

葉表螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP14 對甜椒細菌性斑點病之防治潛力

蔡洵龍¹ 陳敏瑞¹ 徐世典¹ 曾德賜¹ 曾國欽^{1,2}

1 台中市 國立中興大學植物病理學系

2 聯絡作者，電子郵件：kctzeng@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-22854633

接受日期：中華民國 93 年 7 月 7 日

摘要

蔡洵龍、陳敏瑞、徐世典、曾德賜、曾國欽 2004. 葉表螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP14 對甜椒細菌性斑點病之防治潛力. 植病會刊 13:191-200.

由對 *Xanthomonas* 屬數種病原細菌具拮抗能力之葉表螢光假單胞菌菌株中，選出 *Pseudomonas putida* YLFP14 菌株，並評估其對甜椒細菌性斑點病之防治潛力。此菌株在 PDA 培養基上對甜椒細菌性斑點病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, Xav) 所有供試 27 個菌株之生長具抑制作用、不產生氰酸、且對三元硫酸銅、克枯爛與硫酸銅具抗性。在植物生長箱之試驗顯示，*P. putida* YLFP14 分別與三種 Xav 甜椒生理小種混合接種於葉片後，可顯著降低甜椒細菌性斑點病之發生。以糖蜜、酵母粉及黃豆粉為基質 (MYS 基質) 於醱酵槽中進行 *P. putida* YLFP14 之大量液態培養，於 30°C 培養 30 小時，菌量可達 $2-5 \times 10^9$ cfu/ml。以此醱酵液態培養物 (MYS-YLFP14 菌液) 處理於甜椒葉片上，亦同樣有降低細菌性斑點病發生之效果，且其效果較處理同菌量以無菌水懸浮之 *P. putida* YLFP14 懸浮液為佳。MYS-YLFP14 菌液保存在低溫 (4°C) 10 個月後，仍能維持高菌量且不影響其防治效果，但在 30°C，則其菌量快速下降。高濕有利於 *P. putida* YLFP14 在甜椒葉表族群量之維持，又蛋白胨或 D-葡萄糖酸之添加，更可增加 *P. putida* YLFP14 之族群量。添加蛋白胨於接種源並未增加 *P. putida* YLFP14 防治細菌性斑點病之效果，但添加 D-葡萄糖酸則顯著提高防治效果。

關鍵詞：螢光假單胞菌、茄科細菌性斑點病、甜椒、生物防治

緒言

螢光假單胞菌 (fluorescent pseudomonads) 為革蘭氏陰性之桿狀菌，在 King's B 培養基上可產生螢光色素，此類細菌廣泛存在於自然界中⁽²²⁾，其中有些為可群集於植物根部，並可促進植物生長之根棲細菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, 簡稱 PGPR)，主要以 *Pseudomonas fluorescens* 及 *P. putida* 為主⁽²⁴⁾。此外根棲之螢光假單胞菌亦常被應用於土壤傳播性病原菌：*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*^(30, 31)、*Pythium ultimum*⁽¹³⁾ 及 *Fusarium* spp.^(18, 26) 等所引起之植物病害防治上。螢光假單胞菌 *P. fluorescens* 及 *P. putida* 除存在於植物根部、根圍土壤外，亦可存在於植物葉表，有些葉表之菌株亦被應用於葉部病害之防治上，例如，Gnanamanickam and Mew⁽¹²⁾ 自水稻葉表分離到對稻熱病菌 *Pyricularia oryzae* 具拮抗之 *P. fluorescens* 4-15 及 7-14 菌株，於培養基上除可抑制 *P.*

oryzae 孢子發芽外，施用於水稻 UPLRi-5 品種亦可分別降低葉稻熱病害之發生。Wilson 及 Lindow⁽³²⁾ 由梨葉分離到對梨火傷病菌 *Erwinia amylovora* 具明顯抑制能力之 *P. fluorescens* A506 菌株，將其處理於梨花後可降低梨火傷病菌於梨花雌蕊之族群量。Lindow 等人⁽¹⁹⁾ 進一步將 A506 菌株施用於田間梨樹上，除了可降低梨火傷病外，亦可降低霜害之發生。

由 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 引起之茄科植物細菌性斑點病，主要危害番茄和甜椒之莖、葉柄、葉片及果實，造成品質及產量之下降，為甜椒及番茄栽培區頗具威脅性之病害^(14, 17)。甜椒是台灣重要蔬菜之一，甜椒細菌性斑點病於田間經常發生，為台灣重要之細菌性病害^(1, 2)，早期常以鏈黴素加以防治^(9, 10)，之後亦常以銅劑混合錳乃浦或鋅錳乃浦進行防治⁽⁴⁾，然抗藥性菌株之出現使其防治效果降低⁽²⁰⁾。此外，由於化學藥劑的長期使用，對環境及生態之衝擊甚大，因此應用拮抗微生物

防治作物病害以減少化學藥劑使用，遂成爲各國努力研究發展的方向。

曾等人⁽³⁾之研究顯示，台灣作物葉表上普遍存在腐生之 *P. putida* 及 *P. fluorescens*，其中部份菌株在培養基上對 *Xanthomonas* 及 *Erwinia* 屬病原菌具明顯之抑制能力。本研究就其中不引起菸草過敏性反應、不具致腐能力、且在 PDA 培養基上對 *Xanthomonas* 屬數種病原菌具拮抗能力之菌株中，選出具有防治甜椒細菌性斑點病潛力之 *P. putida* YLFP14 菌株，並於生長箱內測試其對甜椒細菌性斑點病防治之效果。

材料與方法

供試菌株

本研究測試用由葉部分離之茄科植物細菌性斑點病菌及葉表螢光假單胞菌菌株，爲國立中興大學植物病理學系病原細菌研究室所保存之菌種(表一)。於進行各項試驗時，先將保存於無菌蒸餾水中之螢光假單胞菌菌株劃線培養於 King's B (KB; K₂HPO₄, 1.5 g; MgSO₄ · 7H₂O, 1.5 g; Difco proteose peptone No.3, 20 g; glycerol, 10 ml; agar, 15 g; distilled water, 1 L; pH 7.2) 培養基上⁽¹⁶⁾，置於 30°C 下培養 1-2 天後，於 UV 下檢視，挑取產生螢光色素之單一菌落，於 KB 培養基平板上增量，置於 30°C 下培養 24-48 小時，將其懸浮於無菌水中製備成細菌懸浮液，以光電比色計測試並調整至供試之濃度；茄科植物細菌性斑點病菌菌株於進行各項測試時，則先將其劃線培養於 nutrient agar (NA; Difco nutrient agar powder, 23 g; distilled water, 1 L; pH 7.2) 培養基中，置於 30°C 下培養 48-72 小時後，挑取單一菌落，再劃線培養於 NA 培養基平板上增量，置於 30°C 下培養 48 小時後，將其懸浮於無菌水中製備成細菌懸浮液，依上述方法調整至供試之濃度。

