

# *Pseudomonas syringae* 引起之茼蒿細菌性葉斑病

張哲銘<sup>1</sup> 蘇秋竹<sup>1\*</sup>

## 摘要

張哲銘、蘇秋竹。2016。 *Pseudomonas syringae* 引起之茼蒿細菌性葉斑病。臺灣農藥科學 1: 127-142。

2011年於雲林縣西螺鎮的蔬菜生產區，首次發現茼蒿植株接近地表下位葉的葉背或葉緣處初期出現水浸狀斑點，病斑會漸癒合成大型不規則褐色斑，經由罹病組織分離出一病原細菌，將此菌接種至茼蒿葉片，可產生相同病徵，完成柯霍氏法則。此病原菌經電子顯微鏡觀察，其型態為桿狀極生多根鞭毛，經生理生化測定得知其可產生果聚醣，並可利用蔗糖及山梨醇，輔以 Biolog 鑑定系統及 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) 序列比對，確認此菌為 *Pseudomonas syringae*。進一步以 16S-23S ITS 片段序列與基因庫登錄之 *P. syringae* 不同病原型的序列進行比較，發現其與 *P. syringae* pv. *antirrhini*、*P. syringae* pv. *tomato*、*P. syringae* pv. *maculicola* 及 *P. syringae* pv. *lachrymans* 之 16S-23S ITS 核苷酸序列相似度可達 99.5 ~ 100%。將此序列以鄰聚連結法 (neighbor-joining method) 繪製親緣演化分析樹狀圖，得知本病原菌與上述 4 病原型皆屬於第三基因種 (genomospecies)，此病原菌是否為新的病原型則需進一步測試方能確認。以濾紙擴散法在培養基上測試市售 9 種藥劑對本菌的抑制效果，結果顯示除嘉賜黴素、鋅錳乃浦及三元硫酸銅 3 種藥劑於供試濃度下對該菌之生長無抑制作用外，其餘 6 種包括鏈四環黴素、鏈黴素、多保鏈黴素、氫氧化銅、嘉賜銅及歐索林酸等藥劑於供試濃度均能抑制其生長，其中又以多保鏈黴之效果最佳。

**關鍵詞：***Pseudomonas syringae*、細菌性葉斑病、茼蒿。

---

接受日期：2016年9月12日

\* 通訊作者。Email: auba@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

## 緒言

茼蒿 (*Chrysanthemum coronarium*)，屬 1 年生菊科、菊屬草本植物，原生於地中海南岸，在歐洲原本是庭園中美麗的觀葉植物，引入中國之後便成為國人喜愛的冬季蔬菜。茼蒿為在臺灣俗稱「打某菜」，因性喜冷涼氣候，適宜栽種於 20°C 左右的冷涼氣候，從播種到收穫約需 45 ~ 50 d，儼然已成為國人冬天吃火鍋不可或缺的重要食材。根據農糧署網站統計，臺灣茼蒿栽種面積可高達 800 餘公頃，主要栽種於雲林縣二崙鄉跟西螺鎮蔬菜生產區，每年 10 月至來年 4 月為盛產期。目前臺灣已確認的茼蒿病害<sup>(1)</sup>包括萎凋病 (*Fusarium wilt*)、細菌性軟腐病 (*bacterial soft rot*)、菌核病 (*Sclerotinia rot*)、葉枯病 (*Cercospora leaf blight*)、炭疽病 (*Anthraco*)、根瘤線蟲 (*Root-knot nematode disease*)、白銹病 (*White blister*)、露菌病 (*downy mildew*)、蕪菁嵌紋病毒 (*TuMV*) 等。本研究室首度於 2011 年在茼蒿植株接近地表下位葉的葉背或葉緣處初期出現水浸狀斑點，病斑會漸癒合成大型不規則褐色斑，農友俗稱其為「鐵銹病」，罹病組織經鏡檢有細菌流出現象，懷疑為細菌所引起之病害。根據文獻報導，菊屬植物細菌性病害零星報導於全球各地，其病原菌分別為 *Pseudomonas solanacearum*<sup>(31)</sup> (已更名為 *Ralstonia solanacearum*)、*Pseudomonas syringae*<sup>(6,29)</sup>、*Pseudomonas cichorii*<sup>(9)</sup> 及 *Erwinia chrysanthemi*<sup>(2,8)</sup> (已更名為 *Dickeya* spp.) 等；本文為臺灣茼蒿細菌性葉斑病首

次報導，主要探討引起本病的病因、病原菌特性及分類地位，並進行室內藥劑篩選，以供農民防治參考。

## 材料與方法

### 一、菌株來源

於雲林縣西螺鎮蔬菜栽培區的 5 個罹病田區採集茼蒿罹病株，以 70% 酒精進行表面消毒後，切取葉片上水浸狀及褐色斑點之罹病組織於無菌水中切碎，以移植環沾取細菌懸浮液劃線於營養培養基 (*Nutrient Agar*, NA, *Difco Laboratories*, Sparks, MD, USA) 平板上，於室溫下培養 1 ~ 2 d，挑取乳白色、圓形略凸、周圍平滑的單一菌落，再劃線於 NA 平板培養基，重覆 3 次後，所得菌株分別以 Cc 編號，共獲得 54 菌株。

### 二、田間病害發生率調查

2011 年 2 月期間於西螺地區選取 5 個茼蒿罹病栽植田進行調查，調查植株約為播種 30 天後至採收前之植株，每個田區隨機選取面積約 1 m<sup>2</sup> 的 3 個小區調查病害發生率，其發生率為單位面積內罹病株數除以總調查株數。

