

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* 引起文心蘭 及虎頭蘭之細菌性軟腐病

蘇秋竹 呂理桑

台中縣霧峰鄉 臺灣省農業藥物毒物試驗所

接受日期：中華民國 81 年 10 月 15 日

摘 要

蘇秋竹、呂理桑，1992. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 引起文心蘭及虎頭蘭之細菌性軟腐病. 植病會刊 1:190-195.

自埔里及台中市採集之文心蘭 (*Oncidium* "Gower Ramsey") 及虎頭蘭 (*Cymbidium* sp.) 之軟腐組織分離得 *Erwinia* 屬軟腐細菌共 14 個菌株。依據生理、生化測試結果得悉此 14 個菌株皆為 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)。病原性測定，這些 Ecc 軟腐細菌菌株均會感染此二種蘭花，其所引起之軟腐病徵，與田間發生者相似。於文心蘭之病徵，最初從假球莖近基部或側枝尖端及基部出現水浸狀淡黃點斑，逐漸蔓延至整個假球莖或側枝，導致整株軟腐黃化死亡或部份死亡；而虎頭蘭之病徵出現於新形成之側枝近地基部部份，初呈褐色水浸狀斑，逐漸蔓延至新側枝引起軟腐，心芽易脫落，偶而亦能蔓延至已成熟之假球莖。所有 14 個菌株對胡蘿蔔、馬鈴薯、蘿蔔、甘薯及芋頭之貯藏器官，胡瓜、茄子及甜椒之果實，洋葱鱗莖，結球白菜及甘藍之葉柄等組織皆有強烈之致腐能力；但對青蒜基部則不具致腐能力。

關鍵字：文心蘭、虎頭蘭、軟腐細菌。

緒 言

近年來，蘭花栽培面積逐漸增加，成爲一重要之花卉產業。文心蘭 (*Oncidium* spp.) 及虎頭蘭 (*Cymbidium* spp.) 一般爲切花及盆景觀賞之用，深受消費者喜愛，爲大眾化花卉，極具市場潛力。然近年來發現有軟腐病發生，初步鏡檢結果判斷其可能爲一細菌性病害。在台灣，細菌性軟腐病於蔬菜栽培田經常發生，尤其是結球白菜、甘藍及蘿蔔等作物於栽培後期最爲常見 (2)。目前已知 *Pseudomonas*, *Bacillus* 及 *Erwinia* 等屬某些病原菌會引起植物組織軟腐 (6,8,12,13)，而 *Erwinia chrysanthemi* 於國內曾被報導會造成蝴蝶蘭軟腐死亡 (11)。本研究目的即在鑑定本省文心蘭及虎頭蘭受何種軟腐菌感染，病原菌對其他植物組織之致腐能力，以供爲病害防治之參考。

材料與方法

菌株分離及病原性測定

由埔里及台中市採集文心蘭及虎頭蘭軟腐病株，經 95% 酒精表面消毒後，自地基部及葉部切取水浸狀

病組織置於無菌水中，以移植環沾取懸浮液，劃線於 Nutrient agar (NA) 或 Crystal violet pectate (CVP) 平板 (4,14)，隔天挑取白色透明或具凹陷似軟腐菌菌落，再劃線於 NA 平板上。經單一菌落三次培養後，移入有蓋螺旋試管之無菌水中，置於室溫下保存。自文心蘭及虎頭蘭各分離得 7 個菌株，共計 14 個菌株供作生理、生化特性試驗使用。病原性測定時，逢機選取文心蘭及虎頭蘭所分離之似軟腐細菌各 3 個菌株，將其培養於 NA 平板，於 30 C 經 24-28 hr 後，懸浮於無菌蒸餾水中，以光譜儀 (Spectronic 20, Bausch & Lomb) 調整其菌量約爲 $2-3 \times 10^8$ colony forming units (cfu)/ml。製成之細菌懸浮液，分別以針刺接種於蘭花植株之葉片、近地基部或假球莖、側枝基部及芽尖和根部等處。另利用普通無動力噴霧器，將接種源溫和噴霧接種於植株，直到植株表面佈滿水膜爲止。供試之蘭花皆由埔里之蘭園購入，文心蘭約一年生之幼苗，第一支假球莖已成熟，另長側枝 1-3 cm。虎頭蘭約二年生幼苗 (約 20-30 cm 高)。接種後將蘭花植株放置於霧室內三天 (溫度約爲 24 C - 32 C)，然後移出放回溫室，接種後連續一個月，每天觀察其發病情形。