供試植物

供試之甜椒爲藍星品種，將其種子播種於盛裝泥炭土介質之保麗龍育苗穴盤(12×24 格)中，每一小格(2.5×2.5 公分)播一粒種子，置於網室中，於長出兩片真葉後，移植栽種於直徑 10 公分盛裝有泥炭土之黑色塑膠軟盆內，長至具 6-8 片展開葉之甜椒植株則作爲接種試驗用。

螢光假單胞菌對茄科植物細菌性斑點病菌之拮抗能力測試

以滅菌過牙籤沾取供試之螢光假單胞菌各菌株之單一菌落，分別穿刺於 NA、KB 及 potato dextrose agar (PDA, Difco potato dextrose agar powder 32 g, distilled water 1 L; pH 7.2) 培養基上，於 30°C 下培養 24 小時後，再用滅菌過

表一、本研究使用之菌株

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Host or plant origin	Location	Source ¹	Race ²
<i>X. axonopodis</i> pv <i>vesicatoria</i>				
Xv 2	Tomato	Taichung	TARI	P3
Xv 7	Tomato	Taitung	TARI	P3
Xv 12	Tomato	Yunlin	TARI	P2
Xv 13	Tomato	Taichung	TARI	P2
Xv 30	Tomato	Tainan	TARI	P2
Xv 34	Pepper	Kaohsiung	TARI	P1
Xv 37	Chilli	Pingtung	TARI	P1
Xv 38	Chilli	Kaohsiung	TARI	P1
Xv 42	Pepper	Kaohsiung	TARI	P1
Xv 55	Pepper	Nantou	TARI	P1
Xv 59	Pepper	Tainan	TARI	P1
Xv 63	Pepper	Yunlin	TARI	P1
Xv 64	Pepper	Yunlin	TARI	P2
Xv 65	-	Taitung	TARI	P2
Xv 86	Tomato	Nantou	TARI	P3
Xv 95	Tomato	Nantou	TARI	P3
Xv 96	Tomato	Nantou	TARI	P3
Xv 103	Tomato	Nantou	TARI	P1
Xv 105	Tomato	Nantou	TARI	P1
XVT 36	Tomato	Hualien	AVRDC	T1P3
XVT 40	Tomato	Hualien	AVRDC	T1P1
XVT 64	Tomato	Ilan	AVRDC	T1P3
XVT 74	Tomato	Kaohsiung	AVRDC	T2P3
XVT 110	Tomato	Taichung	AVRDC	T1P1
XVT 113	Tomato	Tainan	AVRDC	T1P2
XVT 158	Tomato	Nantou	AVRDC	T1P1
XVT 190	Tomato	Hsinchu	AVRDC	T1P3
<i>P. fluorescens</i>				
YLFP8	Cabbage	Tainan		
YLFP9	Cabbage	Tainan		
<i>P. putida</i>				
YLFP4	Cabbage	Tainan		
YLFP6	Cabbage	Tainan		
YLFP10	Cabbage	Tainan		
YLFP14-16	Tomato	Tainan		
YLFP18	Tomato	Tainan		
YLFP56	Mango	Yunlin		
YLFP59	Mango	Yunlin		

¹ TARI: Taiwan Agricultural Research Institute; AVRDC: Asian Vegetable Research and Development Center; Strains of *P. fluorescens* and *P. putida* were isolated by Tzeng et al.⁽³⁾

² P1: pepper race1; P2: pepper race2; P3: pepper race3; T1: tomato race1; T2: tomato race2

之玻璃細孔噴霧器噴佈以無菌水製備之 Xav 細菌懸浮液 (約 1×10^8 cfu/ml) 於上述平板上, 於 30°C 經 48 小時後, 觀察螢光假單胞菌菌落周圍有無抑制圈形成, 測量並記錄螢光假單胞菌菌落邊緣至抑制圈邊緣之距離。

氰酸產生之測定

葉表螢光假單胞菌氰酸之產生係依據 Wei 等人⁽²⁸⁾ 所述之方法測定, 以移殖環挑取供試之螢光假單胞菌菌株, 劃線於每公升含 4.4g 甘胺酸 (glycine, Sigma Chemical Co., MO) 之 tryptic soy agar (TSA; Difco tryptic soy agar powder, 40 g; distilled water, 1 L; pH 7.2) 培養基上, 並以浸有苦味酸試劑 (picric acid, 2.5 g; Na_2CO_3 , 12.5 g; distilled water, 1 L) 之濾紙置於培養皿之蓋子內面, 培養皿則以石蠟膜密封, 經 30°C 培養 3 天後, 檢視濾紙呈色情形, 並依呈色情形將產生氰酸能力分為四級: 黃色為不產生氰酸, 淡棕色 (light brown) 為產生氰酸能力弱, 棕色 (brown) 為產生氰酸能力中等, 及赤棕色 (reddish brown) 為產生氰酸能力強。

