

## *Pseudomonas viridiflava* 引起之番茄髓壞疽病

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> 洪挺軒<sup>4,\*</sup>

### 摘要

蔡佳欣、安寶貞、呂昫陞、陳美德、黃淑苓、洪挺軒。2016。 *Pseudomonas viridiflava* 引起之番茄髓壞疽病。台灣農業研究 65(3):269–277。

2011年於南投縣與花蓮縣地區少數番茄栽植田，發現部分植株出現生長緩慢及衰弱情形，病株莖部表面出現暗褐色塊狀病斑，縱切莖部發現其髓部組織出現褐色壞疽，病勢嚴重時整株萎凋。從罹病莖部壞疽組織分離純化出1種病原細菌，該細菌經接種番茄植株證實可引起相同病徵，並完成科霍氏法則，確認該細菌所引起。該細菌經生理生化特性、Biolog系統測試及16S rDNA序列分析，鑑定出此細菌為 *Pseudomonas viridiflava*，此為 *P. viridiflava* 在台灣造成番茄細菌性髓壞疽病之首次報導。以濾紙圓盤擴散法測試市售10種藥劑對該病原菌的抑制圈大小，結果顯示在3種有效測試濃度(ai)下對病原菌之抑制生長效果，以歐索林酸最佳。

**關鍵詞：**番茄、髓壞疽病、髓壞疽病菌、藥劑篩選。

### 前言

番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 為茄科 (Solanaceae) 茄屬 (*Solanum*)，為世界性的重要蔬菜之一，品種相當多樣。依行政院農業委員會之「農業統計年報」(Council of Agriculture 2013)，台灣於2012年栽種番茄面積達4,501 ha，每公頃收穫量約為24,751 kg，主要產區在中南部，其中以嘉義縣種植面積最大。2011年起在南投縣與花蓮縣等地區番茄栽植田，少數田區的植株出現異常的衰弱現象，病株生長緩慢、莖表面出現暗褐色塊狀病斑，其內部髓部組織褐化壞疽，果實發育遲緩及伴隨著落果現象。惟病害進程緩慢，罹病植株可維持數月不死亡，嚴重時發病株出現萎凋而影響果實品質及產量。將罹病番茄莖部之壞疽病組織於光學顯微鏡下觀察可見大量細菌自切口處泳出，因此推測可能為細菌所引起之病害。

由國內外文獻資料可知番茄的細菌性病害頗多，包括 *Ralstonia solanacearum* 引起之青枯病 (Hsu *et al.* 2002)，*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 引起之細菌性莖腐病 (Hseu *et al.* 2003)，*Xanthomonas* 屬病菌 (*Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*) 引起之細菌性斑點病 (Lue *et al.* 2010)，以及 *Pseudomonas* 屬病菌 (*Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas corrugata*) 引起之髓壞疽病 (Alippi *et al.* 2003; Aysan *et al.* 2004; Moura *et al.* 2005) 或細菌性葉斑病 (Tsai *et al.* 2014)。目前臺灣已被報導可感染番茄莖部並於維管束蔓延造成番茄植株萎凋之細菌性病害，有青枯病及細菌性莖腐病。因此，乃將田間罹病番茄莖部之壞疽組織，參考 Hseu *et al.* (2007) 及 Opina *et al.*

投稿日期：2014年9月2日；接受日期：2015年10月13日。

\* 通訊作者：thung@ntu.edu.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前研究員兼組長。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。

<sup>4</sup> 國立台灣大學植物病理與微生物學系教授。台灣 台北市。

al. (1997) 所述，以專一性引子進行番茄莖腐病及青枯病原細菌之 PCR 快速檢測。結果並未檢測出上述兩種病原細菌的感染，據此推測可能為其他的病原細菌所造成。

由於此病可造成番茄植株生長遲緩、易落果及嚴重時萎凋等各現象，若大量感染時將造成嚴重的經濟損失，因此本研究對此病之病因、病原菌特性及室內藥劑篩選進行探討，期以提供栽培及防治參考。