病原菌之形態及生理、生化特性測定

在NA平板於30 C下培養48 hr之細菌，加入少許無菌水，約5 sec後，輕輕吸起滴於玻片上，加入等量2% 鎊酸染色液(Phosphotungstic acid, 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，置於Hitachi-7000的穿透式電子顯微鏡觀察細菌的形態及鞭毛。由病菌之生理與生化特性的測試結果，得悉其為 *Erwinia* 屬細菌，再依照Dickey與Kelman (5)所列用於鑑別 *Erwinia* 屬軟腐細菌的方法進行。測定項目如表二所列。

病原菌致腐能力測試

自市場買回品種不明之蔬果類植物組織，將其中胡蘿蔔、甘藷及芋頭之貯藏器官切片，茄子、胡瓜及甜椒之果實，洋葱鱗莖片，青蒜植株基部膨大部位，及結球白菜與甘藍之葉柄，經95%酒精表面消毒後，以針在組織上製造傷口，再以移植環沾取已製備之細菌懸浮液($2-3 \times 10^8$ cfu/ml)，塗抹於傷口部份，置於高濕之密閉容器內，於25 C - 30 C室溫下經過24-48 hr後，觀察軟腐情形。

結 果

病徵

文心蘭與虎頭蘭細菌性軟腐病於田間多發生於高溫多雨季節，尤其梅雨期間及颱風後發病最嚴重，入冬後遇較暖及較濕且多氮肥時亦偶有發生。

軟腐病菌於田間常危害文心蘭之假球莖與側枝，發病部位初為水浸黃化，然後逐漸蔓延至全株(圖一、二)；人工接種植株之病徵亦類似，於高溫(24 C-32 C)多濕環境約1-2天即開始出現病徵。葉片接種部位初為褐色水浸狀斑點，水浸狀逐漸擴大，葉片變黃，終至整個葉片掉落。假球莖基部接種者，出現的病徵與田間發生者較為相近，首先自接種的傷口產生水浸狀斑，然後逐漸向上蔓延至整個假球莖，再從側枝基部向上產生水浸黃化，最後植株軟腐死亡。側枝接種者，不論自尖端或基部，其傷口處先呈現水浸狀並逐漸擴展，致使側枝全部水浸黃化或褐化，有些亦可蔓延至假球莖，導致植株部份或全株死亡。田間虎頭蘭軟腐病容易於其新側枝發生，首先於近基部處產生深褐色水浸狀斑，並逐漸蔓延至新側枝內部呈現軟腐(圖三)，心芽易脫落，有些會有黃化現象，偶有蔓延至成熟之假球莖，人工接種所得病徵亦類似。

病原性測定

以逢機選取之文心蘭及虎頭蘭之軟腐病菌各3個菌株，進行人工接種試驗，結果顯示此些菌株，皆可感染此兩種蘭花，造成軟腐病徵。而多濕之環境有利於發病，軟腐易持續擴展，導致全株或部份組織死亡。各菌株之病原性無多大差異，但接種部位影響軟腐細菌病原性之表現(表一)。文心蘭的葉部、假球莖、近地基部、側枝尖端及基部經針刺接種，置於多濕之條件下，均會出現軟腐病徵，並造成全株或部份組織死亡；但根部接種者僅在根傷口附近有軟腐現象，連續觀察一個月，病徵仍未蔓延至地上部或全株；另無傷口溫及噴霧接種者不易發病。而虎頭蘭新側枝基部針刺接種者，於多濕環境易形成軟腐之病徵，且可逐漸擴展並造成心芽脫落；葉部針刺接種不會發病；而根部針刺接種亦僅在傷口附近及根系有軟腐現象，但不會蔓延至地上部及全株；另無傷口溫及噴霧接種者亦不發病。

