

台灣蔬菜細菌性軟腐病菌之物種多樣性

高之韋¹、吳雅芳²、林志鴻^{1*}

¹ 國立嘉義大學植物醫學系

² 行政院農業委員會臺南區農業改良場

* 聯絡作者，E-mail: chih-hung.lin@mail.ncyu.edu.tw

摘要

高之韋、吳雅芳、林志鴻。2023。台灣蔬菜細菌性軟腐病菌之物種多樣性。植物醫學65(1): 21-32。

*Pectobacterium*及*Dickeya*屬之軟腐細菌是引起植物軟腐病的重要病原，可感染多種經濟作物，造成嚴重損失。軟腐細菌原分類於*Erwinia*屬，因分子系統分類學之進展，其分類地位已重新修訂，且持續有新物種被發現，因此有必要重新瞭解台灣的軟腐細菌。本研究根據16S rDNA gene、*dnaX*、*leuS*及*recA*等基因之序列，分析原*Erwinia*屬的9株蔬菜軟腐細菌及2株未知軟腐細菌之分類地位。結果顯示原*E. carotovora* subsp. *carotovora*菌株分別歸類於*P. aroidearum*、*P. brasiliense*、*P. colocasium*及*Pectobacterium* spp.，原*E. chrysanthemi*菌株則為*D. fangzhongdai*，而未知2株菌株分別為*P. brasiliense*及*P. versatile*。除*P. brasiliense*菌株無法引起洋蔥組織軟腐之外，其餘供試菌株對馬鈴薯及洋蔥皆具有致腐能力，但菌株間有顯著差異。供試菌株皆可產生果膠分解酵素，但僅*D. fangzhongdai*菌株可產生藍色色素。供試菌株培養在pH5至pH10之液態營養培養基中皆可生長，但在pH4中不利生長，且菌株間有明顯差異。本研究顯示台灣蔬菜軟腐細菌存在物種多樣性，此結果將有助於瞭解台灣細菌性軟腐病之分類現況。

關鍵詞：軟腐細菌、*Pectobacterium*、*Dickeya*、物種多樣性、親緣關係樹

緒言

細菌性軟腐病為重要的植物細菌性病害之一，寄主範圍廣泛，可感染蔬菜、花卉及觀賞植物等重要經濟作物，引起軟腐、壞疽等症狀，造成嚴重的經濟損失。目前已知有多種病原細菌可以感染植物，引起植物細菌性軟腐病，如 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Burkholderia*、*Pantoea*、

Enterobacter、*Klebsiella*、*Leuconostoc*及*Clostridium*等屬⁽⁶⁾之細菌，其中以*Pectobacterium*及*Dickeya*兩屬之軟腐細菌最具破壞力，因此入選為2010年全球十大植物病原細菌⁽²²⁾。*Pectobacterium*及*Dickeya*兩屬之軟腐細菌皆屬於Enterobacteriales目Pectobacteriaceae科，現今許多研究將其統稱為SRP (soft rot Pectobacteriaceae)，舊稱為SRE (soft rot Enterobacteriaceae或soft rot *Erwinia*)，此類軟腐細菌之形態皆呈桿狀、革蘭氏陰性菌、不形成内生孢子，屬兼性厭氧細菌⁽⁴⁾。軟腐細菌具有非常廣泛的寄主範圍，Ma等人 (2007) 的研究顯示軟腐細菌可感染至少35% 的被子植物，包括多種重要經濟作物，如馬鈴薯、番茄、甜菜、胡蘿蔔、甘藍、蕪菁、菊花、蝴蝶蘭、水稻、玉米等⁽²¹⁾，且大多數的軟腐細菌可以感染多種寄主，其中發現某些物種對特定植物較具致病力，如*P. aroidearum*對單子葉植物的致病力較高⁽²⁵⁾，僅少數的軟腐細菌具有寄主專一性，如*P. betavascularum*只發現為害甜菜，而*P. polaris*只發現感染馬鈴薯⁽³⁵⁾。軟腐細菌為一種伺機性病病原菌 (opportunistic pathogens)，主要透過植物組織傷口侵入植物，並潛伏於植物組織的細胞間隙，直到環境條件(如游離水、溫度等)合適，進而侵染為害^(29, 35, 37)。因軟腐細菌具有潛伏特性，使得馬鈴薯於儲存環境或運輸過程中，皆可能發生軟腐病，因此造成嚴重的經濟損失⁽⁸⁾。軟腐細菌的致病性主要依賴其產生大量的植物細胞壁分解酵素(plant cell wall degrading enzymes)，以降解植物組織的果膠成分，導致植物組織的結構崩壞及細胞損傷，進而造成受侵染部位組織的腐爛^(37, 38)。軟腐細菌通常存活於含有寄主植物或其殘體的土壤中。此外，有研究顯示軟腐細菌可以存活在田間的多種雜草及無症狀的寄生根部⁽³⁵⁾。

軟腐細菌早期分類於*Erwinia*屬⁽⁵⁾，分別有*E. carotovora* subsp. *atroseptica*、*E. carotovora* subsp. *betavascularum*、*E. carotovora* subsp. *carotovora*、*E. carotovora* subsp. *odorifera*、*E. carotovora* subsp. *wasabiae*及*E. chrysanthemi*等物種⁽⁴¹⁾；1998年Hauben等人根據16S rDNA序列將*Erwinia*屬的軟腐細菌重新分類於*Pectobacterium*屬⁽¹³⁾；2005年Samson等人則根據DNA-

DNA雜合反應、表現型特性、血清學反應及16S rDNA序列等分析，又將*Pectobacterium chrysanthemi*重新分類於*Dickeya*屬⁽³²⁾；2016年Adeolu等人分析1548個核心蛋白及16S rDNA序列，再將*Pectobacterium*及*Dickeya*兩屬從Enterobacteriaceae科歸類至Pectobacteriaceae科⁽⁴⁾。自從發現軟腐細菌至今，在世界各地仍不斷有新的物種被發現。根據2021年Toth等人的研究記載，*Pectobacterium*屬有19個物種，分別為*P. actinidiae*、*P. aquaticum*、*P. aroidearum*、*P. atrosepticum*、*P. betavasculorum*、*P. brasiliense*、*P. cacticidum*、*P. carotovorum*、*P. fontis*、*P. oderiferum*、*P. parmentieri*、*P. parvum*、*P. peruvienne*、*P. polaris*、*P. polonicum*、*P. punjabense*、*P. versatile*、*P. wasabiae*及*P. zantedeschiae*等。而*Dickeya*屬有12個物種，分別為*D. chrysanthemi*、*D. dadantii* (subsp. *dadantii*與subsp. *dieffenbachiae*)、*D. dianthicola*、*D. zaeae*、*D. oryzae*、*D. paradisiaca*、*D. solani*、*D. fangzhongdai*、*D. aquatica*、*D. lacustris*、*D. undicola*及*D. poaceiphila*等⁽³⁶⁾。而Hugouvieux-Cotte-Pattat等人(2021)根據表現型、系統發育與基因組等分析，將*D. paradisiaca*物種自*Dickeya*屬移出，重新歸類至*Muscolia*新屬⁽¹⁴⁾。近期*Pectobacterium*屬新增兩個物種，分別為2021年分離自法國環境水體的*P. quasiaquaticum*⁽²³⁾，及2022年引起中國芋頭軟腐病的*P. colocasium*⁽⁴⁶⁾。2021年Hugouvieux-Cotte-Pattat與Van Gijsegem利用基因組核苷酸的相似度(ANI, average nucleotide identity)及DNA-DNA雜合反應分析，清楚界定*D. oryzae*與*D. zaeae*，並且於*Dickeya*屬中新增*D. parazeae*物種⁽¹⁵⁾。軟腐細菌多數物種皆分離自罹病的植物組織，僅少數物種分離自環境中的水體，如*P. fontis*分離自馬來西亞的瀑布、*P. aquaticum*分離自法國的溪流及*D. aquatica*分離自芬蘭的河流等⁽³⁶⁾。近期研究於北愛爾蘭的胡蘿蔔罹病組織分離到*D. aquatica*，顯示存在環境水體中的軟腐細菌物種，可能是植物的潛在病原細菌⁽³⁶⁾。

台灣植物細菌性軟腐病的相關記載，曾與徐(2003)的報告指出台灣植物細菌性軟腐病是由*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 及*E. chrysanthemi* (Ech) 所引起⁽²⁾。黃等人(2007)將原來的Ecc及Ech軟腐細菌學名更新為*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 及*P. chrysanthemi*⁽³⁾。隨著分子生物學及相關技術的進展，對軟腐細菌的系統發育有更深入的探討，並重新定義軟腐細菌的分類地位。因此，軟腐細菌的新物種陸續被發現，故有必要重新確認台灣軟腐細菌的分類地位。近年來陸續有研究以新的分類系統對台灣發生的軟腐病害進行診斷，如Chen等人(2020)於台北陽明山發現白色海芋軟腐病⁽⁷⁾、Tang等人(2021)於彰化埤頭鄉發現胡蘿蔔軟腐病⁽³⁴⁾及Wang等人(2022)於台中發現黃金葛軟腐病⁽⁴⁵⁾等，皆是由*P. aroidearum*引起。於2016年林等人證實*D. zaeae*引起嘉義地區水稻的細菌性基腐病⁽¹⁾；2019年Tsai等人發現*D. fangzhongdai*引起宜蘭三星鄉的青蔥軟腐病⁽³⁹⁾；2022年Wu等人於台中發

