、*Sporobolomyces* 属 subbrunneus 群に分類される全6種のITS領域の塩基配列から設計された。本法を用いて、長崎県南島原市南有馬町のウンシュウミカン園で病原菌の検出を試みたところ、黄斑症状の葉から、*S. productus* は検出されず *S. corallinus* のみが得られた。したがって、この園地では *S. corallinus* が病原と考えられた。また、本法を用いて噴霧接種したカンキツ苗から病原菌を経時的に検出した結果、両菌とも接種1.5ヶ月後で陽性反応を示したが、接種2ヶ月後 *S. productus* は陰性となり、*S. corallinus* の反応は微弱であった。一方、接種2ヶ月後の症状としては、カンキツ葉に明瞭な退緑斑が観察されるものの、PGSの典型的な症状とされる小粒黒点は、その後接種3ヶ月後までに形成された。以上の結果から、本検出法については病原酵母の感染初期の段階での適用が示唆された。

## 引用文献

Boekhout, T. 1991. A revision of ballistoconidia-forming fungi. *Stud. Mycol.* 33:1-194.  
Drummond, A. J., B. Ashton, M. Cheung, J. Heled, M.

Kearse, R. Moir, S. Stones-Havas, T. Thierer and A. Wilson. 2009. Geneious v4.7. www.geneious.com.  
Furuya, N., M. Takashima and H. Shiotani. 2012. Reclassification of citrus pseudo greasy spot causal yeasts, and a proposal of two new species, *Sporobolomyces productus* sp. nov. and *S. corallinus* sp. nov. *Mycoscience* 53:261-269.  
Hamamoto, M. 2005. Development of specific primers for PCR-based identification of basidiomycetous yeasts. *Bull. Sch. Agr., Meiji Univ.* 141:1-7.  
禧久 保・河野通昭. 1972. カンキツの黄斑症 (仮称) に関する研究 (第1報) 症状と解剖学的知見について. *九州病害虫研究会報.* 18: 138-139.  
禧久 保・河野通昭. 1975. 黄斑症 (仮称) に関する研究 (第3報) 伝染性および病原性について. *九州病害虫研究会報.* 21: 110-113.  
Koizumi, M. 1986. *Sporobolomyces roseus*, a causal agent of citrus pseudo greasy spot (Nise-ohan-byo) and the infection process of disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:758-765.  
Koizumi, M. and S. Kuhara. 1984. Yeast-type organisms as citrus pseudo greasy spot (Nise-ohan-byo) causal agent. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 50:620-627.  
小泉銘冊. 2001. にせ黄斑病. p.104. 是永龍二ら編著. ひと目でわかる果樹の病害虫 第一巻 (改訂版). 日本植物防疫協会, 東京.  
倉田宗良・高木俊輔・西村千弘・上村隆之・斎藤 正. 1976. カンキツ黄斑症 (仮称) の防除. *高知農林研報.* 8: 21-28.  
Last, F. T. and D. Price. 1969. Yeasts associated with living plants and their environs. p.183-218. In: A. H. Rose and J. S. Harrison (eds). *The Yeasts. Biology of Yeasts, Vol. 1*, Academic Press, London.  
Nakase, T. 2000. Expanding world of ballistospore yeasts: Distribution in the phyllosphere, systematics and phylogeny. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46:189-216.  
田代暢哉・中島貞彦・山口正洋. 2010. 佐賀県北西部のハウスミカン園におけるにせ黄斑病の発生実態. *日植病報.* 76: 27-28 (講要).