## 材料與方法

### 菌株來源

自南投縣與花蓮縣番茄發病田區採集具生長遲緩及莖部具褐化壞疽病徵之病株(圖 1)，切取罹病莖部病健部組織以 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗 30 s 進行表面消毒，再以 3 次無菌水漂洗後，將組織切碎置入無菌水中震盪，以釋出組織液。之後，用移植環沾取懸浮液，

以劃線平板方式塗於 NA (nutrient agar) (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, France) 培養基平板上，在 26°C 定溫箱培養 2–3 d。待細菌長出單一菌落後，將其挑取至新的 NA 培養基平板，重複 3 次以純化細菌。

### 病原性試驗

接種試驗以市售番茄栽培品種「紅番」之供試植物，供試植物株高約 45–60 cm，種植於盆口直徑約 12 cm 之盆鉢，以泥炭土、珍珠石及蛭石混合 (比例 2 : 1 : 1) 作為栽培介質。細菌菌株選取分離自南投縣之菌株 (編號為 TPN01 及 TPN02) 及分離自花蓮縣菌株 (編號 TPN03 及 TPN04)，合計共 4 分離株為供試菌株。接種原製備方法為，將供試細菌菌株培養於 NA 培養基平板，在 26°C 培養 1 d 以後，以無菌水將細菌配置為懸浮液，並以分光光譜儀 (spectrophotometer, Bausch & Lomb, Bridgewater, NJ) 調整細菌懸浮液濃度至吸收



圖 1. 田間番茄髓壞疽病之病徵。(A) 髓部組織出現褐色壞疽。(B) 嚴重感染時呈深褐色且空心化。

**Fig. 1.** Symptoms of pith necrosis of tomato in the field. The pith of stem shows brown discoloration (A) and collapse in severe infected plant (B).

值 (A600) 為 0.3 (約  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>) 作為接種原。接種方法為先置 1 滴  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> 濃度之細菌懸浮液在番茄莖部，之後以滅菌之針頭於該處刺 1 小孔供病菌感染，以相同方法接種無菌水作為對照組。接種後植株套上透明塑膠袋保濕 48 h，之後除去塑膠袋，將植株放置在 26°C 生長箱觀察，每 1 供試菌株接種 3 棵，並記錄病徵發展情形，之後再從接種番茄之罹病莖部組織分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

### Biolog Identification System 鑑定細菌

以 Biolog 鑑定系統對上述 4 供試菌株進行分析，將供試菌株培養於 5.7% BUG™ Agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., Hayward, CA) 培養基培養 16–24 h，重複劃線培養於 BUG™ Agar 16–24 h，之後以 GN/GP-IF 緩衝液 (0.4% NaCl; 0.03% pluronic F-86; 0.01% gellan gum) 將細菌懸浮，並以波長 590 nm 之濁度計 (Turbidimeter, Biolog Inc.)，調整細菌懸浮液濃度至 52% T (Turbidity)。再將細菌懸浮液接種至 Biolog GN2 反應盤 (Biolog Inc. Hayward, CA) 中，每孔接種 150 µL 細菌懸浮液。將反應盤置於 30°C 定溫箱培養 16–24 h，之後以光譜儀測讀，所得資料以 Biolog GN 資料庫 (Biolog 6.01 版) 比對分析，以鑑定該細菌種類。

### 生理生化特性測定

將 4 株供試菌株生理生化特性的測定結果，參考 Schaad *et al.* (2001) 所編著之「植物病原細菌鑑定實驗指南」進行下列生理生化測定，包括有革蘭氏反應 (Gram reaction)、對葡萄糖利用方式 (氧化/發酵試驗；O/F test)、在 King's B 培養基上產生螢光色素的測定、在結晶紫果膠 (crystal violet pectate) 培養基上測定果膠分解能力、在 YDC (yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>) 培養基上形成之菌落型態、37°C 下之生長能力、果聚糖 (levan) 的生成、氧化酵素 (oxidase test) 測定、馬鈴薯軟腐測試 (potato soft rot)、精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase) 測定、菸草過敏性反應 (tobacco hypersensitivity reaction) 測試、明膠 (gelatin) 液化能力測定，以及對 mannitol、cellobi-

ose、sorbitol、trehalose、sucrose、meso-tartrate、D(-)-tartrate、D-arabinose、D-aspartate 的利用能力，以鑑定供試菌株分類地位。

