

## *Pseudomonas mediterranea* 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> 黃淑苓<sup>3</sup> 洪挺軒<sup>4,\*</sup>

### 摘要

蔡佳欣、安寶貞、呂昫陞、黃淑苓、洪挺軒。2018。 *Pseudomonas mediterranea* 引起之番茄髓壞疽病。台灣農業研究 67(1):16–27。

2011 年於彰化縣地區一處番茄栽植田，發現部分番茄植株出現整株褪色及衰弱現象，具此徵狀植株莖部表面出現暗褐色之長條狀病斑，切開莖部發現維管束褐化及髓部組織壞疽。從罹病莖部組織可於營養培養基分離出 1 種淡黃色的細菌菌落，該細菌經科霍氏法則測試，證實為一病原細菌。將該病原細菌再以 Biolog 系統測試、生理生化特性分析、internal transcribed spacer (ITS) 序列比對、以及專一性引子對測試，鑑定為 *Pseudomonas mediterranea*，此為 *P. mediterranea* 在台灣引起番茄髓壞疽病的首次報導。在室內經以濾紙圓盤擴散法測試市售 10 種藥劑在不同濃度下對該病原細菌的抑制生長效果，結果顯示以鏈黴素稀釋 500× 及多保鏈黴素稀釋 500× 對病原細菌之抑制生長效果最佳。

**關鍵詞：**番茄、髓壞疽病、*Pseudomonas mediterranea*、藥劑篩選。

### 前言

番茄屬於茄科 (Solanaceae) 茄屬 (*Solanum*) 植物，品種眾多，果實可供鮮食、熟食及加工用，為世界性的重要蔬菜之一。依農業統計年報 (Council of Agriculture 2017)，2016 年番茄在台灣的栽種面積達 5,006 ha，每公頃收穫量約為 23,804 kg，產量 118,958 m.t.，主要產區分布於中南部，尤以嘉義縣種植面積 1,085 ha 最大，高雄市 968 ha 次之。2011 年於彰化縣一處番茄栽植田，發現該田區部分的番茄植株出現葉片褪色及衰弱現象，具此徵狀植株生長較正常株緩慢、莖表面出現長條暗褐色病斑，切開莖部可發現維管束組織褐化，並且其髓部組織出現壞疽 (圖 1)。這些推測為罹病之植株可維持數月不死亡，徵狀進程緩慢。經切取可能為罹病之番茄植株莖部壞疽組織以光學顯微鏡觀察，發現大量細菌從組

織切口處湧出，因此推測可能為細菌性病害。由於在這些番茄莖部之髓部組織出現嚴重壞疽之典型病徵，所以進一步推測該病可能由髓壞疽病原細菌所造成。經查國外文獻資料可知，*Pseudomonas* 屬內有多種細菌可引起番茄髓壞疽病徵，如 *Pseudomonas viridiflava* (Aysan *et al.* 2004)、*Pseudomonas cichorii* (Testen *et al.* 2015)、*Pseudomonas mediterranea* (Moura *et al.* 2005)、*Pseudomonas marginalis* (Bella & Catara 2010)、*Pseudomonas corrugata* (Moura *et al.* 2005; Molan & Ibrahim 2007) 以及 *Pseudomonas fluorescens* (Saygili *et al.* 2004) 等。

為確認本次所發生的番茄罹病株之病原菌，從莖部壞疽組織分離病原細菌，在營養培養基 (nutrient agar) 分離出 1 種淡黃色的細菌，將該細菌以注射法打入菸草葉片時，可誘導菸草產生過敏性反應，顯示該菌可能為植物病原細菌 (Lelliott & Stead 1987)。由於該菌

投稿日期：2016 年 10 月 20 日；接受日期：2017 年 8 月 30 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。

