

高苣細菌性葉腐病及品種抗性篩檢

許秀惠¹ 賴婉綺¹ 林俊義^{2,3}

¹ 行政院農委會農業試驗所 植物病理組

² 亞洲大學 健康學院

³ 聯絡作者，電子郵件：yihlin@asia.edu.tw

接受日期：中華民國 98 年 7 月 1 日

摘要

許秀惠、賴婉綺、林俊義. 2009. 高苣細菌性葉腐病及品種抗性測定. 植病會刊 :18: 101-110.

民國 96~97 年間於彰化縣芬園鄉種植之高苣葉片上，出現不規則形褐化壞疽斑，病斑沿著葉脈擴散，嚴重時葉片呈現腐爛且破碎現象，中肋常被感染並造成褐化且輕微腐爛的病徵。由柯霍氏法則、生理生化及 Biolog 鑑定分析結果顯示供試高苣病原菌株為 *Pseudomonas cichorii*，進一步應用對 *P. cichorii* 具有專一性之引子對進行 PCR 鑑定，結果顯示供試病原菌可增幅出 379 bp 之專一性 DNA 條帶，再以 16S rDNA 進行定序與比對分析鑑定，確認該病原菌為 *P. cichorii*，依其引起之病徵將此病害定名為高苣細菌性葉腐病 (bacterial midrib rot of lettuce)。測定市售 21 種高苣品種對高苣細菌性葉腐病菌 *P. cichorii* 之抗性，結果顯示供試 2 種結球高苣品種 (捲心、包心) 以及 7 種葉高苣品種 (明豐 3 號、橡樹葉、大陸 A、大陸妹、HV-076 粉 A、綠葉、翠花等) 之高苣植株於接種後均罹病死亡，其餘供試 12 種高苣品種，包括 1 種結球高苣、1 種半結球高苣、2 種嫩莖高苣及 8 種葉高苣品種雖感病卻仍可持續生長，顯示其品種抗病性較佳。

關鍵詞：高苣、細菌性葉腐病、品種抗感性

緒言

高苣 (*Lactuca sativa* L.)，英名為 lettuce，別名鵝仔菜、千金菜及美生菜，屬菊科 (Asteraceae) 高苣屬 (*Lactuca*) 1~2 年生之草本植物，台灣種植的高苣品種繁多，依其外觀可分為 4 大類：(1) 結球高苣 (var. *capitata*)，又可分為包被型 butterhead lettuce 及抱合型 crisphead lettuce，其栽種期為 10~2 月；(2) 半結球高苣又稱蘿蔓 (var. *longifolia*)，cos lettuce, romaine lettuce，其栽種期為 8 或 9~3 月；(3) 嫩莖高苣 (var. *augustana*)，asparagus lettuce, stem lettuce，其食用葉部栽種期為週年，其食用莖部栽種期為 8 或 9~2 月；(4) 葉高苣 (var. *crispa*)，cutting lettuce, leaf lettuce⁽²¹⁾ 等，其栽種期週年皆可，主要為 4~8 月。依據農糧署農情報告資源網的統計資料顯示在民國 90 年之前高苣栽培面積，年平均在 2,000 ha 上下，91~96 年間種植面積逐漸增加，而 96 年全年高苣種植面積約 3,034 ha，主要種植地區為雲林縣，佔總面積 73%，其餘為台北縣、桃園縣、

台南市、彰化縣、高雄縣、嘉義縣、屏東縣以及台北市等⁽¹⁾。高苣因屬於國際大宗使用之蔬菜，特性為一年四季皆可生產、儲藏性佳、生長速度快、栽培省工、病蟲害及農藥殘留問題少，具有外銷潛力⁽²¹⁾，成為台灣近年來推廣栽植蔬菜之一，因此於 91 年後台灣的高苣栽培面積有逐年增加之趨勢。

高苣已知病害中真菌性病害主要有萎凋病 (fusarium wilt)⁽²⁴⁾、露菌病 (downy mildew)⁽³⁵⁾、菌核病 (sclerotinia rot)⁽³⁶⁾ 等，病毒病害如高苣嵌紋病毒 (lettuce mosaic virus)⁽¹³⁾ 以及線蟲問題⁽³⁰⁾ 等，細菌性病害則有 *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* 引起的葉斑病 (bacterial leaf spot)⁽⁶⁾，*Pectobacterium* (*Erwinia*) *carotovora* subsp. *carotovora* 引起的軟腐病 (bacterial soft rot)⁽⁷⁾，*Rhizomonas* spp. 引起的 corky root⁽²⁾，*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 引起的葉緣焦枯病 (marginal leaf blight)⁽⁵⁾，以及由 *P. cichorii* 引起的斑點病 (varnish spot)⁽¹⁴⁾ 或稱為莖腐病 (bacterial stem

rot)⁽¹⁰⁾，或稱為 midrib rot⁽⁹⁾，或稱為 bacterial rot^(3, 6, 15)等。在台灣已發生且被研究之病害包括真菌的萎凋病⁽²⁷⁾、褐斑病⁽²⁰⁾及病毒病如捲葉嵌紋病⁽⁸⁾，雖然農家要覽提及高苣細菌性軟腐病⁽¹⁸⁾，但實際上台灣尚未有任何關於高苣細菌性病害之研究，而筆者於民國 96~97 年間的夏季在彰化縣芬園鄉種植之高苣上發現葉片有不規則褐化壞疽以及葉片中肋褐化且腐爛等現象。因此本研究將探討造成此病害之病因，分析病原菌之特性及品種抗性篩選，供日後防治參考。

材料與方法

菌株來源

採集彰化縣芬園鄉栽培之高苣葉片上具有不規則形壞疽病斑之樣品，經 75% 酒精表面消毒後，以 0.1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗 30 sec 後，再經無菌水漂洗 3 次後切取罹病與健康交界處之組織，置於無菌蒸餾水中，經振盪後以移殖環沾取細菌懸浮液，劃線於營養培養基 (nutrient agar, NA, Difco™) 平板上，置 30°C 下培養一天後，挑取單一菌落，再劃線於 NA 平板，重覆 3 次後移至 NA 斜面備用。或直接將漂洗後之組織塊置於 NA 平板上置 30°C 培養，待長出菌落後，挑選單一菌落，移至新的 NA 平板，重覆 3 次後移至 NA 斜面。

