

# 甜椒細菌性莖腐病之病原鑑定、 偵測與藥劑篩選

蔡佳欣<sup>1\*</sup> 安寶貞<sup>1</sup> 陳美德<sup>1</sup> 申屠萱<sup>1,2</sup> 李昀珊<sup>1</sup>

1.臺中市霧峰區 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

2.臺中市豐原區 臺中市政府農業局 (現職)

(接受日期：2013年3月14日)

蔡佳欣\*、安寶貞、陳美德、申屠萱、李昀珊。2013。甜椒細菌性莖腐病之病原鑑定、偵測與藥劑篩選。植保會刊 55(1) : 1-10。

甜椒 (*Capsicum annuum* L.) 屬於茄科 (*Solanaceae*) 番椒屬 (*Capsicum*)，為番椒的一種。番椒包括甜椒與辣椒，不具辛辣味為甜椒 (sweet pepper)，具辛辣味者則稱為辣椒 (hot pepper)<sup>(5)</sup>。番椒在台灣總裁培面積達 2290 千公頃<sup>(1)</sup>，主要產地依栽培面積多寡依序為南投、屏東、嘉義、雲林、高雄、臺南、花蓮等 7 縣。台灣常見危害番椒的病害頗多，主要包括疫病<sup>(2)</sup>、細菌性斑點病與青枯病<sup>(3)</sup>等，然而民國 99 年於南投縣仁愛鄉與信義鄉、雲林縣二崙鄉種植的甜椒出現不尋常的病徵，病株莖部出現水浸狀黑褐色條斑，表面組織軟化，將莖部剖開可發現內部組織褐變腐敗，嚴重時莖內部空洞化，病株易從該處傾倒，最後萎凋死亡 (圖一)，該病害之田間病徵外觀有時與青枯病、疫

病所引起之萎凋病徵類似。將罹病莖部橫切置於清水中可見雲霧狀物質由切口泳出，可能為細菌所引起，由於此病於南投、雲林縣甜椒重要產區出現，為避免造成經濟大量損失，因此本研究主要對此病害的病因、病原菌特性、病株快速診斷與室內藥劑篩選做一探討，以供日後栽培與防治參考。

本研究於雲林縣二崙鄉與南投縣仁愛鄉、信義鄉甜椒產區採集莖部具水浸狀條斑與褐化腐敗病徵之罹病株，切取莖部組織後於 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 進行表面消毒，漂洗 30 秒，再以 3 道無菌水漂洗後，將組織置入無菌水震盪均勻，以移植環沾取懸浮液，以劃線平板方式塗於 nutrient agar (NA, Difco Laboratories, USA) 培養基平板上分離病原細菌，之後置於 30°C 生長箱培養 2~3 天後，挑取

---

\* 通訊作者。E-mail: tsaich@tari.gov.tw



圖一、甜椒細菌性莖腐病之病徵。A、莖部出現水浸狀之長條病斑，側枝條乾枯。B、莖部褐化。C、嚴重感染之罹病株，整株萎凋。D、莖部縱切，內部組織褐化。

Fig. 1. Symptoms of bacterial stem rot caused on sweet pepper in field. A, Longitudinal water-soaked lesions occurred on the infected stem and wilting of the lateral shoots were observed. B, The infected branch was brownish. C, Wilted symptom occurred on the severely infected plant. D, The inner tissue of the infected stem was necrotic.

單一菌落至新的NA培養基分離細菌。所分離之細菌菌株懸浮於無菌水中，以分光光譜儀 (Spectrophotometer, Bausch & Lomb, USA) 調整懸浮液濃度吸收值 ( $A_{600}$ ) 至0.3 (相當於 $10^8$  cfu/ml) 做為接種源，以注射接種法接種細菌於8週大之萬國土菸草 (*Nicotiana tabacum*) 葉片內，以進行過敏性反應測試，萬國土菸草於注射接種細菌懸浮液6小時後，葉片即出現壞疽反應，之後病徵沿著葉脈擴展；24小時後，菸草植株葉柄組織軟腐，最後菸草植株軟化倒伏，對菸草可造成軟化壞疽反應之菌株則以Csr編號，選取Csr2、Csr4、Csr13及Csr14為供試菌株。

