

# 具危害芒果葉片造成壞疽斑潛力之細菌 *Pantoea agglomerans* MB-9

李敏惠<sup>1,2</sup> 曾德賜<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 台中市 中興大學植物病理學系

<sup>2</sup> 聯絡作者，電子郵件：mhlee@nchu.edu.tw，傳真：+886-4-2287-7585

接受日期：民國 95 年 2 月 21 日

## 摘要

李敏惠、曾德賜. 2006. 具危害芒果葉片造成壞疽斑潛力之細菌 *Pantoea agglomerans* MB-9. 植病會刊 15: 63-68.

本研究自褐化壞疽病斑之芒果果實表面分離出 18 個細菌菌株，發現其中 MB-9 菌株可於人工接種下引起台灣原生種芒果與愛文芒果之老葉與新葉褐化壞疽。利用人工接種系列稀釋之 MB-9 菌株於芒果新葉，發現 200 CFU 之接種菌量即可導致褐化壞疽病徵之表現。經光學與電子顯微鏡之細胞形態與構造之觀察、培養特性、生理生化反應及血清反應之測試，證實 MB-9 菌株為 *Pantoea agglomerans* (syn. *Erwinia herbicola*)。本報告顯示 *Pantoea agglomerans* (syn. *E. herbicola*) 具有危害芒果葉片的潛在危險性。

關鍵詞：*Pantoea agglomerans*、*Erwinia herbicola*、芒果、褐化壞疽、生理生化反應、血清反應、細菌鑑定

芒果為臺灣重要之夏季水果，主要栽培區為中南部，尤以玉井及屏東最多。影響本省芒果產量最嚴重之病害為炭疽病及細菌性黑斑病<sup>(1,2)</sup>。芒果果實於後熟過程常會見伴隨產生的褐化壞疽病斑，一般多為炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 危害所造成。其多年來一直是嚴重影響芒果品質及國際競爭力之主要限制因子。在一次芒果標本採集與病害調查中，由玉井地區所採集之罹病果實上，分離到一種可以造成芒果葉片接種部位明顯褐化壞疽之細菌。本文針對此具危害芒果潛力之細菌進行鑑定及其病原性測試。

將採集自玉井之罹病原生種芒果果實，切取病斑及其周圍組織，以無菌水磨成汁液，塗佈於 523 平板培養基 (523 medium: 20 g sucrose, 8 g casein, 4 g yeast extract, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 17 g agar 及 1 L 的水) 上以分離細菌。於 27 °C 中培養 2 天後，挑出形成之細菌菌落，經連續兩次單一菌落分離後，移入 523 斜面培養基中培養作為供試菌源。將所分離得之 18 個細菌菌株進行病原性之檢定如下所述。以無菌

水將新鮮培養的細菌調成 10<sup>8</sup> CFU/ml 之菌體濃度，分別接種於以針劃傷之芒果葉片上，每一傷口部位接種 20 μl 菌體量。供測植物為愛文及原生種芒果，包括溫室內盆栽植株，田間五年樹齡植株，及採回實驗室葉片與果實。所有接種處理皆以保濕盒 (moisture chamber) 或以套袋方式維持 24 小時之高濕度。接種濃度對病徵表現之影響，則以各種不同濃度之 MB-9 接種於針刺傷口之葉片上，觀察病徵顯現情形。在對煙草葉片過敏性反應之測定，則將 MB-9 菌株以無菌水製成 10<sup>8</sup> CFU/ml 之懸浮液，然後以注射針打入萬國士與台煙六號煙草葉片中，觀察過敏性反應表現情形。每一接種實驗及每一接種處理至少二重複。

MB-9 之鑑定包括以光學顯微鏡及穿透式電子顯微鏡觀察細菌之形態與構造、生理生化測試以及血清反應測試。細菌形態與鞭毛之觀察係以 2 % 磷鎢酸 (Phosphotungstic acid) 溶液染色後，以 JEOL 200 CX 穿透式電子顯微鏡觀察。而細菌革蘭氏染色反應，則依 Hucker 氏之染色方法測定<sup>(9)</sup>。細菌之培養特性為劃線