病原性測定

將分離所得之細菌菌株分別於 NA 斜面上，於 30°C 下培養一天後，懸浮於無菌蒸餾水中，以分光光譜儀 (spectrophotometer) 調整其吸光值 (A_{600}) 為 0.3，相當於 10^8 cfu/ml 以作為接種源，以注射接種方法分別注射於萬國土菸草 (*Nicotiana tabacum* cv. Vam-Hicks.) 葉片內，置室溫下觀察有無過敏性反應，將引起壞疽斑之菌株以 Pc 編號保存備用。

病原菌形態及生理生化特性測定

將 30°C 下於 NA 斜面上培養 1 天之供試菌株，加入少許無菌水靜置約 5 sec 後，輕輕吸起滴於載玻片上，加入等量的 2% 錳酸染色液 (PTA, pH 7.5, 含 0.1% Bovine serum) 2 min 後，以覆有 Formvar 支持膜的銅網沾取，再以濾紙吸乾多餘水分，置於 Hitach-7000 的穿透式電子顯微鏡觀察細菌形態及鞭毛。依 Schaad⁽³⁰⁾、Braun-Kiewnick 等⁽⁴⁾及 George 等⁽¹²⁾所述方法進行細菌種類鑑定。供試菌株選用 Pc1、Pc2、Pc3、Pc9 及 Pc12 等 5 支菌株，在 NA 斜面上於 30°C 培養一天，進行 KOH 測試、葡萄糖利用方式 (氧化/發酵試

驗, O/F test)、過氧化氫放氧酶 (catalase) 測試、YDC (yeast extract-dextrose-CaCO₃) 培養基上之菌落顏色、螢光色素 (fluorescent pigment, KB 培養基) 測定、氧化酶 (oxidase) 測定、精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase) 測定、明膠 (gelatin) 液化能力、果聚糖 (levan) 的生成、果膠分解能力 (pectolytic) 及醣類利用等測定。

Biolog Identification System 細菌鑑定

將 Pc1、Pc2、Pc3、Pc9 及 Pc12 等 5 支菌株，分別培養於 BUGM (Biolog Universal Growth Medium, medium 36 g, Bacto agar 15 g) 培養基中約 16~24 hr，之後懸浮於 IF buffer (0.4% NaCl, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gellan gum) 中，調整濃度為 63% T，分別加入 Biolog GN2 反應盤 (Biolog Inc. Hayward, CA) 中，每孔加入 150 μ l 細菌懸浮液，置於 30°C 下培養 16~24 hr，之後以光譜儀測讀，最後將資料輸入電腦與 Biolog GN2 資料庫 (Biolog 6.1 版) 中比對，以鑑定其種屬 (依廠商指示使用)。

專一性引子對聚合酶連鎖反應分析

選取 Pc1~14 等 14 支菌株作為供試菌株，並以已知之 *Pseudomonas cichorii* (芹菜葉斑病菌, BCRC 12621, 購自食工所)、*P. cichorii* Sf 010 (向日葵細菌性葉斑病菌)、*P. syringae* pv. *lachrymans* (胡瓜角斑病菌)、*P. syringae* pv. *phaseolicola* (菜豆葉燒病菌)、*P. syringae* pv. *pisi* (豌豆葉枯病菌)、*P. syringae* pv. *syringae* (紫丁香花斑點病菌)、*P. syringae* pv. *tabaci* (菸草斑點病菌) 及 *P. syringae* pv. *tomato* (番茄葉斑病菌) (對照菌株所有 *P. syringe* 相關之 pathovars 的 DNA 均來自中興大學植病系細菌研究室)，將 *P. syringe* 相關 pathovars 外之各供試菌株於 NA 培養基分別培養 24 hr 後，挑選單一菌落，個別置入微量試管中，微量試管中皆加入 400 μ l 之無菌水，取完試樣後將微量試管放置於 100°C 之水浴槽中維持 10 min，取出後以 6,000 rpm 之轉速離心 2 min，取上清液 2 μ l 作為 DNA 模⁽²⁶⁾。並以 Sfl1 / SflR2 為引子對 (此引子對是利用 RAPD 之方式選殖設計而得，對 *P. cichorii* 菌株具專一性)⁽¹⁶⁾ 進行 PCR (polymerase chain reaction) 分析。增幅後之產物則以 2% agarose (1×TAE buffer) 之電泳分析 (100 V)，以 Gen-100 DNA ladder (GeneMark Technology, ROC) 為大小標幟 (size marker)，最後以溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5 μ g/ml) 染色觀察，並照相記錄。

16S rDNA 定序及分析

選取 Pc1、Pc9 及 Pc12 等 3 支菌株在 NA 培養基

上之單一菌落，以 DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 抽取 genomic DNA 後，用細菌 16S rDNA universal primers f8-27/r1510⁽²²⁾ 進行 PCR 增幅，引子濃度約 10 μ M，分別加入 PCR 各反應物：5 mM dNTPs，25 mM Mg⁺，2.5 units/ μ l *RealTaq* DNA polymerase (Real Biotech Corporation, ROC)，以及 5 μ l 10 \times PCR 反應緩衝液，總反應體積為 50 μ l。PCR 增幅條件先以 94 $^{\circ}$ C 反應 5 min，之後進行 94 $^{\circ}$ C 30 sec，55 $^{\circ}$ C 30 sec，72 $^{\circ}$ C 2 min 20 sec，共 40 個循環，最後再進行 72 $^{\circ}$ C 5 min 1 個循環。增幅後之產物則以 1.0~1.5% agarose 進行電泳分析，將所得之片段進行定序 (sequencing)，再將序列以 NCBI (National Center for Biotechnology Information，美國國家生物科技資料中心) 和 SDSC-Biology Workbench (加州大學之聖地牙哥分校高速電腦中心) 之 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

