

ERWINIA CYPRIPEDEII 引起之木瓜黑腐病

呂理燦¹ 李啓彰¹ 黃德昌²

(接受日期：民國69年11月11日)

摘 要

由 *Erwinia cypripedii* 引起之木瓜黑腐病在臺灣於民國68年初在臺東地區首先發現。病徵初在木瓜葉片呈現水浸狀斑點，高濕時泌膠，最後病斑組織壞疽枯死。植株心部呈水浸狀病斑，隨即葉柄下垂，葉片呈黃色，株心內部變褐色，葉片未脫落前植株心部轉黑枯死。病徵由株心向下擴展，但在成熟組織上進展緩慢。無論成熟株，幼株或幼苗皆可被感染。田間尚可發現病果，果皮上有明顯水浸狀黑色角病斑。以噴霧法接種植株心處不能產生病斑，但在葉片上5至7天可以產生典型病斑，2至3個月後可以使株心軟腐轉黑。以穿刺法及注射法接種在株心處及葉片處，2至3天內受接種處皆能產生明顯病斑。

病原菌在馬鈴薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar) 及營養琼脂 (Nutrient agar) 上皆為白色菌落。細菌呈短桿狀，具極細之周生鞭毛，大小約 $2 \times 0.8 \mu\text{m}$ 。革蘭氏陰性細菌，無氧情況下生長良好。具觸酶活性，但不具細胞色素氧化酵素活性；TSI 培養基內可以產生硫化氫，色胺基酸培養液內不產生吲哚；不能水解酪素，白明膠，澱粉，果膠質及脂質；可將硝酸鹽還原成亞硝酸鹽；有利用檸檬酸鹽能力；缺乏尿素酵素及胺基戊酸去雙水酵素，氨苯基丙酸去胺基酵素活性。VP test 為正反應，MR test 為負反應；在 36°C 及 5% 食鹽水內生長皆良好。可利用之碳源有：阿拉伯糖 (Arabinose)，纖維素 (Cellulose)，右旋糖 (Dextrose)，半乳糖 (Galactose)，旋覆澱粉 (Inulin)，甘露糖 (Mannose)，蜜糖 (Melibiose)，棉實糖 (Raffinose)，鼠李糖 (Rhamnose)，清涼茶醇 (Sorbitol)，漏蘆糖 (Trehalose) 及木糖 (Xylose)。根據形態、生理性質與已知資料比較結果，此一病原菌細菌與 *Erwinia cypripedii* 最相近。

(關鍵字：木瓜黑腐病，*Erwinia cypripedii*)

緒 言

木瓜由於其營養豐富，風味甜美，一直為消費者所喜愛，因此本省木瓜栽培事業一向都很興旺，是本省水果中經濟價值較高的一種。

民國68年早春，臺東區農改場研究人員於臺東大溪附近的一處木瓜園發現了一種不明病害。被危害的木瓜葉片上會有壞疽角斑，但

以株心處呈黑色軟腐及所附著葉片黃化下垂最為明顯。病勢可以往下擴展而使木瓜頂部全部枯死，因而葉片全部下垂。果實亦被危害造成病斑。病徵的表現與爪哇地區由 *Erwinia papaya* (Rant) Magrou 引起之木瓜軟腐病^(4,6,11) 相當類似。本病現只在臺東地區的一些木瓜園及屏東的內埔山區木瓜園發現過，

1. 臺灣植物保護中心病理組。
2. 臺東區農業改良場。

此外本省其他地區尚未發現此病害。在以往本省亦無此種或類似此種木瓜細菌性病害的報導。

自病株的葉片、株心、果實等患處分離到白色菌落之細菌，按 Koch's 法則接種後確定此細菌即是造成上述木瓜病害的病原菌。由於此病害在局部地區嚴重危害時往往使感病的木瓜園廢耕，一旦全面發生對本省木瓜栽培事業將又是一個非常嚴重的打擊。為對此病害進一步了解，本文乃就病原細菌之鑑定，感染途徑及初步防治試驗加以報導，以供參考。