對化學藥劑之感受性

將測試之藥劑配成高濃度之母液, 再依據藥劑推薦之濃度吸取適當之量加入 KB 培養基中, 製成含特定稀釋倍數或濃度藥劑之平板。測試時以移殖環挑取螢光假單胞菌單一菌落, 劃線培養於含測試藥劑之 KB 培養基上, 於 30°C 下培養 48 小時後, 以螢光假單胞菌是否生長來判定各菌株對藥劑之感受性。測試之藥劑種類、製造廠商及稀釋倍數或濃度如下: 嘉賜銅 (kasugamycin+copper oxychloride, 81.3% 可濕性粉劑, 大勝化學工業股份有限公司, 1000X)、多保鏈黴素 (thiophanate-methyl+streptomycin, 68.8% 可濕性粉劑, 日本曹達株式會社, 1000X)、鏈四環黴素 (streptomycin+tetracycline, 10% 混合可溶性粉劑, 全台農藥有限公司, 1000X)、氫氧化銅 (cupric hydroxide, 77% 可濕性粉劑, 英青貿易有限公司, 400X)、鏈黴素 (streptomycin, 12.5% 溶液, 豈農農化廠股份有限公司, 1000X)、三元硫酸銅 (tribasic copper sulfate, 27.12% 水懸粉劑, 日星實業股份有限公司, 500X)、克枯爛 (tecloftalam, 10% 可濕性粉劑, 日商三共股份有限公司台北分公司, 1000X)、鋅錳乃浦 (mancozeb, 85% 可濕性粉劑, 台灣杜邦股份有限公司, 400X)、鋅錳滅達樂 (Mancozeb+metalaxyl, 58% 混合可濕性粉劑, 惠光化學股份有限公司, 400X) 及硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 林純藥工業株式會社, 濃度 500 ppm)。

Pseudomonas putida YLFP14 菌株在醱酵槽中之培養及其培養菌液之保存

依上述拮抗能力、氰酸產生及對化學藥劑感受性試驗

結果, 選出在 PDA 培養平板上對所有測試之 Xav 菌株有抑制能力、不產生氰酸且抗三元硫酸銅、克枯爛與硫酸銅之 *P. putida* YLFP14 菌株作為進一步供試菌株。以 1% (w/v) 糖蜜、0.5% (w/v) 酵母粉及 0.75% (w/v) 黃豆粉為基質 (簡稱 MYS 基質) 加入蒸餾水配製成 4 公升之培養液, 置於醱酵槽 (Bioflo III Batch/continuous fermentor, New Brunswick Scientific Co., Inc, NJ) 中, 調整其 pH 值為 7.0, 並經高壓滅菌後, 將預先培養於 523 (sucrose, 10 g; casein hydrolysate, 8 g; yeast extract, 4 g; K_2HPO_4 , 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; distilled water, 1 L; pH 7.2) 液態培養基⁽¹⁵⁾ 之 *P. putida* YLFP14 菌株 200 ml 倒入醱酵槽內, 設定系統溫度為 30°C 、轉速 200 rpm, 培養 30 小時後之培養物稱之為 MYS-YLFP14 菌液。將此 MYS-YLFP14 菌液裝於滅菌過之血清瓶內分別置於 4°C 、 20°C 及 30°C 下保存, 於固定時間後取出, 利用無菌水經適當倍數之稀釋後, 以全自動迴旋式細菌接種儀 (Whitley Automatic Spiral Plater, Don Whitley Scientific Limited, England) 塗抹於 KB 培養基上, 測試 *P. putida* YLFP14 菌量之變化。此外在 MYS-YLFP14 菌液保存效果較佳之 4°C 下, 每二個月取出測量 *P. putida* YLFP14 菌量之變化亦同時測試其對細菌性斑點病防治之效果。

Pseudomonas putida YLFP14 及 MYS-YLFP14 防治甜椒細菌性斑點病之試驗

將甜椒細菌性斑點病菌包含甜椒第一生理小種 (pepper race 1, Xv42 及 Xv59 菌株)、第二生理小種 (pepper race 2, Xv64 菌株) 及第三生理小種 (pepper race 3, Xv7 及 XVT40 菌株) 之細菌懸浮液 (5×10^8 cfu/ml) 分別與 *P. putida* YLFP14 菌株懸浮液 (5×10^8 cfu/ml) 等體積混合後, 添加展著劑 SIL WET L-77 (0.05% v/v, OSi specialties, NY), 以浸葉接種方法進行接種試驗。將具 6-8 片展開葉之甜椒植株葉片浸於上述製備之混合液中 30-40 秒, 再將浸葉接種過之植株利用 PE 塑膠袋套袋, 以維持 RH 100%, 並置於生長箱內 (日溫 28°C , 夜溫 24°C , RH 70-85%, 光照 12hr、 $90 \mu\text{mol per } \mu\text{A /sec} \cdot \text{m}^2$), 5 日後解開套袋, 再經 3 日後記錄其發病情形。此外亦將保存於 4°C 中經不同時間之 MYS-YLFP14 菌液 (稀釋至含 *P. putida* YLFP14 菌量為 5×10^8 cfu/ml) 與等體積之甜椒細菌性斑點病菌懸浮液 (5×10^8 cfu/ml) 混合, 再添展著劑 SIL WET L-77 (0.05% v/v) 後, 並依上述之浸葉接種法進行試驗。植株發病程度以相對發病指數 (relative disease index) 表示。相對發病指數為 (處理組的平均病斑數 ÷ 對照組的平均病斑數) $\times 100\%$, 每一處理接種 4 棵甜椒植株, 每一植株細數並記錄第 5 至第 8 片展開葉之病斑數, 並計算所接種之 4 棵甜椒植株共 16 片葉之平均病斑數; 對照組為僅接種甜椒細菌性斑點病菌者。所獲得之相對發病指

數，再以鄧肯氏多變域測驗法 (Duncan's multiple range test，以95%信賴區間為分析標準) 分析各處理間之差異。

添加營養物對 *Pseudomonas putida* YLFP14 防治甜椒細菌性斑點病之影響

以 Biolog GN Microplate 系統 (Biolog, Inc., Hayward, CA) 測試 *P. putida* YLFP14 與 Xav 菌株對95種碳源利用情形，選出 *P. putida* YLFP14 可利用但 Xav 菌株無法利用之碳源 D-葡萄糖酸 (D-gluconic acid, Sigma Chemical Co., MO)，並與細菌培養常用之蛋白胨 (peptone, Difco, MD) 營養源作為本研究供試之營養物，分別測試此兩種營養物對 *P. putida* YLFP14 防治甜椒細菌性斑點病之影響。依上述浸葉接種方法將 Xav XVT40 細菌懸浮液 (5×10^8 cfu/ml) 與 *P. putida* YLFP14 菌株懸浮液 (5×10^8 cfu/ml) 等體積混合後，添加 0.5% 蛋白胨或 D-葡萄糖酸，接種於甜椒葉片並記錄與分析其發病情形，以了解此兩種營養物質之添加是否影響 *P. putida* YLFP14 對甜椒細菌性斑點病之防治。接種用之懸浮液皆加入展著劑 SIL WET L-77 (0.05% v/v)。

