

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株之致腐能力及存活

曾國欽 陳淑芬 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 6 月 25 日

摘 要

曾國欽、陳淑芬、徐世典，1994. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株之致腐能力及存活. 植病會刊 3:119-127.

具游動性之 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 經紫外線照射後，選出其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58。以電子顯微鏡觀察顯示，MI-17 與 MI-49 仍具正常周生鞭毛，而 MI-58 則無鞭毛。此三個無游動性突變菌株，均非營養缺失性突變菌，其生長速率、果膠分解酵素產生能力及其他測試之生理生化特性與 SP50 相近。然而 SP50 在馬鈴薯植株與結球白菜、蘿蔔、胡蘿蔔、胡瓜及馬鈴薯切片等植物組織上之致腐能力，則較其無游動性突變菌株為強。SP50 具趨化性，可往植物組織傷口處聚集，其在傷口附近聚集之菌量，較其鄰近非傷口部位之菌量可高出 18 倍之多，而無游動性突變菌株則無此現象。將等量之 SP50 與其無游動性突變菌株混合接種於結球白菜組織上，於軟腐組織外緣處，具游動性之軟腐細菌常佔優勢。溫室的試驗中，具游動性之 SP50 在馬鈴薯葉片及土壤中之存活與其無游動性突變菌株未見明顯差異。

關鍵詞：軟腐細菌、游動性、致腐能力、存活。

緒 言

細菌常有鞭毛，藉由鞭毛的運轉，可在液體中游動 (12,17)。而具游動性之細菌，常有趨化性 (chemotaxis)，可被誘引物質 (attractant) 所誘引，而到達有利之環境或遠離忌避物質 (repellent)，逃離不良環境或捕食者 (2,7,18)。植物病原細菌亦常有極生或周生鞭毛，游動性可使其易於到達有利於侵入寄主組織之部位，增加其感染能力；Panopoulos 和 Schroth (22) 之研究顯示，具游動性之 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*，常較其無游動性之突變菌株，在菜豆葉片上有較強之感染力；Bayot 和 Ries (4) 探討游動性對於 *Erwinia amylovora* 侵入蘋果花之影響時，亦發現游動性菌株有較高之感染力；此外游動性對 *P. s. pv. glycinea* 侵入大豆葉片亦很重要 (15)。游動性對於細菌在土壤中，植物根表族群之建立有助益；Scher 等 (25) 認為 *Pseudomonas* 屬螢光細菌，其游動性菌株對大豆種子分泌物具有趨化性，可能有利於其群集於種子或根部表面；而 De Weger 等 (11) 則認為游動性在 *Pseudomonas fluorescens* 於馬鈴薯根部群集之能力亦扮演重要角色；Haefele 和 Lindow (14) 比較冰核細菌

Pseudomonas syringae 之游動性及無游動性突變菌株在豆類葉片上之存活情形，發現不具游動性之突變菌株在葉表之競爭、建立族群及逃避不良環境的能力降低；Cuppels (9) 亦認為鞭毛游動性，可以提供 *P. s. pv. tomato* 在番茄葉片上較強的存活優勢。*Erwinia* 屬軟腐細菌具周生鞭毛，能在水中迅速游動，常經由傷口侵入組織造成植物組織之腐爛 (23)。盛等 (1) 與 Pirhonen 等 (24) 之研究指出，*Erwinia* 屬軟腐細菌之游動性在其致腐能力上亦可能佔有重要角色。為進一步瞭解 *Erwinia* 屬軟腐細菌之游動性與其致腐及存活能力的關係，本研究比較馬鈴薯軟腐細菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株之致腐能力及其在馬鈴薯葉表及土壤中存活情形。

材料與方法

供試菌株

具游動性之 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 菌株，係由臺灣田間馬鈴薯軟腐病植株分離所得，其無游動性突變菌株係依下述方法經紫外線照射後選

取而得，供試菌株均在室溫下，保存於裝有無菌水之螺旋試管中。除另有說明外，各項試驗之培養溫度皆為 30 C。

游動性之測定

將測試之細菌穿刺於 nutrient-gelatin-agar (NGA) (17) 平板上，培養 24 hr 後，觀察細菌菌落是否擴散，游動性程度以菌落擴散圈之大小表示。具游動性之細菌，可形成擴散之菌落，而不具游動性者，則僅於穿刺位置形成點狀菌落。

無游動性突變菌株之選取

無游動性突變菌株係以紫外線照射具游動性之 SP50 菌株，誘導其產生突變後，選取而得。將保存之菌劃線培養於 nutrient agar (NA) (Difco Laboratory, Detroit, Michigan, U.S.A.) 平板上，24 hr 後挑取單一菌落，置於 3 ml 之 nutrient broth (NB) (Difco Laboratory, Detroit, Michigan, U.S.A.) 中，震盪培養 24 hr 後，以 6000 rpm (Sigma 2 K 15, rotor No. 12141) 離心 20 min，除去上層液，加入 3 ml 含 0.85% NaCl 之 0.01 M, pH 7.0 之 phosphate buffer saline (PBS)，震盪後再以相同速度離心一次，除去上層液，連續洗滌三次後，加入 5 ml PBS 震盪，將細菌懸浮液倒入培養皿中，並將培養皿置於裝有 15 W 紫外燈的暗箱中，於距離紫外燈 60 cm 下，打開培養皿蓋，分別照射不同時間後，以 PBS 稀釋至適當濃度，取 0.1 ml 塗抹於 NA 平板上，逢機挑選單一菌落，將其穿刺於 NGA 平板與 crystal violet-pectate (CVP) (10) 或 PT (5) 平板上培養，經 24 hr 培養後，選取可產生果膠分解酵素而不具游動性的突變菌。具果膠分解酵素之菌，在 CVP 平板上可形成凹陷之菌落，或在 PT 平板上，於加入 1% cetyltrimethylammonium bromide 試劑後，於菌落周圍可形成一透明環。所得的突變菌依下述方法測定其果膠分解酵素活性，由其中選得與野生菌株活性相近者，進行進一步之試驗。

