

細菌性軟腐病之診斷與鑑定

黃德昌¹、曾國欽²、呂昀陞^{2,3}

¹ 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局台中分局

² 國立中興大學植物病理學系

³ 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

¹ 電子郵件：tch1@mail.tcbaphiq.gov.tw；傳真：04-22850136

摘要

細菌性軟腐病為台灣重要之細菌性病害，在溫暖潮溼之多雨季節常可造成田間蔬菜與花卉作物之嚴重損失。在台灣 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (原 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 與 *Pectobacterium chrysanthemi* (原 *E. chrysanthemi*) 為造成軟腐病害之主要病原細菌。本病最初之病徵係在被害部位出現水浸狀小斑點，氣候適宜則病組織可迅速擴大而腐爛崩解。細菌性軟腐病可藉由田間病徵進行初步診斷，或進一步分離病原細菌，再以生理生化及病原性測試進行鑑定。此外亦可應用 polymerase chain reaction (PCR) 技術、血清技術與 Biolog 系統等進行快速鑑定。細菌性軟腐病目前尚無有效之化學藥劑可供防治，使用健康種苗及注意田間衛生與適當之田間栽培管理為防範細菌性軟腐病發生之重要策略。

關鍵詞：*Pectobacterium*、細菌性軟腐病、病原細菌、診斷鑑定

Diagnosis and identification of bacterial soft rot disease

Huang, D.C.,¹ Tzeng, K. C.,² Leu, Y. S.^{2,3}

¹ Taichung Branch of Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan, R.O.C.

²Department of plant pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

³ Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Council of agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.

¹E-Mail: tch1@mail.tcbaphiq.gov.tw; Fax: 04-22850136

Abstract

Bacterial soft rot is an important bacterial disease in Taiwan. It often causes a great loss of vegetable and ornamental crops in the fields, especially when the growing season is wet and warm. In Taiwan, most of these bacterial soft rot diseases are mainly caused by strains of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (formerly *Erwina carotovora* subsp. *carotovora*) and *Pectobacterium chrysanthemi* (formerly *E. chrysanthemi*). The initial symptoms on the affected tissues caused by *Pectobacterium* spp. are small water-soaked lesions. When the environmental conditions favor the diseases development, the lesions enlarge rapidly and the affected tissues finally become soft rot, slimy and collapse. In the fields, presumptive diagnosis of bacterial soft rot diseases can be based on symptoms. To confirm the causal agent, the pathogen needs to be isolated and tested for their pathogenicity and other physiological and biochemical characteristics. There are several rapid techniques including polymerase chain reaction (PCR), serological techniques, and Biolog identification system, have been developed to identify or detect soft rot bacteria. No chemical agent is effective for controlling of bacterial soft rot diseases, planting of pathogen-free seeds, tubers or seedlings and implementation of appropriate field sanitation and cultural practices are the

important strategies to manage the diseases.

Key words: *Pectobacterium*, bacterial soft rot, plant pathogenic bacteria, diagnosis and identification

緒言

Pectobacterium (*Erwinia*)屬植物病原細菌可引起蔬菜、花卉、糧食及特用作物等之軟腐病害。*Pectobacterium* 軟腐細菌具有周生鞭毛，具游動性與趨化性，可逃離或避開不良環境，到達有利於存活或感染寄主組織之位置，並有助於其對寄主組織之致腐能力；為兼性嫌氧菌，可在無氧環境下生長，因而增加其與其他微生物在自然環境中競爭之能力；常藉由傷口侵入寄主之幼嫩組織或貯藏器官；可產生果膠分解酵素，能分解植物細胞壁與中膠層中之果膠物質，因而造成植物組織之軟化與崩解。本病之病徵在被害部位開始時會出現變色水浸狀小點，後迅速擴大腐爛軟化成污泥狀；*Pectobacterium* spp. 引起之病徵主要為軟腐，然有些則可造成黑腳(black-leg)、維管束壞疽(vascular necrosis)、萎凋(wilting)或矮化(stunting)等病徵。軟腐細菌主要藉由傷口入侵，若植物組織表面具有水膜則有利軟腐細菌之感染。軟腐細菌可低量殘存於土壤根圈中，在田間植株殘體與低溫皆可延長病原菌存活之時間。

