

## *Pseudomonas cichorii* 引起之番茄細菌性葉斑病

蔡佳欣<sup>1,\*</sup> 安寶貞<sup>2</sup> 呂昫陞<sup>1</sup> 陳美德<sup>3</sup> 黃淑苓<sup>3</sup> 彭玉花<sup>3</sup>

### 摘要

蔡佳欣、安寶貞、呂昫陞、陳美德、黃淑苓、彭玉花。2014。 *Pseudomonas cichorii* 引起之番茄細菌性葉斑病。台灣農業研究 63(2):143–150。

南投縣與花蓮縣部分番茄栽植田於 2010–2011 年期間，發現植株葉片出現墨綠至暗褐色之不規則形或圓形壞疽之水浸狀斑點病徵，經由病組織分離出一種病原細菌，該細菌可誘導萬國士煙草產生過敏性反應。繼將該細菌接種至番茄葉片，可產生相同病徵，完成柯霍氏法則測試。此病原細菌經生理生化測試、Biolog 鑑定系統分析、16S rDNA 序列比對，並以專一性引子對 *SfL1/SfR2* 進行 PCR 增幅鑑定，確認此病原細菌為 *Pseudomonas cichorii*。此為 *P. cichorii* 感染番茄葉片在台灣的首次報導。以濾紙圓盤擴散法測試 10 種市售藥劑對該病原菌的抑制圈大小，結果顯示以鏈四環黴素之抑制效果最佳。

**關鍵詞：**番茄、細菌性葉斑病、細菌性葉斑病菌、藥劑篩選。

### 前言

番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 屬於茄科 (Solanaceae) 茄屬 (*Solanum*)，是世界性的重要蔬菜之一，品種繁多。番茄於台灣栽種面積達 4,500 ha，每公頃收穫量約為 24,750 kg，其中以嘉義縣種植面積最大 (Anonymous 2013)。在台灣有頗多危害番茄的病害，包括疫病、晚疫病、早疫病、萎凋病、白粉病、青枯病、細菌性軟腐病、細菌性斑點病及病毒病等 (Hsu *et al.* 2002)。自 2010 年起南投縣與花蓮縣地區番茄栽植田，部分田區的植株於定植 1–2 個月後之生長期，葉片出現不尋常的病徵，病株葉片出現墨綠至暗褐色之不規則形或圓形之水浸狀斑點病徵，葉片病害嚴重田區之發病比率達 30% 以上。其墨綠色之水浸狀病斑與常見之細菌性斑點病徵有所差異，嚴重發病株整葉褐化壞疽。由病葉切取病斑於光學顯微鏡下鏡檢，可見細菌自切口大量湧出，推測可能為細菌性所引起結果。

由於此一病害已分別發現於不同縣市，為避免造成大量經濟損失，本研究主要目的即在對此病之病因及病原菌特性進行探討，同時於室內篩選合適防治藥劑，以供番茄栽培及病害防治參考。

### 材料與方法

#### 菌株來源

本試驗於南投縣與花蓮縣之番茄發病田區採集具墨綠至暗褐色病斑之葉片 (圖 1)，切取葉部組織後以 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 進行表面漂洗 30 s 消毒，再以無菌水漂洗 3 次後，將組織置入無菌水震盪均勻，以移植環沾取懸浮液劃線塗於 NA (Nutrient agar) (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, France) 培養基平板上。置於 30°C 生長箱培養 2–3 d 後，挑取單一菌落至新的 NA 培養基平板，重複 3 次以純化細菌。

投稿日期：2013 年 12 月 26 日；接受日期：2014 年 3 月 25 日。

\* 通訊作者：tsaich@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。



圖 1. 田間番茄細菌性葉斑病之病徵。葉片出現墨綠色-深褐色病斑，部分病斑融合成面積斑塊。

**Fig. 1.** Symptoms of bacterial leaf spot of tomato in the field. The leaves showed dark green-dark brown spot and some leaf spots coalesced to blotches.