為鑑定病原細菌的分類地位，首先進行細菌形態觀察與生理生化特性測定，將純培養於NA培養基2天之供試菌株，以2%磷鎢酸 (phosphotungstic acid, pH 7.0) 染色後，於穿透式電子顯微鏡 (Hitachi-7000) 觀察細菌形態與鞭毛。並依Schaad<sup>(12)</sup>所述進行生理生化特性的測定，以鑑定其分類地位。於電子顯微鏡下觀察供試菌株形態為桿狀、具周生鞭毛。於生理生化特性測定：以移植環沾取於NA平板純培養之供試菌株與2滴3%氫氧化鉀 (KOH) 溶液混合後呈黏稠狀，屬革蘭氏陰性 (Gram negative) 菌；測試供試菌株對葡萄糖利用方式 (氧化/發酵試驗)，屬於兼性厭氧；於NA平板上培養為圓形、邊緣完整之白色菌落；於YDC (yeast extract-dextrose- $\text{CaCO}_3$ ) 平板上培養時菌落為白色，不具黏稠狀；培養在King's B平板時不產生螢光，亦不產生色素；不分泌氧化酶與尿素酶；培

養於結晶紫果膠 (crystal violet pectate, CVP) 平板上時形成凹陷。細菌於 $37^\circ\text{C}$ 下可生長，但 $40^\circ\text{C}$ 不生長，由這些特性比對Schaad所著<sup>(12)</sup>，顯示此細菌屬於 *Pectobacterium* 屬。

進一步為確定供試菌株種類，以 Biolog Identification System 分析四供試菌株對95種碳素源的利用情形，並將試驗所得資料於 Biolog GN 資料庫 (Biolog 6.01版) 比對，結果顯示各供試菌株均與 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 最接近，相似值在0.6~0.9，顯示造成甜椒莖腐病原為Pcc。

於核酸序列鑑定上，將上述四供試菌株進行16S-23S rDNA intergenic spacer (IGS) 序列定序，細菌簡易核酸抽取法參考Wang<sup>(13)</sup>之所述並略為修改，以滅菌牙籤沾取經純化後之單一菌落，放入 $50 \mu\text{l}$ 之無菌水中懸浮，再加入 $50 \mu\text{l}$ 之0.4 N NaOH靜置10 min後，再加入1 M Tris-HCl (pH 8.0)  $100 \mu\text{l}$ 混合均勻，取 $40 \mu\text{l}$ 加入無菌水中稀釋10倍，做為模版。之後以引子對1491f (5'-GAAGTCGTAACAAGGTA-3') 及L1r (5'-CA(A/G)GGCATCCACCGT-3')<sup>(9)</sup>進行16S-23S rDNA IGS 片段之PCR增幅。PCR增幅產物以1.4% agarose gel 進行電泳分析後，四株供試菌株均增幅出二條預期大小約為510 bp及550 bp之DNA片段，將所得之PCR產物以TOPO TA cloning Kit<sup>®</sup> (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 進行選殖，所得選殖株經增殖後抽取質體，再以PCR確認所選殖片段為預估長度後，委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行

定序工作。由各供試菌株選殖定序所得之大小二條序列分別於NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫分析比對均與Pcc PC1 strain (NCBI Accession Number: CP001657.1) 之16S-23S rDNA區域序列相同度達99%以上，顯示該菌為Pcc，與Biolog鑑定結果相同。

