トマト茎えそ細菌病を引き起こす蛍光色素非産生の 日本産 *Pseudomonas* 属細菌に関する多相分類学的解析

澤田 宏之^{1*}・瀧川 雄一²

ABSTRACT

SAWADA, H.^{1*} and TAKIKAWA, Y.² (2018). A polyphasic approach to study the diversity of nonfluorescent pseudomonads causing pith necrosis of tomato in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 84: 85–97.

To understand the diversity of nonfluorescent isolates of the tomato pith necrosis pathogens distributed in Japan, we used a polyphasic approach to analyze 21 isolates, obtained from eight prefectures (Iwate, Miyagi, Tochigi, Saitama, Chiba, Shizuoka, Ishikawa, and Oita) between 1980 and 2002. All isolates were demonstrated to reproduce the typical pith necrosis symptoms on tomato after inoculation of stems, and no significant differences in symptoms and virulence were found among the isolates. They were gram-negative, aerobic rods with one to three polar flagella, and did not produce fluorescent pigments on King's B medium. On the other hand, in the phylogenetic tree based on the concatenated sequences of the 16S rRNA gene and *rpoD* and in the dendrogram based on a MALDI-TOF MS analysis using the Bruker MALDI Biotyper system, these isolates and reference strains were classified into the following three groups: Group 1 (six isolates and the type strain of *Pseudomonas corrugata* [*Pc*]), Group 2 (seven isolates and the type strain of *P. mediterranea* [*Pm*]), and Group 3 (eight isolates). Group 1 and Group 2 were identified as *Pc* and *Pm*, respectively, based on biochemical and physiological characterizations and PCR assays using species-specific primer sets designed in this study. To our knowledge, this report is the first in Japan of domestic isolates identified as *Pm*. On the other hand, Group 3 formed a monophyletic clade separated from *Pc* and *Pm* in the phylogenetic analysis, utilized 2-ketogluconate and D-aspartic acid, did not utilize *meso*-tartrate and histamine, and gave different PCR results from *Pc* and *Pm*, suggesting that it might represent a novel taxon (new species, or new subspecies of *Pc* or *Pm*). Therefore, we propose the tentative treatment of Group 3 as "*Pseudomonas* sp." and to add *Pm* and *Pseudomonas* sp. as new causal agents of tomato pith necrosis disease in Japan. *Pm* and *Pseudomonas* sp. (Group 3), together with *Pc*, may have been involved in the outbreak of this disease in Japan from the outset, but there is no information on their origins or the history of their invasion in Japan. Thus, we need to establish reliable detection methods based on the results obtained in this study to clarify the origins, ecology and distribution of these three pathogens responsible for this disease.

(Received November 18, 2017; Accepted January 30, 2018)

Key words: nonfluorescent pseudomonad, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mediterranea*, novel taxon, pith necrosis, polyphasic approach

緒 言

トマト (*Solanum lycopersicum*) の茎えそ細菌病は世界各国で発生しており、収量に大きな影響が出ることで、土壌伝染や種子伝染の可能性のあることから、防除困難な重要病

害として警戒されている (Catara *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2005; Sahin *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2010; Alippi and Lopez, 2010; Xu *et al.*, 2013; Searcy *et al.*, 2016; Trantas *et al.*, 2015a). 本病の病原細菌としては、蛍光色素非産生の *Pseudomonas corrugata* (Scarlett *et al.*, 1978; Lopez *et al.*, 1994; 瀧川, 1985;

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター (〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2) Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

² 静岡大学創造科学技術大学院 (〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷836) Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422-8529, Japan

* Corresponding author (E-mail: sawada@affrc.go.jp)

本研究で明らかになった DNA 塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベースに accession No. LC333819–LC333860 として登録した。

瀧川ら, 1985; 夏秋・鍵渡, 1985) と, 蛍光色素産生菌である *P. fluorescens*, *P. viridiflava*, *P. cichorii* など (Sahin *et al.*, 2005; 白川ら, 1993; 桑田・及川, 1989; 久我ら, 1985; 梶ら, 1989) が報告されていたが, 前者の *P. corrugata* が本病の主原因と考えられていた。

近年になり, *P. corrugata* (以後, *Pc* と表記する) を対象としてさまざまな視点に基づく比較解析が行われるようになると, 種内に変異が存在することが指摘されるようになった (Siverio *et al.*, 1993, 1996; Catara *et al.*, 1997, 2000; Sutra *et al.*, 1997). そこで, *Pc* を対象として多相分類学的な解析が実施された結果, それまで *Pc* として扱われていた菌群の一部は別種として独立させるべきであることが判明し, *P. mediterranea* (以後, *Pm* と表記する) と命名され, 新種記載されるに至っている (Catara *et al.*, 2002). その結果, 現在では, 蛍光色素非産生の茎えそ細菌病菌としては, *Pc* と *Pm* の2種が存在すると考えられるようになっている (Jones *et al.*, 2015). さらに, *Pm* の記載後, 世界各地で発生調査が進められた結果, 多くのトマト生産国には *Pc* と *Pm* のいずれもが分布しており, これら2種が本病の主原因として大きな被害を与えていることが明らかになってきた (Catara *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2005; Sahin *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2010; Alippi and Lopez, 2010; Xu *et al.*, 2013; Trantas *et al.*, 2015a).

一方, これまでわが国では, 蛍光色素非産生の本病菌として *Pc* の存在は報告されていたものの (瀧川, 1985; 瀧川ら, 1985; 夏秋・鍵渡, 1985, など), 十分な比較解析が行われていなかった。そのため, 国内産菌株に変異があるか否か, *Pm* に相当する本病菌がわが国にも分布しているか否かについては明確にされておらず, このことが, 本病菌を対象とした信頼性の高い判別・検出技術を開発する上での障害となっていた。

本研究では, これまでにわが国で分離されてきた「蛍光色素非産生のトマト茎えそ細菌病菌」を対象として多相分類学的解析を実施し, 国内産菌株に変異が存在するか否かについて検討を行った。その結果, これらは3つのグループに分かれること, そのうちの1つは *Pc*, もう一つは *Pm* に相当するが, 残りの1つは未記載の新規分類群の可能性があることが明らかとなった。そこで, わが国における本病の病原として, *Pm* と *Pseudomonas* sp. を新たに追加することを提案したい。また, 各グループの特徴的な性質に基づいて判別・検出指標の候補が選別できたので, これらの成果の詳細を以下で報告する。

材料および方法

供試株

トマトの茎えそ症状から分離され, 「蛍光色素非産生のトマト茎えそ細菌病菌」として同定された菌株が, 農業生物資源ジーンバンクには21菌株所蔵されている (Table 1). これらは1980~2002年の間に, 岩手, 宮城, 栃木, 埼玉, 千葉, 静岡, 石川, 大分の8県で, 罹病したトマトの病変部 (茎あるいは果柄) から分離され, 病原性や各種表現型に基づいた検査を経た上で, *Pc* と同定された菌株である。本研究では, これら21菌株を対象として以下の解析を行った (以後, これらのことを「供試株」と表記する)。また, *Pc* と *Pm* の基準株も比較のために用いた (Table 1). 以上の供試株と基準株は, 特に記載しない限り標準寒天培地 (日水製薬) を用いて27°Cで培養した。菌株の保存は凍結保存法 (澤田, 2013) によって行った。