接種源之製備

除另有敘述外各項試驗所用之接種源，係將保存於無菌水之菌源，劃線培養於 NA 平板上，經 24 hr 培養後，挑取單一菌落穿刺於 NGA 平板中，經 12 hr 後，具游動性之 SP50 係挑取擴散菌落邊緣附近的細菌，而不具游動性突變菌株則挑取不擴散點狀之菌落，移於 yeast extract-dextrose-carbonate (YDC) (13) 培養基斜面上，培養 24 hr 後，將細菌懸浮於無菌水中，調整至適當濃度後作為接種源。

細菌鞭毛之觀察

細菌之鞭毛係以電子顯微鏡陰染法觀察。將 YDC 斜面上，經 24 hr 培養後之細菌，懸浮於無菌水中，使成稀薄混濁液，取一滴滴於載玻片上，加等量之 2% 磷鎢酸染色液 (phosphotungstic acid, pH 6.9, 0.1% bovine serum) 均勻混合後，以毛細管吸取懸浮液，滴在張有 formvar 支持膜並經碳素補強之銅網上，用小片濾紙吸取多餘液體，於空氣中乾燥後，以電子顯微鏡 (JEM-7 型) 觀察細菌之鞭毛型態與著生情形。

營養需求測定

將欲測之細菌培養在最小培養基 M56 (6) 及 NA 培養基上，經 48 hr 培養後，觀察細菌生長情形，若細菌可在 NA 平板上生長良好，而在 M56 平板上無法生長，則表示有某種營養之需求，而為營養缺失性突變菌 (auxotroph)。

細菌生理生化特性之測定

SP50 與其無游動性突變菌株之其他生理生化特性，係依照 Tzeng 和 Hsu (28) 所敘述之方法測定。

果膠分解酵素活性之測定

將 YDC 斜面上，經培養 24 hr 後之供試菌懸浮於無菌水中，調整其濃度為 1.1×10^8 cells/ml，取 1 ml 接種於裝有 20 ml 含 1% sodium polypectate (Napp) 之 M9 (21) 培養液的三角瓶中，震盪培養 24 hr 後，以 6000 rpm (Sigma 2 K 15, rotor No. 12141) 離心 20 min，取上層澄清液，經細菌過濾膜 (0.22 μ m) 過濾後，作為粗酵素液，加入一滴 1% merthiolate，保存於 4 C 冰箱中備用，粗酵素液再依下述方法測定其果膠分解酵素之活性：pectate lyase (PL) 活性係參照 Basham 和 Bateman (3) 之方法測定，將 1 ml 粗酵素液與反應基質 (0.05 M, pH 8.6 之 Tris-HCl 緩衝液製備之 1% Napp, 10 ml; 0.01 M CaCl₂, 1 ml; 1% merthiolate, 0.1 ml) 混合後，在 30 C 作用 24 hr 後之反應物，以光譜儀 (Model U-2000, Hitachi, Ltd., Tokyo) 於 230 nm 波長下，測其吸收值，並以加熱之粗酵素液作為對照組；而 polygalacturonase (PG) 活性，則參照 Sherwood (26) 之方法測定，將 1 ml 粗酵素液與反應基質 (0.05 M, pH 5.4 之 acetate 緩衝液製備之 1% Napp, 10 ml; ammonium oxalate, 0.05 g; 1% merthiolate, 0.1 ml) 混合後，在 30 C 作用 24 hr 後，取出 0.5 ml 反應物，加入 2.5 ml 0.5 N HCl 與 5 ml 0.01 M thiobarbituric acid (TBA) 於試管中均勻混合，標其液面高度後，置於沸

水中加熱 1 hr，冷卻後以蒸餾水調整液面至原來高度，若溶液中有顆粒物，則待其沉澱後，取上層液以上述之光譜儀在 510 nm 波長下測其吸收值，並以加熱之粗酵素液作為對照組。

致腐能力測定

對馬鈴薯塊莖之致腐能力：由市場購買之馬鈴薯克尼伯品種 (Kennebeck) 薯塊，經 70% 酒精表面消毒，以直徑 1.2 cm 打孔器在薯塊中央打洞 1 cm 深，加入 0.3 ml 之細菌懸浮液 (5.6×10^8 cells/ml)，並將馬鈴薯薯塊置於含少量水的培養皿中，外罩塑膠袋保持高濕度，於 28 C，5 天後，稱其腐爛組織之重量。另將馬鈴薯薯塊清洗後，橫切厚約 0.7 cm 之切片，吸取 20 μ l 之細菌懸浮液 (1.1×10^8 cells/ml) 滴於直徑 0.6 cm 的濾紙圓盤上，將此濾紙放於薯塊切片中央，接種後之薯塊置於培養皿內，以濕潤濾紙保持高濕度，於 28 C，24 hr 後，量取其腐爛面積。