### 菸草過敏性反應

將分離自番茄病葉之細菌菌株分別培養於 NA 培養基平板，於 30°C 培養 1 d 以後，懸浮細菌於無菌水中，以分光光譜儀 (Spectrophotometer, spectronic 70, Bausch & Lomb) 調整懸浮液濃度至吸收值 ( $A_{600}$ ) 為 0.3 (約  $10^8$  cfu  $mL^{-1}$ ) 作為接種源，以注射接種法接種細菌於「萬國土」菸草 (*Nicotiana tabacum* cv. Vam-Hicks.) 葉片內，於室溫觀察葉片有無過敏性反應，將可以引起葉片壞疽反應之菌株以 TIs 編號。

### 病原性試驗

接種試驗以株高約 25 cm 之普遍栽植的番茄栽培品種「嬌女」及「紅番」為供試植物，供試植物種植於盆口直徑 12 cm 之盆鉢，內含栽培介質 (泥炭土、珍珠石及蛭石比例 2:1:1)。選取南投縣細菌分離株 TIs01、TIs02 及花蓮縣細菌分離株 TIs03 及 TIs04 共 4 分離株為供試菌株，接種方法為先以金剛砂於葉片製造傷口後，以上述的方法製備  $10^8$  cfu  $mL^{-1}$  濃度之細菌懸浮液，以無動力噴灑法將細菌懸浮液噴灑至供試植物葉片，噴灑無菌水之處理作為對照組。接種後植株套上透明塑膠袋保濕 48 h，之後除去塑膠袋置 28°C 生長箱觀察，每 1 供試菌株接種 3 棵，並紀錄病徵發展情形，之後再

從接種之番茄罹病葉部組織分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

### Biolog Identification System 鑑定細菌

將上述供試菌株培養於 BUGTM Agar (每 1 L 水含 57 g Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., CA, USA) 培養基約 16–24 h，重複劃線培養於 BUGTM Agar，經 24 h 後，將細菌懸浮於 GN/GP-IF 緩衝液 (0.4% NaCl; 0.03% pluronic F-86; 0.01% gellan gum)，調整細菌懸浮液濃度至 63%T (Turbidity)，將懸浮液加入 Biolog GN2 反應盤 (Biolog Inc., CA, USA) 中，每孔加入 150  $\mu L$  懸浮液，置於 30°C 下培養 16–24 h 後以光譜儀測讀，所得資料經 Biolog GN 資料庫 (Biolog 6.01 版) 比對，以鑑定細菌種類。

### 細菌形態觀察與生理生化特性測定

將純培養於 NA 培養基 2 d 之供試菌株，加入少量無菌水，之後輕輕吸取少量菌液滴於蠟膜 (Parafilm, Bemis Co., WI, USA) 上，並加入等量 2% 錳酸染液 (pH 7.0)，之後將覆有 formvar 支持膜之銅網 (200 mesh) 覆蓋於菌液上 3 min 後，以濾紙吸取多餘染液。再將銅網置於真空乾燥器內，以真空抽氣幫浦抽乾水分後，以穿透式電子顯微鏡 (Hitachi-7000) 觀察細菌形態與鞭毛。生理生化特性的測定依 Schaad *et al.* (2001) 所編著之植物病原細菌鑑定實驗指南所述，進行革蘭氏染色 (Gram staining)、氧化/發酵試驗 (O/F test)、King's B 培養基上螢光色素的形成、YDC (Yeast extract-dextrose- $CaCO_3$ ) 培養基上之菌落型態、結晶紫果膠 (Crystal violet pectate) 培養基上果膠分解能力測定、40°C 下之生長能力、果聚糖 (Levan) 的生成、氧化酵素 (Oxidase test) 測定、馬鈴薯致腐測試 (Potato soft rot)、精氨酸二水解酶 (Arginine dihydrolase) 測定、明膠 (Gelatin) 液化能力測定，對 Mannitol、Cellobiose、Sorbitol、Sucrose、Trehalose 的利用能力，以鑑定其分類地位。

### 16S rDNA 定序

選取於 NA 培養之 TIs01 及 TIs03 菌株，

參考 Wang *et al.* (1993) 之簡易方法並略為修改，以滅菌牙籤沾取經純化後之單一菌落，放入 50  $\mu\text{L}$  之無菌水中懸浮，再加入 50  $\mu\text{L}$  之 0.4 N NaOH 靜置 10 min 後，再加入 1 M Tris-HCl 100  $\mu\text{L}$  混合均勻。取 20  $\mu\text{L}$  加入無菌水中稀釋 10 倍，再取 2.5  $\mu\text{L}$  為模版，再以細菌 16S rDNA universal primers f8-27/r1510 (Lipson & Schmidt 2004) 進行 PCR 增幅。增幅後之產物以 1.4% agarose 進行電泳分析後，將預期的 DNA 片段以 TOPO TA cloning Kit (Invitrogen Corporation, CA, USA) 進行選殖。所得之選殖株經增殖後抽取質體，再以 PCR 確認所選殖片段為預估長度後，委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行定序工作。

