

# 臺灣引起仙丹花細菌性葉斑病菌之鑑定與特性分析<sup>1</sup>

張世杰、郭建志、廖君達、趙佳鴻<sup>2</sup>

## 摘 要

2018年3月於彰化縣田尾鄉之宮粉仙丹葉片上，發現中央褐色壞疽且周圍具黃色暈環之葉斑型病徵，切取罹病葉片組織，置於光學顯微鏡下可觀察到細菌菌流，經分離純化獲得14株病原細菌。所得菌株於NA平板培養基上呈黃色黏稠狀菌落，為革蘭氏陰性、好氧性細菌，可於菸草葉片誘導產生過敏性反應，以 $10^5$  CFU·ml<sup>-1</sup>細菌懸浮液噴霧接種於宮粉仙丹，可呈現與田間相同之病徵。利用生理生化特性測試及gyrase B序列分析鑑定為*Xanthomonas axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae*。本病害在臺灣尚無推薦藥劑，以田間栽培常用藥劑進行測試，顯示以12.5%鏈黴素溶液及10%鏈四環黴素水溶性粉劑等抗生素類藥劑之抑制能力最佳。

**關鍵詞：**宮粉仙丹、仙丹花細菌性葉斑病

## 前 言

仙丹花為茜草科(Rubiaceae)仙丹花屬(*Ixora*)之多年生常綠灌木，原產於東南亞一帶，其種類繁多，常見的品種如仙丹花(*I. chinensis*)、紅仙丹花(*I. coccinea*)、大王仙丹(*I. duffii*)及白仙丹花(*I. parviflora*)等，為常用於美化庭院的景觀植物<sup>(3)</sup>；宮粉仙丹(*Ixora x westii* H. J. Veitch)為琥珀仙丹花(*I. amboinica*)與香仙丹花(*I. odorata*)之雜交種，其花色柔美，適合庭園美化、低籬或盆栽種植。臺灣目前已被報導可危害仙丹花之病害包括灰黴病(病原：*Botrytis cinerea*)、炭疽病(病原：*Glomerella cingulate*)、斑點病(病原：*Pseudocercospora ixorae*)、煤煙病(病原：*Scorias cylindrica*)、番茄嵌紋病毒(病原：*Tomato mosaic virus*)及簇葉病等<sup>(2)</sup>。

2018年3月彰化縣田尾鄉花卉苗圃種植之宮粉仙丹發生生長異常現象，植株葉片出現中央褐色壞疽且周圍具黃色暈環之病斑，伴隨幼葉扭曲變形，病原菌藉灑水系統傳播，園區發病率達80%，嚴重影響苗木供應；罹病組織經顯微鏡檢視可見細菌菌流流出，疑似為細菌性病害，查詢相關文獻紀錄發現可能為仙丹花細菌性葉斑病(bacterial leaf spot of *Ixora*)<sup>(8)</sup>。該病害主要危害葉片及枝條，罹病葉片初期出現圓形、淺綠色水浸狀斑點，隨後逐漸擴大，呈現中央褐色壞疽且周圍具黃色暈環之病斑，嚴重時病斑聚結形成大片壞死區域並導致葉片變形，而罹病枝條表面則呈褐色壞疽狀<sup>(8)</sup>；

<sup>1</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場研究彙報第1012號。

<sup>2</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場研究助理、副研究員、副研究員、副研究員。

其病原菌為 *Xanthomonas axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae*<sup>(12)</sup>，係一種革蘭氏陰性、好氧性桿狀細菌，能分泌黃色色素 xanthomonadin<sup>(12)</sup>，主要感染茜草科之梔子花(*Gardenia* spp.)<sup>(15)</sup>及仙丹花(*Ixora* spp.)<sup>(8)</sup>。病原細菌藉雨水傳播，經傷口或氣孔等自然開口入侵感染，溫暖潮濕的環境適宜本病害之發展<sup>(9)</sup>。

根據臺灣植物病害名彙紀錄，臺灣於 2018 年前尚無植物病原細菌性病害發生於宮粉仙丹之報導<sup>(2)</sup>。為了解分離細菌菌株之病原性、分類地位及防治方式，將分離細菌菌株進行病原性測試、生理生化特性分析、遺傳特性鑑定及藥劑感受性測試等，建立相關資料供未來仙丹花栽培之用。