Pseudomonas putida YLFP14 於甜椒葉表上之族群變化

以無菌水製備之 *P. putida* YLFP14 細菌懸浮液 (5×10^8 cfu/ml) 及稀釋 500 倍之 MYS-YLFP14 菌液加入展著劑 SIL WET L-77 (0.025% v/v) 後，以手動式噴霧器均勻噴佈於 32 棵甜椒葉片上，至有水滴落為止，其中 16 棵植株以 PE 塑膠袋套袋，以維持 RH 100%，另 16 棵植株則無套袋處理，置於生長箱內；此外亦將 *P. putida* YLFP14 細菌懸浮液 (5×10^8 cfu/ml)，加入展著劑 SIL WET L-77 (0.025% v/v) 及 0.5% (w/v) 蛋白胨或 0.5% (w/v) D-葡萄糖酸，以手動噴霧器均勻噴佈於甜椒葉片後，套袋置於生長箱內，經 1 小時、1、3 及 5 天後分別取出 4 棵植株，並取下植株第 5 至第 8 片之展開葉片，置入含 100ml 無菌水之 250ml 三角瓶內以震盪器震盪 20 分鐘，經適當之稀釋後取 0.1ml 塗抹於 King's B 培養基平板上，於 30°C 培養 48 小時後，計算其菌量，而洗滌後之葉片則以葉片面積測定器 (Leaf Area Meter CI-202; CID Inc., WA) 測其葉表面積，以測定單位面積葉片上 *P. putida* YLFP14 之菌量 (cfu/cm²)。

結 果

葉表螢光假單胞菌菌株之拮抗能力、氰酸產生及農藥抗性

在培養基上供試之螢光假單胞菌 11 個菌株對 27 個 Xav 菌株之拮抗能力有差異，*P. putida* YLFP10 菌株在

表二、葉表螢光假單胞菌氰酸之產生及對甜椒細菌性斑點病菌生長之抑制作用

Table 2. Hydrogen cyanide (HCN) production and inhibition of the growth of 27 strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) on King's B (KB)、nutrient agar (NA) and potato dextrose agar (PDA) media by foliar fluorescent pseudomonads (FP)

FP strains	No. of Xav strains ¹ (%)			HCN production ²
	KB	NA	PDA	
YLFP4	11 (40.7)	0 (0)	20 (74.1)	-
YLFP6	6 (22.2)	0 (0)	10 (37.0)	+++
YLFP8	11 (40.7)	5 (18.5)	16 (59.3)	+
YLFP9	2 (7.4)	0 (0)	25 (92.6)	++
YLFP10	18 (66.7)	20 (74.1)	21 (77.8)	++
YLFP14	1 (3.7)	0 (0)	27 (100)	-
YLFP15	11 (40.7)	16 (59.3)	20 (74.1)	++
YLFP16	6 (22.2)	0 (0)	27 (100)	-
YLFP18	2 (7.4)	9 (33.3)	27 (100)	++
YLFP56	1 (3.7)	0 (0)	22 (81.5)	+++
YLFP59	0 (0)	17 (63.0)	25 (92.6)	-

¹ No. of Xav strains distinctly inhibited (inhibition zone >5mm); number in parenthesis is the percentage of strains inhibited.

² HCN was detected by Wei's method⁽²⁸⁾; +++: strong; ++: moderate; +: weak; -: none

King's B 及 NA 培養基上，可分別對 18 個 (66.7%) 及 20 個 (74.1%) Xav 菌株具抑制作用；*P. putida* YLFP14、YLFP16 及 YLFP18 等 3 個菌株在 PDA 培養基上可抑制所有測試 27 個 Xav 菌株之生長 (表二)。供試之螢光假單胞菌 11 個菌株中，除 *P. putida* YLFP4、YLFP14、YLFP16 及 YLFP59 等 4 個菌株不產生氰酸外，其餘菌株皆可產生氰酸，其中 *P. putida* YLFP6 及 YLFP56 產氰酸能力最強，*P. putida* YLFP9、YLFP10、YLFP15 及 YLFP18 次之，而 *P. putida* YLFP8 氰酸產生能力則較弱 (表二)。對農藥之感受性測試結果顯示，供試之螢光假單胞菌 11 個菌株對克枯爛 (1000X) 與三元硫酸銅 (500X) 兩種藥劑皆具有抗性，9 (72.7%) 個菌株對 500ppm 硫酸銅具有抗性，以及 3 (27.3%) 個菌株對鏈四環黴素與鋅錳滅達樂有抗性，而所有或大部份測試菌株對其餘藥劑則為感受性 (表三)。

Pseudomonas putida YLFP14 及 MYS-YLFP14 對甜椒細菌性斑點病之防治效果

在接種試驗中，以手動噴霧器將無菌水製備之 Xav 懸浮液噴佈於甜椒葉面，並將植株套袋置於日溫 28°C、夜溫 24°C 之生長箱內 2 至 5 日後，發現雖可引起病徵，但僅在心葉部位之葉片所形成之病斑較為明顯、病斑數較多外，其餘部位之葉片則無病徵或產生之病斑數少或不穩定，若以添加展著劑 SIL WET L-77 之浸葉接種方法接種並分別套袋 2-5 日，結果發現套袋 5 日之病害發展較佳，可使上位之展開葉片上之病斑出現較為均勻，且病斑數亦

表三、葉表螢光假單胞菌對不同農藥之感受性

Table 3. The sensitivity of 11 strains of foliar fluorescent pseudomonads to agrochemicals

Chemical	Dilution fold or concentration	No. (and %) of resistant strains ¹
Mancozeb (80% W.P.)	500X	0 (0)
Mancozeb+metalaxyl (58% W.P.)	400X	3 (27.3)
Tecloftalam (10% W.P.)	1000X	11 (100)
Tribasic copper sulfate (27.12% F.P.)	500X	11 (100)
Kasugamycin+copper oxychloride (81.3% W.P.)	1000X	1 (9.1)
Streptomycin+tetracycline (10% S.P.)	1000X	3 (27.3)
Thiophanate-methyl+streptomycin (68.8% W.P.)	1000X	1 (9.1)
Streptomycin (12.5% S.)	1000X	1 (9.1)
Cupric hydroxide (77% W.P.)	400X	1 (9.1)
Cupric sulfate	500ppm	9 (72.7)

¹ Bacterial strains were cultured on King's B medium plates containing agrochemicals. No growth= sensitive; Growth= resistant.