### 細菌單一菌落快速鑑定

以上述粹取核酸法抽取供試菌株核酸後，進一步以 *P. cichorii* 專一性引子對 SfL1/SfR2，配合 PCR 需求條件進行 (Hseu *et al.* 2006)，此引子對可對 *P. cichorii* 增幅出 379-bp 之 DNA 片段。PCR 反應在 20  $\mu\text{L}$  混合液中進行，分別加入 2  $\mu\text{L}$  之 10  $\times$  PCR buffer、0.5  $\mu\text{L}$  之 10 mM dNTP、0.8 units 之 *Taq* DNA polymerase 及各 0.5  $\mu\text{L}$  之 10  $\mu\text{M}$  SfL1 與 SfR2 引子對，於熱循環反應器 (GeneAmp PCR System 2400) 內進行，溫度循環條件為 94 $^{\circ}\text{C}$  進行 5 min、94 $^{\circ}\text{C}$  進行 1 min、5 $^{\circ}\text{C}$  30 s、72 $^{\circ}\text{C}$  30 s，共 30 cycles。再以 72 $^{\circ}\text{C}$  進行 10 min，最後將增幅產物以 1.4% agarose gel 進行電泳分析。

### 藥劑感受性測定

隨機選取 TIs04 細菌分離株，進行藥劑感受性試驗，以濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method) (Adaskaveg & Hine 1985) 於 NA 培養基測試供試菌株對不同藥劑於不同濃度之感受性。各菌株濃度為 10<sup>8</sup> cfu mL<sup>-1</sup>，分別取 0.1 mL 菌液混合於 6 mL 之水瓊脂 (Water agar) 中，再覆於 NA 平板上。將已稀釋成不同濃度的藥劑各 0.1 mL 滴入直徑 13 mm 之濾紙圓盤 (Whatman International Ltd.) 中，每皿 NA 培養基上放置 3 片含藥之濾紙圓盤，

並以滴入無菌水之濾紙圓盤為對照組。將含有濾紙圓盤的細菌培養皿，於 30 $^{\circ}\text{C}$  下培養 48 h 後，測量抑制圈大小，以測定藥效。供試藥劑種類包括 10 種市售藥劑，計有抗生素類之鏈四環黴素 (Streptomycin Tetracycline，商品名為枯萎寧，10.0% SP，全台公司)、鏈黴素 (Streptomycin，商品名為立農黴素，12.5% SL，立農公司)、嘉賜黴素 (Kasugamycin，商品名為菌友，2.0% WP，世大化工)；市售含銅類藥劑之鹼性氧氯化銅 (Copper oxychloride，商品名為新必利丹，70.0% WP，青山公司)、氫氧化銅 (Copper hydroxide，商品名為克菌多，53.8% WG，台灣杜邦公司)；三元硫酸銅 (Tribasic copper sulfate，商品名為果太保，27.12% SC，嘉濱貿易公司)；市售含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (Mancozeb，商品名為興農生-45，80.0% WP，興農公司)；市售混合類藥劑之嘉賜銅 (Kasugamycin + Copper oxychloride，商品名為加速黴素，81.3% WP，世大化工) 及多保鏈黴素 (Thiophanate methyl + Streptomycin，商品名為萬億黴素，68.8% WP，瑞芳化工)；市售其他類藥劑之歐索林酸 (Oxolinic acid，商品名為金星，20.0% WP，台灣住友公司)。供試藥劑有效成分濃度為 40、200 及 1,000 mg L<sup>-1</sup>，每處理 3 皿，並以滴入無菌水之濾紙圓盤為對照組。

## 結果

### 過敏性反應與病原性

將萬國士煙草以注射接種細菌懸浮液 24 h 後，葉片即出現壞疽之過敏性反應。於病原性測試之接種試驗中，供試菌株 TIs01-02 (分離自南投縣)，TIs03-04 (分離自花蓮縣)，以噴灑接種細菌懸浮液於供試嬌女及紅番番茄植株，4 供試菌株接種結果相同，於接種 24 h 後均可於葉部造成水浸狀之墨綠至深褐色之小斑點病徵，48 h 以後水浸狀斑點擴大，部分斑點融合成斑塊狀病斑 (圖 2)，與田間所見病徵相似。由所接種植株之病斑處可再分離出相同的細菌。接種無菌水之對照植株則無病徵出現。