對馬鈴薯植株莖部之致腐能力：將馬鈴薯卡迪娜 (Cardinal) 與克尼伯品種之薯塊種植於花盆，於植株約一個月大時在莖部作穿刺接種，以針在離土表 15 cm 處之莖部 1 cm 範圍內穿刺六孔，將細菌懸浮液 (1.1×10^8 cells/ml) 噴佈於穿刺處，直到有水滴滴下為止，放入霧室 (mist chamber) 中，5 天後，記錄其發病情形。

對一般蔬菜組織之致腐能力：由市場購得之結球白菜、蘿蔔、胡蘿蔔、胡瓜等蔬菜，經 70% 酒精表面消毒後，其中結球白菜係以針於葉柄組織上製造傷口後，接種 20 μ l 之細菌懸浮液 (1.1×10^8 cells/ml)，而蘿蔔、胡蘿蔔及胡瓜等蔬菜，則按前述馬鈴薯切片之接種方法，將細菌懸浮液先滴於濾紙圓盤上，再將濾紙放於蔬菜之塊根或果實切片之中央，接種後之蔬菜組織置於培養皿內，以濕潤濾紙保持高濕度，於 28 C，24 hr 後，量取其腐爛面積。此外，並將供試之軟腐細菌，依前述針刺接種法，接種於結球白菜葉柄組織，每隔一定時間量取其軟腐面積之大小，以瞭解各菌株引起軟腐病勢進展之情形。

植物組織傷口對細菌之誘引

於 70% 酒精表面消毒後之結球白菜葉柄組織上，以針製造傷口，於傷口處分別滴上 0.1 ml 之 SP50 與其無游動性突變菌懸浮液 (1.1×10^8 cells/ml)，經 1/2、1、2 及 3 hr 後，以 1 μ l microsyringe (Hamilton's 7001 N) 分別自傷口處及遠離傷口處之水滴邊緣附近，吸取 1 μ l 量之汁液，作適當稀釋後塗抹於 casamino acids-peptone-glucose (CPG) (10) 平板上，經 24 hr 培養後，計算所含軟腐細菌之量，測定在傷口處及遠離傷口處所含菌量之比值 (16)，以瞭解植物組織傷口對其誘引之情形。

SP50 與其無游動性突變菌株於軟腐組織上向外擴散之能力

分別製備 SP50 與其無游動性突變菌株之細菌懸浮液 (1.1×10^8 cells/ml)，以等體積將兩者充分混合後，取 20 μ l 接種於結球白菜葉柄組織上，經 24 與 48 hr 後，自軟腐組織外緣處吸取 1 μ l 量之汁液，作適當稀釋後，塗抹於 CPG 平板上，經 24 hr 培養後，逢機挑取 100-200 個單一菌落之軟腐細菌穿刺於 NGA 平板，計算具游動性細菌所佔之比例。另外以單獨接種 SP50 或其突變菌株為對照。

SP50 與其無游動性突變菌株在馬鈴薯葉片上之存活測定

栽種於花盆中的馬鈴薯克尼伯品種植株，約一個月大時，將 SP50 與其無游動性突變菌株之細菌懸浮液 (3.2×10^8 cells/ml) 均勻噴佈於葉表面，直到有水滴滴下為止，放置於溫室內，經 1-2 hr 葉面乾燥後，作第一次採樣，用直徑 0.7 cm 的打孔器於葉片上打洞，每個菌株採 30 個葉片圓盤，置於滅菌過之研鉢中，加入 3 ml 無菌水磨碎後，作適當稀釋後，塗抹於 CVP 平板上，經 24 hr 培養後，計算 *Erwinia* 軟腐細菌之量。其後每隔 2-5 天採樣，依上述方法測定 SP50 與其無游動性突變菌株在葉片上菌量之變化。

SP50 與其無游動性突變菌株在土壤中之存活測定

將 300 g 經 20 網目網篩篩過的陰乾砂質壤土 (採自台中縣大里鄉，pH 5.3，有機質 1.5%)，分別和 30 ml 之 SP50 與其無游動性突變菌株之細菌懸浮液 (3.2×10^8 cells/ml) 均勻混合後，加入 300 ml 之燒杯中，並加入 30 ml 之無菌水，使其含水量約為 20%，以塑膠袋封口，置於 28 C 之定溫箱中，定期由燒杯中取出 10 g 土壤加入 100 ml 無菌水中，經振盪並作適當稀釋後，塗抹於 CVP 平板上，經 24 hr 培養後，計算 *Erwinia* 軟腐細菌之量。另稱取 10 g 土壤以烘箱在 100 C 烘乾，求其乾重量。

結 果

無游動性突變菌株之特性

具游動性之 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50，經紫外線照射誘導突變後，共獲得 11 個可產生果膠分解酵素，而不具游動性之突變菌株。其中 MI-17、MI-49 及 MI-58 三個突變菌株產生果膠分解酵素 PL 與 PG 之能力與 SP50 最接近，除 MI-17 突變菌株產生 PG 之能力略低外，其餘突變菌株產生 PL 與 PG 之

表一、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 產生果膠分解酵素之能力

TABLE 1. Pectic enzymes production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58 on potato tuber

Strain	Enzyme activity ¹	
	PL (A_{230})	PG (A_{510})
SP50	0.94	0.06
MI-17	0.87	0.04
MI-49	0.92	0.06
MI-58	0.93	0.05

¹ PL, pectate lyase; PG, polygalacturonase. PL activity was assayed as that described by Basham and Bateman (3), and the results were expressed as A_{230} . PG activity was assayed by the thiobarbituric acid method (26), and the results were expressed as A_{510} . The experiment was done three times with similar results; the values shown are from a single representative experiment.