平板法形成單一菌落於 NA 及 523 培養基上，於 27 °C 定溫箱培養。細菌之生理生化反應特性之鑑定除利用 API-20E (BioMerieux, INC.) 鑑定系統外，還包括苯丙氨酸脫氨酶素 (phenylalanine deaminase) 之產生能力、耐鹽性、果膠分解能力 (pectate degradation)、及利用碳水化合物產酸能力之測試。以上生理生化反應依 Gerhardt 氏 (1981) 所述之方法測定<sup>(9)</sup>。在細菌生理生化反應側測試試驗中，並以新竹食品工業發展研究所菌種中心之 *Pantoea agglomerans* BCRC10380 菌株做為對照。在血清學反應方面，抗血清之製備方式乃依黃氏<sup>(14)</sup>所述之方法進行，將 MB-9 菌株以及下注射打入紐西蘭白兔，所獲得之抗血清利用凝聚法測試此細菌與 *P. agglomerans* BCRC10380 菌株在血清學上關係。每一測試處理至少重複二次。

結果顯示，自玉井芒果園中所採集之病果，經研磨成汁液塗佈於 523 平板培養基上經連續兩次單一菌落分離後，共獲得 18 株細菌，菌落呈黃、白兩種顏色。將此 18 株細菌菌株以傷口接種於原生種及愛文芒果成熟葉片上，連續觀察 12 天後發現僅 MB-9 分離株可造成葉片嚴重壞疽褐化之病徵。其他分離株相對於無菌水接種，則屬無病徵顯現，或略有不明顯褐化現象 (如 MB-4-2, MB-3, MB-12)(表一，圖一A)。無論葉片顏色已轉綠之成熟葉或顏色尚呈紅棕色之新葉都可被感染，但以新葉較為感病。將 MB-9 分離株針刺接種於芒果新葉，於兩天後即可造成明顯的壞疽褐化病徵，而且當接種源濃度高至  $10^9$  CFU/ml 時，有時可見褐化病徵擴展出接種點之外 (圖一C)；接種於植株上之葉片或採下之成熟葉片則需 3 至 4 天病徵才會顯現。從接種產生壞疽之罹病部位分離出之菌株，再接種於芒果葉片亦可造成褐化壞疽病徵 (圖一B)。多次接種於原生種芒果之未成熟及完全成熟果實上，針刺傷口接種結果皆無病徵顯現。不同接種濃度對病徵表現之影響，發現接種濃度為  $1 \times 10^4$  CFU/ml 即可造成接種部位明顯褐化，相當於單一接種點只需 200 CFU 之菌量即可導致病徵之表現 (圖一C)。在煙草葉片上過敏性反應表現之測試，結果顯示接種 48 小時後，台煙六號及萬國士葉片接種部位皆顯現侷限於接種部位之葉片組織褐化變薄、透化等過敏性反應之特性。在細菌之鑑定方面，其中菌落培養特性顯示 MB-9 菌株於 NA 及 523 培養基上菌落均為黃色，不具黏稠性，初期為圓形，後為紡錘形。經染色後以光學顯微鏡及穿透式電子顯微鏡觀察顯示 MB-9 屬於革蘭氏陰性菌，菌體為桿狀，大小為  $0.6 \times 1.4-1.9 \mu\text{m}$ ，具周生鞭毛。在生理生化反應特性測試結果，顯示 MB-9 菌株為兼性嫌氣性細菌，與 *P. agglomerans* BCRC10380 菌株比較，顯

示 MB-9 菌株與 BCRC 10380 菌株之測試結果呈現 100% 相同度 (表二)。在利用碳水化合物產酸測試中，MB-9 與 BCRC 10380 兩菌株對 18 種供測試之碳水化合物中，有 17 種之產酸反應結果相同，只有對 sorbitol 的產酸反應結果不同。MB-9 可以利用 sorbitol 產生酸而 BCRC10380 菌株則不能。兩菌株皆可利用產酸之該 17 種碳水化合物包括 Glucose, Mannitol, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Sucrose, Melibiose, Amygdalin, Arabinose, Xylose, Maltose, Manose, Inulin, Ducitol, Adonitol, Trehalose, Celobiose 及  $\alpha$ -Methyl glucoside。在血清學反應上則顯示 MB-9 之抗血清可與 BCRC10380 菌株產生凝聚反應但無法與分離自大白菜之軟腐病菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 產生反應，顯示 MB-9 與 *P. agglomerans* BCRC10380 菌株兩者有血清學上之關係。