TABLE 1. Susceptibility of different parts of *Oncidium* "Gower Ramsey" and *Cymbidium* sp. to artificial inoculation with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Inoculation method & part of plant inoculated	No. of plants diseased/ No. of plants inoculated	
	Strains from <i>Oncidium</i>	Strains from <i>Cymbidium</i>
<i>Oncidium</i>		
Needle puncture		
Leaf	6/6	6/11
Pseudobulb	5/5	10/10
Basal part of pseudobulb	5/6	6/6
Root ¹	1/6	1/60
Apical part of lateral shoot	3/5	8/10
Basal part of lateral shoot	3/5	5/10
Spray without wounding		
Whole plant	0/6	1/6
<i>Cymbidium</i>		
Needle puncture		
Leaf	0/3	0/3
Basal part of lateral shoot	2/3	3/3
Root ¹	1/3	1/3
Spray without wounding		
Whole plant	0/3	0/3

1. Rotting occurred only on or around wounded site of roots of *Oncidium*, but spread slightly on roots of *Cymbidium*.

病原菌之形態及生理、生化特性

分離自文心蘭及虎頭蘭之 14 個菌株皆為革蘭氏陰性菌，不具氧化酵素，為兼性厭氧，短桿狀，具有周生鞭毛(圖四)，能醱酵利用葡萄糖。這 14 個菌株所測定之生理、生化特性除耐 6% NaCl 外，其他均無差異(表二)。供試菌株均能分解果膠，水解白明膠，具有過氧化氫放氧酵素，不產生吡咯(Indole)，不形成卵磷脂酵素，不能利用蔗糖產生還原糖，在 37 C 能生長，能耐 6% 之 NaCl(但分離自文心蘭之菌株不能耐 6% NaCl)，對 Erythromycin (50 µg/ml) 不具感受性，不產生磷酸酵素，能利用 Cellobiose, D-lactose, Melibiose 及 Trehalose 等產生酸，但在 Maltose, Methyl α-d glucoside 及 Palatinose 中不產生酸，能利用 Galacturonate，但不能利用 Malonate。從這些特性可知分離所得之 14 個菌株均屬於 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (5)。

TABLE 2. Physiological and biochemical characteristics of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from *Oncidium* and *Cymbidium* in Taiwan

Characters	Reaction ¹	
	<i>Oncidium</i> (7 strains)	<i>Cymbidium</i> (7 strains)
Acid from carbon source		
Cellobiose	+	+
D-lactose	+	+
Maltose	-	-
Melibiose	+	+
Methyl α-d glucoside	-	-
Palatinose	-	-
Trehalose	+	+
Utilization of organic compounds		
Galacturonate	+	+
Malonate	-	-
Pectate degradation	+	+
Erythromycin sensitivity (50 µg/ml)	-	-
Lecithinase	-	-
Indole production	-	-
Reducing compound from sucrose	-	-
5% NaCl tolerance	+	+
6% NaCl tolerance	-	+
Growth at 37 C	+	+
Catalase	+	+
Phosphatase test	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+

1. "+": Positive reaction; "-": negative reaction.