### 三、過敏性反應

將分離所得之 54 個病原菌株分別培養於 NA 平板培養基 28°C 1 d 後，以無菌水配置 10<sup>8</sup> cfu/mL 之細菌懸浮液作為接種源，

以注射接種法接種於萬國士菸草 (*Nicotiana tabacum*) 葉片內，置於室溫 24 h 觀察是否有過敏性反應。

#### 四、病原性測定

接種試驗所使用的供試植株為普遍栽培的「大葉茼蒿」，於西螺種子行所購買茼蒿種子，其種子來源為農友自行留種。以 1% 稀鹽酸種子消毒 20 min、流水沖洗 2 次，再將種子浸泡於清水後播種於穴盆中。植株高約 10 cm 時進行接種試驗，分別選取 Cc13、Cc22、Cc24、Cc30、Cc37 及 Cc39 等 6 個菌株進行病原菌測定，配置  $10^8$  cfu/mL 之細菌懸浮液，以噴霧方式分別接種於茼蒿葉面及葉背，置於溫室中的霧室 (mist chamber) 進行保濕，試驗期間之溫度為 15 ~ 27°C，觀察並記錄病徵出現情形，再從接種後罹病茼蒿組織分離出病原菌，以符合柯霍式法則。

#### 五、細菌型態觀察及生理生化測定

將培養於 NA 平板培養基 1 d 之供試菌株，加入少許無菌水 5 s 後，輕輕吸起滴於載玻片上，加入 0.5% 醋酸鉍醯，兩分鐘後以覆有 formvar 支持膜之銅網沾取，再以濾紙吸乾多餘水分，置於 JEM-1010 (Jeol Korea Ltd., Seoul, Korea) 穿透式電子顯微鏡觀察細菌型態及鞭毛。選取前述 6 個菌株作為供試菌株，分別培養於 NA 平板培養基後，依據 Braun-Kiewnick<sup>(7)</sup> 及 Schaad 等學者<sup>(27)</sup> 所編

著之植物病原細菌實驗指南所述，進行葛蘭氏染色 (Gram staining)、King's B 培養基<sup>(18)</sup> 上螢光色素 (fluorescent pigment) 形成、果聚醣 (levan production) 測定、精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase production) 測定、硝酸還原酶 (nitrate reductase) 測定、馬鈴薯致腐測試 (potato soft rot) 及菸草過敏性反應 (tobacco hypersensitivity)；碳源利用上，包含蔗糖 (sucrose)、鼠李糖 (L-rhamnose)、海藻糖 (trehalose)、甘露醇 (mannitol)、香葉醇 (geraniol)、苯甲酸 (benzoate)、纖維二糖 (cellobiose)、山梨糖醇 (sorbitol)、酒石酸 (tartrate) 及阿拉伯糖 (D-arabinose) 等醣類。

#### 六、Biolog Identification System 鑑定

以前述 6 個菌株作為供試菌株，分別重複劃線培養於 BUG Agar 培養基中約 16 ~ 24 h，重複劃線於 BUG Agar 培養基，將細菌懸浮於 GN Inoculation Fluid (0.4% NaCl, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gellan gum) 中，調整濁度至 52% T (turbidity)，分別取 150 ul 細菌懸浮液加入 Biolog GN2 反應盤 (Biolog Inc., Hayward, CA) 中，置於 28°C 下培養 4 ~ 24 h 後以光譜儀測讀，接著透過 Biolog 鑑定系統之 GN2 資料庫 (Biolog 6.1 版) 進行比對判讀，鑑定其種、屬。

#### 七、PCR 檢測鑑定

選取前述 6 個菌株作為供試菌株，並選取 *P. syringae* pv. *syringae*、*P. syringae* pv.

*tomato*、*P. syringae* pv. *tabaci* 及 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 等為對照菌株 (對照菌株 DNA 由國立中興大學植物病理學系細菌研究室提供)。培養供試菌株之菌液至  $10^8$  cfu/mL 濃度，使用組織與細胞基因體 DNA 純化試劑盒 (GeneMark, Taichung, Taiwan) 萃取基因體 DNA，再各取 2 ul 作為 DNA 模版。根據 *P. syringae* pv. *antirrhini* 的 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) 序列<sup>(25)</sup>，設計引子對 Pse-ITS-F (5'-agaagcagctttgctttgc-3') 及 Pse-ITS-R (5'-ccgaaagttgcatcaca-3') 進行 PCR 分析以鑑定供試菌株。PCR 反應總體積為 20 ul，其中包含 1 倍反應緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100)、250 uM 的 dNTPs、0.5 uM 的引子、0.8 Units 的 ProTaq™ DNA Polymerase (Protech Technology Enterprise Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 及 20 ng 基因體 DNA。PCR 增幅條件先以 94°C 反應 5 min，之後進行 94°C 1 min、58°C 1 min、72°C 1 min，共 35 個循環，最後再進行 72°C 10 min。增幅後之產物以 1% agarose (1 倍 TAE buffer) 之電泳分析 (100 V)，並以 100 bp DNA ladder H3 RTU (GeneDireX Inc., 5348 Vegas Dr. Las Vegas City, Nevada 89108, USA) 作為核酸標幟物，最後以溴化乙錠染色觀察，並照相記錄。

