

螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP14 之 抗生作用與其防治甜椒細菌性斑點病之關係

蔡洵龍¹ 林元春¹ 徐世典¹ 曾國欽^{1,2}

1 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、林元春、徐世典、曾國欽. 2004. 螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP14 之抗生作用與其防治甜椒細菌性斑點病之關係 植病會刊 13:201-210.

螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP14 可抑制茄科細菌性斑點病菌在培養基上之生長，也能有效降低甜椒細菌性斑點病之發生。本研究探討 *P. putida* YLFP14 之抗生作用在防治甜椒細菌性斑點病上之重要性。利用跳躍子 Tn5 誘導 *P. putida* YLFP14 突變，獲得單一 Tn5 插入而喪失抗生活性之突變菌株 YLFP14-A378。此突變菌株在培養基中的生長曲線及在甜椒葉表上的族群變化與其野生型菌株 *P. putida* YLFP14 並無差異。防治試驗顯示此突變菌株對甜椒細菌性斑點病仍具防治能力，然在使用較低濃度時，其防病效果較野生型菌株顯著降低。此外，突變菌株在甜椒葉片上降低細菌性斑點病菌族群的能力，亦較野生型菌株為低。由上述結果表示 *P. putida* YLFP14 產生之抗生物質，在防治甜椒細菌性斑點病上具重要性，但尚有其他因子參與防病機制。*P. putida* YLFP14 在馬鈴薯葡萄糖培養基 (PDA) 上，對茄科細菌性斑點病菌具抗生活性，但在營養瓊脂培養基 (NA) 上則無，在 NA 內只有添加所測試七種碳源中的葡萄糖，才能表現抗生活性，又 PDA 培養基之 pH 值為 6 或 9 時及培養溫度為 24°C 時可得較強之拮抗能力。

關鍵詞：螢光假單胞菌、細菌性斑點病、甜椒、抗生作用、生物防治

緒言

螢光假單胞菌 (fluorescent pseudomonads) 常被應用於病害防治上，如 Weller 等人⁽³⁰⁾ 研究發現，抑病土壤中存在的螢光假單胞菌，可抑制 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*，且施用分離得到之螢光假單胞菌，亦可有效抑制小麥全蝕病 (take-all disease)；Wilson 及 Lindow⁽³²⁾ 將分離得到之 *Pseudomonas fluorescence* A506 菌株施用於梨花之雄蕊上，可降低 *Erwinia amylovora* 族群量，因而減少梨火傷病之發生；Guo 等人⁽⁹⁾ 利用所分離到之 *Pseudomonas* sp. J3 於溫室及田間能有效地降低番茄青枯病的發生，亦可使番茄產量增加。為有效應用螢光假單胞菌，許多學者研究其防病機制，包括於植株上之群集能力、促進植物生長、誘發植物抗病及抗生作用等^(3, 6, 8, 18-20, 28)，其中抗生物質在多種病害防治上扮演重要角色。

螢光假單胞菌所分泌的代謝物質種類繁多，其中有些

抗生物質可廣泛地抑制許多植物病原菌的生長⁽⁷⁾，如 2,4-diacetylphloroglucinol 對 *G. graminis* var. *tritici*⁽²⁷⁾、*Thielaviopsis basicola*⁽¹⁴⁾、*Rhizoctonia solani*⁽¹⁰⁾ 及 *Pythium ultimum*⁽²⁴⁾ 等病原菌皆具抑制能力，又如 phenazines⁽²⁹⁾、pyoluteorin⁽¹¹⁾ 及 pyrrolnitrin⁽²¹⁾ 等物質亦有抑制植物病原的能力。為證明螢光假單胞菌所產生的抗生物質，在植物病害防治上之重要性，許多研究者利用跳躍子 (transposon) 突變方式，獲得失去抑制病原菌能力之突變菌株，再測定其防治效果是否喪失。Vincent 等人⁽²⁷⁾ 利用 Tn5 突變 *P. aureofaciens* Q2-87 菌株，所獲得失去抗生物質 2,4-diacetylphloroglucinol 產生能力之突變菌株，亦失去對小麥全蝕病的防病效果；Thomashow 及 Weller⁽²⁶⁾ 以 Tn5 突變 *P. fluorescens* 2-79，所獲得不產生 phenazine-1-carboxylic acid 抗生物質之突變菌株，亦失去防治小麥全蝕病的能力，且失去產生抗生物質能力之突變菌株，亦降

低其在土壤中之存活能力⁽²²⁾；而 Chin-A-Woeng 等人⁽⁵⁾ 以 Tn5 突變 *P. chlororaphis* PCL1391 菌株，所獲得不產生 phenazine-1-carboxamide 之突變菌株，亦失去防治 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 所引起之番茄根腐病的能力。螢光假單胞菌產生抗生物質的能力會受到 pH 值、溫度、氧氣濃度、碳氮源成份及濃度等培養條件的影響，使得其拮抗病原菌的能力有差異^(4, 12, 24)。因此選擇適合抗生物質產生之培養條件，以製備生物防治製劑可能有助於增加螢光假單胞菌對植物病害的防治效果。

蔡等人⁽¹⁾ 選出 *P. putida* YLFP14 作為防治甜椒細菌性斑點病之菌株，此菌株在馬鈴薯葡萄糖培養基 (PDA) 上對甜椒細菌性斑點病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, 簡稱 Xav) 之生長具抑制作用，且分別與 Xav 甜椒三種生理小種混合接種於葉片後，均可降低甜椒細菌性斑點病之發生。本研究利用跳躍子 Tn5 誘導 *P. putida* YLFP14 突變，且獲得在培養基上抗生活性缺失的突變菌株，並測試此突變菌株防治甜椒細菌性斑點病之能力，以探討 *P. putida* YLFP14 在培養基上之抗生作用與其在防治甜椒細菌性斑點病上之關係，另了解培養條件對拮抗能力之影響，以作為醱酵量產 *P. putida* YLFP14 及提高其對植物病害防治效果之參考。