## 材料與方法

### 一、病原細菌之分離

將採自彰化縣田尾鄉之宮粉仙丹罹病葉片及枝條以 75% 酒精表面消毒後，切取病斑及其附近健康組織置於載玻片上，滴加無菌水後於顯微鏡下鏡檢，觀察是否有菌流產生，如觀察到菌流則以移植環沾取後於 nutrient agar 平板培養基(NA; 0.5%(w/v)bactopeptone, 0.3%(w/v)beef extract, 1.5%(w/v)agar, and pH 7.0)<sup>(13)</sup>上進行劃線平板分離，於 30°C、無光照環境下培養 3 天後，挑取黃色黏稠狀菌落進行純化培養，所得菌株供後續實驗用，菌株編號與採集資料如表一所列。

### 二、分離細菌菌株之生理生化特性測試

分離所得之 14 株細菌菌株分別以革蘭氏染色及生理生化測試進行鑑定，生理生化測試包含過氧化氫酵素、氧化酵素、果膠分解酵素、脂質分解酵素、蛋白質水解酵素、澱粉水解酵素、氧化/發酵葡萄糖測試(oxidation/fermentation glucose test, O/F test)、聚羥基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)染色、菌果聚醣(levan)形成能力、生長溫度及於菸草(*Nicotiana tobacum* cv. TT5)葉片之誘導過敏性反應能力<sup>(13)</sup>等。

### 三、分離細菌菌株之病原性測試

將分離所得之 14 株細菌菌株培養於 NA 平板培養基上，於 30°C、無光照環境下培養 3 天後利用無菌水分別調配成  $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup> 之細菌懸浮液，以噴霧接種法將其接種於無傷口 4 週大且完全展開之宮粉仙丹葉片，接種後的植株分別置於相對濕度 65%-90%，晝溫 30°C、夜溫 25°C 之溫室內觀察是否有病斑產生。

### 四、分離細菌菌株之 Biolog 鑑定及碳素元利用分析

將分離所得之 14 株細菌菌株培養於 Biolog Universal Growth Medium 平板培養基(BUG, 5.7%(w/v)BUG agar)上，於 30°C、無光照環境下更新移殖 2 次後以 MicroStation 微生物菌種鑑定系統(Biolog, Inc., California, U.S.A.)進行鑑定，並利用於 GN2 MicroPlate™中培養 36 hr 之結果進行碳素元利用分析<sup>(6)</sup>。

## 五、分離細菌菌株之 *gyrB* 基因序列親緣性分析

參考 Parkinson *et al.*<sup>(10)</sup>之實驗流程進行，方法如下：將分離所得之 14 株細菌菌株利用引子對 XgyrPCR2F(5'-AAGCAGGGCAAGAGCGAGCTGTA-3')/X.gyrrsp1(5'-CAAGGTGCTGAAGATCTG GTC-3')進行 PCR 增幅，反應條件為：樣品總體積為 20  $\mu$ l，內含 DNA 模版、5X PCR Hot-Start Master Mix II(GeneMark)、5  $\mu$ M 引子對及無菌水，混合後於 SensoQuest LbCycler 96(SensoQuest GmbH, Germany)進行，先以 95°C 反應 10 min，接著依序以 95°C 反應 30 sec、55°C 反應 30 sec 及 72°C 反應 2 min，上述 3 步驟共重覆 30 個循環，最後以 72°C 反應 10 min，增幅所得之核酸片段委由源資國際生物科技公司(Tri-I Biotech, Taiwan)以引子對 XgyrPCR2F/X.gyrrsp1 利用核酸自動定序儀(ABI 3730 DNA Analyzer)進行定序，所得核酸序列透過網際網路送至 National Center for Biotechnology Information(NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，以 BLAST 2.0 之程式進行網路基因庫之查詢與比對<sup>(14)</sup>。取得之序列與基因庫中各 *Xanthomonas* 屬病原細菌之 *gyrB* 序列<sup>(11)</sup>以 MEGA7 軟體<sup>(7)</sup>進行排序，以近鄰結合法(Neighbour-joining method, NJ)模組進行親緣性分析。