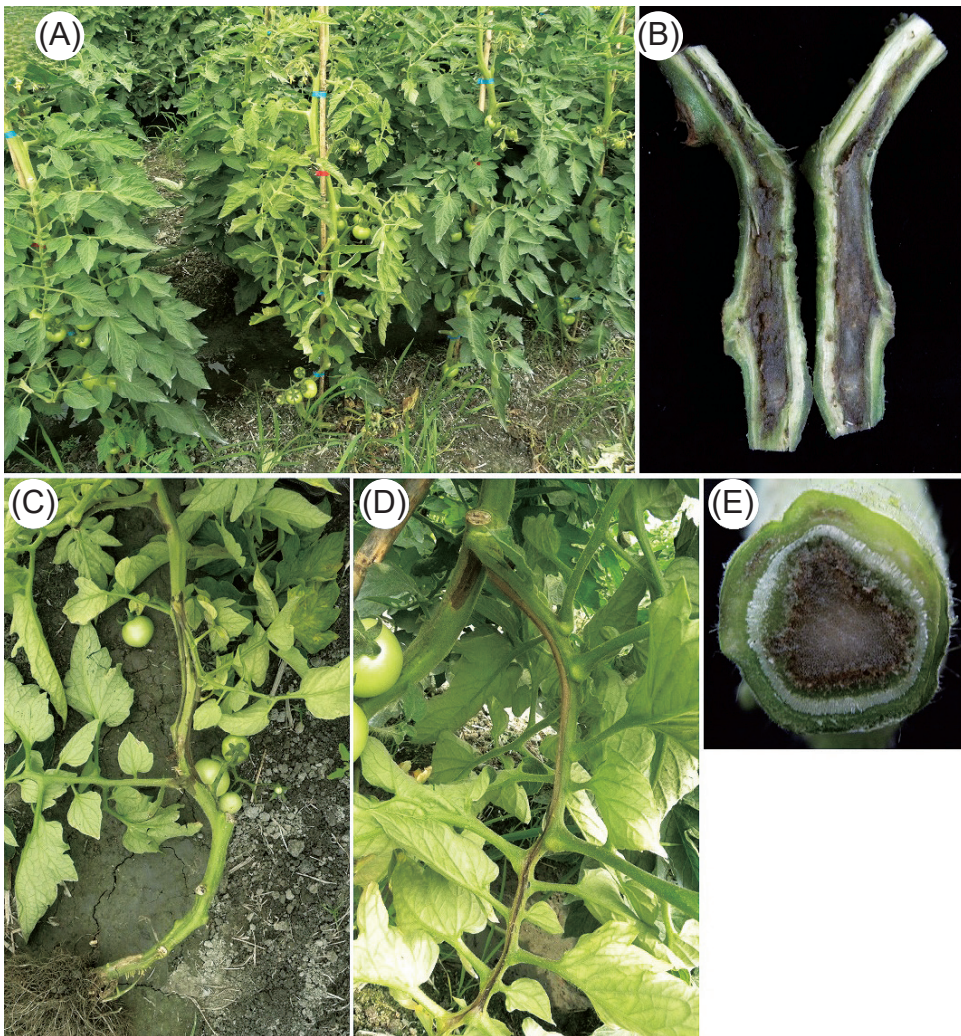


圖 1. 田間番茄髓壞疽病之病徵。罹病植株出現褪色及衰弱病徵 (A)；莖部維管束褐化及髓部組織出現褐色壞疽 (B)、(E)；莖部及側枝條表面出現長條暗褐色病斑蔓延 (C)、(D)。

**Fig. 1.** Symptoms of pith necrosis of tomato in the field. Diseased plant chlorosis and decline (A); section of stem displayed vascular browning and pith necrosis symptoms (B), (E); and longitudinal dark brown lesions on stem and side-shoot (C), (D).

在 King's B 培養基不具有螢光，且菌落型態與台灣已發表可感染番茄莖部維管束的髓壞疽病菌 *P. viridiflava* (Tsai *et al.* 2016)、莖腐病菌 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Hsu *et al.* 2003) 及青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* (Hsu *et al.* 2002) 不同，顯示本次病害可能為其他種類的病原細菌引起。因此，本研究擬對此病之病因、病原菌特性及室內藥劑篩選進行探討，以供栽培及防治參考。

## 材料與方法

### 菌株來源

從彰化縣番茄發病田區採集生長不良及莖髓部具褐化壞疽病徵之病株 (圖 1)，切取罹病莖部組織以 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗 30 s 進行表面消毒，再經 3 次無菌水漂洗後，將病健部組織切碎，放入裝有無菌水之離心管中震盪以釋出細菌。再用移植環沾取細菌懸浮液，以

劃線方式塗在營養培養基 (nutrient agar) (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, France) 平板上，之後將該培養基放在 28°C 定溫箱培養 2–3 d。待細菌長出後，挑取細菌單一菌落以劃線方式塗至新的營養培養基平板，重複 3 次以純化細菌，以供後續試驗使用。

### 病原性試驗

接種試驗以分離自彰化縣之細菌菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 共 3 分離株作為供試菌株，供試番茄植物為「紅番」番茄栽培品種。供試植株種植於盆鉢，至植株高約 60 cm，進行接種試驗。細菌接種原製備方法為，先將 3 供試菌株劃線培養在營養培養基，置於 28°C 定溫箱培養 1 d 後，將長出的細菌以無菌水懸浮，製備成細菌懸浮液，並以分光光譜儀 (spectrophotometer, Bausch & Lomb, USA) 測量細菌懸浮液濃度，並將其調整至吸收值 (A600) 為 0.3 (約  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>) 作為接種源。接種方法為滴 1 滴調配好濃度的細菌懸浮液在番茄莖部，再用滅菌的牙籤在該處刺 1 個小傷口供細菌感染，每株接種 2 處，每一供試菌株接種 3 棵番茄植株，以接種無菌水之處理作為對照組。接種後，將植株套上透明塑膠袋保濕 48 h，之後去除塑膠袋，放在 28°C 之植物生長箱觀察植株病徵發展情形。待植株發病之後，切取罹病的莖部組織分離細菌，確認是否與原來的細菌相同。

### Biolog identification system 鑑定細菌

供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 以 Biolog 鑑定系統分析。首先將 3 供試菌株劃線培養在 5.7% BUG<sup>TM</sup> agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., CA, USA) 平板，之後放置在 30°C 定溫箱培養 16–24 h，再以棉棒沾取細菌菌落，將細菌接種至 IF-A 接種液 (Biolog Inc., CA, USA)，並震盪混合均勻。以波長 590 nm 之濁度計 (Turbidity, Biolog Inc., USA) 調整接種液之細菌濃度至 90–98% T (turbidity)，濃度調整完成後，吸取細菌接種液加入 96 孔之 Biolog GEN III 反應盤 (Biolog Inc., CA, USA) 中，每個孔接種 100  $\mu$ L。將接種菌液後的反應盤培養 25–35 h，以光譜儀

測讀，所得讀值以 Biolog MicroLog<sup>TM</sup> 3 ver. 5.2.2 系統及 Biolog GEN III 資料庫 (2.6.1 版) 比對分析，以鑑定供試細菌種類。

### 生理生化特性測定

參考 Schaad *et al.* (2001) 及 Catara *et al.* (2002) 所述方法，將上述 3 供試菌株進行下列生理生化特性分析，試驗重複 2 次。試驗項目包括革蘭氏反應 (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、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、37°C 下之生長能力、對 mannitol、benzoate、cellobiose、sorbitol、trehalose、sucrose、D-arabinose、L-rhamnose、histamine、meso-tartrate、2-ketoglucuronate 的利用能力，以鑑定供試菌株分類地位。