分子系統解析

供試株の間に遺伝的な変異が存在するか否かを確認するために, 本研究ではまず, 16S rRNA 遺伝子と *rpoD* の連結配列を用いた分子系統解析を実施した。そのために, 澤田ら (2011) および Parkinson *et al.* (2011) のプライマーを用いて, 供試株の各遺伝子の配列を決定した。また, 比較のために, 狭義の *Pseudomonas* 属 (Anzai *et al.*, 1997; Parte, 2014) に属すると考えられる171の既知種・亜種の基準株を対象として, 16S rRNA 遺伝子については EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017), *rpoD* については Genbank より配列データを取得し, 対照配列として以下の解析に供した。すなわち, 遺伝子ごとに, 供試株の配列データ [21 OTU (Operational Taxonomic Unit)] に対照配列 (171 OTU) を加えた上で, 2つの遺伝子データを連結し, 澤田・畔上 (2014) や澤田ら (2015) に記載した方法に従って解析を実施した。系統樹作成法としては近隣結合法 (NJ 法), 最尤法 (ML 法) および最大節約法 (MP 法) を用い, いずれも MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) を利用して解析を行った。

トマトに対する病原性の確認

トマトに対する病原性を確認するために, 本葉展開10葉期に達した「ポンテローザ」に対し, Catara *et al.* (2002) や Trantas *et al.* (2015a) の方法を改変して穿刺接種を行った。すなわち, 供試株を24時間培養し, その菌体を滅菌水に懸濁して約 10^9 cfu/ml としたものを接種源とした。そして, 爪楊枝を菌液に浸し, すぐに第1本葉と第5本葉の葉腋に穿刺した後, 植物体を鉢ごとポリ袋で密封して25°Cの暗温室に48時間置いた。その後, 袋を外し, 23°Cの恒温温室で12日間にわたって経過観察を行った。さらに, 接種結果の

Table 1. Source and characteristics of nonfluorescent isolates of tomato pith necrosis pathogens obtained in Japan and reference strains used in this study

Taxon/Group ^{a)}	Strain ^{b)}	Year of isolation	Location (Prefecture)	Phenotype (conventional method) ^{c)}										MALDI Biotyper ^{d)}		PCR result ^{e)}																			
				Diffuse yellow pigment	Tobacco hyper-sensitivity	Fluorescent pigment	Levan production	Oxidase activity	Pectinolytic activity	Arginine hydrolysis	Growth at 37°C	Utilization of <i>meso</i> -tartrate	Utilization of histamine	Utilization of 2-keto-gluconate	<i>P_c</i>	<i>P_m</i>	A	B	C	D															
Japanese nonfluorescent isolates																																			
Group 1 (<i>Pseudomonas corrugata</i>)																																			
	MAFF 301669	1982	Chiba	-	W	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2.69	1.97	+	+	-	-															
	MAFF 301676	1980	Chiba	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	2.71	2.02	+	+	-	-																
	MAFF 730111	1990	Iwate	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	2.53	1.86	+	+	-	-																
	MAFF 730112	1990	Iwate	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	2.62	2.01	+	+	-	-																
	MAFF 730114	1990	Iwate	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	2.55	1.81	+	+	-	-																
	MAFF 730115	1990	Iwate	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	2.65	1.90	+	+	-	-																
Group 2 (<i>Pseudomonas mediterranea</i>)																																			
	MAFF 301668	1981	Chiba	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.15	2.23	+	-	+	+															
	MAFF 301671	1984	Shizuoka	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.19	2.45	+	-	+	+															
	MAFF 301672	1984	Tochigi	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.07	2.48	+	+	+	+															
	MAFF 311125	1995	Miyagi	W	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.03	2.23	+	-	+	+															
	MAFF 311126	1995	Miyagi	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.04	2.54	+	-	+	+															
	MAFF 311147	1995	Saitama	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.00	2.56	+	-	+	+															
	MAFF 311148	1995	Saitama	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.06	2.29	+	-	+	+															
Group 3 (<i>Pseudomonas</i> sp. = novel taxon)																																			
	MAFF 106669	2002	Ishikawa	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2.19	1.81	+	-	+	+															
	MAFF 106670	2002	Ishikawa	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2.31	1.99	+	-	+	+															
	MAFF 301670	1982	Chiba	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2.13	1.76	+	-	+	+															
	MAFF 302973	1992	Oita	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2.04	1.86	+	-	+	+															
	MAFF 302974	1992	Oita	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.32	1.70	+	-	+	+															
	MAFF 302975	1992	Oita	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.25	1.92	+	-	+	+															
	MAFF 730105	1990	Iwate	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2.34	2.02	+	-	+	+															
	MAFF 730113	1990	Iwate	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	2.29	1.95	+	-	+	+															
Type strains of <i>P. corrugata</i> (<i>P_c</i>) and <i>P. mediterranea</i> (<i>P_m</i>)																																			
<i>P_c</i>	ICMP 5819 ^{f)}	1972	UK	W	W	-	-	+	-	+	+	+	+	-	3.00	2.07	+	+	-	-															
<i>P_m</i>	ICMP 14184 ^{f)}	1994	Italy	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.07	3.00	+	-	+	+															

- a) Japanese nonfluorescent isolates were classified into three groups according to the phylogenetic analysis based on the concatenated sequences of the 16S rRNA gene and *rpoD* (Fig. 1) and the cluster analysis based on the mass spectrum data generated by MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) (Fig. 4).
- b) MAFF: NARO Genebank, Japan (http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_en.php); ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, New Zealand. T, type strain of the species.
- c) Phenotypic characteristics were assessed using conventional methods described in the *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edn. (Schaad *et al.*, 2001). +: positive; -: negative; W: weakly positive.
- d) Score values between 0.00 and 3.00 were calculated based on the similarity of mass spectrum data between the Japanese isolates and the type strains of *P. corrugata* (Pc) and *P. mediterranea* (Pm) by using MBT Compass Explorer implemented in MALDI Biotyper (Bruker Daltonics).
- e) IDs (A–D): see Table 2. +: positive; -: negative.