材料與方法

病原細菌之分離與接種 田間携回病株，切下 5 × 5 mm 木瓜葉部及株心患處之病斑置於載玻片上，滴上無菌水使細菌湧流後，以微細玻管吸取少量細菌懸浮液，再以無菌水稀釋 100 倍後，以稀釋平板法培養於 Nutrient agar (NA) 平板上，置 30°C 定溫箱內 24 小時，挑取單菌落培養於 NA 斜面上⁽⁹⁾，俟生育良好，再以穿刺法接種在株齡 3 至 4 個月大之木瓜幼苗心部及葉部，於溫室內 1 至 2 天即可發病。自發病處取樣，再分離，再接種確定其為病原細菌後，以無菌水配成約 10⁸ cells/ml 之細菌懸浮液 (625nm; OD 0.25)⁽²⁾，以噴霧法接種在木瓜葉片、心部、莖基部及果實。根部以 10⁹ cells/ml 左右之細菌懸浮液 (625nm; OD 0.43)⁽²⁾ 浸 30 分鐘，並以傷口、無傷口處理作比較。對照組以無菌水接種。

形態觀察 小心倒入無菌水於 NA 斜面上生長 24 小時之菌落，至斜放時蓋滿斜面為止。靜置 3 至 4 小時後，以消毒過之小吸管吸取斜面上之細菌懸浮液一滴，與等量之 2% phosphotungstic acid (PTA) 混合後，迅速蓋上 200 mesh 銅網，50 秒後移開，以濾紙吸去網上多餘液體，再以 H-300 型電子顯微鏡觀察。革蘭氏染色法按 Norris and Swain (1971)⁽¹⁰⁾ 法進行後以光學顯微鏡觀察。

生理特性 生理特性中氧氣需求，碳素源利用情形、觸酶活性、氧化酵素活性 (Kovac's oxidase activity)、吡嗪產生、硫化氫產生，甲基紅試驗 (Methyl red test)

、VP 試驗 (Voges-Proskauer test)、硝酸根還原力、利用檸檬酸鈉鹽能力、尿素酵素活性、氨基基丙酸去氨基酵素 (Phenylalanine deaminase) 活性、胺基基戊酸去雙水酵素 (Arginine dihydrolase) 活性、酪素水解 (Casein hydrolysis) 等皆依 Holding and Collee (1971)⁽⁸⁾ 法進行。白明膠水解能力是將培養 24 小時之新鮮菌源穿刺培養在白明膠營養培養基中 (Gelatin, 120g; Nutrient broth, 8g; H₂O 1000ml; pH7.2) 7 至 10 天後，培養基上有液化情形者為正反應⁽⁹⁾。果膠水解能力 (Pectin hydrolysis) 是將菌源劃線培養於含果膠之培養基上 (200ml 蒸餾水熱騰後加入 1 ml 1.5% Bromothymol blue 之酒精溶液，再加入 6 ml 之 10% 新鮮 CaCl₂ · 2H₂O 溶液，最後加入 22 g 之 Sodium polypectate，並以蒸餾水將體積填充至 1000 ml)，逐日觀察培養基表面劃線處是否有凹陷產生至第 15 天為止，有凹陷產生者為正反應⁽¹¹⁾。此外將菌源培養於 5% 食鹽水中，每日取出少許懸浮液培養於 NA 斜面上，30°C 下 1 至 2 天後取出觀察其生長情形，2 天內仍不生長者繼續觀察至第 4 天為止。每日以上述方法測病原細菌之存活至第 15 天為止。另外將菌源劃線培養於 NA 斜面上，置 36°C 定溫箱，24 小時後取出觀察其生長情形。

寄主範圍 寄主範圍測定猶如接種木瓜，用穿刺法及注射法將菌泥及細菌懸浮液 (10⁸ cells/ml) 接種於鶴蘭 (*Phaius* sp.)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* sp.)、四季蘭 (*Cymbidium* sp.)、石斛蘭 (*Dendrobium* sp.)、柑桔 (*Citrus* sp.)、菸草 (*Nicotiana* sp.)、萬年青 (*Phodea* sp.)、藜 (*Chenopodium* sp.)、百香果 (*Passiflora* sp.)、甜椒 (*Capsicum* sp.)、猩猩木 (*Euphorbia* sp.)、菊花 (*Chrysanthemum* sp.)、草莓 (*Fragaria* sp.) 等植物之葉片及莖部，並以無菌水接種當對照，逐日觀察其發病情形。