## 六、分離細菌菌株對藥劑之感受性測試

分離所得之 14 株細菌菌株對藥劑之感受性以濾紙圓盤測定法<sup>(5)</sup>進行測試，測試之藥劑如下：稀釋 1,000 倍之 75% 鋅錳座賽胺水分散性粒劑(拼出露，威群國際有限公司)、稀釋 1,500 倍之 25% 依得利乳劑(興農地菌克，興農股份有限公司)、稀釋 600 倍之 66.5% 普拔克溶液(剋疫菌，優必樂有限公司)、稀釋 2,500 倍之 250g/L 曼普胺水懸劑(沒疫健，台灣先正達股份有限公司)、稀釋 1,000 倍之 23% 亞托敏水懸劑(稱尚久，國豐化學工業股份有限公司)、稀釋 2,500 倍之 50% 白克列水分散性粒劑(威力旺，台灣巴斯夫股份有限公司)、稀釋 3,000 倍之 50% 保粒黴素(甲)水溶性粒劑(保粒明，興農股份有限公司)、稀釋 1,000 倍之 77.5% 嘉賜銅可濕性粉劑(加瑞農，大勝化學工業股份有限公司)、稀釋 400 倍之 72% 波爾多可濕性粉劑(藍寶，台灣龍燈股份有限公司)、稀釋 500 倍之 40% 銅快得寧可濕性粉劑(克瓜菌，瑞芳植物保護股份有限公司)、稀釋 400 倍之 58% 鋅錳滅達樂可濕性粉劑(露速淨，惠光股份有限公司)、稀釋 400 倍之 80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑(好意-45，惠光股份有限公司)、稀釋 1,000 倍之 12.5% 鏈黴素溶液(抗腐黴素，洽益化學股份有限公司)及稀釋 1,000 倍之 10% 鏈四環黴素水溶性粉劑(枯萎寧，全臺農藥有限公司)。

## 七、統計分析

實驗數據利用 SPSS12.0 軟體進行 one-way ANOVA analysis，利用 least significant difference (LSD) test 進行數據比較，統計上以  $p < 0.05$  為具顯著差異。