### 菌株分子鑑定

選取由南投縣分離之 TPN02 及花蓮縣分離之 TPN03 菌株，於 NA 培養基培養後，參考 Wang *et al.* (1993) 之簡易方法並略為修改後進行核酸萃取。以滅菌牙籤沾取經純化後之單一菌落，放入 20 µL 之無菌水中懸浮，再加入 20 µL 之 0.4 N NaOH 震盪均勻後靜置 10 min。再加入 1 M Tris-HCl 40 µL 混合均勻後，取 20 µL 以無菌水稀釋 10× 製備為模板。之後以細菌 16S rDNA 之通用引子對 f8-27/r1510 (Lipson & Schmidt 2004) 進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，PCR 增幅後之 DNA 產物以 1.4% agarose 進行電泳分析，確定是否產生預期之 DNA 片段。所得之 PCR 產物以 TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 進行 DNA 片段選殖，所得之選殖菌株經增殖後抽取質體，再以 PCR 及電泳分析確認選殖所得之片段為預估長度後，委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行定序後，再進行 DNA 序列比對。

### 藥劑感受性測定

選取 TPN02 細菌分離株，進行藥劑感受性試驗。供試藥劑種類包括 10 種市售藥劑，包括有抗生素類之鏈四環黴素 (streptomycin + tetracycline, 10.0% SP, 商品名為枯萎寧, 全台公司)、鏈黴素 (streptomycin, 12.5% SL, 商品名為保安素, 聯利公司)、嘉賜黴素 (kaugamycin, 2.0% WP, 商品名為菌友, 世大化工); 含銅類藥劑之氫氧化銅 (copper hydroxide, 53.8% WG, 商品名為克菌多, 台灣杜邦公司); 鹼性氫氧化銅 (copper oxychloride, 70.0% WP, 商品名為新必利丹, 青山公司); 三元硫酸銅 (tribasic copper sulfate, 27.12% SC, 商品名為果太保, 嘉濱貿易公司); 含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (mancozeb, 80.0% WP, 商品名為興農生-45, 興農公司); 混合類藥劑之多保鏈黴素 (thiophanate methyl + strepto-

mycin, 68.8% WP, 商品名為克腐, 大勝化工); 嘉賜銅 (kasugamycin + copper oxychloride, 81.3% WP, 商品名為加速黴素, 世大化工) 及其他類藥劑之歐索林酸 (oxolinic acid, 20.0% WP, 商品名為金星, 台灣住友公司)。供試藥劑濃度參考一般農友使用濃度調整設定為有效成分 40、200 及 1,000 mg L<sup>-1</sup>。

測試方法以濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method) (Adaskaveg & Hine 1985), 測試供試菌株對上述 10 種藥劑在不同濃度之感受性。方法如下, 製備細菌懸浮液並調整濃度約為 10<sup>8</sup> cfu mL<sup>-1</sup>, 取 0.1 mL 細菌懸浮液加入 6 mL 之水瓊脂 (Water agar) 中混合均勻, 再將其覆於 NA 培養基平板上。將已稀釋成不同濃度的藥劑各 0.14 mL 滴入直徑 13 mm 之濾紙圓盤 (Whatman International Ltd.) 中, 再將含藥之濾紙圓盤放在已經覆上含細菌水瓊脂之 NA 培養基平板上, 並以滴入無菌水之濾紙圓盤作為對照組, 每處理 3 重複。之後將各處理的培養基平板, 放置在 26°C 下定溫箱培養 48 h 後, 測量抑制圈大小, 以測定藥效。