結 果

病徵 木瓜樹受細菌性黑腐病嚴重危害時其外形遠看頗似輪點毒素病 (圖一)，但近

看則大不相同。在葉片上先呈現水浸狀，轉褐色角斑，高濕時泌膠，最後產生壞疽（圖三）。葉柄除基部外，看不到病斑。最主要的病徵在株心處。株心處感染初期亦呈現水浸狀，然後逐漸變黑。患處葉柄下垂，在葉片未脫落前株心即已轉黑枯死（圖二）。此時內部橫切面可以明顯看到褐變情形。褐變的速度比外表病徵的發展要快，因此患處下數公分之健全組織其橫切面已有褐變情形。病徵由株心處向下擴展，上端的患處也逐漸乾死。但在較老熟基部未見病徵。病株有時會自患處邊緣抽出新芽，但此新芽不久也會自心部發病，隨即整枝枯死。在田間常可找到病果，果皮上密布黑色病斑。病斑由小而大，且向果肉組織擴展，使果肉變成褐色，進而腐爛（圖四）。所有葉片，株心，果實等患處常發生惡臭。根部不見被感染情形，一般在莖基處用肉眼無法看到病徵。

病原菌形態與生理 病原細菌在 PDA, NA 平板上之菌落皆為白色，無粘膜。細菌本身為短桿狀，大小約 $2 \times 0.8 \mu\text{m}$ 。一萬倍下可看到周生之微細鞭毛（圖五）。革蘭氏染色為負反應，無氧情況下生長良好；具觸酶活性但不具細胞色素氧化酵素活性；TSI 培養基內可以產生硫化氫；色胺基酸培養液內不產生吡啶；不水解酪素、白明膠、澱粉、果膠質及脂質；可將硝酸鹽還原成亞硝酸鹽；可利用檸檬酸鈉鹽；缺乏尿素酵素、胺基戊酸去氨水酵素及氨苯基丙酸去氨基酵素等活性。VP test 為正反應，M-r test 為負反應； 36°C 及 5% 食鹽水內皆能存活。可利用之碳素源有：阿拉伯糖、纖維素、右旋糖、半乳糖、旋覆澱粉、甘露糖、蜜糖、棉實糖、鼠李糖、清涼茶醇、漏蘆糖及木糖（表一）。

接種試驗一以噴霧法接種在傷口及無傷口之木瓜葉片上，5 至 7 天後皆能產生明顯角狀病斑，但株心處仍未能表現病徵。以同法接種所有葉片或單一葉片，發生角斑後 2 至 3 個月可在株心處產生病徵。前者接種 5 棵時有 2 棵株心發病；後者接種 3 棵時有一棵心部發病。以菌泥穿刺接種在株心時 2 至 3 天內即造成黑腐病徵。各種方法接種皆無法使莖基部及根部造成病徵。穿刺及注射接種可在果實上造成病

斑。病原菌之寄主範圍不廣泛，供試植物中除木瓜外只在秋石斛幼苗造成黑腐及使蝴蝶蘭葉片呈壞疽、黃化，最後整株枯死。

討 論

Hauduroy 等於 1937 年所發表之木瓜細菌性軟腐病主要病徵與本文所述非常相似，其發表之病原菌學名為 *Erwinia papaya* (Rant) Magrou^(4,6,11)。然其病原菌之生理特性與本文所述者有不同之處。極明顯的兩點是該軟腐病病原細菌為好氧菌；利用葡萄糖時不產生氣體⁽⁶⁾。而本文中之病原細菌在無氧情形下仍能生長良好，且利用葡萄糖時會有氣體產生。因此兩者是否為相同病害未能確定。

