

臺灣作物葉表螢光假單胞菌及其對植物病原細菌之拮抗作用

曾國欽 林元春 徐世典

臺中市 國立中興大學植物病理學研究所

接受日期：中華民國 83 年 2 月 15 日

摘 要

曾國欽、林元春、徐世典，1994。臺灣作物葉表螢光假單胞菌及其對植物病原細菌之拮抗作用。植病會刊 3:24-33。

由臺灣不同地區之 18 種作物葉表共分離 151 株螢光假單胞菌，這些螢光假單胞菌均可產生氧化酵素與精氨酸二水解酵素，且不引起菸草葉片之過敏性反應，然依其他生理生化反應之差異，可將其區分成 A、B、C、D 及 E 等五類型，其中 C 類型菌株分佈最廣，普遍存在於各採集區及各類作物上。A、B 及 C 類型菌株分別與 *Pseudomonas aeruginosa*、*P. marginalis* 及 *P. putida* 之特性相似，D 類型菌株則與 *P. fluorescens* 特性相似，並可分成 D1、D2 及 D3 等小群，其特性分別與 *P. fluorescens* 之 biovar I、III 及 V 等相近，而 E 類型菌株之特性則介於 *P. fluorescens* 與 *P. putida* 之間。所分離之葉表螢光假單胞菌大部份為腐生，然 A 與 B 類型及部份之 D3 類型菌株對馬鈴薯切片具軟腐能力，而對蔬菜組織之致腐能力，則較 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 為弱，此外 A 類型菌株以人工接種，亦可引起洋蔥內部之褐變。在所測試之螢光假單胞菌菌株中，有 9.2-35.1% 之菌株在 King's B、nutrient agar 及馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (PDA) 培養基上，可對 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*、*X. c.* pv. *vesicatoria*、*X. c.* pv. *citri* 及 *X. c.* pv. *mangiferacindicae* 之生長有明顯的抑制作用，而有 16.1% 之菌株可在 PDA 培養基上，對 *E. c.* subsp. *carotovora* 具抑制能力。

關鍵詞：螢光假單胞菌、拮抗作用、葉表細菌。

緒 言

螢光假單胞菌 (fluorescent pseudomonads) 為革蘭氏陰性、好氣性、具極生鞭毛之桿狀菌，在 King's B (KB) 培養基上能產生螢光色素 (9)，此類細菌可存在於自然界不同環境中 (17)。有些螢光假單胞菌為重要之植物病原細菌 (6)，其中 *Pseudomonas syringae* van Hall 包含 40 多個病原型 (pathovar)，寄主範圍廣泛，可危害作物之地上部，引起萎凋、潰瘍、葉斑、腫瘤及縮葉等許多不同類型之病徵。另有不具病原性之腐生螢光假單胞菌可存在於作物根表、根圍土壤及葉表上 (3,19)。近年來國外研究報告顯示，某些根棲之螢光假單胞菌菌株具有促進作物生長及增加產量的效果 (4,11)。此外，根棲之螢光假單胞菌亦被應用於土壤傳播性病原菌如 *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx and Olivier var. *tritici* Walker (16,22)、*Pythium* spp. (8,15)、*Fusarium* spp. (18) 及 *Erwinia carotovora*

(Jones) Bergey (21) 等所引起之病害防治上。而腐生之葉表螢光假單胞菌亦被應用於防治植物葉部病害，Teliz-ortiz 和 Burkholder (20) 從菜豆葉部分離到 *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula 菌株，在培養基上測試，可抑制 *Xanthomonas*、*Pseudomonas*、*Corynebacterium* 及 *Erwinia* 等細菌之生長，在植株上測試時，亦顯示施用 *P. fluorescens* 對 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, et al. 所引起之病害有防範作用。Austin 等人 (1) 由 *Lolium perenne* 之葉片上亦分離到對 *Drechslera dictyoides* (Frechleer) Shoemaker 病原菌具拮抗作用之 *P. fluorescens* 菌株，可影響其孢子發芽、發芽管生長以及病斑之擴展。Liao (12) 由番茄與甜椒果實表面分離到的表生細菌中篩選出對 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey 具拮抗能力之 *P. fluorescens* 與 *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula，其中 *P. putida* PP22 菌株在培養基上對 *Erwinia*、

Xanthomonas 及 *Pseudomonas* 等之多種植物病原細菌具有抑制作用，而將其施用於馬鈴薯薯塊上，可降低由 *E. c. subsp. carotovora* 與 *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson 所引起的細菌性軟腐病分別達 21 與 44%。Wilson 和 Lindow (23) 將 *P. fluorescens* A506 菌株施用在梨花之雌蕊上發現可降低 *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow, *et al.*, 之族群，進而減輕梨火傷病的發生。在臺灣有關葉表螢光假單胞菌之研究尙付闕如，本研究之目的主要在探討螢光假單胞菌在臺灣作物葉表之存在情形，其生理生化特性，及是否具有病原性，並探討其對葉部病原細菌是否具有拮抗作用等，以作為日後應用此類細菌進行防範作物病害之參考。