判定後、病変部からの再分離と PCR 検定（後述する 1impGF2/1impGR1 プライマーセットを使用）を実施した。なお、*Pc* や *Pm* の基準株、あるいは滅菌水を用いて同様の処理を行ったものを対照区とした。

表現形質の検査

菌体の形態と集落形態については澤田ら（2017a）の方法、基本的な生理・生化学的性質に関しては Schaad *et al.*（2001）の方法（以後、従来法と表記する）に従って検査を行った。また、API 20NE（シスメックス・バイオメリュール）を用いて 21 項目の生理・生化学的性質の検査を実施し、27°C 下で培養 5 日目の判定結果をもとに菌株間の比較を行った。さらに、Biolog GEN3 マイクロプレート（Biolog）を用いて炭素源の資化性を検査した。そのために、標準寒天培地を用いて被検菌を 27°C で 3 日間培養後、その菌体を接種源とし、Biolog のプロトコールに従って Biolog GEN3 マイクロプレートへ接種した。その後、プレートを 27°C で 6 日間培養しながら、各ウェルにおける発色程度をマイクロステーションリーダーとマイクロログ 3 ソフトウェア（Biolog）を用いて経時的に読み取り、資化性の有無について判定した。

MALDI-TOF MS 分析

標準寒天培地を用いて被検菌を 27°C で 2 日間培養し、ブルカー・ダルトニクスのプロトコールに従ってエタノール・ギ酸抽出法によるサンプル調製を行った後、前報（澤田ら、2017b）と同様にして MALDI バイオタイパー（ブルカー・ダルトニクス）による分析を行った。すなわち、各菌株からマススペクトルデータ（約 2000～20,000 ダルトンの範囲

のタンパク質成分の質量電荷比）を取得した上で、供試株と基準株との間でその比較を行い、スコア値（マススペクトルの類似度、0～3 の間で、類似度が高いほど大きな値となる）を算出した。さらに、菌株間におけるデータの異同・バラツキを視覚的に評価するために、得られたマススペクトルデータにクラスター分析を適用した。そのために、データ間で Pearson の積率相関係数を求めて距離行列を作成し、群平均法に基づいてクラスタリングを行うことによって dendrogram を構築した。

PCR 検定

Pc や *Pm* のゲノム上には 6 型分泌装置（T6SS）をコードする遺伝子クラスターが 3 セット（T6SS-I, T6SS-II, T6SS-III）存在しており、このうちの T6SS-I は保存性が高いのに対し、T6SS-II と T6SS-III は菌種間でやや違いのあることが比較ゲノム解析によって明らかにされている（Trantas *et al.*, 2015b）。そこで、*Pc* と *Pm* のユニバーサルプライマーを設計するために、T6SS-I を構成している *impG* 遺伝子をマーカーとして選んだ。そして、その中から特に保存性の高い領域を選抜し、ユニバーサルプライマーセット（1impGF2/1impGR1）を設計した上で（Table 2 の A 欄）、コロニーダイレクト PCR を行った。次に、菌種特異的プライマーを設計するために、T6SS-II を構成している *impG* 遺伝子を対象として選んだ。そして、その配列中から、*Pc* と *Pm* のそれぞれに対して特異的と思われる領域を選抜した上で、それを標的としてプライマーセット（前者に関しては 2impGFc1/2impGRc2、後者に関しては 2impGFm1/2impGRm1 と 2impGFm1/

Table 2. PCR primers used in this study

ID ^{a)}	Primer name	Gene name (T6SS type) ^{b)}	Specificity ^{c)}	Sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C) ^{d)}	Product size (bp)	Reference
A	1impGF2 1impGR1	<i>impG</i> (T6SS-I)	<i>Pc</i> , <i>Pm</i> and Group 3	TTCACCCTGGCCGACAGCGC TCACAGGGTCGGACGACGTC	68	492	This study
B	2impGFc1 2impGRc2	<i>impG</i> (T6SS-II)	<i>Pc</i>	GCTCGAACAGCTCTATCCGT CGTGCATGCCAATAGCAGTG	66	903	This study
C	2impGFm1 2impGRm1	<i>impG</i> (T6SS-II)	<i>Pm</i>	GCTCGAACAGCTGTATCCCC TCCCGCAGGTTGTGCAATGT	68	1263	This study
D	2impGFm1 2impGRm2	<i>impG</i> (T6SS-II)	<i>Pm</i> and Group 3	GCTCGAACAGCTGTATCCCC CGCGCATGCCAGTAGCAGGT	68	903	This study

a) PCR results obtained using the respective primer set are shown in Table 1 indicated by the respective ID.

b) *P. corrugata* and *P. mediterranea* possess three phylogenetically distinct clusters coding for the type VI secretion system (T6SS), which are designated as T6SS-I, II, and III, respectively (Trantas *et al.*, 2015b). In this study, primer set A was designed based on the sequence of *impG*, which encodes one of the components of T6SS-I. The other primer sets (B–D) were designed based on that of *impG* derived from T6SS-II.

c) *Pc*: *P. corrugata*; *Pm*: *P. mediterranea*; Group 3: see Table 1.

d) AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) and T100 thermal cycler (BIO RAD) were used in this study.

2impGRm2) を構築し (Table 2 の B~D 欄), PCR 検定を実施した.

結 果

分子系統解析

狭義の *Pseudomonas* 属に属する 171 の既知種・亜種の基準株から配列データ (2 遺伝子×171 OTU) を取得し, 本研究で決定した供試株の配列データ (2 遺伝子×21 OTU) (DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベースに accession No. LC333819-LC333860 として登録した) を加えた上で, Jukes-Cantor モデル (Jukes and Cantor, 1969) のもとで進化距離を算出して NJ 解析を行った. また, 比較のために ML および MP 解析も実施した. 3 つの解析法によって得られた系統樹を比較したところ, 供試株周辺の領域に関してはトポロジーがほぼ一致していた. そこで, 本論文では, NJ 系統樹から供試株の周辺領域を切り出したものを代表として示した (Fig. 1). 切り出した部分のトポロジーを, Mulet *et al.* (2010) が 4 遺伝子を用いて構築した *Pseudomonas* 属全体の MLSA 系統樹と比較したところ, Mulet *et al.* (2010) の解析に *P. pohangensis* が供試されていない点を除けば, 既知菌種の位置づけに関する両者のトポロジーは完全に一致していた. 以上のことは, 本研究で構築した系統樹 (Fig. 1) の信頼性が高いことを示している.

この系統樹において, 供試した 21 菌株は以下の 3 つのグループに分かれた: 「Group 1 (*Pc* の基準株と供試株 6 菌株)», 「Group 2 (*Pm* の基準株と供試株 7 菌株)», および 「Group 3 (供試株 8 菌株)». このうち, Group 2 と Group 3 に関しては, 各構成メンバーの配列は互いに相同性が高く, いずれのグループも 99% という高いブートストラップ確率のもとで 1 つにまとまっていた. 一方, Group 1 では, MAFF 301676 が Group 1 の他のメンバーとはやや離れて位置づけられたが, MAFF 301676 以外のメンバーの配列は均一性が高いことが認められた.