## 八、16S-23S ITS 定序

選取 Cc24、Cc30 及 Cc39 經 PCR 反應所得 16S-23S ITS 序列片段經由純化後，以

轉殖套件 pOSI-T PCR Cloning kit (GeneMark, Taichung, Taiwan) 來進行 DNA 片段之轉殖。抽取轉殖株的質體，並進行 PCR 及限制酵素切割確認轉殖片段後，將序列片段送至明欣生物科技公司以自動定序儀 (Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 進行定序。將定序所得之 16S-23S ITS 序列送至 NCBI (National Center for Biotechnology Information, 美國國家生物科技資料中心) 的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

## 九、親緣關係鑑定

將得到的 16S-23S ITS 序列與 17 種登錄於 GenBank (基因庫) 之 *P. syringae* 不同病原型 (表一) 的序列進行比較，本實驗所參考的病原型包括：*P. syringae* pv. *maculicola*、*P. syringae* pv. *morsprunorum*、*P. syringae* pv. *lachrymans*、*P. syringae* pv. *tomato*、*P. syringae* pv. *passiflorae*、*P. syringae* pv. *actinidiae*、*P. syringae* pv. *antirrhini*、*P. syringae* pv. *delphinii*、*P. syringae* pv. *coronafaciens*、*P. syringae* pv. *porri*、*P. syringae* pv. *garcae*、*P. syringae* pv. *syringae*、*P. syringae* pv. *tagetis*、*P. syringae* pv. *helianthi*、*P. syringae* pv. *aptata*、*P. syringae* pv. *psi* 及 *P. syringae* pv. *tabaci*<sup>(19)</sup>。所有序列以 BioEdit 7.0.9.0 版 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) 軟體 ClustalW<sup>(13)</sup>，進行多序列比對並整理得到一致性序列後。再以 DNA 序列分析軟體 Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA) version 4.0<sup>(30)</sup> 套用 Kimura 2-param-

表一、16S-23S ITS 序列比對所使用的茼蒿細菌性葉斑病菌及其他 *Pseudomonas syringae* 病原型菌株

**Table 1.** The 16S-23S ITS sequence alignment for strains of *Pseudomonas syringae* and other pathovar types obtained from *Chrysanthemum coronarium*

Strain	Number	GenBank accession number	Genomespecies <sup>1)</sup>
<i>Pseudomonas syringae</i>	Cc39	KU884652	G3
	Cc24	KU884653	G3
	Cc30	KU884654	G3
pv. <i>antirrhini</i>	ICMP 4303	AY342166	G3
pv. <i>aptata</i>	ICMP 4387	AY342167	G1
pv. <i>pisi</i>	PP105	AY850197	G1
pv. <i>tabaci</i>	ICMP 2835	AY342183	G2
pv. <i>tagetis</i>	ICMP 4091	AY342202	G7
pv. <i>helianthi</i>	ICMP 4531	AY342173	G7
pv. <i>syringae</i>	NRRL B-1631	AY342181	G1
pv. <i>coronafaciens</i>	ICMP 3113	AY342169	G4
pv. <i>porri</i>	BD 450	AY644714	G4
pv. <i>garcae</i>	ICMP 4323	AY342171	G4
pv. <i>delphinii</i>	ICMP 529	AY342170	G3
pv. <i>lachrymans</i>	LMG 5070	JN624860	G3
pv. <i>actinidiae</i>	ICMP 9617	AY342165	G3
pv. <i>maculicola</i>	10	AY342174	G3
pv. <i>morsprunorum</i>	LMG5075	EU009174	G3
pv. <i>passiflorae</i>	NZ187	GU808449	G3
pv. <i>tomato</i>	DC3000	AY342209	G3

<sup>1)</sup> Genomespecies grouping was referenced from Gardan *et al.* (1999)<sup>(11)</sup>.

eter 模式，計算兩兩序列間之遺傳距離，並以鄰近連結法 (neighbor-joining method)<sup>(24)</sup> 方法繪製親緣關係樹圖，以 1,000 次重複取樣之 bootstrap replications 值以檢驗親緣關係樹狀圖各支點的可信度<sup>(10, 17)</sup>，比較各不同的病原型之親緣關係結果。

## 十、藥劑感受性測定

以濾紙擴散法於 NA 平板培養基上測定供試細菌對之感受性，選取前述 6 個菌株作為供試菌株，菌株濃度調整為 10<sup>8</sup> cfu/mL 之菌液。以噴霧方式將菌液均勻噴灑於 NA 平板培養基上，將供試藥劑稀釋成不同濃度

後，分別取 0.1 mL 滴於每片濾紙（直徑 12 mm）上，之後每皿放置 3 個不同濃度藥劑之濾紙圓盤，每個處理進行 3 重複，並以滴入無菌水之濾紙盤為對照組，在 30°C 下培養 2 d 後，測量抑制圈大小，若無抑制圈產生表示此藥劑在所測試的濃度下對供試菌株之生長無抑制效果。供試 9 種藥劑種類如下，抗生素類藥劑：鏈四環黴素 (Streptomycin + Tetracycline, 10.0% SP, 全台農藥公司)、鏈黴素 (Streptomycin, 12.5% SL, 大勝公司)、多保鏈黴素 (Thiophanate methyl + Streptomycin, 68.8% WP, 瑞總公司)、嘉賜黴素 (Kasugamycin, 2.0% S, 世大化工)；含銅劑類藥劑：氫氧化銅 (Copper hydroxide, 53.8% WP, 杜邦公司)、三元硫酸銅 (Tribasic copper sulfate, 27.12% SC, 日產化工公司)；混合類藥劑：嘉賜銅 (Kasugamycin + Copper oxychloride, 81.3% WP, 世大化工)、鋅錳乃浦 (Mancozeb, 80.0% WP, 世大化工公司)；其他類藥劑如歐索林酸 (Oxolinic acid, 20% WP, 住友化學公司)，各藥劑測試濃度如表二所示。