### ITS 分子鑑定

選取彰化縣分離之 ToPN01、ToPN02，並從德國菌種中心引進對照菌株 *P. mediterranea* (DSM 16733) 及 *P. corrugata* (DSM7228) 純培養後，參考 Wang *et al.* (1993) 之簡易核酸萃取方法並略為修改後，進行核酸萃取。先將供試菌株劃線培養在營養培養基，待細菌長出後，以滅菌牙籤沾取單一的細菌菌落，並將細菌懸浮在 20  $\mu$ L 之無菌水中，再加入 0.4 N NaOH 20  $\mu$ L 將其震盪混合均勻。靜置 10 min 後，再加入 1 M Tris-HCl 40  $\mu$ L 混合均勻，混合液再以無菌水稀釋 10 $\times$  作為聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 模板。PCR 以細菌 16S–23S 核糖體核酸基因間之內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 之引子對 D21/D22 進行增幅 (Manceau & Horvais 1997)，PCR 反應在 20  $\mu$ L 的混合物進行，各反應物的濃度為 1 $\times$  PCR buffer、1.5 mM 的 MgCl<sub>2</sub>、0.25 mM 的 dNTP，引子各 2.5 pmol，Taq DNA polymerase 0.8 units，並加入 2  $\mu$ L 模板。在熱循環反應器 (GeneAmp PCR System 2400) 內進行，PCR 溫度循環條件：先以

94°C進行 2 min 後；再以 94°C進行 1 min，60°C進行 1 min，72°C進行 1 min 共 36 cycles；最後 72°C進行 2 min。增幅後之 DNA 產物以 1.4% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，確定是否產生預期之 DNA 片段。所得之 PCR 產物以 TOP-fast PCR cloning kit (GeneMark, Taichung, Taiwan) 進行 DNA 片段選殖，選殖後將帶有 DNA 選殖片段的細菌菌株進行增殖及抽取質體，所抽取之質體再以 PCR 及電泳分析確認其帶有預期 DNA 片段後，委由明欣生物科技股份有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行 DNA 定序，所得 DNA 序列資料再以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫比對。

### 專一性引子對鑑定

為確認本次所分離之病原細菌種類，將本次所分離之供試菌株 ToPN01、ToPN02、ToPN03 以及對照菌株 *P. mediterranea* (DSM 16733)、*P. corrugata* (DSM7228)、*P. viridiflava* (TPN02，已知為台灣另一種番茄髓壞疽病菌) (Tsai *et al.* 2016)，經純培養後，以上述簡易方法萃取核酸。參考 Catara *et al.* (2000, 2002) 所述，分別以 *P. mediterranea* 專一性引子 (PC1/1 與 PC1/2) 以及 *P. corrugata* 專一性引子 (PC5/1 與 PC5/2) 對上述之供試菌株及對照菌株進行 PCR。PCR 條件略微修改如下：各反應物的混合液共 20  $\mu$ L，濃度如下：1 $\times$  PCR buffer、1.5 mM 的  $MgCl_2$ 、0.25 mM 的 dNTP，引子各 1.25 pmol，Taq DNA polymerase 0.4 units 以及 2  $\mu$ L 模板。溫度循環條件如下：先以 94°C進行 5 min 後；再以 94°C進行 1 min，62°C進行 1 min，72°C進行 30 s 共 30 cycles；最後 72°C進行 5 min。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。

### 藥劑感受性測定

選取 ToPN01 及 ToPN02 分離株，進行藥劑感受性試驗。測試方法以濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method) (Adaskaveg & Hine 1985) 測試供試菌株對各種市售藥劑在不同濃度之感受性。試驗藥劑種類選取植物保護

手冊上對細菌有防治效果的藥劑共 10 種進行測試，藥劑測試濃度範圍以商品包裝所列之使用濃度為基準，並進一步上下增減 2 倍濃度進行測試比較。測試的藥劑種類，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，商品名為實多黴素，大勝化工)、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)；鹼性氯氧化銅 (copper oxychloride，85.0% WP，商品名為銅寶發，青山公司)、三元硫酸銅 (tribasic copper sulfate，27.12% SC，商品名為銅高尚，日產化工公司)；含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (mancozeb，80.0% WP，商品名為台生粉，世大化工)；混合類藥劑之多保鏈黴素 (thiophanate methyl + streptomycin，68.8% WP，商品名為安達菌，瑞總公司)；嘉賜銅 (kasugamycin + copper oxychloride，81.3% WP，商品名為高速攻露，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)。

藥劑測試方法如下：先將細菌製成懸浮液，濃度調整至  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>，吸取 0.1 mL 細菌懸浮液加入 6 mL 之 0.8% 水瓊脂 (water agar) 中混合均勻，再將水瓊脂覆蓋在營養培養基平板上；將上述各藥劑稀釋成不同濃度後，分別吸取 0.12 mL 滴入直徑 13 mm 的濾紙圓盤 (Whatman International Ltd., UK) 中，再將含有藥劑的濾紙圓盤放置在已覆上含細菌水瓊脂之營養培養基平板上，並以滴入無菌水之濾紙圓盤作為對照組，每處理 3 重複。之後將培養基平板，放置在 28°C 下定溫箱培養 48 h 後，測量各藥劑在不同濃度下產生的抑制圈大小，以測定藥效。

## 結果與討論

### 病原性試驗

將 3 株供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03，以穿刺法接種細菌懸浮液於供試紅番番茄植株

