

# *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 引起 之番茄細菌性莖腐病

許秀惠<sup>1\*</sup> 林俊義<sup>2</sup> 宋子承<sup>1</sup>

1 臺中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植病組

2 臺中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所

(接受日期：中華民國 92 年 7 月 11 日)

許秀惠\*、林俊義、宋子承 2003 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 引起之番茄細菌性莖腐病 植保會刊 45 : 257 - 262

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 是台灣重要蔬果之一，栽培遍及全臺，面積達 4,459 公頃<sup>(1)</sup>，各主要栽培地以其面積多寡依序為嘉義、台南、雲林、高雄、南投、彰化、屏東、花蓮、新竹、台東及宜蘭縣等。根據文獻記載可感染番茄的病害種類頗多<sup>(10)</sup>，在台灣溫暖潮濕的氣候下，番茄病害種類也很多，常見之細菌性病害主要為青枯病及細菌性斑點病。民國九十年夏季於南投竹山地區種植神奇 208 及 37 號之番茄栽培園發現植株萎凋死亡的現象，主要病徵為莖部初呈淡褐色水浸狀病斑，隨著病斑擴大，顏色也加深為深褐色，並於莖部呈現黏濕狀 (圖 1, 1)，病勢進展進而造成葉片萎凋，縱切莖部其內部組織出現褐化現象，且部分組織軟化瓦解，於軟化組織混雜著菌泥，最後整個植株萎凋死亡 (圖 1, 2)，有時可見莖倒伏現象，嚴重時輕握植株之莖部呈空洞狀；隔年夏天於同處番茄園發現相同的問題，且附近不同的番茄園也發現相同現象。田間病徵觀察與晚疫病及青枯病相近，但將具有上述問題之番茄植株莖部置於清水中可見菌霧狀湧出，推測可能是細菌危害所致。

從竹山地區番茄田取回具上述病徵之植株，經 75 % 酒精表面消毒後切取病組織以營養培養基 (nutrient agar, NA) 分離細菌，最後移至 NA 斜面備用。分離所得之細菌菌株於 NA 培養後懸浮於無菌蒸餾水中，以光譜儀 (spectrophotometer) 調整其吸收值 ( $A_{600}$ )，使細菌濃度約為  $10^8$  colony-forming units (cfu) /ml 作為接種源，以注射接種方法分別注射於萬國日燈草葉片內，並置室溫下觀察，於接種後 6 小時內供試燈草葉片即出現壞疽斑反應，之後病徵沿著葉脈快速

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

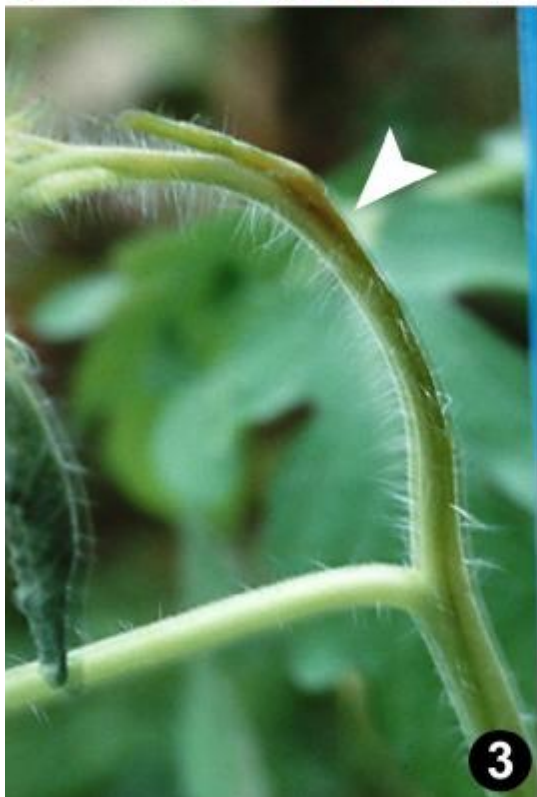


圖1、番茄細菌性莖腐病之病徵。

1. 田間罹病植株莖部病斑呈深褐色及黏濕狀。
2. 田間罹病植株病勢進展，後期植株萎凋。
3. 接種之番茄植株於莖部出現水浸狀病徵（箭頭處）。
4. 接種之番茄植株莖組織軟腐，並出現萎凋倒伏現象（箭頭處）。