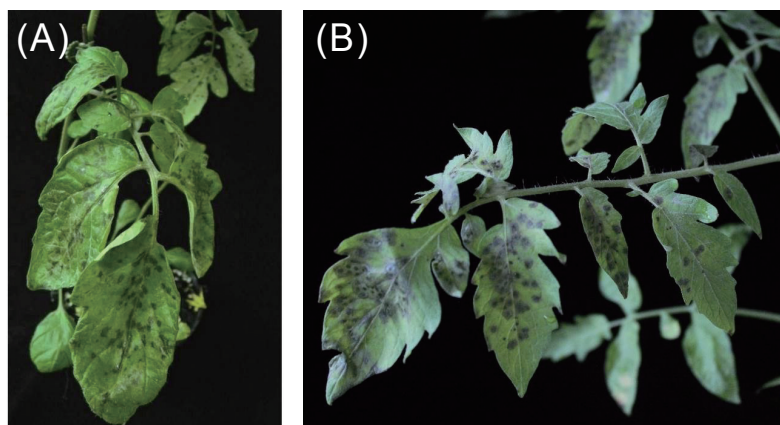


圖 2. 番茄人工機械接種分離到的細菌後呈現的病徵。(A)「嬌女」番茄與 (B)「紅番」番茄接種後均出現墨綠至褐色的水浸狀斑點。

Fig. 2. Symptom appearance of the tomato inoculated with the isolated bacteria. Two tomato cultivars (A) 'Jiao Nu' and (B) 'Hong Fan' showed dark green-dark brown water-soaking leaf spots after inoculation.

### 細菌形態與生理生化測定

經於電子顯微鏡下觀察供試菌株形態，為極生多根鞭毛之桿狀細菌。以革蘭氏染色結果，屬於革蘭氏陰性 (Gram negative)。以氧化方式利用葡萄糖在 NA 培養時，菌落為白色；在 King's B 培養基上，可產生螢光色素；在結晶紫果膠 (Crystal violet pectate; CVP) 培養基，不形成凹陷、不產生果聚醣 (Levan)，具氧化酶 (Oxidase) 而不具精氨酸二水解酶 (Arginine dihydrolase)，無法液化白明膠 (Gelatin)；在馬鈴薯組織塊上，不具致腐能力；又於 40°C 下不生長。可利用 Mannitol，不能利用 Cellobiose、Sorbitol、Sucrose 及 Trehalose (表 1)。

### Biolog system 鑑定結果

將供試菌株 Tls01-04 共 4 株，於 Biolog Identification System 分析 4 菌株對 95 種碳素源的利用情形，將試驗所得資料於 Biolog GN 資料庫 (Biolog 6.01 版) 比對顯示各供試菌株均屬於 *P. cichorii* (*syringae*)，相似值依序為 0.97、0.72、0.89 及 0.93。

### 16S rDNA 定序及鑑定

選取 Tls01 與 Tls04 供試菌株，以細菌 16S rDNA f8-27/r1510 引子對進行 PCR 增幅，

均可增幅出一約 1500-bp 之 DNA 片段。此 DNA 片段經選殖及定序後，菌株 Tls01 (NCBI Accession KJ567157) 與 Tls04 (NCBI Accession KJ567158) 於 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫分析比對，比對結果供試菌株均與 *Pseudomonas cichorii* MAFF211996 strain 及 PPST50936 strain (NCBI Accession Number: AB724282.1 及 JQ994483.1) 之 16S rDNA 序列相同度達 99% 以上。

### 專一性引子對鑑定單一菌落

為了進一步確認此分離菌株為 *P. cichorii*，挑取培養於 NA 培養基之單一菌落，以對 *P. cichorii* 具專一性之引子 Sfl1/SflR2 進行 PCR 反應，於電泳分析後，各供試菌株均可增幅出 *P. cichorii* 特異性之 379-bp DNA 片段，與對照菌株 *P. cichorii* (BCRC 編號 12682) 增幅的片段大小一致 (圖 3)。

### 藥劑感受性測定

以濾紙圓盤擴散法，於 NA 培養基上，測定番茄葉斑菌株 Tls04 對不同藥劑於不同濃度下之感受性。於 10 種藥劑在 3 種有效成份濃度 40、200、1,000 mg L<sup>-1</sup> 下，測試對該病菌生長之抑制效果，當藥劑有效成份濃度僅 40

表 1. 番茄細菌性葉斑病菌之生理生化分析。

Table 1. Physiological and biochemical analysis on tomato bacterial leaf spot pathogen.