材料與方法

螢光假單胞菌之分離

自臺灣臺南、嘉義、雲林、南投、臺中及桃園等地作物栽培區，採集健康作物植株之葉片，視葉面積大小不同，以內徑 8 mm 之打孔器取 6-10 個葉片圓盤置於滅菌過之研鉢，以 2 ml 之無菌水充分研磨，取研磨汁液 100 μ l，以滅菌過之 L 型玻棒，均勻塗佈於 KB 培養基平板上，經 30 C 培養 24-48 小時後，將平板置於紫外線 (312 nm, Spectroline, Model TC-312A, U.S.A.) 下檢視，挑取產生螢光色素之菌落，劃線培養於 KB 培養基平板上，重複數次以單一菌落分離法純化菌株。菌株純化後即挑取單一菌落，移殖於 KB 培養基斜面上增量，經 30 C 培養 24 小時後，挑菌懸浮於裝有無菌水之有蓋螺旋試管中，於室溫保存，供進一步測試。

生理生化特性之測定

螢光假單胞菌之生理生化特性係參照 Fahy 和 Lloyd (6)，Fahy 和 Hayward (5) 及 Hildebrand 等人 (7) 之方法測定，測定之菌株為分離自作物葉表之 151 螢光假單胞菌菌株 (表一)，測試項目包括菌果聚糖之產生 (levan formation)，Kovacs 氧化酵素 (Kovacs' oxidase) 和精氨酸二水解酵素 (arginine dihydrolase) 之產生，硝酸鹽還原作用 (nitrate reduction)，白明膠水解作用 (gelatin hydrolysis)，41 C 生長測定 (growth at 41 C)，綠膿素 (pyocyanin) 之產生，卵磷脂分解酵素 (lecithinase) 之產生及 Tween 80 水解作用 (Tween 80 hydrolysis)。而碳素源之利用，是將待測菌株之單一菌落劃線培養於 M9 培養基 (14) 平板，經 30 C 培養 24 小時，重複二次作為前培養，再懸浮於無菌水中，調整濃度約為 10^6 cfu/ml；測試用之培養基為 M9 培養基去除 glucose，而添加經無菌過濾膜

(孔徑 0.22 μ m) 過濾之待測碳素源，使其濃度為 0.3%，並以不添加任何碳素源之 M9 培養基作為對照組，取上述懸浮液 10 μ l 滴加於培養基上，每菌株三重複，於 30 C 培養，持續觀察 14 天，與對照組比較並記錄其生長情形，若其生長明顯較對照組良好，則視該菌株可利用所測試之碳素源。所測試之碳素源包括 D-glucose、 β -alanine、2-keto-D-gluconic acid、D(+)-trehalose、sucrose、D(-)-tartaric acid、m-tartaric acid、D-sorbitol、L(+)-tartaric acid、propionic acid、L(+)-rhamnose、m-erythritol 及 ethanol (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA)。

菸草過敏性反應測定

將所欲測試之螢光假單胞菌菌株培養於 KB 培養基上，於 30 C 培養 24-48 小時後，挑取細菌將其懸浮於無菌水中，使其濃度約為 10^8 cfu/ml。另以注射針頭在菸草 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 之葉片上穿

表一、臺灣作物葉表分離之螢光假單胞菌菌株
TABLE 1. Strains of foliar fluorescent pseudomonads isolated from crops in Taiwan

Crop	No. of strains isolated	Locality	Strain
Cabbage	19	Tainan	YLFP 1-10
		Chiayi	YLFP 107-114
		Nantou	YLFP 169
Eggplant	6	Nantou	YLFP 75-80
Grapefruit	1	Chiayi	YLFP 51
Loofah	12	Chiayi	YLFP 119-130
Mango	14	Tainan	YLFP 21-22
		Chiayi	YLFP 52-53
		Yunlin	YLFP 54-63
Melon	3	Tainan	YLFP 72-74
Mungbean	16	Chiayi	YLFP 131-146
Mustard	7	Taoyuan	YLFP 35-41
Peach	6	Taichung	YLFP 81-86
Peanut	15	Chiayi	YLFP 147-161
Potato	8	Yunlin	YLFP 64-71
Radish	5	Taichung	YLFP 97-101
Rice	4	Taichung	YLFP 89
		Chiayi	YLFP 116-118
Snap bean	1	Taichung	YLFP 87
Sweet pepper	10	Tainan	YLFP 23
		Taoyuan	YLFP 42-50
Tomato	20	Tainan	YLFP 11-20
		Taoyuan	YLFP 24-33
Welsh onion	3	Taoyuan	YLFP 91-92
		Chiayi	YLFP 115
Ginger	1	Taichung	YLFP 102
Total	151		

刺一個小洞，以手指由葉之下表面輕輕按於小洞上，並以取下針頭之塑膠注射針筒吸取所製備之細菌懸浮液，由葉之上表面將其輕壓於小洞上，將細菌懸浮液緩緩注射滲透於小洞附近之葉片組織。於接種後24-48小時觀察葉片是否有過敏性反應產生(2)。

致病能力測試

測試螢光假單胞菌對蔬菜組織之致病能力，供試之蔬菜係由市場買回，接種部位則視蔬菜種類不同而有果實、鱗片、葉柄、塊莖或塊根。蔬菜組織洗淨後以75%酒精進行表面消毒，切取適當組織塊，以滅菌過之牙籤沾取經30°C培養於KB上24小時之螢光假單胞菌菌落，或培養於nutrient agar (NA) (Difco Laboratory, Detroit, Michigan, USA)之*E. c. subsp. carotovora* SP45菌落，於蔬菜組織上穿刺接種，並於接種部位滴加10 µl之無菌水，各處理置於培養皿內，以濕潤之濾紙維持高濕度，另以不沾菌之牙籤穿刺接種做為對照處理，每處理三重複於室溫下24-48小時後，觀察並記錄腐爛情形，以測定螢光假單胞菌之致病能力。