材料與方法

供試菌株

本研究所使用之螢光假單胞菌菌株 *Pseudomonas putida* YLFP14 (rifampicin 50 μ g/ml)、大腸桿菌菌株 *Escherichia coli* SM10 (含質體 pSUP2021:Tn5)⁽²⁵⁾ 及其他 *Acidovorax*、*Burkholderia*、*Erwinia*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Xanthomonas* 屬之植物病原細菌菌株，均取自於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。於進行各項試驗時，首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⁽¹⁵⁾(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，置於 30°C 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 培養基平板上更新培養，置於 30°C 培養 24-48 小時後備用；含質體 pSUP2021 之大腸桿菌菌株於進行各項測試時，先將其劃線培養於含 50 μ g/ml kanamycin (Sigma Chemical Co., MO) 之 Luria-Bertani agar⁽²³⁾ (LA; tryptone, 10 g; yeast extract, 5 g; NaCl, 10 g; agar, 15 g; distilled water, 1 L; pH 7.2) 培養基平板上，置於 37°C 培養 24 小時後備用；植物病原細菌菌株則將其劃線培養於營養瓊脂培養基 (nutrient agar, NA; Difco nutrient agar powder 23 g; distilled water, 1 L; pH 7.2) 平板上，置於 30°C 培養 24-48 小時後備用。

供試植物

供試之甜椒為藍星品種，將其種子播種於填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 cm) 播一粒種子，置於網室中，待長出兩片真葉後，移植栽種於直徑 10 cm 盛裝有泥炭土之黑色塑膠軟盆內，長至具 6-8 片展開葉時，即作為測試用。

Pseudomonas putida YLFP14 之 Tn5 誘變及抗生物質缺失突變菌株之篩選

參照 Kraus 及 Loper⁽¹⁷⁾ 利用跳躍子誘導突變的方法，進行 *E. coli* SM10 (含質體 pSUP2021) 及 *P. putida* YLFP14 間的接合作用，使攜帶有 Tn5 的 pSUP2021 質體轉移至 *P. putida* YLFP14，以誘導 *P. putida* YLFP14 產生突變。首先將 *P. putida* YLFP14 培養於含有 rifampicin (Sigma Chemical Co., MO) 50 μ g/ml 及 *E. coli* SM10 培養於含有 kanamycin 50 μ g/ml 之 5 ml Luria-Bertani broth (LB) 中，並分別置於 28°C 及 37°C 震盪培養，經隔夜培養後，分別取出 400 μ l 菌液移至含各自上述抗生素濃度之 40 ml LB 培養液中，再震盪培養 3-5 小時後離心 (5,000 g, 5 min)，去除上層液，以生理食鹽水懸浮成 10⁹ cfu/ml 濃度。將 *P. putida* YLFP14 與 *E. coli* SM10 以體積 10:1 之比例混合於微量離心管中，以離心 (5,000 g, 5 min) 把菌體離下後，並以 15 μ l 生理食鹽水懸浮，再將此懸浮液小心滴在 LA 培養基平板上 1 cm² 的硝化纖維紙 (nitrocellulose membrane 0.45 mm, Bio-Rad Laboratories, CA) 上，置於 30°C 培養 24 小時後，取出硝化纖維紙，放置於微量離心管中，並加入 1 ml 生理食鹽水，利用震盪器將附著於硝化纖維紙上之菌體，震盪懸浮於生理食鹽水，再取適量塗抹於含 rifampicin (50 μ g/ml) 及 kanamycin (50 μ g/ml) 之 KB 培養基平板上，置於 30°C 培養，選取同時抗 rifampicin 及 kanamycin 抗生素之菌株，這些菌株即為可能的突變菌株。將此些菌株進一步依蔡等人⁽¹⁾ 所述方法於 PDA 培養基平板上測試其對 Xav XVT40 生長之抑制能力，以篩選對 Xav 失去抗生活性之突變菌株。

Pseudomonas putida YLFP14 突變菌株之 Tn5 插入分析

利用南方雜合反應分析 *P. putida* YLFP14 突變菌株的染色體 DNA 上是否為單一 Tn5 之插入。突變菌株全 DNA 的抽取步驟係參照 Sambrook 等人⁽²³⁾ 之方法進行。所獲得之全 DNA 分別以 *Eco*RI 及 *Sal*I 限制酵素進行完全切割，並經由 0.8% 瓊脂凝膠電泳分析後，將瓊脂凝膠浸泡於 0.25 N 的 HCl 緩慢震盪處理 30 分鐘，進行去嘌呤作用 (depurination)，以清水漂洗後加入 denature solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 緩慢震盪處理 30 分鐘後，以清水漂洗再加入 neutralization solution (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5

M NaCl) 緩慢震盪處理 30 分鐘；剪取適當大小的尼龍濾膜 (Zeta-Probe[®] Blotting Membranes, Bio-Rad Laboratories, CA) 一片，並以 5×SSC 緩衝液 (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate) 先潤濕後，將上述處理過之瓊脂凝膠置於尼龍濾膜上，以 5×SSC 緩衝液作為轉漬溶液，於真空轉漬系統 (Model 785 vacuum blotter, Bio-Rad Laboratories, CA) 上進行轉漬 1 小時。取出尼龍濾膜，將吸附 DNA 之面朝上，並置於乾淨的濾紙上，待晾乾後，以 254 nm 波長的紫外光 240 millijoules/cm² (Uvilink UV Crosslinker CL-508, Uvitec Inc., U.K.) 進行聯結。探針之製備，係利用 Plasmid Miniprep Purification Kit (GeneMark Technology Co., Taiwan) 抽取 pSUP2021 質體，以抽取出之質體 pSUP2021 為模版，並以 NEBlot[®] Phototope[®] Kit (New England Biolabs Inc., U.K.) 進行非放射性 biotin 探針的製備。將製備所得之探針與轉漬於尼龍濾膜上之 DNA 在 60 °C 下進行雜合反應，反應 16 小時後，經 Streptavidin-alkaline phosphatase (NEN[™] Life Science, MA) 與 biotin 結合，再以 CDP-Star[™] (1,2-dioxetane chemiluminescent enzyme substrate, Tropix, MA) 進行偵測反應後，將其壓片於 scientific imaging film (BIOMAX-ML, Kodak, NY) 上，以檢測雜合訊號。由於 Tn5 上已知僅有一個 *SalI* 限制酵素切位，且無 *EcoRI* 限制酵素切位⁽¹³⁾，突變菌株之全 DNA，經 *EcoRI* 及 *SalI* 限制酵素切割後，以 pSUP2021 為探針進行的南方雜合反應結果，若經 *EcoRI* 切割者只呈現一條雜合反應帶，而經 *SalI* 切割者呈現二條雜合反應帶，即表示單一 Tn5 插入引起之突變。