莖部 14 d 後，接种植株雖未見萎凋病徵，但可見接種處附近之側枝條表面出現褐色長條斑。將該植株側枝條及主莖縱切觀察，發現細菌從接種處沿維管束蔓延，植株側枝條之維管束褐化 (圖 2A)，並且在莖部之髓部組織出現褐色壞疽病徵 (圖 2B、2C)，與田間所見病徵相同。持續觀察所接種番茄植株生長緩慢，2-3 mo 後陸續開始出現黃化及衰弱現象，病程進展緩慢，接種無菌水之對照植株則無病徵出現。從接种植株發病蔓延之壞疽病組織處可再分離出細菌，該細菌經核酸分析與原接種細菌相同，完成科霍氏法則，證實所分離之細菌為該病害之病原菌。

### Biolog identification system 鑑定

以 Biolog 鑑定系統鑑定上述 3 株供試菌株，供試菌株培養在 Biolog GEN III 反應盤以測定其對碳素源利用情形及生理特性，培養後的反應盤以光譜儀測讀後之讀值經 Biolog MicroLog™ 3 ver. 5.2.2 系統分析及資料庫比對，比對結果顯示供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 屬於 *Pseudomonas corrugata*，相似值分別為 0.674、0.697 及 0.674，大於系統設定臨界值 0.5。

*Pseudomonas corrugata* 最早由 Scarlett *et al.* (1978) 所描述，為番茄髓壞疽病之病原菌，該菌已在全球各地被發現，並可依據生理生化

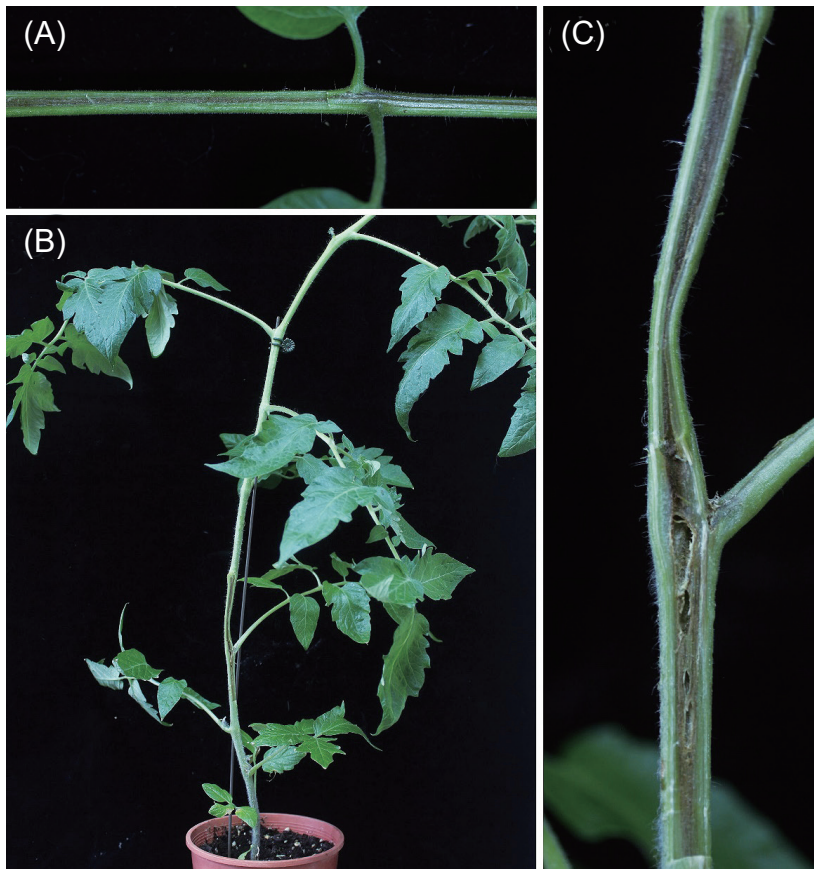


圖 2. 紅番番茄人工接種分離到的細菌後呈現的病徵。番茄接種 14 d 後，側枝條表面出現褐色長條斑及維管束組織出現褐化的病徵 (A)；莖部縱切後出現髓壞疽病徵 (B)；髓壞疽病徵放大圖 (C)。

**Fig. 2.** Symptoms of the tomato plants (cv. 'Hong Fan') after inoculation with the isolated bacteria. Tomato side shoot showing longitudinal brown external lesion and vascular browning in 14 days after inoculation (A); pith necrosis symptom observed in the stem after inoculation (B); and close-up of the pith necrosis symptom (C).

的差異性將 *P. corrugata* 分為 2 群 (Sutra *et al.* 1997)，其中 1 群在 2002 年被獨立為新種，命名為 *P. mediterranea* (Catara *et al.* 2002)。然而經查 Biolog GEN III 資料庫 (2.6.1 版) 內尚未建立 *P. mediterranea* 的資料，因此供試菌株被鑑定為 *P. corrugata*。顯示供試菌株與 *P. corrugata* 相似，但仍需再進行其他的生理生化試驗及核酸分析，進一步確定供試菌株的分類地位。

### 生理生化測定

將供試菌株 ToPN01、ToPN02、及 ToPN03，進行生理生化特性試驗，試驗重複 2 次，結果相同，3 供試菌株均為革蘭氏陰性 (Gram negative)；以氧化方式利用葡萄糖，在營養培養基培

