

橫山梨果腐病之病因及病原菌 藥劑感受性測定

許秀惠^{1*} 林俊義¹ 黃毓斌² 方尚仁³ 安寶貞¹

1. 行政院農委會農業試驗所 植物病理系
2. 行政院農委會農業試驗所 應用動物系
3. 行政院農委會動植物防疫檢疫局植物防疫組

(接受日期：中華民國 90 年 9 月 1 日)

摘 要

許秀惠、林俊義、黃毓斌、方尚仁、安寶貞 2001 橫山梨果腐病之病因及病原菌藥劑感受性測定 植保會刊 43：105-115

於 1998 年 6 月間在南投縣中寮鄉種植之橫山梨發現果實腐爛問題，經柯霍氏法則確認該病原為細菌，隔年（1999）於新竹栽培之橫山梨亦發現相同病害。此病害主要危害果實，在枝條及葉片上不引起病徵，果實初期病徵僅在表皮上出現淡褐色水浸狀小斑點，病斑繼續擴展造成內部果肉腐爛，輕壓表皮具彈性，嚴重時整個果實腐爛，並有乳白色汁液與氣泡湧出。從罹病果實上分離之細菌，經生理生化測定，Biolog 鑑定系統，專一性引子對 PCR 分析等方法，鑑定該病原細菌為 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*。將此病定名為果腐病。以蟲針沾細菌懸浮液刺傷果實及浸菌無傷口接種等方法接種橫山梨果實，發現僅傷口處理者出現病徵，且病徵擴展迅速，病斑直徑可達 1.2 cm/day，該病菌也感染新興梨，在馬鈴薯、胡蘿蔔及洋蔥等組織上具有致腐能力，且可造成煙草植株腐爛。果實蠅媒介試驗顯示在有果實蠅成蟲之蟲箱內，不論以病菌處理果實蠅取食之洋菜膠或以病菌直接覆於果實上，供試之橫山梨及新興梨果實均出現典型果腐病徵。另外，讓果實蠅於梨果實上產卵後，於產卵孔滴病原菌也產生相同果腐病徵。測試市售 11 種藥劑在一般使用濃度下對該病菌生長之抑制效果，結果顯示除鋅乃浦外，其餘供試之枯萎寧、四環黴素、鏈黴素、安達菌、嘉賜黴素、嘉賜銅、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、銅合浦及鋅錳乃浦等藥劑於培養基上均能抑制該病菌之生長。

(關鍵詞：梨、果腐病、軟腐細菌、藥劑篩選、果實蠅)

* 通訊作者。E-mail: shhseu@wufeng.tari.gov.tw

緒 言

梨 (*Pyrus* spp.) 是薔薇科之落葉果樹，台灣栽培之梨以橫山梨 (*Pyrus pyrifolia* var. *yokoyama*) 及嫁接梨 (本省常以橫山梨嫁接新興、幸水、新世紀等) 為主，據 2000 年農業統計年報記載臺灣梨樹栽培面積約 9000 公頃⁽¹⁾，主要產地在中南部之臺中縣及苗栗縣，其次為新竹縣及南投縣。梨樹上已知之病蟲害種類頗多⁽³⁾，病害包括赤星病 (pear rust)、黑星病 (pear scab)、黑斑病 (black spot of pear)、輪紋病 (pear ring rot)、白粉病 (powdery mildew of pear)、白紋羽病 (*Rosellinia* root rot of pear)、炭疽病 (pear anthracnose) 及葉緣焦枯病 (pear leaf scorch) 等，蟲害包括梨圓介殼蟲 (Florida red scale)、梨綠蚜 (pear green aphid)、梨瘤蚜 (pear phylloxera)、二點葉蟎 (two-spotted spider mite)、東方果實蠅 (oriental fruit fly)、桑粉介殼蟲 (mulberry mealybug) 及桑介殼蟲 (white peach scale) 等。1998 年 6 月間，在南投縣中寮鄉多處橫山梨園發現梨果實腐爛的問題，隔年於新竹地區之梨園也發現同樣問題，果實初期僅出現水浸狀病徵，隨後呈現腐爛現象，嚴重的果園其發生比率高達 35%，造成果農重大損失。據國內外資料顯示可造成落葉果樹之果實軟腐的病原並不多，僅輪紋病 (ring rot, 病原為 *Botryosphaeria dothidea*)、苦腐病 (bitter rot, 病原為 *Glomerella cingulata*)、藍腐病 (blue rot, 病原為 *Penicillium* spp.)、褐腐病 (brown rot, 病原為 *Monilinia fructicola*) 及灰黴病 (grey mold, 病原為 *Botrytis cinerea*) 等，多為真菌引起之病害，且與本病引起之病徵不同^(3, 9, 10)，因此有必要確認造成台灣橫山梨果腐的原因。另外，筆者等於田間調查時發現中寮地區梨園果實蠅危害相當嚴重，且於部份樣品中發現果內有東方果實蠅產卵孔及少量未孵化卵