表四、在植物生長箱中甜椒葉片同時接種 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (甜椒生理小種一，二或三) 與 *Pseudomonas putida* YLFP14 或MYS-YLFP14 菌液後細菌性斑點病之發病指數

Table 4. Disease index of bacterial spot on leaves of sweet pepper inoculated with mixture of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (pepper race 1, 2 or 3) and *Pseudomonas putida* YLFP14 or MYL-YLFP14 in plant growth chamber tests

Treatment ¹	Relative disease index (%) ²				
	Race 1		Race 2	Race 3	
	Xv42	Xv59	Xv64	Xv7	XVT40
X+YLFP14	44.67 b	40.75 b	41.33 b	40.50 b	34.89 b
X+MYS-YLFP14	22.12 c	25.01 b	18.08 c	n ³	25.51 b
X(CK)	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a

¹ Sweet pepper plants were inoculated by immersing intact leaves for 30-40 sec in different inoculum mixtures as indicated. The inoculated plants were covered with plastic bags for 5 days, and the number was recorded 3 days after removal of the plastic bag. X+YLFP14: cell suspension of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* Xv42, Xv59, Xv64, Xv7 or XVT40 (5×10^8 cfu/ml) was mixed with equal volume of cell suspension of *P. putida* YLFP14 (5×10^8 cfu/ml); X+MYS-YLFP14: cell suspension of each strain of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* was mixed with equal volume of MYL-YLFP14 which was diluted to contain 5×10^8 cfu/ml of *P. putida* YLFP14; MYL-YLFP14 was liquid culture of *P. putida* YLFP14 grown in a fermentor containing molasses, yeast powder and soybean powder (MYS) as substrates for 30hrs at 30°C; X(CK): *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* only.

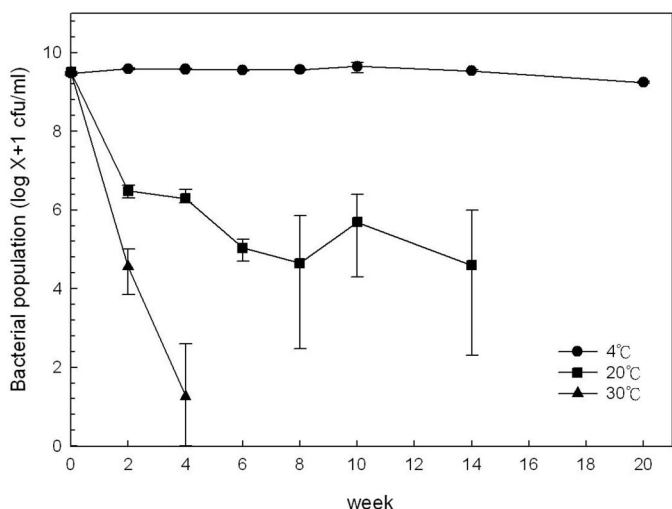
² Relative disease index was the percentage of mean number of lesions observed in a treatment relative to mean number of lesions formed in the treatment X(CK), in which the disease index was set as 100%. Values in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

³ n : not tested.

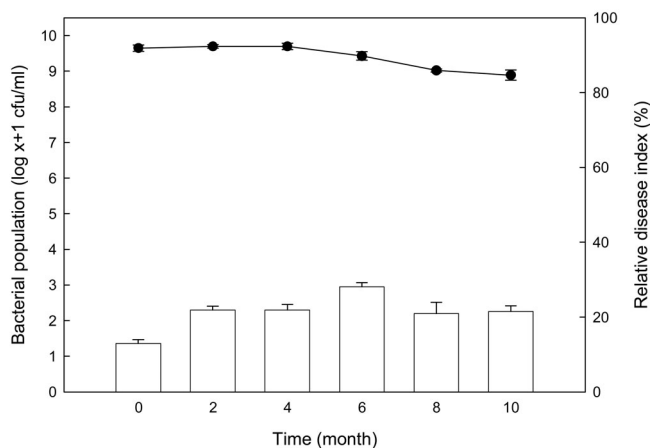
較多，而下位葉仍較不感病，病斑數較少甚至無病徵產生。因此，本防治試驗皆採用添加展著劑 SIL WET L-77 之浸葉接種方法接種，於接種後套袋 5 天，記錄第 5 至第 8 展開葉片所形成之病斑數，並計算其相對病害指數。試驗結果顯示，混合 *P. putida* YLFP14 細菌懸浮液 (5×10^8 cfu/ml 菌量) 之處理，皆可降低由 Xav 甜椒第一、第二或第三生理小種分別引起之甜椒葉部細菌性斑點病之發生，其相對病害指數可由對照組之 100% 降低至 34.89-44.67%。而 MYL-YLFP14 菌液 (含 *P. putida* YLFP14 菌量 5×10^8 cfu/ml) 處理者，則可降低其相對病害指數至 18.08-25.51% (表四)。顯示在相同菌量下，MYL-YLFP14 菌液較 *P. putida* YLFP14 懸浮液對甜椒細菌性斑點病具有較高之防治效果。