分類地位

Pectobacterium 軟腐細菌，為革蘭氏陰性菌屬腸內菌科，分類地位如下：

Proteobacteria

γ-proteobacteria

Enterobacteriales

Enterobacteriaceae

Pectobacterium

Pectobacterium 軟腐細菌原屬於 *Erwinia*，主要含有 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*、*E. c.* subsp. *betavasculorum*、*E. c.* subsp. *carotovora*、*E. c.* subsp. *odorifera*、*E. c.* subsp. *wasabiae* 等五個亞種與 *E. cacticida*、*E. chrysanthemi* 及 *E. cypripedii* 等三個種，而近年來由於分子生物技術發達與親源分析技術的進步，使 *Pectobacterium* 軟腐細菌在分類上有重大之改變，如 Hauben 等人(1998)利用 16S rDNA 之序列分析將原屬於 *Erwinia* 屬之軟腐細菌，重新歸類於 *Pectobacterium* 屬中，分別為 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*、*P. c.* subsp. *betavasculorum*、*P. c.* subsp. *carotovorum*、*P. c.* subsp. *odoriferum*、*P. c.* subsp. *wasabiae* 等五個亞種與 *P. cacticidum*、*P. chrysanthemi* 及 *P. cypripedii* 等三個種；Gardan 等人(2003)進一步依據 16S rDNA 核酸序列分析與 DNA-DNA 雜合反應之結果，再將 *Pectobacterium carotovorum* 中三個亞種提升至種的地位，分別為 *Pectobacterium atrosepticum*、*Pectobacterium betavasculorum* 與 *Pectobacterium wasabiae*，此外 Samson 等人(2005)依據 DNA-DNA 雜合反應、16S rDNA 序列、血清特性及表現型之數值分析等資料，再將 *P. chrysanthemi* 歸類於新屬 *Dickeya* 中。本文以現階段使用較多之 *Pectobacterium* 進行說明。

細菌性軟腐病之診斷

在台灣常見之作物細菌性軟腐病主要是由 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)與 *Pectobacterium chrysanthemi* (Pch)所引起，其中 Pcc 最適生長溫度為 28-30°C，普遍存在於各地，寄主範圍廣泛，可引起大部分蔬菜之軟腐。Pch 可在較高溫度下生長，其最適生長溫度為 34-37°C，可引起特殊作物(如蝴蝶蘭、青蔥、玉米)之軟腐萎凋等。環境因素為影響軟腐病發生之重要因子，田間土壤溼度與溫度為決定病害的發生與病徵的呈現之重要關鍵，Pcc 之適合發病溫度為 20°C 至 30°C，在高溫環境(25 至 35°C 時)則 Pch 較易發生；在潮濕的環境下，高濕的土壤可使皮孔保持張開，因而提供細菌

侵入之管道，此外潮濕之環境則適合病原菌在土中之散播。病原菌感染主要係藉由收穫時造成之傷口或由線蟲、昆蟲或真菌所造成的傷口侵入，因此不當之採收動作與生理不適，如霜害、過熱與生長裂縫等造成之傷口，皆有利於軟腐病菌之侵入。茲將數種常見作物之軟腐病病徵簡述如下，以期藉由正確認識作物實際受害之病徵，來有效診斷細菌性軟腐病。

葉菜類蔬菜細菌性軟腐病

軟腐病菌在葉菜類蔬菜作物上所造成之病徵類似，受影響之部位主要包括葉基部及莖基部等組織，初期在組織上出現水浸狀的小斑點，當環境適合時，病斑會快速進展並加深加寬，最後病組織開始軟化，進而軟腐，流出黏液並發出惡臭。在空氣潮濕之環境下，植物組織可在3~5天內完全腐爛。當溫度過高，潮濕土壤、氮肥過多時較易發生。尤其在豪雨過後，天氣濕熱時可在幾天內，造成非常嚴重的損失。平地發生比高冷地嚴重。常見者如結球白菜軟腐病(Pcc引起)、甘藍軟腐病(Pcc引起)、青蔥軟腐病(Pch或Pcc引起)、芹菜軟腐病(Pcc或Pch引起)等。

根莖類蔬菜細菌性軟腐病

根莖類蔬菜軟腐病係指如：馬鈴薯軟腐病(Pcc或Pch引起)、蘿蔔軟腐病(Pcc或Pch引起)、胡蘿蔔軟腐病(Pcc或Pch引起)、芋頭軟腐病(Pcc引起)等，此類病害病徵常出現在近地基之莖部，初期亦呈水浸狀，然後軟腐、褐化、枯萎，導致整株植物矮化、萎凋、死亡。以下將分別介紹其病徵及其發生概況：