粒，而東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* Hendel) 為台灣果樹之重要害蟲之一⁽²⁾，且果實蠅產卵為害時會造成傷口，提供存在於田間之病原菌侵入感染的機會，因此本研究除探討果腐病因，測定該病菌之特性及分析該病菌對市售藥劑之感受性外，也探討果實蠅是否媒介病害之發生，以供病害防治參考。

材料與方法

田間果腐觀察

從病區 (南投中寮) 發生果腐病嚴重之多處橫山梨園內，逢機採取 100 粒腐爛之果實，攜回實驗室後以解剖顯微鏡觀察果腐情形，並檢查是否有果實蠅產卵孔或卵，除此外並檢查樣品區分其腐爛情形。

菌株分離

於中寮及新竹地區栽培之橫山梨果園選取水浸狀腐爛之果實樣品，經 75% 酒精表面消毒後切取罹病與健康組織交界處之組織，置無菌蒸餾水中，經振盪後以移植環沾取懸浮液，劃線於營養培養基 (nutrient agar, NA) 平板上，置 28°C 下培養 2 天後，挑取單菌落之細菌，再劃線於 NA 平板，重覆 3 次，移至 NA 斜面備用。

病原菌鑑定

形態及生理生化特性測定：

將 28°C 下 NA 斜面上培養 1 天之果腐病菌，加入少許無菌水約 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，置於 Hitach-7000 的穿透式電子顯微鏡觀察細菌形態及鞭毛。果腐病菌株，在 NA 斜面上 28°C 下培養 1 天，依 Schaad⁽¹³⁾ 所述進行革蘭氏染色 (Gram stain)，King's B 培養基上螢光

色素之形成、葡萄糖之利用方式（氧化/發酵試驗, OF test）、結晶紫果膠（crystal violet pectate, CVP）培養基上果膠分解能力、YDC 培養基上之菌落顏色, 37°C 之生長能力, 氧化酵素（oxidase test）測定、催化酵素（catalase）測定、明膠（gelatin）之液化能力及利用 sorbitol、melibiose、citrate、raffinose、arabitol 及 lactose 之產酸能力測定等。

Biolog 系統鑑定

將果腐病菌 Psr 06、Psr 13、Psr 15、Psr 16 及 Psr 17 等菌株, 分別培養於 BUGM（Biolog Universal Growth Medium, medium 36 g, Bacto Agar 15g）培養基中約 16-24 小時, 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 4 - 24 小時, 之後以光譜儀測讀, 最後將資料輸入電腦與 Biolog GN2 資料庫（Biolog 4.0 版）中比對, 以鑑定其種屬（依廠商指示使用）。

專一性引子對聚合酵素連鎖反應

供試菌株為梨果腐病菌株（Psr 06、Psr 13、Psr 15、Psr 17、Psr 18 及 Psr 19）, 並選取蝴蝶蘭分離之菌株（SR6、SR9, 已知為 *Erwinia chrysanthemi*）, 海芋分離之菌株（Zan3, 已知為 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*）及 *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 等菌株為對照。

供試菌株於 NA 或 PDA（potato dextrose agar, Difco）培養基分別培養 24 小時後, 依 Wang 等⁽¹⁴⁾之方法略加修改以製備細菌 DNA 模板, 其步驟如下: 以滅菌過之牙籤沾取培養基上單一菌落, 放入含有 20 μ l 0.5 N NaOH 之 200 μ l 微量離心管中, 劇烈振

盪後短暫離心, 並直接加入 20 μ l 的 1 M Tris-HCl（pH 8.0）混合均勻, 取此製備液 2 μ l 當 DNA 模版。分別以 5A/5B^(4, 6, 8)（對 *Erwinia chrysanthemi* 菌株具專一性, 此引子對是依 Ech 之 *pecS* 基因的核酸序列設計而得）及 EC1/EC2⁽⁷⁾（對 *Erwinia carotovora* 菌株具專一性, 此引子對是依 Ec 之 *pel* 基因的核酸序列設計而得）為引子對, 進行 PCR 反應。各引子濃度約 0.5 μ M, 分別加入 PCR 各反應物: 250 μ M dNTPs, 0.6 單位的 DynaZyme II DNA Polymerase（Finnzymes Oy Inc., Finland）, 以及 1 \times 的反應緩衝液（10mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl 及 0.1% Triton X-100）, 總反應體積 20 μ l。

5A/5B 之 PCR 增幅條件為 94°C, 5 min 一個循環, 之後進行 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec, 共 32 個循環, 最後再進行 72°C 5 min 一個循環。而 EC1/EC2 之 PCR 增幅條件為 94°C 5 min 一個循環, 之後進行 94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 90 sec, 共 25 個循環, 最後再進行 72°C 5 min 一個循環。增幅後之產物則以 1.5 % agarose（1 \times TAE buffer）之電泳分析（100V）, 並以 5 μ l, Gen-100 DNA ladder（GeneMark Technology, R.O.C.）為標幟（marker）, 最後以溴化乙錠（ethidium bromide 0.5 mg / ml）染色觀察, 並照相記錄。

病原性測定

將分離所得之細菌菌株分別於 NA 斜面上, 28°C 下培養 1 天後, 懸浮於無菌蒸餾水中, 以光譜儀（spectrophotometer）調整其吸收值（A₆₀₀）, 使細菌濃度相當於 10⁸ colony-forming units（cfu）/ml 作為接種源, 以注射接種方法分別注射於萬國士煙草葉片內, 置室溫下觀察接種結果。另外選取 Psr 06、Psr 13、Psr 15、Psr 16、Psr 17、Psr 25 及 Psr 27 為供試菌株, 依上述方法製備接種源後, 以無傷口浸菌接種方法及

以蟲針穿刺製造傷口接種方法，分別接種於橫山梨及新興梨果實上，放置室溫，以塑膠袋套袋保濕二天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵出現情形，同時再從接種之病果中分離細菌，所得之細菌再接種至橫山梨以確定其病原性。另外，選取從海芋及山東白菜分離之軟腐病菌(已知為 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)，以蟲針穿刺製造傷口之接種方法，分別接種於橫山梨果實上，放置室溫，以塑膠袋套袋保濕二天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵出現情形。同時將病原菌以穿刺接種法接種至洋蔥鱗片，大白菜梗，馬鈴薯塊莖及胡蘿蔔塊根上，以確定其致病能力。

藥劑感受性測定

利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method) ⁽⁵⁾ 於 NA 培養基上測定供試果腐病菌菌株對不同藥劑不同濃度之感受性。各菌株濃度為 10^8 cfu/ml 分別取 0.1 ml 混於水瓊脂中，再覆於 NA 平版上；將各種藥劑稀釋成不同濃度後，分別取 0.1 ml 滴於每片濾紙 (直徑 12.7 mm) 上，之後將濾紙圓盤置於水瓊脂平板上，每皿放 3 個含藥之濾紙圓盤及 1 個浸無菌水之濾紙圓盤為對照，置 28°C 下培養 3-4 天後，測量抑制圈大小，若無抑制圈產生表示此藥劑在所測試的濃度下對供試菌株之生長無抑制效果。選取 Psr 06、Psr 13、Psr 15、Psr 16、Psr 17、Psr 25 及 Psr 等 7 個菌株為供試菌株，供試 11 種市售藥劑及稀釋濃度如下：四環黴素 (tetracycline, 商品名為鉑美樹, Acroplant, 30.3 % WP, 臺灣氰氨公司, 濃度為 200 ppm、400 ppm、600 ppm)、鏈四環黴素 (Plantomycin, streptomycin + tetracycline, 10 % SP, 商品名為枯萎寧, 全台公司, 濃度為 100 ppm、200 ppm、400 ppm)；鏈黴素 (streptomycin, 12.5 % S, 商品名為立農黴素, 豈農公司, 濃度為 100 ppm、200

ppm、400 ppm)、多保鏈黴素 (Atakin, thiophanatemethyl + streptomycin, 68.8 % WP, 商品名為安達菌, 瑞總公司, 濃度為 500 ppm、1000 ppm、1500 ppm)、嘉賜黴素 (Kasugamycin, 2% S, 商品名為加收米, 大勝化工, 濃度為 100 ppm、200 ppm、400 ppm); 含銅類藥劑之鹼性氫氧化銅 (copper oxychloride, 85 % WP, 商品名為健果銅, 益欣公司, 濃度為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)、氫氧化銅 (Kocide, cupric hydroxide, 37.5 % EC, 商品名為可產多, Kocide Chemical Corporation, 濃度為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)、嘉賜銅 (Kasuran, kasugamycin + copper oxychloride, 81.3 % WP, 商品名為統統好, 大勝化工, 濃度為 500 ppm、1000 ppm、1500 ppm) 及銅鋅錳乃浦 (Cuprosan 311 Super D, copper oxychloride + zineb + maneb, 63 % WP, 商品名為久保丹, 法台公司, 濃度為 500 ppm、1000 ppm、1500 ppm) 等, 以及鋅錳乃浦 (Dithane M-45, mancozeb, 80 % WP, 商品名為萬生-200, 杜邦公司, 濃度為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm) 與鋅乃浦 (Zineb, 72 % WP, 商品名為達仙, 青山公司, 濃度為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm) 等供試藥劑。

果實蠅媒介果腐病菌試驗

此試驗以人工飼養之同一批東方果實蠅 (約 20 天日齡交尾過之成蟲) 為試驗材料, 並以 Psr 06、Psr 13、Psr 15、Psr 16 及 Psr 17 等菌株以等體積混合, 製成 10^8 cfu/ml 之細菌懸浮液當供試接種源, 試驗共分 3 處理, 每處理均含一對照試驗, 每天觀察果實病徵, 連續記錄 2 星期, 以比較橫山梨受害情形。另外, 以同樣方法處理新興梨, 比較新興梨受害情形。人工飼養之東方果實蠅均置於 50×50×50 cm 之網製養蟲箱內, 每一處理及對照組均放入 50 對東方果實蠅成蟲, 並於每一養蟲箱上放置 1 塊含糖酵母塊

作為成蟲飼料，以及3塊約4×8cm，厚1cm之水瓊脂（1.5%）作為成蟲所需之水份來源。各處理分述於下：

- 1、將洋菜膠置於病原菌懸浮液中，隨即取出瀝乾，再放置養蟲箱上，箱內除放置果實蠅外並放置3個經70%酒精表面消毒之橫山梨。對照組僅將洋菜膠置於無菌水中，未塗佈病原菌，其餘材料均相同，以比較橫山梨果腐病發生情形。
- 2、將3個已表面消毒之橫山梨果實浸於病原菌懸浮液中，隨即取出瀝乾，再放置養蟲箱內，箱內同樣放置果實蠅。對照組為橫山梨果實僅覆無菌水，未塗佈病原菌懸浮液，其餘材料均相同，以比較橫山梨果腐病發生情形。
- 3、洋菜膠及橫山梨果實均未塗佈病原菌，先將橫山梨果實置於有果實蠅之養蟲箱內，確認果實蠅在果實上產卵後（約24hr），取出橫山梨果實，將病原菌懸浮液滴於產卵孔後再置回養蟲箱內。對照組則滴無菌水於產卵孔，其餘材料均相同，以比較橫山梨果腐病發生情形。

結 果

果腐病之特徵

從罹病橫山梨園攜回之梨病果，其腐爛型態頗多，包括細菌感染，真菌感染（以輪紋病為主）及其他因子造成之果實腐爛等。調查結果顯示罹病果實樣品中70%可見蟲孔，30%未見蟲孔；具蟲孔者可於果實內發現果實蠅卵，其中確認細菌危害的樣品占總樣品數50%，具蟲孔且於果實內有果實蠅卵，並確認為輪紋病危害的樣品占總樣品數20%；在未見蟲孔亦即未遭果實蠅危害之果實樣品中，確認細菌引起之果實腐爛者占總樣品數8%，因輪紋病菌

危害造成果實腐爛者占總樣品數12%，其餘為其他因子為所造成。由結果可知，不論果實上是否有蟲孔，因細菌引起之果腐病徵占總樣品數58%，因輪紋病菌引起之果實腐爛占32%，其餘10%則為鳥害或裂果造成果實傷害伴隨腐生菌感染所引起之果實腐爛。橫山梨果腐病果實之病徵初呈水浸狀小斑點，似燙傷狀，之後病斑快速擴大，顏色略加深呈淡褐色，但果實不會形成輪紋徵狀（圖一，1），因內部果肉腐爛但表皮未腐爛，因此輕壓受害果實具有彈性，之後腐爛之汁液呈白色汁液及氣泡自傷口處湧出，後期整個果實腐爛且表皮顏色略加深，切開果肉內呈糊狀腐爛，伴隨著腐臭味，果肉呈淡黃色（圖一，2），部份腐爛樣品中其果肉內可見明顯果實蠅產卵孔道（圖一，4）。

病原菌鑑定

形態及生理生化特性

供試7株果腐病菌株均為革蘭氏陰性（gram negative），桿狀具周生鞭毛，兼性厭氧細菌，在King's B培養基上不產生螢光色素，在YDC培養基上形成白色菌落，具果膠分解能力，在37°C可生長，不具氧化酵素能力（oxidase test），具液化明膠（gelatin）及催化酵素（catalase）的能力，且能利用melibiose、citrate、raffinose及lactose產酸，而不能利用sorbitol及arabitol產酸。

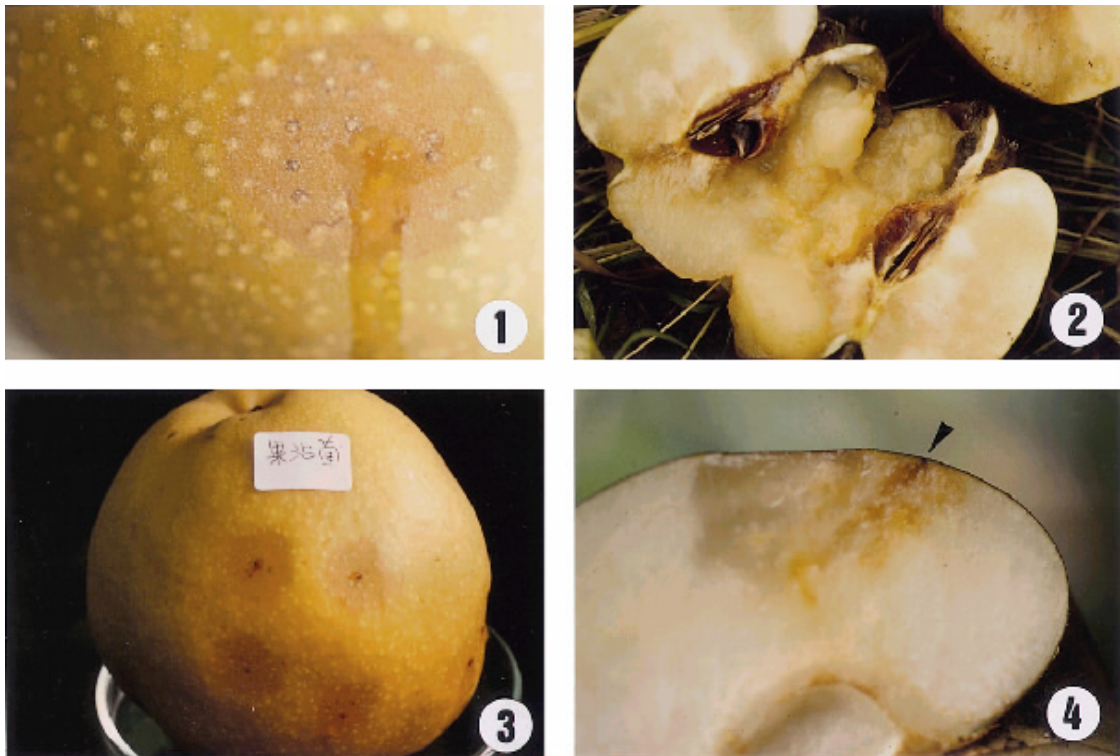
Biolog系統鑑定

果腐病菌Psr 06、Psr 13、Psr 15、Psr 16及Psr 17等菌株經由Biolog GN MicroPlate鑑定系統測試之結果，鑑定為*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*，相似值在0.75-0.96間，與*Erwinia chrysanthemi*、*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*、*E. c.* subsp. *betavasculorum*、*Erwinia amylovora*之相似值均在0-0.02之間。

專一性引子對測定

電泳分析結果如圖二，利用針對 *Erwinia chrysanthemi* 所設計之引子對測試結果顯示供試 Ech 菌株均於 500 bp 處產生專一性 DNA 片段，而供試之梨果腐病菌菌株及已知為 Ecc 之 Zan3 菌株及對照菌株 (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 及 *Ralstonia solanacearum*) 均未出現任何 PCR 產物。但利用針對 *Erwinia*

carotovora 所設計之引子對測試結果顯示已知為 Ecc 之 Zan3 菌株在 434 bp 處產生專一性 DNA 片段，而供試之果腐病菌株也於 434 bp 處產生專一性 DNA 片段，但是已知為 Ech 之供試菌株及對照菌株 (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 及 *Ralstonia solanacearum*) 均未出現任何 PCR 產物。顯示供試之梨果腐病菌株應為 *Erwinia carotovora*。

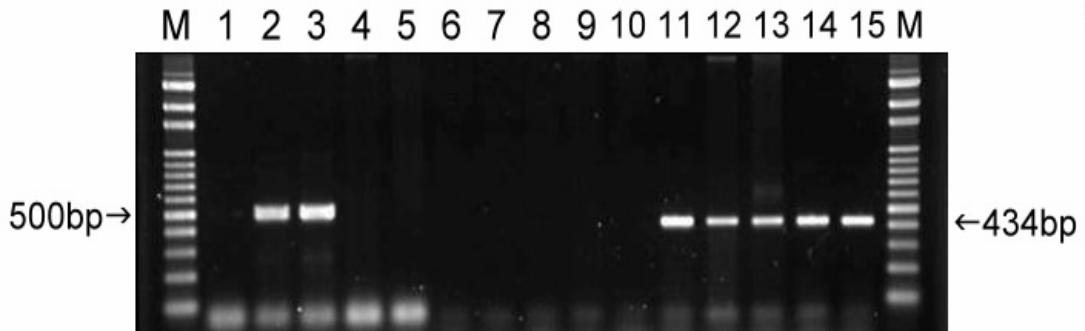


圖一、梨果腐病之病徵。

1. 橫山梨果實呈現褐色水浸狀病斑。
2. 橫山梨果實內部呈糊狀腐爛病徵。
3. 覆有果腐病菌之新興梨果實經由果實蠅產卵媒介引起果腐病徵。
4. 梨果實內部呈糊狀腐爛病徵，可見明顯產卵孔道（箭頭處）。

Fig.1、Symptoms of pear fruit rot disease.

1. Surface view of pear fruit rot. Lesion showed brown and water soaked symptoms.
2. Inner view of pear fruit rot. Lesion showed mushy slimy symptoms.
3. Symptoms on pear fruit caused by surface artificially contaminated *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Psr strains) at the wound sites made by oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*.
4. Inner view of pear fruit rot. Arrow head indicates the puncture mark of *Bactrocera dorsalis*.



圖二、利用引子對 5A/5B 及 EC1/EC2 以聚合酵素連鎖反應分析梨果腐病菌。

Fig. 3、Analyses of the bacterium that causes pear fruit rot by PCR with primer pairs 5A/5B (lanes 1-5) and EC1/EC2 (lanes 6-15), respectively. Lanes 1 and 6, negative control (sterile distilled water); The DNA templates were extracted from: lane 7, *Ralstonia solanacearum*; lane 8, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; lanes 2 and 9, *Erwinia chrysanthemi* SR6; lanes 3 and 10, *E. chrysanthemi* SR9; lane 11, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Zan3; lanes 4 and 12, Psr 06; lanes 5 and 13, Psr 13; lane 14, Psr 15; lane 15, Psr 17; M, Gen-100 DNA ladder. Psr: fruit-rot strains from pear. Arrow indicates PCR-amplified products.

病原性測定

接種於菸草葉片之供試菌株均能於 24 小時內造成軟腐病徵，且病徵迅速蔓延，於接種 2-3 天後，整個菸草植株之葉片、葉柄及莖均形成軟腐。供試 7 株菌株以蟲針刺傷法接種於橫山梨及新興梨果實上，於接種後隔天，即於梨果上以穿刺點為中心，開始形成圓形水浸狀病斑，病斑迅速擴大，病斑直徑發展速率約 1.2 cm/day，且輕壓果表似皮球狀，內軟外稍硬，數天後即從傷口處流出汁液及氣泡，約 7-10 天後整個果實腐爛，出現病徵與田間病徵相同，從接種之病果上再分離之細菌與原細菌相同，再接種梨果實亦產生相同之病徵。無傷口浸菌接種則不顯現病徵，而接種至新興梨果實上不論針刺或無傷口浸菌接種均出現相同之病徵。以已知為 Ecc 之海芋及山東白菜軟腐病菌株接種橫山梨果實，產生同樣的果腐病徵。供試果腐病菌在馬鈴薯塊莖、胡蘿蔔塊根、大白菜梗及

洋蔥鱗片等組織均具有致腐能力。

果腐病菌對藥劑之感受性

以濾紙圓盤擴散法測定供試 7 株梨果腐病菌對不同藥劑不同濃度之感受性。測試市售 11 種藥劑在一般使用濃度下對該病菌生長之抑制效果，結果顯示除鋅乃浦 (Zineb, 72 % WP) 對 7 株供試之果腐病菌之生長均不具有抑制能力外，其餘供試之藥劑在供試濃度下對供試之 7 株果腐病菌之生長均具有抑制能力，雖然各菌株間形成之抑制圈大小有所差異，但差異不大。各供試濃度形成之抑制圈半徑 (已扣除濾紙之大小) 如下: 枯萎寧 (Streptomycin + Tetracycline, 10 % SP): 1-11 mm、四環黴素 (Tetracycline, 30.3 % SP): 12-17 mm、鏈黴素 (Streptomycin, 12.5 % S.): 6-12 mm、安達菌 (Thiophanate methyl + Streptomycin, 68.8 % WP): 6-11 mm、嘉賜黴素 (Kasugamycin, 2 % S.): 1-12

mm、嘉賜銅 (Kasugamyucin + Copper oxychloride, 81.3 % WP): 3 – 12 mm、氫氧化銅 (Copper hydroxide, 37.5 % EC): 4 – 11 mm、鹼性氫氧化銅 (Copper oxychloride, 85 % WP): 4 – 7 mm、銅合浦 (Copper oxychloride + Mancozeb, 63 % WP): 3 – 12 mm、鋅錳乃浦 (Mancozeb, 80 % WP): 3 – 8 mm。

果實蠅媒介果腐病菌試驗

供試橫山梨及新興梨受害情形均相同，試驗之對照組其果實均無腐爛之病徵發生，因對照組養蟲箱內同樣置放果實蠅，因此在果實上僅出現典型果實蠅危害之黑色徵狀，且果肉未變軟，果實上除產卵孔外，內部果肉可見幼蟲及食痕，從產卵孔部位檢視，幼蟲潛行於果肉中。

- 1、洋菜膠塗佈果腐病菌懸浮液之處理，在處理後第二天於梨果實上出現水浸狀病徵，病徵是以蟲孔為圓心，向外擴展，但果肉內之果實蠅卵粒並未孵化，並未形成果實蠅為害時幼蟲取食之食痕。洋菜膠未塗佈果腐病菌懸浮液之對照處理其果實僅見蟲孔及果實蠅危害徵狀，未見果腐病徵。
- 2、梨果實表面覆果腐病菌懸浮液之處理，處理後第二天於梨果實上出現水浸狀病徵，病徵是以蟲孔為圓心，向外擴展 (圖一，3)，果肉組織逐漸軟腐，因果實蠅媒介，使病原菌侵入果肉，造成果肉軟腐，但對照處理之梨果僅覆無菌水，未見果腐病徵。
- 3、當果實蠅於梨果上產卵後，再於梨果表面之產卵孔滴病菌懸浮液，同樣在滴果腐病菌懸浮液處理後第二天於產卵孔部位開始出現水浸狀病徵，且以蟲孔為圓心，向外擴展，果肉組織逐漸軟腐，但對照處理僅於產卵孔滴無菌水，未見果腐病徵。

討 論

1998年夏天於中寮鄉栽植之橫山梨上發現果實腐爛的問題，曾經引起地方農會、媒体及農政單位之注意。調查中寮地區田間受害果實初步觀察發現橫山梨果實腐爛型態頗多，因細菌引起之果腐病徵占58%，因輪紋病菌引起之果實腐爛占32%，其餘則為鳥害或裂果造成果實傷害伴隨腐生菌感染而引起果實腐爛。從中寮及新竹地區罹病梨園之病果中分離所得之細菌，經橫山梨及新興梨果實、菸草、馬鈴薯、胡蘿蔔、大白菜梗及洋蔥等接種試驗，確認該細菌具病原性，此結果顯示橫山梨果腐的病原為細菌，將此病害定名為梨果腐病。據國外資料^(9, 10)顯示梨火傷病在梨果實上造成果實變小，果實呈現黑褐色的病徵，但果實不會腐爛，果肉仍堅硬，此病徵顯然與本病引起之病徵不同，另外，從梨果接種試驗發現接種後病徵擴展迅速，病斑直徑發展速率約1.2 cm/day，顯示該細菌具強致腐能力，在煙草，馬鈴薯塊莖、胡蘿蔔塊根及洋蔥鱗片均具有強致腐能力，與梨火傷病菌 (*Erwinia amylovora*) 之特性不同^(9, 10)。而輪紋病之病徵於果皮上會形成輪紋，且僅造成果實濕腐，不會造成果實軟腐，其病勢進展也較果腐病慢，顯然輪紋病與果腐病之病徵也不同^(9, 10)。

從病果上分離之細菌經鑑定後證實為革蘭氏陰性 (gram negative)，桿狀，具周生鞭毛，在 King's B 培養基上不會產生螢光色素，且為兼性厭氧細菌，依這些生理生化特性分析顯示該病原細菌分類上應為 *Erwinia* 屬細菌。在 *Erwinia* 屬細菌⁽¹³⁾中，*Erwinia amylovora* (梨火傷病之病原菌)無法在 CVP 培養基上形成凹陷，此特性與本病原特性不同。由國外資料^(11, 13)顯示若菌落為白色且具有軟腐能力之 *Erwinia* 屬細菌包括 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca)、*Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum* (Ecb)、

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (Ecc)、*Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* (Eco)、*Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* (Ecw) 及 *Erwinia chrysanthemi* (Ech) 等，因而進一步經由核酸之特性分析進行鑑定，依朱等報告^(4, 6, 8)所述，針對軟腐病菌 *E. chrysanthemi* 的 *pecS* 基因之核酸序列所設計之引子對 (5A /5B)，若供試菌株為 *E. chrysanthemi* 則應用 PCR 方法分析將於 500 bp 處增幅出一條專一性反應產物，但橫山梨果腐病菌株無法增幅出此一專一性反應產物，且由 Darrasse 等報告⁽⁷⁾顯示 Eca, Ecc, Eco 及 Ecw 等菌株應用 EC1/EC2 引子對 (*E. carotovora* 之 *pel* 基因的核酸序列所設計之引子對) 進行 PCR 分析均會出現 434 bp 之專一性反應產物，而本研究進行 *pel* 基因核酸序列 PCR 反應分析結果顯示供試果腐菌株與供試已知為 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 之 Zan3 菌株均可增幅出一條 434 bp 之專一性反應產物，可知供試橫山梨果腐菌株應為 *E. carotovora* 種內之病原細菌而不是 Ech。果腐病菌經由 Biolog 系統鑑定結果亦顯示為 Ecc，相似值在 0.75 - 0.96 間，與 Ech、Eca、Ecb、*E. amylovora* 之相似值均在 0 - 0.02 之間，而由供試菌株利用產酸能力測定之差異顯示該菌株與 Ecc 之特性相近，與 Eca、Ecb、Eco 及 Ecw 等菌株之特性有所不同，因此確認造成橫山梨果腐病之病原細菌為 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*。

從田間橫山梨病果調查資料顯示，果實腐爛且有明顯蟲孔者占 70%，其中有 50% 是具有蟲孔且為細菌感染造成之果實腐爛，顯示傷口對果腐病菌侵入橫山梨果實扮演重要角色；而實驗室內橫山梨果實接種試驗結果顯示傷口有利於此病菌之侵入感染，推測可能與橫山梨果皮較厚有關。一般田間果實傷口之產生除人為機械性及強風造成碰撞外，昆蟲為害也能造成傷口，如刺吸式口器之昆蟲及果實蠅雌蟲產

卵均可造成傷口，但田間調查時利用誘蟲燈卻一直未誘集到刺吸式口器之昆蟲，再加上切開田間病果樣品發現部份病果可見果實蠅產卵孔，因此推測果實蠅產卵所提供之傷口可增加橫山梨果腐病之發生及傳播機率。本研究中果實蠅媒介果腐病菌接種試驗亦顯示不論食餌洋菜膠或梨果表面污染果腐病菌，供試之梨果實均因果實蠅取食及產卵的行為而將病原菌帶入果內感染，並引起果腐病徵，但以無菌水塗佈洋菜膠或果實表面之對照處理，則僅出現果實蠅危害的徵狀，由此推測若田間存在受軟腐病菌污染之殘果或已感染軟腐病菌之作物，則可能經由果實蠅媒介而感染梨果，反之，若田間無病原菌存在，雖然有果實蠅危害引起之傷口存在，也不會引起果腐病。另外，由另一處理結果顯示，將病菌滴於果實蠅產卵之傷口也會引起果腐病，推測田間存在之病原菌也可能經由風雨傳播，而將病原菌帶至產卵孔或其他傷口，進而引起果腐病。

其他寄主來源之軟腐病菌接種橫山梨果實與果腐病菌接種橫山梨果實均產生相同的果腐病徵，顯示其他寄主來的軟腐病菌亦可感染梨果，因此梨果腐病應為梨園偶發性之病害，可能是附近農田、農具或殘果存在軟腐病菌感染所致，田間調查也顯示梨果腐病在多雨高濕環境及疏於防範管理的果園發生機率較大。而用於防治植物細菌性病害之藥劑大都以銅劑或抗生素類藥劑為主^(5, 12)，本研究測試市售 11 種藥劑在一般使用濃度下對該病菌生長之抑制效果，結果顯示除鋅乃浦外，其餘供試之枯萎寧、四環黴素、鏈黴素、安達菌、嘉賜黴素、嘉賜銅、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、銅合浦及鋅錳乃浦等藥劑均能抑制該病菌。經實際追蹤中寮果農施藥情形，證實中寮地區之梨農所施用之藥劑主要針對殺真菌性(如輪紋病)之藥劑及殺蟲劑(如果實蠅)為主，其中防治輪紋病，常施用甲基

鋅乃浦，但未曾施用銅劑及抗生素類之殺細菌性藥劑，因此常見之殺細菌性藥劑應可抑制果腐病菌，此結果可供日後梨果腐病田間防治參考。

引用文獻

1. 行政院農委會統計室。2000。農業統計年報。第114頁。
2. 黃毓斌、高靜華、鄭允。1998。本省東方果實蠅防治策略與展望。台灣果實蠅防治研討會。第9-25頁。
3. 葉金彰、邱錫欣編輯。1993。落葉果樹病蟲害圖鑑。台灣省政府農林廳及國立中興大學編印。103頁。
4. 朱木貴 1955 *Erwinia chrysanthemi* 之遺傳差異性、藍色基因選殖及 PCR 偵測。國立中興大學植病研究所博士論文。
5. Adaskaveg, J. E., and Hine, R. B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 69: 993-996.
6. Chu, M. K., Huang, H. C., Tzeng, K. C., Hsu, S. T., and Chou, M. L. 1994. Detection of *Erwinia chrysanthemi* with a specific DNA probe and polymerase chain reaction. *Plant Pathol. Bull.* 3: 236. (Abstract)
7. Darrasse, A., Prious, S., Kotoujansky, A., and Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1437-1443.
8. Huang, H. C., Chu, M. K., Lin, R. H., Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 1995. Molecular cloning of the blue-pigment related genes from *Erwinia chrysanthemi* (ECH) strain RA3B and use of the genes for identification of ECH by PCR technology. *Phytopathology* 85 : 1188. (Abstract)
9. Jones, A. L., and Aldwinckle, H. S. 1990. Compendium of apple and pear diseases. The American Phytopathological Society, USA, pp. 100.
10. Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K., and Uyemoto, J. K. 1995. Compendium of stone fruit diseases. The American Phytopathological Society, USA, pp. 98.
11. Lelliott, R. A., and Dickey, R. 1984. Genus VII. *Erwinia* Winslow, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (N. R. Kneg and J. G. Holt, eds), vol. 1, p 469-476. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland
12. McManus, P. S., and Stockwell, V. O. 2001. Antibiotic use for plant disease management in the United States. *Plant Health Progress.* P. 1-9.
13. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. ed. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA 373 pp.
14. Wang, H., Qi, M., and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.

ABSTRACT

Hseu, S. H.*, Lin, C. Y., Huang Y. B., Fang, S. L., and Ann, P. J. 2001. **Fruit rot of oriental pear caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *in vitro* bactericide screening.** Plant Prot. Bull. 43: 105-115 (¹ Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC).

An incidental fruit rot of oriental pears occurred in Chung Liao, Nantou in July, 1998. The causal agent attacked fruits and caused severe fruit rot. After being attacked, fruits firstly showed water-soaked lesions, the tissues became extremely soft, followed by a slimy decay that associated with mushy slimy white color ooze emerging from lesions. An unknown bacterium was isolated from the diseased fruits and followed identification based on physiological characteristics, Biolog analyses and primer pairs specific to *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* using polymerase chain reaction, the causal agent was therefore identified as *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc). Inoculation tests conducted in the laboratory indicated that the expansion of the soft lesion could reach up to 1.2 cm diameter per day. In addition to pear, the bacterium could also cause soft rot of potato, carrot, onion and tobacco. Transmission tests combining oriental fruit flies and Ecc in a confined space indicated that oriental fruit flies could transmit the disease through feeding or egg laying. Screening eleven chemicals include Streptomycin + Tetracycline, Tetacycline, Streptomycin, Thiophanate methyl + Streptomycin, Kasugamycin, Kasugamyucin + Copper oxychloride, Copper hydroxide, Copper oxychloride, Copper oxychloride + Mancozeb, and Mancozeb *in vitro*, the results showed that all chemicals, except Zineb, effectively inhibited bacterial growth at various dosage tested.

(Key words: pear, fruit rot disease, soft rot bacterium, bactericide screening, oriental fruit fly)

✉Corresponding author. E-mail: shhseu@wufeng.tari.gov.tw