

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物醫學碩士學位學程

碩士論文

Master Program for Plant Medicine

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

杭菊萎凋病害及其防治之研究

The study on wilt diseases of chrysanthemum and their control

顏嘉玲

Chia-Ling Yen

指導教授：孫岩章 博士

Advisor: En-Jang Sun, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月

July, 2015





## 誌謝

首先感謝我的指導老師孫岩章老師，給我很大的包容，決定自己的研究方向與研究方法，在研究過程中提供幫助與指導，百忙中還親自與我到臺東進行調查。感謝我的口委老師鄭秋萍老師、林乃君老師、郭章信老師在百忙中仍不厭其煩的給予我的論文指正與鼓勵。感謝鍾嘉綾老師提供分子鑑定器材幫助我完成實驗。感謝葉德銘老師在嫁接的問題上提供的寶貴意見。

感謝苗栗改良場朱盛祺學長帶我認識苗栗杭菊產業的重要前輩們，並且在研究的過程中總是熱心的提供資源。感謝臺東改良場許育慈學姊及苗改場張訓堯先生和所有改良場的前輩們在我研究期間給予協助。感謝江夏有機農場的玉妃姊以及黃克賢老師和所有的夥伴們，特別感謝妃姊總是在研究過程中有耐心的協助我並給予鼓勵。感謝農友曾逸弘先生、羅輝鳳先生、葉金城先生、韓順雄先生、李聲章先生、陳永宏先生、劉慶嘉先生、陳鏡榮先生、林金德先生協助我採樣調查。

謝謝麟傑熱心地協助我完成分子鑑定實驗。謝謝舜隲、昭儀和靖軒耐心地和我一起討論定序的問題。謝謝昱瑄提供嫁接技術的意見。謝謝我的好室友婷娟熱心地幫助我解決實驗材料的問題。謝謝宥任，雖然對我的研究領域不了解，還是給我的報告許多實用的意見。謝謝晏宇在研究過程中給我各種支持，是我最可靠的顧問和朋友。謝謝友倫、勝志、玉瑤、奕德、筱娟、長和、洵瑜、志千、鈺平及所有學長姐給予意見與協助。謝謝政融、佩琳、立雯、彥安、韋辰、品叡以及實驗室的所有夥伴們，感謝大家對我的包容和協助，很慶幸一路上有大家陪伴。

謝謝我的爸媽和姊姊在研究所的這段時間一路上在物質與精神方面支持我。

謝謝在實驗過程中被我摧殘的菊花、艾草以及所有的生命。

最後要謝謝自己。雖然我是這樣資質平庸又生性懶惰的人，但我還是讓自己完成了這篇論文。



## 中文摘要

杭菊 *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam 為多年生草本植物，其頭狀花序經乾燥後可作為藥用或飲料，具有保健功效。臺灣杭菊種植主要分布於苗栗以及台東地區。杭菊栽培過程病蟲害甚多，尤其近年來杭菊萎凋病在苗栗及臺東等杭菊種植地區皆造成危害，嚴重時田間植株死亡率可超過一成，其中以連作田更為嚴重。為探討造成臺灣杭菊萎凋病之病原，本研究自苗栗杭菊萎凋病株分離出鐮胞菌及若干細菌分離株，將菌株回接於健康苗株完成柯霍氏法則檢定，發現所得之細菌分離株具有病原性，而鐮胞菌分離株則無。雖然經由 TTC 培養基培養細菌分離株形態與青枯病相似，但分子定序結果確認此病原細菌分離株為伯克氏菌 *Burkholderia gladioli*。雖然本試驗結果顯示只有細菌分離株能造成萎凋病徵，但仍無法排除與鐮胞菌行共同感染之可能性。另外，探討以抗生素對病原之抑制效果，盆栽試驗結果發現處理組與對照組並無顯著差異。而以三種市售生物防治資材盆栽試驗防治效果，所得結果指出枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 製劑金雞牌賜倍效有較顯著之防治效果。選擇檢測艾草及越山菊作為抗病根砧之有效性，並先以根浸接種法確認艾草及越山菊皆沒有出現萎凋症狀。再以嫁接杭菊接穗之嫁接株進行浸根接種測試，結果顯示嫁接株以無菌水處理之對照組與接種處理皆未發生萎凋病徵。由此些結果推論以嫁接方法防治杭菊細菌性萎凋病害應具有發展之潛力。

關鍵字：杭菊萎凋病，杭菊細菌性萎凋，生物資材防治，抗生素防治、嫁接防治

## Abstract



*Chrysanthemum Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam is a perennial herb, whose head inflorescence can be used as herbal medicine or herb drinks after drying process, and it has been reported to have a wide range of health benefits. *Chrysanthemum* in Taiwan is grown mainly in Miaoli and Taitung. *Chrysanthemum* can be affected by many diseases; over the last few years, the wilt disease of *chrysanthemum* caused serious yield loss in Miaoli and Taitung regions. Over 10 percent of *chrysanthemum* withered in the field, especially in continuous cropping gardens, where the disease spreads seriously. To investigate the the causing agent of *chrysanthemum* wilt in Taiwan, several isolates of *Fusarium* spp. and bacteria were obtained from diseased plants collected from Miaoli *chrysanthemum* gardens in this study. The results of pathogenicity test showed that the bacteria isolates had pathogenicity while the *Fusarium* spp. did not. Though the colony phenotype of bacteria isolates on the TTC medium was similar to *Ralstonia solanacearum*, the molecular sequencing identification confirmed that the cause of *chrysanthemum* wilt should be *Burkholderia gladioli*. However, the possibility of co-infection with *Fusarium* cannot be excluded. Three antibiotics were chosen to control the *chrysanthemum* wilt in this study, and the results showed that there were no significant difference between the water control and the antibiotic treatments in a pot assay. The applications of three microbial agents for controlling the *chrysanthemum* wilt disease showed *Bacillus subtilis* WG6-14 had better control effect than the other treatments. Next, artemisia and Yue-Shan *chrysanthemum* were chosen to screen for resistance rootstocks. Both artemisia and Yue-Shan *chrysanthemum* grafted plants showed no wilt

symptom after inoculation by a root-dipping method. The grafted plants of the sterile water control treatments and inoculated treatments by the root-dipping method presented no wilt symptom. According to these results, the grafting method has great potential as a control mean for chrysanthemum wilt.

Key words: chrysanthemum wilt disease; bacterial wilt; microbial agent control; antibiotic control; grafting control.