Character	Strains from tomato	<i>P. cichorii</i> <sup>z</sup>	<i>P. syringae</i>
Gram reaction	G (-) <sup>y</sup>	G (-)	G (-)
O/F test <sup>y</sup>	O	O	O
Fluorescent pigment on KB	+	+	+
Diffusible non-fluorescent pigment on KB	-	-	-
Levan	-	-	+
Oxidase	+	+	-
Pectolytic Activity	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	V
Colonies yellow on YDC	-	-	-
Colonies mucoid on YDC at 30°C	-	-	-
Growth at 40°C	-	-	-
Utilization of:			
Mannitol	+	+	V
Cellobiose	-	-	-
Sorbitol	-	-	+
Sucrose	-	-	+
Trehalose	-	-	-
Tobacco HR	+	+	+

<sup>z</sup> Data are from Schaad *et al.* 2001.

<sup>y</sup> G (-), Gram negative; O, oxidative; F, fermentation; +, positive; -, negative; v, 21-79% positive.

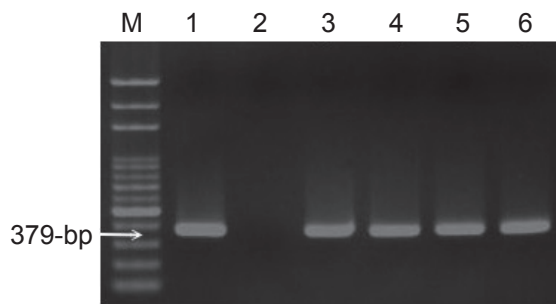


圖 3. 以引子對 SfL1/SfL2 配合 PCR 技術鑑定番茄細菌性葉斑病菌。M 為 100-bp Marker，1 為 *Pseudomonas cichorii* (BCRC 編號 12682)，2 為無菌水之負對照，3-6 為葉斑病菌 TIs01-04。

Fig. 3. Specific amplification of tomato leaf spot pathogen by polymerase chain reaction with specific primer pairs SfL1/SfL2. Lane M, 100-bp DNA marker; lane 1, DNA from *Pseudomonas cichorii* (BCRC number 12682); lane 2, ddH<sub>2</sub>O for negative control; and lanes 3-6, DNA from tomato leaf spot pathogen.

mg L<sup>-1</sup>，鏈四環黴素及鏈黴素即產生抑制圈，抑制圈半徑 3.30-5.17 mm；當藥劑有效成份濃度為 200 mg L<sup>-1</sup>，包含上述 2 種藥劑，嘉賜黴素、多保鏈黴素及歐索林酸亦出現抑制圈，

半徑 1.27-9.77 mm；濃度為 1,000 mg L<sup>-1</sup> 時，出現抑制圈之藥劑種類仍維持為鏈四環黴素、鏈黴素、嘉賜黴素、多保鏈黴素及歐索林酸，半徑 3.23-15.10 mm。其餘藥劑包括鹼性氯氧

化銅、氫氧化銅、三元硫酸銅、嘉賜銅、鋅錳乃浦，則均對供試菌株無抑制效果 (表 2)。

## 討論

2010–2011 年時於南投縣與花蓮縣等番茄栽培區，發現部分番茄葉片出現墨綠–深褐色之圓形或不規則形斑點，經病原菌分離及接種試驗確認此問題為細菌所引起。此病原菌經測試為革蘭氏陰性，菌體為桿狀具極生數根鞭毛；屬好氧性細菌，於 YDC (yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>) 平板培養時，菌落為白色，不具黏稠狀；培養在 King's B 平板時會產生螢光色素；於 40°C 不生長，由這些特性比對 Schaad (2001) 所述資料，顯示此細菌屬於 *Pseudomonas* 屬。以 Biolog 鑑定系統測試供試 4 株番茄葉斑細菌結果為 *Pseudomonas cichorii* (*syringae*) 相似度在 07–1.0 之間，顯示此病菌可能為 *Pseudomonas cichorii* 或 *Pseudomonas syringae*。依 Schaad *et al.* (2001) 之細菌鑑定資料，上述 2 種細菌可由其他生理生化特性加以區分，因此進一步測試供試菌株之生理生化特性發現該病菌具有氧化酶作用、不產生果聚醣、不利用 Sorbitol 及 Sucrose 之特性與 *P. cichorii* 相同但與 *P. syringae* 不同 (表