養時菌落為淡黃色；在 King's B 培養基培養時不產生螢光色素；培養在結晶紫果膠 (crystal violet pectate; CVP) 平板上時不形成凹陷；可產生果聚糖 (levan)；具氧化酶 (oxidase)；具精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase)；接種在馬鈴薯組織塊不產生軟腐；注射接種菸草葉片可誘導產生過敏性反應 (tobacco hypersensitivity)；可液化明膠 (gelatin)；可在 37°C 下生長。可利用 mannitol、trehalose、sucrose、meso-tartrate、D-arabinose、histamine 及 2-ketogluconate，不能利用 benzoate、cellobiose、sorbitol 及 L-rhamnose，如表 1 所示。

*P. mediterranea* 本屬於 *P. corrugata* 之一群，之後獨立為新種 (Catara *et al.* 2002)，兩者在生理生化特性十分接近，主要的差異為：*P. mediterranea* 可以利用 meso-tartrate、histamine 及

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	ToPN01-03 strain	<i>Pseudomonas mediterranea</i> <sup>z</sup>
Gram reaction	G (-) <sup>y</sup>	G (-)
O/F test	O	O
Fluorescent pigment on KB	-	-
Levan	+	-
Oxidase	+	+
Pectolytic activity	-	-
Arginine dihydrolase	+	+
Tobacco hypersensitivity reaction	+	V
Gelatin hydrolysis	+	+
Growth at 37°C	+	+
Utilization of:		
2-ketogluconate	+	+
Mannitol	+	+
Benzoate	-	-
Cellobiose	-	-
Sorbitol	-	-
Trehalose	+	+
Sucrose	+	+
Meso-tartrate	+	+
D-arabinose	+	+
L-rhamnose	-	-
Histamine	+	+

<sup>z</sup> Data are from: Schaad *et al.* (2001); Catara *et al.* (2002).

<sup>y</sup> G (-): gram negative; O: oxidative; F: fermentation; +: positive; -: negative; V: between 21–79% of strains positive.

2-ketogluconate, *P. corrugata* 則無法利用。本次所分離之病原細菌經測定對 meso-tartrate、histamine 及 2-ketogluconate 均可以利用, 因此供試菌株生理生化特性與 *P. mediterranea* 較為接近。此外供試菌株之其他生理生化特性大多數與 Catara *et al.* (2002) 所述之 *P. mediterranea* 資料相同, 但在具有合成果聚醣 (levan) 能力則有所不同, 顯示我國菌株與外國菌株在生理生化特性上有些許差異。此種合成果聚醣差異現象, 在其他同屬於 *Pseudomonas* 屬之植物病原細菌亦可被觀察到, 如 *P. viridiflava* 及 *P. savastanoi* (González *et al.* 2003; Marchi *et al.* 2005)。

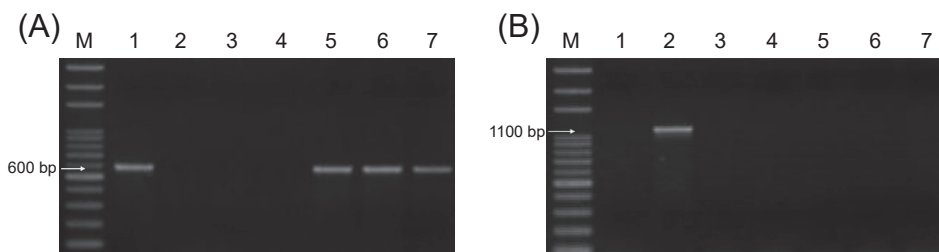
### ITS 序列分析

為確定所分離之菌株為 *P. mediterranea* 或是 *P. corrugata*, 供試菌株 ToPN01、ToPN02 以及對照菌株 *P. mediterranea* (DSM16733)、*P. corrugata* (DSM7228) 之核酸, 以細菌 internal transcribed spacer (ITS) 引子對 D21/D22 進行 PCR 增幅結果, 均可增幅出一約 550 bp 之 DNA 片段。此 DNA 片段經選殖及定序後, 供試菌株核酸序列 ToPN01 與 ToPN02 彼此序列相同度為 100% (以 ToPN01 為代表上傳 GenBank, NCBI accession number KX832047), 該序列經 NCBI 基因資料庫分析比對結果, 供試菌株 ToPN01 與 *P. corrugata* strain (NCBI accession

number D87087.1) 序列相同度達 97%, 顯示所分離之菌株與 *P. corrugata* 高度相似。而供試菌株 ToPN01 序列與對照菌株比對結果, 與 *P. corrugata* (DSM7228) 序列相同度亦為 97%, 然而與 *P. mediterranea* (DSM16733) 序列相同度達 100%。因此, 由 ITS 序列分析可知, 所分離的菌株與 *P. mediterranea* 較為接近。

### 專一性引子鑑定

為進一步確認所分離之菌株為 *P. mediterranea* 或是 *P. corrugata*, 以 *P. mediterranea* 之專一性引子對 PC1/1 與 PC1/2, 以及 *P. corrugata* 專一性引子 PC5/1 與 PC5/2 進行 PCR 增幅。PCR 產物經電泳分析結果, *P. mediterranea* 專一性引子 PC5/1 與 PC5/2 可對 3 供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 及對照菌株 *P. mediterranea* (DSM 16733) 增幅出約 600 bp DNA 片段, 而對照菌株 *P. corrugata* (DSM 7228) 及 *P. viridiflava* (TPN02) 無增幅出預期之 PCR 產物 (圖 3A)。以 *P. corrugata* 專一性引子 PC5/1 與 PC5/2, 則僅有對照菌株 *P. corrugata* (DSM 7228) 增幅出約 1,100 bp DNA 片段, 3 供試菌株 ToPN01-03 及 *P. mediterranea* (DSM 16733) 及 *P. viridiflava* 並無增幅出 PCR 產物 (圖 3B)。顯示田間所分離之菌株為 *P. mediterranea*, 而非 *P. corrugata*, 亦非台灣已存在之 *P. viridiflava*。