本文所述病原細菌具周生鞭毛，因此分類上將其歸屬於 *Erwinia* sp.。其生理性質與 Bergey's Manual⁽³⁾ 上所列 *Erwinia* 各種細菌之生理特質相比較結果發現與 *E. cypripedii* 最相似。Dickey⁽⁵⁾ 於 1979 所發表之 *E. cypripedii* 之生理特性為另一項有力佐證。只是本文所述病原細菌無 Phenylalanine deaminase 活性，此點與 Bergey's Manual⁽³⁾ 上及 Dickey⁽⁵⁾ 所發表 *E. cypripedii* 之特性不同。另外碳素源之利用情形三者皆有些微差異。然三者對 Lactose、Melibiose 及 Xylose 之利用情形相同。綜合以上結果，本文所述之病原細菌應可歸屬於 *E. cypripedii*。

本文所述木瓜黑腐病主要病徵雖表現於株心處，但在田間主要感染部位可能是木瓜葉片而非株心部。因為當溫室人工接種時株心部除非以菌泥穿刺或以高濃度細菌懸浮液注射接種外，傷口及無傷口噴霧接種都不能在株心部產生病徵。此外田間常可發現許多病株只在葉片上表現出病徵而不見株心處黑腐。在這種情形下田間病株株心處病徵之發生其感染源很可能是自葉片而來，即如樹薯流膠病之感染情形一葉片罹病後病原細菌自葉片、葉脈、葉柄而感染基部及其頂端⁽¹⁾。本實驗曾只以木瓜葉片接種，任其發病，經 3 至 4 個月後株心處會表現出黑腐病徵。然此觀點仍有待組織化學法及細菌移行之測定來進一步證明。田間尚可發現

少數之病株，其株心處黑腐，葉片黃化下垂，但葉片上沒有任何病斑。這可能是昆蟲帶菌後直接吸食株心處所造成。昆蟲在本病害傳播中所佔角色亦有待求證。

本菌不易危害較成熟之莖部組織，但可在這些組織中潛伏甚久，環境適宜時再繼續危害。實驗中於68年7月初接種2棵木瓜，10天後株心部完全乾死，病徵不再向下擴展，不久病徵亦消失。然於69年1月下旬兩棵於頂端部都再度呈現水浸狀病斑，但不明顯。至3月上旬病徵就顯現得非常清楚，經分離，接種後確定其仍為相同之病原細菌。由於此病原細菌可潛伏在成熟的木瓜組織中，因此對此病害的防治理論上自必困難。本實驗中曾以鹼性氫氧化銅500倍，立農黴素1000倍，脲硫醃醃500倍每隔10天直接噴洒於患處一次，共噴藥三次及將木瓜病株砍至離地面50公分處，再以上述藥劑、濃度、使用方法來防治此一病害，結果都無防治效果可言，其原因很可能即是病原細菌潛伏在成熟之木瓜莖組織中。所幸目前發生此病害地區有限，且都發生在土地貧瘠地區（肥沃地尚未見發病木瓜園），故對發病果園採用徹底砍除及腐耕對防止此病害蔓延應有實質效果。如臺東地區除大溪嚴重發生外，一些果園亦有零星發生，但經拔除病株，撲滅病原後就未曾再發生成災。

本病原細菌寄生性較弱，因此本病之發生可能只在某些特殊環境下才猖獗成災。又本菌不具果膠分解酵素，培養時亦不產生惡臭；但病株株心部軟化，且能產生惡臭。是否發病後一些具此特性雜菌混入亦有待證明。