## 結果

### 病原性試驗

將 4 株供試菌株 TPN01 與 TPN02 (分離自南投縣) 及 TPN03 與 TPN04 (分離自花蓮縣), 以穿刺法接種細菌懸浮液於供試紅番茄植株莖部 3 wk 後, 將接種之莖部縱切觀察。發現莖內髓部組織呈現褐色壞疽病徵, 並從接種處沿維管束蔓延 (圖 2)。持續觀察所接種番茄植株生長緩慢, 2–3 mo 後陸續開始出現萎凋現象, 病程進展緩慢, 與田間所見相同。從接種植株發病蔓延之壞疽病組織處, 可再分離出細菌, 該細菌經 Biolog 鑑定系統與生理生化特性分析結果與原接種細菌特性相同, 接種無菌水之對照植株則無病徵出現。

### 生理生化測定

供試菌株 TPN01、TPN02、TPN03 及 TPN04, 生理生化特性測定結果 4 細菌菌株均為革蘭氏陰性 (Gram negative)。以氧化方式利用葡萄糖在 NA 培養時, 菌落為淡金褐色; 培養在 King's B 時會產生螢光色素; 培養於 YDC



圖 2. 番茄人工接種分離到的細菌後呈現的病徵。(A) 「紅番」番茄接種 3 wk 後出現髓部壞疽的病徵；(B) 髓壞疽病徵放大圖。

**Fig. 2.** Symptom appearance of the tomato inoculated with the isolated bacteria. (A) 'Hong Fan' cultivar showed pith necrosis symptom in 3 weeks after inoculation; (B) Close-up of the pith necrosis symptom.

培養基不產生黏稠狀菌落；培養於結晶紫果膠 (crystal violet pectate; CVP) 平板上時形成凹陷。又菌株不產生果聚糖 (levan)，不具氧化酶 (oxidase)；不具精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase)。當接種在馬鈴薯組織塊可使其軟腐，注射接種菸草葉片可誘導產生過敏性反應 (tobacco hypersensitivity)。此外，可液化白明膠 (gelatin)，於 37°C 下不生長。可利用 mannitol、sorbitol、meso-tartrate、D(-)-tartrate，不能利用 cellobiose、trehalose、sucrose、D-arabinose 及 D-aspartate，如表 1 所示。

### Biolog system 鑑定結果

將供試菌株 TPN01-04 共 4 株，以 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，結果顯示各供試菌株均屬於 *P. viridiflava (syringae)*，相似值依序為 0.768、0.879、0.787 及 0.907。

### 分子鑑定結果

選取分離自南投縣之供試菌株 TPN02 與花蓮縣之供試菌株 TPN03，以細菌 16S rDNA 通用引子對 f8-27/r1510 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，菌株核酸序列 TPN02 (NCBI Accession KM357829) 及 TPN03 (NCBI Accession KM357829) 經 NCBI (National Center for Biotechnology Informa-

表 1. 番茄髓壞疽病菌之生理生化分析。

**Table 1.** Physiological and biochemical analysis on tomato pith necrosis pathogen.

Character	Strain from tomato	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> <sup>z</sup>
Gram reaction	G (-) <sup>y</sup>	G (-)	G (-)
O/F <sup>y</sup> test	O	O	O
Fluorescent pigment on KB	+	+	+
Levan	-	-	+
Oxidase	-	-	-
Pectolytic activity	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Tobacco hypersensitivity reaction	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	V
Colonies yellow on YDC	-	-	-
Colonies mucoid on YDC at 30°C	-	-	-
Growth at 37°C	-	-	-
Utilization of:			
Mannitol	+	+	V
Cellobiose	-	-	-
Sorbitol	+	+	+
Trehalose	-	-	-
Sucrose	-	-	+
Meso-tartrate	+	+	+
D(-)-tartrate	+	+	-
D-arabinose	-	-	-
D-aspartate	-	-	-

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

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

tion) 基因資料庫分析比對，比對結果 2 供試菌株均與 *Pseudomonas viridiflava* strain RM207.1a 及 KNOX249.1b (NCBI Accession Number:AY604845.1 及 AY604848.1) 之 16S rDNA 序列相同度達 99% 以上。