# 目錄



誌謝 .....	i
中文摘要 .....	iii
Abstract.....	iv
表目錄 .....	ix
圖目錄 .....	xi
第一章 前言 .....	1
一、 杭菊栽培概說.....	1
二、 杭菊之基本特性及栽培管理.....	2
三、 臺灣地區杭菊之相關病害.....	3
四、 研究目的.....	4
第二章 前人研究 .....	5
一、 真菌引起之維管束萎凋病害.....	5
二、 細菌引起之維管束萎凋病害.....	6
三、 菊花之萎凋病害.....	7
四、 伯克氏菌所引起之植物病害.....	8
五、 萎凋病防治之研究.....	9
(一) 化學防治 .....	9
(二) 種植抗病品種 .....	9
(三) 拮抗微生物 .....	9
(四) 土壤添加物 .....	10
(五) 耕作防治 .....	10



六、 嫁接防治之研究.....	12
第三章 材料與方法.....	13
一、 臺灣主要杭菊產區萎凋病害之田間調查.....	13
二、 杭菊萎凋病相關病原菌之分離及初步鑑定.....	13
(一) 病原菌之分離及初步鑑定.....	13
三、 杭菊萎凋病病原性檢定.....	14
(一) 供試杭菊健康苗之繁殖.....	14
(二) 杭菊病株分離所得之鐮胞菌分離株病原性測試.....	15
(三) 杭菊分離所得細菌分離株之病原性測試.....	15
四、 杭菊萎凋病具病原性分離菌株之分子鑑定.....	19
(一) 目標片段之增幅 (PCR 反應).....	19
(二) 基因片段之定序.....	20
五、 相關資材防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	20
(一) 微生物製劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	20
(二) 抗生素藥劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	21
六、 嫁接防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	22
(一) 根砧接種測試.....	22
(二) 嫁接株剪根浸泡菌液接種.....	22
第四章 結果.....	24
一、 臺灣主要杭菊產區杭菊萎凋病害之田間調查.....	24
二、 杭菊萎凋病之相關病原菌之分離及初步鑑定.....	31
(一) 病原菌之分離及初步鑑定.....	31
三、 杭菊萎凋病分離菌株病原性檢定.....	35
(一) 杭菊健康苗之繁殖.....	35

(二) 杭菊病株分離所得鐮胞菌分離株之病原性測試 .....	36
(三) 杭菊病株分離所得細菌分離株之病原性測試 .....	37
四、 杭菊細菌萎凋病分離株之分子生物學鑑定.....	44
(一) 目標片段之增幅 (PCR 反應) .....	44
(二) 本研究之細菌分離株 HG01 及 HG02 及再分離菌株基因片段之定序 .....	44
五、 相關資材防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	51
(一) 微生物製劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究 .....	51
(二) 抗生素藥劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究 .....	51
六、 嫁接防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	53
(一) 根砧接種測試 .....	53
(二) 嫁接株浸根接種 .....	53
第五章 討論 .....	55
一、 臺灣苗栗、屏東與臺東地區杭菊萎凋病害之田間調查.....	55
二、 杭菊萎凋病之相關病原菌分離保存.....	55
三、 杭菊萎凋病病原性檢定.....	56
(一) 鐮胞菌分離株病原性測試 .....	56
(二) 細菌分離株病原性測試 .....	56
四、 病原分離菌株之分子鑑定.....	57
五、 相關資材防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	58
(一) 生物防治資材防治杭菊細菌性萎凋病效果之研究 .....	58
(二) 抗生素藥劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究 .....	59
六、 嫁接防治杭菊細菌性萎凋病之研究.....	59
七、 結論及未來發展.....	60
參考文獻 .....	61





## 表目錄

表 1、供病原性測試之杭菊扦插穗來源。 .....	15
表 2、杭菊萎凋病罹病指數之分級對照表。 .....	17
表 3、本研究所測試之生物資材 .....	21
表 4、本研究所測試之抗生素藥劑 .....	22
表 5、苗栗地區 2014 年至 2015 杭菊田間萎凋病及主要之病害與相關施作情形 調查結果 .....	26
表 6、屏東江夏有機農場 2014 年杭菊田間主要病害調查之結果 .....	28
表 7、臺東地區 2015 杭菊田間主要之病害與相關施作情形調查結果 .....	29
表 8、自苗栗地區杭菊萎凋病株分離可疑病原菌之結果 .....	32
表 9、自苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得真菌及細菌分離株之編號及其來源。 .....	32
表 10、自苗栗萎凋病杭菊分離所得四株鐮胞菌分離株對健康菊苗剪根浸泡接種之 結果 .....	37
表 11、杭菊病株分離所得細菌分離株以壓力注射法對離體葉片接種結果 .....	38
表 12、杭菊病株分離所得似青枯病菌 HG02 以菌液灌根接種之結果。 .....	39
表 13、二種可能具病原性之細菌分離株進行浸根接種病原性測試之結果 .....	41
表 14、病原性細菌分離株 HG02 對三種品系杭菊進行浸根接種病原性測試之結 果 .....	42
表 15、再分離之菌株序列與 HG02 分離株序列比對之結果 .....	50
表 16、分離株 HG01 及 HG02 以引子對 27F/1492R 經 PCR 增幅所得之 DNA 序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果。 .....	50
表 17、以白花品系杭菊盆栽進行 3 種生物製劑對分離株 HG02 防治之效果 ..	51

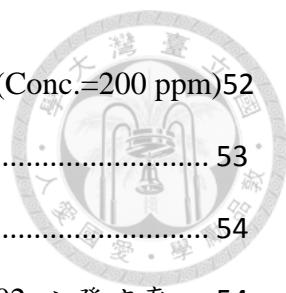


表 18、不同抗生素藥劑對於杭菊萎凋菌株 HG02 之抑制情形 (Conc.=200 ppm)	52
表 19、盆栽測試 3 種抗生素防治杭菊萎凋病之效果 .....	53
表 20、艾草及越山菊以浸根接種分離株 HG02 之發病率 .....	54
表 21、以艾草及越山菊為根砧嫁接杭菊再浸根接種分離株 HG02 之發病率 ....	54