トマトに対する病原性の確認

接種 2 日後には, いずれの供試株・基準株の接種区においても, 穿刺部位付近の表皮が暗緑色・水浸状を呈するのが認められた. その後, 水浸斑は徐々に上下方向へ拡大するとともに, 褐変が進んだ. 接種 14 日後には, この壊死斑は長さが 5~10 mm, 幅 2~3 mm 程度の紡錘状となってやや陥没し, 中心部では組織の崩壊が認められた (Fig. 2A の下). また, その周囲からは不定根が発生する場合もあった (Fig. 2B). 壊死斑の形成された茎を縦断したところ, 穿刺部位を中心とした長さ 3~6 cm 程の領域の維管束や髄が褐変し, 穿刺部位直下の髄部組織が崩壊して空洞化する様

子も認められた (Fig. 2C の下). なお, 菌株間で病徴や病原性に関して顕著な差は認められなかった. 形成された病斑から再分離を試みたところ, 接種菌と集落形態が類似した細菌がほぼ純粋に分離できた. さらに, 1impGF2/1impGR1 プライマーセット (Table 2 の A 欄) を用いてコロニー PCR を行ったところ, 再分離菌から想定通りの増幅産物 (492 bp) が確認できた. なお, 滅菌水を用いた陰性対照区では, 病変は誘導されなかった (Fig. 2A・C の上).

表現形質の検査

供試株はいずれも 1~3 本の極鞭毛を有する桿菌であり, MAFF 301669 (Group 1) (Fig. 3A) の大きさは $2.4 \pm 0.5 \mu\text{m} \times 1.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, $n=20$), MAFF 311126 (Group 2) (Fig. 3B) の大きさは $2.3 \pm 0.5 \mu\text{m} \times 0.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$, MAFF 730105 (Group 3) (Fig. 3C) の大きさは $2.3 \pm 0.5 \mu\text{m} \times 0.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった. 標準寒天培地を用いた平板培養では, 1 日目に孤立集落が肉眼的に認められるようになり, 2 日目にはその直径が 1 mm, 6 日目前後には極大 (~5 mm) に達した. 孤立集落の形状は, 円形, 全縁~わずかに波状, 不透明, 丘状, やや平滑でわずかに湿光を帯びており, 培養初期には乳白色~淡黄色を呈するが, 時間とともに徐々に橙黄色に変化する様子が認められた. 菌密度の高い菌叢部分 (菌苔) の色調は培養 8 日目以降になると少しずつ薄くなり, 透明度が上がり始めた. また, MAFF 301669, 301676, 730112, 301668, 301670, 302973, 730105 以外の供試株・基準株では, 淡黄色の水溶性色素の産生が認められた (Table 1). なお, 供試株・基準株を標準寒天培地で平板培養する限り, 集落表面が皺状を呈する様子は認められなかった.

供試株・基準株の基本的な生理・生化学的性質を検査したところ, いずれもグラム陰性, 好気性であり, King B 培地での蛍光色素の産生, レバン産生, ジャガイモ塊茎腐敗は陰性, オキシダーゼ, アルギニンジヒドロラーゼ, 37°C での生育は陽性となった. また, タバコ過敏反応では菌株によって異なる反応が認められた (Table 1). 一方, 従来法 (Schaad *et al.*, 2001) に基づく炭素源の資化性試験では, グループ単位で異なるパターンが観察された. すなわち, メソ酒石酸とヒスタミンの資化性に関しては, Group 2 と *Pm* の基準株では陽性となったが, それ以外の菌株はすべて陰性となった. それに対し, 2-ケトグルコン酸では, Group 2, Group 3 および *Pm* の基準株では陽性となり, Group 1 と *Pc* の基準株は陰性となった (Table 1).

API 20NE を用いて生理・生化学的性質を予備的に検査したところ, アルギニンジヒドロラーゼ, ゼラチンの分解, D-マルトースとアジピン酸の利用において, 弱い反応が遅れて現れる事例が認められた. そこで本研究では, いずれ

Fig. 1. Neighbor-joining tree based on the concatenated sequences of the 16S rRNA gene and *rpoD* showing the relationships among 21 isolates of the tomato pith necrosis pathogens obtained in Japan (indicated by accession numbers in the NARO Genebank shown in Table 1) and the type strains of the recognized 171 species/subspecies of the genus *Pseudomonas sensu stricto* (Anzai *et al.*, 1997; Parte, 2014). The clade containing *P. corrugata* and its relatives is shown in detail here. Isolates were classified as Group 1 (= *P. corrugata*), Group 2 (= *P. mediterranea*) and Group 3 (= novel taxon). The data sets used were retrieved from EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017) or NCBI GenBank, except for 42 sequences determined in the present study (DDBJ accessions LC333819–LC333860). Filled circles indicate that the corresponding nodes were also recovered in the maximum-likelihood and maximum-parsimony trees. Numbers at nodes are bootstrap values ($\geq 60\%$) from 1000 repetitions. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

の供試株・基準株でも安定した結果が観察できるようになる培養5日目に最終的な判定を行うことにした。その結果、Group 1, Group 3, および *Pc* の基準株からは同一の結果が得られた。すなわち、培養5日目には、硝酸塩の還元、アルギニンジヒドロラーゼ、ゼラチンの分解、オキシダーゼ、

D-グルコース、L-アラビノース、D-マンノース、D-マンニトール、*N*-アセチル-D-グルコサミン、D-マルトース、グルコン酸カリウム、カプリン酸、アジピン酸、リンゴ酸、およびクエン酸ナトリウムの利用が陽性となったが、インドールの産生、グルコースの発酵、ウレアーゼ、エスクリンの分解、

Fig. 2. Symptoms on stems of tomato induced 14 days after inoculation. Symptoms and virulence did not differ significantly among the 21 isolates and type strains used in this study (Table 1). Bar, 1 cm.

A. Dark-brown, hollow lesion around the inoculation site (below). No symptoms were observed on the negative control (above: sterile distilled water).

B. Aerial roots sometimes developed.

C. Pith and vascular system became discolored, and pith collapsed (below). No symptoms were observed on the negative control (above: sterile distilled water).

β -ガラクトシダーゼ、および酢酸フェニルの利用は陰性となり、プロファイル番号は 1157775 となった (Table 3). 一方, Group 2 と *Pm* の基準株では, D-マルトースとアジピン酸の利用が陰性となったため, 最終的なプロファイル番号は 1157555 となった (Table 3). なお, いずれの供試株・基準株も硝酸塩の還元は陽性を示したが, 還元程度には菌株間で差が認められ, 亜硝酸塩が検出される場合と, 窒素まで還元反応が進行している場合とがあった.

Biolog GEN3 マイクロプレートを用いて炭素源の資化性を検査したところ, Table 4 の最上段に示した 36 項目に関しては, すべてのグループ・基準株が陽性を示した. また, 2 段目に示した 23 項目では, いずれもが陰性となった. 一方, 3 段目に示した D-アスパラギン酸に関しては, Group 2, Group 3 および *Pm* の基準株は資化性を示したが, Group 1 と *Pc* の基準株では生育が認められなかった.