Pseudomonas putida YLFP14 在 MYL-YLFP14 菌液中於不同溫度下之菌量變化

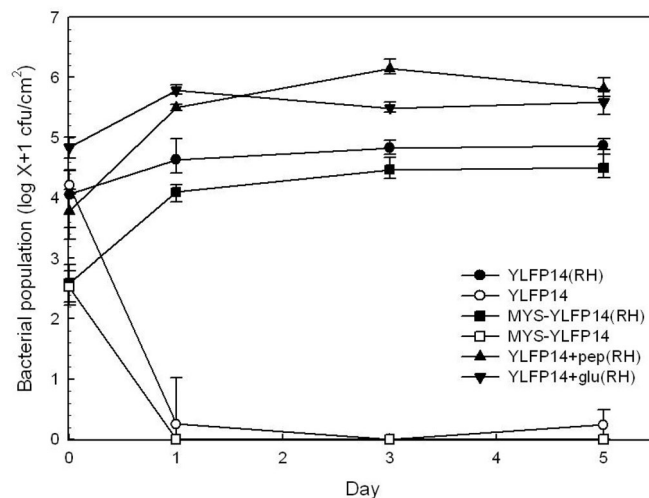
P. putida YLFP14 在醱酵槽中以 MYL 基質培養，於 30°C 培養 30 小時後，菌量可達 $2-5 \times 10^9$ cfu/ml，此培養物即為 MYL-YLFP14 菌液，將其置於 4°C，經 20 週後，*P. putida* YLFP14 菌量仍可維持 10^9 cfu/ml，然於 20°C，經 14 週後其菌量降至 10^5 cfu/ml，而於 30°C，經 4 週後，菌量則降至 10^2 cfu/ml 以下 (圖一)，顯示低溫較能維持 MYL-YLFP14 菌液中 *P. putida* YLFP14 菌量。而在 4°C 下保存之 MYL-YLFP14 菌液在 10 個月後，其 *P. putida* YLFP14 菌量仍能維持 10^8 cfu/ml 以上，且仍有明顯之防治效果 (圖二)。



圖一、醱酵槽製備之 MYS-YLFP14 菌液中於不同溫度保存下 *Pseudomonas putida* YLFP14 之族群變化。
Fig 1. Population changes of *Pseudomonas putida* YLFP14 in MYS-YLFP14 liquid culture after storage at different temperatures. MYS-YLFP14 liquid culture was prepared from YLFP14 grown in a fermentor using molasses, yeast powder and soybean powder (MYS) as substrates for 30 hrs at 30°C.



圖二、醱酵槽製備之 MYS-YLFP14 菌液於 4°C 保存後 *Pseudomonas putida* YLFP14 之菌量變化及其對甜椒葉部細菌性斑點病之防治。
Fig 2. Population changes of *P. putida* YLFP14 in MYS-YLFP14 liquid culture after storage at 4°C (lines) and efficacies of the stored MYS-YLFP14 on the control of bacterial spot of sweet pepper (bars). For disease control experiments, sweet pepper plants were inoculated with mixture of cell suspension of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 (5×10^8 cfu/ml) and MYS-YLFP14 (5×10^8 cfu/ml) after storage at equal volume. Relative disease index was the percentage of the mean number of lesions observed in a treatment relative to mean number of lesions formed in the control treatment (inoculated with XVT40 only) in which the disease index was set as 100%.



圖三、*Pseudomonas putida* YLFP14 於不同條件下在甜椒葉表之族群變化。
Fig 3. Population changes of *Pseudomonas putida* YLFP14 on the leaves of sweet pepper under different conditions. YLFP14(RH): Plants were sprayed with cell suspension of YLFP14 (5×10^8 cfu/ml) and covered with plastic bags for maintaining RH 100%; YLFP14: Plants were sprayed with cell suspension of YLFP14 (5×10^8 cfu/ml) and were not covered with plastic bags; MYS-YLFP14(RH): Plants were sprayed with MYS-YLFP14 containing YLFP14 (5×10^6 cfu/ml) and covered with plastic bags for maintaining RH 100%; MYS-YLFP14: Plants were sprayed with MYS-YLFP14 containing YLFP14 (5×10^6 cfu/ml) and were not covered with plastic bags; YLFP14+pep: Plants were sprayed with cell suspension of YLFP14 (5×10^8 cfu/ml) containing 0.5% peptone and covered with plastic bags for maintaining RH 100%; YLFP14+glu: Plants were sprayed with cell suspension of YLFP14 (5×10^8 cfu/ml) containing 0.5% D-gluconic acid and covered with plastic bags for maintaining RH 100%. The cell suspension of YLFP14 was prepared from the culture grown on King's B medium plate for 24-48 hrs, and MYS-YLFP14 was the liquid culture of YLFP14 grown in a fermentor containing molasses, yeast powder and soybean powder (MYS) as substrates for 30 hrs at 30°C.

Pseudomonas putida YLFP14 於甜椒葉表上之族群變化

將 *P. putida* YLFP14 噴佈於甜椒葉片後，葉面菌量約為 1×10^4 cfu/cm²，在不套袋情形下，其族群迅速降低，經一日後，其族群降至 10 cfu/cm² 以下；而在套袋(高濕)之環境下則有利其存活，套袋 5 日後其族群量仍可維持約 7×10^4 cfu/cm² (圖三)。以 MYS-YLFP14 菌液噴佈於甜椒葉片上，於不套袋情形下，其族群亦迅速降低；而在套袋(高濕)之環境下除有利其菌量之維持外，亦發現經套袋一日後其族群量明顯增加，由 10^2 cfu/cm² 增殖為 10^4 cfu/cm² (圖三)。

蛋白胨或 D-葡萄糖酸等營養物質之添加有助於提高

表五、添加蛋白胨或 D-葡萄糖酸對 *Pseudomonas putida* YLFP14 防治甜椒葉部細菌性斑點病之影響

Table 5. Effect of peptone or D-gluconic acid on the control of bacterial spot on leaves of sweet pepper by *Pseudomonas putida* YLFP14

Treatment ¹	Relative disease index (%) ²
X+YLFP14	38.83 c
X+YLFP14+Pep	48.71 c
X+Pep	94.32 b
X+YLFP14+Glu	18.38 d
X+Glu	91.91 b
X(CK)	100.00 a

¹ Sweet pepper plants were inoculated with different inoculum mixtures as indicated. X+YLFP14: cell suspension of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 (5×10^8 cfu/ml) was mixed with equal volume of cell suspension of *P. putida* YLFP14 (5×10^8 cfu/ml); X+YLFP14+Pep: cell suspension of XVT40 (5×10^8 cfu/ml) was mixed with equal volume of cell suspension of YLFP14 and containing 0.5% peptone; X+Pep: cell suspension of XVT40 (5×10^8 cfu/ml) containing 0.5% peptone; X+YLFP14+Glu: cell suspension of XVT40 (5×10^8 cfu/ml) was mixed with equal volume of cell suspension of YLFP14 (5×10^8 cfu/ml) containing 0.5% D-gluconic acid; X+Glu: cell suspension of XVT40 (5×10^8 cfu/ml) containing 0.5% D-gluconic acid; X(CK): cell suspension of XVT40 (5×10^8 cfu/ml) only.