## 圖目錄

圖 1、杭菊萎凋病罹病指數依病徵之分級。(A) 0 級 (B) 1 級 (C) 2 級以及 (D) 3 級。.....	18
圖 2、杭菊接穗接於艾草根砧之情況.....	23
圖 3、苗栗縣公館鄉在 2014 年夏季觀察田間杭菊萎凋病徵。.....	27
圖 4、苗栗銅鑼鄉地區 2014 年種植之健康杭菊，前期與水稻輪作。.....	27
圖 5、屏東江夏有機農場位於內埔地區之杭菊田。.....	30
圖 6、臺東杭菊植株於 2015 年所觀察到之炭疽病。.....	30
圖 7、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F412 之分生孢子型態。.....	33
圖 8、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F322 之分生孢子形態。.....	33
圖 9、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F522 之分生孢子形態。.....	34
圖 10、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F421 之分生孢子形態。.....	34
圖 11、自杭菊萎凋病株分離所得細菌分離株 HG02 於 TTC 培養基上生長之菌落特徵。.....	35
圖 12、臺大中非大樓頂樓簡易溫室中扦插成功之健康杭菊苗。.....	36
圖 13、杭菊葉片以壓力注射接種無病原性細菌分離株 HG05 之結果.....	38
圖 14、杭菊葉片以壓力注射接種 HG02 菌液後產生過敏反應壞疽。.....	39
圖 15、接種後發病之植株根部。A，部分根部褐化；B，根部完全褐化；C，根部殘缺不全。.....	40
圖 16、接種後發病之白花品種杭菊植株，莖段插入水中可呈現菌流現象.....	43
圖 17、病原性測試後以稀釋分離法對 6 發病杭菊進行病原菌再分離所得之菌落型態。.....	43
圖 18、以專一性引子對 759/760 進行核酸聚合酶連鎖反應產物電泳圖譜。.....	45




圖 19、以廣用之細菌 16S rDNA PCR 序列引子對 <i>Escherichia coli</i> 27F/1492R 進行核酸聚合酶連鎖反應之產物電泳圖。.....	46
圖 20、HG01 分離株以引子 27F/1492R 增幅後產物之部份 DNA 之序列。.....	47
圖 21、HG02 分離株以引子 27F/1492R 增幅後產物之部份 DNA 之序列。.....	48
圖 22、再分離之分離菌株以引子 27F/1492R 增幅後產物之部份 DNA 之序列。.....	49



# 第一章 前言

## 一、杭菊栽培概說

杭菊原產於中國，早期自中國引入臺灣。臺灣杭菊栽種品系主要分為黃花、白花以及紫花三種花色 (張和王, 2010)，目前尚未有品種名 (劉, 2012)。世界杭菊生產以中國大陸為主要產區，在中國重要產區浙江省桐鄉市杭菊種植面積高達 4200 公頃 (沈等, 2010)。而 2014 年杭菊在臺灣栽培面積於共約 48 公頃，產量約 47 公噸，其中苗栗縣銅鑼鄉及大湖鄉產量約佔總產量 72% (農情報告資源網, 2015)。苗栗縣栽培品種主要為杭白菊，係目前臺灣杭菊第一大產區。臺東地區為臺灣杭菊第二大產區，其種植地區主要分布於臺東市知本、卑南鄉以及鹿野、太麻里鄉等地，主要種植黃色品系杭菊 (陳和許, 2012)。臺灣各地所栽植之杭菊品系，由於西部市場需求及東部產量逐年下滑，苗栗地區亦有種植黃杭菊；而紫花品系由於花色表現不穩定故僅少量種植作展示與推廣之使用 (劉, 2012)。

杭菊主要取用其乾燥頭狀花序，因其具有揮發油、綠原酸及木犀草苷等保健有效成分可作為飲料或藥用 (衛生署臺灣中藥典編修委員會, 2013)，杭菊亦具有觀賞價值，每年產季產區皆呈現大片花海美景吸引遊客觀光，苗栗地區銅鑼鄉農會每年產季於十月底、十一月初更舉辦杭菊季增進當地農戶收入而使杭菊成為苗栗重要特用作物之一 (朱等, 2012；張, 2014)。



## 二、杭菊之基本特性及栽培管理

杭菊 *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam 為菊科 (Compositae) 多年生草本植物 (陳和許, 2012), 係於春季及夏季生長, 秋季及冬季開花之短日照作物。杭菊性喜溫暖, 適合栽培於陽光充足且排水良好之砂質土壤。其繁殖方式以扦插或分株育苗為主, 農友多採較省工省時之分株法育苗。杭菊多於農曆春節時期育苗, 並於國曆 3 月中旬至 4 月中旬定植。

杭菊不耐淹水, 需種植於高畦, 畦高約 30 公分, 整地作畦後即可定植。定植約一週後即可存活, 此時如有缺株則需補植。田間通常使用黑色塑膠布、防草蓆, 或稻草覆蓋畦面以防止雜草產生。杭菊栽種田間需要灌溉設施, 一般以畦溝灌溉較普遍, 水源較缺乏地區則較多以噴水帶灌溉。

杭菊生長期間, 於新稍枝條長達 15 公分時摘心, 藉以打破頂芽優勢, 促進測芽生長以增加分枝及花序數, 並且降低植株高度以防倒伏。摘心通常施行 3 至 6 次, 9 月初因即將進入花芽分化時期故停止摘心。杭菊生育後期植株莖枝較長, 可用花網或竹樁予以支撐以免倒伏。

當杭菊於 10 月中旬至 12 月中下旬花序展開約 7 至 8 分時可於晴天採收花朵, 由於花芽分化時間不一致, 一般可分 3 至 4 次採收, 必須以人工採花。採收後立即輸送至工廠乾燥。一般乾燥方式以循環式烘箱 60 至 80°C 脫水烘乾 12 小時, 即為可包裝銷售之杭菊成品 (朱等, 2012)。

採收後通常於本田選留 10 分之 1 健康母株, 將地上部枝葉剷除後覆蓋堆肥及泥土, 待母株越冬休眠後, 春天 1 至 2 月時從地下莖抽出之新芽可作分株芽繁殖, 或進行扦插苗培植 (張, 2014; 陳和許, 2012)。