## 結 果

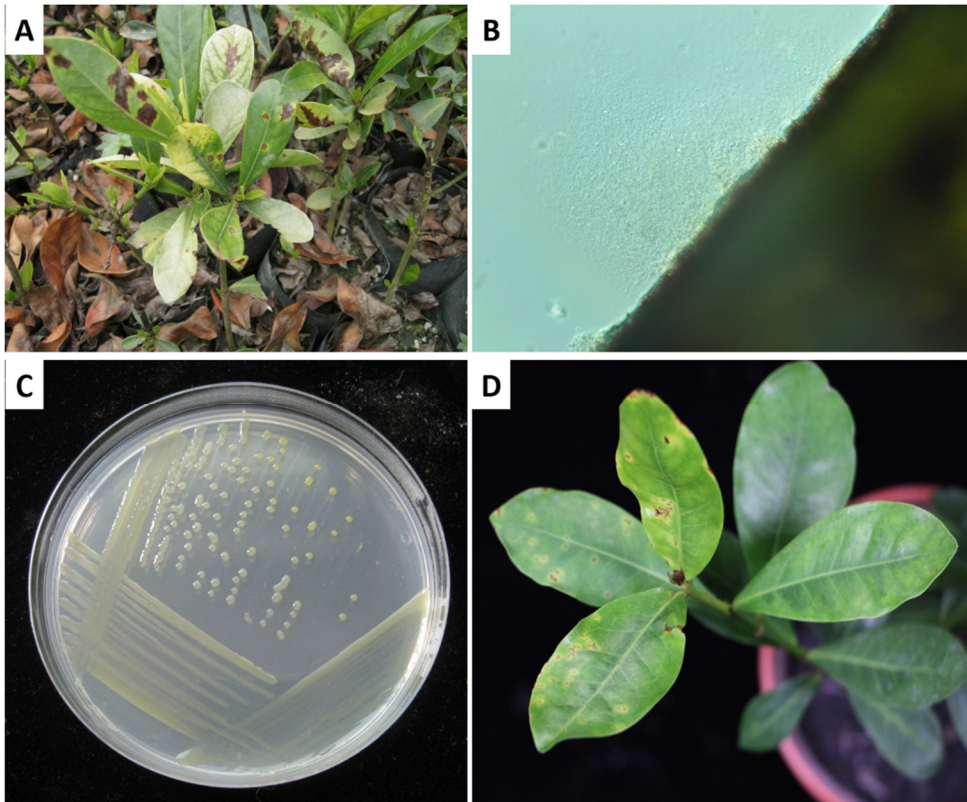
### 一、病原細菌之分離

罹病之宮粉仙丹葉片表面可見中央呈褐色壞疽且周圍具黃色暈環之病斑，而罹病枝條表面則呈褐色壞疽狀(圖一 A)，透過顯微鏡鏡檢可見病斑及其附近健康處組織間有菌流流出(圖一 B)，且於 NA 平板培養基上可見黃色黏稠狀之菌落(圖一 C)，以劃線平板法純化後共獲得 14 株分離細菌菌株，分別命名為 Tcpb21-Tcpb34(表一)，並保存於-30℃甘油保存管中備用，需要時則劃線培養於 NA 平板培養基上，於 30℃、無光照環境下培養 3 天後進行實驗。

表一、本研究使用之細菌菌株

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strains	Collection date	Location	Isolation part
Tcpb21	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb22	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb23	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb24	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb25	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb26	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb27	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb28	2018.03.19	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb29	2018.03.22	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb30	2018.03.22	Tianwei, Changhua	Leaf
Tcpb31	2018.03.29	Tianwei, Changhua	Stem
Tcpb32	2018.03.29	Tianwei, Changhua	Stem
Tcpb33	2018.03.29	Tianwei, Changhua	Stem
Tcpb34	2018.03.29	Tianwei, Changhua	Leaf



圖一、仙丹花細菌性葉斑病之病徵及病原菌形態。(A)罹病葉片表面可見中央呈褐色壞疽且周圍具黃色暈環之病斑，(B)鏡檢可見病斑及其附近健康處組織間有菌流流出，(C)病原菌於 NA 平板培養基上為黃色黏稠狀菌落，(D)將病原菌接種於宮粉仙丹葉片，28 天後葉片出現褐色壞疽且周圍具黃色暈環之病徵。

Fig. 1. Symptoms of bacterial leaf spot of *Ixora* and morphology of its causal agent. (A) Brown and necrotic lesions surrounded by a wide chlorotic halo on diseased leaves. (B) Bacterial stream emerging from diseased tissue margin. (C) Bacterial strain formed yellow and mucoid colonies on NA medium. (D) Necrotic lesions surrounded by a chlorotic halo appeared on leaves of *Ixora x westii* after 28 days after inoculation with the bacterial strain.

## 二、分離細菌菌株之生理生化特性測試

分離所得之 14 株細菌菌株 Tc**p**b21-Tc**p**b34 之革蘭氏染色結果為革蘭氏陰性，氧化/發酵葡萄糖測試結果為好氧性，聚羥基丁酸酯染色顯示無法累積形成聚羥基丁酸酯顆粒，而於菸草葉片上可誘發過敏性反應；14 株分離細菌菌株不具氧化酵素，然具過氧化氫酵素、脂質分解酵素、蛋白質水解酵素、澱粉水解酵素及果膠分解酵素，可於 40°C 下生長，且可利用蔗糖形成菌果聚醣(表二)。

表二、14 株分離細菌菌株 Tcbp21 – Tcbp34 之生理生化特性測試

Table 2. Biochemical and physiological assays for 14 bacterial strains Tcbp21 – Tcbp34

Characteristics	Reaction <sup>1</sup>
Aerobic metabolism of glucose	+
Anaerobic metabolism of glucose	–
HR on tobacco	+
Growth at 40°C	+
Catalase	+
Oxidase	–
Lipid hydrolysis	+
Protein digestion	+
Starch hydrolysis	+
Pectolytic activity	+
Polyhydroxybutyrate granules accumulation	–
Levan production from sucrose	+

<sup>1</sup>+ indicates positive reaction; – indicates negative reaction.

### 三、分離細菌菌株之病原性測試

利用噴霧接種法將分離所得之 14 株細菌菌株 Tcbp21–Tcbp34 分別接種於宮粉仙丹葉片，結果顯示接種後 7 天於葉片上可見水浸狀小斑點，隨後隨時間擴大，呈中央褐色壞疽且周圍具黃色暈環之病斑(圖一 D)，切取病斑及其附近健康處組織進行鏡檢可見菌流流出且於 NA 平板培養基上可獲得相同之黃色黏稠狀菌落。