謝 辭

臺灣植物保護中心植物病理組研究報告第24號。本研究進行期間曾得臺東區農業改良場植物保護股前股長劉清河先生鼎力支持，特此誌謝。

引 用 文 獻

1. 呂理榮、陳主得，1971。樹薯細菌性萎凋病(1)病菌之分離、鑑定、病原性、病害組織觀察及防除方法。臺灣糖業試驗所研究

彙報54：15—20。

2. 張勝祺，1977。影響水稻白葉枯病急性萎凋病徵發生之研究，國立中興大學碩士論文。
3. Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., p. 333—339, The William and Wilkins Co., Baltimore, U. S. A.
4. Cook, A. A. 1975. *Diseases of Tropical and Subtropical Fruits and Nuts*. p. 263—265, Hafner Press, New York, U. S. A.
5. Dickey, R. S. 1979. *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* spp. *Phytopathology* 69: 324—329.
6. Elliott, C. 1951. *Manual of Bacterial Plant Pathogens*, 2nd Ed., p. 158, *Chronica Botanica*, Waltham Mass, U. S. A.
7. Hildebrand, D. C. 1971. Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology* 61: 1430—1436.
8. Holding, A. J. and J. E. Collee. 1971. Routine biochemical test, in *Methods in Microbiology* (J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds.), Vol. 6A, p. 2—30, Academic Press, Inc., New York, U. S. A.
9. Kir'aly, Z., Z. Klement, F. Solymosy, and J. Vörös. 1974. *Methods in Plant Pathology*, Part II. p. 119—169, Elsevier Scientific Publishing Co., New York, U. S. A.
10. Norris, J. E. and H. Swain. 1971. Staining bacteria, in *Methods in Microbiology* (Norris, J. R., and D. W. Ribbons, eds.), Vol. 5A, p. 105—134. Academic Press, Inc., New York, U. S. A.
11. Weber, G. F. 1973. *Bacterial and Fungal Diseases of Plants in Tropics*, p. 388, University of Florida Press, Gainesville, U. S. A.

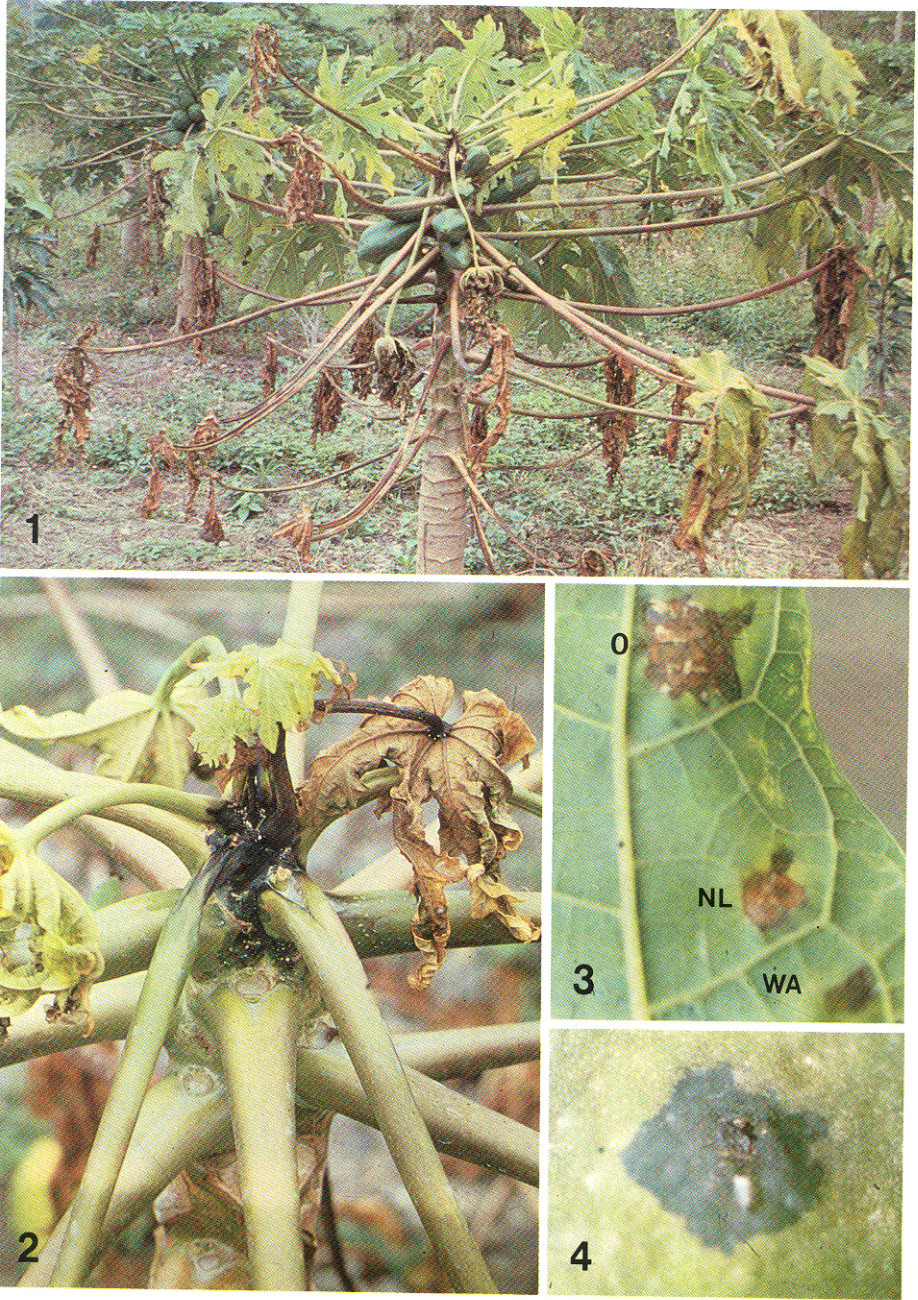
表一、木瓜黑腐病病原細菌與 *Erwinia cypripedii* 生理、生化特性之比較