表二、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 在馬鈴薯上之致腐能力

TABLE 2. Soft rot ability of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58 on potato tuber

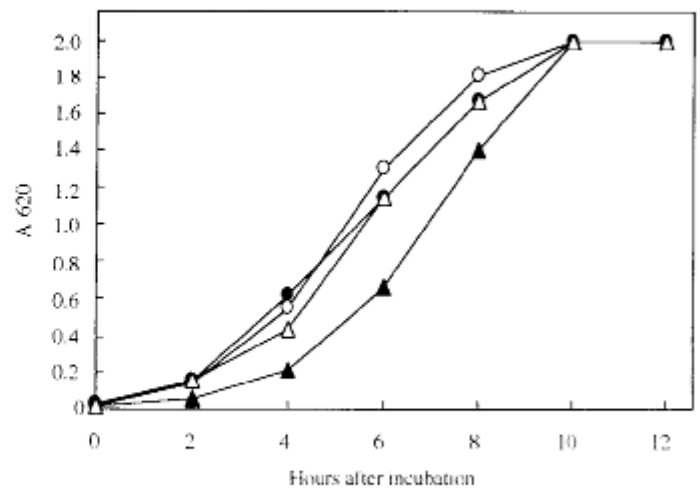
Strain	Whole tuber ¹	Tuber slice ²
	Tissue rotted (g)	Rotted area (cm ²)
SP50	8.73 a ³	16.08 a
MI-17	4.78 b	7.87 b
MI-49	4.68 b	3.62 b
MI-58	2.73 b	7.82 b

¹ Rotted tissues in whole tubers were measured 5 days after inoculation; data shown were mean of 4 replicates.

² Rotted area on the tuber slice was measured 24 hr after inoculation; data shown were mean of 3 replicates.

³ Values in the same column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) by Duncan's multiple range test.

能力與 SP50 相同或相近(表一), 因而被選為進一步研究之材料。電子顯微鏡觀察顯示, 具游動性之 SP50 與 MI-17 及 MI-49 之細胞皆有正常之周生鞭毛, 而 MI-58 則未具鞭毛。此三個無游動性突變菌株, 於 M56 最小培養基與 NA 平板上皆生長良好, 顯示此三個經由紫外線誘導之無游動性突變菌株, 不是營養缺失性



圖一、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 (▲) 與其無游動性突變菌株 MI-17(○)、MI-49(●) 及 MI-58(△) 在最小培養基 M56 之生長。

Fig. 1. Growth of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 (▲) and its nonmotile mutants MI-17(○), MI-49(●) and MI-58(△) in minimal medium M56.

突變菌; 在 M56 培養液中, 其生長速率與 SP50 相近或略快(圖一), 於培養 10 hr 後, 均可到達相同濃度之靜止期(stationary phase); 於其他生理生化特性測試結果顯示, 無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 與 SP50 一樣仍可液化明膠, 具有解脂能力與酪蛋白水解能力, 於含硫代硫酸鈉培養基中可產生硫化氫, 可還原硝酸鹽, 而不能水解澱粉, 不產生卵磷脂分解酵素及磷酸分解酵素, 對抗生素 erythromycin 不敏感(50 $\mu\text{g/ml}$)。

SP50 與其無游動性突變菌株之致腐能力

無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 於馬鈴薯整個薯塊或切片上, 造成軟腐之程度, 皆較具游動性之 SP50 顯著減弱(表二); 又接種於馬鈴薯植株莖部後, 觀察馬鈴薯植株腐爛情形, 亦顯示游動性之 SP50 在此兩種馬鈴薯植株上皆較其無游動性突變菌株有較強之致腐能力(表三)。在卡迪娜品種上, 接種 SP50 可造成 55% 植株發生腐爛倒伏情形, 其餘植株雖未倒伏, 切開其莖部可發現部份蔓延之黑褐色腐爛現象, 而接種無游動性突變菌株時, 大部份植株僅在接種的部位產生壞疽現象; 於克尼伯品種上之接種試驗, 亦得類似結果。此外具游動性之 SP50 在蘿蔔、胡蘿蔔、胡瓜切片上之致腐能力, 皆顯著地較其無游動性突變菌株為強(表四)。另外, 在結球白菜葉柄組織上, 具游動性之 SP50 亦較其無游動性之突變菌株有較強之致腐能力(圖二)。又接種具游動性之 SP50 其引起結球白菜葉柄組織腐爛面積, 隨時間之增長而迅速擴大, 而接種無游動性突變菌株, 其軟腐病勢進展緩慢(圖三)。

表三、馬鈴薯植株接種 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 五天後之軟腐反應

TABLE 3. Soft rot reaction of potato plants 5 days after inoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58

Cultivar	Strain	Reaction (%) ¹		
		Necrotic lesion	Rotted partially	Plant collapsed
Cardinal	SP50	0	45	55
	MI-17	57	43	0
	MI-49	67	33	0
	MI-58	100	0	0
Kennebeck	SP50	0	50	50
	MI-17	70	0	0
	MI-49	60	0	0
	MI-58	40	20	20

¹ Reaction (%) of 7-10 potato plants.