現*D. dadantii*造成羽葉蔓綠絨軟腐病⁽⁴⁵⁾。根據2021年Wei等人的研究得知台灣*Dickeya*屬軟腐細菌至少存在*D. dadantii*、*D. chrysanthemi*、*D. undicola*與*D. fangzhongdai*等4種物種⁽⁴⁴⁾。上述顯示台灣的軟腐細菌存在物種多樣性，非早期所記載的僅有Ecc及Ech(或*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*及*P. chrysanthemi*)兩種軟腐細菌，因此有必要重新瞭解台灣的軟腐細菌。

Van der Wolf等人(2021)的研究表示，根據16S rDNA序列分析可區分*Pectobacterium*及*Dickeya* spp.與*Erwinia*及*Enterobacter* spp.等物種，但軟腐細菌物種的分類尚需要特定的管家基因(housekeeping gene)序列分析，才能確認其物種地位，或利用多位點序列分析(MLSA, multi-locus sequence analysis)，可進一步提升物種鑑定的精確性⁽⁴⁰⁾。近年Portier等人利用多位點序列分析等方法，修訂*Pectobacterium*物種間的分類地位^(30, 31)。故本研究欲根據Portier等人的分類方法，分析台灣產區不同蔬菜之軟腐細菌Ecc與Ech菌株，以瞭解其分類地位及物種多樣性；同時探討供試菌株的基本特性及致病能力，以瞭解軟腐細菌物種間的差異性。研究結果可作為後續蔬菜細菌性軟腐病防治或抗病育種之供試材料，並提供病害診斷或管理等相關研究之參考。

材料與方法

菌株來源、培養及保存

本研究所使用之供試菌株共11株，包含8株*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)、1株*E. chrysanthemi* (Ech)及2株軟腐細菌，皆分離自台灣產區的不同蔬菜寄主，其中4株Ecc菌株由臺南區農業改良場提供，其餘7株為嘉義大學植物醫學系植物細菌實驗室保存之菌株(表一)。利用滅菌移植環將保存的供試菌株平板畫線於NA培養基(Nutrient agar medium, 1 g beef extract, 2 g yeast extract, 5 g peptone, 5 g NaCl, 15 g agar, 1 L dH₂O)，置於30°C生長箱培養2天。以滅菌移植環挑取菌落塗抹於523培養基(10 g sucrose, 8 g casein hydrolysate, 4 g yeast extract, 2 g K₂HPO₄, 0.3 g MgSO₄ · 7H₂O, 15 g agar, 1 L dH₂O)⁽¹⁸⁾平板，置於30°C生長箱增量培養一天，再以滅菌移植環沾取菌泥懸浮於無菌水中，調整菌液至OD₆₀₀ = 0.3，其濃度約10⁸ CFU/mL，作為接種源。供試菌株之保存，將欲保存的菌株懸浮液加入已滅菌的30%甘油保存管中，均勻混合後，隨即放置-80°C冰箱長期保存。

分子鑑定及親緣關係分析

將供試菌株畫線於NA培養基平板，置於30°C生長箱培養24小時，再將菌落懸浮於無菌水中，調配至OD₆₀₀ = 0.3 (約10⁸ CFU/mL)，作為聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction，

表一、本研究使用之細菌菌株來源及資訊

TABLE 1. Source and information of bacterial strains used in this study

Strain	Year	Location	Host	Original species name/identity ¹	Source
ECC3	1997	Hsilo, Yunlin	Cabbage	Ecc	TNDARES ²
ECC7	1998	Yuanchang, Yunlin	Cabbage	Ecc	TNDARES
ECC17	2009	Mailiao, Yunlin	Iceberg lettuce	Ecc	TNDARES
ECC35	2014	Hsinhua, Tainan	Taro	Ecc	TNDARES
OR13	1995	Shanhua, Tainan	Onion	Ecc	DPMNCYU ³
Bsr6	1998	Sanhsing, Ilan	Welsh onion	Ecc	DPMNCYU
Bsr9	1998	Sanhsing, Ilan	Welsh onion	Ecc	DPMNCYU
Bsr21	1991	Chuanglei, Ilan	Welsh onion	Ech	DPMNCYU
TSR25	2002	Jian, Hualien	Tomato	Ecc	DPMNCYU
CY-1	2021	Jhuci, Chiayi	Cabbage	Pectolytic bacterium	DPMNCYU
CY-2	2021	Supermarket	Pakchoi	Pectolytic bacterium	DPMNCYU

¹ Ecc: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; Ech: *Erwinia chrysanthemi*.

² TNDARES: Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture.

³ DPMNCYU: Department of Plant Medicine, National Chiayi University.

PCR)之DNA模版。就供試菌株的16S rDNA、*dnaX*、*leuS*及*recA*等4個目標基因進行PCR反應，PCR所使用的引子對及擴增後產物，以及反應物與反應條件皆參照引用文獻(表二)。完成PCR之產物寄至基龍米克斯生物科技股份有限公司進行定序，取得基因正反序列後，以Chromas v. 2.6.6檢查與修剪(trimming)序列，並以DNAMAN v.10.3.3.06組合(assembly)正反序列，使用美國國家生物科技資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)網站，以BLASTn進行基因序列比對，並查詢相近的軟腐菌株序列及登錄號，利用MEGA 11 v.11.0.10整理序列及建立親緣關係樹。參考Portier等人 (2019) 的分析方法，將供試菌株之*dnaX*、*leuS*及*recA*等基因序列串聯以進行多位點序列分析^(30, 31)。再分別對16S rDNA及*dnaX-leuS-recA*序列建立親緣關係樹，以確認供試菌株的分類地位，參考菌株皆下載自NCBI網站之資料庫，其相關資訊如表三及表四所示。

表二、本研究使用之引子對及其相關資訊

TABLE 2. Primers used in this study and their related information

Target gene	Primer	Sequence (5' to 3')	PCR product	Reference
16S rDNA	fD1	AGAGTTTGATCTGGCTCAG	1468 bp	(26)
	rP2	ACGGCTACCTGTGTACGACTT		
<i>dnaX</i>	dnaXF	TATCAGGTYCTTGCCCGTAAGTGG	535 bp	(33)
	dnaXR	TCGACATCCARCGYTGAGATG		
<i>leuS</i>	leuSFErwi	TYTCCATGCTGCCYTAYCCT	556 bp	(31)
	leuSRErwi	TCCAGTTRCGTGTCATGGTT		
<i>recA</i>	recAF	GGTAAAGGGTCTATCATGCG	730 bp	(42)
	recAR	CCTTCACCATACATAATTTGGA		

表三、根據16S rDNA序列分析親緣關係所使用之參考菌株

TABLE 3. Reference strains used for phylogenetic analysis using 16S rDNA sequence

Species ¹	Reference strains	NCBI accession number ²
<i>E. coli</i>	K-12 substr. MG1655	NZ_CP032667 ³
<i>D. fangzhongdai</i>	JS5	NR_151914
<i>D. solani</i>	IPO2222	NZ_CP015137 ³
<i>P. actinidiae</i>	KKH3	NR_125539
<i>P. aquaticum</i>	A212-S19-A16	NZ_CP086253 ³
<i>P. aroidearum</i>	SCRI102	JN600327
<i>P. aroidearum</i>	SCRI109	JN600323
<i>P. atrosepticum</i>	CFBP1526	NR_118295
<i>P. betavasculorum</i>	CFBP2122	NR_118291
<i>P. brasiliense</i>	BC1	CP009769 ³
<i>P. brasiliense</i>	BZA12	NZ_CP024780 ³
<i>P. brasiliense</i>	HNP201719	CP0463803
<i>P. brasiliense</i>	JP4	MN393939
<i>P. brasiliense</i>	ZBC7	MK910253
<i>P. cacticida</i>	1-12	NR_037102
<i>P. carotovorum</i>	CFBP2046	NR_118226
<i>P. colocasium</i>	LJ1	CP084032 ³
<i>P. fontis</i>	M022	MH627387
<i>P. odoriferum</i>	CFBP1878	NR_118225
<i>P. parmentieri</i>	RNS08-42-1A	NR_153752
<i>P. parvum</i>	s0421	NZ_OANP03000055 ³
<i>P. peruviana</i>	IFB5232	MF589613
<i>P. polaris</i>	NIBIO1006	NR_159084
<i>P. polonicum</i>	DPMP315	MK240326
<i>P. punjabense</i>	SS95	MH249622
<i>P. quasiquaticum</i>	A477-S1-J17	CP065177 ³
<i>P. versatile</i>	JP12	MN393892
<i>P. wasabiae</i>	SR91	NR_026047
<i>P. zantedeschiae</i>	9M	MG761828
<i>Pectobacterium</i> sp.	PL152	CP091064 ³

¹ *E.*: *Escherichia*; *D.*: *Dickeya*; *P.*: *Pectobacterium*.