Pseudomonas aeruginosa 引起洋蔥內部褐變之測定

由市場買回之洋蔥洗淨後，以75%酒精進行表面消毒，將所分離之A類型*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula菌株配製成濃度約 10^8 cfu/ml之細菌懸浮液，以注射針取3 ml由洋蔥鱗莖頸部切口處注入，另以無菌水接種者作為對照，各處理置於塑膠袋內並以濕潤之衛生紙維持高濕度，每處理二重複，置於30°C下，於7-10天後將洋蔥鱗莖縱剖，觀察其病徵。

螢光假單胞菌對植物病原細菌拮抗能力之測定

將欲測試之螢光假單胞菌以無菌水調整至濃度為 10^8 cfu/ml之細菌懸浮液，以微量滴管分別吸取5 µl滴於KB、NA及馬鈴薯葡萄糖瓊脂(PDA) (Difco, Laboratory, Detroit, Michigan, USA)培養基平板上，每菌株重複二次，於30°C培養24小時後，再將NA培養基斜面上培養48-72小時之病原細菌，製備成濃度約 10^7 cfu/ml之細菌懸浮液，以滅菌過之玻璃細孔噴霧器噴佈一薄層於上述平板上，於30°C經48小時培養後，觀察螢光假單胞菌之菌落周圍有無抑制圈形成，並測量抑制圈大小。葉部植物病原細菌*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye XW138為國立中興大學植物病理研究所吳文川教授所提供，而*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson XC7、*X. campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye XV4、*Xanthomonas campestris* pv. *mangi-*

feraeindicae (Patel, Moniz and Kulkarni) Dye Xm1及*E. c. subsp. carotovora* SP45為本研究室保存之菌株。

鐵離子對螢光假單胞菌產生螢光色素及對植物病原細菌拮抗作用之影響

將無菌過濾膜(孔徑0.22 µm)過濾之FeCl₃溶液添加在KB與PDA (pH 7.0)培養基中，調整使其最後之濃度分別為1、10及100 ppm，依照前述方法，測定螢光假單胞菌在添加不同濃度FeCl₃之培養基上抑制病原細菌生長之能力，並將培養基置於紫外線(312 nm)下觀察拮抗細菌產生螢光色素之情形。

結 果

螢光假單胞菌之分離

螢光假單胞菌普遍存在於所分離之作物葉表，於臺南、嘉義、雲林、南投、臺中、桃園等不同地區18種作物葉表，計分離得到151株螢光假單胞菌(表一)。

臺灣螢光假單胞菌特性之類型

由作物葉表分離之151株螢光假單胞菌經生理生化特性測試結果顯示，此些螢光假單胞菌均可產生氧化酵素與精氨酸二水解酵素，但不引起菸草葉片之過敏性反應，大部分菌株不產生綠膿素，在41°C不能生長；而在菌果聚糖之產生、硝酸鹽還原作用、白明膠水解作用、卵磷脂酵素的產生、Tween 80水解作用及對馬鈴薯切片之致病能力等測定之反應上則有差異。又供試之151株螢光假單胞菌均能利用glucose與β-alanine，然對其他碳素源的利用能力，菌株間亦有差異(表二)。而依上述生理生化特性之差異情形，可將此151株螢光假單胞菌區分為A、B、C、D及E等五個類型，分別包括有9、45、61、26及10個菌株(表三)。

A類型菌株之特性與*Pseudomonas aeruginosa*相似，此類型菌株不產生菌果聚糖，在馬鈴薯切片上具致病能力，硝酸鹽還原與白明膠水解作用均呈正反應，並可產生綠膿素與卵磷脂酵素，可於41°C生長，對Tween 80之水解作用菌株間則有差異，又此類型菌株均可利用2-keto-D-gluconic acid、propionic acid及ethanol，而不能利用sucrose、m-tartaric acid、L(+)-tartaric acid、L(+)-rhamnose及m-erythritol，而大部分菌株不利用D(-)-tartaric acid與D-sorbitol。

B類型菌株之特性則與*Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens相似，此類型菌株可產生菌果聚糖及卵磷脂酵素，在馬鈴薯切片上具致病能力，硝酸鹽還原與白明膠水解作用均呈正反應，不產生綠膿素，在

表二、臺灣作物葉表螢光假單胞菌之特性

TABLE 2. Characteristics of 151 strains of foliar fluorescent pseudomonads isolated from crops in Taiwan

Characteristic	Reaction ¹
Fluorescence on KB	+
Levan	-(103)
Oxidase	+
Potato rot	-(90)
Arginine dihydrolase	+
Tobacco hypersensitivity	-
Nitrate reduction	-(85)
Gelatin hydrolysis	+(80)
Lecithinase	+(79)
Tween 80 hydrolysis	-(119)
Pyocyanin	-(142)
Growth at 41 C	-(142)
Utilization of:	
D-glucose	+
β-alanine	+
2-keto-D-gluconic acid	+(89)
D(+)-trehalose	-(88)
Sucrose	-(104)
D(-)-tartaric acid	-(144)
m-tartaric acid	+(85)
D-sorbitol	-(102)
L(+)-tartaric acid	-(122)
Propionic acid	+(143)
L(+)-rhamnose	-(147)
m-erythritol	-(109)
Ethanol	+(102)

¹ +: all strains positive, -: all strains negative, +(): number of strains showed positive reaction, -(): number of strains showed negative reaction.