Fig. 3. Electron micrographs of three isolates selected as representatives of Groups 1, 2 and 3 (see Table 1), showing rod-shaped cells and 1–3 polar flagella. Bar, 1 μ m.

A. MAFF 301669 (Group 1 = *P. corrugata*).

B. MAFF 311126 (Group 2 = *P. mediterranea*).

C. MAFF 730105 (Group 3 = novel taxon).

MALDI-TOF MS 分析

各供試株と *Pc* の基準株との間でマススペクトルデータを比較し, スコア値を算出したところ, Group 1 のメンバーからはいずれも高い値 (2.53~2.71) が得られた (Table 1). 一方, Group 2 と Group 3 のメンバーのスコア値は, それよりもやや低い値 (前者は 2.00~2.19, 後者は 2.04~2.34) となった. 次に, *Pm* の基準株との比較を行ったところ, Group 2 のメンバーは高い値 (2.23~2.56) を示したが, Group 1 と Group 3 のメンバーからはやや低い値 (前者は 1.81~2.02, 後者は 1.70~2.02) が認められた. さらに, 得られたスペクトルデータを対象としてクラスター分析を行ったところ, 供試株・基準株は 3 つのクラスターに類別された (Fig. 4). しかも, この類別のパターンは, 分子系統解析に

Table 3. Biochemical profiling of Japanese nonfluorescent isolates of tomato pith necrosis pathogens and reference strains using API 20NE

API 20NE test ^{c)}	Japanese nonfluorescent isolates ^{a)}			Type strains ^{b)}	
	Group 1 (= <i>Pc</i>)	Group 2 (= <i>Pm</i>)	Group 3 (= novel taxon)	<i>Pc</i>	<i>Pm</i>
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Indole production	—	—	—	—	—
Glucose fermentation	—	—	—	—	—
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+
Urease activity	—	—	—	—	—
Esculin hydrolysis	—	—	—	—	—
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
β-Galactosidase activity	—	—	—	—	—
Oxidase activity	+	+	+	+	+
Utilization of:					
D-glucose	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+
D-maltose	+	—	+	+	—
Potassium gluconate	+	+	+	+	+
Capric acid	+	+	+	+	+
Adipic acid	+	—	+	+	—
Malic acid	+	+	+	+	+
Trisodium citrate	+	+	+	+	+
Phenylacetic acid	—	—	—	—	—
Numerical profile ^{d)}	1157775	1157555	1157775	1157775	1157555

a) Japanese nonfluorescent isolates were classified into three groups (Groups 1, 2 and 3; see Table 1) according to the phylogenetic analysis based on the concatenated sequences of the 16S rRNA gene and *rpoD* (Fig. 1) and the cluster analysis based on the mass spectrum data generated by MALDI Biotyper (Fig. 4) before the API 20NE tests.

b) See Table 1. *Pc*: *P. corrugata*; *Pm*: *P. mediterranea*.

c) API 20NE tests were done at 27°C for 5 days according to the methods of the supplier (Bio Merieux).

d) Seven-digit numerical profile was calculated according to the methods of the supplier.

+: positive; —: negative.

基づく系統樹のトポロジーと一致していた。すなわち、スペクトルデータに基づいて類別された3つのクラスター (Fig. 4) のメンバーは、それぞれ、分子系統解析に基づいて類別された3つのグループ (Fig. 1) のメンバーと同一であった。

PCR 検定

Pc と *Pm* のユニバーサルプライマーセットとして設計した「1impGF2/1impGR1」 (Table 2 の A 欄) を用い、コロニーダイレクトで PCR を行ったところ、供試株・基準株の全てから増幅産物を得ることができた (Table 1 の A 欄)。また、*Pc* 特異的プライマーセットとして設計した「2impGFc1/2impGRc2」 (Table 2 の B 欄) を用いて PCR 検定を行った

ところ、*Pc* の基準株と Group 1 からは増幅が認められたが、*Pm* の基準株や Group 2・3 からはシグナルが得られなかった (Table 1 の B 欄)。次に、*Pm* 特異的プライマーセットとして設計した「2impGFm1/2impGRm1」 (Table 2 の C 欄) を用いて PCR を行ったところ、*Pm* の基準株と Group 2 からはシグナルが認められたが、*Pc* の基準株と Group 1・3 からは増幅産物が得られなかった (Table 1 の C 欄)。一方、*Pm* に特異的と思われる配列を標的として設計した「2impGFm1/2impGRm2」 (Table 2 の D 欄) では、*Pm* の基準株と Group 2 だけでなく、Group 3 からも増幅が認められた (Table 1 の D 欄)。

Table 4. Carbon source utilization of Japanese nonfluorescent isolates of tomato pith necrosis pathogens and reference strains analyzed using Biolog MicroStation with the GEN III microplate system^{a)}

Positive reaction for all Japanese nonfluorescent isolates (Groups 1–3) (Table 1) and type strains of <i>Pc</i> and <i>Pm</i>
D-trehalose, sucrose, <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine, α -D-glucose, D-mannose, D-fructose, D-galactose, inosine, D-mannitol, D-arabitol, <i>myo</i> -inositol, glycerol, L-alanine, L-arginine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-histidine, L-pyrogutamic acid, L-serine, pectin, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucuronic acid, glucuronamide, mucic acid, quinic acid, D-saccharic acid, <i>p</i> -hydroxyphenylacetic acid, L-lactic acid, citric acid, α -ketoglutaric acid, L-malic acid, γ -aminobutyric acid, DL- β -hydroxybutyric acid, propionic acid, acetic acid
Negative reaction for all Japanese nonfluorescent isolates (Groups 1–3) (Table 1) and type strains of <i>Pc</i> and <i>Pm</i>
dextrin, D-maltose, D-cellobiose, gentiobiose, D-turanose, stachyose, D-raffinose, α -D-lactose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-salicin, <i>N</i> -acetyl- β -D-mannosamine, <i>N</i> -acetyl-D-galactosamine, <i>N</i> -acetyl neuraminic acid, L-fucose, L-rhamnose, D-sorbitol, D-glucose-6-phosphate, D-fructose-6-phosphate, gelatin, L-galactonic acid lactone, D-lactic acid methyl ester, acetoacetic acid
Positive reaction for Groups 2 and 3 (Table 1) and type strain of <i>Pm</i>
D-aspartic acid

a) Fresh bacterial cells were emulsified in “inoculating fluid A” (Biolog). For each isolate, 100 μ l of the cell suspension was then dropped into each well of the MicroPlate (Biolog) using a multichannel pipette and incubated at 27°C for 6 days. MicroPlates were read with the MicroStation semi-automated reader; results were interpreted by the system’s software (MicroLog 3 software).

Stable results were not obtained in the following utilization assays: 3-methyl glucose, D-fucose, D-serine, glycyl-L-proline, methyl pyruvate, D-malic acid, bromosuccinic acid, Tween 40, α -hydroxybutyric acid, α -ketobutyric acid, formic acid.