品種抗性篩選

選取 Pc1、Pc9 及 Pc12 等 3 支菌為供試菌株，供試之 21 種市售商業高苣品種包含四大類：(1) 結球高苣 (包括捲心、包心及奶油妹)；(2) 半結球高苣 (新勇)；(3) 嫩莖高苣 (莖高苣及大心)；(4) 葉高苣 (深橡樹葉、淺橡樹葉、紅捲、紅翠、葉高苣 #183、綠葉、橡樹葉、HV-075 青 A、尖葉、HV-076 粉 A、翠花、大陸妹、尖 A、大陸 A 及明豐 3 號)。將病原菌分別製備成 10⁸ cfu/ml 之懸浮液作為接種源，選用約播種一個月之高苣 (約 4~6 片葉片大小) 為供試植株，每一供試菌株接種 3 棵植株，將供試 3 支菌株之菌液分別均勻噴灑於供試植株上，因此每一個品種共接種 9 棵，之後以塑膠袋套袋保濕，放置 30 $^{\circ}$ C 定溫箱中，兩天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵出現情形。

結 果

病徵

彰化縣芬園鄉地區栽培之高苣葉片上之病徵為不規則形褐化壞疽斑，病斑沿著葉脈擴散 (圖一，A)，嚴重時葉片呈現腐爛且破碎現象 (圖一，B)，中肋常被感染並造成褐化且輕微腐爛的病徵，紅捲高苣上亦具有和葉高苣同樣之病徵 (圖一，C)。將分離所得的所有細菌菌株分別以 10⁸ cfu/ml 細菌懸浮液注射接種至萬國士煙草葉片內，室溫下 24 hr 內即可形成壞疽病斑。選取 Pc1、Pc9 及 Pc12 進行接種，供試高苣植株於接種後 16~32 hr 於葉片即出現不規則形及點狀水浸狀斑，之

後病斑持續擴展，且色澤加深轉為不規則形褐化壞疽斑 (圖一，D)，中肋被感染時形成褐化條狀壞疽斑，並造成組織腐爛，壞疽沿著葉脈往側邊組織發展 (圖一，E)，一星期後，若環境溼度低，病斑呈深綠或深褐色乾枯 (圖一，F)，二星期後，受感染之葉片中肋腐爛軟化下垂，不同品種間之病徵略有不同，甚至部分葉片有枯萎掉落的情形，若環境溼度高時，葉片呈現腐爛現象，嚴重者造成供試高苣植株死亡。

形態及生理生化特性

供試高苣病原菌為革蘭氏陰性，於 TEM 觀察其為單極生一至多根鞭毛之桿狀細菌，以氧化方式利用葡萄糖，具催化酶，YDC 培養基 30 $^{\circ}$ C 培養時不會產生黏液，亦無法產生色素，KB 上可產生螢光色素，具氧化酶，不具精氨酸二水解酶，不具液化明膠能力，不具果聚糖酶，無法分解果膠及不能利用 L-Rhamnose、Sorbitol、Sucrose 和 D-Trehalose，但可利用 Mannitol。

Biolog Identification System 細菌鑑定

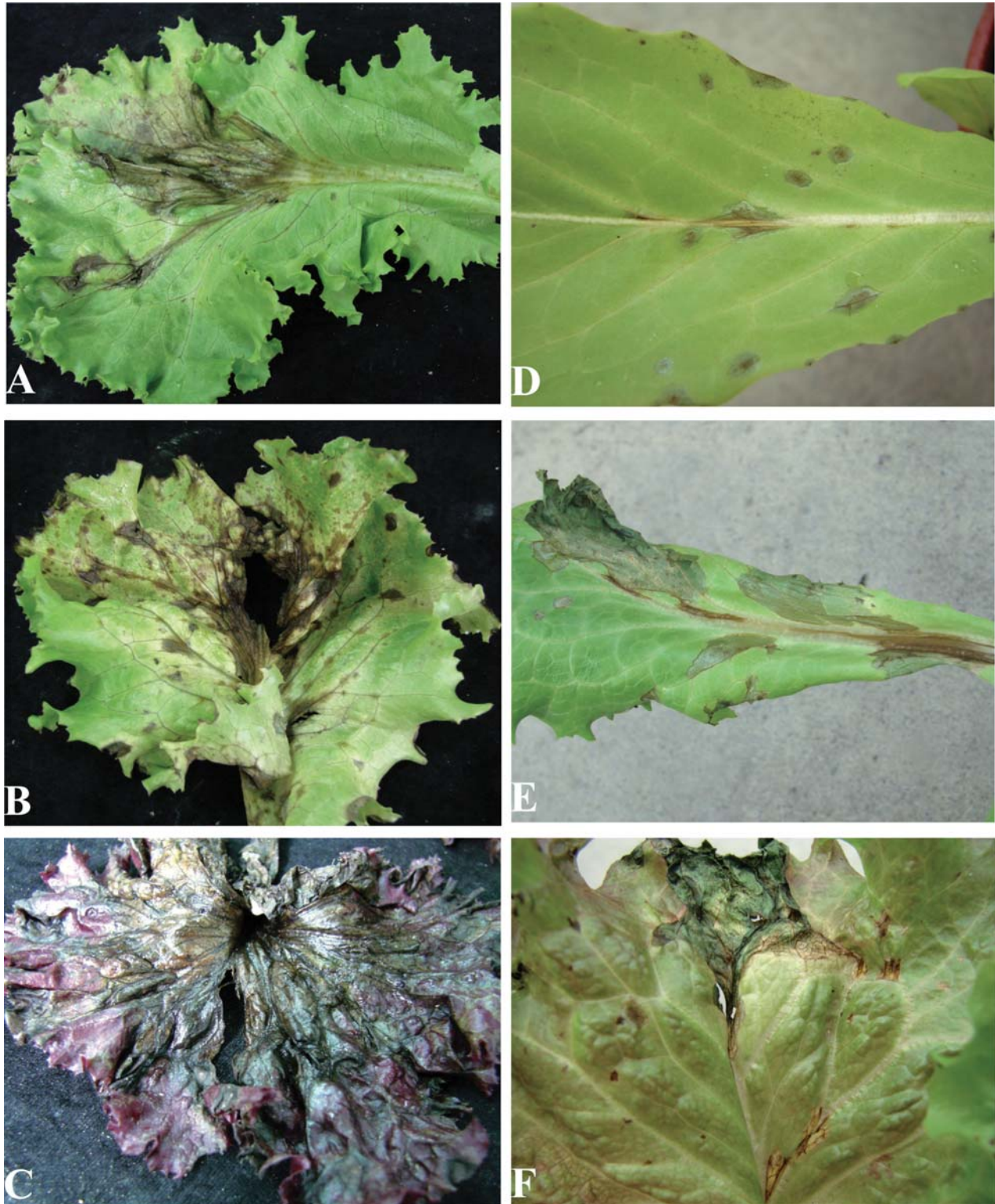
以 Biolog 系統鑑定結果供試高苣菌株 Pc1 與 *P. syringae* 之相似值為 0.53，Pc2、Pc3、Pc9 及 Pc12 為 *P. cichorii* (*syringae*)，相似值依序分別為 0.88、0.75、0.85 及 0.94。