41 C 不能生長，不能水解 Tween 80，又此類型菌株均可利用 2-keto-D-gluconic acid、D(+)-trehalose、sucrose、m-tartaric acid、D-sorbitol 及 propionic acid，均不能利用 D(-)-tartaric acid、L(+)-tartaric acid 及 L(+)-rhamnose，大部分菌株可利用 m-erythritol 及 ethanol。

C 類型菌株之特性與 *P. putida* 之特性相近，此類型菌株不產生菌果聚糖，在馬鈴薯切片上不具致腐能力，其硝酸鹽還原作用與白明膠水解作用均呈負反應，不產生綠膿素和卵磷脂酵素，在 41 C 不能生長，大部分菌株不能水解 Tween 80，又此類型菌株均不能利用 sucrose、D(-)-tartaric acid、D-sorbitol、L(+)-rhamnose 及 m-erythritol。大部分菌株可利用 propionic acid 而不能利用 2-keto-D-gluconic acid 與 D(+)-trehalose，此外在 m-tartaric acid、L(+)-tartaric acid 及 ethanol 之利用，菌株間亦有差異。

表三、臺灣作物葉表螢光假單胞菌特性之類型

TABLE 3. Characteristics differentiating groups of 151 strains of foliar fluorescent pseudomonads isolated from crops in Taiwan

Characteristic	Group ¹							Total
	A	B	C	D1	D2	D3	E	
Levan	- ²	+	-	+	-	-	-	
Potato rot	+	+	-	-	-	v	-	
Nitrate reduction	+	+	-	-	+	-	+	
Gelatin hydrolysis	+	+	-	+	+	+	-	
Pyocyanin	+	-	-	-	-	-	-	
Growth at 41 C	+	-	-	-	-	-	-	
Lecithinase	+	+	-	+	+	v	v	
Tween 80 hydrolysis	v	-	d-	-	v	v	v	
Utilization of:								
2-keto-D-gluconic acid	+	+	d-	+	+	v	d+	
D(+)-trehalose	v	+	d-	+	v	d-	v	
Sucrose	-	+	-	-	-	d-	-	
D(-)-tartaric acid	d-	-	-	-	-	d-	d-	
m-tartaric acid	-	+	v	v	-	v	v	
D-sorbitol	d-	+	-	v	-	d-	d-	
L(+)-tartaric acid	-	-	v	-	-	d-	v	
Propionic acid	+	+	d+	+	v	d+	d+	
L(+)-rhamnose	-	-	-	+	-	d-	-	
m-erythritol	-	d+	-	+	-	d-	-	
Ethanol	+	d+	v	v	-	v	v	
No. of strains	9	45	61	3	2	21	10	151

¹ Based on data from Palleroni (17) and Fahy and Lloyd (6), characteristics of strains in A, B, C and D groups were similar to those of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. marginalis*, *P. putida* and *P. fluorescens*, respectively, while strains in E group were with characteristics between those of *P. putida* and *P. fluorescens*. Strains in D group could be further differentiated into D1, D2 and D3 subgroups with characteristics similar to *P. fluorescens* biovars I, III and V, respectively.

² +: all strains positive, -: all strains negative, d+: 80% or more of strains positive, d-: 20% or less of strains positive, v: 21-79% of strains positive.

D 類型之菌株均能水解白明膠，不產生綠膿素，在 41 C 不能生長，而在菌果聚糖產生與硝酸鹽還原之反應上則有差異，可進一步將其分成 D1、D2 及 D3 等小群，其特性分別與 *P. fluorescens* biovar I、III 及 V 近似；其中 D3 類型對於各種碳素源的利用能力，菌株間差異甚大，且部份菌株在馬鈴薯切片上具致腐能力。

E 類型菌株則在硝酸鹽還原作用為正反應，白明膠水解作用為負反應，此類型菌株之特性係介於

表四、螢光假單胞菌於臺灣不同作物葉表之存在情形
TABLE 4. Foliar fluorescent pseudomonads isolated from various crops in Taiwan

Crop	Group ¹							Total
	A	B	C	D1	D2	D3	E	
Cabbage	0 ²	4	13	0	0	2	0	19
Eggplant	0	0	6	0	0	0	0	6
Grapefruit	0	0	0	1	0	0	0	1
Loofah	0	12	0	0	0	0	0	12
Mango	3	0	10	1	0	0	0	14
Melon	0	0	3	0	0	0	0	3
Mungbean	2	14	0	0	0	0	0	16
Mustard	0	0	5	0	0	2	0	7
Peach	0	0	1	0	1	0	4	6
Peanut	0	15	0	0	0	0	0	15
Potato	0	0	6	0	0	2	0	8
Radish	0	0	1	0	0	2	2	5
Rice	0	0	1	0	0	2	1	4
Snap bean	1	0	0	0	0	0	0	1
Sweet pepper	0	0	6	0	0	4	0	10
Tomato	0	0	8	1	1	7	3	20
Welsh onion	3	0	0	0	0	0	0	3
Ginger	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	9	45	61	3	2	21	10	151

¹ See footnote on Table 3.