## 結果

### 一、病徵與病害之發生

2010 及 2011 年的冬季期間常呈現連續濃霧的氣候條件，於西螺鎮的蔬菜生產區發現茼蒿植株接近地表下位葉的葉背或葉緣處初期出現水浸狀斑點，病斑會漸癒合成大型不規則褐色斑（圖一），農友俗稱其為「鐵銹病」，在適合環境下，蔬菜田中

茼蒿植株罹病嚴重時會影響茼蒿品質及產量；經西螺鎮茼蒿生產區現場調查，結果顯示 5 區罹病茼蒿田發生率分別為 14.1%、23.7%、34.3%、38.5% 及 41.9%，平均發生率為 30.5%。

### 二、過敏性反應及病原性測定

分離自茼蒿罹病植株的 54 個菌株，於菸草測試皆會產生過敏性反應，選取其中 6 個菌株進行病原性測定，茼蒿植株於接種後約 3 d，初期於葉緣或葉片開始顯現水浸狀小斑點，病斑會持續擴展、色澤加深及逐漸癒合呈現褐色不規則斑，與田間觀察之病徵相同，接種罹病植株亦分離出相同病原菌。

### 三、細菌型態觀察及生理生化測定

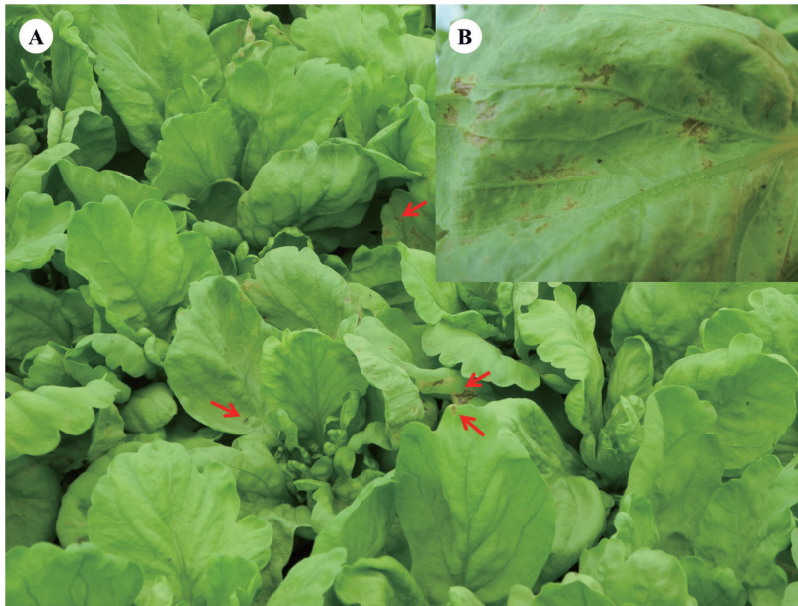
分離自茼蒿細菌菌株為葛蘭氏陰性菌具好氧性，於 NA 平板培養基上為白色邊緣完整之圓形菌落，培養於 KB 培養基上經波長 365 nm 紫外光激發可產生螢光，可產生果聚糖，但在 41°C 無法生長，不具白明膠水解作用，不產生精氨酸二水解酵素，不可還原硝酸，在馬鈴薯組織上不具有致腐能力，於穿透式電子顯微鏡下觀察其為桿狀具數根極生鞭毛；碳源測試結果：茼蒿菌株可利用 mannitol、sucrose、m-tartrate、L-tartrate 及 sorbitol，但不能利用 D-arabinose、benzoate、cellobiose、geraniol、trehalose 及 L-rhamnose；供試菌株與會產生螢光之假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 2 種細菌 *P. syringae* 及

表二、茼蒿細菌性葉斑病菌對農藥感受性測定

**Table 2.** Sensitivity of *Pseudomonas syringae* strains obtained from *Chrysanthemum coronarium* to different agrochemicals

Chemicals	Concentration (ppm)	Inhibition zone (cm) <sup>1)</sup>
Streptomycin	100	0.99 ± 0.01 c
Tetracycline (10% SP)	200	1.20 ± 0.01 b
	400	1.30 ± 0.01 a
Kasugamycin (2% S)	100	0
	200	0
	400	0
Oxolinic acid (20% WP)	100	0.94 ± 0.04 b
	200	1.06 ± 0.03 a
	400	1.12 ± 0.03 a
Kasugamycin	500	0.27 ± 0.06 b
Copper oxychloride (81.3% WP)	750	0.41 ± 0.14 b
	1,000	0.60 ± 0.14 a
Thiophanate methyl	500	1.40 ± 0.01 c
Streptomycin (66.8% WP)	750	1.50 ± 0.05 b
	1,000	1.61 ± 0.02 a
Mancozeb (80% WP)	1,000	0
	1,500	0
	2,000	0
Copper hydroxide (53.8% WP)	1,000	0.69 ± 0.29 b
	1,500	1.07 ± 0.06 a
	2,000	1.20 ± 0.06 a
Streptomycin (12.5% SL)	100	1.20 ± 0.02 c
	200	1.28 ± 0.02 b
	400	1.40 ± 0.01 a
Tribasic copper	250	0
Sulfate (27.12% SC)	500	0
	750	0
CK		0

<sup>1)</sup> Mean ± standard error. Means that are in the same column and are followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to the LSD test.