馬鈴薯細菌性軟腐病：此病為世界各國馬鈴薯產地之重要細菌病害，本病可在馬鈴薯各時期發生，主要可影響地下部之塊莖造成薯塊之腐爛(tuber rot)與地上部之植株造成莖腐(stem rot)之病徵，薯塊上之軟腐病徵包括輕微的維管束褐變到完全腐爛之情形，病原菌最初是藉由薯塊表面之皮孔、傷口或是匍匐莖枝接觸點進行感染，受感染之組織會呈現奶油色至棕褐色之情形，在腐爛組織之邊緣可見褐色至黑色之色素出現，在莖腐之病徵初期係出現在近地基部之組織上，在氣候潮濕之情形下會呈現水浸狀之病徵，但當天氣轉乾燥時，罹病組織則呈現乾枯，受感染之部位會出現黑色到輕微褐色之情形，

當氣候溫暖潮濕時，病勢進展快速，罹病部位會快速腐爛，因而導致植株導伏，但若病勢發展期間氣溫突然降低(10-15°C)，使得病原菌生長受阻，罹病部位則會出現黑色乾枯之病徵，此情形又稱為黑腳(black leg)，可造成此病害之病原菌包括 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*(Pca)、*P. c.* subsp. *carotovorum*、*P. chrysanthemi*，其中以 Pcc 影響範圍最為廣泛，在世界各地之栽培田皆可發現此病原菌，而 Pca 主要係發生在溫帶地區，Pch 則常見於亞熱帶到溫帶地區。此病害除在田間發生外，當倉儲環境不良時亦會發生，並造成嚴重之損失。在田間若有其他病害如 *Fusarium dry rot* 與晚疫病(late blight)之存在，或是薯塊鈣含量過低之情形皆會助長細菌性軟腐病之發生。此病害之管理主要仍是以栽植耐病之健康種苗為主，並注意水份管理，在肥料施用上，要注意氮肥與鈣肥施用之比例，以低氮肥高鈣肥之情形較不易感病。

蘿蔔細菌性軟腐病：該病被害初期病徵會出現在近地基之莖部，根冠污白色，呈水浸狀，葉柄如熱水燙過般軟化、褐化、枯萎，病狀嚴重時，中心部腐敗軟化消失成空洞，並發出惡臭，葉片也會軟化腐敗。當氣候不適合發病時，病狀有時會轉弱，並自根冠發出畸形新葉。本病與氣候關係密切，溫暖環境較易發生，又低窪排水不良之濕地病害較多，高旱地則少。氮肥與含水量過多之作物發病較嚴重，在台灣蘿蔔細菌性軟腐病可由 Pcc 或 Pch 引起。

芋頭細菌性軟腐病：軟腐細菌主要棲息於土壤中或病組織殘體，日照或乾燥可降低其密度，病菌主要藉由傷口侵入塊根，如蟲孔、機械傷口、生長時產生之小裂口或除蘖芽之傷口等，病害於高溫、高濕度較易發生。病徵最初在組織上出現水浸狀的小斑點，然後被害組織加深、加大，進而軟腐，並產生惡臭，造成植株地上部生長停滯，葉部常呈黃化萎凋病徵。

胡蘿蔔細菌性軟腐病：本病主要危害根部，因而導致地上部葉片變黃萎凋，根部出現凹陷褐色溼性病斑，組織軟化，內部組織崩解，軟化腐爛，並有惡臭產生。收穫期發生多，貯藏期亦有發生。

蔬果作物細菌性軟腐病

蔬果作物如：番茄、甜瓜等作物，在此以常見之番茄細菌性軟腐病作為例子進行

說明。

番茄主要受軟腐病菌侵害部位為莖部及果實，當莖部被侵害時，髓部會腐敗消失成空洞狀，並會發出惡臭，有時會發生縱裂並於該處倒伏、枯死，病徵易與青枯病混淆，但可藉由橫切維管束進行診斷，當被害莖橫斷面可見髓部腐敗現象時，則係受軟腐細菌所感染導致，而青枯病菌感染時，主要可造成維管束褐變之病徵。在果實上之病徵，外皮變成半透明薄層，果肉腐敗軟化、發惡臭、變色，幼果較易被侵害。