專一性引子對 Sfl1/Sfr2 聚合酶鎖反應分析

以 *P. cichorii* 之專一性引子對 Sfl1 / Sfr2 進行 PCR 分析，結果顯示供試之 14 株高苣病原菌株、*P. cichorii* (芹菜葉斑病菌，BCRC 12621) 及 Sf 010 (向日葵細菌性葉斑病菌) 均可產生大小約為 379 bp 之專一性 DNA 條帶，而供試 *P. syringae* pv. *lachrymans* (胡瓜角斑病菌)、*P. syringae* pv. *phaseolicola* (菜豆葉燒病菌)、*P. syringae* pv. *pisi* (豌豆葉枯病菌)、*P. syringae* pv. *syringae* (紫丁香花斑點病菌)、*P. syringae* pv. *tabaci* (菸草斑點病菌) 及 *P. syringae* pv. *tomato* (番茄葉斑病菌) 則無任何條帶產生。

16S rDNA定序及鑑定

以對細菌 16S rDNA 具專一性之引子對 f8-27/r1510 進行 PCR 增幅，得到大小為 1,502 bp 之 DNA 片段，將此片段進行 DNA 定序分析後，再將所得序列以 BLAST 程式搜尋 NCBI 和 SDSC-Biology Workbench database 之相似序列，結果顯示 Pc1、Pc9 及 Pc12 供試菌株與 *P. cichorii* 16S rDNA partial sequences (GenBank accession number EF101976 for *P. cichorii* strain IP1-05



圖一、高苣細菌性葉腐病之病徵。

A, B, C 為田間罹病之高苣病徵。A, B: 葉高苣; C: 紅捲高苣 (葉高苣的品種)。

D, E, F 為接種之高苣病徵: D: 接種第 2 天之大心高苣 (嫩莖高苣的品種), 葉片不規則褐斑; E: 接種一星期之綠葉高苣 (葉高苣的品種), 葉片及中肋腐爛; F: 接種一星期之紅捲高苣 (葉高苣的品種), 葉片乾腐。

Fig. 1. Symptoms of bacterial midrib rot of lettuce. A, B, C: Symptoms of leaf lettuce (var. *crispa*) in fields. D, E, F: Symptoms of lettuce inoculated with *Pseudomonas cichorii*. D: 1 day after inoculation of stem lettuce (var. *augustana*), irregular brown spot on leaf; E: 1 week after inoculation of leaf lettuce (var. *crispa*), rot on leaf and midrib; F: 1 week after inoculation of leaf lettuce (var. *crispa*), dry rot on leaf.

and AJ308302 for *P. cichorii* strain ICMP 5707T), 其 16S rDNA 部分序列間的相同性 (identity) 均為 99%。而 Pc1、Pc9 及 Pc12 供試菌株與 *P. syringae* 16S rDNA partial sequences (GenBank accession number DQ318868 for *P. syringae* strain 17) 間的相同性均為 98%，Pc1、Pc9 及 Pc12 供試菌株與 EU196772 for *P. syringae* strain PGO25 的 16S rDNA 部分序列間的相同性均為 93%。

品種抗感性

選取 Pc1、Pc9 及 Pc12 等菌株以無傷口噴霧接種法接種至播種一個月之市售商業品種的莴苣供試植株上(約4~6片葉片大小)，於接種後 16 hr 所有供試高苣品種葉片皆形成不規則及點狀水浸斑，接種後第 2 天形成不規則形之壞疽斑 (圖一，D)，以及中肋具條狀褐化腐爛之壞疽沿著葉脈往側邊組織蔓延 (圖一，E)，不規則形之壞疽位置為隨機出現，葉面上可能在中肋或中肋左右兩側形成同時具有斑點和中肋褐化腐爛之情形，之後病斑漸擴大且色澤加深為深褐色。在所有供試高苣品種中，以結球類型 (奶油妹)、半結球類型 (新勇) 以及嫩莖類型 (莖高苣、大心) 的高苣供試 4 個品種較具抗性，雖感病卻仍然可以持續生長，植株不會死

亡，而屬於葉高苣的類型的 15 個品種又可分為兩類，一為紅色葉片之葉高苣 4 種 (深橡樹葉、淺橡樹葉、紅捲、紅翠)，另一為綠色葉片之葉高苣共有 11 種 (葉高苣 #183、綠葉、橡樹葉、HV-075 青 A、尖葉、HV-076 粉 A、翠花、大陸妹、尖 A、大陸 A 及明豐 3 號)，其中紅色葉片之 4 種葉高苣以及綠色葉片中 4 種 (葉高苣 #183、HV-075 青 A、尖葉及尖 A) 較具抗性，與結球 (奶油妹)、半結球及嫩莖高苣供試之品種試驗結果相同，雖感病但植株仍持續生長，不會造成植株死亡，而另外之 7 種綠色葉高苣 (綠葉、橡樹葉、HV-076 粉 A、翠花、大陸妹、大陸 A 及明豐 3 號) 植株則於接種後一星期至一個月內陸續死亡；結球高苣類型的供試 2 個品種捲心及包心感病，顯示上述 2 種結球高苣及 7 種綠色葉高苣總共 9 種品種之高苣感病性較強外，其餘 12 種品種新生葉片不受影響持續生長，顯示其抗性較佳 (表二)。