### 三、臺灣地區杭菊之相關病害

國內已記載之杭菊病害包括：(1) 白銹病，由 *Puccinia horiana* Hennings 引起，主要發生在冬末春初低溫多雨季節；(2) 炭疽病，由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig 引起，周年發生，多濕季節較嚴重；(3) 葉斑病，由 *Septoria chrysanthemella* Saccardo 引起，好發於杭菊生長後期高溫多濕季節；(4) 灰黴病，由 *Botrytis cinerea* Pers. 引起，好發於春冬季低溫多濕季節；(5) 疫病，由 *Phytophthora* sp. 引起，多在育苗期發生，尤其好發於高濕環境；(6) 白絹病，由 *Sclerotium rolfsii* Sacc. 引起，於杭菊生長期好發於高溫多濕時節；(7) 莖腐病，由 *Rhizoctonia solani* 引起，通常發生在育苗時期；(8) 細菌性軟腐病，由 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 引起，好發於高溫多濕季節，尤其颱風過後病害蔓延更迅速；(9) 萎凋病：由鐮胞菌 *Fusarium oxysporum* 所引起 (朱等，2012)。杭菊具有連作障礙，田區之連作次數越多，通常萎凋病將越趨於嚴重 (陳和許，2012；朱和張，2010)，萎凋病嚴重時田間植株死亡率可超過一成 (朱和張，2010)，其發生常使杭菊於田間生長期造成缺株需要不斷補植；當遭遇梅雨季或颱風季等雨量較多之時節，若畦面高度不足而淹水，則淹水處容易大面積發生萎凋枯死，造成嚴重損失。故苗栗地區之杭菊栽植經常採取與水稻或芋頭輪作方式，而臺東地區之杭菊栽培則是與水稻或玉米等作物輪作，以減低萎凋病害發生。



#### 四、研究目的

萎凋病為杭菊生產過程之重要病害，罹病之杭菊植株於田間呈現缺水萎凋狀，即使補充水分也無法恢復原狀。病株隨著病勢發展最終枯死，無法正常開花而不具有生產力，一旦發現病株需要耗費人力補植。然而植物保護手冊中，用於杭菊之推薦使用藥劑並無針對杭菊萎凋病之用藥。除了輪作外，杭菊農民面對萎凋病害常無計可施，而輪作種植水稻及芋頭的收益往往不如杭菊。本研究實地訪查當地農友後了解到，為了防治杭菊萎凋病，農民幾乎已嘗試過所有植保手冊推薦用藥以及各種農藥資材行所推銷之防治資材，甚至不當使用防治資材卻不見得收到成效。如此無疑徒然耗費成本且破壞環境，又可能造成食品安全之疑慮。

在其它作物，例如番茄之青枯病與萎凋病以及絲瓜萎凋病等，也甚少有效之化學防治方法，然而皆有嫁接防治成功應用之例子可供參考。經請教臺灣大學園藝系葉德銘老師之建議，觀賞用之菊藝中，大立菊之系統與杭菊較接近，可參考大立菊根砧應用在嫁接防治上。

本研究於 2014 年 7 月自苗栗地區杭菊萎凋病株莖基部以稀釋分離法以及組織分離法得到若干鐮胞菌分離株以及具有高度流動性疑似青枯病之細菌分離株。在國際上鐮胞菌以及青枯病菌都曾有報導造成菊花萎凋病之記錄，而在臺灣杭菊萎凋病相關的病害探討仍十分有限。

故本研究欲探討造成苗栗杭菊萎凋病之確切病因，並且測試以抗生素處理與嫁接法防治此病原之效果。期望藉由本研究之執行能對此病害有更多的了解，並進而研擬有助此防治此病害之可能措施。



## 第二章 前人研究



### 一、真菌引起之維管束萎凋病害

真菌性萎凋病危害許多世界重要作物，造成維管束萎凋之真菌特別重要者有以下幾種：長喙黴屬 (*Ceratocystis* spp.)、造成荷蘭榆樹病 (*Ophiostoma* spp.)、鐮胞菌屬 (*Fusarium* spp.)，以及輪黴菌屬 (*Verticillium* spp.) (Agrios,2004)。

*Ceratocystis* 屬中有 3 種為世界重要之樹木萎凋病原，包括； *Ceratocystis fagacearum* 引起之橡樹萎凋病，其孢子會造成維管束阻塞或誘發寄主植物之抗病反應產生樹脂及侵填體進而形成萎凋病徵 (Appel,1995)； *Ceratocystis fimbriata* 引起之桉樹萎凋病；以及也是由 *Ceratocystis fimbriata* 引起之可可樹萎凋病 (Roux *et al*,2000)。 *Ophiostoma novo-ulmi* 引起之荷蘭榆樹病也是世界重要樹木病害，這些真菌引起之樹木病害，同時也是列在本國輸入植物或植物產品檢疫規定之重要的防檢疫病害。

在作物萎凋病害方面， *Fusarium oxysporum* 之植物寄主範圍非常廣泛，包含葫蘆科、百合科、茄科、菊科、豆科、芭蕉科等作物。其中 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 引起番茄萎凋病使番茄維管束產生褐化病徵，以及 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 引起之香蕉黃葉病在全球都是重要病害。

*Verticillium* 屬引起之病徵與 *Fusarium* 屬造成之萎凋病十分相似。  
*Verticillium* 屬的為害範圍遍及世界，然而其在溫帶及亞熱帶地區地位特別重要，能引起花卉、蔬菜、果樹、草莓和林木等作物之萎凋病害，例如棉花萎凋病 (Pullman and DeVay, 1982) 及菊花萎凋病 (Douglast and MacHardy,1981) 等。

## 二、細菌引起之維管束萎凋病害

細菌性維管束萎凋病亦造成許多世界重要作物之危害，其中多為草本植物。以下列出特別重要者：由 *Clavibacter* (*Corynebacterium*) 所造成之馬鈴薯輪腐病 (*C. michiganense* subsp. *sepedonicum*) 以及番茄潰瘍病 (*C. michiganense* subsp. *michiganense*)；由 *Curtobacterium* (*Corynebacterium*) *flaccumfaciens* 所造成之菜豆萎焉病；由 *Erwinia tracheiphila* 引起之瓜類萎凋病以及 *Erwinia amylovora* 引起之梨火傷病；由 *Pantoea stewartii* 引起之玉米細菌性萎凋病；由 *Burkholderia caryophylli* 引起之康乃馨萎凋病；以及由 *Ralstonia solanacearum* 所引起之茄科與植物青枯病等。細菌性萎凋病徵外觀與真菌性萎凋相似，然而真菌性萎凋病係真菌佔據植物維管束組織直至植物死亡，細菌性萎凋病則是細菌破壞木質部細胞壁或細菌產生之毒素令植物維管束或植物氣孔功能產生障礙造成植物萎凋。細菌性萎凋病防治相當困難，主要採取輪作、抗病品種、無菌種苗、防治昆蟲媒介、去除田間病株以及確實做好田間衛生等措施 (Agrios, 2004)。