² Accession numbers of 16S rDNA sequences downloaded from the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

³ Sequences of 16S rDNA gene were extracted from the complete genome sequence or the whole genome shotgun sequence.

致腐能力測試

將供試菌株畫線於523培養基平板，置於30°C生長箱培養一天後，再將菌落懸浮於無菌水中均勻混合，並調整其OD₆₀₀ = 0.3 (約10⁸ CFU/mL)，作為接種源。選用馬鈴薯塊莖及洋蔥鱗莖作為致腐能力測試的植物材料，馬鈴薯的接種方法修改自Oskiera等人 (2017) 的研究⁽²⁷⁾。先以自來水沖洗馬鈴薯塊莖表面的土壤，浸泡於0.5 % NaOCl溶液10分鐘以進行表面滅菌，再浸泡於無菌水10分鐘，連續2次，以減少植物組織殘留NaOCl。

24 J. Plant Med.

表四、根據多位點基因 *dnaX*、*leuS* 及 *recA* 等序列分析親緣關係所使用之參考菌株

TABLE 4. Reference strains used for phylogenetic analysis based on the multilocus sequences (*dnaX*, *leuS*, and *recA*)

Species ¹	Reference strains ¹	NCBI accession numbers ²		
		<i>dnaX</i>	<i>leuS</i>	<i>recA</i>
<i>E. coli</i>	K-12 substr. MG1655	NC_000913 ³	NC_000913 ³	NC_000913 ³
<i>D. fangzhongdai</i>	DSM 101947	NZ_CP025003 ³	NZ_CP025003 ³	NZ_CP025003 ³
<i>D. solani</i>	CFBP7704	MK516970	MK517114	MK517258
<i>P. actinidiae</i>	KKH3	NZ_JRMH01000001 ³	NZ_JRMH01000001 ³	NZ_JRMH01000001 ³
<i>P. aquaticum</i>	CFBP8637T	MK516879	MK517023	MK517167
<i>P. aroidearum</i>	CFBP8168T	MK516971	MK517115	MK517259
<i>P. atrosepticum</i>	CFBP1526T	MK516904	MK517048	MK517192
<i>P. betavascolorum</i>	CFBP2122T	MT683936	MT684083	MT684230
<i>P. brasiliense</i>	CFBP5381	MT683969	MT684116	MT684263
<i>P. brasiliense</i>	CFBP6617T	MK516956	MK517100	MK517244
<i>P. brasiliense</i>	CFBP7357	MT684036	MT684183	MT684330
<i>P. cacticida</i>	CFBP3628T	MK516923	MK517067	MK517211
<i>P. carotovorum</i>	CFBP2046T	MK516909	MK517053	MK517197
<i>P. colocasium</i>	LJ1	NZ_CP084032 ³	NZ_CP084032 ³	NZ_CP084032 ³
<i>P. fontis</i>	CFBP8629T	MK516878	MK517022	MK517166
<i>P. odoriferum</i>	CFBP1878T	MK516907	MK517051	MK517195
<i>P. parmentieri</i>	CFBP8475T	MK516972	MK517116	MK517260
<i>P. parvum</i>	CFBP8630T	MT684049	MT684196	MT684343
<i>P. peruviense</i>	CFBP8626	MT684048	MT684195	MT684342
<i>P. polaris</i>	CFBP8603T	MT684046	MT684193	MT684340
<i>P. polonicum</i>	DPMP315	NZ_RJTN01000001 ³	NZ_RJTN01000001 ³	RJTN01000017 ³
<i>P. punjabense</i>	CFBP8604T	MK516877	MK517021	MK517165
<i>P. quasiquaticum</i>	A477-S1-J17	NZ_CP065177 ³	NZ_CP065177 ³	NZ_CP065177 ³
<i>P. versatile</i>	CFBP6051T	MK516938	MK517082	MK517226
<i>P. versatile</i>	CFBP8651	MK516880	MK517024	MK517168
<i>P. wasabiae</i>	CFBP3304T	MK516922	MK517066	MK517210
<i>P. zantedeschiae</i>	CFBP1357	MT683921	MT684068	MT684215
<i>P. sp.</i>	PL152	CP091064 ³	CP091064 ³	CP091064 ³

¹ *E.*: *Escherichia*; *D.*: *Dickeya*; *P.*: *Pectobacterium*; T: type strain.

² Download sequences of the *dnaX*, *leuS*, and *recA* based on accession numbers from the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

³ Sequences of *dnaX*, *leuS*, and *recA* gene were extracted from the complete genome sequences or whole genome shotgun sequences.

將表面滅菌的馬鈴薯置於無菌操作台內風乾，取塊莖中間部分切成長、寬、厚約6、5、0.7 cm的切片，作為測試之馬鈴薯組織。洋蔥鱗莖則先剝去外皮，以70%酒精噴濕去皮之洋蔥鱗莖進行表面滅菌，置於無菌操作台內風乾，將洋蔥鱗莖兩端切除後，再切成四等分，去除最外面2-3片鱗葉及中心較小鱗葉，其餘鱗葉作為測試之洋蔥組織。將馬鈴薯切片與洋蔥鱗莖分別置於含有滅菌濾紙的培養皿，以滅菌解剖刀於供試組織中央畫出小的十字傷口，隨即在傷口上滴入5 μL接種源，並於濾紙上加入2 mL無菌水，再以石蠟膜密封後，置於30°C生長箱培養，每天觀察病徵進展，量測組織軟腐面積之中心垂直直徑(cm)，

並以接種無菌水作為對照，每1菌株三重複。

藍色色素產生能力測試

將供試菌株畫線於NA培養基平板，置於30°C生長箱培養一天後，再以滅菌移植環沾取菌落畫線於NGM培養基(NA, 1% glycerol, 2 mM MnCl₂ · 4H₂O)^(3, 19)平板，放置30°C生長箱培養三天後，觀察菌株的生長情形，並記錄是否有藍色色素產生，作為菌株產生藍色色素能力之判斷依據，每1菌株三重複。

果膠分解酵素產生能力測試

將供試菌株畫線於NA培養基平板，置於30°C生長箱培養一天後，再以滅菌移植環沾取菌落點於CVP培養基(Crystal violet-sodium polypectate medium, 0.9% NaOH, 0.045% CaCl₂, 0.2% NaNO₃, 0.3% Agar, 2% sodium polypectate, 0.015% crystal violet)⁽³⁾平板，放置30°C生長箱培養一天後，觀察菌株的生長情形，並記錄CVP培養基表面是否產生凹陷，作為菌株產生果膠分解酵素能力之判斷依據，每1菌株三重複。

不同酸鹼環境生長測試

將供試菌株畫線於523培養基平板，置於30°C生長箱培養一天後，將菌落懸浮於無菌水中，並調整細菌懸浮液至OD₆₀₀ = 0.3 (約10⁸ CFU/mL)，作為供試菌液。配製NB培養基(Nutrient Broth medium, 1 g beef extract, 2 g yeast extract, 5 g peptone, 5 g NaCl, 1 L dH₂O)，並利用1 M NaOH與1 M HCl將其pH分別調整為pH4 - pH10，共7種不同pH值的NB培養基，各取0.9 mL分裝於滅菌的1.5 mL離心管中備用。取0.1 mL供試菌液分別加入7種不同pH值的0.9 mL NB 離心管中，除檢測其OD₆₀₀值之外，並置於震盪生長箱(30°C, 300 rpm)培養一天，再檢測所有供試離心管的OD₆₀₀值，以瞭解供試菌株於不同酸鹼環境下的生長情形，本試驗共重複三次。

統計分析方法

利用IBM® SPSS® Statistics統計分析軟體之單因子變異數分析(One-way ANOVA)進行實驗數據分析，Fisher's LSD (Least Significant Difference) test進行事後檢定，以比較各組數據之間的差異性(P<0.05)。於不同酸鹼環境生長測試中使用95% 信賴