為確認所分離菌株之病原性，將供試菌株以無菌水懸浮，以上述的方法製備 $10^8$  cfu/ml濃度之細菌懸浮液，接種於株高約30 cm之普遍栽植的甜椒栽培品

種銘星。接種法分別以噴灑法與剪葉法進行接種。噴灑法：將 $10^8$  cfu/ml濃度之細菌懸浮液，以無動力噴灑法將細菌懸浮液噴灑至供試植物，噴灑無菌水之處理做為對照組。剪葉法：以剪刀浸於 $10^6$  cfu/ml濃度之細菌懸浮液，之後從葉柄處直接剪除植株之葉片。接種後植株套上透明塑膠袋保濕48小時，並置於 $30^{\circ}\text{C}$ 生長箱觀察，並紀錄病徵發展情形。以噴灑接種細菌懸浮液於供試甜椒植株24小時後，莖部即開始出現水浸狀條斑病徵，之後條狀斑蔓延，48小時以後，莖



圖二、甜椒人工機械接種分離到的細菌後呈現的病徵。A、噴灑病菌於植株，莖部出現水浸狀之褐色長條病斑。B、病菌由葉柄入侵莖部造成水浸狀褐化。

Fig. 2. Symptom appearance of the sweet pepper mechanically inoculated with the isolated bacterium. A, Water-soaked and brown streaks on the stem occurred by spraying of the bacterial suspension. B, The inoculated bacterium attacked stem through petioles to cause water-soaked and longitudinal lesions.

部外皮褐化(圖二A)，內部組織亦褐變壞疽，最後植株萎凋。以剪葉法接種供試甜椒植株後，於24小時葉柄處開始軟化，36小時後細菌由葉柄蔓延至莖部造成水浸狀病徵(圖二B)，之後細菌上下蔓延，感染部位褐化，內部組織壞疽，最後枝條腐敗枯萎，與田間所見病徵相似，接種無菌水之對照植株則無病徵出現。由接種發病植株之莖部壞疽處可再分離出相同的細菌，完成科霍氏法則，證實為Pcc所引起之病害。國外 Fiori與 Schiaffino<sup>(8)</sup>曾報告*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)可於甜椒莖部與枝條上造成黑色斑點與長條斑病徵，引起甜椒之bacterial stem rot。因Ecc於1998年Hauben等人以16S rDNA序列分析將其重新歸類於*Pectobacterium*屬<sup>(10)</sup>，而後改為*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901) Hauben et al. 1999, comb. nov.，所以Ecc即為Pcc。本研究從台南縣與雲林縣地區發生之甜椒莖腐病株所分離出之病原菌，經鑑定為Pcc，與Fiori及Schiaffino<sup>(8)</sup>所述病害之病原菌相同，故依此病之病徵，稱其為甜椒細菌性莖腐病(bacterial stem rot)。Pcc為臺灣重要之病原細菌，適合的發病溫度為20-30°C，寄主範圍廣範，普遍存在於臺灣各地，可引起多種蔬菜作物軟腐病，寄主包括葉菜類之甘藍、結球白菜、青蔥及芹菜等；根莖類蔬菜之馬鈴薯、蘿蔔及芋頭等；蔬果類之番茄等<sup>(6)</sup>。然而此菌於田間危害甜椒作物，造成之甜椒植株莖腐與萎凋情形則尚未有報告予以確認。依本次接種試驗顯示，Pcc可經由菌液噴灑植株及剪刀剪葉方