### 藥劑感受性測定

以濾紙圓盤擴散法，於 NA 培養基上，測定番茄髓壞疽菌株 TPN02 對不同藥劑在不同濃度下之感受性。10 種市售藥劑在 3 種有效成分濃度 40、200、1,000 mg L<sup>-1</sup> 下，測試對該病菌生長之抑制效果。當藥劑有效成分濃度僅 40 mg L<sup>-1</sup>，歐索林酸即產生抑制圈，抑制圈半徑 5.37 mm；當藥劑有效成分濃度為 200 mg L<sup>-1</sup>，包含上述歐索林酸，鏈四環黴素亦出現抑制圈，半徑 8.83–2.80 mm；濃度為 1,000 mg L<sup>-1</sup> 時，出現抑制圈之藥劑種類共計 3 種，為歐索林酸、鏈四環黴素及鏈黴素，半徑 1.87–10.20 mm。其餘 7 種藥劑包括嘉賜黴素、多保鏈黴素、嘉賜銅、鹼性氯氧化銅、氫氧化銅、三元硫酸銅及鋅錳乃浦，則均對供試菌株無抑制效果，各供試藥劑濃度於 NA 培養基形成之抑制圈直徑 (已扣除濾紙之大小) 如表 2 所示。

表 2. 供試藥劑在不同濃度對番茄髓壞疽菌株 TPN02 之生長抑制效果。

**Table 2.** Growth inhibition of *Pseudomonas viridiflava* TPN02 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>
Oxolinic (20% WP)	5.37 ± 0.30 a <sup>z</sup>	8.83 ± 0.18 a	10.20 ± 0.23 a
Streptomycin + Tetracycline (10% SP)	0 b	2.80 ± 0.06 b	5.83 ± 0.03 b
Streptomycin (12.5% SL)	0 b	0 c	1.87 ± 0.18 c
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8% WP)	0 b	0 c	0 d
Kasugamycin (2.0% WP)	0 b	0 c	0 d
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3% WP)	0 b	0 c	0 d
Copper hydroxide (77.0% WP)	0 b	0 c	0 d
Copper oxychloride (85.0% WP)	0 b	0 c	0 d
Tribasic copper sulfate (27.12% SC)	0 b	0 c	0 d
Mancozeb (80.0% WP)	0 b	0 c	0 d
LSD	0.08	0.17	0.27

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

## 討論

2011 年在南投縣與花蓮縣番茄栽培區，發現番茄植株出現生長緩慢，莖部外表具暗褐色病斑，莖內髓部呈現壞疽病徵，且病勢嚴重時萎凋等現象之病株。此病害經病原菌分離及接種試驗確認，此問題為細菌所引起。該病原細菌續經測試為革蘭氏陰性；屬好氣性細菌，於 YDC (yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>) 平板培養時，菌落非黃色，不具黏稠狀；培養在 King's B 平板時會產生螢光色素；於 37°C 不生長。將這些特性比對 Schaad *et al.* (2001) 所述資料，顯示該細菌屬於 *Pseudomonas* 屬。以 Biolog 鑑定系統測試 4 供試菌株，結果為 *Pseudomonas viridiflava* (*syringae*) 相似度在 0.768–0.907 之間，顯示此病菌可能為 *Pseudomonas viridiflava* 或 *Pseudomonas syringae*。依 Schaad 等之細菌鑑定資料，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。發現該病菌可使馬鈴薯軟腐 (potato rot)，具果膠分解能力 (pectolytic activity)，不產生果聚糖 (levan)，可利用 D (-)-tartrate 之特性，而且與 *P. viridiflava* 相同但與 *P. syringae* 不同 (如表 1)，因此該菌與 *P. viridiflava* 較接近。此外，Lel-

liot *et al.* (1966) 以 LOPAT (Levan-Oxidase-Potato rot-Arginine dihydrolase-Tobacco hypersensitivity) 測試法，將 *Pseudomonas* 屬細菌區分為 5 群，*P. syringae* 歸屬於第 1 群，*P. viridiflava* 歸屬於第 2 群，由本研究所分離之菌株測試結果為不產生果聚糖；不具氧化酶 (oxidase)；具有馬鈴薯軟腐能力；不具精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase)；可誘導菸草產生過敏性反應 (tobacco hypersensitivity) 的特性 (如表 1)，亦顯示所分離之病原細菌與 *P. viridiflava* 的特性相同，屬於 LOPAT 第 2 群，而與 *P. syringae* 不同 (LOPAT 第 1 群)。在分子鑑定上，分析供試菌株之 16S rDNA 序列與 *P. viridiflava* 相似度達 99% 以上。因此，綜合上述資料鑑定該菌為 *P. viridiflava*。在接種試驗，該菌可經由莖部傷口進入髓部感染及蔓延，造成髓壞疽病徵，證實具病原性，並可回分出相同病菌，完成科霍氏法則，確認該菌為病原菌。