表四、蔬菜組織接種 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 二十四小時後之軟腐反應

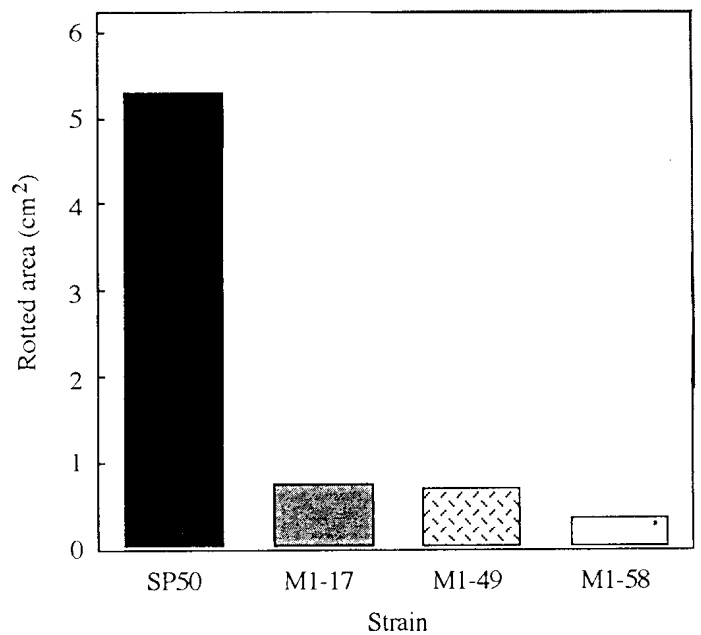
TABLE 4. Soft rot reaction of vegetable tissues 24 hours after inoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58

Strain	Rotted area (cm ²) ¹		
	Radish	Carrot	Cucumber
SP50	9.62 a	14.68 a	3.72 a
MI-17	3.68 b	6.11 b	0.90 b
MI-49	1.85 b	3.41 b	0.82 b
MI-58	1.07 b	3.20 b	0.36 b

¹ Slices of radish, carrot and cucumber were inoculated; data shown were mean of 3 replicates. Values in the same column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) by Duncan's multiple range test.

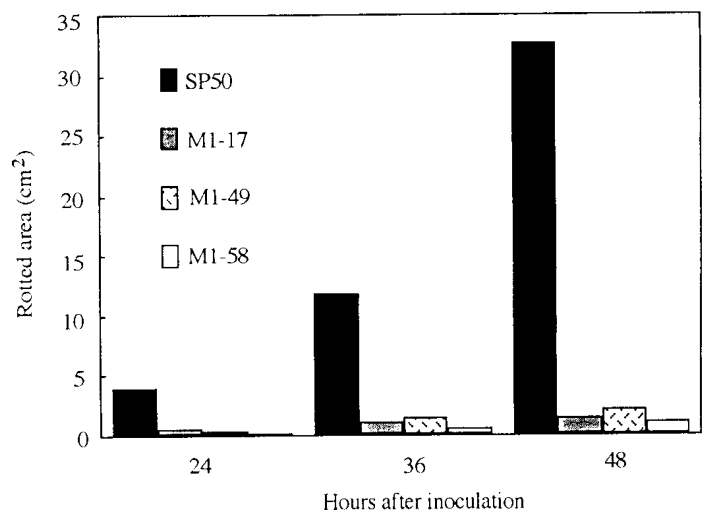
植物組織傷口對軟腐細菌之誘引

分別接種 SP50 與其無游動性突變菌株於結球白菜組織上，於接種後 2-3 hr，具游動性之 SP50 明顯聚集於傷口附近，於傷口附近之細菌量與不在傷口附近之細菌有顯著差異，於傷口附近之細菌比鄰近非傷口部位之細菌可高達 18 倍之多；而接種不具游動性之突變菌株，其細菌量於傷口處與不在傷口附近之差異則顯著減少，顯示游動性可影響軟腐細菌向傷口聚集之能力(圖四)。



圖二、結球白菜葉柄組織以 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 接種 24 hr 後所呈現之軟腐反應。

Fig. 2. Soft rot reaction of Chinese cabbage petiole tissues 24 hours after inoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58.



圖三、結球白菜葉柄組織接種 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 後軟腐病勢發展之情形。

Fig. 3. Soft rot development on Chinese cabbage petiole tissues after inoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58.