Fig. 1. Symptoms of bacterial stem rot of tomato caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

1. Infected stem showing dark brown and slimy symptoms.
2. Infected plant showing wilting symptoms at late stage.
3. Tomato plant showing water soaked symptoms 24 hr after inoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. (arrow head)
4. Tomato plant showing wilting symptoms 48 hr after inoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. (arrow head)

擴展，於 24 小時內即造成煙草植株之組織軟腐，確認分離所得之細菌為病原菌。以同樣方法製備接種源，並以無動力噴灑方法將接種源噴灑於供試神奇 208 番茄植株，同時以噴灑無菌水之處理作為對照，每種處理 10 棵，接種後套上透明塑膠袋保濕 24 小時，之後置於 30°C 之生長箱中觀察，並記錄病徵發展情形，結果顯示接種供試細菌懸浮液之番茄植株於接種 24 小時後，莖及葉片上均出現水浸狀病徵（圖1，3），接種 48 小時後，植株即出現莖部褐化腐爛及植株萎凋倒伏的現象（圖1，4），與田間呈現的病徵相似，但接種無菌水之植株於接種 2-3 星期後仍未出現任何病徵。因此確認造成番茄植株莖腐及植株萎凋病徵之病原菌為細菌。

為確認番茄莖腐病害之病原菌種類，將番茄病株分離所得之病原細菌 Tsr001、Tsr002、Tsr003、Tsr004、Tsr005、Tsr006、Tsr007 及 Tsr008 等，依 Schaad<sup>(12)</sup> 所述進行形態觀察及各項生理生化試驗，結果顯示供試病原菌為革蘭氏陰性，桿狀，具周生鞭毛，兼性厭氧之細菌，在 King's B 培養基上不具螢光也不產生色素，在 YDC 培養基上形成白色菌落，在結晶紫果膠培養基 (crystal violet pectate, CVP) 上形成凹陷，在 37°C 下可生長，這些特性顯示供試病原菌應屬於 *Erwinia*。依文獻資料顯示 *Bacillus*、*Clostridium*、*Cytophaga*、*Erwinia*、*Flavobacterium*、*Pseudomonas* 及 *Xanthomonas* 等均可造成植物軟腐，其中 *Erwinia* 屬是引起植物軟腐最主要之病原<sup>(3, 10)</sup>。本研究為確認 *Erwinia* 病原菌之種名，進而利用專性引子對聚合酶連鎖反應進行鑑定，供試菌株包括造成番茄莖腐之菌株，蝴蝶蘭細菌性軟腐病之菌株 [SR6 及 SR9，已知為 *Erwinia chrysanthem* (Ech)]，彩色海芋軟腐病之菌株 [Zan3，已知為 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)]，*Ralstonia solanacearum* 以及 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 菌株等。供試菌株分別依 Wang 等<sup>(15)</sup> 之方法製備細菌 DNA 模板，再以 5A/5B<sup>(2, 5, 8)</sup> (對 *Erwinia chrysanthemi* 具專性之引子對，是依 Ech 之 *pecS* 的核酸序列設計而得)，及 EC1/EC2<sup>(6)</sup> (對 *Erwinia carotovora* 具專性之引子對，是依 Ec 之 *pel* gene 的核酸序列設計而得) 為引子對，進行 PCR 反應。應用針對 *Erwinia chrysanthemi* 所設計之引子對測試，結果顯示供試 Ech 菌株均於 500 bp 處產生專性 DNA 片段，而供試之番茄莖腐菌株、Ecc-Zan3 菌株、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 及 *R.*