花卉作物細菌性軟腐病

我國當前許多重要之切花作物如彩色海芋(Pcc 或 Pch)、菊花與向日葵等皆受軟腐病之影響，導致此些花卉之產量降低，品質下滑，以下將針對此些常見之花卉細菌性軟腐病進行介紹。

彩色海芋細菌性軟腐：本病害主要影響部位為地際部之莖與塊根，此病原菌可殘存於土壤或藉由種球帶菌進入田間，當大雨過後或灌溉不當排水不良環境下，軟腐病害會迅速發生，受害部位會開始產生水浸狀軟腐病徵，最後植株倒伏死亡，當天氣不適合病害發生，有時會出現葉片黃化之病徵，則此時塊根與莖部已受到感染，等到氣候適宜，則植株快速死亡，為當前彩色海芋生產時之重要病害。

菊花扦插苗細菌性軟腐病：本病害近年來常見於菊花扦插苗之繁殖場，病害最初由菊花扦插苗之莖基部傷口入侵，沿莖內髓部組織向上蔓延，造成髓部組織腐爛；有時髓部組織腐爛後，會向莖之外部組織蔓延，並導致扦插苗基部腐爛，最後整個菊苗萎凋倒伏；若腐爛僅局限於髓部而未向外蔓延，且病勢幾天後即不再進展，軟腐之髓部組織最後會變乾，形成中空褐化之莖部，然植株外表無任何病徵，且莖基部仍可長根，農民俗稱為「空心苗」，此類菊花苗種植於田間，於生長過程中易由莖部中空處折斷。菊花細菌性軟腐病罹病植株以分散方式分布於苗床間，且本病一年四季都會發生，但主要發生於下雨過後，嚴重時會造成幼苗的大量死亡或生產出大批的「空心苗」，因而造成苗的供應不足與菊苗品質的降低。

向日葵細菌性軟腐病：本病害因其可造成向日葵植株軸心中空及腐爛，進而引起植株萎凋枯死，因此又稱為向日葵細菌性軸腐病(stalk rot)，*Pectobacterium carotovorum*

subsp. *carotovorum* 與 *P. chrysanthemi* 皆可引起本病害，但在台灣以 *P. chrysanthemi* 為主，此病在田間之病徵最初為植株葉片現失水、萎凋之情形，而後葉片與葉柄出褐化、乾枯之病徵，但莖仍直立於田間，類似於青枯病危害之病徵，但將莖部切開後，可見莖部已呈中空且具水浸狀腐爛，嚴重時植株則會倒伏死亡。

蘭花細菌性軟腐病(Pcc 或 Pch 引起):此病害之病徵主要之感染源為種苗或污染之介質，其所造成之病徵出現於假球莖或新形成之側枝近地基部，初呈褐色水浸狀斑點或斑塊，後逐漸蔓延至其他新側枝，溼度適合時，植物組織會出現軟腐之現象，並常導致心芽脫落，有時並會蔓延至成熟之假球莖，常見之病害如：虎頭蘭細菌性軟腐病與文心蘭細菌性軟腐病；而近年常發生於各蝴蝶蘭栽培園之蝴蝶蘭軟腐病，其病菌可感染各齡期葉片的不同部位，花梗或花瓣也會受害。葉片受感染後，首先出現水浸狀斑點，隨即迅速擴大，造成組織軟腐。在高溫時期病勢發展極快，三至五天內及可使整葉腐爛，老葉、新葉均會受害，葉基部或心葉遭受感染後，常在數天內導致整株死亡。

細菌性軟腐病菌之鑑定

細菌性軟腐病菌之鑑定可藉由田間病徵進行初步之推測診斷，再將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害，再利用 NA 培養基進行分離純化，在 30°C 培養約 24 小時後，自其中挑取半透明、圓形之菌落，進一步利用 CVP 培養基(1 N NaOH, 4.5 ml; 10% CaCl₂·2H₂O, 3.0 ml; NaNO₃, 1.0 g; Agar, 1.5 g; sodium polypectate, 10.0 g; 0.075% crystal violet, 1.0 ml; DW, 500 ml) 測試其是否具有果膠分解酵素，必要時可再進行相關之生理生化及病原性測試以進行確認診斷(Schaad, et al., 2001)。此外也可利用引子對