SP50 與其無游動突變菌株於軟腐組織上向外擴散之能力

具游動性之 SP50 與其無游動突變菌株單獨或混合接種於結球白菜上，經不同時間後，偵測具游動性軟腐細菌於軟腐組織外緣處存在之情形。結果顯示單獨

表五、混合接種 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 於結球白菜葉柄組織後，具游動性軟腐細菌於腐爛組織外緣存在之百分率

TABLE 5. Percentage of motile cells at margin area of rotted Chinese cabbage petiole tissues after coinoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58

Bacteria inoculated	Hours after inoculation ¹	
	24	48
SP50	100	100
MI-17	0	0
MI-49	0	0
MI-58	0	0
SP50+MI-17	96.0	99.7
SP50+MI-49	94.1	98.9
SP50+MI-58	95.4	100

¹ Chinese cabbage petiole tissues were coinoculated with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutant in a 1:1 ratio with each containing 1.1×10^8 cells/ml. One μ l of suspension was removed from margin area of rotted areas after certain period. The percentage of motile cells in the samples was determined by dilution plating on CPG agar and then assaying on a motility agar, NGA plate.

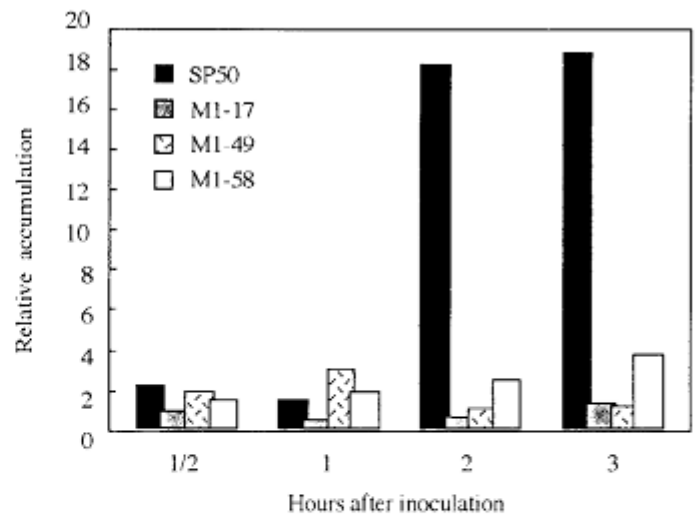
接種 SP50 菌株之組織上，在軟腐組織外緣附近採樣之軟腐細菌，皆具游動性。而單獨接種 MI-17、MI-49 及 MI-58 等無游動性突變菌株之組織上所分離到之軟腐細菌，則皆不游動，顯示此些無游動性突變菌株於軟腐組織上仍很穩定，未見其恢復游動性。若混合接種 SP50 及其無游動性突變菌株於結球白菜組織，於軟腐組織外緣所偵測之軟腐細菌，具有游動性者佔 94% 以上(表五)，說明游動性菌株可藉其游動性游到新的部位，而無游動性突變菌株則未具有此能力。

SP50 與其無游動性突變菌在馬鈴薯葉片上之存活

於溫室內，在克尼伯品種之馬鈴薯葉片上，無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 於接種後經 4 星期，仍可在馬鈴薯葉片上偵測到，於各採樣時間所偵測到之軟腐細菌數目常起伏於 10^1 - 10^3 cfu/leaf disc 之間，而具游動性之 SP50 於克尼伯品種馬鈴薯葉片上，並未較其無游動性之突變菌株有顯著較好之存活情形(圖五)。

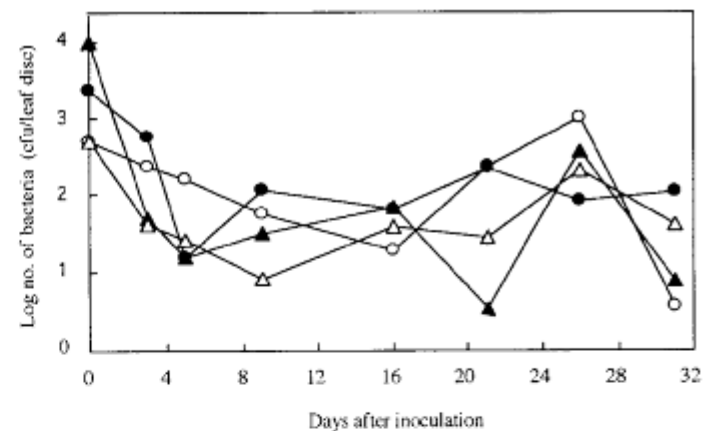
SP50 與其無游動性突變菌株在土壤中之存活

無游動性突變菌株混入土壤後，各菌株皆顯著下降，其中 MI-58 菌株於 6 天後即無法偵測到；而無游



圖四、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 與其無游動性突變菌株 MI-17、MI-49 及 MI-58 在結球白菜葉柄組織傷口處聚集情形。

Fig. 4. Accumulation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58 to the wounded site of the Chinese cabbage petiole tissues. Relative accumulation is expressed as ratio of number of bacteria detected from the site of the wound to that from the adjacent nonwounded site.