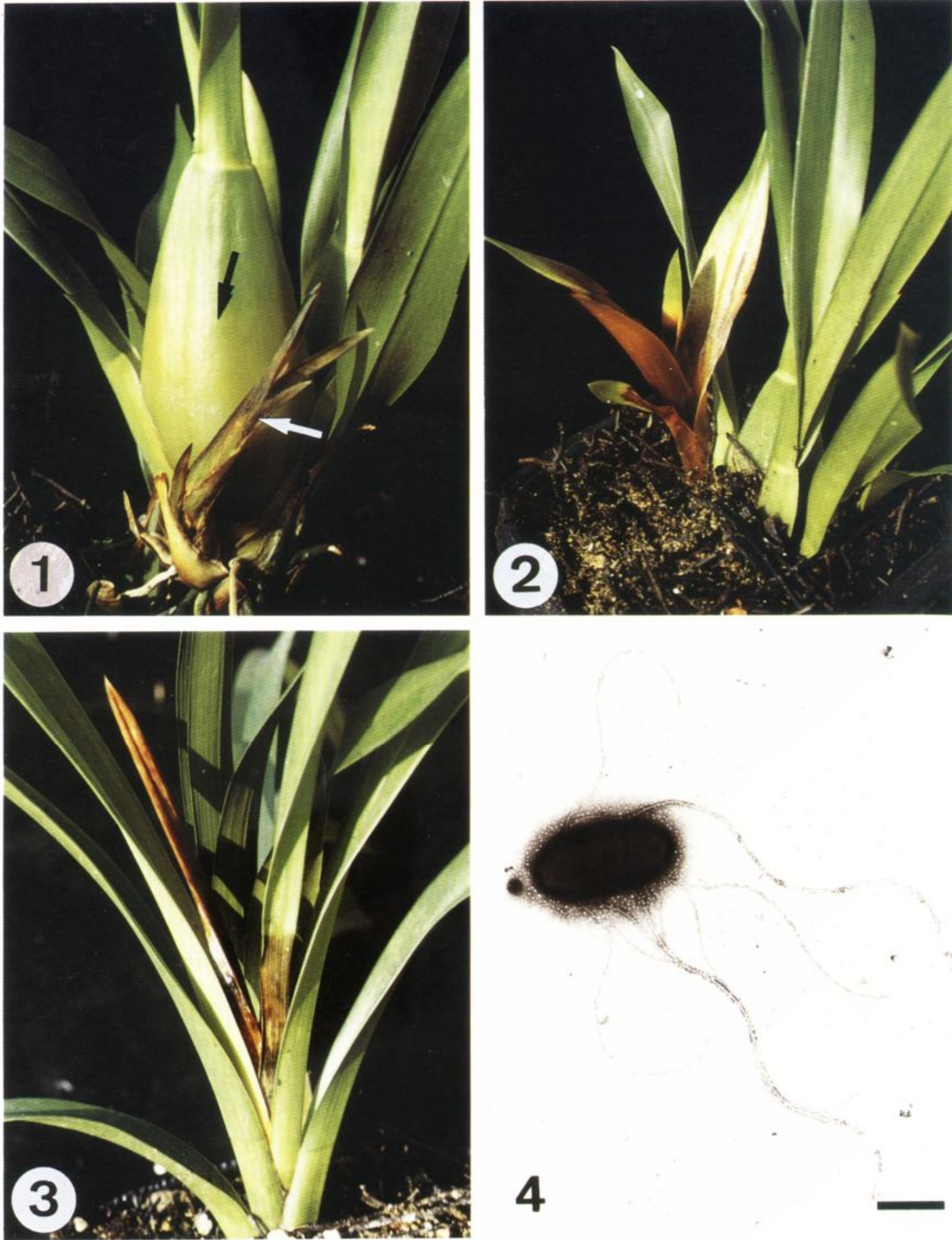
病原菌致腐能力測試

所有 14 個菌株對市場購入之植物組織，大部分均具強烈之致腐能力，其中對馬鈴薯、芋頭、紅蘿蔔、白蘿蔔及甘薯的貯藏器官，茄子、小黃瓜及甜椒果實，洋葱鱗莖及結球白菜及甘藍之葉柄均具有致腐能力，但對青蒜植株之莖基部不具致腐能力。

討 論

台灣作物之細菌性軟腐病，主要由 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 及 *E. chrysanthemi* (Ech) 所引起，此兩種軟腐細菌其寄主範圍廣(1,2,3,10,11)，能為害許多作物，造成重大損失。有關蘭花軟腐病的發生，在台灣僅蝴蝶蘭曾被報導為 Ech 所引起(11)，至於田間常見其他蘭科植物軟腐病之發生，是否為同一軟腐細菌所引起，未曾有正式記錄。本試驗，筆者自台中市與埔里的文心蘭與虎頭蘭之軟腐罹病組織分離 14 個擬似軟腐細菌之菌株，經接種試驗及多項生理、生化特性之測定，發現均為 Ecc 引起。此 14 個菌株，在所測定之生理、生化特性中，除分離自文心蘭之菌株不能耐 6% NaCl，而分離自虎頭蘭菌株能耐 6% 外，其他特性均無差異。來自文心蘭與虎頭蘭之所有菌株皆不產生吡咯，與國外有關 Ecc 菌株特性報告相似(7,9)，而與國內來自不同寄主的 Ecc 菌株卻多數皆會產生吡咯(3,14)有些差異。