² Relative disease index was the percentage of mean number of lesions observed in a treatment relative to mean number of lesions formed in the treatment X(CK), in which the disease index was set as 100%. Values in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

P. putida YLFP14 於甜椒葉片上之族群量。將含 0.5% w/v 蛋白胨或 D-葡萄糖酸之 *P. putida* YLFP14 細菌懸浮液噴佈於甜椒葉片上，甜椒植株經套袋後 *P. putida* YLFP14 於甜椒葉片上之菌量皆可增殖至 10^5 - 10^6 cfu/cm² (圖三)。

蛋白胨或 D-葡萄糖酸對 *Pseudomonas putida* YLFP14 防治甜椒細菌性斑點病之影響

在 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 與 *P. putida* YLFP14 之混合接種菌液內分別添加 0.5% 蛋白胨或 D-葡萄糖酸後進行甜椒細菌性斑點病之防治試驗。結果顯示，添加 0.5% 蛋白胨並未顯著增加 *P. putida* YLFP14 對病害之防治效果，然添加 0.5% D-葡萄糖酸，則有助於 *P. putida* YLFP14 對病害之防治(表五)。

討 論

螢光假單胞菌 *P. fluorescens* 及 *P. putida* 常被應用於作物根部^(25, 29) 及葉部病害⁽²³⁾ 之防治上，然於台灣應用此類細菌於作物病害防治之研究尚少。本研究之結果顯示，螢光假單胞菌亦有防治甜椒細菌性斑點病之潛力。螢光假單

胞菌防治病害之效果因菌株之不同而有差異，而篩選適當之菌株為應用生物防治方法成功與否之重要關鍵。本研究除選取對 Xav 菌株具拮抗能力之螢光假單胞菌進行測試外，也考慮其是否產生氰酸及對農藥尤其銅劑是否具有抗性。螢光假單胞菌許多菌株具有產生氰酸之能力⁽⁶⁾，氰酸之產生在有些螢光假單胞菌，如 *P. fluorescens* CHA0 防治煙草黑腳病上扮演重要角色⁽²⁷⁾，但對有些植物亦可能造成傷害使植株生長不良^(5, 7)。而銅劑常被推薦用於作物細菌性斑點病之防治，未來在綜合防治策略上，生物防治製劑如與銅劑等配合施用時，則此生物防治菌須具有抗銅性才能發揮其效果。本研究選出之 *P. putida* YLFP14 菌株，除在 PDA 培養基上對所有測試之 27 個 Xav 菌株之生長具有抑制作用，且不產生氰酸外，對三元硫酸銅、克枯爛與硫酸銅等皆具抗性，日後在田間實際應用時應有較好之適應性。

在植物生長箱內，應用 *P. putida* YLFP14 之防治試驗顯示其可降低甜椒細菌性斑點病之發病程度，且對 Xav 甜椒第一、第二及第三生理小種所引起的斑點病均具有防治效果，值得進一步將其研發成生物製劑以供病害防治之用。為獲得大量穩定之 *P. putida* YLFP14 來源，本研究初步以糖蜜、酵母粉及黃豆粉等較經濟之基質以液態醱酵方式進行大量培養，經 30°C、30 小時後，*P. putida* YLFP14 之菌量可達 $2-5 \times 10^9$ cfu/ml。以液態醱酵培養之 MYS-YLFP14 菌液應用於防治試驗，可顯著降低甜椒細菌性斑點病之發生，其效果較同菌量以無菌水懸浮之 *P. putida* YLFP14 懸浮液為佳，經稀釋 1000 倍後仍具防病效果(未發表資料)。然在常溫下(20°C 與 30°C) MYS-YLFP14 之 *P. putida* YLFP14 菌量很快下降，目前 MYS-YLFP14 菌液需於低溫(4°C) 環境下保存方可維持其中 *P. putida* YLFP14 之菌量，在 4°C 保存 10 個月之 MYS-YLFP14 菌液對甜椒細菌性斑點病仍有顯著降低之效果。因此，以此 MYS-YLFP14 菌液為基礎，發展適當的製劑以利保存及應用，仍待進一步研究。

微生物在葉表因受多種環境因子之影響，不易存活或僅以較低的族群量存在⁽⁸⁾，而拮抗菌株在葉表族群的變化則會影響生物防治之效能⁽³²⁾。*P. putida* YLFP14 在葉表上需要高溼的環境(RH 100%) 才能維持其在葉表之族群，反之，其族群則快速下降。由於溫溼度亦為茄科植物細菌性斑點病發生重要因子^(11, 21)，甜椒細菌性斑點病在高溼環境下較易發生。由本研究中得知，高溼條件對 *P. putida* YLFP14 族群量之維持與增殖亦有利，由於螢光假單胞菌之生長速率較甜椒細菌性斑點病菌為快，推測可能因此使得 *P. putida* YLFP14 得以表現其防病效果；雖然 *P. putida* YLFP14 族群在低溼環境下快速下降，但先噴佈 *P. putida* YLFP14 後 72 小時內仍有防治甜椒細菌性斑點病的效果(未發表資料)，因此未來施用 *P. putida* YLFP14 來防治甜椒細菌性斑點病時，可定時重複噴佈於甜椒葉片上，以提

高其防治效能。另外，研究中顯示添加蛋白胨及D-葡萄糖酸營養物質皆有助於 *P. putida* YLFP14 於葉表上族群之增加，然只有添加D-葡萄糖酸有助於 *P. putida* YLFP14 防治甜椒細菌性斑點病，其原因可能是 *P. putida* YLFP14 可利用D-葡萄糖酸，而 Xav 病原菌不能利用，以致使 *P. putida* YLFP14 之族群在甜椒葉表上較居優勢，而有助於病害之防治。有關營養物質之添加對螢光假單胞菌防治病害之影響問題，值得進一步探討。

螢光假單胞菌大多被應用於防治由真菌引起的根部或土壤傳播病害，而本研究顯示，*P. putida* YLFP14 具有防治葉部細菌性病害之潛力。由於本研究之防治試驗係於控制條件下進行，其環境較為單純，因此 *P. putida* YLFP14 於田間是否對甜椒細菌性斑點病仍具防治效果，需要進行田間試驗予以証實，有關影響 *P. putida* YLFP14 防治效果之因子及田間防治試驗目前已在進行。