圖一、(A) 田間茼蒿細菌性葉斑病之病徵；(B) 近照顯示葉背呈現大型不規則褐色斑。

Fig. 1. (A) Symptoms of bacterial leaf spot on *Chrysanthemum coronarium* field specimens (red arrows). (B) A close-up image showing irregular brown spots on the abaxial surface of a leaf.

*P. cichorii* 之生理生化特性進行比較，結果顯示供試菌株與 *P. syringae* 的生理生化特性相近 (表三)。

#### 四、Biolog 鑑定系統測試

供試菌株分別以 Biolog Identification System 之 GN2 資料庫 (Biolog 6.1 版) 進行比對判讀。培養 24 h 的結果，各菌株與 *P. syringae* pv. *antirrhini* 最為相近，其相似值依序分別為 0.549、0.882、0.893、0.528、0.829 及 0.583。

#### 五、PCR 檢測鑑定

根據 GenBank 上所登錄 *P. syringae* pv.

*antirrhini* 的 16S-23S ITS 序列設計引子對 (Pse-ITS-F/R)，應用此引子對進行 PCR 檢測。各供試菌株及對照菌株：*P. syringae* pv. *syringae*、*P. syringae* pv. *tomato*、*P. syringae* pv. *tabaci* 及 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 等對照菌，皆可產生約 420 bp 大小 DNA 片段及無菌水對照組無基因產物 (圖二)，確認 6 個供試菌株為 *P. syringae*。

#### 六、16S-23S ITS 定序及親緣關係鑑定

供試菌株經 PCR 增幅所得之片段進行 DNA 定序，將序列資料上傳至 NCBI

表三、茼蒿細菌性葉斑病菌之生理生化特性

**Table 3.** Physiological and biochemical characteristics of *Pseudomonas syringae* strains obtained from *Chrysanthemum coronarium*

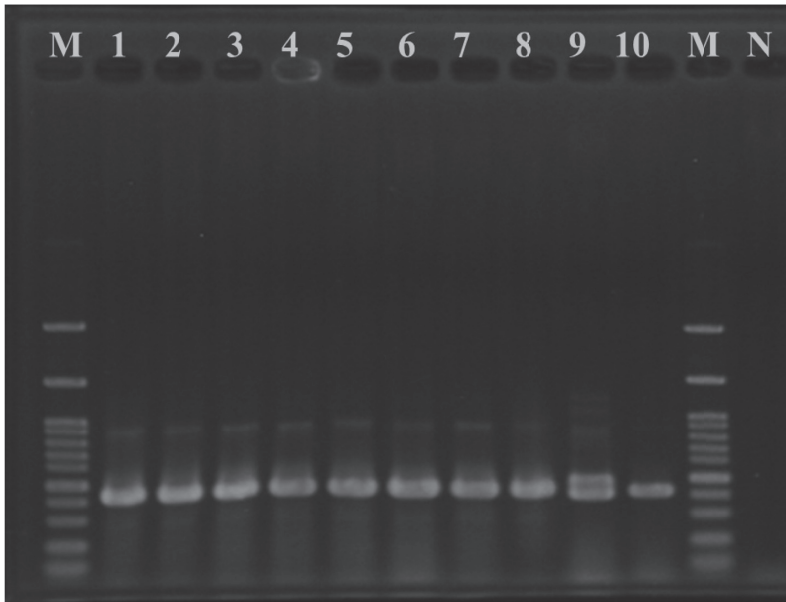
Characteristic	Tested strain	<i>P. syringae</i> <sup>1)</sup>	<i>P. cichorii</i> <sup>1)</sup>
KOH test	G(-)	G(-)	G(-)
Fluorescent pigment on KB	+ <sup>2)</sup>	+	+
Flagellar number	≥ 1	≥ 1	≥ 1
Tobacco HR	+	+	+
Growth at 41° C	-	-	-
Potato rot	-	-	-
Levan	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Utilization of:			
Manitol	+	+	+
Geraniol	-	-	-
Benzoate	-	-	-
Cellobiose	-	-	-
Sorbitol	+	+	-
Trehalose	-	-	-
Sucrose	+	+	-
m-Tartrate	+	V	+
D-Tartrate	+	V	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-

<sup>1)</sup> Identified according to laboratory guides for the identification of plant pathogenic bacteria by Braun-Kiewnick and Sands (2001)<sup>(7)</sup> and Schaad (1988)<sup>(27)</sup>.

<sup>2)</sup> +: positive reaction; -: negative reaction.