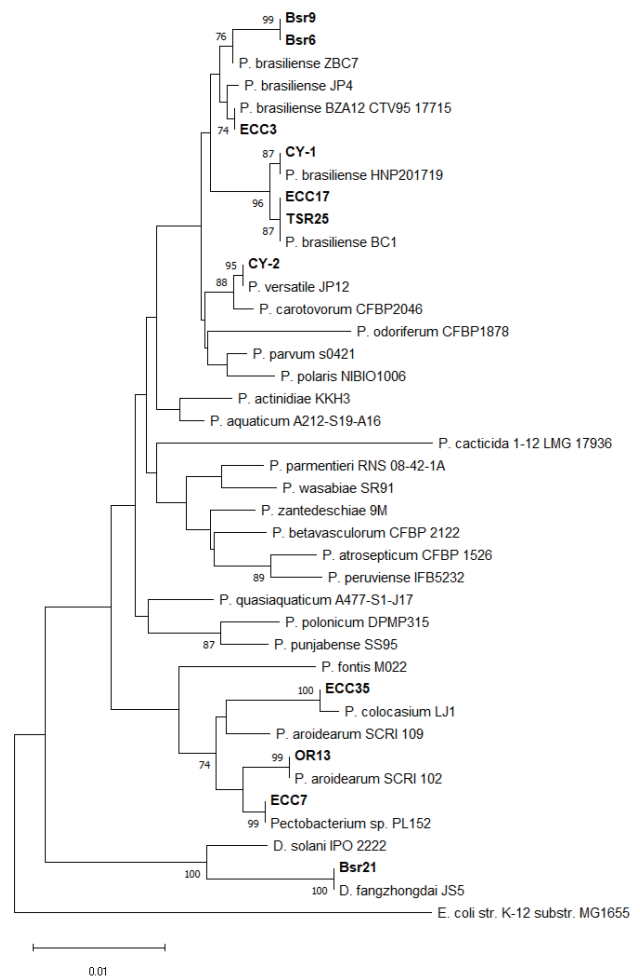
表五、供試菌株之16S rDNA序列於NCBI網站經BLASTn之序列比對結果

TABLE 5. Alignment of 16S rDNA sequences of the tested strains by BLASTn on the NCBI website

Strain	Original name ¹	Reference strain ²	Identity
OR13	Ecc	<i>P. aroidearum</i> SCRI 102	1352/1352 (100%)
ECC3	Ecc	<i>P. brasiliense</i> BZA12	1353/1353 (100%)
ECC17	Ecc	<i>P. brasiliense</i> BC1	1353/1353 (100%)
TSR25	Ecc	<i>P. brasiliense</i> BC1	1353/1353 (100%)
CY-1	Pectolytic bacterium	<i>P. brasiliense</i> HNP201719	1353/1353 (100%)
Bsr6	Ecc	<i>P. brasiliense</i> ZBC7	1348/1353 (99.6%)
Bsr9	Ecc	<i>P. brasiliense</i> ZBC7	1348/1353 (99.6%)
ECC35	Ecc	<i>P. colocasium</i> LJ1	1351/1353 (99.9%)
CY-2	Pectolytic bacterium	<i>P. versatile</i> JP12	1353/1353 (100%)
ECC7	Ecc	<i>P. sp.</i> PL152	1353/1353 (100%)
Bsr21	Ech	<i>D. fangzhongdai</i> JS5	1353/1353 (100%)

¹ Ecc: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; Ech: *Erwinia chrysanthemi*.

² D.: *Dickeya*; P.: *Pectobacterium*.



圖一、*Pectobacterium*及*Dickeya*屬菌株之16S rDNA基因序列所建構之親緣關係樹。使用MEGA11軟體進行鄰近連接分析(neighbor-joining)建立親緣樹，樹圖分支的可信度採用拔靴重復取樣法進行1000次的隨機取樣測試，圖中只顯示大於70%的bootstrap數值。以*Escherichia coli* K-12 substr. MG1655菌株作為外群。

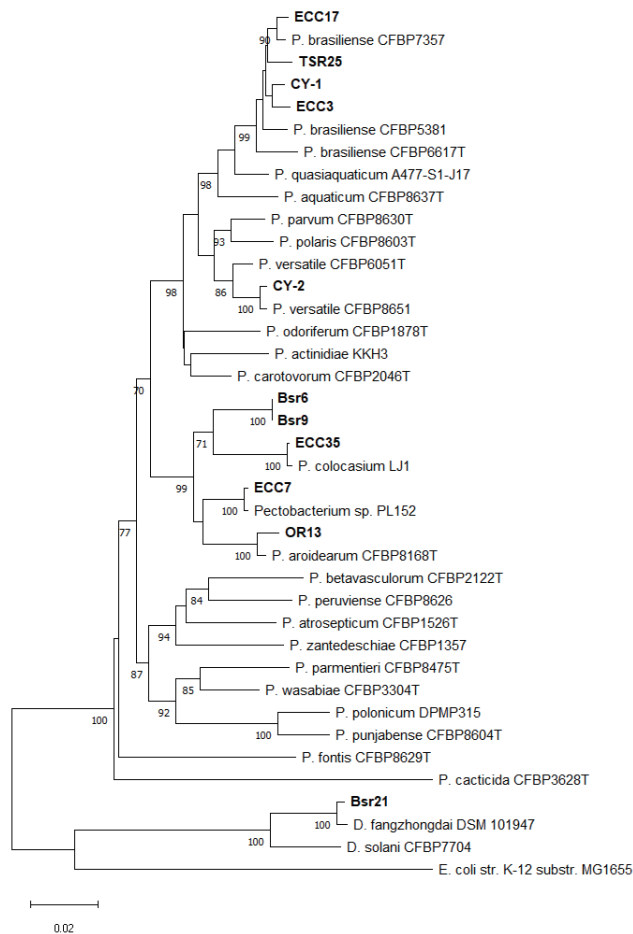
Fig. 1. Phylogenetic tree reconstructed from sequences of 16S rDNA gene of *Pectobacterium* and *Dickeya* strains. Phylogenetic analysis was completed using MEGA11 by the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates (only bootstrap values larger than 70 are shown). The *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 strain was used as the outgroup.

區間(CI, Confidence intervals)表示誤差線，以比較各組數據之間的差異性。

結果

軟腐細菌之分子鑑定與親緣關係分析

本研究之11株供試軟腐細菌，經由NCBI網站的BLASTn進行基因序列比對，其最高相似度的參考菌株，如表五所示。將供試菌株及參考菌株經16S rDNA序列之親緣分析，結果顯示分離自甘藍、結球萵苣及番茄的原*E. carotovora* subsp.



圖二、*Pectobacterium*及*Dickeya*屬菌株之*dnaX*、*leuS*及*recA*基因序列串聯所建構之親緣關係樹。使用MEGA11軟體進行鄰近連接分析(neighbor-joining)建立親緣樹，樹圖分支的可信度採用拔靴重複取樣法進行1,000次的隨機取樣測試，圖中只顯示大於70%的bootstrap數值。以*Escherichia coli* K-12 substr. MG1655菌株作為外群。

Fig. 2. Phylogenetic tree reconstructed from concatenated sequences of *dnaX*, *leuS* and *recA* housekeeping genes of *Pectobacterium* and *Dickeya* strains. Phylogenetic analysis was conducted using MEGA11 by neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates (only bootstrap values larger than 70 are shown). The *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 strain was used as the outgroup.

carotovora (Ecc) 菌株ECC3、CY-1、ECC17及TSR25，皆歸類於*Pectobacterium*屬的*P. brasiliense*物種；分離自洋蔥、芋頭及白菜的原Ecc菌株OR13、ECC35及CY-2，則分別歸類於*P. aroidearum*、*P. colocasium*及*P. versatile*三種物種；分離自甘藍的原Ecc菌株ECC7與*Pectobacterium* sp. PL152菌株最接近，暫定為*Pectobacterium* sp.菌株；分離自青蔥的原Ecc菌株Bsr6及Bsr9與*P. brasiliense*物種最接近，同樣分離自青蔥的原*E. chrysanthemi* (Ech) 菌株Bsr21則歸類於*Dickeya*屬的*D. fangzhongdai*物種(圖一)。經多位點基因(*dnaX-leuS-recA*)序列之親緣分析結果，顯示親緣關係樹圖與16S rDNA序列分

析之樹圖相似(圖二)，其中供試菌株Bsr6及Bsr9在多位點基因序列親緣關係樹圖中無法明確歸類，暫定為*Pectobacterium* sp.菌株。本研究共有11株供試軟腐細菌，其中8株分屬於5種物種，其餘3株未知。本研究供試菌株的44個序列資訊已登錄NCBI網站之Genbank資料庫，序列登錄號分別為16S rDNA基因(OP005472-OP005482)、*dnaX*基因(OP018927-OP018937)、*leuS*基因(OP018938-OP018948)及*recA*基因(OP018949-OP018959)。

致腐能力測試

供試菌株對馬鈴薯及洋蔥組織的致腐能力測試，結果顯示*P. brasiliense* CY-1菌株及*P. colocasium* ECC35菌株對馬鈴薯的致腐能力最強，而*P. aroidearum* OR13菌株及*P. versatile* CY-2菌株對馬鈴薯的致腐能力最弱(圖三)；4株*P. brasiliense*菌株對洋蔥皆無致腐能力，且*P. aroidearum* OR13菌株及*P. versatile* CY-2菌株對洋蔥的致腐能力最強，而*P. colocasium* ECC35菌株、*Pectobacterium* sp. Bsr6及*Pectobacterium* sp. Bsr9菌株對洋蔥的致腐能力較弱(圖三)。軟腐細菌菌株之間，對馬鈴薯及洋蔥組織的致腐能力存在顯著差異。