² Number of strains isolated.

表五、葉表螢光假單胞菌於臺灣不同地區之存在情形
TABLE 5. Foliar fluorescent pseudomonads isolated from various localities in Taiwan

Locality	Group ¹							Total
	A	B	C	D1	D2	D3	E	
Tainan	2 ²	0	18	0	0	6	0	26
Chiayi	3	45	6	2	0	1	1	58
Yunlin	1	0	15	0	0	2	0	18
Nantou	0	0	7	0	0	0	0	7
Taichung	1	0	3	0	1	3	6	14
Taoyuan	2	0	12	1	1	9	3	28
Total	9	45	61	3	2	21	10	151

¹ See footnote on Table 3.

² Number of strains isolated.

*P. fluorescens*與 *P. putida*間，其對碳素源之利用能力則與 *P. fluorescens* biovar V及 *P. putida*相近。

在所分離之 18 種作物中，C 類型菌株可由其中 12 種作物分離到，D3 類型菌株可由 7 種作物上分離到，而其餘各類型菌株則僅由 2-4 種作物上分離得到(表四)，又在六個採集區中，C 類型菌株亦分佈最廣，普遍存在於各採集區，A 與 D3 類型菌株則分佈於五

個採集區，而 B 類型菌株則僅於嘉義地區分離而得(表五)。

螢光假單胞菌之致腐能力

逢機選取 A、B 及 D3 類型中，可引起馬鈴薯切片腐爛的菌株共 7 株，測試其在不同蔬菜組織上之致腐能力，結果顯示此些螢光假單胞菌之軟腐菌株，其致腐能力均較 *E. c. subsp. carotovora* SP45 菌株為弱，且各菌株對不同蔬菜組織之致腐能力亦有差異，供試之 7 個菌株皆可引起萵苣組織之腐爛，其中 B 類型之 YLFP119 與 YLFP133 菌株，及 D3 類型之 YLFP12 菌株可引起 8-9 種蔬菜組織軟腐，其餘則只能引起少數蔬菜組織之軟腐，其中 A 類型之菌株則於多種蔬菜組織上，常引起水浸狀而不造成軟腐(表六)。

Pseudomonas aeruginosa 對洋葱之致病性

所分離之 A 類型 9 個 *Pseudomonas aeruginosa* 菌株，經測試其在洋葱鱗莖上之致病性，結果顯示此些菌株於接種 7-10 天後，均可使洋葱鱗莖內部出現褐變的現象，並由接種部位向下擴展但不引起腐爛(圖一)，而由病組織亦可再分離到 *P. aeruginosa* 細菌。

螢光假單胞菌對植物病原細菌之拮抗特性

測試分離自作物葉表之螢光假單胞菌菌株對 *Xanthomonas campestris* 不同病原型之細菌是否具有拮抗能力，結果顯示在 KB、NA 及 PDA 培養基上有 9.2-35.1% 之菌株分別對 *X. c. pv. campestris* XC7、*X. c. pv. vesicatoria* XV4、*X. c. pv. citri* XW138 及 *X. c. pv. mangiferaeindicae* Xm1 等病原細菌之生長有明顯的抑制作用，而以在 KB 與 PDA 培養基上具明顯抑制作用之螢光假單胞菌菌株數較多(表七)。其中有部份菌株則可同時對所測試之三種以上的病原細菌具有明顯的抑制作用，如在 PDA 培養基上，C 類型之 YLFP4、6、10、14、15、16、18、19、56、59 菌株，以及 D 類型之 YLFP8、9、17 及 29 菌株等，則可同時對三種以上的病原細菌具有明顯之拮抗能力。而所測試之螢光假單胞菌菌株中，雖然在 KB 培養基上，對於 *E. c. subsp. carotovora* SP45 並無明顯之抑制作用，然在 PDA 培養基上則有 14(16.1%) 個菌株可明顯抑制 *E. c. subsp. carotovora* SP45 之生長。

鐵離子對螢光假單胞菌產生螢光色素及對植物病原細菌拮抗作用之影響

以 YLFP8、21、36、45、61 及 63 六個菌株，測試鐵離子對其產生螢光色素及抑制 *X. c. pv. campestris* XC7 與 *X. c. pv. vesicatoria* XV4 生長能力之影響，結果顯示各菌株產生螢光色素之能力均隨

表六、葉表螢光假單胞菌軟腐菌株對蔬菜組織之致腐能力

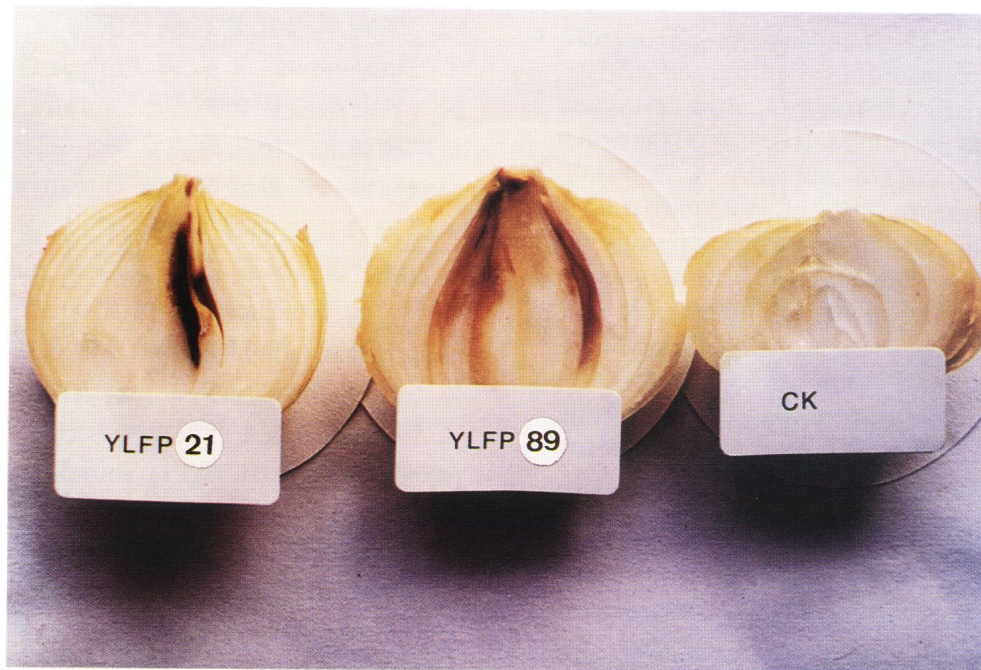
TABLE 6. Soft rot reaction of vegetables to selected strains of foliar fluorescent soft rot pseudomonads

Vegetable	Part inoculated	Strain							Ecc ² SP45
		YLFP ¹							
		8(D3)	12(D3)	21(A)	115(A)	119(B)	133(B)	161(B)	
Carrot	storage root	- ³	-	+	+	+	+	+	++
Celery	petiole	-	+	+	+	-	+	-	++
Chinese cabbage	petiole	WS	+	WS	WS	+	+	-	++
Eggplant	fruit	-	++	WS	WS	+	+	-	++
Leek	leaf sheath	-	-	-	WS	-	-	-	++
Lettuce	petiole	+	+	+	+	+	+	+	++
Onion	bulb scale	-	-	WS	WS	WS	WS	-	++
Potato	tuber	++	++	+	+	+	+	+	++
Radish	storage root	+	++	WS	WS	+	+	+	++
Sweet pepper	fruit	-	+	WS	WS	+	+	-	++
Sweet potato	storage root	-	-	+	+	-	-	-	++
Taro	corm	-	+	-	+	+	-	-	+
Welsh onion	leaf sheath	-	-	WS	WS	+	+	+	+

¹ See footnote on Table 3.

² Ecc SP45: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP45.

³ - ~ ++: non-rotted ~ rotted intensively, ws: water-soaked only.



圖一、*Pseudomonas aeruginosa* YLFP 21與 YLFP 89 菌株所引起之洋葱內部褐變(接種後 10 天之病徵)。

Fig. 1. Internal browning of onion 10 days after inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* YLFP 21 and YLFP 89.

表七、葉表螢光假單胞菌對植物病原細菌生長之抑制作用

TABLE 7. Inhibitory effect of foliar fluorescent pseudomonads (FP) on the growth of phytopathogenic bacteria

Pathogen	No. of FP strains tested	Inhibitory effect on		
		King's B	NA	PDA
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> XC7	87	21(24.1) ¹	8(9.2)	19(21.8)
<i>X. c.</i> pv. <i>vesicatoria</i> XV4	77	27(35.1)	17(22.1)	24(27.6)
<i>X. c.</i> pv. <i>citri</i> XW138	87	19(21.8)	11(12.6)	23(26.4)
<i>X. c.</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> Xml	87	30(34.5)	14(16.1)	28(32.2)
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> SP45	87	0(0)	1(1.1)	14(16.1)

¹ No. of fluorescent pseudomonads strains showed distinct inhibitory effect (inhibition zone > 5 mm) on the growth of pathogen tested; number in parenthesis was the percentage.

表八、鐵離子對螢光假單胞菌螢光色素產生及對 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* XC7 與 *X. c.* pv. *vesicatoria* XV4 生長抑制能力之影響TABLE 8. Effect of iron on the fluorescent pigment production and on the inhibition of the growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* XC7 and *X. c.* pv. *vesicatoria* XV4 by fluorescent pseudomonads (FP)

FP strain	Concentration of FeCl ₃ (ppm)	P·on King's B ¹	Inhibition zone (mm) ²			
			XC7		XV4	
			KB	PDA	KB	PDA
YLFP8	0	+++	10	13	13	10
	1	+++	11	12	15	8
	10	-	10	12	11	10
	100	-	10	5	11	4
YLFP21	0	+	12	16	13	16
	1	-	8	15	11	14
	10	-	9	11	9	9
	100	-	9	7	10	9
YLFP36	0	+++	5	1	15	0
	1	+	0	1	9	0
	10	-	0	1	0	0
	100	-	0	0	0	0
YLFP45	0	+++	8	8	13	8
	1	++	6	8	15	8
	10	-	7	11	13	13
	100	-	7	8	12	13
YLFP61	0	++	10	3	11	3
	1	+	8	2	8	5
	10	-	0	3	0	2
	100	-	0	4	0	2
YLFP63	0	+++	13	2	14	2
	1	++	12	2	11	2
	10	-	0	2	2	2
	100	-	0	0	3	2

¹ P: fluorescent pigment production examined under the UV-lamp with 312 nm wave length; - ~ +++: no fluorescent pigment produced ~ strong fluorescent pigment produced.

² Mean of two replicates; inhibition zone was measured 48 hr after incubation.

KB 培養基中鐵離子濃度的提高而降低，當 KB 培養基中的 FeCl₃ 濃度達 10 ppm 時，供試菌株均不產生螢光色素。其中 YLFP36、61 及 63 菌株在 KB 培養基上對 XC7 與 XV4 的抑制能力亦隨鐵離子的添加而減弱，當 FeCl₃ 濃度達 10 ppm 時，三菌株對 XC7 與 XV4 的抑制

能力大部份均消失；而 YLFP8、21 及 45 菌株在 KB 培養基添加 FeCl₃ 達 100 ppm 時，對 XC7 與 XV4 的抑制能力則未受明顯之影響，且其在 PDA 培養基上的抑制能力均較 YLFP36、61 及 63 菌株為強(表八)。

討 論

螢光假單胞菌廣泛存在於自然環境中(17)，本研究於台灣不同作物葉表亦常可分離到螢光假單胞菌，顯示其普遍存在於台灣作物葉表。測試分離之151株螢光假單胞菌，其中有61個菌株對馬鈴薯切片具有軟腐能力，這些菌株分別與 *P. aeruginosa*、*P. marginalis* 及 *P. fluorescens* biovar V 之特性相近，在實驗室培養皿內，這些菌株對多種蔬菜組織亦具有致腐能力，但其致腐能力則較 *E. c. subsp. carotovora* 菌株為弱。這些菌株在田間及特殊環境下，如採收後運銷貯藏期，是否會引起蔬菜組織之軟腐及其重要性如何？則仍有待評估。然 Liao 和 Wells (13)，曾由市場中採回之蔬菜軟腐罹病組織分離到128個具果膠分解能力之軟腐細菌，其中有43%為螢光假單胞菌，顯示具果膠分解能力之螢光假單胞菌與貯藏期蔬菜之軟腐有密切關係。*P. aeruginosa* 可產生綠膿素，可於41°C下生長，常為腐生，有時可為人類之病原菌(17)。本研究分離之A類型 *P. aeruginosa* 菌株除了可引起馬鈴薯切片之軟腐外，經測試亦可引起洋蔥鱗莖內部之褐變，*P. aeruginosa* 菌株可引起洋蔥鱗莖內部褐變在國外已有類似之報導(6)。本研究分離之螢光假單胞菌，除上述可引起馬鈴薯切片軟腐之 *P. aeruginosa*、*P. marginalis* 及少數 *P. fluorescens* biovar V 之菌株外，其餘菌株由於均可產生氧化酵素與精氨酸二水解酵素及不引起菸草葉片之過敏性反應，可能為不具病原性之腐生螢光假單胞菌(6,7,17)，這些菌株主要分別與 *P. putida* 及 *P. fluorescens* biovar I、III 及 V 之特性相近。

Pseudomonas putida 與 *P. fluorescens* 細菌，由於菌株間變異甚大，在分類上仍不甚明確，因而此類細菌有時以 *P. fluorescens*-*P. putida* complex 稱之(7)。本研究分離所得之菌株在生理生化特性上之差異亦甚大，其鑑定主要係參照 Palleroni (17) 與 Fahy 和 Lloyd (6) 對 *P. fluorescens* 與 *P. putida* 的分類方法進行，將菌果聚糖之產生、馬鈴薯切片之致腐能力、硝酸鹽還原及白明膠水解作用均呈負反應者歸為C類型，而此類型之菌與 *P. putida* 之特性相近。D類型菌株之特性則與 *P. fluorescens* 相近，此類型之菌均能水解白明膠，而以菌果聚糖產生及硝酸鹽還原作用反應之差異，進一步區分成D1、D2及D3三小群，其特性分別與 *P. fluorescens* biovar I、III 及 V 相近。少數菌株由於硝酸鹽還原作用為正反應，白明膠水解作用為負反應，其特性介於 *P. fluorescens* 與 *P. putida* 之間，故暫將其歸於E類型。由本研究顯示 *P. putida* 可由12種作物上分離得到，且廣泛分布於六處採集區，顯示其可能為臺灣作物葉表之主要螢光假單胞菌。

本研究分離之部分葉表螢光假單胞菌對 *E. c. subsp. carotovora* 與幾種重要的 *Xanthomonas* 屬病原細菌，於培養基上之生長有明顯之抑制作用，且有些菌株可同時抑制多種病原細菌之生長，其中屬於腐生之 *P. fluorescens* 與 *P. putida* 之菌株，值得繼續探討將其應用於病害防治之可行性。葉表螢光假單胞菌對於葉部病原細菌之拮抗作用機制隨菌株之不同而有差異，有些可能與其產生銹鐵物質(siderophore)有關，使病原菌得不到足夠鐵離子而生長受阻(10,18)，例如供試之YLFP36、61與63菌株於KB培養基中添加鐵離子後，則影響其對病原菌之拮抗能力，然YLFP8、21及45菌株則添加鐵離子於培養基後並未明顯影響其拮抗能力，其對病原菌之拮抗作用，則可能與其它機制如抗生物質之產生有關(8,22)。

謝 辭

本研究承國科會 NSC82-0409-B005-035 經費補助，特此誌謝。

引用文獻

1. Austin, B., Dickinson, C. H., and Goodfellow, M. 1977. Antagonistic interactions of phylloplane bacteria with *Drechslera dictyoides* (Drechsler) Shoemaker. *Can. J. Microbiol.* 23:710-715.
2. Baker, C. J., Atkinson, M. M., and Collmer, A. 1987. Concurrent loss in Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* of the ability to induce the hypersensitive response and host plasma membrane K^+/H^+ exchange in tobacco. *Phytopathology* 77:1268-1272.
3. Blakeman, J. P., and Brodif, I. D. S. 1976. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. Pages 529-557 in: *Microbiology of Aerial Plant Surface*. C. H. Dickinson, and T. F. Preece, eds. Academic Press, New York, U.S.A., 669 pp.
4. Burr, T. J., Schroth, M. N., and Suslow, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68:1377-1383.
5. Fahy, P. C., and Hayward, A. C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. Pages 337-378 in: *Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide*. P. C. Fahy and G. J. Persley, eds. Academic Press Australia, N. S. W., Australia, 393 pp.
6. Fahy, P. C., and Lloyd, A. B. 1983. *Pseudomonas*: The fluorescent pseudomonads. Pages 141-188 in: *Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide*. P. C. Fahy and G. J. Persley, eds. Academic Press Australia, N. S. W., Australia, 393 pp.

7. Hildebrand, D. C., Schroth, M. N., and Sands, D. C. 1988. *C. Pseudomonas*. Pages 60-80 in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd. ed. N. W. Schaad, ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A., 157 pp.
8. Howie, W. J., and Suslow, T. V. 1991. Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:393-399.
9. King, E. O., Ward, M. D., and Raney, E. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44:301-307.
10. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schorth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature 286:885-886.
11. Kloepper, J. W., Schroth, M. N., and Miller, T. D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70:1078-1082.
12. Liao, C. H. 1989. Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. Plant Dis. 73:223-226.
13. Liao, C. H., and Wells, J. M. 1987. Diversity of pectolytic, fluorescent pseudomonads causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. Phytopathology 77:673-677.
14. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A., 545 pp.
15. Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D., and Defago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. Phytopathology 82:190-195.
16. Ownley, B. H., Weller, D. M., and Thomashow, L. S. 1992. Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Phytopathology 82:178-184.
17. Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula. Pages 141-199 in: Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Vol. 1. N. R. Krieger, and J. G. Holt, eds. William and Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A., 964 pp.
18. Scher, F. M., Dupler, M., and Baker, R. 1984. Effect of synthetic iron chelates on population densities of *Fusarium oxysporum* and the biological control agent *Pseudomonas putida* in soil. Can. J. Microbiol. 30:1271-1275.
19. Suslow, T. V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. Pages 187-223 in: Phytopathogenic Prokaryotes. Vol. 1. M. S. Mount, and G. H. Lacy, eds. Academic Press, New York, U.S.A., 541 pp.
20. Teliz-Ortiz, M., and Burkholder, W. H. 1960. A strain of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas phaseolicola* and other bacterial plant pathogens. Phytopathology 50:119-123.
21. Xu, G. W., and Gross, D. C. 1986. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. Phytopathology 76:414-422.
22. Weller, D. M., Howie, W. J., and Cook, R. J. 1988. Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. Phytopathology 78:1094-1100.
23. Wilson, M., and Lindow, S. E. 1993. Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. Phytopathology 83:117-123.

ABSTRACT

Tzeng, K. C., Lin, Y. C., and Hsu, S. T. 1994. Foliar fluorescent pseudomonads from crops in Taiwan and their antagonism to phytopathogenic bacteria. Plant Pathol. Bull. 3:24-33. (Graduate Institute of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

A total of 151 strains of foliar fluorescent pseudomonads (FP) were isolated from various crops at different localities in Taiwan. All these strains produced oxidase and arginine dihydrolase, but did not induce hypersensitive reaction on tobacco leaves. They were differentiated into A, B, C, D and E groups based on their physiological and biochemical characteristics and their soft rot ability on potato slice. Among them strains in C group appeared to be the most dominant; they were readily isolated from various crops and localities. Strains in A group were similar to *Pseudomonas aeruginosa* while strains in B, C and D groups were similar to *P. marginalis*, *P. putida* and *P. fluorescens*, respectively. In addition, strains in D group could be further differentiated into D1, D2 and D3 subgroups with characteristics similar to *P. fluorescens* biovars I, III and V, respectively. Strains in E group were with characteristics between those of *P. putida*

and *P. fluorescens*. Most strains of foliar FP tested were saprophytic. However, all strains in A, B and some strains in D3 subgroup could induce soft rot on potato slice, but they were less virulent than *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on vegetable tissues. In addition, strains in A group could induce internal browning of onions by artificial inoculation. Among the foliar FP strains tested, 9.2–35.1% of strains showed distinct inhibitory effect on the growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. c.* pv. *vesicatoria*, *X. c.* pv. *citri* and *X. c.* pv. *mangiferaeindicae* on King's B, nutrient agar and potato dextrose agar (PDA) media, while 16.1% of strains showed distinct inhibitory effect on the growth of *E. c.* subsp. *carotovora* on PDA medium.

Key words: fluorescent pseudomonads, antagonism, foliar bacteria.