*solanacearum* 均未出現任何 PCR 產物，推定造成番茄莖腐之病原菌不是 *Erwinia chrysanthemi*。但利用針對 *Erwinia carotovora* 所設計之引子對測試，結果顯示其為 Ecc 之 Zan3 菌株在 434 bp 處產生專一性 DNA 片段，而供試之番茄莖腐病原菌株也於 434 bp 處產生專一性 DNA 片段，而其如為 Ech 之供試菌株、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 及 *R. solanacearum* 等均未出現任何 PCR 產物，此試驗結果顯示供試之番茄病原細菌係屬 *Erwinia carotovora*。

本研究進一步利用 Biolog 系統 (Biolog Inc. Hayward, CA)<sup>(9)</sup> 測試番茄莖腐之菌株，並與 Biolog GN 2 (Biolog 4.0 版) 資料庫中比對，結果顯示這些菌株與 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 之相似值在 0.91–1.00 之間，因此供試之番茄莖腐病原細菌為 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*。因該病害主要造成莖腐病徵，因此稱為番茄細菌性莖腐病，與國外記載番茄細菌性莖腐病 (bacterial stem rot) 為相同之病害<sup>(7, 10, 13)</sup>。曾與徐等<sup>(14)</sup> 研究台灣 14 種蔬菜作物之軟腐病，對軟腐病菌株之生理生化特性有詳盡的描述，其中亦包括番茄軟腐病菌株，並確認病原為 Ecc，Jones 等<sup>(10)</sup> 亦指出 Ecc 可造成番茄莖的髓及表皮軟化，與本研究結果相同。

選取農友 301、L390、神奇 208 及 37 號等四種番茄品種 (系)，利用噴灑接種方法測試對莖腐病菌之感受性，發現供試病菌在此四種不同番茄品種上均造成相同病徵，且主要造成莖腐萎凋病徵，確認上述供試的番茄品種 (系) 對莖腐病菌均為感病。番茄植株對不同軟腐病菌株之感受性測定則是選取來自彩色淘芋及白菜之軟腐病菌 (其如為 Ecc)，以噴灑接種方法分別接種於上述番茄植株，同樣以塑膠袋套袋保濕一天，並置 30°C 生長箱中觀察發病情形，發現不論來自彩色淘芋或白菜之軟腐病菌皆可感染番茄，並造成番茄莖腐萎凋的病徵，顯示不同來源之軟腐病菌均能感染番茄，因此確認供試軟腐病菌菌株不具寄主專一性，因此，若番茄田鄰近之蔬菜田或花卉田感染軟腐病，病原菌有可能感染鄰近栽植的番茄植株。組織致腐能力測定是以穿刺接種法將上述供試病菌接種至山東白菜梗，馬鈴薯塊莖，胡蘿蔔塊根，置培養皿內加無菌水保濕，調查各菌株之致腐能力，發現接種 16 小時內，供試切塊組織均具軟腐，大小可達 2 cm，顯示番茄莖腐病菌株與來自白菜，彩色淘芋之軟腐病菌皆具山東白菜梗，馬鈴薯塊莖及胡蘿蔔塊根上均具強致腐能力。Wingard<sup>(16)</sup> 研究指出綠色未成熟番茄果比紅色成熟番茄果感病，本研究以穿刺接種法測試農友 301 番茄未成熟綠果及已成熟之紅果對番茄莖腐病菌之感受性，發現接種 24 小時內不論綠果或紅果均於接種處出現水浸狀病斑，接種 2–4 天後整顆果實腐爛，顯示綠果與成熟紅果對莖腐病菌之感受性並無顯著差異。

若田間尚有軟腐病菌，若植株修剪或摘心時較易發生番茄莖腐病<sup>(7, 13)</sup>，雖然番茄莖腐病是番茄上較次要的病害，但一旦發生卻常造成經濟損失，為降低農民損失，並提供農民防治參考，因而進行藥劑感受性測定，利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)<sup>(4)</sup> 於 NA 培養基上測定供試 8 株番茄莖腐病菌對市售 11 種不同藥劑不同濃度之感受性。分別取 0.1 ml 供試細菌懸浮液 (菌株濃度為  $10^8$  cfu/ml)，混於水瓊脂中，再覆於 NA 平板上；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