藍色色素及果膠分解酵素產生能力測試

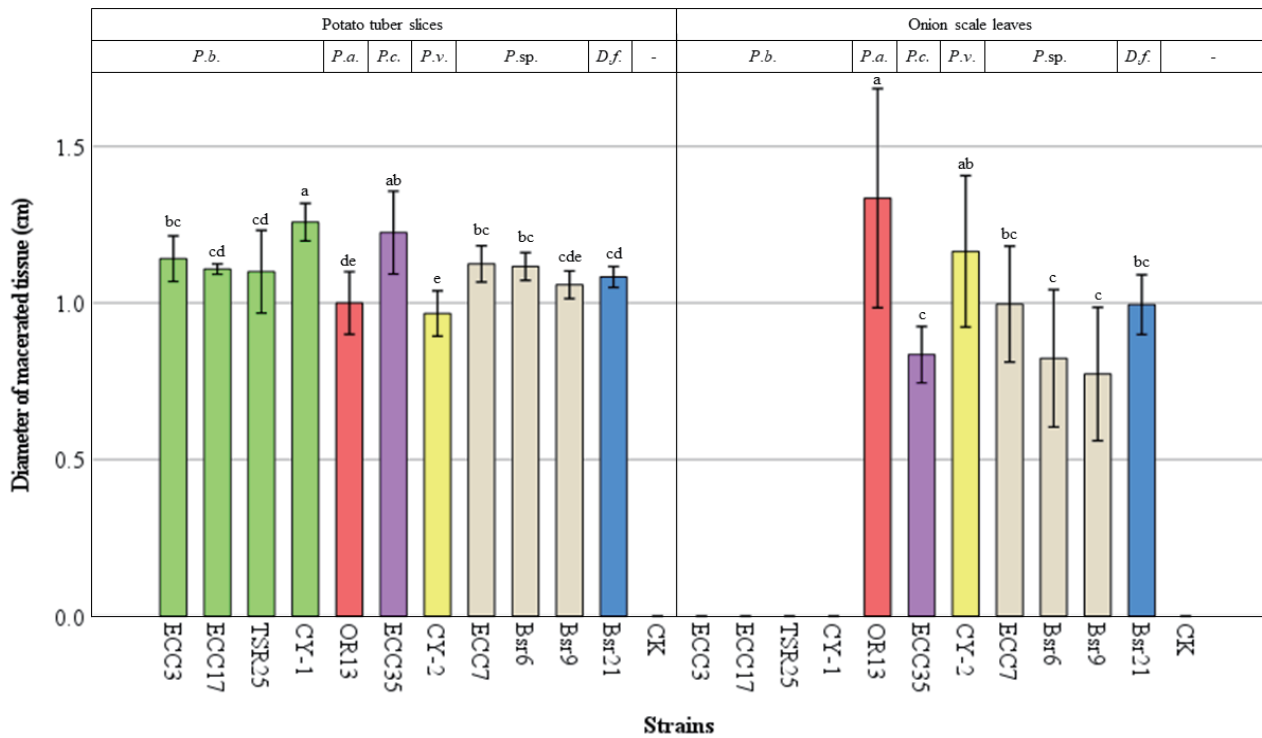
供試菌株於藍色色素產生能力測試結果，顯示僅*D. fangzhongdai* Bsr21菌株於NGM培養基上會產生藍色色素(圖四)，其餘10株供試菌株皆不會產生藍色色素(表六)；於果膠分解酵素產生能力測試中，11株供試菌株皆可在CVP培養基平板表面產生深度凹陷的特徵(圖四)，顯示供試菌株皆具有產生果膠分解酵素的能力(表六)。

不同酸鹼環境生長測試

供試菌株培養於不同酸鹼值的營養液態培養基(NB)，結果顯示11株供試菌株培養在pH4的NB培養基，其OD₆₀₀值皆無明顯增加(圖五)。但培養在pH5至pH10的NB培養基，所有供試菌株皆可生長，在各別的pH環境下，菌株之間的生長有明顯差異，其中*D. fangzhongdai* Bsr21、*Pectobacterium colocasium* Ecc35及*Pectobacterium* sp. Bsr6菌株的OD₆₀₀值較低(圖五)，又以培養在pH10的NB培養基，*D. fangzhongdai* Bsr21菌株的OD₆₀₀值最低。

討論

細菌性軟腐病普遍發生於全球各地，對許多的重要農作物造成嚴重的經濟損害⁽⁴¹⁾。軟腐細菌的寄主範圍廣泛，對寄主植物具高度破壞性，且可長期存活於土壤、水體及植物組織等環境，使農業藥劑防治不易^(35, 41)。故利用不同的防治方法進行病害綜合管理應是可行的防治策略。由於軟腐細菌呈現物種多樣性，易造成多種農產損失，具有較高的經濟風



圖三、供試菌株對馬鈴薯與洋蔥組織之致腐能力。將接種之馬鈴薯與洋蔥組織培養於30°C經24小時後，測量軟腐面積垂直中心的兩個直徑，取平均值(cm)，每1菌株三重複，以最小顯著差異(LSD)進行事後檢定。誤差線表示平均值的標準差。柱頂標準差線上所標示小寫英文字母不同時顯示 > 95% 之信賴差異度。*P.b.*: *P. brasiliense* ; *P.a.*: *P. aroidearum* ; *P.c.*: *P. colocasium* ; *P.v.*: *P. versatile* ; *P. sp.*: *Pectobacterium sp.* ; *D.f.*: *D. fangzhongdai* 。

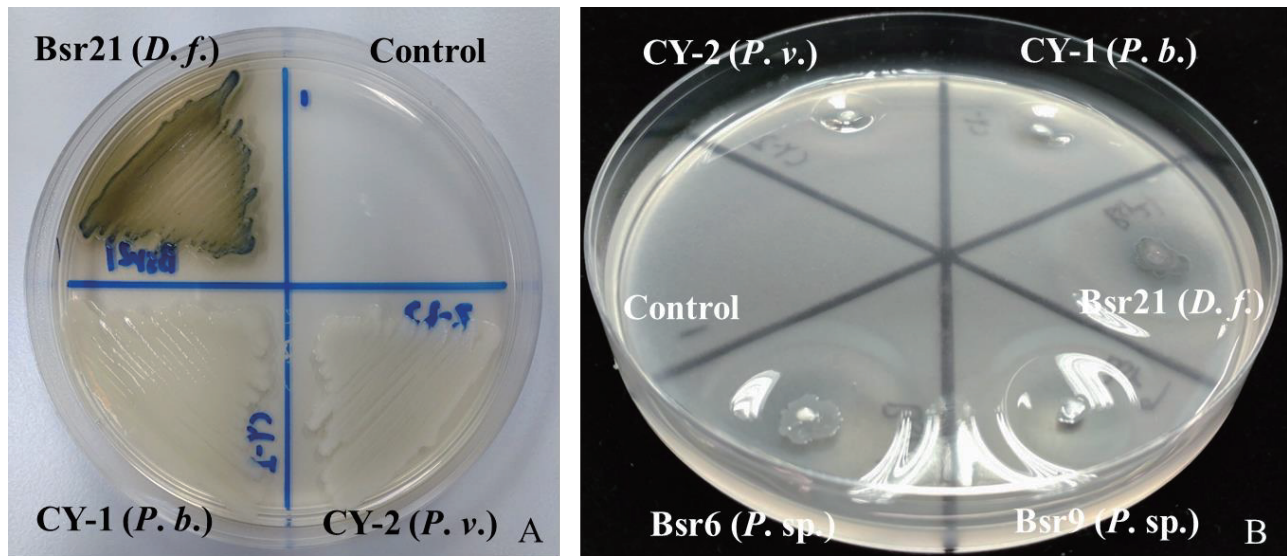
Fig. 3. Maceration potential of tested strains on potato tuber slices and onion scale leaves. After incubated at 30°C for 24 hrs., the sizes of macerated area were measured and recorded (two vertical diameters / 2). Means with the same letter were not significantly different ($p < 0.05$) by Fisher's least significant difference. The error bar represents standard error of mean on column marked with different lowercase letters indicate significant difference > 95%. *P.b.*: *P. brasiliense* ; *P.a.*: *P. aroidearum* ; *P.c.*: *P. colocasium* ; *P.v.*: *P. versatile* ; *P. sp.*: *Pectobacterium sp.* ; *D.f.*: *D. fangzhongdai* ; CK: sterile water.