### 四、分離細菌菌株之 Biolog 鑑定與碳素元利用分析

分離所得之 14 株細菌菌株 Tcbp21–Tcbp34 以 MicroStation 微生物菌種鑑定系統進行鑑定，結果顯示其為火鶴花細菌性葉枯病菌(*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)，平均相似度為 0.75，分析於 GN2 MicroPlate™ 中培養 36 hr 之碳素元利用情形，結果如表三所示。

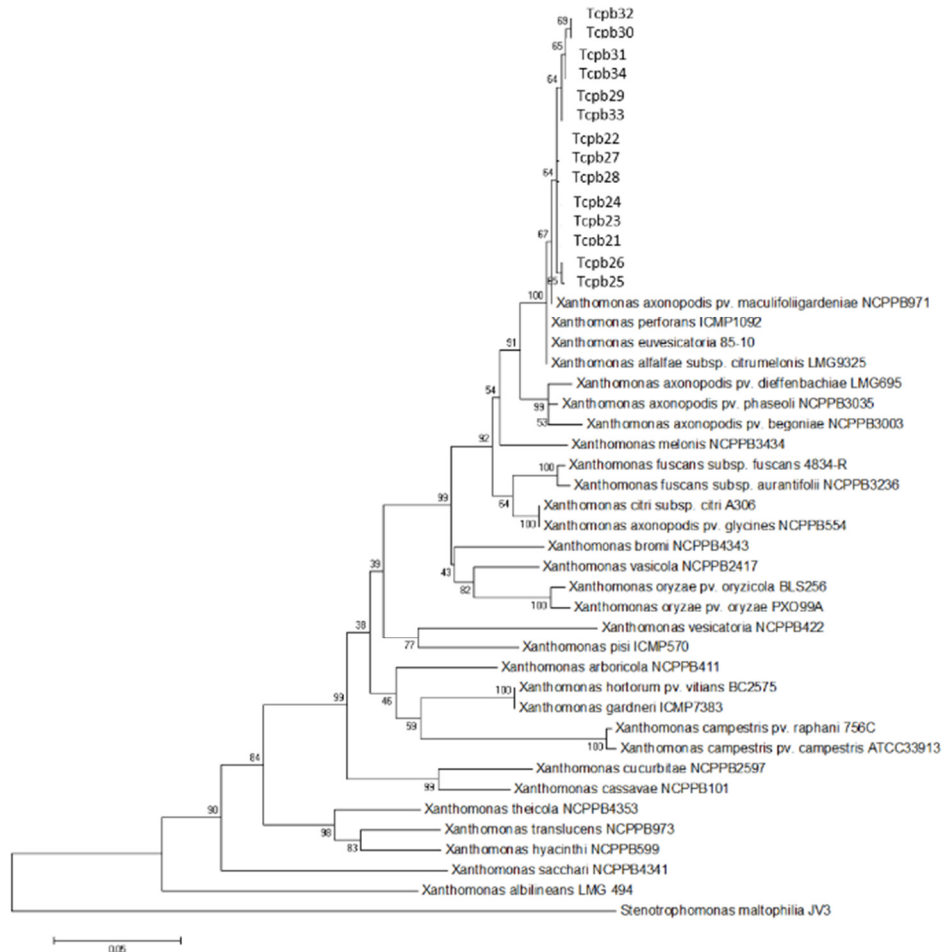
表三、以 Biolog GN Microplate 系統測試 14 株分離細菌菌株 Tcbp21-Tcbp34 之碳素元利用情形  
Table 3. Carbon utilization pattern by 14 bacterial strains Tcbp21-Tcbp34 with Biolog GN Microplate system