由文心蘭及虎頭蘭分離之 Ecc，在人工接種環境下對二種蘭花均會感染，造成軟腐現象，病徵和田間出現者相似，同時菌株間病原性似乎無多大差異，但文心蘭之細菌軟腐病徵和疫病菌 (*Phytophthora palmivora*) 所引起之病徵(安寶貞, 1992 個人通訊)，肉眼似乎不易判別，唯細菌性軟腐病株之假球莖會軟化，同時具有臭味，但疫病菌引起之病徵，其假球莖通常於發病初期仍堅實無臭味，這些應可作為田間病株初步診斷之參考。軟腐細菌主要藉由傷口或自然開口侵入組織(13)，本研究顯示 Ecc 菌株以針刺接種不同部位在高溫(24 C - 32 C)多濕(霧室)條件下，軟腐病徵易逐漸蔓延造成全株軟腐死亡，而在相同條件下於無人為傷口之蘭花植株則幾不發病；根部針刺接種，僅根部傷口附近局部軟腐現象，然連續觀察一個月並無蔓延至地上部情形。因此，其在田間之感染可能主要藉由地上部傷口侵入，因此在栽培管理過程中，宜儘量減少製造傷口及勤於清除病株以減少並避免污染到接種源，應能降低軟腐病之發生。同時另由蝴蝶蘭分離之 Ech 13 個菌株，以針刺接種對文心蘭及虎頭蘭均有很強之病原性；反之來自文心蘭及虎頭蘭之 Ecc 菌株亦可造成蝴蝶蘭軟腐，黃氏等人(未發表資料)



圖一、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)引起之文心蘭假球莖及側枝之軟腐病徵。

圖二、Ecc引起文心蘭側枝之軟腐病徵。

圖三、Ecc引起虎頭蘭側枝軟腐病徵。

圖四、電子顯微鏡陰染法明示由文心蘭分離之Ecc細菌具有周生鞭毛。線長 = 1 μm

Fig. 1. Soft rotting of pseudobulb (black arrow) and lateral shoot (white arrow) induced by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) on *Oncidium* "Gower Ramsey".

Fig. 2. Soft rotting of lateral shoot induced by Ecc on *Oncidium* "Gower Ramsey".

Fig. 3. Soft rotting induced by Ecc on lateral shoot of *Cymbidium*.

Fig. 4. Transmission electron micrograph of a cell of Ecc from *Oncidium* "Gower Ramsey", showing peritrichous flagella. Bar = 1 μm .

分離自結球白菜軟腐組織之 Ecc 菌株亦能造成蝴蝶蘭軟腐。

文心蘭與虎頭蘭之 Ecc 及蝴蝶蘭之 Ech 所有菌株對胡蘿蔔、馬鈴薯、蘿蔔、甘薯、芋頭、胡瓜、甜椒、洋葱、結球白菜及甘藍植物組織均具有強致腐能力，但 Ecc 菌株對青蒜基部無致腐能力，而 Ech 菌株則有。本研究所得之 Ecc 菌株對洋葱具有強致腐能力和徐與曾氏 (3,14) 等人報告台灣所分離之 Ecc 菌株對洋葱僅有弱致腐能力略為不同。

目前為止，在自然狀況下感染蝴蝶蘭之軟腐細菌皆為 Ech (11,15)，而本研究發現危害本省文心蘭與虎頭蘭之軟腐細菌則皆為 Ecc。由於 Ecc 和 Ech 菌株於人工接種環境下均會造成文心蘭、虎頭蘭及蝴蝶蘭軟腐，因此在自然狀況下，Ecc 和 Ech 軟腐細菌是否皆能感染三種蘭花或僅單獨優勢存在，尚不明瞭，有待詳細探討。