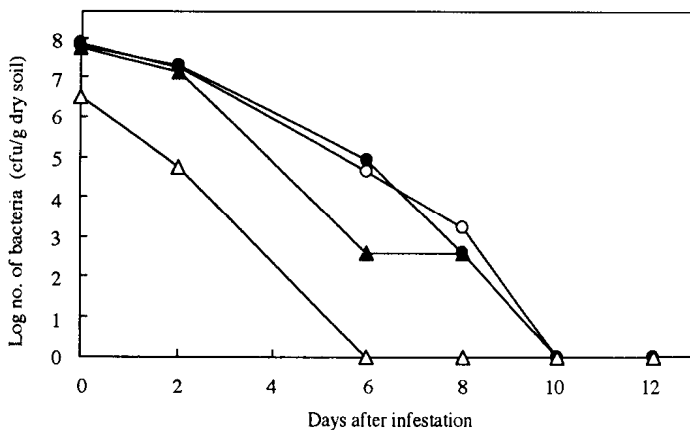
圖五、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 (-▲-) 與其無游動性突變菌株 MI-17(-○-)、MI-49(-●-) 及 MI-58(-△-) 在溫室馬鈴薯克尼伯品種葉表之存活。

Fig. 5. Survival of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 (-▲-) and its nonmotile mutants MI-17(-○-), MI-49(-●-) and MI-58(-△-) on leaf surfaces of Kennebeck potato plants in greenhouse conditions.

動性之突變菌株 MI-17 與 MI-49 及具游動性之 SP50，於 10 天後亦無法測得，顯示具游動性之 SP50 與其無游動性突變菌株於土壤中皆存活不良(圖六)。

討 論

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* 分佈廣泛，可引起許多經濟作物於栽培、運銷與貯藏時期之軟腐



圖六、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 (-▲-) 與其無游動性突變菌株 MI-17(-○-)、MI-49(-●-) 及 MI-58(-△-) 在土壤中之存活。

Fig. 6. Survival of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 (-▲-) and its nonmotile mutants MI-17(-○-), MI-49(-●-) and MI-58(-△-) in soil.

(23)。本研究探討游動性與其致腐及存活能力可能之關係。以紫外線照射具游動性之 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50，所選取之三個無游動性突變菌株中，MI-58 突變菌株因不具鞭毛，而失去游動性，然 MI-17 與 MI-49 兩個突變菌株，雖具有外觀正常之周生鞭毛，卻不具游動性。可知 MI-58 突變菌株係在鞭毛形成之基因上發生突變，而 MI-17 與 MI-58 兩個突變菌株，則可能在控制游動性之基因上發生突變所致 (27)。致腐能力測試結果顯示，此三個無游動性突變菌株對作物組織仍具致腐能力，然其致腐能力顯著減弱；具游動性之 SP50 對作物組織造成之軟腐皆較其無游動性之突變菌株為大。由於果膠分解酵素為 *Erwinia* 軟腐細菌造成植物組織腐爛之主要致病因子 (8, 19)，具游動性之 SP50 與其無游動性突變菌株致腐能力之差異，可能與其產生果膠分解酵素能力有關，然本研究所選取之三個無游動性突變菌株產生果膠分解酵素 PL 與 PG 之能力與具游動性之 SP50 甚為相近 (MI-17 突變菌株產生 PG 能力略低外)，且將 SP50 與其無游動性突變菌株培養於含 1% Napp 之培養基，所產生之果膠分解酵素粗抽出液，分別接種於結球白菜組織，其造成之軟腐程度亦未見差異 (資料未發表)；此外三個突變菌株並非營養缺失性突變菌，其生長速率亦未減慢。因此，這些因子可能並非其致腐能力顯著減弱之主要原因。*Erwinia* 軟腐細菌可產生其它胞外酵素 (extracellular enzymes) 如 cellulase、hemicellulase 及 proteinase 等亦可能影響其致腐能力 (19)。SP50 與其無游動性突變菌株，在此些酵素產生能力之差異，本研究並未比較，仍待進一步測試，然在生化特性測試中顯示，無游動性突變菌株仍具 proteinase，可分解酪蛋白及明膠。

具游動性之 SP50 為何致腐能力較其無游動性突變菌株為強？也許由接種具游動性之 SP50 於結球白菜組織，其軟腐面積，隨時間之增長可迅速擴大，而接種三個無游動性突變菌株，其軟腐面積進展緩慢之結果，可推測部份原因係由於具游動性之 SP50 可向腐爛組織外緣游動，繼續感染周圍之組織，使得軟腐面積更加蔓延擴大，因而增強其致腐能力所致；而無游動性突變菌株雖然可分泌果膠分解酵素，於接種部位附近可造成植物組織之腐爛，由於其不能游動，所以產生腐爛之範圍很容易被寄主所產生的抗病物質所限制 (20)。游動性之 SP50 向腐爛組織外緣游動之推測，於本研究中混合接種游動性之 SP50 與其無游動性突變菌株於結球白菜組織後，偵測腐爛組織外緣之菌，大部份為具游動性者，可獲得證實。此外欲證明游動性是否影響 SP50 之致腐能力，篩選無游動性突變菌株之游動性回復菌 (revertant) 進一步測試，比較其致腐能力，亦為一研究途徑。由於三個無游動性突變菌株在保存與培養中均甚穩定，於研究過程中並未篩選到其游動性回復菌株，因此，無法作進一步測試。