討 論

經柯霍氏法則確認彰化縣芬園地區栽培之莴苣發生細菌性病害，其病徵初期為葉片上出現不規則形水

表一、莴苣細菌性葉腐病菌之生理生化測試

Table 1. Physiological and biochemical characters of strains isolated from lettuce

Character	Strains from lettuce ¹	<i>Pseudomonas cichorii</i> ²	<i>P. syringae</i> ²
KOH test	G (-) ³	G (-) ³	G (-) ³
O/F test	O ³	O ³	O ³
Catalase	+	+	+
Colonies yellow on YDC	-	-	-
Colonies mucoid on YDC at 30°C	-	-	-
Diffusible non-fluorescent pigments on KB	-	-	-
Fluorescent pigment on KB	+	+	+
Flagellar number	>1	>1	>1
Oxidase	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	+
Levan	-	-	+
Pectolytic activity	-	-	-
Tobacco HR	+	+	+
Utilization of :			
Cellobiose	-	-	-
Mannitol	+	+	V
L-Rhamnose	-	-	-
Sorbitol	-	-	+
Sucrose	-	-	+
D-Trehalose	-	-	-

¹ The tested strains isolated from lettuce were Pc 1, 2, 3, 9 and 12.

² Data are combined by referring to Braun-Kiewnick, *et al.*, 2001⁽⁴⁾, George, *et al.*, 2005⁽¹²⁾, and Schaad, 2001⁽³¹⁾.

³ G (-), Gram negative; O, oxidative; F, formation; +, positive reaction; -, negative reaction; V, 21~79% positive.

表二、市售高苣商業品種對 *Pseudomonas cichorii* 病原菌之抗感性Table 3. Resistance of commercial varieties of lettuce to *Pseudomonas cichorii*

高苣類型	品種(系)名	抗感病	植株死亡	種子來源
結球高苣	奶油妹	+	-, 0/9	德城行
	捲心	+	+, 6/9	德城行
	包心	+	+, 5/9	農友種苗公司
半結球高苣	新勇	+	-, 0/9	德城行
嫩莖高苣	莖高苣	+	-, 0/9	農友種苗公司
	大心	+	-, 0/9	順益種子行
葉高苣(紅色)	深橡樹葉	+	-, 0/9	德城行
	淺橡樹葉	+	-, 0/9	德城行
	紅捲葉	+	-, 0/9	德城行
	紅翠	+	-, 0/9	農友種苗公司
葉高苣(綠色)	葉高苣 #183	+	-, 0/9	德城行
	綠葉	+	+, 1/9	德城行
	橡樹葉	+	+, 2/9	德城行
	HV-075 青A	+	-, 0/9	農友種苗公司
	尖葉	+	-, 0/9	農友種苗公司
	HV-076 粉A	+	+, 1/9	農友種苗公司
	翠花	+	+, 2/9	農友種苗公司
	大陸妹	+	+, 1/9	農友種苗公司
	尖A	+	-, 0/9	順益種子行
	大陸A	+	+, 2/9	順益種子行
明豐3號	+	+, 1/9	順益種子行	

浸狀斑，之後病斑漸加深成深褐色且沿著葉脈擴散，葉片中肋若感染時會造成褐色且輕微腐爛，當環境溼度較高時容易導致葉片組織腐爛，嚴重時甚至導致植株死亡(圖一)。觀察田間不同品種亦發現同樣的病徵。由上述病徵之樣品分離所得的菌株確認為病原菌後即進行生理生化性質測定，結果顯示該病原細菌為革蘭氏陰性，桿狀，多數為單極生單鞭毛，少數為單極生多根鞭毛之細菌，George等⁽¹²⁾研究提及 *Pseudomonas* 屬細菌具一至數根鞭毛，且具氧化酶，不具菌果聚醣及液化明膠能力等特性，而我們從高苣上分離所得之菌株也具同樣特性(表一)，顯示供試病原菌屬於 *Pseudomonas* 屬。另外，此供試高苣病原菌在 KB 培養基上可產生螢光色素，目前已知具螢光之 *Pseudomonas* 屬細菌包括：*P. agarici*，*P. cichorii*，*P. fuscovaginae*，*P. marginalis*，*P. savastanoi*，*P. syringe*，*P. tolaasii*，*P. viridiflava* 等⁽⁴⁾，但經由精氨酸二水解酶、果膠分解能力以及菸草過敏性反應等各項試驗結果推測分離自高苣的病原菌與 *P. agarici* 或 *P. cichorii* 或 *P. syringe* 等之生理生化特性較為相近⁽⁴⁾。

以 Biolog 測試高苣供試菌株與 *P. syringe* 及 *P. cichorii* 相似值為 0.74~0.94，顯示供試菌株可能是 *P. cichorii* 或 *P. syringe*，由於兩種細菌之生理生化特性不