5A (5'-GCGGTTGTTCCACCAGGTGTTTT-3')、

5B (5'-ATGGCACGCTACCTGGAAGTAT-3')、

Y1 (5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3')、

Y2 (5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3')

運用 PCR 技術針對罹病組織進行偵測鑑定，其中引子對 5A/5B 可針對 *P. chrysanthemi*

增幅出 500 bp 之 DNA 片段，引子對 Y1/Y2 可針對 *Pectobacterium carotovorum* 增幅出 434 bp 之 DNA 片段。其它鑑定方式如血清技術與 Biolog 快速鑑定系統等則皆可用來快速鑑定 *Pectobacterium* 軟腐細菌之用。此外由於 *P. chrysanthemi* 具有可產生藍色素之特性，因此還可應用 NGM 培養基來進行藍色素產生測試，以辨識菌株是否為 *P. chrysanthemi* (Lee & Yu, 2006)。

結語

軟腐細菌廣泛存在於世界各地，其中 Pcc 曾自土壤、多種作物與雜草之根圈、地下水、雨水、雪、空氣、昆蟲等中分離到，並可在濕冷的環境下於土中長時間殘存，病原菌可在溫暖乾燥的環境短距離傳播，在土中的殘存時間久一般認為與氣溫有關，但土壤溼度與拮抗菌的族群也扮演重要的角色。

軟腐病菌目前尚無有效之化學藥劑可供防治，現行之防治策略主要仍以田間栽培管理為最有效之方式，其中健康種苗制度為杜絕軟腐病菌發生之重要關鍵，在田間之管理首重水分管理，避免淹水與噴灌，以減少病原菌在田間散播，降低病害之發生機會，在肥培管理部份，則需注意氮肥之施用與增加鈣肥之用量，以增加植株對軟腐病菌之抗性，最後在收穫與倉儲之管理則以有效控制環境之溫濕度為減少病害發生之重要課題。

主要參考文獻

1. 曾國欽、李一芸、林祖盛、徐世典。1999。台灣彩色海芋細菌性軟腐病之研究。國際球根花卉產業研討會專刊 45-52 頁。台灣省農林廳種苗改良繁殖場編印。
2. 朱木貴。1995。*Erwinia chrysanthemi* 之遺傳差異性、藍色基因選殖及 PCR 偵測。國立中興大學植物病理學系博士論文。
3. 徐世典、張東柱、張清安、蔡進來、蔡東纂。2002。台灣植物病害名彙。中華民國

- 植物病理學會 出版。台中。386 頁
4. 黃冲昌。2001。軟腐病。洋蘭保護。植物保護圖件系列之六。第 44-50 頁。張弘毅、方尚仁、歐陽瑋 編。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局編印。台北。
 5. 黃冲昌。2003。台灣作物細菌性病害防治現況與檢討。重要防疫檢疫植物病原細菌綜合管理研討會專刊。第 91-110 頁。黃秀珍、曾國欽、林元春 編。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局暨國立中興大學植物病理學系編印。台中。
 6. 曾國欽。2003。植物細菌病害診斷鑑定技術。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(二)。第 91-110 頁。黃振文、蔡東纂、曾國欽、詹富智 編。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局暨國立中興大學植物病理學系編印。台中。
 7. 曾國欽。1993。蔬菜細菌性軟腐病。蔬菜保護研討會專刊。第 231-240 頁。中華植物保護學會出版。
 8. 許秀惠、吳俊瑋、宋秉峰、林俊義。2004。向日葵細菌性軸腐病之特性、品種抗性與藥劑篩選。植保會刊 46: 367-378
 9. 劉興隆、徐世典、曾國欽。2002。菊花扦插苗細菌性軟腐病之病原特性及影響病害發生之因子。植病會刊 11: 157~164
 10. Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., Bertheau, Y., 1994. PCR and restriction fragment-length-polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1437-1443.
 11. Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 381-391.
 12. Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenacker, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:384-397.
 13. Hauben, L., Van Gijsegem, F., and Swings, J. 2005. Genus XXIV. *Pectobacterium* Waldee 1945, 469^{AL} emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck and

- Swings 1999a, 1, pages 721-730 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. Vol Two, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley J. T. eds Springer Science+Business Media, Inc., NY., USA.
14. 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: 200-206.
 15. Schaad N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS press, The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 373pp.
 16. Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Saux, M. F., 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. and *Dickeya zae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 55:1415-1427.