1)，因此該菌應與 *P. cichorii* 較為接近。又於分子鑑定上，16S rDNA 序列與 *P. cichorii* 相似度達 99% 以上，應用 *P. cichorii* 專一性引子 SflL1/SfR2 測試供試細菌時，可增幅出特異性之 379-bp 片段，因此依據上述資料鑑定該菌為 *P. cichorii*。

*P. cichorii* 又稱為菊苣假單胞菌，最早在菊苣 (Chicory) 上發現 (Swingle 1925)，該病菌寄生範圍廣泛，可危害多種蔬菜作物及觀賞植物，如芹菜 (Celery) (Wilk & Dye 1974)、番茄 (Tomato) (Wilk & Dye 1974)、萵苣 (Lettuce) (Grogan *et al.* 1977)、甘藍 (Cabbage) (Smith & Ramsey 1956)、菊花 (Chrysanthemum) (Jones *et al.* 1983)、天竺葵 (Geranium) (Engelhard *et al.* 1983)、木蘭花 (Magnolia) (Mullen & Cobb 1984)、鵝掌藤 (Dwarf schefflera) (Chase & Brunk 1984) 等。此菌於台灣曾在 1988 年被發現引起芹菜葉斑病 (Su 1988)，之後此病菌陸續被報導可造成向日葵細菌性葉斑病 (Hseu *et al.* 2005) 及萵苣細菌性葉腐病 (Hseu *et al.* 2009) 等病害，但未見於番茄作物。因此，本篇報告為番茄可被 *P. cichorii* 感染在台灣之首次紀錄，並依據其所造成之葉斑病徵將此病稱之為番茄細菌性葉斑病 (bacterial leaf spot)。

表 2. 供試藥劑在不同濃度對番茄葉斑菌株 Tls04 之生長抑制效果。

**Table 2.** Growth inhibition of *Pseudomonas cichorii* Tls04 by various agrochemicals in different concentrations.

Chemical	Inhibition zone (mm in diam.)		
	40 mg L <sup>-1</sup>	200 mg L <sup>-1</sup>	1,000 mg L <sup>-1</sup>
Streptomycin + Tetracycline (10% SP)	5.17 ± 0.03 a <sup>z</sup>	9.77 ± 0.15 a	15.10 ± 0.10 a
Streptomycin (12.5% SL)	3.30 ± 0.25 b	6.67 ± 0.18 b	9.57 ± 0.23 b
Kasugamycin (2.0% WP)	0 c	4.20 ± 0.12 c	9.23 ± 0.14 c
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8% WP)	0 c	2.43 ± 0.19 d	5.43 ± 0.07 d
Oxolinic (20% WP)	0 c	1.27 ± 0.03 e	3.23 ± 0.09 e
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3% WP)	0 c	0 f	0 f
Copper hydroxide (77.0% WP)	0 c	0 f	0 f
Tribasic copper sulfate (27.12% SC)	0 c	0 f	0 f
Copper oxychloride (85.0% WP)	0 c	0 f	0 f
Mancozeb (80.0% WP)	0 c	0 f	0 f
LSD <sub>0.05</sub>	0.24	0.30	0.29

<sup>z</sup> Mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

依本次接種試驗顯示，此病菌可經由菌液噴灑植株葉片，經由金剛砂製造的微小傷口感染番茄植株，故可推測此病於田間可能經由風沙造成葉片傷口後，病菌經雨水或噴灑澆灌飛濺至健康葉片從傷口入侵。因此，防治上應注意風大區域的防風措施，以減少風沙造成葉片傷口，及避免以灌溉噴灑方式以減少感染。在藥劑防治上，以花蓮縣分離株 T1s04 於室內篩選可抑制病菌生長的藥劑，發現全部 10 種供試藥劑中以抗生素類藥劑之鏈四環黴素抑制細菌生長之抑制圈顯著最大 ( $P < 0.05$ )、鏈黴素次之、嘉賜黴素再次之，然而於 3 種含銅類藥劑包括氫氧化銅、三元硫酸銅及鹼性氫氧化銅等藥劑於所測試的 3 種濃度均無法抑制此菌的生長，顯示田間已存在對銅劑具高忍受度菌株。此結果與南投縣分離株之測試結果無明顯差異 (資料未列出)，因此應避免含銅類藥劑在田間頻繁施用，以防止抗藥性問題。