*P. viridiflava* 寄主範圍廣泛，分布世界各地，可危害多種作物，如番茄 (tomato) (Alippi *et al.* 2003)、苜蓿 (alfalfa) (Heydari *et al.* 2014)、豌豆 (pea) (Martin-Sanz *et al.* 2010)、甜瓜 (melon) (Aysan *et al.* 2003)、蘋果 (apple) (Alimi *et al.* 2011)、羅勒 (basil) (Végh *et al.* 2012)、蘿蔔 (radish) (Shakya & Vinther 1989)、萵苣 (lettuce) (Ibrahim & Molan 2009) 等。該菌在國內尚未有危害番茄的報導，此為 *P. viridiflava* 感染番茄在台灣之首次紀錄。

由國外文獻可知，*Pseudomonas* 屬之多種病原菌 (*P. cichorii*、*P. corrugata*、*P. viridiflava*、*P. fluorescens* 及 *P. mediterranea*) 可造成番茄莖壞疽 (stem necrosis) 或髓壞疽 (pith necrosis) (Alippi *et al.* 2003; Aysan *et al.* 2004; Moura *et al.* 2005)，其中亦包括 *P. viridiflava*。本文依田間番茄病株與接種試驗之病株均具髓部壞疽之特殊病徵，與國外文獻描述相同 (Saygili *et al.* 2004)，因此將此病稱之為番茄髓壞疽病 (pith necrosis)。

依本次接種試驗顯示，此病菌可經由莖部小傷口感染番茄植株，因此病菌於田間，可能經植株修剪傷口入侵莖部感染。另外，國外研

究指出，該病菌可殘存在番茄植株殘體、土壤、種子 (Yildiz *et al.* 2004) 及雜草 (Mariano & McCarter 1993)，因此於防治上應注意修剪工具的消毒、修剪後傷口的保護、及時清除病株、選擇非發病田種植、種子消毒及控制雜草。

在藥劑防治上，於室內篩選可抑制該病原細菌生長的藥劑，以供將來田間防治或種子消毒參考。試驗發現，全部 10 種供試藥劑中以歐索林酸抑制細菌生長之抑制圈顯著最大 ( $P < 0.05$ )，抗生素類藥劑之鏈四環黴素次之、鏈黴素再次之，然而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。由此顯示，田間存在對銅劑耐受度高之菌株，因此在田間應避免含銅類藥劑頻繁施用，以防止抗藥性問題的產生。

## 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.
- Alimi, M., H. Rahimian, N. Hassanzadeh, M. T. Darzi, A. Ahmadikhah, A. Heydari, and G. M. Balestra. 2011. First detection of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of blossom blight in apple by using specific designed primers. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:4708–4713.
- Alippi, A. M., E. Dal Bo, L. B. Ronco, M. V. López, A. C. López, and O. M. Aguilar. 2003. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathol.* 52:287–302.
- Aysan, Y., M. Mirik, A. Ala, F. Sahin, and O. Cinar. 2003. First report of *Pseudomonas viridiflava* on melon in Turkey. *Plant Pathol.* 52:800.
- Aysan, Y., N. Yildiz, and F. Yucl. 2004. Identification of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional method and enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytoparasitica* 32:146–153.
- Council of Agriculture. 2013. 2012 Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture (COA). Taipei, Taiwan. 348 pp. (in Chinese)
- Heydari, A., G. Khodakaramian, and D. Zafari. 2014. Occurrence, genetic diversity and pathogenicity charac