Carbon sources	Utilization <sup>1</sup>
Acetic acid, <i>cis</i> -Aconitic acid, L-Alaninamide, D-Alanine, L-Alanine, L-Alanylglycine, $\alpha$ -Ketobutyric acid, D-Cellobiose, Citric acid, Dextrin, D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose, Gentiobiose, Glycerol, Glycogen, Glycyl-L-glutamic acid, L-Glutamic acid, D-Glucose, N-Acetyl-glucosamine, $\alpha$ -Ketoglutaric acid, Lactulose, Hydroxy-L-proline, L-Leucine, D-Mannose, Maltose, D-Melibiose, Malonic acid, Methylpyruvate, Propionic acid, D-Psicose, Succinic acid, Bromosuccinic acid, Mono-methyl-succinate, L-Serine, D-Sorbitol, Sucrose, Tween 40, L-Threonine	+
Arabinose, L-Aspartic acid, Glycyl-L-aspartic acid, Glucose-1-phosphate, Glucose-6-phosphate, D, L- $\alpha$ -Glycerolphosphate, D-Raffinose, Tween 80, D-Trehalose, Turanose	V
Adonitol, D-Arabitol, $\gamma$ -Aminobutyrate, 2-Aminoethanol, L-Asparagine, 2, 3-Butanediol, $\alpha$ -Hydroxybutyrate, $\beta$ -Hydroxybutyrate, $\gamma$ -Hydroxybutyrate, D, L-Carnitine, $\alpha$ -Cyclodextrin, i-erythritol, Formic acid, Histidine, Itaconate, Inosine, m-inositol, D-Galacturonic acid, D-Galactonic acid lactone, D-Gluconic acid, N-Acetyl-D-galactosamine, D-Glucosamine, $\beta$ -Methyl-D-glucoside, D-Glucuronic acid, Glucuronamide, L-Pyroglutamate, $\alpha$ -D-Lactose, D, L-Lactic acid, D-Mannitol, L-Ornithine, p-Hydroxyphenylacetate, L-Phenylalanine, Phenylethylamine, Putrescine, Quinic acid, L-Rhamnose, D-Saccharic acid, Sebacate, D-Serine, Succinamic acid, Thymidine, $\alpha$ -Ketovaleric acid, Xylitol, Urocanic Acid, Uridine	-

<sup>1</sup>+, 80% or more of strains were able to utilize the carbon sources; V, 80% or more of strains tested produced borderline results; -, 80% or more of strains were not able to utilize the carbon sources.

### 五、分離細菌菌株之 *gyrB* 序列親緣性分析

利用引子對 XgyrPCR2F/X.gyrssp1 增幅 *gyrB* 核酸片段序列，並以近鄰結合法(Neighbour-joining method, NJ)模組進行親緣性分析，結果顯示 Tcbp21-Tcbp34 等 14 株分離細菌菌株與仙丹花細菌葉斑病菌(*X. axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae*)之親緣關係最近(圖二)。



圖二、以 *gyrB* 序列進行近鄰結合法模組分析 14 株分離細菌菌株 Tcbp21 – Tcbp34 與各 *Xanthomonas* 屬病原細菌間之親緣性。利用 MEGA7 軟體以 Jukes-Cantor 模組進行基因庫中各 *Xanthomonas* 屬病原細菌 *gyrB* 序列之親緣性比對，*Stenotrophomonas maltophilia* JV3 菌株為分析使用之外群種。下方尺規(0.050)表示各菌株間每個位點之核苷酸取代數。

Fig. 2. Phylogenetic tree generated using the Neighbour-joining method of *gyrB* partial sequences showing the relationship of 14 bacterial strains Tcbp21-Tcbp34 with other *Xanthomonas* species. A phylogenetic tree was constructed in MEGA7 by deriving from the Jukes-Cantor method. The sequences of *Stenotrophomonas maltophilia* strain JV3 was used as the outgroup species. The bar(0.050)at the bottom represents the number of nucleotide substitutions per site.



## 六、分離細菌對藥劑之感受性測試

利用 14 種藥劑進行測試，顯示以抗生素類、銅劑類及重金屬類等 8 種藥劑，對 14 株分離細菌菌株具抑制生長之能力，其中以稀釋 1,000 倍之 12.5%鏈黴素溶液及稀釋 1,000 倍之 10%鏈四環黴素水溶性粉劑等抗生素類藥劑抑制能力最佳，稀釋 1,000 倍之 75%鋅錳座賽胺水分散性粒劑、稀釋 1,000 倍之 77.5%嘉賜銅可濕性粉劑、稀釋 400 倍之 72%波爾多可濕性粉劑及稀釋 500 倍之 40%銅快得寧可濕性粉劑等藥劑抑制能力次之，而稀釋 400 倍之 80%鋅錳乃浦可濕性粉劑及稀釋 400 倍之 58%鋅錳滅達樂可濕性粉劑抑制能力較差(表四)。

表四、殺菌劑對 14 株分離細菌菌株 Tcpb21 – Tcpb34 之抑制能力

Table 4. Inhibition activities of fungicides on 14 bacterial strains Tcpb21-Tcpb34.