險，故進出口檢疫上逐漸受到各國重視。因此，瞭解台灣植物細菌性軟腐病原之物種多樣性，顯得格外重要。故本研究之供試菌株來自1991至2021年台灣9處不同蔬菜產區所分離的11株軟腐細菌，除了根據16S rDNA基因序列進行供試菌株分析外，同時參照Portier等人 (2020) 之研究方法^(30, 31)，串聯 *dnaX*、*leuS*及*recA*等管家基因序列進行多位點序列分析，以瞭解11株供試菌株現今的分類地位。研究發現原來鑑定為*E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 的8株供試軟腐細菌分別歸類於現今的*P. aroidearum*、*P. brasiliense*、*P. colocasium*及兩群未知物種*Pectobacterium* spp.；原來鑑定為*E. chrysanthemi* (Ech) 之供試軟腐細菌歸類於*D. fangzhongdai*；而2021年分離的2株軟腐細菌分別為*P. brasiliense*及*P. versatile*。供試菌株中有4株為*P. brasiliense*菌株，佔比較高，與近年來國內學者發表的軟腐細菌不同，*Pectobacterium*屬主要為*P. aroidearum*^(7, 34, 43)，而在*Dickeya*方面，本研究由青蔥分離之菌株歸屬於*D. fangzhongdai*，與前人研究結果相符^(39, 44)。顯示台灣軟腐細菌存在物種多樣性，值得進一步關注。

本研究11株軟腐菌株之16S rDNA序列經BLASTn比對，有

8株供試菌株與對應的參考菌株序列相似度達100%，其他3株菌株則有99.6 - 99.9%。供試菌株ECC35與*P. colocasium* LJ1的16S rDNA序列相似度為99.9% (1351/1353)，在親緣樹上很明確地分配於同一演化支，並與*P. aroidearum*的親緣較近，符合Zhou等人 (2022) 對*P. colocasium*親緣關係的描述⁽⁴⁶⁾。供試菌株Bsr6及Bsr9之16S rDNA序列相同，並與*P. brasiliense* ZBC7的16S rDNA序列相似度為99.6% (1348/1353)，Bsr6及Bsr9菌株在親緣樹圖上，與*P. brasiliense*聚集在同一演化支，但與*P. brasiliense* ZBC7具有相對較高的遺傳距離(0.4%)。Nabhan等人 (2012) 表示使用16S rDNA序列分析無法很有效的區分*Pectobacterium carotovorum*等亞種，因在1,530個核苷酸序列中僅存在35個變異位點⁽²⁴⁾。Janda等人 (2007) 研究顯示16S rDNA序列的親緣分析對某些屬或物種之間的區分能力較差，如某些物種菌株間之16S rDNA序列相似度高於99%，但DNA-DNA雜合反應結果卻區分為不同物種，當不同物種之16S rDNA序列存在高相似度時，則需進一步鑑定確認⁽¹⁶⁾。

根據串聯*dnaX*、*leuS*及*recA*基因的多位點序列分析結果，菌株ECC3、ECC17、TSR25及CY-1等歸類於*P. brasiliense*，



圖四、供試菌株產生藍色色素及果膠分解酵素能力的測試結果。A、供試菌株培養於NGM培養基平板，於30°C經3天後的生長情形。B、供試菌株培養於CVP培養基平板，於30°C經1天後的生長情形。*P.b.*: *P. brasiliense*; *P.v.*: *P. versatile*; *P. sp.*: *Pectobacterium sp.*; *D.f.*: *D. fangzhongdai*; Control: sterile water。

Fig. 4. Results from the indigoidine production and pectolytic activity assays. A. Strains on NGM medium were incubated at 30°C for 3 days. B. Strains on CVP medium were incubated at 30°C for 1 day. *P.b.*: *P. brasiliense*; *P.v.*: *P. versatile*; *P. sp.*: *Pectobacterium sp.*; *D.f.*: *D. fangzhongdai*; Control: sterile water.

表六、供試菌株之藍色色素產生能力及果膠分解酵素產生能力

TABLE 6. The indigoidine production ability and pectolytic activity of the tested strains

Strain	Original species name/identity ¹	Species ²	Indigoidine production ³	Pectolytic activity ⁴
OR13	Ecc	<i>P. aroidearum</i>	-	+
ECC3	Ecc	<i>P. brasiliense</i>	-	+
ECC17	Ecc	<i>P. brasiliense</i>	-	+
TSR25	Ecc	<i>P. brasiliense</i>	-	+
CY-1	Pectolytic bacterium	<i>P. brasiliense</i>	-	+
ECC35	Ecc	<i>P. colocasium</i>	-	+
CY-2	Pectolytic bacterium	<i>P. versatile</i>	-	+
ECC7	Ecc	<i>P. sp.</i>	-	+
Bsr6	Ecc	<i>P. sp.</i>	-	+
Bsr9	Ecc	<i>P. sp.</i>	-	+
Bsr21	Ech	<i>D. fangzhongdai</i>	+	+

¹ Ecc: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; Ech: *Erwinia chrysanthemi*.

² *D.*: *Dickeya*; *P.*: *Pectobacterium*.

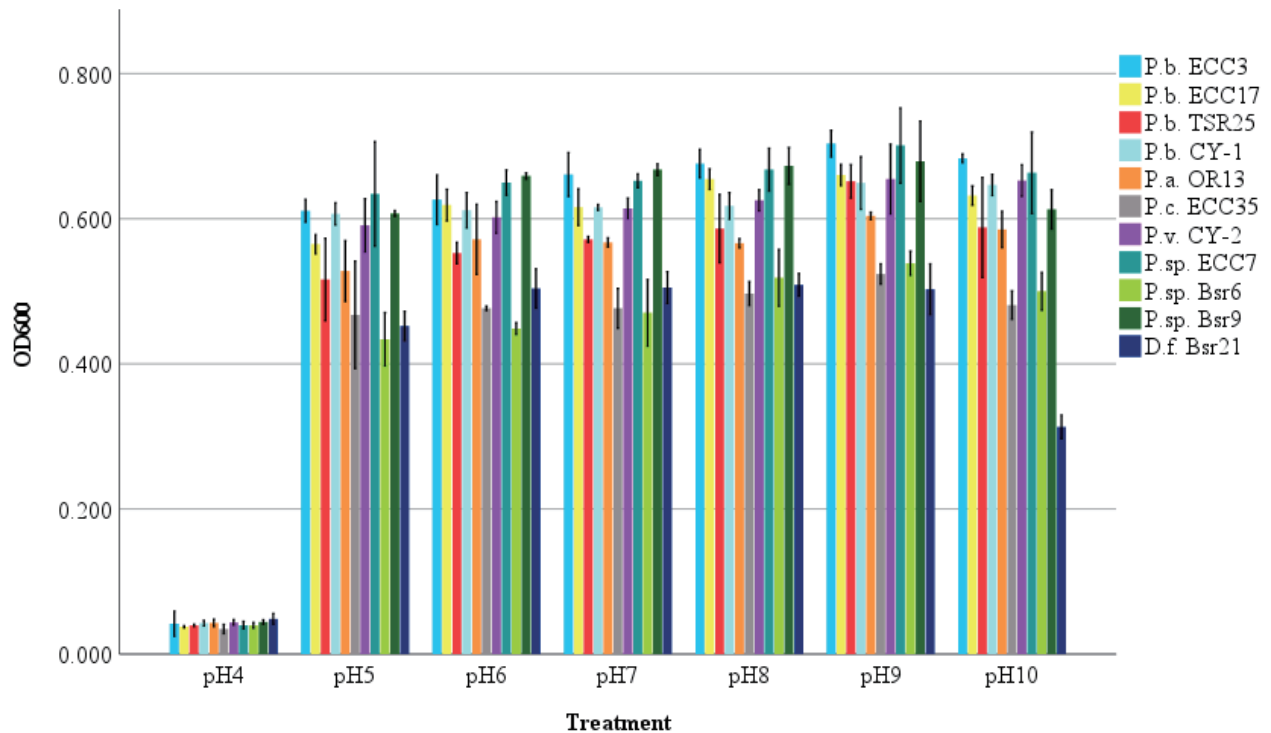
³ Indigoidine production ability is based on the blue pigment formed on NGM medium at 30°C for 3 days.

⁴ Pectolytic activity is according to the cavity formation on CVP medium at 30°C for 1 day.