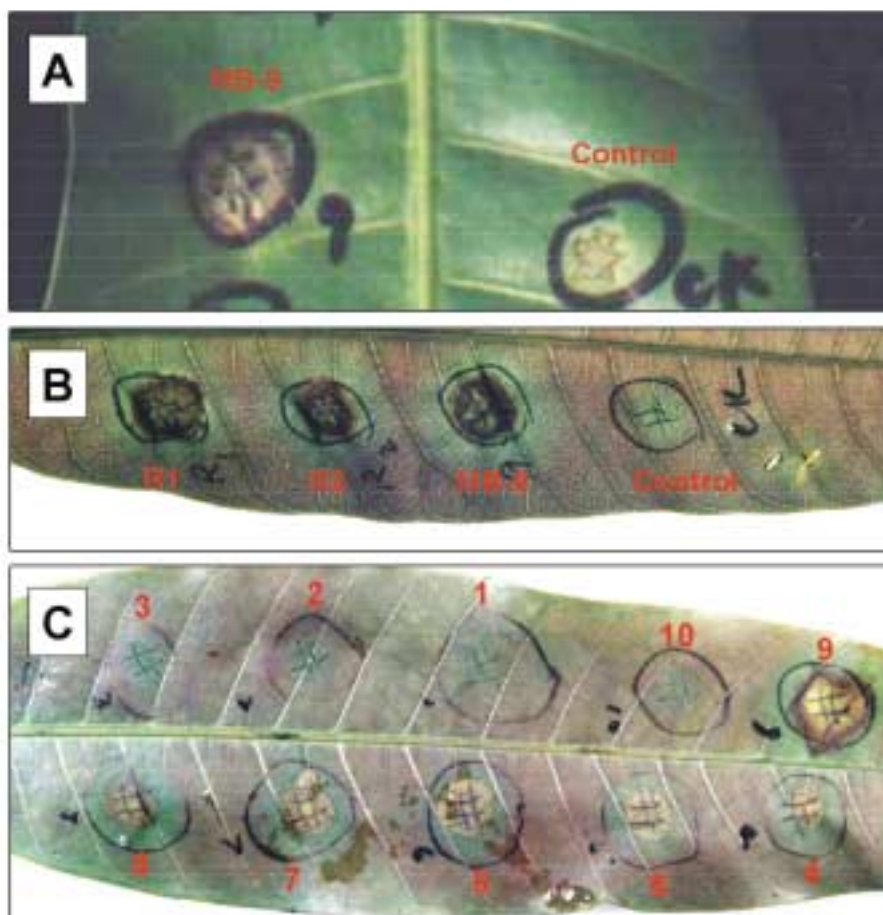
*Pantoea agglomerans* 或稱為 *Erwinia herbicola* 菌株，大部份為葉表腐生，根據 Gavini 等氏 (1989) 於 International Journal of Systemic Bacteriology 之報告<sup>(8)</sup>，將可形成黃色菌落之 *Erwinia herbicola* (Dye 1964) 更名

表一、18 株分離自台灣原生種芒果壞疽病斑之細菌菌株接種於愛文及原生種芒果成熟葉片四天後之病徵表現情形

Table 1. The disease index on leaves of Irwin mango and naive mango 4 days after inoculation with 18 bacterial strains isolated from mango fruit necrotic lesions

Bacterial strains	Mango cultivars	
	Irwin	native
MB-1	0 <sup>1</sup>	0
MB-2	0	0
MB-3	0	1
MB-4-1	0	0
MB-4-2	1	2
MB-5-1	0	0
MB-5-2	0	0
MB-6	0	1
MB-7	0	0
MB-9	5	5
MB-10	0	0
MB-11	0	1
MB-12	0	2
MB-13	0	1
MB-B1	0	1
MB-B2	0	1
MB-B3	0	1
MB-T	0	1
Control	0	0

<sup>1</sup> 0, no necrosis; 1, 1~20 % necrosis of inoculated area; 2, 21~40 % necrosis of inoculated area; 3, 41~60% necrosis of inoculated area; 4, 61~80% necrosis of inoculated area; 5, 80~100 % necrosis of inoculated area.



圖一、MB-9 菌株感染芒果之情形。A、MB-9 菌株(MB-9) 及水(Control) 傷口接種於原生種芒果成熟葉片上四天後之發病情形。B、自 MB-9 菌株 (MB-9) 接種之罹病部位分離出之 MB-9 再分離株 (R1 與 R2) 傷口接種於愛文芒果新葉兩天後之發病情形，Control 為接種水之對照處理。C、愛文芒果新葉傷口接種不同濃度之 MB-9 菌株兩天後之發病情形。接種源濃度 (CFU/ml) 如標示為 1 代表  $1 \times 10^1$ ，2 代表  $1 \times 10^2$ ，3 代表  $1 \times 10^3$ ，4 代表  $1 \times 10^4$ ，5 代表  $1 \times 10^5$ ，6 代表  $1 \times 10^6$ ，7 代表  $1 \times 10^7$ ，8 代表  $1 \times 10^8$ ，9 代表  $1 \times 10^9$ ，而 10 則代表水接種之對照處理。

Figure 1. Symptoms caused by MB-9 strain on mango leaf. A, Symptoms of mature Taiwan native mango leaf were presented 4 days after wound inoculation with MB-9 strain (MB-9) and water (Control). B, Symptoms of young mango leaf (cv. 'Irwin') were shown 2 days after wound inoculation with MB-9 strain (MB-9) and two bacterial isolates (R1 and R2), which were re-isolated from MB-9 strain inoculated mango leaf. C, Young leaf of mango cultivar 'Irwin' was wound inoculated with serially diluted suspensions of MB-9 strain (CFU/ml) for 2 days. 1,  $1 \times 10^1$ ; 2,  $1 \times 10^2$ ; 3,  $1 \times 10^3$ ; 4,  $1 \times 10^4$ ; 5,  $1 \times 10^5$ ; 6,  $1 \times 10^6$ ; 7,  $1 \times 10^7$ ; 8,  $1 \times 10^8$ ; 9,  $1 \times 10^9$ ; 10, water.

為 *P. agglomerans* (Ewing and Fife 1972)。 *P. agglomerans* 於植物病害生物防治上之應用已被廣泛研究，為一廣效性之拮抗微生物，防制對象包括真菌及細菌所造成之植株病害及果實後熟期病害<sup>(3, 4, 11, 19, 20)</sup>。本研究發現造成芒果葉片壞疽病斑之 MB-9 菌株，經形態鑑定、培養特性、生理生化測定及血清反應，其結果以 *P. agglomerans* BCRC10380 為對照並比較 Bergey's Manuals<sup>(10)</sup>中所記載之 *E. herbicola* 特性，顯示 MB-9 菌株應為 *P. agglomerans*。 *P. agglomerans* MB-9 為分離自褐化病斑之成熟芒果果實，但在回接成熟果實時卻無法顯示出病原性。其存在於果表可能只是個腐生菌，當果實受其它病原菌感染 (例如真菌)，營養釋出，果

實抗病力衰退，使得本菌可在果實表面生長。在自然界中 *P. agglomerans* MB-9 是否造成芒果葉部病害則需進一步調查。台灣颱風發生頻繁，當颱風來臨風雨交加時，葉片容易摩擦造成傷口，此時濕度高，若再有 200 CFU 以上的 *P. agglomerans* MB-9 菌體存在，則芒果葉片壞疽病害很可能在田間發生。部份 *P. agglomerans* 菌株已被發現可造成植物病害，包括引起滿天星及香石竹之腫瘤病<sup>(6)</sup>、洋蔥莖葉壞疽<sup>(15, 16, 18)</sup>、苜蓿萎凋<sup>(17)</sup>、蒜頭枝枯<sup>(14)</sup>、棉花種子腐敗<sup>(13)</sup>、大豆胚軸壞疽<sup>(7)</sup>及龍舌蘭科植物 (*Dracaena sanderana*) 之水浸狀葉斑<sup>(8)</sup>等。如上所述及本研究之結果，顯示 *P. agglomerans* 可以是造成植物病害之病原菌亦可作為植物病害生物

表二、MB-9 菌株與 *Pantoea agglomerans* BCRC10380 菌株之培養及生理生化特性Table 2. Cultural, physiological and biochemical characteristics of MB-9 strain and *Pantoea agglomerans* BCRC10380

Cultural, physiological and biochemical characteristics	Bacterial strains	
	MB-9	<i>Pantoea agglomerans</i> CCRC10380
Blue pigment	- <sup>1</sup>	-
Yellow pigment	+	+
Glucose fermentation	+	+
$\beta$ -galactosidase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Citrate utilization	+	+
H <sub>2</sub> S production from sodium thiosulphate	-	-
Urease	-	-
Tryptophan deaminase	-	-
Indole production	-	-
Acetoin production	+	+
Cytochrome oxidase	-	-
Nitrate reduction	+	+
Phenylalanine deaminase	+	ND <sup>2</sup>
Catalase activity	+	+
Casein hydrolysis	-	ND
Pectate degradation	-	-
Salt tolerance (10%)	-	-
Salt tolerance (5%)	+	+

<sup>1</sup> +, positive; -, negative<sup>2</sup> ND, not determined

防治之有益微生物。因此，在應用 *P. agglomerans* 作為生物防治製劑時，應測試其是否會為害除施用點以外之作物其他部位或為害施用區域範圍內其他作物。本報告證明 *Pantoea agglomerans* (syn. *E. herbicola*) 可在人工接種下危害芒果葉片造成壞疽，顯示其具有在田間危害芒果葉片的潛在危險性。

## 謝 辭

本研究進行及本文書寫期間承蒙國立中興大學植物病理學系曾國欽教授提供嚴謹之建議，在此表示深切的謝意。本研究承蒙行政院農委會計畫經費資助，特此致謝

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Ann, P. J. 1993. Effect of climate on development of mango bacterial black spot and chemical control. Plant Pathol. Bull. 2:12-19. (in Chinese with English abstract)
- Ann, P. J., Huang, R. C. and Chen, M. F. 1994. Effects of environmental factors on disease incidence of mango anthracnose. Plant Pathol. Bull. 3:34-44. (in Chinese with English abstract)
- Bonaterrea, A., Mari, M., Casalini, L. and Montesinos, E. 2003. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. In. J. Food Microbiol. 84: 93-104.
- Braun-Kiewnick, A., Jacobsen, B. J. and Sands, D. C. 2000. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. Phytopathology 90: 368-375.
- Chase, A. R. 1984. Leaf spot diseases of *Dracaena sanderana* caused by two species of *Erwinia*. Plant Dis 68:251
- Cooksey, D. A. 1986. Galls of *Gypsophila paniculata* caused by *Erwinia herbicola*. Plant Dis. 70:464-468
- Cots, J., and Widmer, F. 1999. Germination, senescence and pathogenic attack in soybean (*Glycine max.* L.): identification of the cytosolic aconitase participating in the glyoxylate cycle. Plant Sci. 149: 95-104
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., and de Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing

- and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:337-345.
9. Gerhardt, P. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington. 524pp.
  10. Holt, J. G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins, London. 964pp.
  11. Hsieh, T. F., Huang, H. C. and Erickson, R. S. 2005. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. J. Phytopathol. 153:608-614.
  12. Huang, T. C. 1986. Studies on the detection Techniques for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Taiwan. Master Thesis. National Chung-Hsing University. 133pp. (in Chinese with English abstract)
  13. Jones, M. and Bell, A. 2004. Association of *Pantoea agglomerans* with seed rot of South Carolina cotton. Phytopathology 94:s69.
  14. Koch, M. F., Taanami, Z., and Levy, E. 1996. Damage to garlic crops caused by *Erwinia herbicola*. Phytoparasitica 24:125-126.
  15. Kritzman, G. and Zutra, D. 1984. Stalk blight of onion, a new disease in Israel caused by *Erwinia herbicola*. p. 83. Spec. Publ. Agric. Res. Org., Bet Dagan no. 225.
  16. Mansvelt, E. L., Harding-Goodman, A., and Hattingh, M. J. 1985. Histopathology of seed stalk necrosis of onion caused by *Erwinia herbicola*. Phytophylactica 17: 41-45.
  17. Moline, H. E. and Kulik, M. M. 1997. Contamination and deterioration of alfalfa sprouts caused by a seedborne isolate of *Erwinia herbicola*. J. Food Qual. 20:53-60.
  18. Morales, N., Vietinghoff, J., Angeles Peres, M. de los Rosa, M. de la Moreno, A., Cuello, I. and Seidel, D. 1994. *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye — a new pathogen of onion seed production (*Allium cepa* L.) in Cuba. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 29:29-40.
  19. Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., Fons, E. and Vinas, I. 2002. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. J. Appl. Microbiol. 92: 247-255.
  20. Pusey, P. L. 1999. Selection and field testing of *Pantoea agglomerans* strain E325 for biocontrol of fire blight of apple and pear. Phytopathology 89:s62.

## ABSTRACT

Lee, M. H.<sup>1,2</sup>, and Tzeng, D. D. S.<sup>1</sup> 2006. *Pantoea agglomerans* MB-9 is a potential pathogen causing necrosis on mango leaf. *Plant Pathol. Bull.* 15:63-68. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan; <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: mhlee@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-2287-7585)

Mango is one of the most important tropic fruits in Taiwan. Necrotic lesions are commonly found on ripen fruits of native mango and cultivar 'Irwin'. Eighteen bacterial strains were isolated from necrotic lesions of native mango fruits. Wound inoculation showed that strain MB-9 caused necrosis on immature and mature mango leaves of native mango and cultivar 'Irwin'. Immature mango leaf wound inoculated with serially diluted bacterial suspensions of MB-9 strain revealed that inoculation with 200 CFU was able to cause necrotic symptom. Bacterial identification based on microscopic, cultural, physiological and biochemical characteristics and serological reactions indicates that MB-9 strain was *Pantoea agglomerans* (syn. *Erwinia herbicola*). This study indicated that *P. agglomerans* MB-9 is a potential pathogen causing necrosis on mango leaf.

Key words: *Pantoea agglomerans*, *Erwinia herbicola*, mango leaf necrosis, physiological and biochemical tests, serological reaction, bacterial identification