Chemical	Dilution times	Inhibition zone(mm)
75% Mancozeb + Zoxamide WG	1,000	2.60c <sup>1</sup>
25% Etridiazole EC	1,500	0.00f
66.5% Propamocarb hydrochloride SL	600	0.00f
250g/ L Mandipropamid SC	2,500	0.00f
23% Azoxystrobin SC	1,000	0.00f
50% Boscalid WG	2,500	0.00f
50% Polyoxins SG	3,000	0.00f
77.5% Kasugamycin + Copper oxychloride WP	1,000	2.47cd
72% Bordeaux WP	400	2.00d
40% Oxine-copper + Cupric hydroxide WP	500	1.93d
58% Mancozeb + Metalaxyl WP	400	0.33e
80% Mancozeb WP	400	1.73d
12.5% Streptomycin SL	1,000	4.94a
10% Streptomycin + Tetracycline SP	1,000	3.61b
CK	-	0.00f

<sup>1</sup> Statistical analysis by LSD( $p < 0.05$ ) was applied to compare the inhibition zone between each fungicide.

## 討 論

本試驗自宮粉仙丹罹病組織中分離出之 Tcpb21–Tcpb34 等 14 株細菌菌株，為革蘭氏陰性、好氧性細菌，不具氧化酵素且無法累積形成聚羥基丁酸酯顆粒，然具過氧化氫酵素、脂質分解酵素、蛋白質水解酵素、澱粉水解酵素及果膠分解酵素，於 NA 平板培養基上為黃色黏稠狀之菌落，可於 40°C 下生長，且可利用蔗糖形成菌果聚糖，於菸草葉片上可誘導過敏性反應產生，推測為 *Xanthomonas* 屬病原細菌；以噴霧接種法接種於宮粉仙丹葉片上，於接種後 7 天可在葉片上產生水浸狀小斑點，病斑隨時間擴大，呈中央褐色壞疽且周圍具黃色暈環之病斑，且最低可發病菌量為

$10^5$  CFU·ml<sup>-1</sup>，顯示此 14 株分離細菌菌株為宮粉仙丹之病原菌。

以 MicroStation 微生物菌種鑑定系統鑑定 14 株分離細菌菌株，結果顯示其為火鶴花細菌性葉枯病菌(*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)，進一步分析於 GN2 MicroPlate™中培養 36 hr 之碳素元利用情形，分離細菌菌株可利用 *cis*-aconitic acid、D-fructose、D-galactose、D-glucose、glycerol、L-leucine、D-mannose 及 methylpyruvate 等物質，但無法以 adonitol、D-arabitol、 $\gamma$ -aminobutyrate、2-aminoethanol、L-asparagine、2, 3-butanediol、D, L-carnitine、 $\alpha$ -cyclodextrin、itaconate、N-acetyl-D-galactosamine、D-galacturonate、D-glucosaminatate、L-pyroglytamate、 $\beta$ -hydroxybutyrate、 $\gamma$ -hydroxybutyrate、D, L-lactic acid、 $\alpha$ -D-lactose、i-erythritol、m-inositol、L-ornithine、phenylethylamine、putrescine、L-rhamnose、D-saccharate、sebacate、D-serine 與 xylitol 等做為唯一碳素源，與 Bergey's Manual 中 *Xanthomonas* 各屬<sup>(12)</sup>比較顯示與 *X. axonopodis* 具較高的相似性；然 *Xanthomonas* 屬細菌具高度寄主專一性，火鶴花細菌性葉枯病菌無法感染仙丹花，進一步利用引子對 XgyrPCR2F/X.gyrssp1 增幅 Tcpg21–Tcpg34 等 14 株分離細菌菌株之 *gyrB* 核酸片段，並與各 *Xanthomonas* 屬病原細菌之 *gyrB* 序列以近鄰結合法(Neighbour-joining method, NJ)模組進行親緣性分析，顯示此 14 株分離細菌菌株與仙丹花細菌葉斑病菌(*X. axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae*)具較近之親緣關係，推斷本病害之病原細菌為 *X. axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae*。