考 察

病原細菌の種レベルの所属

本研究では、「蛍光色素非産生のトマト茎えそ細菌病菌」と同定されていた 21 菌株 (Table 1) を対象として、*Pc* や *Pm* の同定に有効と考えられる検査項目 (Sutra *et al.*, 1997; Catara *et al.*, 1997, 2002; Trantas *et al.*, 2015a, 2015b) を中心とした多相分類学的な解析を行い、分類学的な位置づけに関して再検討を試みた。その結果、菌体の形態 (Fig. 3)、集落形態、蛍光色素の産生、レバン産生、オキシダーゼ、ジャガイモ塊茎腐敗、アルギニンジヒドロラーゼ、37°C での生育 (Table 1)、ユニバーサルプライマーを用いた PCR 検定 (Table 1 の A 欄) では、菌株間で斉一な結果が認められた。一方、供試株・基準株のうち、MAFF 301669, 301676, 730112, 301668, 301670, 302973, 730105 では、水溶性の黄色色素の産生が認められなかった (Table 1)。さらに、このうちの一部の菌株 (MAFF 301676, 730112, 301668, 301670, 302973) では、タバコ過敏感反応が陰性となった。Trantas *et al.* (2015b) も同様に、水溶性の黄色色素を産生する *Pc*・*Pm* ではタバコ過敏感反応が陽性となるが、色素非産生株の中には過敏感反応が陰性となるものが存在することを報告している。ただし、黄色色素産生能や過敏感反応誘導能の有無に関わらず、いずれの供試株・基準株もトマトに対して典型的な茎えそ症状を引き起こすことが認められ (Fig. 2)、病徴や病原性に関して菌株間に顕著な差はないことが確認できた。

一方、供試株を対象として分子系統解析を行うと、これらは 3 つのグループ (Group 1, 2, 3) に類別されること、および、*Pc* の基準株は Group 1, *Pm* の基準株は Group 2 に配置されることが判明した (Fig. 1)。このうち、Group 1 に関しては、MALDI-TOF MS 分析に基づくデンドログラムにおいても、*Pc* の基準株と同じクラスターに含まれることが明らかになった (Fig. 4)。さらに、メソ酒石酸、ヒスタミン、2-ケトグルコン酸の資化性 (Table 1)、API 20NE (Table 3) や Biolog (Table 4) による検査、および、特異的プライマーによる PCR 検定 (Table 1 の B, C, D 欄) においても、*Pc* の基準株と結果が一致することが認められた。以上のことから、Group 1 に属するメンバーは、いずれも *Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlett 1981 と同定することができた。

Group 2 のメンバーは、分子系統解析による系統樹 (Fig. 1) や MALDI-TOF MS 分析に基づくデンドログラム (Fig. 4) において、*Pm* の基準株と同じ位置づけとなった。また、メソ酒石酸、ヒスタミン、2-ケトグルコン酸の資化性 (Table 1)、API 20NE (Table 3) や Biolog (Table 4) による検査、および、特異的プライマーによる PCR 検定 (Table 1 の B, C, D 欄) の結果においても、*Pm* の基準株と一致していた。したがって、Group 2 のメンバーは、いずれも *Pseudomonas mediterranea* Catara, Sutra, Morineau, Achouak, Christen and Gardan 2002 に相当すると判断した。これまでに国内産の菌株が *Pm* と同定された事例はなく (日本植物病理学会, 2017)、本研究がわが国における初めての報告となる。なお、*Pm* と同定された菌株の中には、1981~1984 年に分離された菌株

Fig. 4. Dendrogram constructed after cluster analysis of the MALDI Biotyper-generated mass spectrum data for 21 isolates of the tomato pith necrosis pathogens obtained in Japan and type strains of *P. corrugata* (*Pc*) and *P. mediterranea* (*Pm*) (Table 1). The dendrogram was constructed using a group average method with the Pearson product-moment correlation coefficient. The grouping pattern completely matched the grouping in the phylogenetic tree (Fig. 1): Group 1 (= *P. corrugata*), Group 2 (= *P. mediterranea*) and Group 3 (= novel taxon).

(MAFF 301668, 301671, 301672) が含まれている (Table 1). これらは、わが国でトマト茎えそ細菌病が病原学的に研究された最初期の段階 (瀧川ら, 1981, 1985; 瀧川, 1985) で分離されたものであることから、わが国には当初から、*Pc* と *Pm* の双方が分布していた可能性が考えられる。同様に、多くのトマト生産国でも、*Pc* と *Pm* のいずれもが確認されている (Catara *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2005; Sahin *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2010; Alippi and Lopez, 2010; Xu *et al.*, 2013; Trantas *et al.*, 2015a). しかし、これら2種の起源地が

それぞれどこであり、その後、どのように分布を拡大し、わが国へ侵入するに至ったのかについては全く分かっておらず、今後の研究が必要である。

Group 3 に関しては、分子系統解析や MALDI-TOF MS 分析の結果、*Pc* や *Pm* の基準株からは独立した単系統群としてまとまることが明らかとなった (Fig. 1, 4). 一方、メソ酒石酸やヒスタミンの資化性 (Table 1), API 20NE による検査 (Table 3), および, 2impGFm1/2impGRm1 プライマーセットによる PCR 検定 (Table 1 の C 欄) に関しては、*Pc*

の基準株と結果が一致していた。それに対し、2-ケトグルコン酸の資化性 (Table 1), Biolog による検査 (Table 4), および, 2impGFC1/2impGRc2 あるいは 2impGFM1/2impGRm2 プライマーセットによる PCR 検定 (Table 1 の B および D 欄) では, *Pm* の基準株と同一の結果が得られた。以上のように, Group 3 に属する菌株は, *Pc* と *Pm* のいずれとも完全には一致しないことから, 新規分類群 (新種, あるいは既知種の新亜種) の可能性が高いことが示唆された。ただし, 本研究で得られた結果のみに基づいて, Group 3 の分類上の位置づけは確定できないことから, 十分な情報が揃うまでの間は「*Pseudomonas* sp.」として取り扱うことにしたい。今後は, 比較ゲノム解析 (Chun *et al.*, 2018) をはじめとする, 異なる視点に基づいた分類学的研究をさらに進める必要がある。その上で, Group 3 の特徴や範囲を具体的に把握するとともに, *Pc* や *Pm* 等の近縁種との異同をより明確にすることによって, 新規分類群として記載したいと考えている。なお, Group 3 に関しても, わが国における本病の研究史の初期段階 (1982 年) で分離された菌株 (MAFF 301670) が含まれている (Table 1) (瀧川ら, 1985; 瀧川, 1985)。したがって, *Pc* や *Pm* と同様に, Group 3 についても, わが国での本病の発生に当初から関わっていたことが推察される。しかし, Group 3 に相当する既知菌種はこれまでに世界的にも報告がないため, その起源や分布の実態に関しては今のところ手がかりが足りないのが実情である。今後, 本病を対象とした詳細な疫学・生態学的研究を進め, 情報を蓄積する必要があるだろう。