Table 1. Comparison of physiological and biochemical characteristics of papaya black rot bacteria and *Erwinia cypripedii*

| Characters | <i>Erwinia</i> from papaya | <i>Erwinia</i> <i>cypripedii</i> ^{a)} | <i>Erwinia</i> <i>cypripedii</i> ^{b)} |
|------------------------------|-------------------------------|---|---|
| Gram stain | - | - | - |
| Catalase | + | | + |
| Kovacs' oxidase | - | | - |
| H ₂ S production | + | | + |
| Indole production | - | - | - |
| Hydrolysis of casein | - | - | - |
| Hydrolysis of gelatin | - | - | - |
| Hydrolysis of starch | - | | - |
| Hydrolysis of pectin | - | - | - |
| Hydrolysis of lipid | - | | - |
| MR test | - | | |
| V-P test | - | | |
| Nitrate reduction | + | | + |
| Urease | - | | - |
| Phenylalanine deaminase | - | + | + |
| Growth at 36°C | + | + | + |
| Growth in 5% NaCl | + | + | + |
| Gas from glucose | + | + | + |
| Na-citrate utilization | + | + | + |
| Arginine dihydrolase | - | | |
| Utilization of carbohydrates | | | |
| arabinose | + | - | + |
| glucose | + | | + |
| inositol | - | + | + |
| inulin | + | - | |
| lactose | - | - | - |
| maltose | - | + | |
| melibiose | + | + | + |
| raffinose | + | + | - |
| rhamnose | + | | + |
| sorbitol | + | | + |
| trehalose | + | + | |
| xylose | + | + | + |
| cellulose, dextrose | + | | |
| galactose, mannose | + | | |
| fructose | - | | |
| Potato soft rot | - | | - |

a) Characters listed in Bergeys' Manual, 8th edition⁽³⁾.

b) Characters published by Dickey⁽⁵⁾.



圖一、木瓜黑腐病病株全貌，注意莖頂端葉片下垂情形。

Fig. 1. Papaya with black rot disease. Note the withering of leaves on the top of stem.