℃下培養 3—4 天後，測量抑制圈大小，結果顯示供試之鏈黴素 (streptomycin 12.5 % S)、多保鏈黴素 (thiophanate-methyl + streptomycin 68.8 % WP)、四環黴素 (tetracycline 30.3 % SP)、氫氧化銅 (copper hydroxide 37.5 % EC)、鹼性氫氧化銅 (copper oxychloride 85 % WP)、銅錳錳乃浦 (copper oxychloride + mancozeb 63 % WP) 及錳錳乃浦 (mancozeb 80 % WP) 等藥劑均能抑制番茄細菌性萎腐病菌之生長。但枯芩寧 (streptomycin + tetracycline 10 % SP)、嘉賜黴素 (kasugamycin 2 % S)、嘉賜銅 (kasugamycin + copper oxychloride 81.3 % WP) 及錳錳滅達樂 (metalaxyl + mancozeb 58 % WP) 等藥劑在推薦使用濃度下，有部分濃度對部份菌株之生長不具抑制效果。顯示大部分的供試藥劑在推薦使用濃度下對番茄細菌性萎腐病菌之生長具抑制作用，基於經濟及藥害之考量原則下，建議在番茄開花前可使用銅劑類藥劑防治，開花後則建議使用抗生素類藥劑防治。

(關鍵詞：番茄、萎腐病、軟腐病菌)

## 引用文獻

1. 行政院農委會統計室。2002。農業統計年報。76-77 頁。
2. 林林貴。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。台中。
3. 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。
4. 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.
5. 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)
6. 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.
7. Dhanvantari, B. N., and Dirks, V. A. 1987. Bacterial stem rot of greenhouse tomato: etiology, spatial distribution, and the effect of high humidity. *Phytopathology* 77: 1457-1463.
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, J. B., Chase, A. R., and Harris, G. K. 1993. Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Dis.* 77: 553-558.
10. Jones, J. B., Stall, R. E., and Zitter, T. A. 1991. *Compendium of tomato diseases*. APS Press. 73 pp.
11. Lelliott, R. A., and Dickey, R. 1984. Genus VII. *Erwinia* Winslow, pp.

- 469-476. In: N. R. Krieg and J. G. Holt [eds.], Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
12. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. ed. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 3<sup>rd</sup> edition American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA 373 pp.
13. Speights, D. E., Halliwell, R. S., Home, C. W., and Hughes, A. B. 1967. A bacterial stem rot of greenhouse grown tomato plants. *Phytopathology* 57: 902-904.
14. Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 1981. Identification and characterization of soft-rotting *Erwinia* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 23: 77-85.
15. Wang, H., Qi, M., and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.
16. Wingard, S. A. 1924. Bacterial soft-rot of tomato. *Phytopathology* 14: 451-459.

## ABSTRACT

**Hseu, S. H.<sup>1\*</sup>, Lin, C. Y.<sup>2</sup>, and Sung, T. C.<sup>1</sup> 2003. Bacterial stem rot of tomato caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.** *Plant Prot. Bull.* 45: 257 – 262. (<sup>1</sup>Division of Plant Pathology, Agriculture Research Institute, Wufeng, Taiwan 413, ROC ; <sup>2</sup>Agriculture Research Institute, Wufeng, Taiwan 413, ROC)

Bacterial stem rot was found to cause severe losses of tomato in the Tsushan area, Nantou County, central Taiwan during 2001. The disease mainly affected stems of plants, which showed symptoms of being water-soaked and then turned dark brown. The slimy tissues resulted in hollow stems, and eventually the entire plant wilted. Masses of bacterial cells released from diseased tissues were observed under light microscopy. Strains of bacterium have consistently been isolated from diseased tissues. Based on physiological, biochemical, and pathogenicity tests, the Biolog identification system, and the polymerase chain reaction, the causal agent of this disease was identified as *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

(Key words: tomato, bacterial stem rot, *Erwinia*)

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