病原の追加

トマト茎えそ細菌病の病原として, 日本植物病名目録には *Pc* と *P. fluorescens* の 2 種が記載されている (日本植物病理学会, 2017)。すなわち, 現時点で, 蛍光色素非産生菌として収録されているのは *Pc* のみである。一方, 本研究によって, *Pc*, *Pm* および *Pseudomonas* sp. (Group 3) という 3 種類の蛍光色素非産生菌が, トマトの茎えそ症状の発生に関与していることが明らかとなった。また, これら 3 種類の病原間では, 病徴や病原力に関して顕著な差は認められず (Fig. 2), 症状に基づいて区別することはできないことが判明した。諸外国でも, *Pc* と *Pm* がもたらす症状は判別不能であることが報告されている (Catara *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2005; Sahin *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2010; Alippi and Lopez, 2010; Xu *et al.*, 2013; Trantas *et al.*, 2015a, 2015b)。以上のことから, トマト茎えそ細菌病の病原として, *Pm* と *Pseudomonas* sp. の 2 つを新たに追加することを提案したい。なお, 後者については, 分類学的な検討を早急に進め, 学名を確定したいと考えている。

判別・検出技術

本研究では, *Pc*, *Pm* および Group 3 の間で, 表現型に差異があることが確認できた (Table 1, 3, 4)。このうち, メソ酒石酸, ヒスタミン, 2-ケトグルコン酸の資化性については, *Pc* と *Pm* の判別に利用できることが既に報告されていたが (Catara *et al.*, 2002; Trantas *et al.*, 2015a), Group 3 との判別にも有効であることが本研究によって明らかとなった (Table 1)。さらに, D-アスパラギン酸の資化性 (Table 4) や API 20NE による検査 (Table 3) においても, これらの菌種間で反応に差が認められた。以上のような表現型の違いは, トマトの茎えそ症状由来の分離株を種レベルで同定する際に, 判別性状として利用できるであろう。

また, 本研究で実施した MALDI-TOF MS 分析によって, *Pc*, *Pm* および Group 3 からマスマススペクトルデータを取得し, それをインハウスライブラリーとして整備することができた。したがって, 今後は, 茎えそ症状由来の分離株を MALDI-TOF MS 分析し, ライブラリー検索を行えば, 種レベルの所属を簡便・迅速に判定することが可能となった。

さらに, ユニバーサルプライマーセットとして開発した「1impGF2/1impGR1」 (Table 2 の A 欄) を用いれば, 本病の病原菌であるか否かの判定が, PCR によって容易に実現できるであろう。同様に, *Pc* や *Pm* の特異的プライマーセットとして開発した「2impGFC1/2impGRc2」と「2impGFM1/2impGRm1」 (Table 2 の B および C 欄) についても, 種レベルの同定を行う上で有効であることが確認できた。さらに, これらに加えて「2impGFM1/2impGRm2」 (Table 2 の D 欄) も併用すれば, Group 3 の判別も可能となる。ただし, これらのプライマーセットに関しては, 近縁の *Pseudomonas* 属細菌を用いた特異性の検証試験を行っていないので, 現時点では, 土壌や種子を対象とした直接検出に利用すべきではないと考えている。あくまでも, 茎えそ症状からの分離株を対象とした同定試験に限定して用いるべきであろう。今後は, これらの特異性に関して十分な検証を行った上で, 直接検出に利用できるよう実験系として確立する必要がある。そのような実験系を完成させ, 土壌や種子の保菌検定に応用できるようにするとともに, それを用いて疫学的な調査を行い, 本病に関わる 3 つの病原菌の起源, 生態や分布の実態を明らかにしたいと考えている。

摘 要

わが国に分布するトマト茎えそ細菌病菌の多様性の実態を把握するために, 1980~2002 年の間に, 岩手, 宮城, 栃木, 埼玉, 千葉, 静岡, 石川, 大分の 8 県で分離された 21 菌株を対象として多相分類学的な解析を行った。これら供試株

をトマトに接種すると典型的な茎えそ症状が再現され、病徴や病原力に関して菌株間に顕著な差は認められなかった。また、いずれもグラム陰性、好気性で1~3本の極鞭毛を有する桿菌であり、King B培地で蛍光色素を産生しなかった。一方、16S rRNA遺伝子と*rpoD*の連結配列に基づく分子系統樹、および、MALDI バイオタイパーの分析結果に基づくデンドログラムにおいて、これら供試株や比較に用いた基準株は、以下の3つのグループに類別された: Group 1 [*Pseudomonas corrugata* (*Pc*) の基準株と供試株6菌株]、Group 2 [*P. mediterranea* (*Pm*) の基準株と供試株7菌株]、および、Group 3 (供試株8菌株)。このうち、Group 1とGroup 2に関しては、その主要な生理・生化学的性質や菌種特異的プライマーを用いたPCR検定に基づき、それぞれ、*Pc* および *Pm* と同定することができた。これまでに国内産の菌株が *Pm* と同定された事例はなく、本研究がわが国における初めての報告となる。一方、Group 3は単系統群として独立すること、2-ケトグルコン酸とD-アスパラギン酸の利用が陽性、メソ酒石酸とヒスタミンの利用が陰性となること、PCR検定で *Pc* や *Pm* とは異なる結果が得られることから、新規分類群(新種、あるいは既知種の新亜種)の可能性が高いことが示唆された。そこで、現時点ではGroup 3を *Pseudomonas* sp. と暫定的に表記した上で、わが国におけるトマト茎えそ細菌病の病原として *Pm* と *Pseudomonas* sp. の2つを新たに追加することを提案したい。なお、*Pm* や *Pseudomonas* sp. (Group 3) は、*Pc* とともに、わが国における本病の発生に当初から関与していた可能性があるものの、その起源やわが国への侵入経緯に関しては全く情報がない。今後は、本研究で得られた成果を活用し、信頼性の高い検出技術を確立した上で、本病に関わるこれら3つの病原菌の起源、生態や分布の実態を解明することが必要である。

謝 辞

本研究に供試したトマト茎えそ細菌病菌は、多くの研究者の方々から農業生物資源ジーンバンクへご提供頂いたものである。また、農研機構 野菜花き研究部門の染谷信孝氏、遺伝資源センターの青柳千佳氏、中島比呂美氏には多大なるご協力を頂いた。ここに記して深く感謝の意を表したい。

引用文献

- Alippi, A.M. and Lopez, A.C. (2010). First report of *Pseudomonas mediterranea* causing tomato pith necrosis in Argentina. *Plant Pathol.* 59: 1163.
- Anzai, Y., Kudo, Y. and Oyaizu, H. (1997). The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports

- synonymy of these three genera. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 249–251.
- Catara, V., Gardan, L. and Lopez, M.M. (1997). Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas corrugata* strains from southern Italy. *J. Appl. Microbiol.* 83: 576–586.
- Catara, V., Arnold, D., Cirvilleri, G. and Vivian, A. (2000). Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: evidence for two distinct genomic groups. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 753–762.
- Catara, V., Sutra, L., Morineau, A., Achouak, W., Christen, R. and Gardan, L. (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1749–1758.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., da Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., Xu, X.W., De Meyer, S. and Trujillo, M.E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 461–466.
- Jones, J.P., Zitter, T. A., Momol, T.M. and Miller, S.A. (2015). Diseases of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) (更新2015年5月12日). Common Names of Plant Diseases, <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Tomato.aspx>. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. (参照2017年11月12日)。
- Jukes, T. and Cantor, C. (1969). Evolution of protein molecules. *In* Mammalian protein metabolism (Munro, H.N., ed.). pp. 21–132, Academic Press, New York.
- 梶 和彦・平子喜一・武地誠一・瀧川雄一 (1989). 福島県におけるトマト茎えそ細菌病の発生. 北日本病害虫研究会報 40: 52–55.
- 久我ゆかり・谷井昭夫・美濃羊輔・酒井隆太郎 (1985). トマト茎えそ症状とその病原細菌. 日本植物病理学会報 51: 105. (講要)
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.
- 桑田博隆・及川 健 (1989). 青森県におけるトマトの茎えそ症状 (1) *Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlett 1981 及び *P. viridiflava* (Burkholder 1930) Dowson 1939 の分離例. 北日本病害虫研究会報 40: 56–58.
- Lopez, M.M., Siverio, F., Albiach, M.R., Garcia, F. and Rodriguez, R. (1994). Characterization of Spanish isolates of *Pseudomonas corrugata* from tomato and pepper. *Plant Pathol.* 43: 80–90.
- Moura, M.L., Jacques, M.A., Brito, L.M., Mourão, I.M. and Duclos, J. (2005). Tomato pith necrosis (TPN) caused by *P. corrugata* and *P. mediterranea*: severity of damages and crop loss assessment. *Acta Hort.* 695: 365–372.
- Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12: 1513–1530.
- 夏秋哲子・鍵渡徳次 (1985). トマトの茎えそ症状 (3) 病原細菌の性状. 日本植物病理学会報 51: 341–342. (講要)
- 日本植物病理学会 (2017). 日本植物病名目録 (2017年版). 日本植物病理学会, 東京.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J. and Elphinstone, J. (2011). Rapid

- phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. Plant Pathol. 60: 338–344.
- Parte, A.C. (2014). LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Res. 42: D613–616.
- Rodrigues, L.M.R., Destefano, S.A.L., Beriam, L.O.S. and Rodrigues-Neto, J. (2010). Occurrence of *Pseudomonas mediterranea* on tomato in Brazil. Plant Pathol. 59: 797.
- Sahin, F., Aysan, Y. and Saygili, H. (2005). First observation of pith necrosis on tomato caused by some *Pseudomonas* species in Turkey. Acta Hort. 695: 93–96.
- 澤田宏之・功刀幸博・綿打享子・工藤 晟・佐藤豊三 (2011). *Xanthomonas arboricola* によるブドウ斑点細菌病 (新称). 日本植物病理学会報 77: 7–22.
- 澤田宏之 (2013). 細菌の保存. 土壌微生物実験法第3版 (日本土壌微生物学会編). pp. 27–30, 養賢堂, 東京.
- 澤田宏之・畔上耕児 (2014). ククモビン型 Ri プラスミドを保持した *Rhizobium radiobacter* によるトマト毛根病 (新称). 日本植物病理学会報 80: 98–114.
- 澤田宏之・清水伸一・三好孝典・篠崎 毅・楠元智子・野口真弓・成富毅誌・菊原賢次・間佐古将則・藤川貴史・中畝良二 (2015). わが国で分離された *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 の特徴. 日本植物病理学会報 81: 111–126.
- 澤田宏之・横澤志織・上松 寛・西口 徹・近藤賢一 (2017a). *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* WB 系統によるクルミ黒斑細菌病のわが国における初発生. 日本植物病理学会報 83: 10–21.
- 澤田宏之・藤川貴史・北 宜裕・折原紀子・篠崎 毅・清水伸一・中畝良二・瀧川雄一 (2017b). マタタビ類斑点細菌病 (新称) の原因菌である *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* の特徴. 日本植物病理学会報 83: 136–150.
- Scarlett, C.M., Fletcher, J.T., Roberts, P. and Lelliott, R.A. (1978). Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. Ann. Appl. Biol. 88: 105–114.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Searcy, J.V.K., Smith, S., Gitaitis, R.D. and Dutta, B. (2016). First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in Georgia, USA. Plant Dis. 100: 518.
- 白川 隆・尾崎克己・高橋和夫 (1993). *Pseudomonas fluorescens* biovar II によるトマト茎えそ細菌病の発生. 北日本病害虫研究会報 44: 53–55.
- Siverio, F., Cambra, M., Gorris, M.T., Corzo, J. and Lopez, M.M. (1993). Lipopolysaccharides as determinants of serological variability in *Pseudomonas corrugata*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1805–1812.
- Siverio, F., Carbonell, E.A., Garcia, F. and Lopez, M.M. (1996). Characteristics of the whole cell fatty acid profiles of *Pseudomonas corrugata*. Eur. J. Plant Pathol. 102: 519–526.
- Sutra, L., Siverio, F., Lopez, M.M., Hunault, G., Bollet, C. and Gardan, L. (1997). Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis: emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genomospecies. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 1020–1033.
- 瀧川雄一・山下修一・土居養二・與良 清 (1981). トマトの茎えそ症状株から分離された *Pseudomonas* sp. について. 日本植物病理学会報 47: 134. (講要)
- 瀧川雄一 (1985). トマト茎えそ細菌病について. 今月の農業 29: 107–111.
- 瀧川雄一・露無慎二・後藤正夫 (1985). *Pseudomonas corrugata* によるトマト茎えそ細菌病 (新称) について. 日本植物病理学会報 51: 342–343. (講要)
- Trantas, E.A., Sarris, P.F., Pentari, M.G., Mpalantinaki, E.E., Ververidis, F.N. and Goumas, D.E. (2015a). Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. Plant Pathol. 64: 307–318.
- Trantas, E.A., Licciardello, G., Almeida, N.F., Witek, K., Strano, C.P., Duxbury, Z., Ververidis, F., Goumas, D.E., Jones, J.D., Guttman, D.S., Catara, V. and Sarris, P.F. (2015b). Comparative genomic analysis of multiple strains of two unusual plant pathogens: *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*. Front. Microbiol. 6: 811. doi: 10.3389/fmicb.2015.00811.
- Xu, X., Baysal-Gurel, F. and Miller, S.A. (2013). First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in the United States and *P. corrugata* in Ohio. Plant Dis. 97: 988.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67: 1613–1617.