- teristics of *Pseudomonas viridiflava* inducing alfalfa bacterial wilt and crown root rot disease in Iran. *Eur. J. Plant Pathol.* 139:299–307.
- Hseu, S. H., C. Y. Lin, and T. C. Sung. 2003. Bacterial stem rot of tomato caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Plant Prot. Bull.* 45:257–262. (in Chinese with English abstract)
- Hseu, S. H., H. Shentue, K. C. Tzeng, and C. Y. Lin. 2007. Development of specific primers for differential identification pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol. Bull.* 16:19–29. (in Chinese with English abstract)
- 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, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
- Ibrahim, Y. and Y. Molan. 2009. Occurrence of bacterial leaf spot disease on lettuce caused by *Pseudomonas viridiflava* in the Kingdom of Saudi Arabia. *New Dis. Rep.* 19:48.
- Lelliott, R. A., E. Billing, and A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* 29:470–489.
- 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.
- Lue, Y. S., W. L. Deng, Y. F. Wu, A. S. Cheng, S. T. Hsu, and K. C. Tzeng. 2010. Characterization of *Xanthomonas* associated with bacterial spot of tomato and pepper in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 19:181–190.
- Mariano, R. L. R. and S. M. McCarter. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* in tomato and selected weed species. *Microb. Ecol.* 26:47–58.
- Martin-Sanz, A., J. L. Palomo, M. Pérez de la Vega, and C. Caminero. 2010. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas viridiflava* on pea in Spain. *Plant Dis.* 94:128.
- Moura, M. L., M. A. Jacques, L. M. Brito, I. M. Mourão, and J. Duclos. 2005. Tomato pith necrosis (TPN) caused by *P. corrugata* and *P. mediterranea*: Severity of damages and crop loss assessment. *Acta Hort.* 695:365–372.
- Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J. F. Wang, T. H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W. F. Hong, B. W. Holloway, and J. N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probe and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5:19–30.
- Saygili, H., Y. Aysan, F. Sahin, N. Ustun, and M. Mirik. 2004. Occurrence of pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* on tomato plants in Turkey. *Plant Pathol.* 53:803.
- Schaad, N. W., J. B. Jone, and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 373 pp.
- Shakya, D. D. and F. Vinther. 1989. Occurrence of *Pseudomonas viridiflava* in seedlings of radish. *J. Phytopathol.* 124:123–127.
- 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.* 63:143–150. (in Chinese with English abstract)
- Végh, A., M. Hevesi, Zs. Némethy, and L. Palkovics. 2012. First report of bacterial leaf spot of basil caused by *Pseudomonas viridiflava* in Hungary. *Plant Dis.* 96:141.
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153–4154.
- Yildiz, H. N., Y. Aysan, F. Sahin, and O. Cinar. 2004. Potential inoculum sources of tomato stem and pith necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava* in the Eastern Mediterranean region of Turkey. *J. Plant Dis. Prot.* 111:380–387.

## Occurrence of Pith Necrosis of Tomato Caused by *Pseudomonas viridiflava* 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 Ting-Hsuan Hung<sup>4,\*</sup>

### Abstract

Tsai, C. H., P. J. Ann, Y. S. Lu, M. D. Chen, S. L. Hwang, and T. H. Hung. 2016. Occurrence of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas viridiflava* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65(3):269–277.

In 2011 some infected tomato plants were noticed in several fields of Nantou and Hualien Counties. Dark brown blotch was observed in the surface of stem. Internally, pith and vascular tissues showed brown discoloration and necrosis symptom. The pathogenicity of the bacteria isolated from necrotic stem tissues was verified by Koch's postulates. The pathogen was further identified as *Pseudomonas viridiflava* based on physiological and chemical tests, Biolog identification, and 16S rDNA sequence analysis. This is the first report of pith necrosis of tomato caused by *P. viridiflava* in Taiwan. On screening the agrochemicals, oxolinic acid was the most efficient to inhibit the pathogen growth.

**Key words:** Tomato, Pith necrosis, *Pseudomonas viridiflava*, Agrochemical screening.

---

Received: September 2, 2014; Accepted: October 13, 2015.

\* Corresponding author, e-mail: thhung@ntu.edu.tw

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

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

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

<sup>4</sup> Professor, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.