謝 辭

感謝中興大學植病系葉彥希及李佩貞二位同學熱心參與及協助本文部份工作。

引用文獻

- 曾國欽、徐世典、蔡金池、梁玲薇。1988。台灣馬鈴薯 *Erwinia* 屬軟腐細菌之特性。植保會刊 30:417 (摘要)。
- 蔡雲鵬。1991。台灣植物病害名彙。修訂3版。植保學會與植病學會出版。中華民國 604 pp。
- 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.
- Cuppels, D., and Kelman, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopathology 64:468-475.
- Dickey, R. S., and Kelman, A. 1988. *Erwinia*: 'carotovora' or soft rot group. Pages 44-58 in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, N. W. Schaad ed. APS., Minnesota, U.S.A., 164 pp.
- Dowson, W. J. 1941. The identification of the bacteria commonly causing soft rot in plants. Ann. Appl. Biol. 28:102-105.
- Dye, D. W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia* II. The "carotovora" group. N. Z. J. Sci. 13:81-97.
- Friedman, B. A. 1951. *Pseudomonas marginalis* as the cause of soft rot imported witloof chicory. Phytopathology 41:880-888.
- Graham, D. C. 1972. Identification of soft rot coliform bacteria. Pages 273-279 in: Proc. 3rd. Int. Conf. Plant pathogenic Bacteria. H. P. Mass-Geesteranus, ed. Wageningen, The Netherlands.
- Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 1981. Species of *Erwinia* associated with soft rot diseases of plants in Taiwan. Pages 9-18 in Proc. 5th Int. Conf. Plant Pathol. Bact. J. C. Lozano, ed. CIAT, Cali, Colombia.
- Huang, T. C., and Lee, H. L. 1988. Identification and control of soft-rotting *Erwinia* from *Phalaenopsis*. Plant Prot. Bull. 30:416-417 (Abstract).
- Lund, B. M. 1979. Bacterial soft rot of potatoes. Pages 14-49 in: Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 12. Plant Pathogens. D. W. Lovelock, and R. Davies eds. Academic Press, London.
- Perombelon, M. C. M., and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. Annu. Rev. Phytopathol. 18:361-387.
- Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 1981. Identification and characterization of soft-rotting *Erwinia* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 23:77-85.
- Wey, G. C. 1988. Occurrence and investigation of important diseases on *Phalaenopsis* in Taiwan. Rep. Taiwan Sugar Res. Inst. 122:21-41.

ABSTRACT

Su, C. C., and Leu, L. S. 1992. Soft Rot of *Oncidium* "Gower Ramsey" and *Cymbidium* sp. caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Plant Pathol. Bull. 1:190-195 (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic substances Research Institute, Wufeng, Taichung, R.O.C.)

Fourteen bacterial strains isolated from soft rotted tissues of *Oncidium* "Gower Ramsey" and *Cymbidium* sp. collected in Puli and Taichung areas. On the basis of physiological and biochemical tests, all fourteen strains were identified as *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc). These strains induced soft rot symptoms similar to those observed in the field. On *Oncidium* "Gower Ramsey" the symptom first appeared as pale yellow, water-soaked spot on the basal part of pseudobulbs, or on the top and basal parts of young lateral shoots, which might expand gradually to other parts and became soft rot, finally all or part of plantlets died; On

Cymbidium sp., the symptom first appeared as dark green, water soaked spots on the basal part of lateral shoots, which expanded gradually, and became soft rot, but matured pseudobulbs were rarely affected. Strains of Ecc induced soft rot extensively on tissue slices of storage organs of carrot, potato, radish, sweet potato and taro, fruit sections of cucumber, eggplant and sweet pepper, detached bulb scales of onion, and petioles of cabbage and Chinese cabbage but not on basal parts of garlic plants.

Key words: *Oncidium* “Gower Ramsey”, *Cymbidium* sp., *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.