***Pseudomonas putida* YLFP14 及其抗生活性缺失突變菌株 YLFP14-A378 之生長、碳素源利用及抑菌圖譜**

將 *P. putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 移殖於 5 ml nutrient broth (NB, Difco nutrient broth powder 8 g; distilled water, 1 L; pH 7.2) 中，置於 28 °C 震盪 (320 rpm) 培養約 16 小時後，取出 400 μ l 菌液再移至含 40 ml NB 培養液之 125 ml 之三角燒瓶中，於 28 °C 震盪 (320 rpm) 培養，每隔一小時取出 1 ml 培養液以光電比色計 (spectrophotometer, U2000 Hitachi Ltd., Japan) 於 620 nm 波長測量並記錄其吸光值，以測定其生長曲線。利用 Biolog GN2 Microplate (Biolog Inc., Hayward, CA) 測試 *P. putida* YLFP14 與突變菌株 YLFP14-A378 對 95 種不同碳素源利用之差異。*P. putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 對不同植物病原細菌之抑菌圖譜，則依蔡等人⁽¹⁾所述的方法分別於 PDA、KB 及 NA 培養基平板上進行測試。抑制圈大小為量取菌落邊緣至抑制圈邊緣之長度。測試之植物病原細菌包括：*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Aac110、Aac142 (西瓜細菌性果斑病菌)；*Burkholderia caryophylli*

CO8、GO8 (石竹科花卉細菌性萎凋病菌)；*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZL1 (彩色海芋細菌性萎凋病菌)；*E. chrysanthemi* CAS7 (青蔥細菌性萎凋病菌)；*Pseudomonas syringae* PA5 (楊桃細菌性斑點病菌)；*Ralstonia solanacearum* Ps152 (番茄細菌性萎凋病菌)；*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* Xv42、XVT40 (茄科細菌性斑點病菌)；*X. campestris* pv. *campestris* Xcc84 (十字花科黑腐病菌)。

***Pseudomonas putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 於甜椒葉表上之族群變化及對甜椒細菌性斑點病菌族群之影響**

將 *P. putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 (培養於含 50 μ g/ml kanamycin 之 KB 培養基，於 30 °C 培養 24 小時) 分別懸浮於含 0.1% 之甲基纖維素 (methyl cellulose, Sigma Chemical Co., MO) 之無菌蒸餾水中，其濃度為 5 × 10⁶ cfu/ml，或與 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40n (為 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 具 nalidixic acid 抗性之自然突變菌株) 之懸浮液 (5 × 10⁸ cfu/ml) 等體積混合，均勻噴佈於具 6-8 片展開葉之甜椒植株葉片上，再將接種植株以透明塑膠袋套袋或直接置於生長箱內 (日溫 30 °C、夜溫 25 °C、RH 70-85%、光照 12hr、90 μ mol per μ A /sec · m²)，每隔 24 小時於每一植株取下 4 個葉片 (第 3-6 片展開葉)，依 Wilson 及 Lindow⁽³¹⁾ 的方法將葉片置於含 100 ml 無菌水之 300 ml 三角瓶中，以超音波震盪器 (Bransonic 8200, LabBoss.com, VA) 處理 7 分鐘後，將懸浮液塗抹於含 rifampicin 20 μ g/ml 之 KB 培養平板上 (測 YLFP14 或 YLFP14-A378 之菌量)，或含 nalidixic acid (Sigma Chemical Co., MO) 20 μ g/ml 之 NA 培養平板上 (測 XVT40n 之菌量)，於 30 °C 培養 48 小時後，計算菌落數；洗滌後之葉片則以葉片面積測定器 (Leaf Area Meter CI-202; CID Inc., WS) 測其表面積，最後計算單位面積葉片上之菌量 (cfu/cm²)，每一試驗三重複。

***Pseudomonas putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 對甜椒細菌性斑點病之防治試驗**

將 *P. putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 懸浮液以光電比色計調整其濃度為 1 × 10⁹ cfu/ml，再稀釋成 1 × 10⁸ 及 1 × 10⁷ cfu/ml 後，分別與甜椒細菌性斑點病菌 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 懸浮液 (1 × 10⁹ cfu/ml) 等體積混合，並添加展著劑 SIL WET L-77 (0.05% v/v, OSi specialties, NY)。依蔡等人⁽¹⁾方法將具 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，接種過之植株套袋以維持高濕度，置於生長箱內，五日後解開套袋三天後觀察並記錄發病情形。植株發病程度以相對發病指數 (relative disease index) 表示，即處理組的平均病斑數

除以對照組的平均病斑數之百分比，每一處理接種 4 棵甜椒植株，每一植株固定選取第 3 至 6 片展開葉，記錄葉片上之病斑數，並計算 4 棵植株共 16 片葉之平均病斑數，而對照組為僅接種甜椒細菌性斑點病菌 (XVT40) 者，每一試驗三重複。

碳素源、pH 值及培養溫度對 *Pseudomonas putida* YLFP14 抗生活性之影響

參照 Shanahan 等人⁽²⁴⁾之報告，選擇 D-葡萄糖 (D-glucose, Sigma Chemical Co., MO)、D-葡萄糖酸 (D-gluconate, Sigma Chemical Co., MO)、D-半乳糖 (D-galactose, Sigma Chemical Co., MO)、果糖 (fructose, Sigma Chemical Co., MO)、麥芽糖 (maltose, Sigma Chemical Co., MO)、L-穀胺酸 (L-glutamic acid, Sigma Chemical Co., MO) 及蔗糖 (sucrose, Sigma Chemical Co., MO) 作為碳素源，測試其對甜椒細菌性斑點病菌抗生活性之影響。每一碳素源以 0.2 μ m 過濾膜 (Acrodisc Syringe Filters, product No. 4612, Pall Gelman Laboratory, MI) 過濾後，加至高溫高壓滅菌後之 NA 培養基中，添加之濃度為 1%。利用牙籤挑取培養於 KB 培養基上之 *P. putida* YLFP14 菌落穿刺於上述含各種碳素源之培養基平板上，置於 30°C 培養 24 小時後，再將 Xav XVT40 之懸浮液 (約 1×10^8 cfu/ml) 利用玻璃細孔噴霧器均勻噴佈於上述平板上，置於 30°C 培養 48 小時觀察有無抑制圈形成，並測量菌落邊緣至抑制圈邊緣之長度，作為記錄抑制圈之大小。此外，於 NA 培養基中添加不同濃度 (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 及 4.0%) 的葡萄糖，依上述之方式測試不同濃度之葡萄糖對 *P. putida* YLFP14 抗生活性之影響；以 PDA 為供試培養基，經高壓滅菌釜滅菌後，利用滅菌過之 1N 鹽酸 (HCl) 及 1N 氫氧化鈉 (NaOH) 溶液調整 pH 值分別為 6.0、7.0、8.0 及 9.0，並依上述之方式測試 pH 值對抗生活性的影響；另外以 pH 值 7.0 之 PDA 培養基平板，分別置於 20°C、24°C、28°C 及 32°C，依上述方式測試溫度對 *P. putida* YLFP14 抗生活性之影響。