而菌株OR13、ECC35、CY-2和Bsr21則分別歸類於*P. aroidearum*、*P. colocasium*、*P. versatile*和*D. fangzhongdai*等物種。供試ECC7菌株與*Pectobacterium sp.* PL152菌株形成獨立的

演化支，可能為一新物種。多位點序列分析顯示Bsr6及Bsr9菌株自成一演化支，屬於未知物種，亦可能為一新物種，需進一步探討。

供試軟腐細菌*P. brasiliense*菌株之寄主植物分別為十字花科甘藍、菊科結球萵苣及茄科番茄。根據Oulghazi等人(2021)的報告顯示，*P. brasiliense*可為害12科的寄主植物，其中亦包含茄科、十字花科及菊科等作物，但未記載結球萵苣⁽²⁸⁾。過往文獻指出*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*引起結球萵苣軟腐病^(10, 11, 17)，但根據*Pectobacterium*屬的物種分類，原歸類於*P. carotovorum*或*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*的物種已變更其分類地位^(31, 36)。分離自洋蔥罹病植株之*P. aroidearum* OR13菌株，符合Nabhan等人(2013)對*P. aroidearum*物種之描述，其寄主植物主要來自單子葉植物⁽²⁵⁾。*P. colocasium* ECC35菌株分離自芋頭罹病植株，與發表*P. colocasium*為新物種的Zhou等人(2022)所分離的寄主相同⁽⁴⁶⁾。菌株*P. versatile* CY-2則分離自超市採購的白菜植株。*P. versatile*為Portier等人(2019)在修訂*Pectobacterium*物種時所提出的新物種，此菌株分離自不同寄主植物，如馬鈴薯、韭蔥、菊苣、風信子、甘藍、菊花、仙客來、鸞尾及萵苣等，亦存在多處的河流中⁽³¹⁾。*P. versatile*是否普遍存在台灣田區，則有待後續進行調查。菌株*D. fangzhongdai* Bsr21分離自青蔥罹病植株。根據Wei等人(2021)研究顯示，40株Ech供試菌株中有32株屬於*D. fangzhongdai*，其中29株分離自蘭花，3株分離自青蔥⁽⁴⁴⁾。因此，*D. fangzhongdai*可能是蘭花及青蔥軟腐病的主要病原。



圖五、供試菌株於不同酸鹼環境下，培養於30°C經24小時之生長情形。誤差線表示95%的信賴區間。P.b.: *P. brasiliense* ; P.a.: *P. aroidearum* ; P.c.: *P. colocasium* ; P.v.: *P. versatile* ; P.sp.: *Pectobacterium* sp. ; D.f.: *D. fangzhongdai*。

Fig. 5. Growth of tested strains in nutrient broth adjusted to different pH values at 30°C for 24 hrs. The error bar represents 95% confidence intervals. P.b.: *P. brasiliense* ; P.a.: *P. aroidearum* ; P.c.: *P. colocasium* ; P.v.: *P. versatile* ; P.sp.: *Pectobacterium* sp. ; D.f.: *D. fangzhongdai*.

軟腐細菌的致腐能力測試結果，11株供試菌株對馬鈴薯組織切片皆可造成典型的軟腐浸漬徵狀。其中*P. brasiliense* CY-1菌株具有最強的致腐能力，但其他3株*P. brasiliense*菌株未表現相同的致腐能力，與De Werra等人(2021)的研究結果相似，不同*P. brasiliense*菌株間之致腐能力存在差異性⁽⁹⁾。對洋蔥的致腐能力測試顯示，4株*P. brasiliense*菌株對洋蔥皆無致腐能力。根據Oulghazi等人(2021)的報告顯示，*P. brasiliense*主要為害雙子葉植物，單子葉植物僅發現於香蕉假莖軟腐⁽²⁸⁾。而分離自洋蔥罹病植株的*P. aroidearum* OR13菌株，對洋蔥的致腐能力最強，與Nabhan等人(2013)的研究相似，*P. aroidearum*對單子葉植物的寄主具有較強毒力⁽²⁵⁾。近年來*P. aroidearum*在台灣引起海芋⁽⁷⁾、胡蘿蔔⁽³⁴⁾及黃金葛⁽⁴³⁾等植物軟腐病。根據Li等人(2022)研究指出分離自海芋的*P. aroidearum*菌株，其寄主範圍廣泛，包含單子葉及雙子葉植物，對胡蘿蔔、胡瓜、番茄、芋頭、洋蔥及蒜苗等作物具高毒力⁽²⁰⁾。因此，*P. aroidearum*未來在台灣可能會持續出現新的寄主植物。*P. colocasium* ECC35菌株對馬鈴薯的致腐能力較強，而*P. versatile* CY-2菌株則對洋蔥的致腐能力較強。菌株*Pectobacterium* sp. ECC7、Bsr6及Bsr9與*D. fangzhongdai* Bsr21皆可造成馬鈴薯及洋蔥組織軟腐。

供試的11株軟腐細菌在CVP培養基上可產生典型的深度凹陷特徵，具有產生果膠分解酵素能力，故CVP培養基可作

為快速檢測疑似軟腐細菌是否具有致腐能力之判斷依據^(3, 40)。測試藍色色素產生結果，僅*D. fangzhongdai* Bsr21菌株生長在NGM培養基上，其菌落會產生明顯的藍色色素，與Ech菌株會產生藍色色素的特性相符，而*Pectobacterium*屬菌株皆未產生藍色色素。故使用NGM培養基可初步區分出*Dickeya* spp.^(3, 19, 44)，但不是所有的*Dickeya*屬物種皆能產生大量的藍色色素⁽⁴⁴⁾，可能會影響對疑似細菌的判斷。軟腐細菌在不同酸鹼環境下的生長情形，11株供試菌株皆可在pH5至pH10的NB液態培養基生長，但在pH4難以生長，與Haque等人(2017)研究*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*菌株在pH4環境下無法生長之結果相似⁽¹²⁾。Wei等人的研究顯示*Dickeya*菌株在pH5至pH10的NA培養基皆可生長，在pH4則菌株之間具有差異性⁽⁴⁴⁾。而供試*D. fangzhongdai* Bsr21菌株可生長在pH10的NB液態培養基中，但其生長速度明顯較其他供試菌株緩慢。

近年分類學研究方法的演變，應用基因序列探討生物演化及物種歸類的分子系統分類學，已成為相關研究的主流，在軟腐細菌的分類研究方面，同樣受到廣泛使用。軟腐細菌的分類歷經多次變遷，除了重新定義物種地位之外，同時也發現許多新的物種。新興的分子生物技術已改變學者們對軟腐細菌的認知，且更明確地瞭解其物種分類階，藉由探討特定物種的寄主範圍、病害發生生態、地理分布及生物特性等資訊，並建

立適當的防治策略，以降低細菌性軟腐病所導致的經濟損失。因此，瞭解國內植物細菌性軟腐病的實際現況，將有助於提升未來在植物保護、抗病育種及進出口檢疫等相關產業的執行成效。

引用文獻

- 林靜宜、黃巧雯、楊宏仁、蔡佳欣、許淑麗、倪蕙芳。2016。由 *Dickeya zeae* 引起之水稻細菌性基腐病。台灣農業研究 65(2) : 207-217。
- 曾國欽、徐世典。2003。重要植物細菌性病害之診斷鑑定。植物重要防檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(二) : 95-115頁。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。
- 黃德昌、曾國欽、呂昀陞。2007。細菌性軟腐病之診斷與鑑定。植物重要防檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(六) : 109-116頁。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., and Gupta, R. S. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales' : proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(12):5575-5599.
- Burkholder, W. H. 1957. Genus VI. *Erwinia* Winslow *et al.* 1917. Pages 349-359 in: Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed. R. S. Breed, E. G. D. Murray, and N. R. Smith eds. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Charkowski, A. O. 2018. The changing face of bacterial soft-rot diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 56:269-288.
- Chen, L.-R., Lin, P.-R., and Huang, C.-J. 2020. First Report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot disease of white calla lily in Taiwan. Plant Dis. 104(2):563.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., Van Der Wolf, J. M., and Sledz, W. 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Ann. Appl. Biol. 166(1):18-38.
- De Werra, P., Debonneville, C., Kellenberger, I., and Dupuis, B. 2021. Pathogenicity and relative abundance of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in Switzerland: an epidemiological dichotomy. Microorganisms 9(11):2270. doi.org/10.3390/microorganisms9112270.
- Felix, K. C. D. S., Oliveira, W. J. D., Mariano, R. D. L. R., and Souza, E. B. D. 2014. Lettuce genotype resistance to soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Sci. Agric. 71:287-291.
- Hamarash, A. M. 2020. Influence of planting spaces on growth, yield and bacterial soft rot infection of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Diyala Agric. Sci. J. 12(1):79-89.
- Haque, M. M., Oliver, M. M. H., Nahar, K., Alam, M. Z., Hirata, H., and Tsuyumu, S. 2017. CytR homolog of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* controls air-liquid biofilm formation by regulating multiple genes involved in cellulose production, c-di-GMP signaling, motility, and type III secretion system in response to nutritional and environmental signals. Front. Microbiol. 8:972. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00972.
- Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst. Appl. Microbiol. 21(3):384-397.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C., Briolay, J., and Pritchard, L. 2021. Proposal for the creation of a new genus *Musicola* gen. nov., reclassification of *Dickeya paradisiaca* (Samson *et al.* 2005) as *Musicola paradisiaca* comb. nov. and description of a new species *Musicola keenii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71(10):005037. doi.org/10.1099/ijsem.0.005037.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Van Gijsegem, F. 2021. Diversity within the *Dickeya zeae* complex, identification of *Dickeya zeae* and *Dickeya oryzae* members, proposal of the novel species *Dickeya parazeae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71(11):005059. doi.org/10.1099/ijsem.0.005059.
- Janda, J. M. and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J. Clin. Microbiol. 45(9):2761-2764.
- Jetiyanon, K. and Plianbangchang, P. 2013. Lipopolysaccharide of *Enterobacter asburiae* strain RS83: a bacterial determinant for induction of early defensive enzymes in *Lactuca sativa* against soft rot disease. Biol. Control 67(3):301-307.
- Kado, C. H. and Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60(6): 967-976.
- Lee, Y.-A. and Yu, C.-P. 2006. A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. J. Microbiol. Methods. 64(2):200-206.
- Li, L., Yuan, L., Zhao, Y., Shi, Y., Chai, A., Xie, X., and Li, B. 2022. Emergence of bacterial soft rot in calla lily caused by *Pectobacterium aroidearum* in China. Crop Prot. 152:105854.

- doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105854.
21. Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., and Charkowski, A. O. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97(9):1150-1163.
 22. Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M. A., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., and Toth, I. A. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13(6):614-629.
 23. Moussa, H. B., Pédrón, J., Bertrand, C., Hecquet, A., and Barny, M. A. 2021. *Pectobacterium quasiquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71(10):005042. doi.org/10.1099/ijsem.0.005042.
 24. Nabhan, S., De Boer, S. H., Maiss, E., and Wydra, K. 2012. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *J. Appl. Microbiol.* 113(4):904-913.
 25. Nabhan, S., De Boer, S. H., Maiss, E., and Wydra, K. 2013. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(7):2520-2525.
 26. Noaman V. and Bastani D. 2016. Molecular study on infection rates of *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale* in sheep and cattle in West-Azerbaijan province, Iran. *Vet. Res. Forum.* 7(2):163-167.
 27. Oskiera, M., Kałużna, M., Kowalska, B., and Smolińska, U. 2017. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* on cabbage and Chinese cabbage: identification, characterization and taxonomic relatedness of bacterial soft rot causal agents. *J. Plant Pathol.* 99(1):149-160.
 28. Oulghazi, S., Sarfraz, S., Zaczek-Moczydłowska, M. A., Khayi, S., Ed-Dra, A., Lekbach, Y., Campbell, K., Moleleki, L. N., O'Hanlon, R., and Faure, D. 2021. *Pectobacterium brasiliense*: genomics, host range and disease management. *Microorganisms* 9(1):106. doi.org/10.3390/microorganisms9010106.
 29. Pérombelon, M. C. M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 51(1):1-12.
 30. Portier, P., Pédrón, J., Taghouti, G., Dutrieux, C., and Barny, M. A. 2020. Updated taxonomy of *Pectobacterium* genus in the CIRM-CFBP bacterial collection: when newly described species reveal old endemic population. *Microorganisms.* 8(9):1441. doi.org/10.3390/microorganisms8091441.
 31. Portier, P., Pédrón, J., Taghouti, G., Fischer-Le Saux, M., Caullireau, E., Bertrand, C., Laurent, A., Chawki, K., Oulghazi, S., Moumni, M., Andrivon, D., Dutrieux, C., Faure, D., Hélias, V., and Barny, M. A. 2019. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69(10):3207-3216.
 32. Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(4):1415-1427.
 33. Sławiak, M., van Beckhoven, J. R., Speksnijder, A. G., Czajkowski, R., Grabe, G., and van der Wolf, J. M. 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 125(2):245-261.
 34. Tang, W.-Q., Chang, C.-Y., Lee, Y.-J., and Chu, C.-C. 2021. First report of *Pectobacterium aroidearum* causing bacterial soft rot of carrot in Taiwan. *Plant Dis.* 105(3):695.
 35. Toth, I. K., Barny, M. A., Brurberg, M. B., Condemine, G., Czajkowski, R., Elphinstone, J. G., Helias, V., Johnson, S. B., Moleleki, L. N., Pirhonen, M., Rossmann, S., Tsrör, L., van der Waals, J. M., van der Wolf, J. M., Gijsegem, F. V., and Yedidia, I. 2021. *Pectobacterium* and *Dickeya*: environment to disease development. Pages 39-84 in: F. van Gijsegem, J. M. van der Wolf, and I. K. Toth, eds. *Plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium* species. Springer, Cham, Switzerland.
 36. Toth, I. K., Barny, M. A., Czajkowski, R., Elphinstone, J. G., Li, X. S., Pédrón, J., Pirhonen, M., and Gijsegem, F. V. 2021. *Pectobacterium* and *Dickeya*: taxonomy and evolution. Pages 13-37 in: *Plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium* species. F. van Gijsegem, J. M. van der Wolf, and I. K. Toth, eds. Springer, Cham, Switzerland.
 37. Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., and Birch, P. R. 2003. Soft rot erwinias: from genes to genomes. *Mol. Plant Pathol.* 4(1):17-30.
 38. Toth, I. K. and Birch, P. R. 2005. Rotting softly and stealthily.

32 J. Plant Med.

Curr. Opin. Plant Biol. 8(4):424-429.

39. Tsai, W.-A., Lin, P.-R., and Huang, C.-J. 2019. First report of *Dickeya fangzhongdai* causing soft rot disease of welsh onion in Taiwan. J. Plant Pathol. 101(3):797-798.
40. Van der Wolf, J. M., Cahill, G., Gijsegem, F. V., Helias, V., Humphris, S., Li, X. S., Lojkowska, E., and Pritchard, L. 2021. Isolation, detection and characterization of *Pectobacterium* and *Dickeya* species. Pages 149-173 in: Plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* species. F. van Gijsegem, J. M. van der Wolf, and I. K. Toth, eds. Springer, Cham, Switzerland.
41. Van Gijsegem, F., Toth, I. K., and van der Wolf, J. M. 2021. Soft rot Pectobacteriaceae: a brief overview. Pages 1-11 in: Plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* species. F. van Gijsegem, J. M. van der Wolf, and I. K. Toth, eds. Springer, Cham, Switzerland.
42. Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A. J., and Łojkowska, E. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. Microbiology. 148(2):583-595.
43. Wang, L.-H., Tang, W.-Q., Chan, J.-J., Lee, Y.-J., Chang, C.-Y., Fang, Z.-Q., and Chu, C.-C. 2022. First report of bacterial soft rot on *Epipremnum aureum* caused by *Pectobacterium aroidearum* in Taiwan. Plant Dis. doi.org/10.1094/PDIS-03-22-0578-PDN.
44. Wei, X.-Y., Deng, W.-L., and Chu, C.-C. 2021. Phylogenetic and phenotypic analyses on *Dickeya* spp. isolated from different host plants in Taiwan. J. Phytopathol. 169:678-691.
45. Wu, Y.-M., Wang, L.-H., and Chu, C.-C. 2022. First report of *Dickeya dadantii* causing bacterial soft rot of *Thaumatococcus danianus* in Taiwan. Plant Dis. doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0924-PDN.
46. Zhou, J., Hu, M., Hu, A., Li, C., Ren, X., Tao, M., Xue, Y., Chen, S., Tang, C., Xu, Y., Zhang, L., and Zhou, X. 2022. Isolation and genome analysis of *Pectobacterium colocasium* sp. nov. and *Pectobacterium aroidearum*, two new pathogens of taro. Front. Plant Sci. 13:852750. doi.org/10.3389/fpls.2022.852750.

Sinhua, Tainan)

*Corresponding author, E-mail: chih-hung.lin@mail.ncyu.edu.tw

Soft rot bacteria of the genera *Pectobacterium* and *Dickeya* are important pathogens that cause the soft rot diseases in plants. They can infect a variety of economic crops and cause severe losses. Soft rot bacteria were originally classified to the genus *Erwinia*. With the progress of molecular taxonomy, their taxonomic status has been revised and new species continue to be discovered. Thus, it is necessary to understand the soft rot bacteria in Taiwan again. Based on 16S rDNA, *dnaX*, *leuS* and *recA* gene sequences, we analyzed the phylogenetic placement 9 strains of the original *Erwinia* genus and 2 unknown strains of soft rot bacteria of vegetables. Results showed that the original *E. carotovora* subsp. *carotovora* strains were classified as *P. aroidearum*, *P. brasiliense*, *P. colocasium*, and *Pectobacterium* spp. and the original *E. chrysanthemi* strain was identified as *D. fangzhongdai*. The unknown strains were *P. brasiliense* and *P. versatile*. Almost all tested strains were able to induce soft rot symptoms on potato and onion. Only strains belonging to *P. brasiliense* did not induce symptoms on onion. There were significant differences among the symptom severities caused by different strains. All tested strains can produce pectolytic enzymes, but only the *D. fangzhongdai* strain can produce blue pigment. Tested strains were able to grow in nutrient broth adjusted to pH5 to pH10, but not in those adjusted to pH4. There were significant different among the OD₆₀₀ values of different strains. This study revealed the species diversity of soft rot bacteria causing vegetable diseases in Taiwan. The results will help to understand the current status of bacterial soft rot in Taiwan.

Keywords: Soft rot bacteria, *Pectobacterium*, *Dickeya*, Species diversity, phylogenetic tree

ABSTRACT

Kao, C.-W.¹, Wu, Y.-F.², and Lin, C.-H.^{1*} 2023. Species diversity of bacterial soft rot pathogens of vegetables in Taiwan. J. Plant Med. Plant. 65(1): 21-32.

¹Department of Plant Medicine, National Chiayi University, Chiayi;

²Tainan District Agricultural Research and Extension Station, COA,