### 三、菊花之萎凋病害

菊花為世界重要之切花作物，菊花之萎凋病害對於切花產業有相當重要之影響。真菌性病原與細菌性病原都曾經被報導能造成菊花萎凋病徵，例如真菌有 *Verticillium dahlia* (Douglas & MacHardy,1981) 與 *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (Emberger & Nelson,1981)；細菌的部分則有在菲律賓發現由 *(Ralstonia) Pseudomonas solanacearum* 所引起之菊花細菌性萎凋病 (Wells and Roldan,1923)。在臺灣，觀賞用菊花 (*Chrysanthemum* spp.) 之萎凋病曾被報導係由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* 所引起，此病發生於春末至初秋之間，尤以夏季高濕時最為嚴重，冬季則不發生。初期葉片轉黃之後整株萎凋，晚間暫時復原不久後便不再復原，整株枯死，同時根部腐爛，切開維管束有褐化現象 (楊秀珠，1986；中華民國植物病理學會，2002)。

#### 四、伯克氏菌所引起之植物病害

伯克氏菌屬 (*Burkholderia* spp.) 其分類地位如下 (Bernner *et al.*, 2005) :

Kindom Bacteria

Phylum Proteobacteria

Class  $\beta$ - Proteobacteria

Order Burkholderiales

Family Burkholderiaceae

Genus *Burkholderia*

伯克氏菌屬於格蘭氏陰性菌，對許多植物具有病原性，能造成萎凋、腐爛、枝枯或潰瘍等病徵。在 100 多年前伯克氏菌屬以及青枯病菌屬細菌皆被歸類於假單孢菌屬 *Pseudomonas* spp. (Kerstens *et al.*, 1996)，如今以多相分類方法 (polyphasic taxonomic approach)，*Pseudomonas andropogonis*、*P. caryophylli*、*P. cepacia*、*P. gladioli*、*P. glumae*，以及 *P. plantarii* 皆已被歸類於 *Burkholderia* 伯克氏菌屬 (Allen *et al.*, 2005；Coenye and Vandamme, 2007)。伯克氏菌在臺灣之植物病害曾經被報導者：由 *Burkholderia gladioli* 引起之鳳梨果腐病 (許等，2008) 以及由 *Burkholderia caryophylli* 所引起之星辰花、康乃馨、洋桔梗等花卉之萎凋病 (吳等，2006)。



## 五、萎凋病防治之研究

萎凋病害在世界各種作物生產扮演重要角色，相關防治方法之研究也甚多。

以下列出幾種萎凋病防治方式：

### (一) 化學防治

在臺灣萎凋病害之化學防治推薦藥劑並不多，植物保護手冊中只有少數病害有推薦化學防治方法。例如由 *Fusarium oxysporium* f. sp. *gladioli* 引起之唐菖蒲萎凋病，依照植物保護手冊推薦之化學防治方法為將球莖於種植前浸泡稀釋 2000 倍 25%撲克拉水基乳劑或浸泡稀釋 2000 倍 25%撲克拉乳劑 3 小時。由 *Erwinia sinocalami* Lo, Chen et Huang 所引起之麻竹細菌性萎凋病之推薦化學防治方式為：施用 40%「溴氯混合劑」乳劑 (Ground) 500 倍稀釋液，或施用 85%「邁隆」可濕性粉劑 (Dazomet) 500 倍稀釋液，實施土壤燻蒸，每平方公尺施用 4 公升。

### (二) 種植抗病品種

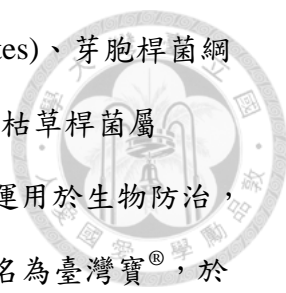
例如在臺灣種植耐病品種臺蕉一號、新北蕉（亦稱寶島蕉）、臺蕉五號之健康組織培養苗可以防治香蕉黃葉病（趙等，2008）；由 *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 引起之樹薯細菌性萎凋病可以種植抗病品種「一支香」（農業藥物毒物試驗所技術服務組和田間試驗技術小組，2013）。

### (三) 拮抗微生物

拮抗微生物幫助植物之抗病機制大約有以下幾種：(1) 競爭：即利用拮抗微生物與有害微生物之間競爭營養及生存空間等資源控制有害微生物之族群；(2) 直接分泌抗生物質抑制或殺死有害微生物；(3) 寄生及捕捉：拮抗微生物直接補食有害微生物以其為營養源；(4) 誘發植物對有害微生物之抗性；(5) 有益微生物能產生幫助植物生長之物質使植物更能適應逆境 (Bonanomi *et al*, 2010)。

田間常被應用於防治土壤病害之拮抗微生物有：例如枯草桿菌、木黴菌及放





射線菌等。枯草桿菌為格蘭氏陽性菌，屬於厚壁菌門 (Firmicutes)、芽胞桿菌綱 (Bacilli)、芽胞桿菌目 (Bacillales)、芽胞桿菌科 (Bacillaceae)、枯草桿菌屬 (*Bacillus*)(Paul *et al.*,2009)。目前枯草桿菌製劑在世界各地廣泛運用於生物防治，例如已商品化之枯草桿菌 *Bacillus subtilis* Y1336，在臺灣商品名為臺灣寶<sup>®</sup>，於網站(百泰生物科技，2011)敘明具有防治番茄青枯病 (*Ralstonia solanacearum*)、芋頭軟腐病 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 等病害之功效；而另一枯草桿菌 *Bacillus subtilis* strain WG6-14 在臺商品名為金雞牌賜倍效<sup>®</sup>，於網站 (沅美生物科技，2011) 敘明具有防治水稻秧苗徒長病 (*Gibberella fujikuroi* (*G. moniliformis*) *Fusarium moniliforme* (無性世代))之功效。鏈黴菌 (*Streptomyces* spp.) 屬於放線菌門 (Actinobacteria)、放線菌綱(Actinobacteria)、放線菌目 (Actinomycetales)、鏈黴菌科 (Streptomycetaceae)(Goodfellow *et al.*,2012)；鏈黴菌能產生鏈黴素 (streptomycin)、新黴素 (Neomycin) 等抗生物質而能被應用於保護作物免於受土壤傳播病原危害(Crawford *et al.*, 1993; Kieser *et al.*, 2000)。

#### (四) 土壤添加物

使用土壤添加物之防治機制大致上可分為三個方面：(1) 產生抗生物質減少土壤中有害微生物數量；(2) 誘生拮抗微生物之族群數量；(3) 提供作物營養增加對有害微生物之抗性 (王等，2009)。

堆肥經常用作土壤添加物以提供植物養分之補充，其對於土媒病害的防治也經常被討論，例如於本田栽植前，在土中混拌 SH 土壤添加物 (甘蔗渣 4.4%、稻殼 8.4%、蚵殼粉 4.25%、尿素 8.25%、硝酸鉀 1.04%、過磷酸鈣 13.16%、矽酸爐渣 60.5%) 可用以防治镰胞菌以及青枯病菌引起之萎凋病 (黃和孫，1992；朱等，2014；張，1987)。