(GenBank accession number: KU884652-KU884654)，並將所得序列於 BLAST 網站進行序列比對，結果顯示供試菌株皆與 *P. syringae* pv. *antirrhini* (GenBank accession number AY342166) 之序列相同度達 99%。各菌株之 16S-23S ITS 的序列片段為 418 ~

429 bp，長度變化為 12 bp，進一步對照序列比對結果，分離自茼蒿的本病原菌與 *P. syringae* pv. *antirrhini*、*P. syringae* pv. *toma-to*、*P. syringae* pv. *maculicola* 及 *P. syringae* pv. *lachrymans* 之 16S-23S ITS 核苷酸序列相似度可達 99.5 ~ 100%。將此序列以鄰聚連結



圖二、以引子對 ITS-F/R 應用 PCR 鑑定 *Pseudomonas syringae* 的電泳圖譜。M 為 100 bp DNA ladder；1 ~ 6 行為供試菌株，分別為：Cc13、Cc30、Cc37、Cc22、Cc24、Cc39；7 ~ 10 行為正對照組，分別為：*P. syringae* pv. *syringae*、*P. syringae* pv. *tabaci*、*P. syringae* pv. *tomato*、*P. syringae* pv. *phaseolicola*；N 為去離子水對照組。

**Fig. 2.** Amplification of 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) fragments from DNA that was purified using PCR with the ITS-F/R primer pair. M: 100 bp DNA ladder; Lanes 1 ~ 6: Cc13, Cc30, Cc37, Cc22, Cc24, Cc39; Lanes 7 ~ 10: *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *Phaseolicola*; N: ddH<sub>2</sub>O.

法繪製親緣演化分析樹狀圖（圖三），顯示來自茼蒿 3 個供試菌株與上述 4 個病原型皆屬於同一分群。

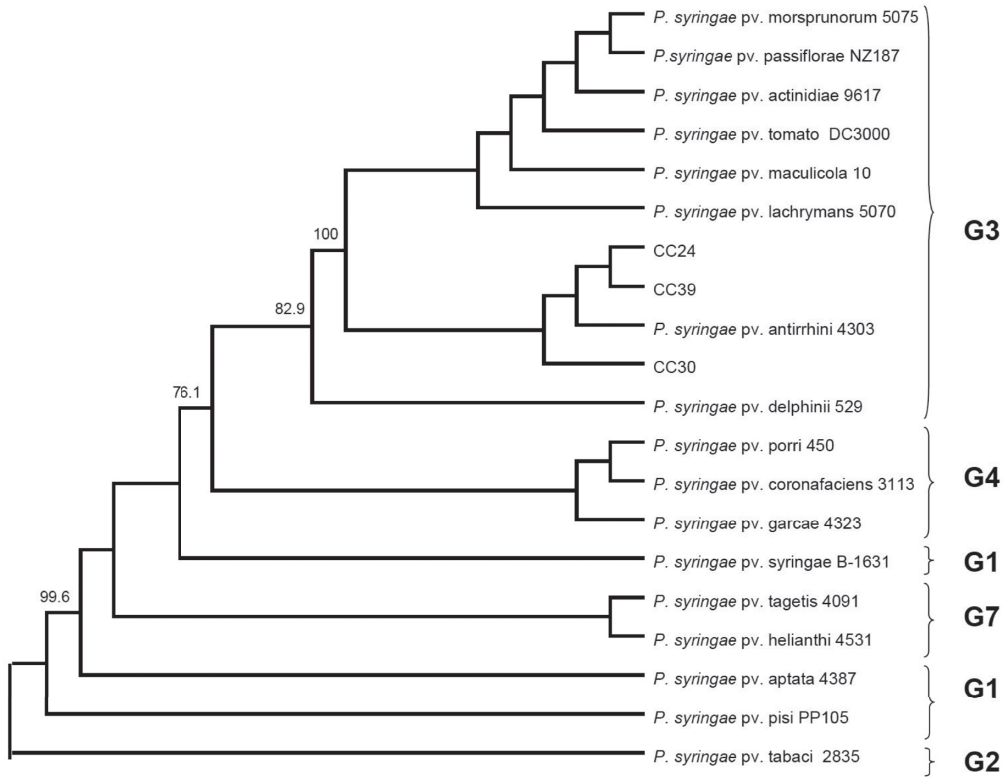
## 七、藥劑感受性測定

測定供試菌株對市售 9 種藥劑在推薦使用濃度的感受性，結果顯示除了嘉賜黴素、鋅錳乃浦及三元硫酸銅 3 種藥劑對測試菌株之生長無抑制效果外，其餘 6 種包括鏈四環黴素、鏈黴素、多保鏈黴素、氫氧化

銅、嘉賜銅及歐索林酸等藥劑於 3 種供試濃度均能有抑制其生長，藥劑以多保鏈黴素之抑制效果最佳，其次依序為鏈黴素、鏈四環黴素、歐索林酸、氫氧化銅、嘉賜銅，另同一藥劑之不同濃度間抑制效果有顯著差異之趨勢，如多保鏈黴素、鏈黴素及鏈四環黴素（表二）。

## 討論

茼蒿為國人喜愛的冬季蔬菜，2010 及



圖三、茼蒿細菌性葉斑病菌菌株與其他 *Pseudomonas syringae* 病原型之 16S-23S ITS 序列，經由最鄰近連結法分析親緣演化樹；枝條上的數字代表 bootstrap 值，且僅標示高於 70 的 bootstrap 值。

Fig. 3. A neighbour-joining tree illustrating the relationships between the *Chrysanthemum coronarium* bacterial leaf spot pathogen and *Pseudomonas syringae* pathovars based on 16S-23S ITS gene sequences. Probabilities of bootstrap analyses (in percentages) of 1,000 resamplings which are greater than 70% are shown above the internal branches.