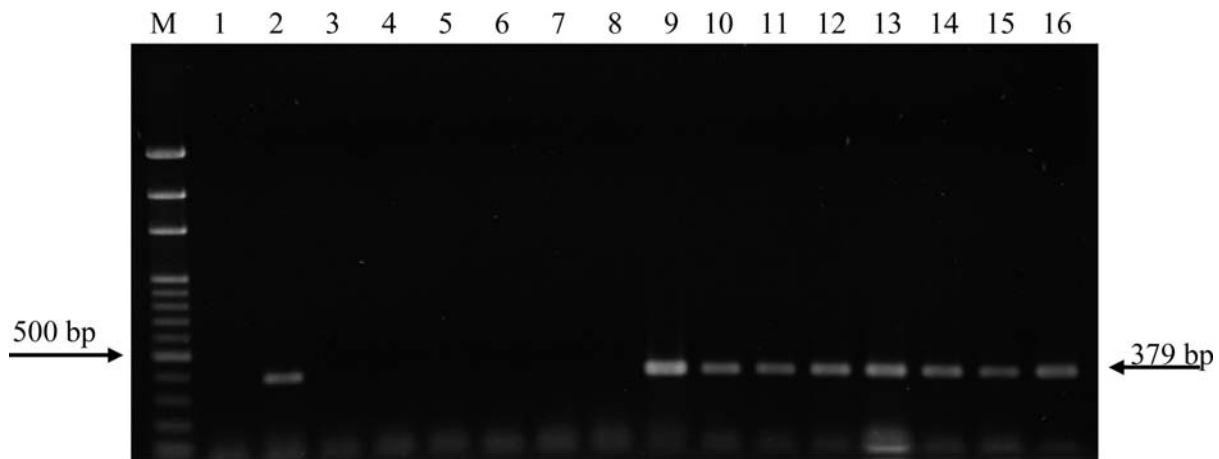
容易區分，進一步以 16S rDNA 鑑定高苣病原菌菌株，結果顯示與 *P. cichorii* 之 16S rDNA 部分序列間之相同性為 99%，但與 *P. syringe* 之 16S rDNA 部分序列間比對發現其相同性為 93~98%。*Pseudomonas* 屬依照 16S rDNA 之序列分類，*P. cichorii* 和 *P. syringe* 都屬於 *P. syringe* 之族群 (group)，其 Bootstrap 值為 84~87%⁽¹²⁾，而由 Biolog 和 16S rDNA 之結果發現 *P. cichorii* 和 *P. syringe* 之相似度頗高，因此若單以 Biolog 或者是 16S rDNA 方法來鑑定高苣病原菌，均無法有效且明確分別 *P. cichorii* 和 *P. syringe*，因此本研究再利用對 *P. cichorii* 具專一性之引子對 Sfl1 / Sfr2⁽¹⁶⁾ 鑑定供試高苣病原菌，Hseu 等⁽¹⁶⁾ 研究所設計對 *P. cichorii* 具專一性的引子對 Sfl1 / Sfr2，是經過 NCBI 基因庫比對後，並選取與其他已註冊非標的細菌之 DNA 序列均低於 15% 之片段而得，同時將這些非標的菌株的 DNA 或菌液與標的菌株 *P. cichorii* 的 DNA 或菌液混合進行 PCR，確定該引子對僅對供試的 *P. cichorii* 菌株具高專一性，與非標的 *P. syringe* 菌株則不產生任何干擾訊號⁽¹⁶⁾，本研究利用此引子對進行 PCR，顯示所有供試高苣菌株均可在 379 bp 處產生專一性之 DNA 條帶(圖二)，同時也確認其他供試之 *P. syringe* 不同的病原型 (pathovars) 菌株如 pv. *lachrymans* (胡瓜角斑病菌)、pv.

phaseolicola (菜豆斑點病菌)、*pv. pisi* (豌豆斑點病菌)、*pv. syringae* (紫丁香花斑點病菌)、*pv. tabaci* (菸草斑點病菌) 及 *pv. tomato* (番茄葉斑病菌) 等 6 種 *P. syringae* 對照菌株皆無此專一性條帶產生，顯示供試菌株不是 *P. syringae* 內的病原菌。綜合上述菌株型態、生理生化測定、Biolog 系統鑑定、PCR 專一性引子對及 16S rDNA 序列比對的結果均顯示分離自高苣之病原菌為 *P. cichorii*。

P. cichorii 自從 Swingle 1925 年於菊苣⁽³³⁾ 上發現後，陸續發現許多新的寄主，主要危害蔬菜包括高苣^(6, 9, 10, 14)、甘藍⁽³⁴⁾、芹菜⁽³⁴⁾ 等，以及觀賞植物如菊花⁽¹⁹⁾、天竺葵⁽¹¹⁾ 及木蘭花⁽²⁵⁾ 等，糧食作物如小麥⁽²⁹⁾，近幾年更發現該病原菌可感染藥用植物薑黃⁽²³⁾ 等，所感染之範圍包括單子葉及雙子葉植物，造成之病徵包括葉枯、葉斑、bacterial rot、midrib rot、varnish spot 及 bacterial stem rot 等。在台灣目前已知被 *P. cichorii* 感染之植物有芹菜⁽³²⁾ 和向日葵⁽¹⁷⁾，其病徵為罹病之葉片上出現不規則或圓型病斑，但在台灣尚未有引起高苣病害之紀錄。國外文獻指出 *P. cichorii* 在高苣上造成之病徵有 bacterial rot^(3, 6, 15)：造成高苣葉片腐爛，莖腐病 (bacterial stem rot)⁽¹⁰⁾：為高苣葉柄出現深褐色條狀壞疽及腐爛之情形，midrib rot⁽⁹⁾：使葉面產生深褐色到墨綠色病斑，且沿著中肋延伸至側邊組織造成中肋腐爛，以及斑點病 (varnish spot)⁽¹⁴⁾：在葉面造成具光澤感及不

規則形黑褐色之壞疽病斑，而本研究供試高苣之病原菌 *P. cichorii* 主要的病徵初期為斑點及中肋褐化，在高濕環境下會形成整個葉片腐爛的病徵，因此將此病害定名為高苣細菌性葉腐病，在台灣由 *P. cichorii* 引起之高苣細菌性病害是首次紀錄。

Su 等之研究中指出 *P. cichorii* 適宜之生長溫度為 30-35°C，接種於芹菜且同樣在 72 hr 時置於濕環境中菌量可持續增殖，但是乾環境則不再增殖⁽³²⁾，所以在高濕環境下病斑才會擴展⁽¹⁹⁾，*P. cichorii* 引起的高苣細菌性葉腐病，其病勢進展也是受環境影響，當環境溼度較高，且農民栽培的是感病的品種時，植株被感染會死亡，因而造成農民的經濟損失。本研究因而探討台灣較常見的高苣品種對葉腐病菌之抗感性 (表二)，發現供試的 21 種市售高苣商業品種均可被 *P. cichorii* 所感染，其中以奶油妹 (結球高苣)、新勇 (半結球高苣)、莖高苣、大心 (嫩莖高苣)、深橡樹葉、淺橡樹葉、紅捲、紅翠 (紅色葉片葉高苣) 以及葉高苣 #183、HV-075 青 A、尖葉及尖 A (綠色葉片葉高苣) 等 12 種市售商業品種較具抗性，植株雖然感病卻不會死亡，顯示半結球、嫩莖及紅色葉片之葉高苣對於 *P. cichorii* 較具有抗性，而供試之綠葉、橡樹葉、HV-076 粉 A、翠花、大陸妹、大陸 A 及明豐 3 號 (綠色葉高苣) 和捲心、包心 (結球高苣) 等 9 種供試高苣植株不但感病且於接種一星期後陸續死亡。雖然有關 *P. cichorii* 危害高苣的研究