謝辭

本研究承行政院農業委員會計畫補助，特致謝忱。

引用文獻

- 許秀惠. 1989. 台灣茄科細菌性斑點病菌之定性及感染番茄葉組織之顯微觀察. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 62pp。
- 許秀惠、徐世典、曾國欽. 1990. 台灣茄科植物細菌性斑點病菌之特性、病原型與血清型. 植保會刊 32:59-69。
- 曾國欽、林元春、徐世典. 1994. 台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。
- Adaskaveg, J. E., and Hine, R. B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 69:993-996.
- Alstrom, S., and Burns, R. G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biol. Fertil. Soils* 7:232-238.
- Askeland, R. A., and Morrison, S. M. 1983. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1802-1807.
- Bakker, A. W., and Schippers, B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Bio. Biochem.* 19:451-457.
- Beattie, G. A. 2002. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. Page 1-26 in: *Phyllosphere microbiology*. S. E. Lindow, E. I. Hecht-Poinar, and V. J. Elliott ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 395 pp.
- Conover, R. A. 1955. Control of bacterial spot in tomato fields with streptomycin-tetramycin spray. *Plant Dis. Repr.* 39:611-615.
- Crossan, D. F., and Krupka, L. R. 1955. The use of streptomycin on pepper plants for the control of *Xanthomonas vesicatoria*. *Plant Dis. Repr.* 39:480-483.
- Diab, S., Bashan, Y., Okon, Y., and Henis, Y. 1982. Effects of relative humidity on bacterial scab caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper. *Phytopathology* 72:1257-1260.
- Gnanamanickam, S. S., and Mew, T. W. 1992. Biological control of blast disease of rice (*Oryza sativa* L.) with antagonistic bacteria and its mediation by a *Pseudomonas* antibiotic. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 58:380-385.
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70:712-715.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., and Zitter, T. A. 1991. Compendium of tomato disease. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 73pp.
- Kado, C. I., and Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976.
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 22:301-307.
- Lai, M., and Watson, T. 1973. Bacterial spots of tomato and pepper in California. *Plant Dis. Repr.* 57:258-259.
- Leeman, M., Van Plet, J. A., Hendrickx, M. J., Scheffer, R. J., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1995. Biocontrol of Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85:1301-1305.
- Lindow, S. E., McGourty, G., and Elkins, R. 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology* 86:841-848.
- Macro, G. M., and Stall, R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to

- copper. *Plant Dis.* 67:779-781.
21. Nayudu, M. V., and Walker, J. C. 1960. Bacterial spot of tomato as influenced by temperature and by age and nutrition of the host. *Phytopathology* 50:360-364.
 22. Palleroni, N. J. 1984. Family I. Pseudomonadaceae Genus I. *Pseudomonas*. Page 141-199 in: Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. N. R. Krieg and J. G. Holt ed., Vol. I. William and Wilkins, Baltimore, M. D. USA, 946 pp.
 23. Spurr, H. W., and Knudsen, G. R. 1985. Biological control of leaf diseases with bacteria. Page 45-62 in: Biological Control on the Phylloplane. C. E. Windels and S. E. Lindow ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 169 pp.
 24. Suslow, T. V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. Page 187-223 in: Phytopathogenic Prokaryotes. M. S. Mount and G. H. Lacy ed., Vol. I. Academic press, Inc., New York, USA, 541 pp.
 25. Thomashow, L. S. 1996. Biological control of plant root pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:343-7.
 26. Vidhyasekaran, P., and Muthamilan, M. 1995. Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* 79:782-786.
 27. Voisard, C., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic condition. *EMBO J.* 8:351-358.
 28. Wei, G., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81:1508-1512.
 29. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
 30. Weller, D. M., and Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73:463-469.
 31. 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.
 32. 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

Tsai, Y. L.¹, Chen, M. J.¹, Hsu, S. T.¹, Tzeng, D. D. S.¹, and Tzeng, K. C.^{1,2} 2004. Control potential of foliar *Pseudomonas putida* YLFP14 against bacterial spot of sweet pepper. Plant Pathol. Bull. 13:191-200. (¹Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung; ² Corresponding author, E-mail: kctzeng@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22854633)

Pseudomonas putida YLFP14 selected from foliar fluorescent pseudomonads was evaluated for its potential to control bacterial spot on leaves of sweet pepper caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in a growth chamber. The selection of *P. putida* YLFP14 was based on its ability to inhibit the growth of all 27 tested strains of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* on PDA medium, inability to produce hydrogen cyanide, and resistance to tribasic copper sulfate and tecloftalam and cupric sulfate. The disease severity of the bacterial spot was significantly reduced when leaves were inoculated with the mixture of *P. putida* YLFP14 and *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (pepper race 1, 2 or 3). For mass production, *P. putida* YLFP14 was cultured in a fermentor containing molasses, yeast and soybean powders (MYS) as substrates. The population level of *P. putida* YLFP14 could reach to 10^9 cfu/ml 30 hr after incubation at 30°C. Application of this fermentation liquid culture (MYS-YLFP14 liquid culture) also reduced the disease, and its control efficacy was better than cells of *P. putida* YLFP14 suspended in sterile distilled water at the same inoculum concentration. The population of *P. putida* YLFP14 in the MYS-YLFP14 liquid culture maintained high level when stored at 4°C, whereas it declined rapidly after storage at 30°C. The MYS-YLFP14 liquid culture stored at 4°C for 10 month was still effective in the disease control. At high humidity (RH 100%), the population of *P. putida* YLFP14 on leaf surfaces of sweet pepper increased one day after introduction, and remained almost at the same level (10^4 - 10^5 cfu/cm²) afterward, but at low humidity (RH 70-85%), it rapidly decreased. Addition of peptone or D-gluconic acid to the suspension of *P. putida* YLFP14 increased the population of *P. putida* YLFP14 on the leaves at high RH, however, only addition of D-gluconic acid significantly enhanced the disease control efficacy of *P. putida* YLFP14.

Key words : bacterial spot, biocontrol, sweet pepper, fluorescent pseudomonads