2011 年冬季呈現連續濃霧的氣候條件下，西螺鎮蔬菜生產區茼蒿疑似細菌性病害嚴重發生，農友俗稱其為「鐵銹病」，在適合環境下，蔬菜田中茼蒿植株的罹病率常超過 3 成以上，嚴重影響茼蒿的產值；本研究於雲林縣西螺鎮的 5 個罹病田區發生率調查亦證實平均發生率達 30%，進一步採

集樣本並進行病原菌分離，將分離到的細菌菌株接種於健康茼蒿植株，顯現病徵與田間罹病植株病徵相似，並可由接种植株再次分離到相同病原菌，完成柯霍氏法則，確認此病害為細菌所引起。

分離自茼蒿細菌性葉斑病菌菌株經由生理生化特性、Biolog 菌種鑑定系統分析及

16S-23S ITS 片段選殖解序結果，將此病原菌歸屬於 *P. syringae*。*P. syringae* 又稱為丁香假單胞菌群，其寄主範圍廣，可危害多種觀賞植物及蔬菜作物，在臺灣已有多種作物有被感染的紀錄<sup>(1)</sup>包括：茶、大豆、番茄、桑、菸草、胡麻、小麥、蘿蔔、扶桑、楊桃<sup>(3)</sup>及梨<sup>(5)</sup>等，國外尚有萬壽菊、向日葵、甜菜、燕麥、翠雀草、李樹、胡瓜、西番蓮、奇異果、金魚草、洋蔥、咖啡等危害紀錄<sup>(19)</sup>，目前依據危害寄主範圍及病原性的差異性，*P. syringae* 群病原細菌被歸類有 57 種病原型<sup>(12, 14)</sup>。此群細菌在臺灣曾於 1998 年被發現引起楊桃細菌性葉斑病，嚴重危害中部地區楊桃產區，造成農友莫大恐慌及損失，其病原菌因生理生化鑑定及寄主範圍接種試驗之結果，皆顯示該病菌與 *P. syringae* 之其他病原型菌株間皆有很大的差異，而被歸屬於 *P. syringae* 的新病原型，並命名為 *P. syringae* pv. *averrhoi*<sup>(20)</sup>；另於 2014 年動植物防疫檢疫局發布通報，確認來自日本梨接穗疑似帶有細菌性病害之病原菌 *P. syringae*，惟該病原菌之病原型仍待寄主範圍測定才能確認。

Gardan 等學者<sup>(11)</sup>曾以 DNA 雜交分析及 rRNA 分型兩種方式進行綜合分析，將其中 48 種 *P. syringae* 病原型分為 9 種基因種 (genomospecies)；Kong 等學者則以 17 種病原型 16S-23S ITS 序列片段<sup>(19)</sup>作為來進行 *P. syringae* 之分群，結果顯示由 16S-23S ITS 序列所繪製之親緣演化分析樹狀圖，共可分為 7 個分群。本試驗以茼蒿細菌性葉斑病菌菌株與 17 種 *P. syringae* 病原型之 16S-

23S ITS 序列進行親緣演化分析，得知來自茼蒿細菌菌株與 *P. syringae* pv. *antirrhini*、*P. syringae* pv. *tomato*、*P. syringae* pv. *maculicola* 及 *P. syringae* pv. *lachrymans* 等病原型為同一分群，歸屬於第三基因種 (圖三)，本研究來自茼蒿細菌性葉斑病菌菌株是否為一新病原型，仍待深入探討。

室內藥劑篩選試驗，發現抗生素及銅劑類藥劑，對來自茼蒿細菌性葉斑病菌菌株生長抑制效果顯著，此結果與楊桃細菌性斑點病之推薦防治藥劑相似<sup>(4)</sup>，將來可作為茼蒿細菌性葉斑病防治用藥參考依據。另根據文獻指出 *P. syringae* 群細菌<sup>(16, 21, 22, 23, 26, 28)</sup>可藉由種子帶菌或於植株器官表面間隙微量殘存能力，目前臺灣茼蒿種植方式是由種子播種，一般農友習慣自行採種，因此種子帶菌或污染病原菌可能為本病害發生主要感染源，本研究分別比較 1%、10% 稀鹽酸<sup>(15)</sup>種子消毒後並進行適度催芽試驗，統計結果得知種子發芽率不受稀鹽酸消毒影響 (資料未列出)，建議農友可以將茼蒿種子於播種前以 1% 稀鹽酸消毒 20 min，再以流水沖洗 10 ~ 20 min，此方式可效除去附著在種子表面的細菌進而減少病害發生風險。