#### (五) 耕作防治

##### 1. 去除田間病株

於田間發病率尚低時，及時清除病株。(趙等，2008)

## 2. 運用輪作防治萎凋病

連作栽培容易使土壤肥力不均，或造成土壤酸化或鹼化，直接或間接影響作物生育。而連作寄主植物容易使土壤中病原累積，難以防治。故以輪作其他非寄主作物降低病原在環境中之數量。

例如以輪作花椰菜防治 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* 引起之萵苣萎凋病及 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 引起之草莓萎凋病 (Koike and Gordon, 2015; Gordon and Koike, 2015)。在臺灣則建議與水稻輪作以防治香蕉黃葉病，以及 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* 引起之豌豆萎凋病等 (趙等, 2008; 汪, 1986, 林和方, 1996)。

## 六、嫁接防治之研究

嫁接應用於作物生產由來已久，早在西元前 1800 年就有發現古人運用嫁接生產蔬菜之記錄 (Mudge *et al*,2009)。自 1920 年代開始有記錄日本以及韓國利用嫁接抗病根砧防治由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 引起之番茄萎凋病 (Davis *et al*,2008)。嫁接防治被運用於防治許多種土媒病害，例如線蟲、細菌(如：*Ralstonia solanacearum* 及 *Pseudomonas* spp.)、真菌 (如：*Didymella bryoniae*、*Monosporascus cannonballus*、*Fusarium* spp.、*Verticillium* spp.、*Colletotrichum coccodes*)(Gilardi *et al*，2013) 及卵菌 *Phytophthora* spp 等 (Genova *et al*,2013)。

在臺灣，嫁接防治已被應用於防治許多作物病害。例如：以菱角絲瓜嫁接圓筒絲瓜可防治由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *luffae* 引起之絲瓜萎凋病 (徐，2002)；應用南瓜為根砧嫁接洋香瓜可防治由 *Monosporascus cannonballus* 引起之洋香瓜黑點根腐病 (林和蘇，2010)；亞洲世界蔬菜中心在臺灣以不同品系茄子為根砧嫁接番茄接穗使抗線蟲、青枯病及萎凋病等土壤傳播病害 (Vurskan and Yammaz, 1991)。

以往菊花嫁接之應用主要是以藝術欣賞為訴求，較少作為抗病策略，然而也有應用嫁接方式來幫助觀賞用菊花對抗淹水逆境之探討(許，2010；邱，2012)，嫁接菊藝中最負盛名者當屬大立菊。大立菊是一種造型菊栽培方式，是運用嫁接與摘心技術使單一株菊花上可以開出成千朵大小相同、排列整齊之菊藝，在臺灣每年 11 月士林官邸皆有展覽大立菊為主題之菊藝展示。大立菊之嫁接採用之根砧具有根系發達、生長勢強、和抗逆性佳等特性，在大陸通常以青蒿 (*Artemisia carvifolia*) 以及黃蒿 (*Artemisia annua*) 作為大立菊根砧，臺灣則以艾草 (*Artemisia princeps* var. *orientalis*) 及分枝多且生長勢強之大菊品系 (*Dendranthema morifolium*) 作為大立菊根砧 (上海花圃，1981；臺北市工務局，2014)。



## 第三章 材料與方法



### 一、臺灣主要杭菊產區萎凋病害之田間調查

本項研究係自 2014 年夏季至 2015 年夏季調查臺灣主要杭菊產區之萎凋病害及其他相關病蟲害，同時收集有關施作與產量之資料。地點包括苗栗、臺東、及屏東地區。

有關苗栗地區之杭菊，主要地點包括苗栗縣公館鄉羅輝鳳先生之杭菊田、銅鑼鄉曾逸弘先生之杭菊田、銅鑼鄉韓順雄先生之杭菊田、銅鑼鄉陳永宏先生之杭菊田、銅鑼鄉李聲章先生杭菊田、以及銅鑼鄉葉金城先生之杭菊田。本研究也在 2014 年夏季調查屏東江夏有機農場所屬鹽埔及內埔地區之杭菊田，另在 2015 年調查臺東知本主要杭菊產區之田間病害狀況，主要有農友陳鏡榮先生及林金德先生之杭菊田。

### 二、杭菊萎凋病相關病原菌之分離及初步鑑定

#### (一) 病原菌之分離及初步鑑定

本項杭菊萎凋病相關病原菌之分離，係採用組織分離法及稀釋分離法二種。組織分離法係將杭菊田採得之萎凋病株莖基部，以消毒過之刀片切出約 5×5 mm 之病健部，浸泡於 2% 次氯酸鈉水溶液中進行表面消毒 30 秒後，以無菌水漂洗 2 次，每次 20 秒，將多餘水分瀝乾後置於 1.5 % (w/v) 水瓊脂培養基 (Water agar, WA, Difco™) 中進行常溫培養，待長出菌絲後，於解剖顯微鏡下，以消毒過之解剖刀切取菌絲尖端，移至馬鈴薯葡萄糖平板培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA, Difco™) 上，待菌落長至足夠大時，切取菌絲塊置入裝有 1 mL 無菌水之 1.5 mL 微量離心管 (Eppendorf) 中，再置於 4°C 冰箱中保存以供後續之鑑定及試驗。

稀釋分離法係將病株之莖基部以消毒過之解剖刀切下病健部組織，浸泡於 2% 次氯酸鈉水溶液中進行表面消毒 20 秒後，以無菌水每次 10 秒共漂洗二次，將組織塊多餘水分吸乾後，即移入含有 1 mL 無菌水之微量離心管中，使用滅菌過之研磨棒磨碎組織塊，並將此研磨後得到之水溶液序列稀釋 10 至 1000 倍後，各靜置 30 分鐘即吸取 0.1 mL 病組織液滴於馬鈴薯葡萄糖平板培養基 (PDA) 上，再以消毒過之三角玻棒將病組織液均勻塗佈於培養基表面，放置於 12 小時光週期、28°C 生長箱中培養，四天後觀察分離之結果，再將單一菌落移到新的 PDA 及 NA (Nutrient Agar, Difco™) 培養基培養。

所分離到之細菌菌落型態疑似青枯病菌，故隨後亦使用 TTC 選擇性培養基進行初步之形態學鑑定。TTC 選擇性培養基之配方係參考 Schaad 等人之報告 (Schaad *et al*, 2001) 之報告，其配方為每一公升培養基中含有：