**圖 3.** 以 PCR 技術鑑定番茄髓壞疽病菌。 *Pseudomonas mediterranea* 專一性引子對 PC1/1 與 PC1/2 之 PCR 增幅結果 (A); *Pseudomonas corrugata* 專一性引子對 PC5/1 與 PC5/2 之 PCR 增幅結果 (B)。行 M: 100 bp marker; 行 1: *Pseudomonas mediterranea* (DSM16733); 行 2: *Pseudomonas corrugata* (DSM7228); 行 3: *Pseudomonas viridiflava* (TPN02); 行 4: 為未含有 DNA 模板之負對照; 行 5-7: 番茄髓壞疽病菌 (ToPN01-03)。

**Fig. 3.** Identification of tomato pith necrosis pathogen by polymerase chain reaction (PCR). PCR amplification with *Pseudomonas mediterranea* specific primer pair PC1/1 and PC1/2 (A); PCR amplification with *Pseudomonas corrugata* specific primer pair PC5/1 and PC5/2 (B). Lane M: 100 bp DNA marker; lane 1: DNA from *Pseudomonas mediterranea* (DSM16733); lane 2: DNA from *Pseudomonas corrugata* (DSM7228); lane 3: *Pseudomonas viridiflava* (TPN02); lane 4: no template control; and lanes 5-7: DNA from tomato pith necrosis pathogen (ToPN01-03).

藥劑感受性測定

以濾紙圓盤擴散法，在培養基上測定 10 種市售藥劑在 3 種不同濃度下對供試菌株 ToPN01 及 ToPN02 的抑制效果。2 d 後量取各藥劑在

培養基所產生的抑制圈直徑 (扣除濾紙圓盤直徑 13 mm)，試驗重複 2 次，結果類似，以其中 1 次結果為代表，將結果列於表 2。試驗結果顯示，有 4 種藥劑可對 2 供試菌株出現抑制圈，分別為鏈黴素、鏈四環黴素、多

表 2. 供試藥劑在不同濃度對番茄髓壞疽菌株 ToPN01 及 ToPN02 之生長抑制效果。

Table 2. Growth inhibition of *Pseudomonas mediterranea* ToPN01 and ToPN02 by various agrochemicals in different concentrations.

Chemical	Dilution fold	Inhibition zone (mm in diam.)	
		ToPN01	ToPN02
Streptomycin (12.5% SL)	500	3.30 ± 0.06 a <sup>z</sup>	3.47 ± 0.03 a
	1,000	1.83 ± 0.03 d	1.97 ± 0.07 d
	2,000	0 f	0 g
Streptomycin + Tetracycline (10% SP)	500	2.67 ± 0.09 b	2.77 ± 0.03 b
	1,000	0.23 ± 0.12 e	0.43 ± 0.19 e
	2,000	0 f	0 g
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8% WP)	500	3.20 ± 0.12 a	3.40 ± 0.06 a
	1,000	2.00 ± 0.10 c	2.17 ± 0.19 c
	2,000	0.17 ± 0.03 e	0.23 ± 0.03 f
Kasugamycin (2.0% WP)	125	0 f	0 g
	250	0 f	0 g
	500	0 f	0 g
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3% WP)	500	2.10 ± 0.06 c	2.23 ± 0.03 c
	1,000	0 f	0 g
	2,000	0 f	0 g
Copper oxychloride (63.02% WP)	200	0 f	0 g
	400	0 f	0 g
	800	0 f	0 g
Copper hydroxide (61.4% WP)	750	0 f	0 g
	1,500	0 f	0 g
	3,000	0 f	0 g
Tribasic copper sulfate (27.12% SC)	250	0 f	0 g
	500	0 f	0 g
	1,000	0 f	0 g
Oxolinic (20% WP)	500	0 f	0 g
	1,000	0 f	0 g
	2,000	0 f	0 g
Mancozeb (80.0% WP)	250	0 f	0 g
	500	0 f	0 g
	1,000	0 f	0 g
LSD		0.12	0.15

<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.

保鏈黴素，及嘉賜銅，其餘 6 種藥劑包括嘉賜黴素、鹼性氯化銅、氫氧化銅、三元硫酸銅、鋅錳乃浦及歐索林酸在本次測試的濃度下，對 2 供試菌株無抑制效果。抑制圈大小以鏈黴素 500× 及多保鏈黴素稀釋 500× 最大，抑制圈直徑為 3.20–3.47 mm，其次為鏈四環黴素稀釋 500×，抑制圈直徑為 2.67–2.77 mm，再其次為嘉賜銅 500× 及多保鏈黴素稀釋 1,000×，抑制圈直徑為 2.00–2.23 mm。在此 4 種可抑制菌株生長的藥劑中，其中 3 種藥劑亦可在基準濃度 (商品建議使用的稀釋倍率) 下對 2 供試菌株產生抑制圈，分別為鏈黴素稀釋 1,000×、多保鏈黴素稀釋 1,000× 及鏈四環黴素 1,000×，其中以鏈黴素稀釋 1,000× 及多保鏈黴素稀釋 1,000× 所產生的抑制圈直徑 1.83–2.17 mm 較佳，明顯大於鏈四環黴素 1,000 環所產生的抑制圈 0.23–0.43 mm。然而銅劑類在本次 3 種不同測試濃度下對供試菌株均無產生抑制圈，顯示銅劑在基準濃度上下 2 倍的濃度範圍內抑菌效果不佳。

自 *P. mediterranea* 從 *P. corrugata* 之一群獨立為新種後 (Catara *et al.* 2002)，目前尚無 *P. mediterranea* 藥劑試驗之文獻資料可供參考。但可從過去對 *P. corrugata* 的研究得知，*P. corrugata* 對銅劑具較高耐受度 (Alippi *et al.* 2003)。在本次藥劑試驗中，亦同樣發現在本次試驗的濃度中，銅劑類抑制 *P. mediterranea* 菌株生長的效果不佳，與早期的研究結果類似。由於本病為台灣新發生病害，國內亦未有相關的藥劑防治資料可供參考，因此本次進行 *P. mediterranea* 藥劑篩選，已初步篩選出 4 種藥劑可對該病菌產生抑制圈，抑制菌株生長，具有防治的應用潛力。該 4 種藥劑及濃度，在後續規劃田間防治試驗或種子消毒試驗時，可作為使用的藥劑種類及試驗濃度參考。

## 結論

2011 年在彰化縣番茄栽培田區發現部分番茄植株出現褪色及衰弱情形，病株莖部表面出現長條狀褐色病斑，切開莖部發現維管束褐化及髓部壞疽，其病徵與文獻所報告之番茄髓壞疽病 (Scarlett *et al.* 1978; Trantas *et al.* 2015)

相似。該病害經科霍氏法則確認為細菌所引起，並依據田間番茄病株以及經接種試驗後之植株均出現典型的髓部壞疽病徵，將此病稱為番茄髓壞疽病 (pith necrosis)。

番茄髓壞疽病已知可由多種 *Pseudomonas* 屬之病原細菌引起，在台灣已報導由 *P. viridiflava* 感染番茄造成髓壞疽病 (Tsai *et al.* 2016)，此菌在台灣亦被報導造成十字花科蔬菜細菌性葉枯病，地點遍及台灣北、中、南、東北各地，且在四季均有該病的發生，顯示 *P. viridiflava* 應已在台灣立足 (Hseu *et al.* 2015)。然而，本次在彰化縣所發生之番茄髓壞疽病，經鑑定所分離之病原細菌，與台灣已發生之 *P. viridiflava* 不同。該菌以 Biolog 鑑定系統測試屬於 *Pseudomonas corrugata*。然而 *P. corrugata* 早期可區分為 2 群 (Catara *et al.* 2000)，其中 1 群依照生理生化特性與核酸序列的差異而獨立成為新種 *P. mediterranea* (Catara *et al.* 2002)。經查 Biolog 鑑定系統資料庫 (2.6.1 版)，尚無 *P. mediterranea* 資料，因此進一步測試該病菌之生理生化特性、ITS 核酸序列分析及專一性引子對測試，發現該菌生理生化及核酸分析結果均與 *P. mediterranea* 較接近。因此，將本次番茄髓壞疽病原菌鑑定為 *P. mediterranea*，而不是 *P. corrugata*，亦非台灣已發生之 *P. viridiflava*。

*P. mediterranea* 最初主要分離自地中海國家，如義大利、法國、西班牙之具有髓壞疽病徵的番茄及甜椒 (Catara *et al.* 2002)，之後該菌陸續在土耳其 (Basim *et al.* 2005)、葡萄牙 (Moura *et al.* 2005)、巴西 (Rodrigues *et al.* 2010)、阿根廷 (Alippi & López 2010) 美國 (Xu *et al.* 2013; Searcy *et al.* 2016) 及希臘 (Trantas *et al.* 2015) 等國家被報導危害番茄造成髓壞疽病。然而該菌在台灣尚未有危害番茄的報導，此為 *P. mediterranea* 造成番茄髓壞疽病，在台灣的首次報導。

*P. mediterranea* 早期屬於 *P. corrugata*，從國外早期的研究中，由 *P. corrugata* 引起的番茄髓壞疽病，該病害通常感染率為 5–10%，但有案例感染率可超過 50% (Trantas *et al.* 2015)。近年亦有報導在美國喬治亞州 (Georgia) 兩處番茄生產區受 *P. mediterranea* 感染的番茄植株，兩處的感染率分別 10% 及 15% (Searcy *et al.*

al. 2016)。有國外研究，分別將 *P. corrugata* 及 *P. mediterranea* 接種番茄植株後，兩種病菌對果實造成的影響類似，所結之番茄果實品質下降，並分別造成 19% 及 20% 的產量損失 (Moura *et al.* 2005)。因此，若該病菌發生蔓延時，可能造成番茄顯著損失。台灣位於熱帶與亞熱帶區域，夏季氣候炎熱，冬季溫度不會過低。以 2016 年台灣中部台中為例，冬季最低溫之 2 月份平均溫度為 16.4°C，夏季最高溫之 7 月份平均溫度為 29.4°C (Central Weather Bureau 2016)。早期研究指出，*P. corrugata* 可殘存在 15°C 的土壤 (Ryder & Bird 1993)，但尚無 *P. mediterranea* 的殘存溫度試驗。由於 *P. mediterranea* 與 *P. corrugata* 類似，因此推測台灣的冬季溫度撲滅 *P. mediterranea* 的可能性低，並且本次經測試 *P. mediterranea* 由生理生化特性可知，在 37°C 下依然可以生長，顯示該菌在台灣越夏的可能性高，因此推測 *P. mediterranea* 在台灣立足的可能性高。

在傳播特性上，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，有報告指出 *P. mediterranea* 可殘存於土壤 (Moura *et al.* 2012) 及 *P. corrugata* 殘存在種子 (Zutra 1989)，因此在本病的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、勿經病田引水灌溉及使用未帶病菌種子等措施。在藥劑防治上，本次初步在室內篩選出 4 種市面上販售之藥劑，在本次試驗濃度範圍內，在培養基上可抑制病原細菌生長，該藥劑與試驗濃度可做為進一步規劃田間防治試驗或種子消毒試驗之使用參考。

## 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.
- Alippi, A. M. and A. C. López. 2010. First report of *Pseudomonas mediterranea* causing tomato pith necrosis in Argentina. *Plant Pathol.* 59:1163.
- 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., N. Yildiz, and F. Yucel. 2004. Identification of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional methods and enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytoparasitica* 32:146–153.
- Basim, H., E. Basim, S. Yilmaz, and M. Ilkucan. 2005. First report of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. *Plant Pathol.* 54:240.
- Bella, P. and V. Catara. 2010. Occurrence of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas marginalis* in Italy. *Plant Pathol.* 59:402.
- Catara, V., D. Arnold, G. Cirvilleri, and A. Vivian. 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., L. Sutra, A. Morineau, W. Achouak, R. Christen, and L. Gardan. 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1749–1758.
- Central Weather Bureau. 2016. Climate statistics. <http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/monthlyData/mD.htm> (visit on 06/14/2017) (in Chinese)
- Council of Agriculture. 2017. 2016 agricultural statistics yearbook. <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx> (visit on 8/4/2017) (in Chinese)
- González, A. J., M. R. Rodicio, and M. C. Mendoza. 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2936–2941.
- 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., S. Y. Hsu, S. F. Tsai, and Y. J. Tseng. 2015. Cruciferous bacterial blight: A new disease caused by *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Pathol. Bull.* 24:119–130. (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)
- Lelliot, R. A. and D. E. Stead. 1987. Method for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 216 pp.

- Manceau, C. and A. Horvais. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. tomato. Appl. Environ. Microbiol. 63:498–505.
- Marchi, G., C. Viti, L. Giovannetti, and G. Surico. 2005. Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. Eur. J. Plant Pathol. 112:101–112.
- Molan, Y. and Y. Ibrahim. 2007. First report of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. Plant Dis. 91:110.
- Moura, L., I. Queiroz, I. Mourão, L. M. Brito, and J. Duclos. 2012. Survival and genotypic variation of *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea* in response to soil solarization and biofumigation. p.553–558. in: XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Organic Horticulture: Productivity and Sustainability. March 31, 2012. Lisbon, Portugal. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium.
- 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. p.365–372. in: Proceedings of the First International Symposium on Tomato Diseases. November 25, 2005. Orlando, FL. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium.
- Rodrigues, L. M. R., S. A. L. Destéfano, L. O. S. Beriam, and J. Rodrigues-Neto. 2010. Occurrence of *Pseudomonas mediterranea* on tomato in Brazil. Plant Pathol. 59:797.
- Ryder, M. H. and A. F. Bird. 1993. Effect of *Acrobeloides nanus* (Nematoda: Cephalobidae) upon the survival of *Pseudomonas corrugata* (Eubacteria) in pasteurized soil from, Kapunda, South Australia. T. Roy. Soc. South Aust. 117:179–182.
- 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.
- Scarlett, C. M., J. T. Fletcher, P. Roberts, and R. A. Lelliott. 1978. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. Ann. Appl. Biol. 88:105–114.
- 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, MN. 373 pp.
- Searcy, J. V. K., S. Smith, R. D. Gitaitis, and B. Dutta. 2016. First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in Georgia, USA. Plant Dis. 100:518.
- Sutra, L., F. Siverio, M. M. Lopez, G. Hunault, C. Bollet, and L. Gardan. 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis: Emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genom-species. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:1020–1033.
- Testen, A. L., J. Nahson, D. P. Mamiro, and S. A. Miller. 2015. First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas cichorii* in Tanzania. Plant Dis. 99:1035.
- Trantas, E. A., P. F. Sarris, M. G. Pentari, E. E. Mpalantinaki, F. N. Ververidis, and D. E. Goumas. 2015. Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. Plant Pathol. 64:307–318.
- 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. 65:269–277. (in Chinese with English abstract)
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154.
- Xu, X., F. Baysal-Gurel, and S. A. Miller. 2013. First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in the United States and *P. corrugata* in Ohio. Plant Dis. 97:988.
- Zutra, D. 1989. Tomato pith necrosis in Israel. Hassadeh 69:612–613.

## Occurrence of Pith Necrosis of Tomato Caused by *Pseudomonas mediterranea* in Taiwan

Chia-Hsin Tsai<sup>1</sup>, Pao-Jen Ann<sup>2</sup>, Yun-Sheng Lu<sup>1</sup>, Shu-Ling Hwang<sup>3</sup>, and Ting-Hsuan Hung<sup>4,\*</sup>

### Abstract

Tsai, C. H., P. J. Ann, Y. S. Lu, S. L. Hwang, and T. H. Hung. 2018. Occurrence of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(1):16–27.

In 2011 some chlorosis and declined tomato plants were noticed in a field located in Changhua County. Diseased plants had longitudinal dark brown lesions on the stems. Section of the diseased stem showed vascular brown discoloration and pith necrosis symptoms. The yellowish bacteria were isolated from the necrotic stem tissues of tomato on nutrient agar. The isolated bacteria were confirmed as a disease pathogen by Koch's postulates test. The bacteria were identified as *Pseudomonas mediterranea* based on Biolog identification system, physiological and chemical tests, internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis, and specific primer pairs in polymerase chain reaction. This is the first report of *P. mediterranea* causing tomato pith necrosis disease in Taiwan. On screening 10 agrochemicals, streptomycin and thiophanate methyl + streptomycin diluted 500-fold showed the most effective inhibition on pathogen growth.

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

---

Received: October 20, 2016; Accepted: August 30, 2017.

\* 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> Assistant, 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.