結 果

以 Tn5 誘導 *Pseudomonas putida* YLFP14 突變產生抗生活性缺失之突變菌株

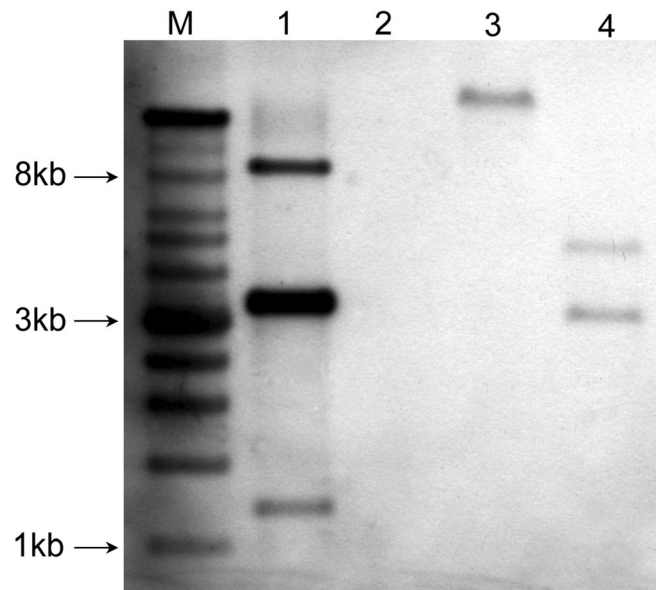
經多次 *E. coli* SM10 及 *P. putida* YLFP14 間的接合試驗結果，共獲得 606 株突變菌株。於 PDA 培養基平板上，測試此些突變菌株對 Xav XVT40 之抗生活性，其中編號 YLFP14-A378 之突變菌株失去對 XVT40 之抗生作用。抽取突變菌株 YLFP14-A378 之質體，結果無 pSUP2021 質體之存在，顯示此突變菌株對 kanamycin 之

抗性並非因質體 pSUP2021 之存在，而是 Tn5 插入染色體所致。

突變菌株 YLFP14-A378 之全 DNA 經 *EcoRI* 及 *SalI* 限制酵素切割後，以 pSUP2021 為探針進行南方雜合反應分析結果顯示，經 *EcoRI* 切割者只呈現一條雜合條帶，而經 *SalI* 切割者有二條雜合條帶 (圖一)，顯示突變菌株 *P. putida* YLFP14-A378 為單一 Tn5 插入引起之突變。

Pseudomonas putida YLFP14-A378 突變菌株之生長與抑菌圖譜

在 NB 培養基中，測定突變菌株 YLFP14-A378 之生長曲線，結果顯示 YLFP14-A378 與其野生型菌株 *P. putida* YLFP14 並無明顯差異 (圖二)。YLFP14-A378 之抑菌圖譜測試結果，顯示在 PDA 培養基上，YLFP14-A378 失去對甜椒細菌性斑點病菌及其他供試植物病原細菌之抑制能力；在 NA 培養基上，YLFP14-A378 則與 *P. putida* YLFP14 一樣對供試之植物病原細菌皆無抑制作用；而在 KB 培養基上，YLFP14-A378 與 *P. putida* YLFP14 對青枯病菌 Ps152 的生長仍具有抑制能力，但對其他供試之植物病原細菌則一樣無抑制作用 (表一)。



圖一、跳躍子 Tn5 誘導之抗生活性缺失突變菌株 *P. putida* YLFP14-A378 其 Tn5 插入之南方雜合分析。

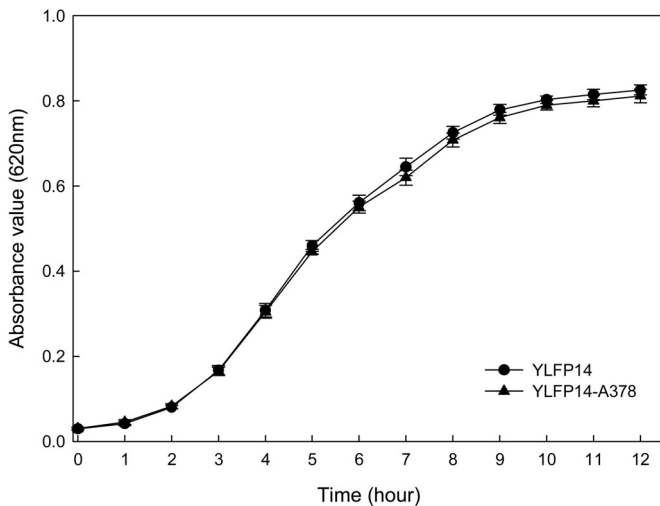
Fig.1. Southern blot analysis of the Tn5 induced antibiotic-defective mutant *Pseudomonas putida* YLFP14-A378 probed by biotin-labeled pSUP2021. M: marker (1kb ladder marker; GeneMark Technology Co., Taiwan); lane 1: *HindIII* digested pSUP2021; lane 2: *SalI* digested total DNA of wild type *P. putida* YLFP14; lane 3: *EcoRI* digested total DNA of *P. putida* YLFP14-A378; lane 4: *SalI* digested total DNA of *P. putida* YLFP14-A378.

表一、*Pseudomonas putida* YLFP14 及其 Tn5 誘導之抗生活性缺失突變菌株 YLFP14-A378 對植物病原細菌生長之抑制作用

Table 1. Inhibitory effect of *Pseudomonas putida* YLFP14 (Y14) and its Tn5 induced antibiotic-defective mutant YLFP14-A378 (A378) on growth of different bacterial plant pathogens on nutrient agar (NA), potato dextrose agar (PDA) and King's B medium (KB)

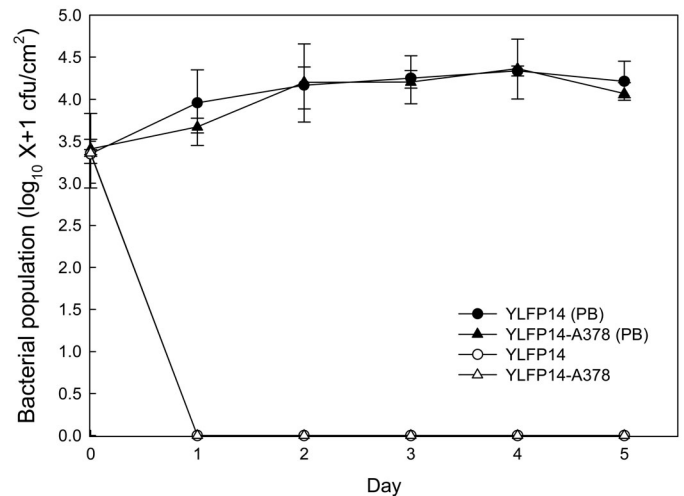
Pathogen	NA		KB		PDA	
	Y14	A378	Y14	A378	Y14	A378
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Aac110	0.0 ¹	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Aac142	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0
<i>Burkholderia caryophylli</i> CO8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Burkholderia caryophylli</i> GO8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ZL1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
<i>Erwinia chrysanthemi</i> CAS7	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
<i>Pseudomonas syringae</i> PA5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0
<i>Ralstonia solanacearum</i> Ps152	0.0	0.0	0.9	0.9	0.9	0.0
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> XVT40	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xv42	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Xcc84	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0

¹ Inhibition zone: cm.



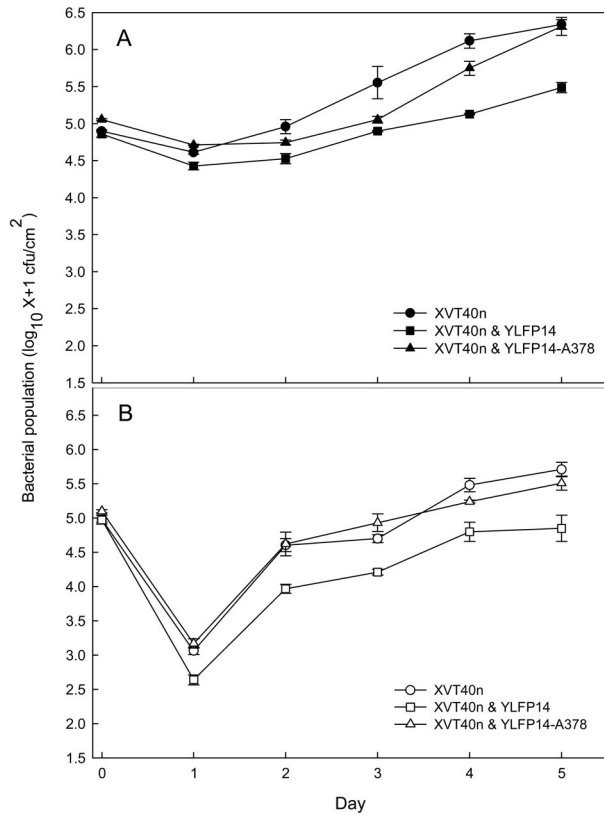
圖二、*Pseudomonas putida* YLFP14 及其 Tn5 誘導之抗生活性缺失突變菌株 YLFP14-A378 在 28°C nutrient broth 中之生長曲線。

Fig.2 Growth curves of *Pseudomonas putida* YLFP14 and its Tn5 induced antibiotic-defective mutant YLFP14-A378 grown in nutrient broth at 28°C.



圖三、*Pseudomonas putida* YLFP14 及其 Tn5 誘導之抗生活性缺失突變菌株 YLFP14-A378 在套袋 (PB) 及不套袋的甜椒葉片上之族群變化。

Fig.3. Population changes of *Pseudomonas putida* YLFP14 and its Tn5 induced antibiotic-defective mutant YLFP14-A378 on the leaves of sweet pepper. Plants were sprayed with cell suspension of *P. putida* YLFP14 or YLFP14-A378, and placed in a growth chamber (25-30°C, RH 70-80%, light 12 hr 90 μ mol per μ A /sec \cdot m²) after inoculation. Plants were either covered with plastic bags (PB) for maintaining RH 100% or not covered. Four leaves (the 3rd to 6th expanded leaves) from each of four plants were taken at each time for determination of the numbers of *P. putida* YLFP14 and YLFP14-A378.

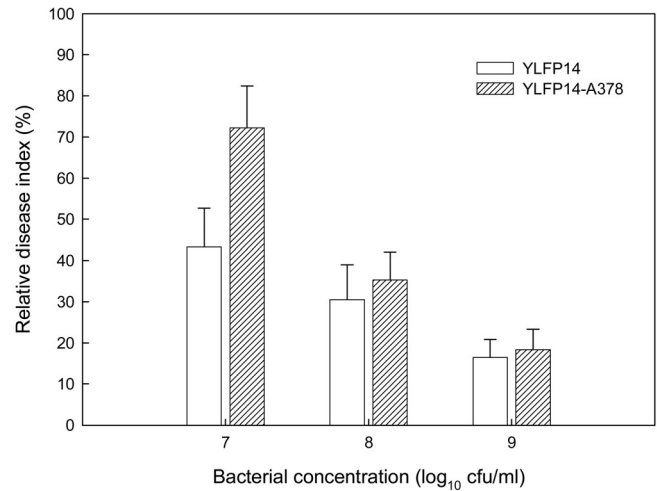


圖四、*Pseudomonas putida* YLFP14 及其 Tn5 誘導之抗生活性缺失突變菌株 YLFP14-A378 在套袋(A) 及不套袋(B) 的甜椒葉片上對 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40n 族群變化之影響。

Fig. 4 Effect of *Pseudomonas putida* YLFP14 and its Tn5 induced antibiotic-defective mutant YLFP14-A378 on the population changes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40n on sweet pepper leaves. Leaves were sprayed with cell suspension of XVT40n (5×10^8 cfu/ml) only, with cell suspension of XVT40n (5×10^8 cfu/ml) mixed with equal volume of YLFP14 (5×10^6 cfu/ml), or with cell suspension of XVT40n (5×10^8 cfu/ml) mixed with equal volume of YLFP14-A378 (5×10^6 cfu/ml). Plants were covered with plastic bags (A) for maintaining RH100%; or not covered (B). All plants were placed in a growth chamber (25-30°C, RH 70-80%, light 12 hr $90 \mu\text{mol per } \mu\text{A /sec} \cdot \text{m}^2$) after inoculation.

***Pseudomonas putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 於甜椒葉表上之族群變化及對甜椒細菌性斑點病菌族群之影響**

將 *P. putida* YLFP14 及其突變菌株 YLFP14-A378 分別均勻噴在甜椒植株葉片上，於不套袋的情形下，其族群皆迅速下降，而在套袋的高濕環境下，其族群於第一天上升後，在隨後之五天則維持在 10^4 cfu/cm² 左右，且二者之族群並無差異(圖三)。 *P. putida* YLFP14 或 YLFP14-A378 與 Xav XVT40n 混合接種於甜椒葉片後，在套袋情況下，*P. putida* YLFP14 與 YLFP14-A378 均能降低 XVT40n 之族群，但 YLFP14-A378 對甜椒葉表 XVT40n 之抑制能力則



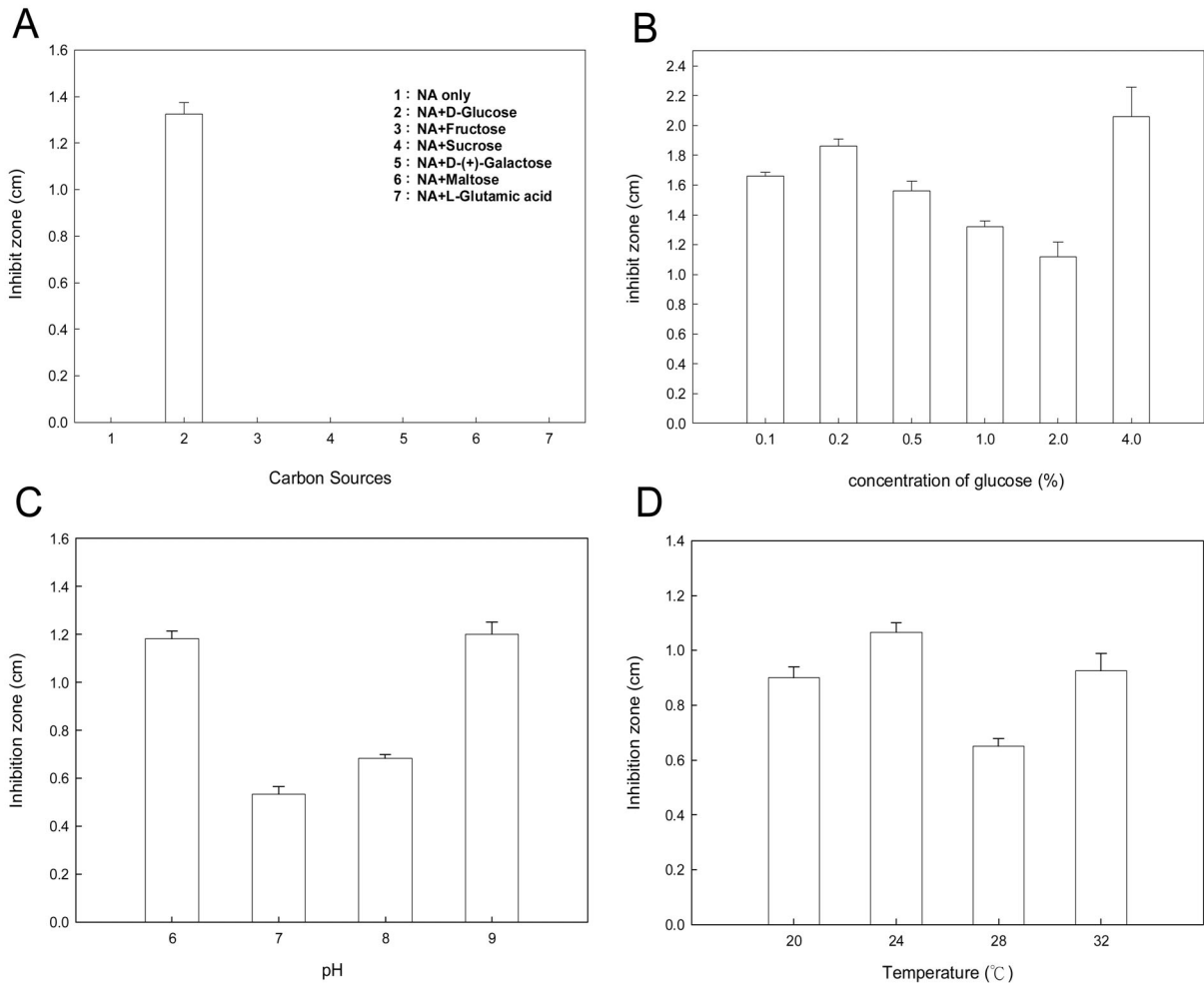
圖五、施用不同濃度之 *Pseudomonas putida* YLFP14 及其 Tn5 誘導之抗生活性缺失突變菌株 YLFP14-A378 對甜椒細菌性斑點病發病程度之影響。

Fig 5. Effect of different concentrations of *Pseudomonas putida* YLFP14 and its Tn5 induced antibiotic-defective mutant YLFP14-A378 on the disease severity of bacterial spot of sweet pepper. The leaves were inoculated by dipping into a suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 (10^9 cfu/ml) mixed with equal volume of different concentrations of *P. putida* YLFP14 or YLFP14-A378 for 30-40 sec. The inoculated plants were then covered with plastic bags and placed in a growth chamber (25-30°C, RH 70-80%, light 12 hr $90 \mu\text{mol per } \mu\text{A /sec} \cdot \text{m}^2$). The plastic bags were removed 5 days after covering and the leaf lesions were counted one day after removal of the bags. Relative disease index was the percentage of mean number of lesions observed in a treatment relative to mean number of lesions formed in the control (inoculated with XVT40 only) whose relative disease index was set as 100%.

較野生型 *P. putida* YLFP14 減少(圖四、A)；在不套袋情況下，YLFP14-A378 對甜椒葉表之 XVT40n 之族群則無抑制能力(圖四、B)。

***Pseudomonas putida* YLFP14-A378 對甜椒細菌性斑點病之防治效果**

突變菌株 YLFP14-A378 及其野生型菌株 *P. putida* YLFP14 分別以不同濃度與甜椒細菌性斑點病菌 XVT40 (10^9 cfu/ml) 等體積混合後，接種於甜椒葉片結果，在 10^9 或 10^8 cfu/ml 之濃度時，*P. putida* YLFP14 與 YLFP14-A378 皆可明顯降低甜椒細菌性斑點病之平均相對發病指數，然 *P. putida* YLFP14 與 YLFP14-A378 處理間並無顯著之差異；在 10^7 cfu/ml 之濃度時，處理 *P. putida* YLFP14 或 YLFP14-A378 者仍具防治效果，然 YLFP14-A378 對甜椒細菌性斑點病之防治效果顯著地較 *P. putida* YLFP14 為低(圖五)。



圖六、*Pseudomonas putida* YLFP14 在 nutrient agar 上添加 1% 不同碳素源(A) 或不同濃度葡萄糖(B)、在不同 pH 值 potato dextrose agar (PDA) 上(C) 及在 PDA (pH 7.0) 上培養於不同溫度(D) 對抑制 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 生長之影響。

Fig.6. Inhibitory effects of *Pseudomonas putida* YLFP14 on the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* XVT40 on nutrient agar supplemented with 1% various carbon sources (A), nutrient agar supplemented with various concentrations of glucose (B), potato dextrose agar with different pH values (C) and potato dextrose agar (pH 7.0) at different temperatures (D).

培養條件對 *Pseudomonas putida* YLFP14 抗生活性表現之影響

在 NA 培養基中分別加入濃度為 1% 之七種不同的碳素源，結果只有加入葡萄糖時 YLFP14 菌株對 XVT40 才具拮抗作用(圖六、A)，而葡萄糖添加濃度亦會影響抑制圈大小，在測試之濃度中以 4% 所形成的抑制圈最大，但添加 0.2% 葡萄糖所產生的抑制圈，反較添加 0.5-2.0% 者所產生的抑制圈為大(圖六、B)。*P. putida* YLFP14 菌株在 pH 值 7 之 PDA 培養基上，對 XVT40 拮抗能力最小，而在 pH 值 6 及 9 時其拮抗能力較佳(圖六、C)。又 *P. putida* YLFP14 菌株在 pH 值 7 之 PDA 培養基上，在供試溫度中培養在 28°C 時，對 XVT40 的拮抗能力最小，而在 24°C 時之拮抗能力最佳(圖六、D)。

討 論

Pseudomonas 屬之腐生性螢光假單胞菌常被用於防治植物真菌或細菌性病害。螢光假單胞菌產生之代謝物質常可抑制植物病菌的生長⁽⁷⁾。此些螢光假單胞菌所產生之抗生物質在生物防治上扮演重要角色^(5, 26)。本研究為探討 *P. putida* YLFP14 在培養基上抑制甜椒細菌性斑點病菌生長之能力，是否與其防治甜椒細菌性斑點病有關。利用 Tn5 跳躍子誘導 *P. putida* YLFP14 產生突變，獲得在 PDA 培養基上失去對甜椒細菌性斑點病菌 XVT40 拮抗能力之突變菌株 YLFP14-A378，經南方雜合反應分析確認 YLFP14-A378 為單一 Tn5 插入所產生之突變。此突變菌株在 PDA 平板上，對所供試之其他植物病原細菌，亦同時失去抗生活性，顯示 *P. putida* YLFP14 在 PDA 培養基上，對供試之其他植物病原細菌之抗生作用，皆由 *P. putida* YLFP14 所產生之同一抗生物質所致，而此物質具廣效性，可對多種植物病原細菌具有抗生活性。由於螢光假單胞菌在 KB 培養基上，對青枯病菌之抑制能力與其產生之螢光鉗鐵物質

(siderophores) 有關⁽²⁾，而突變菌株 YLFP14-A378 在 KB 培養基上仍能產生螢光銻鐵物質，因此 YLFP14-A378 在 KB 培養基上，如同其野生型菌株對青枯病菌生長仍具有抑制活性。在 KB 培養基中添加 100 μ M 之氯化鐵 (FeCl₃) 時，*P. putida* YLFP14 則無法在此培養基上產生銻鐵物質，同時亦失去對青枯病菌的抑制能力(未發表資料)。

突變菌株 YLFP14-A378 雖失去對甜椒細菌性斑點病菌之抗生能力，其在 NB 培養液中之生長曲線及其在甜椒葉片上之族群變化，則與其野生型菌株並無顯著差異。於防治試驗結果顯示，此突變菌株對甜椒細菌性斑點病仍具防治能力，然在較低濃度 (10⁷ cfu/ml) 時其防治能力，則顯著地較其野生型菌株 *P. putida* YLFP14 為低；又突變菌株 YLFP14-A378 在甜椒葉片上，降低甜椒細菌性斑點病菌的能力亦較野生型菌株為低，顯示 YLFP14 產生之抗生物質對其在甜椒細菌性斑點病之防治具重要角色，然尚有其他因子參與。在高濃度 (10⁸ 或 10⁹ cfu/ml) 時，突變菌株 YLFP14-A378 與其野生型菌株 *P. putida* YLFP14，對甜椒細菌性斑點病之防治效果並無顯著差異，其原因有待探討。由於 *P. putida* YLFP14 對多種植物病原細菌之生長亦具抑制作用，顯示此菌在其他植物細菌病害防治應用上亦具潛力。

螢光假單胞菌抗生物質之產生，可受許多環境因子影響⁽²⁴⁾。Shanahan 等人⁽²⁴⁾的研究指出，*Pseudomonas* sp. F113 所產生之抗生物質 2,4-diacetylphloroglucinol 的量，會隨著培養基中所含糖類不同而有差異。James 及 Guttererson⁽¹²⁾亦發現，培養基中葡萄糖的存在與否決定 *P. fluorescens* HV37a 的抗生活性。本研究顯示 *P. putida* YLFP14 培養於添加葡萄糖的 NA 培養基時，才具有抑制甜椒細菌性斑點病菌的活性，而含其他測試的碳素源則未能促進其抗生物質之產生，且 NA 培養基中加入不同濃度之葡萄糖，也影響 *P. putida* YLFP14 的拮抗能力；此外，培養基之 pH 值及培養溫度，亦可影響 YLFP14 抗生物質之產生，此些有關 *P. putida* YLFP14 抗生物質產生因子之結果，可應用於此菌之量產及提高其對植物病害防治效果之參考。本研究中於 NA 培養基中添加果糖並未促進 *P. putida* YLFP14 抗生物質之產生，然利用 Biolog GN2 microplate 比較 YLFP14-A378 與野生型菌株對 95 種碳素源之利用中發現，不產生抗生物質之突變菌株 YLFP14-A378 無法利用果糖(未發表資料)。在 YLFP14-A378 內跳躍子 Tn5 插入位置之初步分析中顯示，跳躍子 Tn5 係插於 *P. putida* YLFP14 之果糖操縱子(fructose operon) *fruB* 基因上(未發表資料)，而果糖操縱子內含四個基因(*fruRBKA*)，其中 *fruB* 與 *fruA* 為運送有關之基因，*fruK* 與 *fruR* 則分別為 kinase 及調控基因⁽¹⁶⁾。由於此一操縱子為果糖代謝之上游基因，此一操縱子功能破壞後，如何影響 *P. putida* YLFP14 對植物病原細菌之抑制能力，則有待進一步探討。

引用文獻

1. 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。
2. 劉惠元. 1992. 螢光假單胞菌防治番茄青枯病之研究. 國立中興大學植物病理學研究所博士論文. 125pp。
3. Bakker, P. A. H. M., Van Peer, R., and Schippers, B. 1991. Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. Pages 217-230 in: Biotic Interactions and Soil-Borne Diseases. A. B. R. Beemster, G. J. Bollen, M. Gerlagh, M. A. Ruissen, B. Schippers, and A. Tempel ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 428 pp.
4. Bencini, D. A., Howell, C., and Wild, J. R. 1983. Production of phenolic metabolites by a soil pseudomonad. Soil Bio. Biochem. 15:491-492.
5. Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., van der Bij, A. J., van der Drift, K. M. G. M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R. J., Keel, C., Bakker, P. A. H. M., Tichy, H.-V., de Bruijn, F. J., Thomas-Oates, J. E., and Lugtenberg, B. J. J. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:1069-1077.
6. Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., and Kim, D. S. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4197-4201.
7. Dowling, D. N., and O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol. 12:133-141.
8. Fenton, A. M., Stephens, P. M., Crowley, J., O'Callaghan, M., and O'Gara, F. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58:3873-3878.
9. Guo, J. H., Qi, H. Y., Guo, Y. H., Ge, H. L., Gong, L. Y., Zhang, L. X., and Sun, P. H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Biol. Control 29:66-72.
10. Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69:480-482.

11. 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.
12. James, D. W. J., and Gutterson, N. I. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* Hv37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1183-1189.
13. Jorgensen, R. A., Rothstein, S. J., and Reznikoff, W. S. 1979. A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. *Mol. Gen. Genet.* 177:65-72.
14. Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., and Defago, G. 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:4-13.
15. 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.
16. Kornberg, H. L. 2001. Routes for fructose utilization by *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:355-359.
17. Kraus, J., and Loper, J. E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of pythium damping-off of cucumber. *Phytopathology* 82:264-271.
18. Leeman, M., van Pelt, J. A., den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:655-664.
19. Lemanceau, P., and Alabouvette, C. 1993. Suppression of fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: Mechanisms and applications. *Biocontrol Sci. and Technol.* 3:219-234.
20. Lemanceau, P., Bakker, P. A. H. M., de Kogel, W. J., Alabouvette, C., and Schippers, B. 1992. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of Fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2978-2982.
21. Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H. J., and van Pee, K. H. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag. Sci.* 56:688-695.
22. Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., and Pierson III, L. S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2616-2624.
23. Sambrook, J., Maniatis, T. I., and Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
24. Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., and O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:353-358.
25. Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Techology* 1:784-791.
26. Thomashow, L. S., and Weller, D. M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170:3499-3508.
27. Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J. M., Kovacevich, P. A., Mukerji, P., Weller, D. M., and Pierson, E. A. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2928-2934.
28. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
29. Weller, D. M. 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73:1548-1553.
30. 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.
31. Wilson, M., and Lindow, S. E. 1994. Inoculum density-dependent mortality and colonization of the phyllosphere by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2232-2237.
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, Lin, Y. C.¹, Hsu, S. T.¹, and Tzeng, K. C.^{1,2} 2004. The relation of antibiosis to the biocontrol of bacterial spot of sweet pepper by *Pseudomonas putida* YLFP14. Plant Pathol. Bull. 13:201-210. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ² Corresponding author, E-mail: kctzeng@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22854633)

Pseudomonas putida YLFP14 inhibits the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) on potato dextrose agar (PDA) and significantly reduces the disease severity of bacterial spot of sweet pepper caused by Xav. The importance of antibiosis in this biocontrol was investigated. The Tn5 mutagenesis was used to induce mutation of *P. putida* YLFP14, and a single-site Tn5 insertion mutant, YLFP14-A378, defective in inhibitory activity on PDA plate against Xav and other bacterial plant pathogens was obtained. The growth curve in nutrient broth and population changes on leaves of sweet pepper of this mutant were similar to those of its wild type strain. Disease control experiments showed that the mutant YLFP14-A378 remained effective in control of the bacterial spot, but at lower dosages, the control efficacy was significantly reduced as compared with its wild type strain. The ability in reduction of Xav populations on pepper leaves was also less by the mutant YLFP14-A378 than by its wild type strain. The above results suggest that antibiosis is an important factor for *P. putida* YLFP14 to control the bacterial spot of sweet pepper. However, other factors might be also involved in the mechanisms of disease control. *P. putida* YLFP14 was inhibitory to Xav on PDA, but not on nutrient agar (NA). The inhibitory activity on NA was observed only when supplemented with glucose among the seven tested carbon sources. PDA at pH 6 or 9 and incubation temperature at 24 °C were the better conditions for producing higher inhibitory activities.

Key words : fluorescent pseudomonad, bacterial spot, sweet pepper, antibiosis, biocontrol