本研究在溫室內探討具游動性之 SP50 與其無游動性突變菌株在馬鈴薯葉片上存活情形，發現在馬鈴薯葉表，軟腐細菌消長情形與其是否具有游動性並無相關性，由於本試驗是在溫室內進行，其在田間自然環境下，游動性是否有助於軟腐細菌之存活則有待進一步之評估。此外，具游動性之 SP50 與其無游動性突變菌株在土壤中的存活測試結果亦相近，在未栽培寄主植物之土壤中，於 10 天內皆下降至無法偵測到。由於具游動性之細菌，常有趨化性，本研究所用之 SP50 在植物組織傷口處聚集之細菌量較其鄰近非傷口部位之菌量可高達 18 倍之多，可知此游動性菌株具有趨化性。Hsu 和 Huang (16) 對 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 與 *E. chrysanthemi* 之趨化性研究指出，*E. carotovora* subsp. *carotovora* 與 *E. chrysanthemi* 對植物根分泌物有趨化性，然無寄主專一性，具趨化性之軟腐細菌於栽種作物或雜草之土壤中，是否可向其根圈移動，而有利於其存活，是值得繼續探討之問題。

引用文獻

1. 盛文綸、徐世典、曾國欽. 1981. *Erwinia chrysanthemi* 與 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 無游動性突變種之特性. 植保會刊 23:269-270(摘要)。
2. Adler, J. 1975. Chemotaxis in bacteria. Annu. Rev. Biochem. 44:341-356.
3. Basham, H. G., and Bateman, D. F. 1975. Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. Phyto-

- pathology 65:141-153.
4. Bayot, R. G., and Ries, S. M. 1986. Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology* 76:441-445.
 5. Burr, T. J., and Schroth, M. N. 1977. Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. *Phytopathology* 67:1382-1387.
 6. Carlton, B. C., and Brown, B. J. 1981. Gene mutation. Pages 222-242 in: *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 524 pp.
 7. Chet, I., Zilberstein, Y., and Henis, Y. 1973. Chemotaxis of *Pseudomonas lachrymans* to plant extracts and to water droplets collected from the leaf surfaces of resistant and susceptible plants. *Physiol. Plant Pathol.* 3:473-479.
 8. Collmer, A., and Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:383-409.
 9. Cuppels, D. A. 1988. Chemotaxis by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:629-632.
 10. Cuppels, D. A., and Kelman, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 64:468-475.
 11. De Weger, L. A., van der Vlugt, C. I. M., Wijffes, A. H. M., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B., and Lugtenberg, B. 1987. Flagella of plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* 169:2769-2773.
 12. Doetsch, R. N., and Sjoblad, R. D. 1980. Flagellar structure and function in eubacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:69-108.
 13. Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. the "amylovora" group. *N. Z. J. Sci.* 11:590-607.
 14. Haeefele, D. M., and Lindow, S. E. 1987. Flagella motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2528-2533.
 15. Hattermann, D. R., and Ries, S. M. 1989. Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology* 79:284-289.
 16. Hsu, S. T., and Huang, H. C. 1987. Chemotaxis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Proc. Natl. Sci. Council. B. ROC.* 11:80-89.
 17. Iino, T., and Enomoto, M. 1970. Motility. Pages 45-163 in: *Methods in Microbiology*. Vol. 5A. J. R. Norris, and D. E. Ribbons, eds. Academic Press, London, 450 pp.
 18. Klopmeier, M. J., and Ries, S. M. 1987. Motility and chemotaxis of *Erwinia herbicola* and its effect on *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 77:909-914.
 19. Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft rot erwinias. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:405-430.
 20. Lovrekovich, L., Lovrekovich, H., and Stahmann, M. A. 1967. Inhibition of phenol oxidation by *Erwinia carotovora* in potato tuber tissue and its significance in disease resistance. *Phytopathology* 57:737-742.
 21. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 545 pp.
 22. Panopoulos, N. J., and Schroth, M. N. 1974. Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves by *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathology* 64:1389-1397.
 23. Perombelon, M. C. M., and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18:361-387.
 24. Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M. B., and Pava, E. T. 1991. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:276-283.
 25. Scher, F. M., Kloepper, J. W., and Singleton, C. A. 1985. Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates in vitro and in soil. *Can. J. Microbiol.* 31:570-574.
 26. Sherwood, R. T. 1966. Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology* 56:279-286.
 27. Silverman, M., and Simon, M. I. 1977. Bacterial flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:397-419.
 28. Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 1981. Identification of soft-rotting *Erwinia* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 23:77-85.

ABSTRACT

Tzeng, K. C., Chen, S. F., and Hsu, S. T. 1994. Soft rot ability and survival of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SP50 and its nonmotile mutants. *Plant Pathol. Bull.* 3:119-127. (Graduate Institute of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58 induced by UV light were selected from a motile strain SP50 of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. The electron microscopic examination

revealed that cells of mutants MI-17 and MI-49 had normal peritrichous flagella, while MI-58 had no flagellum. These three nonmotile mutants were not auxotrophic and resembled SP50 in growth rate, pectic enzymes production and other biochemical characteristics tested. Inoculation tests showed that motile strain SP50 appeared to cause more rot on potato plants and various plant tissues than its nonmotile mutants. Cells of motile strain SP50 but not its nonmotile mutants were attracted to wounds on Chinese cabbage petiole tissues. For motile strain SP50 the number of cells detected from the site of the wound was 18 times more than that from the adjacent nonwounded site. To Chinese cabbage petiole tissues which were coinoculated with motile strain SP50 and its nonmotile mutants in a 1:1 ratio, the motile cells were predominant at the margin area of the rotted tissues. In the greenhouse tests, nonmotile mutants MI-17, MI-49 and MI-58 survived much the same as the motile strain SP50 on the leaf surface of potato plants and in soil.

Key words: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, motility, soft rot ability, survival.