## 引用文獻

- Adaskaveg, J. E. and R. B. Hine. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strain of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 69:993–996.
- Anonymous. 2013. 2012 Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan. Taipei. 348 pp. (in Chinese)
- Chase, A. R. and D. D. Brunk. 1984. Bacterial leaf blight incited by *Pseudomonas cichorii* in *Schefflera arboricola* and some related plants. *Plant Dis.* 68:73–74.
- Engelhard, A. W., H. C. Mellinger, R. C. Ploetz, and J. W. Miller. 1983. A leaf spot florist's geranium incited by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.* 67:541–544.
- Grogan, R. G., I. J. Misaghi, K. A. Kimble, A. S. Greathead, D. Ririe, and R. Bardin. 1977. Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. *Phytopathology* 67:957–960.
- Hseu, S. H., W. C. Lai, and C. Y. Lin. 2009. Identification of the causal agent of lettuce bacterial midrib rot and resistance screening of lettuce cultivars. *Plant Pathol. Bull.* 18:101–110.
- Hseu, S. H., H. Shentue, and C. Y. Lin. 2006. Development of specific PCR primers for identification of *Pseudomonas cichorii*. *Plant Pathol. Bull.* 15:275–285.
- Hseu, S. H., S. C. Shih, P. F. Ding, and C. Y. Lin. 2005. Characterization of sunflower bacterial leaf spot and its bacteriocide screening. *Plant Pathol. Bull.* 13:329–334.
- Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsai. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan, 4th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung. 386 pp. (in Chinese)
- Jones, J. B., A. W. Engelhard, and B. C. Raju. 1983. Outbreak of a stem necrosis on chrysanthemum incited by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.* 67:431–433.
- Lipson, D. A. and S. K. Schmidt. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2867–2879.
- Mullen, J. M. and G. S. Cobb. 1984. Leaf spot of southern magnolia caused by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.* 68:1013–1015.
- Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. Ed. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd ed. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 373 pp.
- Smith, M. A. and G. B. Ramsey. 1956. Bacterial zonate spot of cabbage. *Phytopathology* 46:210–213.
- Su, C. C. 1988. Studies on Bacterial Leaf Spot of Celery. Master thesis. Graduate Institute of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung. 54 pp. (in Chinese)
- Swingle, D. B. 1925. Center rot of "French Endive" or wilt of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Phytopathology* 15:730.
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153–4154.
- Wilk, J. D. and D. W. Dye 1974. *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. *N. Z. J. Agric. Res.* 17:123–130.

## Occurrence of Bacterial Leaf Spot of Tomato Caused by *Pseudomonas cichorii* in Taiwan

Chia-Hsin Tsai<sup>1,\*</sup>, Pao-Jen Ann<sup>2</sup>, Yun-Sheng Lu<sup>1</sup>, Mei-De Chen<sup>3</sup>, Shu-Ling Hwang<sup>3</sup>, and Yu-Hua Peng<sup>3</sup>

### Abstract

Tsai, C. H., P. J. Ann, Y. S. Lu, M. D. Chen, S. L. Hwang, and Y. H. Peng. 2014. Occurrence of bacterial leaf spot of tomato caused by *Pseudomonas cichorii* in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 63(2):143–150.

During 2010–2011 an unknown disease of tomato was found in Nantou and Hualien counties. Dark green to dark brown irregular or round spots were observed on the diseased leaves. The bacteria isolated from the infected tissues can induce tobacco hypersensitive reaction and their pathogenicity was verified by Koch's postulates. The pathogen was further identified as *Pseudomonas cichorii* based on physiological and biochemical tests, Biolog identification, 16S rDNA sequence analysis, and specific primers Sf1/SfR2 following polymerase chain reaction. This is the first report of *P. cichorii*-elicited tomato bacterial leaf spot disease in Taiwan. Among the tested agrochemicals, the mixture of streptomycin and tetracycline has the highest efficacy in inhibiting bacterial growth.

**Key words:** Tomato, Bacterial leaf spot, *Pseudomonas cichorii*, Agrochemical screening.

---

Received: December 26, 2013; Accepted: March 25, 2014.

\* Corresponding author, e-mail: tsaich@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.