仙丹花細菌性葉斑病在臺灣之發生情形於 2018 年首次被報導<sup>(1)</sup>，然該病害在臺灣尚無推薦藥劑，故以 14 種常用於觀賞花卉、花木或細菌性病害之藥劑進行測試，顯示抗生素類、銅劑類及重金屬類等藥劑具抑制病原細菌生長之能力，其中以 12.5%鏈黴素溶液及 10%鏈四環黴素水溶性粉劑等抗生素類藥劑抑制能力最佳，而 75%鋅錳座賽胺水分散性粒劑、77.5%嘉賜銅可濕性粉劑、72%波爾多可濕性粉劑、40%銅快得寧可濕性粉劑、80%鋅錳乃浦可濕性粉劑及 58%鋅錳滅達樂可濕性粉劑等銅劑類與重金屬類藥劑之抑制能力較差；然於測試中發現分離細菌菌株對銅劑類藥劑具耐受性，此現象於 *Xanthomonas* 屬細菌已被廣泛報導<sup>(4)</sup>，建議以銅劑防治仙丹花細菌性葉斑病時需留意抗藥性的產生。

## 參考文獻

1. 張世杰、郭建志、廖君達、趙佳鴻 2018 仙丹花細菌性葉斑病菌之鑑定與特性分析 植物保護科技新知研討會暨中華植物保護學會 107 年度年會 臺中市(BPDR-1)。
2. 曾顯雄、曾國欽、張清安、蔡東纂、嚴新富 2019 臺灣植物病害名彙 中華民國植物病理學會 臺中市。
3. Chen, L. Y. 2003. Floral development and flowering regulation of *Ixora*. Dissertation. Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Taichung. 143pp.
4. Cooksey, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 201-219.

5. De Beer, E. J. and M. B. Sherwood. 1945. The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances. *J. Bacteriol.* 50: 459-467.
6. Jones, J. B., A. R. Chase and G. K. Harris. 1993. Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Dis.* 77: 553-558.
7. Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
8. Miller, J. W. 1970. Bacterial leaf spot of *Ixora*. *Plant Pathol. Circ. No.* 101.
9. Palmateer, A. J. and A. R. Chase. 2018. Diseases of gardenia. p.927-939. In: McGovern, R. and W. Elmer(eds.). *Handbook of Florists' Crops Diseases. Handbook of plant disease management.* Springer. Cham.
10. Parkinson, N. M., V. Aritua, J. Heeney, C. Cowie, J. Bew and D. Stead. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrB gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2881-2887.
11. Parkinson, N. M., C. Cowie, J. Heeney and D. Stead. 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 264-274.
12. Sandler, G. S. and J. F. Bradbury. 2005. *Xanthomonadales ord. nov.* p.63-122. In: Brenner, D. J. and N. R. Krieg(eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume two.* Springer. New York.
13. Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.* 3<sup>rd</sup> edition. APS Press, St. Paul.
14. Tatusova, T. A. and T. L. Madden. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 247-250.
15. Wehlburg, C. 1968. Leafspot of *Gardenia*. *Plant Pathol. Circ. No.* 70.

# Identification and Characterization of the Causal Agent of Bacterial Leaf Spot of *Ixora* in Taiwan<sup>1</sup>

Shih-Chieh Chang, Chien-Chih Kuo, Chung-Ta Liao and Chia-Hung Chao<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Ixora* (*Ixora x westii*) plants exhibiting brown and necrotic lesions surrounded by a wide chlorotic halo were observed in March, 2018, at Tianwei Township, Changhua County in Taiwan. Microscopic examination showed that masses of bacterial cells oozed out of the freshly cut tissues from the junctions of diseased and healthy area of lesions. The bacteria formed yellow and mucoid colonies on NA medium. Results of Gram staining showed that the isolated bacterial cells were Gram-negative. Fourteen bacterial strains were characterized as *Xanthomonas axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae* with phylogenetic analysis of gyrase B sequences. All of bacterial suspensions ( $10^5$  CFU · ml<sup>-1</sup>) were prepared individually from these 14 strains and sprayed onto 4-week-old *Ixora* plants. Brown and necrotic lesions surrounded by a wide chlorotic halo as the field-grown *Ixora* plants were observed. Bacteria isolated from the inoculated *Ixora* leaves showed the same cultural and biochemical characteristics as the bacterium originally isolated from the field samples. Subsequently, the sensitivity of the bacterial strains to multiple commercial fungicides was tested, and the results showed that the bacterium was most sensitive to streptomycin (12.5% SL) and streptomycin + tetracycline (10% SP).

**Key words:** *Ixora*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae*

---

<sup>1</sup> Contribution No. 1012 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup> Research assistant, Associate Researcher, Associate Researcher and Associate Researcher of Taichung DARES, COA.