1. casein hydrolysate 1.0 g
2. Peptone 10.0 g
3. Glucose 5.0 g
4. Agar 17.0 g

以上材料高溫高壓滅菌後，加入 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 混合均勻後即完成配製。

### 三、杭菊萎凋病病原性檢定

#### (一) 供試杭菊健康苗之繁殖

供試杭菊苗源有三，列於表 1。分別自此三種品系之杭菊植株由上位葉往下數 3 至 4 個莖節 (約 10 cm) 之枝條作為扦插穗，將最下方之節位插入介質後，放置於臺灣大學中非大樓頂樓簡易溫室中培養。栽培介質以泥炭土 (Bas Van Buuren, BVB, 巴斯萬伯倫公司生產，荷蘭製造) 及根基旺以 1:1 混合，待苗株生

長一個月根系穩定後方可供接種試驗使用。



表 1、供病原性測試之杭菊扦插穗來源。

Table 1. The sources of chrysanthemum cutting for the pathogenicity test.

供應者	品種
屏東江夏有機農場	小朵黃花
苗栗農友曾逸弘先生	白花
苗改場作物改良課	黃花

### (二) 杭菊病株分離所得之鐮胞菌分離株病原性測試

本研究自 2014 年起，即自苗栗杭菊田間病株，以組織分離法得到多株鐮胞菌分離菌株。此些菌株皆於 PDA 培養基培養至菌落長滿直徑 9 cm 之培養基時，進行剪根接種法 (Reid *et al*, 2002) 之病原性測試，過程為以無菌水洗下孢子製成孢子懸浮液後，以血球計數器計數。將計數後的孢子懸浮液以無菌水稀釋到孢子濃度約  $1 \times 10^6$  spores/mL，即取孢子懸浮液 150 mL，浸泡剪去三分之一根部之一個月大杭菊扦插苗，浸泡 20 分鐘後再回種於培養土，以無菌水浸泡作對照組，一株為一重複，共進行三重複。

### (三) 杭菊分離所得細菌分離株之病原性測試

#### 1. 細菌分離株對葉注射之病原性測試

此測試方式參考林奕德之作法 (林奕德, 2014)。將受試之細菌分離株以劃線平板的方式在 PDA 培養基上於常溫培養 3 天後以 20 mL 無菌水洗下細菌懸浮液，將此細菌懸浮液以分光光度計在波長 600nm 下調整 OD 值達 0.3 時，細菌濃度約等於  $10^8$  cfu/mL，以此細菌懸浮液作為後續接種實驗之接種原。

將分離自苗栗杭菊病株之細菌分離株 (HG01、HG02 和 HG05) 製備成細菌懸浮液，並設無菌水處理為對照組。將此懸浮液以無針頭之針筒用壓力注射的方式，自葉背分別打入白花、黃花及小朵黃花等三品系，三種品系之杭菊葉片組織內，使其葉肉組織呈現水浸狀後，放入裝有以無菌水濕潤之擦手紙作為保濕之乾淨夾鍊袋內，3 天後觀察葉片變化情形，每處理 3 重複。此實驗中，對杭菊可能具有病原性之菌株會在葉片水浸狀區域形成壞疽。參考此結果繼續進行後續接種及鑑定作業。

## 2. 菌液對盆苗灌根接種之病原性測試

以白花杭菊作為受試植物，使用菌液倒入法 (吳等，2008) 直接於邊長約 9 cm 之 4 週大穴盤苗介質內倒入細菌懸浮液 30 mL (OD 600 = 0.3)。並且以無菌水作為對照組，一株為一重複，每處理 6 重複。


## 3. 菊苗以菌液浸根接種之病原性測試

分別以白花、黃花和小朵黃花三種不同品系之四週大杭菊苗株為受試植物，將製備好之細菌懸浮液 150 mL 作為接種源，浸泡裸根杭菊苗根部 30 分鐘後回種於介質內，並以無菌水作為對照組，一株為一重複，各進行 6 重複。本次菌液浸根接種杭菊裸根苗後之杭菊萎凋病評量，是依據罹病指數分成 3 級，詳如表 2 及圖 1。而各處理組杭菊萎凋病發病嚴重度之計算公式為：

$$\text{嚴重度 (\%)} = \left[ \frac{\sum \text{級數} \times \text{該級罹病植株數}}{3 \times N} \right] \times 100$$

表 2、杭菊萎凋病罹病指數之分級對照表。

Table 2. The disease index of the chrysanthemum wilt disease.



級別	病徵描述
0	植株葉片均翠綠挺立。
1	1% 至 30% 之葉片下垂。
2	50% 以上之葉片下垂，葉片退色呈灰綠色。
3	50%-100% 之葉片下垂且呈現乾枯萎凋狀。



(A) 0 級



(B) 1 級



(C) 2 級



(D) 3 級

圖 1、杭菊萎凋病罹病指數依病徵之分級。(A) 0 級 (B) 1 級 (C) 2 級以及 (D) 3 級。

Figure 1. The disease symptoms for each disease index of the chrysanthemum wilt disease. (A) 0, symptom; (B) 1, 1-30%; (C) 2, above 50% wilted and (D) 3, all the leaves of the plant are wilted.

#### 4. 病原性測試後以稀釋分離法進行病原菌之再分離

將人工接種發病植株清洗並且表面消毒後，即將病株莖基部褐化之病健部以稀釋分離法進行再分離，並將所得分離株與原接種之分離株進行比對及鑑定。

#### 四、杭菊萎凋病具病原性分離菌株之分子鑑定

##### (一) 目標片段之增幅 (PCR 反應)

因初步自 TTC 培養基之培養特性判定本研究之細菌病原菌株可能屬於青枯病菌，但為確定該細菌病原菌分類歸屬，乃進一步以對 *Ralstonia solanacearum* 種之細菌具有專一性之引子片段 759(5'-GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC-3')，及 760(5'-GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG-3') (Opina *et al*, 1997) 進行核酸聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，並以廣用之 *Escherichia coli* 之 16s rDNA 細菌序列引子對 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')，及 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') 進行 PCR 反應以增幅 HG01、HG02 以及再分離菌株之 16s rDNA 序列作定序用。