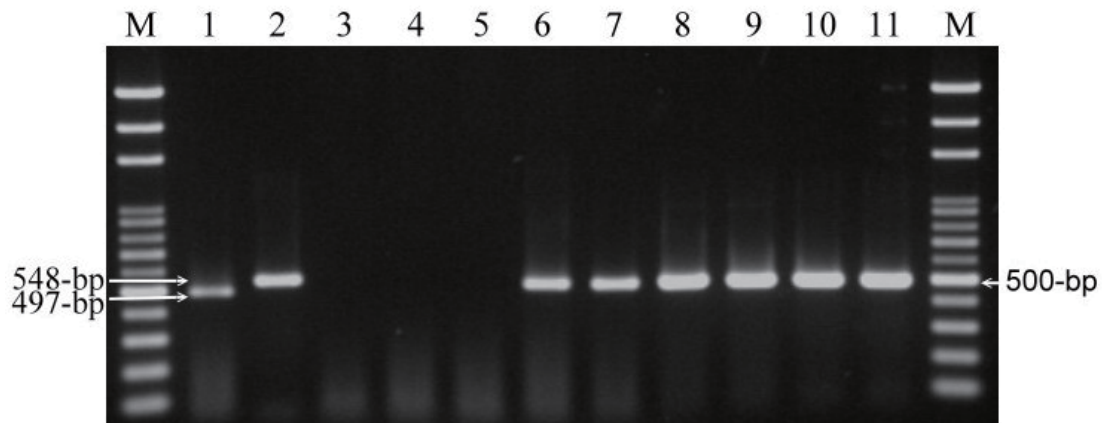
式感染甜椒植株，因此於田間此病可能經由菌液經雨水飛濺至健康株再感染或經由病原細菌污染的修剪工具從傷口入侵。因此應注意修剪器械的衛生，勿使用受病菌污染的工具修剪健康株，及避免於陰雨潮濕的天氣修剪植株，亦應即時移除發病嚴重之病株或剪除病枝條，以減少菌液因風雨飛濺時傳播感染。

臺灣田間可造成甜椒莖褐化萎凋的因子頗多，如疫病與青枯病菌亦可感染甜椒造成莖部褐化萎凋病徵，為能快速診斷田間甜椒萎凋病株是否由Pcc引起，本試驗以抽取病株莖部組織總核酸法，配合專一性引子進行快速診斷鑑定。以剪葉法接種Pcc於甜椒植株後，分別剪取接種二天剛發病之水浸狀罹病莖組織與接種七天之褐化乾枯枝條，抽取莖部病組織總核酸，以專一性引子對Ec3F (5'-AAATGCTGGC(T/C)GGTATGCCGTA-3')及Ec4R (5'-CAGCGTCAGGAACGGACATAC-3')<sup>(4)</sup>進行PCR快速診斷。總核酸抽取參考Hung等人<sup>(11)</sup>之方法並經修改如下：取0.35 g莖部病組織置於研鉢內，加入2.7 ml核酸萃取液(100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA-2Na, 250 mM NaCl, pH 8.0)，充分研磨後再加入0.3 ml 10% Sarkosyl (N-Lauroyl-sarcosine, Sigma, UK)充分混合均勻後，倒入1.5 ml eppendorff tube，於55°C下水浴加溫1小時；以5,000 g離心5分鐘，吸取800  $\mu$ l的上清液到1.5 ml eppendorff tube中，加入100  $\mu$ l 5 M NaCl，充分混合呈乳狀後，再加入100  $\mu$ l 10% CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromide)含0.7 M NaCl，於65°C下水浴

10分鐘；加入600  $\mu$ l之CI (chloroform / isoamyl alcohol = 24 : 1 by volume) 混合均勻，12,000 g離心10分鐘，取800  $\mu$ l 上清液加入500  $\mu$ l 之PCI (phenol/ chloroform/isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1 by volume) 劇烈混合，12,000g離心10分鐘；取600  $\mu$ l 上清液加入0.6倍體積之isopropanol混合均勻，於4 $^{\circ}$ C下12,000 g 離心10分鐘，沉澱物以500  $\mu$ l 70% ethanol清洗，抽氣乾燥後將沉澱溶於80  $\mu$ l TE buffer (10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA ; pH 8.0)。PCR結果顯示於所接

種的甜椒植株，不論是發病二天，具水浸狀病徵之病組織或是已發病七天之黑褐化組織，皆可增幅出Pcc專一性之497-bp DNA片段，與已知的甘藍軟腐病菌 (Pcc) 增幅的片段大小一致，而蝴蝶蘭軟腐病菌 (*Pectobacterium chrysanthemi* = Pch) 則增幅出對Pch專一性之548-bp DNA片段，接種無菌水之健康對照植株則無任何PCR產物 (圖三)。顯示此抽取總核酸法可良好萃取甜椒植株之核酸，並穩定的用於病株的PCR快速診斷。

由於此病可造成植株萎凋倒伏之嚴



圖三、應用PCR偵測甜椒莖腐病株之*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 電泳分析圖。M為100-bp Marker，1為來自感染Pcc之甘藍總DNA，2為來自感染*Pectobacterium chrysanthemi* (Pch) 之蝴蝶蘭DNA，3~5為接種無菌水之甜椒植株DNA，6~8為接種Pcc Csr2菌株2天之病株，9~11為接種7天之病株。

Fig. 3. PCR detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) in artificially-inoculated sweet pepper plants. Lane M, 100-bp DNA marker ; lane 1, Total DNA isolated from cabbage infected with Pcc ; lane 2, DNA from Phalaenopsis infected with *Pectobacterium chrysanthemi* (Pch) ; lane3~5, DNA from sweet pepper inoculated with sterile water ; lane 6~8 and lane 9~11 are DNA from Pcc Csr2-infected sweet pepper at 2 day post-inoculation (dpi) and 7 dpi, respectively.

重病徵，若發生嚴重將造成農民經濟損失，因此為降低此病所造成的損失，進行藥劑感受性測試，以供將來的防治參考。選取Csr2（雲林縣二崙鄉分離株）進行藥劑感受性試驗，以濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)<sup>(7)</sup>於NA平板上測試供試菌株對9種藥劑之感受性，試驗於藥劑有效成份濃度40、200、1000 mg/l下進行，並以滴入無菌水之濾紙圓盤為對照組，每處理3皿。將含有濾紙圓盤的細菌培養皿，於30°C下培養48小時後，測量各供試藥劑濃度於NA平板形成之透明抑制圈直徑（已扣除濾紙之直徑），以測定藥效。供試藥劑包括9種市售藥劑，包括有抗生素類之鏈四環黴素 (Streptomycin Tetracycline，商品名為枯萎寧，全台公司，10.0% SP)、鏈黴素 (Streptomycin，商品名為立農黴素，立農公司，12.5% SL)、嘉賜黴素 (Kaugamycin，商品名為菌友，世大化工，2.0% WP)；市售含銅類藥劑之鹼性氯化銅 (Copper oxychloride，商品名為新必利丹，青山公司，70.0% WP)、氫氧化銅 (Copper hydroxide，商品名為果再青，貝士得公司，77.0% WP)、三元硫酸銅 (Tribasic copper sulfate，商品名為

銅高尚，日產化工公司，27.12% SC)；市售混合類藥劑之嘉賜銅 (Kasugamycin + Copper oxychloride，商品名為加速黴素，世大化工，81.3% WP) 及多保鏈黴素 (Thiophanate methyl + Streptomycin，商品名為萬億黴素，瑞芳化工，68.8% WP)；市售其他類藥劑之歐索林酸 (Oxolinic acid，商品名為金星，台灣住友公司，20.0% WP)。在不同濃度下各種藥劑抑制甜椒莖腐Csr2菌株生長的效果差異性，以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test, LSD test) 在5%顯著水準下的統計檢定分析結果如表一所示，當藥劑有效成份濃度僅為40 mg/l時，歐索林酸及鏈四環黴素即產生抑制圈，抑制圈半徑3.6-15.77 mm；當藥劑有效成份濃度提高至200 mg/l時，包括上述二種藥劑，鏈黴素及嘉賜黴素亦開始產生抑制圈，抑制圈半徑2.13-17.8 mm；1000 mg/l時則全部九種藥劑均可產生抑制圈，抑制圈半徑1.57-20.07 mm；於三種測試濃度中，全部九種藥劑所產生的抑制圈，均以歐索林酸產生的抑制圈顯著最大 (P<0.05)、鏈四環黴素次之，可做為日後防治參考。

表一、供試藥劑在不同濃度對甜椒莖腐 *Csr2* 菌株之生長抑制效果Table 1. Growth inhibition of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Csr2 by various agrochemicals in different concentrations

Chemical	Inhibition zone (mm in diam.)		
	40 ppm	200 ppm	1000 ppm
Oxolinic (20%WP)	15.77±0.12 a	17.80±0.12 a	20.07±0.24 a
Streptomycin + Tetracycline (10%SP)	3.60±0.23 b	8.47±0.15 b	11.67±0.28 b
Kasugamycin (2.0%WP)	0 c	4.33±0.15 c	8.00±0.06 c
Streptomycin (12.5%SL)	0 c	2.13±0.07 d	5.07±0.09 d
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3%WP)	0 c	0 e	4.00±0.06 e
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8%WP)	0 c	0 e	3.27±0.07 f
Copper hydroxide (77.0%WP)	0 c	0 e	3.07±0.09 f
Tribasic copper sulfate (27.12%SC)	0 c	0 e	2.40±0.25 g
Copper oxychloride (85.0%WP)	0 c	0 e	1.57±0.12 h
LSD	0.26	0.24	0.49

Mean ± standard error (n=3). Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.



## 引用文獻

1. 行政院農業委員會統計室 編。2009。農業統計年報。行政院農業委員會。65頁。
2. 呂理燊、高清文。1981。*Phytophthora capsici* 引起之甜椒及辣椒之疫病。植保會刊 23: 59-66。
3. 林俊義、許秀惠、王三太、曹幸之、顏志恆、蕭吉雄。1999。番椒 (*Capsicum* spp.) 品系抗青枯病篩選。中華農業研究 48: 71-83。
4. 許秀惠、申屠萱、曾國欽、林俊義。2007。鑑別 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 及 *Erwinia chrysanthemi* 細菌性軟腐病菌專一性引子之開發。植物病理學會刊 16:19-29。
5. 郭孚耀。2000。甜椒栽培技術 (台中區農業改良場特刊第45號)。行政院農委會台中區農業改良場出版。61頁。
6. 黃德昌、曾國欽、呂昫陞。2007。細菌性軟腐病之診斷與鑑定。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊 (六)。第109-116頁。張碧芳、黃振文、曾國欽編。行政院農委會動植物防疫檢疫局出版。
7. Adaskaveg, J. E., and Hine, R. B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strain of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Dis. 69: 993-996.
8. Fiori, M., and Schiaffino, A. 2004. Bacterial stem rot in greenhouse pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sardinia (Italy): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. I. Phytopathology 152: 28-33.
9. Fessehaie, A., De Boer, S. H. and Lévesque, C. A. 2002. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. Can. J. Microbiol. 48: 387-398.
10. 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: 384-397.
11. Hung, T. H., Wu, M. L., and Su, H. J. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening using the polymerase chain reaction. J. Phytopathol. 147: 599-604.
12. Schaad, N. W., Jone, 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. Wang, H., Qi, M., and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21: 413-415.

## ABSTRACT

**Tsai, C. H.<sup>1\*</sup>, Ann, P. J.<sup>1</sup>, Chen, M. T.<sup>1</sup>, Shentu, H.<sup>1,2</sup> and Lee, Y. S.<sup>1</sup> 2013.**  
**Identification, Detection, and Bactericide Screening of Bacterial Stem Rot of Sweet Pepper.** Plant Prot. Bull. 55: 1-10 (<sup>1</sup>Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, COA ; <sup>2</sup> Taichung City Government Agriculture Bureau (present position))

Stem rot disease of sweet pepper was found in Nantou and Yunlin counties in 2010. Water-soaked, longitudinal, and brown lesions were observed on the surface of stem, and the pith showed necrotic and disintegrated symptoms. Bacteria isolated from the infected tissues were verified to cause stem rot of sweet pepper in pathogenicity test. The pathogen was further identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) based on physiological and chemical tests, Biolog identification, and 16S-23S rDNA intergenic spacer region sequences. Polymerase chain reaction using the primer pair Ec3F/Ec4R was developed for rapid diagnosis of Pcc. The 497-bp DNA fragment corresponding to Pcc can be amplified from the mechanically inoculated sweet pepper plants. The bactericide oxolinic acid has the most efficiency to inhibit Pcc growth.

(Key words: sweet pepper, bacterial stem rot, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, rapidly diagnosis, bactericide screening)

---

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