## 謝辭

本研究感謝國立中興大學鄧文玲教授提供對照菌株 DNA、段中漢博士協助校稿及李祈益先生、尹蓓小姐與劉芝華小姐協助試驗，特致謝忱。

## 引用文獻

1. 徐世典、張東柱、張清安、蔡進來、蔡東纂 編。2002。臺灣植物病害名彙。4 版。中華民國植物病理學會。臺中。386 頁。
2. 劉興隆、徐世典、曾國欽。2002。菊花扦插苗細菌性軟腐病之病原特性及影響病害發生之因子。植病會刊 11: 157-164。
3. 蘇秋竹、徐世典。1998。在臺灣由 *Pseudomonas syringae* 引起之楊桃細菌性葉斑病。植物病理學會刊 7: 216-217。
4. 蔡志濃、安寶貞、林俊義、吳雅芳、彭淑貞。2001。楊桃細菌性斑點病之發生、品種抗病性及藥劑防治。植物病理學會刊 10: 139-145。
5. 動植物防疫檢疫局。2014。梨接穗細菌性病害簡介。https://www.baphiq.gov.tw/view.php?catid=10275
6. Bolick, J. H. 1960. Bacterial bud blight of *Chrysanthemum*. Proc. Fla. State. Hortic. Soc. 73: 346-351.
7. Braun-Kiewnick, A., and Sands, D. C. 2001. Gram-negative bacteria: *Pseudomonas*, pp. 84-120. In: N. W. Schaad, J. B. Jones, and W. Chun [eds.], Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd ed. APS, St. Paul, MN, USA. 373 pp.
8. Burkholder, W. H., McFadden, L. A., and Dimock, A. W. 1953. A bacterial blight of *Chrysanthemums*. Phytopath. 43: 522-526.
9. Daughtrey, M. 1980. A bacterial disease of chrysanthemum (and geranium!). Bull. New York State Fl. Industr. 122: 1-2.
10. Felsenstein, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39: 783-791.
11. Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., and Grimont, P. A. D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 469-478.
12. Gardan, L., Shafif, H., and Grimont, P. A. D. 1997. DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria, pp. 445-448. In: K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, and J. Von Kietzell [eds.], *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Kluwer Academic, London, UK. 648 pp.
13. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.
14. Hirano, S. S., and Upper, C. D. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. Annu. Rev. Phyto-

- pathol. 28: 155-177.
15. Hopkins, D. L. 1991. Control of bacterial fruit blotch of watermelon with cupric hydroxide. *Phytopath.* 81: 1228.
  16. Kagiwata, T. 1990. Bacteriological characteristics of cucumber angular leaf spot pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *J. Agric. Sci.* 35: 116-128.
  17. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
  18. King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
  19. Kong, H., Blackwood, C., Buyer, J. S., Gulya, T. J., and Lydon, J. 2005. The genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on the 16S-23S ITS rDNA intergenic spacer regions. *Biol. Control.* 32: 356-362.
  20. Lin, Y. C., Hu, Y. M., Hsu, S. T., Tzeng, K. C., and Huang, H. C. 2006. Cloning and characterization of exchangeable effector locus of *Pseudomonas syringae* pv. *averrhooi*, a new pathogen on *Averrhoa carambola*. *Plant Pathol. Bull. (Taiwan)* 15: 139-152.
  21. McCarter, S. M., Jones, J. B., Gitaitis, R. D., and Smitley, D. R. 1983. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with *tomato* seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. *Phytopath.* 73: 1393-1398.
  22. Preston, G. 2000. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol. Plant Pathol.* 1: 263-275.
  23. Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. W., and Panopoulos, N. J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Mol. Plant Pathol.* 83: 964-970.
  24. Satiou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining methods: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
  25. Sawada, H., Takeuchi, T., and Matsuda, I. 1997. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 282-288.
  26. Schaad, N. W. 1982. Detection of seed-borne bacterial plant pathogens. *Plant Dis.* 66: 885-890.
  27. Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria,

- 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 398 pp.
28. Shila, S. J., Islam, M. R., Ahmed, N. N., Dastogeer, K. M. G., and Meah, M. B. 2013. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* associated with the seeds of cucurbits. *Uni. J. Agric. Res.* 1: 1-8.
  29. Stapp, C. 1934. Eine bakteriose an chrysanthemun. *Zentbl. Baket. II Abt.* 90: 320-329.
  30. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
  31. Welles, C. G., and Roldan, E. F. 1923. Another economic host of *Bacterium solanacearum*. *Phytopath.* 13: 488-491.

# Bacterial Leaf Spots on *Chrysanthemum coronarium* Caused by *Pseudomonas syringae*

Che-Ming Chang<sup>1</sup>, Chiou-Chu Su<sup>1\*</sup>

## Abstract

Chang, C. M., and Su, C. C. 2016. Bacterial leaf spots on *Chrysanthemum coronarium* caused by *Pseudomonas syringae*. Taiwan Pestic. Sci. 1: 127-142.

In February 2011, *Chrysanthemum coronarium* leaves with necrotic spot symptoms were collected from Xiluo Township, Yunlin County in Taiwan. Symptoms began as small water soaked lesions on the leaf and gradually expanded to become irregular brown spots. A G(-) bacterial pathogen was isolated from infected leaf tissue. This pathogen was a rod shaped bacteria that possessed many polar flagella. It was able to induce hypersensitive reactions in tobacco, produce levan, and utilize sucrose and sorbitol as carbon sources. Using physiological and biochemical analyses, Biolog identification, PCR analysis, and 16S-23S ITS rDNA sequence analysis, we identified the pathogen as *Pseudomonas syringae*. Pathogenicity was verified by Koch's postulates. The 16S-23S ITS rDNA sequences of the tested strains were 99.5 ~ 100% identical to the ITS sequences of *P. syringae* pv. *antirrhini*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *maculicola*, and *P. syringae* pv. *lachrymans*. We constructed a phylogenetic tree using the neighbor joining method and determined that the tested strains were clustered with genomospecies 3 classified by Gardan. We then investigated the ability of 9 agrochemicals to control this pathogen by disc diffusion assays, and found that Streptomycin + Tetracycline, Streptomycin, Thiophanate methyl + Streptomycin, Kasugamycin, Copper hydroxid, and Oxolinic acid had inhibitory activities against the pathogen.

**Key words:** *Pseudomonas syringae*, bacterial leaf spot, *Chrysanthemum coronarium*.

---

Accepted: September 12, 2016.

\* Corresponding author, Email: auba@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung.