

向日葵細菌性軸腐病之特性、 品種抗性及藥劑篩選

許秀惠^{1*} 宋秉峰¹ 吳峻璋² 施淑晴¹ 林俊義¹

¹台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植物病理組

²台中市國立中興大學植物病理系

(接受日期：2004 年 12 月 21 日)

摘 要

許秀惠*、宋秉峰、吳峻璋、施淑晴、林俊義 2004 向日葵細菌性軸腐病之特性、
品種抗性及藥劑篩選 植保會刊 46 : 367-378

民國 91 年 6 月，在苗栗縣大湖地區所種植之向日葵發生植株葉片乾枯萎凋的徵狀，但莖仍直立於田間，切開莖部，其內部已成中空且具水浸狀腐爛，若發生於植株莖苗期被害，嚴重者倒伏死亡。92 年夏天同樣情形再度發生。經柯霍氏法則確認該病原為細菌。經生理生化，Biolog 鑑定及專一性引子進行 PCR 分析等測定，確認該病原菌包括 *Erwinia chrysanthemi* (Ech) 及 *E. carotovora* pv. *carotovora* (Ecc)。該病原菌主要造成向日葵植株軸心中空及腐爛，進而引起植株萎凋枯死，因此稱為向日葵細菌性軸腐病 (stalk rot)。由 Ecc 及 Ech 引起之向日葵細菌性軸腐病為台灣向日葵首次記錄。品種抗性測定發現供試九種向日葵品種中以東北八重最為感病，月光及光輝雖感病但抗性較強。軸腐病菌對馬鈴薯塊莖、大白菜梗、胡蘿蔔塊根均具強致腐能力。測試市售 11 種藥劑在一般使用濃度下以濾紙圓盤法測試對軸腐病菌菌株生長之抑制效果，顯示除甲基鋅乃浦對該病菌之生長無抑制作用外，其餘 10 種包括鏈黴素、四環黴素、鏈四環黴素、嘉賜黴素、多保鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、嘉賜銅、鋅錳乃浦及鋅錳滅達樂等藥劑均能抑制其生長，且以四環黴素藥劑之效果最佳。

(關鍵詞：向日葵、細菌性軸腐病、品種抗性、藥劑篩選)

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

緒 言

向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 俗稱葵花、葵花籽、太陽花，英名 sunflower，屬菊科 (*Compositae*) 之一年生草本植物⁽⁸⁾，原產於美洲西部，用途廣泛，除切花觀賞外，因種子含豐富的脂肪及蛋白質，可用於榨油、食用或將種子催成豆苗當蔬菜炒食等，也被當成藥用植物。台灣於日據時代即有種植，早期栽培於嘉南及高屏地區，近幾年常被當作觀賞作物及綠肥作物。台灣 3—12 月月平均溫度在 18°C 以上，而向日葵栽培最適溫度為 21—24°C，因此台灣全年均適宜向日葵栽培，栽培地區現已擴及台北、桃園、苗栗、台中、彰化等地區，由於向日葵生長期短，栽培容易，是一種頗具潛力的切花及庭園花卉。

向日葵植株從種子發芽到收穫，已知病害超過 35 種^(8, 11, 19, 23)，常見有露菌病 (downy mildew)、銹病 (rust)、菌核病 (sclerotial disease)、白絹病 (southern blight)、褐腐病 (charcoal rot)、灰黴病 (grey mold)、白粉病 (powdery mildew)、葉斑病 (leaf spot)、*Verticillium* 萎凋病及病毒病 (viruse disease) 等。台灣有關向日葵病害的研究已發表的報告僅有真菌^(1, 4, 6)及病毒⁽⁷⁾方面，包括白絹病、菌核病^(4, 6)、白粉病⁽¹⁾、銹病、灰黴病及病毒病⁽⁷⁾等，但未有其他病原之相關研究報告，僅在蔡等人之著作中提及台灣向日葵有空胴病 (hollow stalk) 及細菌性葉斑病 (bacterial leaf spot) 二種細菌性病害⁽⁸⁾，但未有病害及病原菌特性之描述。91 年 6 月，在苗栗縣大湖地區所栽種之向日葵植株葉片及葉柄出現乾枯萎凋的徵狀，但莖仍直立於田間，此病徵似青枯病危害，切開莖部，其內部已成中空且具水浸狀腐爛，情況嚴重者植株倒伏死亡⁽⁵⁾，92 年夏天同樣情形再度發生，且有蔓延的趨勢。本研究主要探討造成此病害之病因，病原菌之特性，同時測試向

日葵品種之抗感性及病原菌對市售藥劑之感受性，以供病害防治參考。

材料與方法

菌株來源

於新竹縣，苗栗縣，南投縣及彰化縣等向日葵栽培區取回向日葵乾枯萎凋之罹病植株，以次氯酸鈉漂洗 30 秒表面消毒，並以無菌水漂洗後，切取罹病莖或葉柄組織，置無菌蒸餾水中，經振盪均勻後以移殖環沾取懸浮液，劃線於營養培養基 (nutrient agar, NA) 平板上，置室溫下培養一天，挑取單一菌落再劃線於 NA 平板，重覆三次，移至 NA 斜面培養備用；或者直接以組織分離法將病原組織塊直接置於 NA 平板上，於室溫下培養，菌落長出後挑選單一菌落，經三次純化後，移至 NA 斜面培養備用。

病原性測定

將分離所得之細菌菌株分別於 NA 斜面上於室溫下培養一天後，以無菌蒸餾水懸浮，並以分光光譜儀 (spectrophotometer) 調整其吸光值 (A_{600}) 至 0.3，使其濃度約為 10^8 cfu/ml 作為接種源，以注射接種方法分別注射於萬國土煙草葉片內，置室溫下觀察結果。

病原菌鑑定

(1) 形態及生理生化特性測定

將室溫下 NA 斜面上培養一天之供試菌株，加入少許無菌水約 5 秒後，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)，二分鐘後以覆有 formvar 支持膜的銅網沾取，再以濾紙吸乾多餘的水分，置於 Hitach -7000 的穿透式電子顯微鏡觀察細菌形態及鞭毛。供試菌株在 NA 斜面上 30°C 下培養一天，依 Schaad⁽²⁴⁾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 (Yeast extract- dextrose- CaCO_3) 培養基上之菌落顏色, 37°C 下之生長能力, 氧化酵素 (oxidase test) 測定、催化酵素 (catalase) 測定、明膠 (gelatin) 液化能力及利用 sorbitol、melibiose、citrate、raffinose、arabitol 及 lactose 產酸能力測定等。

(2) Biolog 系統鑑定

選取 Sf016—Sf054 共 12 支向日葵軸腐病菌株, 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 ul 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)。

(3) 專一性引子對聚合酵素連鎖反應分析 (polymerase chain reaction, PCR)

選取向日葵軸腐病之病原菌株 Sf003、Sf011、Sf012、Sf013、Sf014、Sf015、Sf016、Sf017、Sf018、Sf019、Sf020、Sf021、Sf022、Sf024、Sf025、Sf051、Sf052、Sf053、Sf054、Sf065 及 Sf066 等 21 支作為供試菌株, 以及分離自蝴蝶蘭已知為 *E. chrysanthemi* 的菌株 (SR6 及 SR9), 分離自海芋已知為 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 之菌株 (Zan3 及 Zan20) 等為對照菌株。

供試菌株於 NA 培養基分別培養 24 小

時後, 依 Wang 等⁽²⁶⁾之方法略加修改以製備 PCR 反應之細菌 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 μl 0.5 N NaOH 之微量離心管中, 劇烈振盪並短暫離心後直接加入 20 μl 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 混合均勻, 取此製備液 2 μl 當 DNA 模版。並同時以 5A/5B^(2, 12) (此引子對是依 Ech 之 *pecS* 基因的核酸序列設計而得, 對 *E. chrysanthemi* 菌株具專一性), 及 EC1/EC2⁽¹⁴⁾ (此引子對是依 Ec 之 *pel* 基因的核酸序列設計而得, 對 *E. carotovora* 菌株具專一性) 為引子對, 進行 PCR 反應。各引子濃度約 0.5 μM , 分別加入 PCR 各反應物: 250 μM dNTPs, 0.6 單位的 DyNazyme II DNA Polymerase (Finnzymes Oy Inc., Finland), 以及 2 ul 10 \times 的反應緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5mM MgCl_2 , 50mM KCl 及 0.1% Triton X-100), 總反應體積為 20 μl 。

PCR 增幅條件先以 94°C 反應 5 分鐘, 之後進行 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒, 共 32 個循環, 最後再進行 72°C 5 分鐘一個循環。增幅後之產物則以 1.5 % agarose (1 \times TAE buffer) 之電泳分析 (100 V), 並以 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 mg / ml) 染色觀察, 並照相記錄。

品種抗性之致病能力測定

選取 Sf003、Sf011、Sf016、Sf025 為供試 Ech 菌株, 將菌液混合後製備成 10⁸ cfu/ml 為接種源, 以無傷口噴霧接種方式, 分別接種於太陽、光輝、月光、東北八重、情人節、雙色混合、華麗紅褐、香吉士-橙及香吉士-檸檬等 9 個不同品種之向日葵植株上, 並套塑膠袋保濕, 置 30°C 生長箱中, 2 天後除去塑膠袋, 觀察並記錄病徵出現情形。同時選取向日葵軸腐病

菌(包含 Ecc 及 Ech 菌株)，於實驗室以穿刺接種法將病原菌接種至馬鈴薯塊莖、大白菜梗及胡蘿蔔塊根上，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) ⁽¹⁰⁾ 於 NA 培養基上測定供試軸腐病菌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 (water agar) 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，之後每皿放 3 個含藥之濾紙圓盤，並以浸無菌水之濾紙盤為對照組，在室溫下培養 2 - 3 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。取 Sf003、Sf011、Sf012、Sf013、Sf014、Sf015、Sf016、Sf017、Sf018、Sf019、Sf020、Sf021、Sf022、Sf024 及 Sf025 等 15 個 Ech 菌株及 Sf052、Sf053 及 Sf054 等 3 個 Ecc 菌株做為供試菌株，供試 11 種市售藥劑及稀釋濃度如下：四環黴素 (tetracycline, 30.3%SP, 商品名為鉑美樹，臺灣氰氨公司，濃度為 200、400、600 ppm)、鏈四環黴素 (streptomycin + tetracycline, 10% SP, 商品名為枯萎寧，全台公司，濃度為 100、200、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、200、400 ppm)，多保鏈黴素 (thiophanate methyl + streptomycin, 68.8%WP, 商品名為安達菌，瑞總公司，濃度為 500、1000、1500 ppm)，嘉賜黴素 (kasugamycin, 2% S, 商品名為加收米，大勝化工，濃度為 100、200、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、1500、2000 ppm)，氫氧化銅 (copper hydroxide, 77 % WP,

商品名為果菜多-101，英明公司，濃度為 1000、1500、2000 ppm)，嘉賜銅 (kasugamycin + copper oxychloride, 81.3%WP, 商品名為統統好，大勝化工，濃度為 500、1000、1500 ppm)，鋅錳滅達樂 (mancozeb + metalxyl, 80%WP, 商品名為全滅露-鋅錳，富農公司，濃度為 1000、1500、2000 ppm)，鋅錳乃浦 (mancozeb, 80%WP, 商品名為萬生-200，杜邦公司，濃度為 1000、1500、2000 ppm) 及甲基鋅乃浦 (mezineb, 70%WP, 商品名為安收多，台灣拜耳公司，濃度為 1000、1500、2000 ppm) 等供試藥劑。

結 果

病徵

田間罹病植株病徵在葉片呈現失水萎凋狀，之後葉片及葉柄褐化乾枯，花朵也失水下垂，但莖仍直立於田間(圖一，1)，切開莖部，其內部已成中空且具水浸狀腐爛，若植株莖部組織未纖維化前即罹病，則植株倒伏死亡。接種的向日葵植株葉片，初呈水浸狀斑(圖一，2)，病斑迅速擴大，約二天後整個葉片及葉柄出現水浸狀褐化軟腐狀(圖一，3)，若環境乾燥則葉片呈現褐化萎凋病徵(圖一，4)，最後植株倒伏，甚至萎凋死亡。

病原性測定

將供試 21 株細菌菌株以注射接種方法注射於萬國土煙草葉片 6 個小時後即出現壞疽斑，24 小時內壞疽斑沿著葉脈蔓延，並造成煙草葉片及葉柄組織軟腐病徵。

病原菌鑑定

(1) 形態及生理生化特性

供試 21 株病原菌均為革蘭氏陰性菌 (Gram negative)，桿狀具周生鞭毛，兼性厭氧之細菌，在 NA 上為白色透明菌落，在



圖一、向日葵軸腐病之病徵：

1. 向日葵田間病徵。
2. 接種的向日葵葉片出現水浸狀病斑。
3. 接種的向日葵莖軸初期腐爛病徵（箭頭）。
4. 接種的向日葵嚴重時葉片及莖軸乾枯萎凋。

Fig. 1. Symptoms of sunflower stalk rot:

1. Field symptoms of sunflower stalk rot.
2. Early water-soaking symptoms on leaves.
3. Early stalk necrosis symptoms (arrowhead) occurring on the sunflower stalk.
4. Severely infected sunflower showing wilt symptoms.

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，於 37°C 可生長，不具氧化酵素（oxidase test），但具液化明膠（gelatin）及催化酵素（catalase）的能力，且能利用 melibiose，

citrate，raffinose 及 lactose 產酸，不能利用 sorbitol 及 arabitol 產酸，顯示供試病原菌屬於 *Erwinia* 屬。各供試向日葵菌株之生理生化結果與已知為 Eca、Ecc、Ech 等菌株之生理生化結果如表一所示。

表一、向日葵軸腐病菌之生理生化測試結果

Table 1. Results of physiological and biochemical characters of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* isolated from sunflower

Characters	Eca ¹⁾	Ecc ²⁾	Ech ³⁾	Isolates from sunflower	
				Ecc ²⁾	Ech ³⁾
				(3 isolates)	(18 isolates)
Gram strain	— ⁴⁾	—	—	—	—
Anaerobic growth	+	+	+	+	+
Colonies yellow on YDC	—	—	—	—	—
Colonies mucoid on YDC at 30	—	—	—	—	—
Fluorescent pigment on KB	—	—	—	—	—
Oxidase	—	—	—	—	—
CVP test	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Potato soft rot	+	+	+	+	+
Indole production	—	—	+	—	+
Sensitivity to erythromycin	—	—	+	—	+
Phosphatase activity	—	—	+	—	+
Growth at 37°C	—	+	+	+	+
Reducing sugars from sucrose	+	—	—	—	—
Acid produced from:					
sorbitol	—	—	—	—	—
melibiose	+	+	+	+	+
raffinose	+	+	+	+	+
arabitol	—	—	—	—	—
lactose	+	+	+	+	+

¹⁾ Eca, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.

²⁾ Ecc, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

³⁾ Ech, *Erwinia chrysanthemi*.

⁴⁾ +, positive ; —, negative.

(2) Biolog 系統鑑定

供試 12 株向日葵菌株中之 9 株菌株 (Sf016-Sf022, Sf024, Sf025), 經由 Biolog GN MicroPlate 鑑定系統測試, 結果顯示供試菌株與 *E. chrysanthemi* 相似值在 0.8-0.97 間, 而與 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *betavascolorum* 及 *E. amylovora* 之相似值均在 0-0.02 之間。而其餘供試之 3 株菌株 (Sf052, Sf053 及 Sf054) 其測試結果與 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 之相似值分別為 0.86, 0.87 及 0.90, 但與 *E. chrysanthemi* 之相似值為 0, 顯示供試向日葵菌株包括 Ecc 及 Ech。

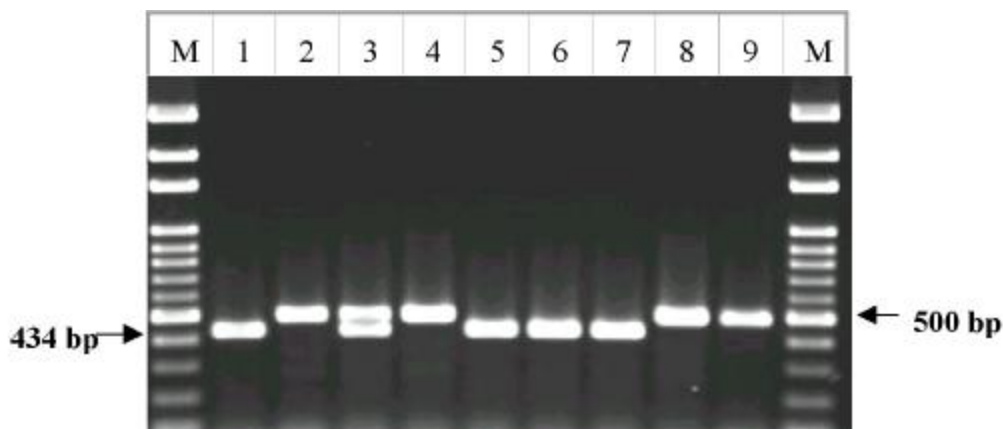
(3) 專一性引子對聚合酵素連鎖反應測定

電泳分析結果如圖二所示, 利用針對 *E. chrysanthemi* 及 *E. carotovora* 所設計之兩

組引子對 5A/5B 及 EC1/EC2 進行聚合酵素連鎖反應, 測試結果顯示供試之 21 支向日葵菌株中有 18 支與供試 Ech 菌株 SR6 及 SR9 的結果相同, 在 500 bp 處可產生一條專一性的 DNA 片段, 而 Sf052、Sf053 及 Sf054 等三支菌株與供試 Ecc 菌株 Zan3 及 Zan20 的結果相同, 在 434 bp 處可產生一條專一性的 DNA 片段。

品種抗性及致病能力測定

將供試向日葵 Ech 菌株之懸浮液以無傷口噴霧接種方法接種於 9 種不同的向日葵品種植株上, 2 天後葉片即出現水浸狀壞疽斑, 病斑迅速蔓延, 之後整個葉片下垂萎凋, 莖部也出現褐化斑, 最後植株乾枯萎凋死亡。各品種間以東北八重最為感病, 7 天後植株均已萎凋死亡, 香吉士-檸檬與香吉士-橙約 10-14 天, 太陽與雙



圖二、以引子對 5A/5B 及 EC1/EC2 應用 PCR 反應鑑定向日葵細菌性軸腐病菌。

Fig. 2. Identification of Soft rot bacteria by PCR with primer pairs 5A/5B and EC1/EC2. Genomic DNA of bacterial strains were used as the template and prepared from lane 1, *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*; lane 2, *E. chrysanthemi*; lane 3, genomic DNA mixture of *E. carotovora* and *E. chrysanthemi*; lanes 4, 8, and 9, *E. chrysanthemi* isolated from sunflowers; lanes 5, 6, and 7, *E. carotovora* subsp. *carotovora* isolated from sunflowers. Lane M, Gen-100-bp DNA ladder. Arrows indicate 500- and 434-bp PCR-amplified products.

色混合約 2 至 3 星期，情人節與華麗紅褐約 3 至 4 星期，光輝及月光約 4 至 5 星期。9 個供試向日葵品種中抗性最強的品種為光輝及月光，接種 1 個月後才逐漸

萎凋死亡。各品種間抗性依序為月光，光輝，華麗紅褐，情人節，雙色混合，太陽，香吉士-橙，香吉士-檸檬與東北八重。該病原細菌不論 Ecc 或 Ech 在馬鈴薯塊莖、

表二、各種農藥在不同濃度下對向日葵軸腐病菌生長之抑制

Table 2. Growth inhibition of *Erwinia chrysanthemi* and *E. carotovora* subsp. *carotovora* under various concentrations of agrochemicals

Chemical	Concentration (ppm)	No. of strains inhibited/ no. of strains tested		Inhibited radius (cm)	
		Ech	Ecc	Ech	Ecc
Streptomycin (12.5% S)	100	15/15	3/3	1~1.7	0.53
	200	15/15	3/3	1.16~1.86	0.57~0.63
	400	15/15	3/3	1.5~2.16	0.77~0.97
Streptomycin +tetracycline (10% SP)	100	15/15	3/3	0.26~0.5	0.97~1.2
	200	15/15	3/3	0.56~1.1	1.17~1.5
	400	15/15	3/3	0.79~1.23	1.5~1.97
Tetracycline (30.3% SP)	200	15/15	3/3	1.96~2.93	2.03~2.2
	400	15/15	3/3	2.23~3.33	2.07~2.37
	600	15/15	3/3	2.76~3.63	2.23~2.63
Copper hydroxide (37.5%EC)	1000	15/15	3/3	0.03~0.86	0.33~0.63
	1500	15/15	3/3	0.2~0.96	0.4~0.67
	2000	15/15	3/3	0.4~1.96	0.47~0.73
Thiophanate methyl + streptomycin (68.8% WP)	500	15/15	3/3	0.86~1.5	0.4~0.5
	1000	15/15	3/3	1.1~1.86	0.5~0.6
	1500	15/15	3/3	1.36~2.16	0.57~0.73
Copper oxychloride (85% WP)	1000	15/15	3/3	0.03~0.63	0.47~0.5
	1500	15/15	3/3	0.16~0.73	0.53~0.57
	2000	15/15	3/3	0.06~0.96	0.6~0.63
Kasugamycin (2% S)	100	15/15	3/3	0.4~1.06	0.6~1.13
	200	15/15	3/3	0.43~1.36	0.9~1.57
	400	15/15	3/3	1.03~1.96	1.2~2.1
Kasugamycin +copper oxychloride (81.3% WP)	500	15/15	3/3	0.03~0.33	0.5~0.7
	1000	15/15	3/3	0.23~0.73	0.77~0.87
	1500	15/15	3/3	0.6~1.16	0.87~1.1
Mancozeb +Metalxyl (80% WP)	1000	15/15	2/3	0.1~0.33	0~0.07
	1500	15/15	2/3	0.2~0.53	0~0.07
	2000	15/15	2/3	0.26~0.53	0~0.1
Mancozeb (80% WP)	1000	15/15	1/3	0.1~1.53	0~0.1
	1500	15/15	1/3	0.13~1.7	0~0.17
	2000	15/15	1/3	1.03~1.86	0~0.33
Mezineb (70% WP)	1000	3/15	0/3	0.1~0.2	0
	1500	4/15	0/3	0.2	0
	2000	6/15	0/3	0.2~0.33	0

大白菜梗、胡蘿蔔塊根均具強致腐能力，於 6 小時後即可產生軟腐病徵。

藥劑感受性

以濾紙圓盤擴散法測定供試 15 株向日葵 Ech 菌株及 3 株向日葵 Ecc 菌株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，結果顯示除甲基鋅乃浦 (mezineb, 70% WP) 對供試之向日葵 Ecc 菌株之生長不具抑制能力外，其餘供試之藥劑在供試濃度下對供試向日葵菌株之生長均具有抑制效果，雖然各菌株間形成之抑制圈大小有所差異，但差異不大。而所有藥劑中又以四環黴素藥劑之效果最佳。各供試濃度形成之抑制圈半徑（已扣除濾紙大小）如表二所示。

討 論

民國 91 年—92 年間相繼在新竹縣，苗栗縣，南投縣及彰化縣等向日葵栽培區發現植株失水萎凋的問題，初看極似青枯病之危害病徵，經初步確認該病原為細菌⁽⁵⁾，主要特徵在於莖部受害後會呈現腐爛中空的現象。依國外^(15, 16, 17)資料顯示，向日葵上曾紀錄植株褐化且莖部中空之軸腐病 (stalk rot)，也會造成植株萎凋死亡，其所述之病徵與台灣向日葵上發現之病徵相同，由於此病害主要在向日葵莖部造成中空腐爛，因此我們也將此病害稱為向日葵細菌性軸腐病。這是向日葵細菌性軸腐病在台灣發生的首次記錄。

向日葵上分離之細菌依生理生化特性分析確認該病原細菌分類上應屬於 *Erwinia* 屬^(20, 24)的細菌，此病原菌在馬鈴薯塊莖、大白菜梗及胡蘿蔔塊根上，亦具強致腐能力。在 *Erwinia* 屬細菌中⁽²⁴⁾具有致腐能力之細菌包括 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca)、*E. carotovora* subsp.

betavascularum (Ecb)、*E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)、*E. carotovora* subsp. *odorifera* (Eco)、*E. carotovora* subsp. *wasabiae* (Ecw) 及 *E. chrysanthemi* (Ech) 等^(3, 9, 13, 24)，在台灣造成作物細菌性軟腐病的細菌主要為 Ecc 或 Ech，但是僅利用生理生化特性較難區分 Ecc 或 Ech⁽⁹⁾，因此本研究進一步經由核酸特性不同，以 PCR 方法進行鑑定分析，依朱等報告^(2, 9, 12, 18)所述，針對 *E. chrysanthemi* 之核酸序列所設計出之引子對 5A/5B 進行 PCR 反應，可於 500 bp 處增幅出專一性片段，以 Darrasse 等所設計出之引子對 Ec1/Ec2 進行 PCR 反應^(9, 14)，針對 Eca、Ecc、Eco 及 Ecw 等 Ec 的菌株，均可在 434 bp 處增幅出一條專一性的 DNA 片段，分析結果顯示供試的向日葵軸腐病菌株中有 18 支菌株與供試已知為 *Erwinia chrysanthemi* 及蝴蝶蘭菌株均可增幅出一條 500 bp 之專一性產物，而供試的向日葵軸腐病菌株中有三支菌株與供試已知為 Ecc 之彩色海芋菌株在 434 bp 處均產生相同的專一性產物。進一步再以 Biolog 系統鑑定供試的向日葵軸腐病菌株，結果亦顯示其中所選取之 9 支菌株與 Ech 相似值在 0.8—0.97 之間，另 3 支菌株與 Ecc 之相似值為 0.86—0.90 之間，由此可知造成台灣向日葵軸腐病之病原菌包含 *E. chrysanthemi* (Ech) 及 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)。

國外資料顯示 Ecc 最適生長溫度為 28—30°C，而 Ech 最適生長溫度為 34—37°C⁽²²⁾，一般而言，危害作物之病原菌通常以其中之一為主，但也同時發現 Ecc 及 Ech 危害同一作物，如青蔥、玉米、馬鈴薯、蘿蔔及彩色海芋等^(3, 13, 25)，在本研究取樣分離結果顯示，造成向日葵軸腐之病原菌包括 Ech 及 Ecc，且 Ech 多於 Ecc 菌株，因此在台灣栽培向日葵尤其在多雨的季節應防範細菌性軸腐病發生，且台灣地區位於亞熱帶，平均氣溫較高，再加上近年來

溫室效應的結果使平均溫度逐年增加，推測 Ech 可能成爲日後引起台灣作物軟腐之重要病原菌。

病原性測定發現向日葵品種中，東北八重在接種 7 天後全株萎凋死亡，其餘品種則呈現部分萎凋或全株萎凋，約 2-3 個星期即死亡，然而月光及光輝卻可維持一個月後才逐漸萎凋死亡，顯示向日葵不同品種對軸腐病菌之抗性有所差異，其抗病感受性依序爲月光，光輝，華麗紅褐，情人節，雙色混合，太陽，香吉士-橙，香吉士-檸檬與東北八重。

初步室內藥劑篩選結果顯示，僅甲基鋅乃浦對向日葵軸腐病菌之 Ecc 菌株之生長無抑制作用，其餘 10 種包括鏈黴素、四環黴素、鏈四環黴素、嘉賜黴素、多保鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、嘉賜銅、鋅錳乃浦及鋅錳滅達樂等藥劑均能抑制 Ech 及 Ecc 軸腐病菌生長，尤其四環黴素藥劑較其他藥劑效果更佳。

引 用 文 獻

1. 方新政。1973。向日葵白粉病之研究。植保會刊 15：5-12。
2. 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。127 頁。
3. 李一芸。1994。台灣彩色海芋細菌性軟腐病之研究。國立中興大學植病研究所碩士論文。63 頁。
4. 吳文希。1991。Control of sclerotinia rot of sunflower and chrysanthemum。植保會刊 33：45-55。
5. 許秀惠、吳俊瑋、宋秉峰、林俊義。2002。向日葵細菌性軸腐病在台灣之發生。植保會刊 44：367。（摘要）
6. 黃鴻章。2002。Screening sunflower for resistance to sclerotinia wilt。植病會刊 11：15-18。
7. 廖吉彥、張清安、陳金枝、鄧汀欽。2001。向日葵黃化斑點病毒之分離與鑑定。植病會刊 10：173-180。
8. 謝桑煙。1993。向日葵。雜糧作物各論 II 油料類及豆類，第 75-850 頁。蔡文福、林興、謝淑惠、李雅琴編。台灣區雜糧發展基金會印。台北市。
9. 蔡佳玲。1998。應用聚合酶連鎖反應技術偵測台灣 *Erwinia* 軟腐細菌。國立中興大學植病研究所碩士論文。66 頁。
10. 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.
11. Allen D. J. 1974. Diseases of sunflower (*Helianthus annuus*) in Tanga region, Tanzania. Plant Dis. Repr. 58: 896-899.
12. 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)
13. Chuang, M. F., Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 1989. Soft rot of radish caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Plant Prot. Bull. 31: 358-365.
14. 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.
15. Gudmestad, N. C., Secor, G. A., Nolte, P., and Straley, M. L. 1984. *Erwinia*

- carotovora* as a stalk rot pathogen of sunflower in North Dakota. *Plant Dis.* 68: 189-192
16. Gudmestad, N. C., and Secor G. A. 1983. The bionomics of *Erwinia carotovora* in North Dakota. *American Potato J.* 60: 759-771.
 17. Gulya, T. J., Woods, D. M., Bell, R., and Mancl, M. K. 1991. Diseases of sunflower in California. *Plant Dis.* 75: 572-574.
 18. 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)
 19. Klisiewicz, J. M., and Beard, B. H. 1976. Diseases of sunflower in California. *Plant Dis. Rep.* 60: 298-301.
 20. Lelliott, R. A., and Dickey, R. 1984. Genus VII. *Erwinia* Winslow. pp. 469-476. In: N. R. Kneg and J. G. Holt [eds.], *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland. 964 pp.
 21. McManus, P. S., and Stockwell, V. O. 2001. Antibiotic use for plant disease management in the United States. *Plant Health Progress* 1: 1-9.
 22. Perombelon, M. C. M., and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathology* 18: 361-387.
 23. Richeson, M. L. 1981. Etiology of a late season wilt in *Helianthus annuus*. *Plant Dis.* 65: 1019-1021.
 24. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
 25. Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 1981. Identification and characterization of soft-rotting *Erwinia* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 23: 77-85.
 26. 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.,^{1*} Sung, P. F.¹, Wu, C. W.², Shih, S. C.¹, and Lin, C. Y.¹ 2004. Bacterial stalk rot of sunflower in Taiwan: varietal resistance and agrochemical screening. Plant Prot. Bull. 45: 367-378. (¹Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan 413, ROC; ² Department of Plant Pathology, Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan 402, ROC)

Severe stalk rot of sunflower was first found in Tahu, Miaoli County in 2002. The disease mainly appeared on the stem and caused water-soaked symptoms. In some severe cases, the stem pith disintegrated and showed hollow stem symptoms. The pathogens were identified as *Erwinia chrysanthemum* and *E. carotovora* subsp. *carotovora* based on physiological and chemical tests, Biolog identification, and PCR analysis. This is the first record of the disease occurring in Taiwan. Resistance screening indicated that “Tohokuhae” was the most sensitive cultivar and “Moon bright” and “Sunbright” showed better resistance when inoculated with Ech. Among 11 bactericides screened, tetracycline proved to be the most effective.

(Key words: sunflower, stalk rot, agrochemical screening)

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