圖二、應用 PCR 技術以引子對 SfL1 / SfR2 鑑定高苣細菌性葉腐病菌。M，100 bp DNA marker；1，negative control；2，*Pseudomonas cichorii* (芹菜葉斑病菌)；3，*P. syringae* *pv. lachrymans* (胡瓜角斑病菌)；4，*P. syringae* *pv. phaseolicola* (菜豆斑點病菌)；5，*P. syringae* *pv. pisi* (豌豆斑點病菌)；6，*P. syringae* *pv. syringae* (紫丁香花斑點病菌)；7，*P. syringae* *pv. tabaci* (菸草斑點病菌)；8，*P. syringae* *pv. tomato* (番茄葉斑病菌)；9，Sf 010 (向日葵細菌性葉斑病菌，*P. cichorii*)；10~16，Pc 1~7 (高苣細菌性葉腐病菌，*P. cichorii*)。

Fig. 2. Identification of *Pseudomonas cichorii* from lettuce by PCR with primer pair SfL1 / SfR2. Lane M, 100 bp DNA marker; lane 1, negative control; lane 2, *P. cichorii*; lane 3, *P. syringae* *pv. lachrymans*; lane 4, *P. syringae* *pv. phaseolicola*; lane 5, *P. syringae* *pv. pisi*; lane 6, *P. syringae* *pv. syringae*; lane 7, *P. syringae* *pv. tabaci*; lane 8, *P. syringae* *pv. tomato*; lane 9, Sf 010 (bacterial leaf spot of sunflower, *P. cichorii*); lanes 10~16, Pc 1~7 (bacterial midrib rot of lettuce, *P. cichorii*).

中並沒有探討萵苣品種的抗感性。但在 Burkholder 及 Grogan 等報告中分別指出 *P. cichorii* 造成結球型萵苣，不論是 bacterial rot⁽⁶⁾ 或 varnish spot⁽¹⁴⁾，都是具破壞性的病害，Cottyn 等人與 Dhanvantari 的研究也指出 *P. cichorii* 引起 butterhead lettuce (結球萵苣) 的莖腐⁽¹⁰⁾ 或 midrib rot⁽⁹⁾，均顯示結球型萵苣是感病的萵苣種類，而本研究之抗感性試驗結果也顯示供試的結球萵苣以及大部分的綠色葉萵苣均極感病，植株於接種後死亡。

自 Burkholder 於 1954 年美國紐約⁽⁶⁾ 在萵苣上發現 *P. cichorii* 後，陸續於 1977 年美國加州⁽¹⁴⁾、1990 年加拿大安大略⁽¹⁰⁾、1996 年日本岩手縣⁽¹⁵⁾、2003 年在土耳其⁽³⁾ 以及 2009 年的比利時⁽⁹⁾ 以及台灣也出現同樣之病害，證實受害之地區在持續擴增中，包括美洲、歐洲、亞洲等地的萵苣栽培區，均可見 *P. cichorii* 危害萵苣，可知此病害是萵苣上很普遍的問題。在歐、美、亞等地區，萵苣是屬於重要之經濟蔬菜，從 90 年代中期開始發現 *P. cichorii* 可感染萵苣後，不論是造成斑點病 (varnish spot)⁽¹⁴⁾ 或莖腐病 (bacterial stem rot)⁽¹⁰⁾，或 midrib rot⁽⁹⁾，或 bacterial rot^(3, 6, 15) 等多種的病徵，但萵苣被 *P. cichorii* 感染嚴重時會造成植株腐爛死亡，一旦產量下降，將造成農民經濟上的損失。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Agriculture and Food Agency. 2002. Crop yields of the order query-Lettuce. Retrieved June 12, 2008, from Agricultural report resources network on the world wide web: http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp (in Chinese)
2. Alvarez, J., Datnoff, L. E., and Nagata, R. T. 1992. Crop rotation minimizes losses from corky root in Florida lettuce. *Hortscience* 27: 66-68.
3. Aysan, Y., Sahin, S., Ulke, G., and Sahin, F. 2003. Bacterial rot of lettuce caused by *Pseudomonas cichorii* in Turkey. *Plant Pathol.* 52: 782. (Abstract)
4. Braun-Kiewnick, A., and Sands, D. C. 2001. *C. Pseudomonas*. Pages 84-107 in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. ed. APS, St. Paul, USA. 373 pp.
5. Brown, N. A. 1918. Some bacterial diseases of lettuce. *J. Agric. Res.* 13: 367-388.
6. Burkholder, W. H. 1954. Three bacteria pathogenic on head lettuce in New York State. *Phytopathology* 44: 592-596.
7. Ceponis, M. J., Kaufman, J., and Butterfield, J. E. 1970. Relative importance of gray mold rot and bacterial soft rot of western lettuce on the New York market. *Plant Dis. Rep.* 54: 263-265.
8. Chen, Y. K., and Chen, M. J. 1994. Lettuce leafroll mosaic-a new lettuce disease caused by caulimovirus-like agent in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 3: 209-215.
9. Cottyn, B., Heylen, K., Heyrman, J., Vanhouteghem, K., Pauwelyn, E., Bleyert, P., Van Vaerenbergh, J., Höfte, M., De vos, P., and Maes, M. 2009. *Pseudomonas cichorii* as the casual agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butterhead lettuce in Flanders. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 211-225.
10. Dhanvantari, B. N. 1990. Occurrence of bacterial stem rot caused by *Pseudomonas cichorii* in greenhouse-grown lettuce in Ontario. *Plant Dis.* 74: 394. (Abstract)
11. Englhard, A. W., Mellinger, H. C., Ploetz, R. C., and Miller, J. W. 1983. A leaf spot of florists' geranium incited by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.* 67: 541-544.
12. George, M. G. Julia, A. B., and Timothy, L. 2005. Family I. Pseudomonadaceae Pages 323-377. in: Bergey's manual of systematic bacteriology. part c. George ed. Springer. N.Y, USA. 1388 pp.
13. Grogan, R. G. 1980. Control of lettuce mosaic with virus. *Plant Dis.* 64: 446-449.
14. Grogan, R. G., Misaghi, I. J., Kimble, K. A., Greathead, A. S., Ririe, D., and Bardin, R. 1977. Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. *Phytopathology* 67: 957-960.
15. Hikichi, Y., Saito, A., and Suzuki, K. 1996. Infection sites of *Pseudomonas cichorii* into head leaf of lettuce. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 125-129.
16. Hseu, S. H., Shentue, H., and Lin, C. Y. 2006. Development of species specific PCR primers for identification of *Pseudomonas cichorii*. *Plant Pathol. Bull.* 15: 275-285. (in Chinese with English abstract)
17. Hseu, S. H., Shih, S. C., Ding, P. F., and Lin C. Y. 2004. Characterization of sunflower bacterial leaf spot and its bacteriocide screening. *Plant Pathol. Bull.* 13: 329-334. (in Chinese with English abstract)
18. Huang, J. H. 2005. Vegetables disease of Asteraceae. (plant protection). Pages 175-176 in: Taiwan agriculture encyclopedia. vol. 3. Harvest Farm Magazine of non-profit organization, Ye ed. Taipei, 520 pp. (in Chinese)
19. Jones, J. B., Raju, B. C., and Engelhard, A. W. 1984. Effects of temperature and leaf wetness on development of bacterial spot of geraniums and chrysanthemums incited by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.* 68: 248-251.
20. Lin, H. J., and Huang, J. W. 2002. A semiselective medium for detecting *Acremonium lactucae*, the causal