圖二、木瓜黑腐病於株心處引起黑腐，患處葉片下垂之情形。

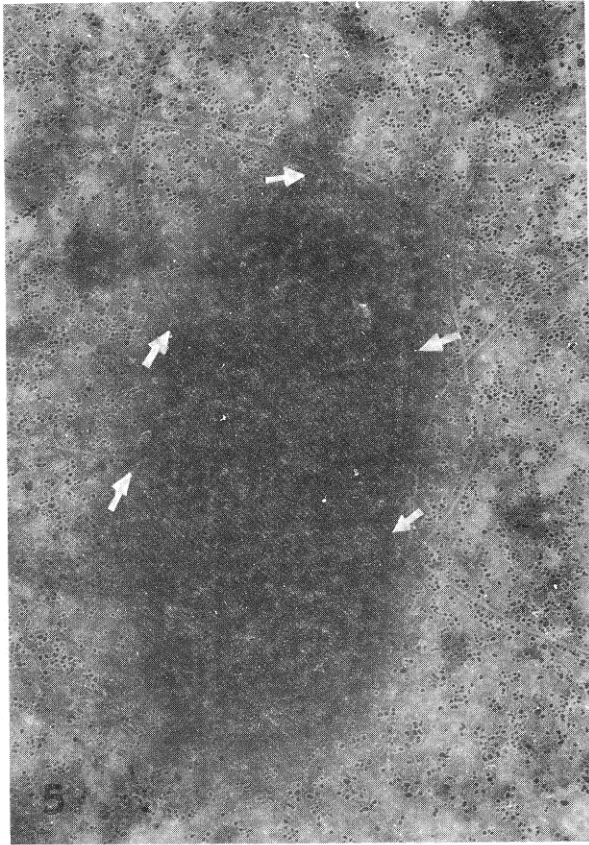
Fig. 2. Papaya with black rot disease on the top of the stem. Note the black rot portion and the withering of leaves.

圖三、木瓜黑腐病於葉片上造成之病徵，初期水浸狀角斑 (WA)、已呈壞疽之病斑 (NL) 及其上面之流膠物 (O)。

Fig. 3. The symptoms of papaya black rot disease on infected leaf. Water soaked angular leaf spot (WA), necrotic lesion (NL) with oöze formation (O).

圖四、木瓜黑腐病於果實上造成之病徵。

Fig. 4. Papaya black rot disease on the surface of an infected fruit.



圖五、木瓜黑腐病病原細菌，具周生鞭毛（↑）。

Fig. 5. The causal bacterium of papaya black rot disease with peritrichous flagella (↑).

PAPAYA BLACK ROT CAUSED BY *ERWINIA CYPRIPEDEII*L. S. Leu¹, C. C. Lee¹ and T. C. Huang²

Papaya black rot (so named in this article) was first discovered in the Taitung area in Taiwan, in 1979. The first symptom of the disease was the appearance of water soaked spots on the leaf blades. These spots gradually became necrotic. Afterwards, water soaking lesions also appeared on the top of the stems, which then rotted with a black color. The symptoms progressed downward slowly in the mature tissues. Seedlings, young trees and mature trees were infected. Fruits also showed black, water soaked spots in diseased orchards. The bacterium producing white colonies was constantly isolated from the infected tissues.

After spraying a bacterial suspension from the cultures, symptoms appeared on the leaf after 5-7 days and on top of the stems 2-3 months thereafter. After syringe injection, symptoms appeared both on the leaf and on the top of the stems 2-3 days after injection of the bacterial suspension.

Colonies of the bacterium on potato

(Key words: Papaya black rot disease, *Erwinia cypripedii*)

dextrose agar and nutrient agar were white. Cells of the bacterium measuring, about $2 \times 0.8 \mu\text{m}$, were gram-negative rods with peritrichous flagella. The metabolism of glucose was fermentative, catalase positive and Kovac's oxidase negative. H_2S was produced but no indole. Casein, gelatin, starch, pectin, and lipid were not hydrolyzed. The organism utilized sodium citrate and reduce nitrate to nitrite. Any possible activities due to urease, arginine dehydrolase, and phenylalanine deaminase were absent. M-r test was positive, and the V-P test negative. The bacterium will grow at 36°C and in 5% NaCl solution. It utilizes arabinose, cellulose, dextrose, lactose, maltose, mannose, melibiose, raffinose, rhamnose, sorbitol, sorbose, trehalose, and xylose as a carbon source. The morphological and physiological characters indicate that the causal bacterium was closely related to *Erwinia cypripedii*.

The possible significance of the disease on poor land is discussed.

1. Plant Pathology Division, Plant Protection Center, Taiwan. Wufeng, Taichung, Taiwan 431, Republic of China.
2. Taitung District Agricultural Improvement Station, Taitung, Taiwan 930, Republic of China.