- agent of lettuce brown spot. *Plant Prot. Bull.* 11: 147-156. (in Chinese with English abstract)
21. Lin, T. L. 2005. Lettuce. (vegetables). Pages 409-412. *in*: Taiwan agriculture encyclopedia. vol. 2. Harvest Farm Magazine of non-profit organization, Fang ed. Taipei, 926 pp. (in Chinese)
 22. Lipson, D. A., and Schmidt, S. K. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2867-2879.
 23. Maringoni, A. C., Theodoro, G. F., Ming, L. C., Cardoso, J. C., and Kurozawa, C. 2003. First report of *Pseudomonas cichorii* on turmeric (*Curcuma longa*) in Brazil. *Plant Pathol.* 52: 794. (Abstract)
 24. Matheron, M. E., and Koike, S. T. 2003. First report of fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Arizona. *Plant Dis.* 87: 1265. (Abstract)
 25. Mullen, J. M., and Cobb, G. S. 1984. Leaf spot of southern magnolia caused by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.* 68: 1013-1015.
 26. Opina, N., Tavner, F., Holloway, G., Wang, J. F., Li, T. H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A.C., Krishnapillai, V., Hong, W. F., Holloway, B. W., and J. N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5: 19-33.
 27. Peng, Y. H., and Huang, J. W. 1998. Pathogenicity tests of lettuce fusarium wilt fungus. *Plant Pathol. Bull.* 7: 121-127. (in Chinese with English abstract)
 28. Pernezny, K., Raid, R. N., Stall, R. E., Hodge, N. C., and Collins, J. 1995. An outbreak of bacterial spot of lettuce in Florida caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Dis.* 79: 359-360.
 29. Piening, L. J., and MacPherson, D. J. 1985. Stem melanosis, a disease of spring wheat caused by *Pseudomonas cichorii*. *Can. J. Plant Pathol.* 7: 168-172.
 30. Radewald, J. D., Mowbray, P. G., Paulus, A. O., Shibuya, F., and Rible, J. M. 1969. Preplant soil fumigation for California head lettuce. *Plant Dis. Rep.* 53: 385-389.
 31. Schaad, N. W. 2001. Initial identification of common genera. Pages 7-10 *in*: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. ed. APS, St. Paul, USA. 373 pp.
 32. Su, C. C., Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 1989. Bacterial leaf spot of celery. *Plant Prot. Bull.* 31: 346-357.
 33. Swingle, D. B. 1925. Center rot of "French endive" or wilt of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Phytopathology* 15: 730. (Abstract)
 34. Thayer, P. L., and Wehlburg, C. 1965. *Pseudomonas cichorii*, the cause of bacterial blight of celery in the Everglades. *Phytopathology* 55: 554-557.
 35. Wu, B. M., Subbarao, K. V., Van Bruggen, A. H. C., and Koike, S. T. 2001. Comparison of three fungicide spray advisories for lettuce downy mildew. *Plant Dis.* 85: 895-900.
 36. Younga, C. S., Clarksonb, J. P. Smitha, J. A., Watlingc, M., Phelps, K., and Whipps, J. M. 2004. Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathol.* 53: 387-397.

ABSTRACT

Hseu, S. H.¹, Lai, W. C.¹, and Lin, C. Y.^{2,3} 2009. Identification of the causal agent of lettuce bacterial midrib rot and resistance screening of lettuce cultivars. *Plant Pathol. Bull.* 18 : 101-110. (¹ Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, ² Health Science College, Asia University, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC, ³ Corresponding author, E-mail: yihlin@asia.edu.tw)

An unknown bacterial disease was first found in lettuce cultivation areas of Changhua during summer of 2007 and 2008. Symptoms mainly occurred in the midrib of leaves and started with greenish, brown or black spots and later coalesced and developed leaf rot symptoms. Under humid condition, symptoms development could be rapid, often in less than 24 hours, and always occurred on nearly mature plants before harvest. The causal agent was identified as *Pseudomonas cichorii* based on physiological and chemical tests, Biolog GN MicroPlate Identification System, 16S rDNA sequence analysis, and pathogenicity tests. The pathogen was further confirmed by PCR with Sfl1 / Sfr2 specific primers to *Pseudomonas cichorii*. This is the first report of the disease occurred on lettuce in Taiwan. In a disease resistance screening of the twenty one local lettuce cultivars, the result showed that all tested cultivars were sensitive to the disease but the romaine and stem lettuce showed moderate degree of resistance.

Key words : lettuce, bacterial midrib rot, *Pseudomonas cichorii*, variety resistance