PCR 及電泳分析流程如下：於 PCR 反應管加入 foreword primer 以及 reverse primer 各 1  $\mu$ L，2 X Taq DNA Polymerase Master Mix RED 7.5 $\mu$ L，dd H<sub>2</sub>O 5.5 $\mu$ L 使最後之反應總體積為 15  $\mu$ L，以 tip 沾點欲反應之細菌單菌落後與反應管中溶液輕輕混合均勻，略加以離心。將此 PCR 反應管放入已預熱為 94 $^{\circ}$ C 之聚合酶連鎖反應器，反應器設定反應程式為 94 $^{\circ}$ C 預跑 1 分鐘，再以 94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 1.5 分鐘進行 35 個循環；最後 72 $^{\circ}$ C 維持 2 分鐘，再以 12 $^{\circ}$ C 保存，完成反應。反應完成後，取 5  $\mu$ L PCR 產物以及 1 kb DNA marker 分別注入 1%瓊脂凝膠的 well 中，並且分別加入 ddH<sub>2</sub>O 作為對照組以及自食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 購得之 *Ralstonia solanacearum* 菌株 12605 同步進行 PCR 反應之產物作為負對照組，以 6V/cm 之電壓進行電泳分析，電泳 20 分鐘後，將

凝膠取出放入 EtBr 水溶液中，輕輕搖晃 15 分鐘染色。染色完成後，將此凝膠置於 UV 燈箱內，觀察並照相。



## (二) 基因片段之定序

PCR 產物之定序係委託基龍米克斯生物科技股份有限公司進行相關之純化及定序，取回之序列經校正後，於美國國家生物技術信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 網站以 BLAST (Basic Local Search Tool) 功能比對本研究所使用之分離菌株之分類地位。

## 五、相關資材防治杭菊細菌性萎凋病之研究

### (一) 微生物製劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究

為測試相關資材對於杭菊細菌性萎凋病之盆栽防治效果，乃選擇白花品系之杭菊一個月之扦插苗，將扦插苗除土裸根後分別將根部（未斷根處理）浸泡於 HG02 分離株菌液 30 分鐘後回種於穴盤苗內放置 24 小時，以供後續防治資材防治之測試。

為測試生物防治資材防治細菌性杭菊萎凋病之效果，乃將所選擇之市售生物防治資材（如表 3），依照產品推薦使用濃度配製成水溶液，澆灌已接種細菌性萎凋病分離株 HG02 24 小時後之杭菊盆基部後，隨即放回溫室觀察發病或防治之情形，以無菌水作對照組，每處理各 6 重複，一株為一重複。



表 3、本研究所測試之生物資材

Table 3. The microbial agents tested in this study.

商品名	Scientific name	來源	用法
金雞牌賜倍效	<i>Bacillus subtilis</i> WG6-14	沅漢生物科技股份有限公司	稀釋 1000 倍
臺灣寶	<i>Bacillus subtilis</i> Y1336	百泰生物科技股份有限公司	稀釋 1000 倍
安心寶	<i>Streptomyces candidus</i> Y21007-2	百泰生物科技股份有限公司	稀釋 800 倍

## (二) 抗生素藥劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究

### 1. 以 Kirby-Bauer 法測試抗生素對 HG02 分離株之抑制性

為測試不同抗生素防治細菌性杭菊萎凋病之效果，以修改過之 Kirby-Bauer 法 (Bauer and Kirby, 1996) 測試具病原性之細菌分離株對各種抗生素的感受性，方法是將濃度 200 ppm 之 20  $\mu$ L 抗生素水溶液分別滴在直徑 0.5 mm 之圓型濾紙上，待濾紙陰乾後再將此濾紙放置於已平塗受試菌株菌液之 PDA 培養基上，一天後觀察抗生素抑制細菌生長情形，共進行 4 重複，一片濾紙處理為一重複。所選用之測試藥劑如表 4，以此結果選擇抑制效果最佳的三種藥劑進行後續之盆栽測試。

### 2. 抗生素防治杭菊細菌性萎凋病盆栽測試

盆栽測試係依照前述試驗之結果，選擇產生抑制圈最大之前三種藥劑，各以 200 ppm 之濃度，每盆 50 mL，倒入已接種細菌性萎凋病分離株 HG02 經 24 小時後之杭菊盆莖基部 (杭菊植株未斷根處理)，並以無菌水作為對照組，再隨後觀察發病或防治結果。每處理各 6 重複，一株為一重複。

表 4、本研究所測試之抗生素藥劑

Table 4. The antibiotics tested in this study.

English name	Chinese name	Manufacturer
Ampicillin	安比西林	Sigma
Neomycine	新黴素	Sigma
Keflex	頭孢子菌素	禮來
Rifampicin	立汎黴素	永信
Tetracycline hydrochloride	四環黴素	杏輝
Novobiocin sodium salt	新生黴素	Sigma
Streptomycin sulfate	鏈黴素	Sigma
Thiophanate methylstreptomycin	多保鏈黴素	大勝化學工業股份有限公司

## 六、嫁接防治杭菊細菌性萎凋病之研究

### (一) 根砧接種測試

本試驗以大立菊常用之根砧艾草 (*Artemisia princeps* var. *orientalis*) 以及越山菊 (*Dendranthema morifolium*) 作為嫁接根砧，以白花杭菊作為接穗。先對此兩種根砧接種測試其抗感病性。

方法係以細菌分離株 HG02 製備之細菌懸浮液 (OD 600 = 0.3) 浸泡剪去三分之一根段之裸根艾草與越山菊植株根部，並以無菌水作對照組，浸泡 30 分鐘後回種於邊長 9 cm 之方型穴盤內，各 6 重複，一株為一重複。

### (二) 嫁接株剪根浸泡菌液接種

首先製備待測試之嫁接株。嫁接時，越山菊本葉已達到 4 片葉；艾草植株直接購自建國假日花市，嫁接時保留 3 至 5 片本葉，以進行合接。砧木留取 2 至 3 片本葉，並由所留取最上位本葉上方 0.5 至 1 公分處斜切 0.5 至 1 公分切

口。接穗以心葉下保留 2 至 3 片本葉，由第 2 本葉下之莖斜切 0.5 至 0.7 公分，接於砧木接口處，以嫁接夾固定於接口處（圖 2），並且套上夾鍊袋保濕後，放置於陰涼處，一週後移至中非大樓頂樓簡易溫室培養，每間隔 6 小時灑水一次，以此嫁接植株作為後續接种植株。

以細菌分離株 HG02 製備之 150 ml 細菌懸浮液 (OD 600 = 0.3) 作為接種源，浸泡剪去三分之一根段之裸根艾草與越山菊根砧嫁接植株根部，並以無菌水作對照組，浸泡 30 分鐘後回種於邊長 9 cm 之方型穴盤內，共 3 重複，一嫁接株為一重複。



圖 2、杭菊接穗接於艾草根砧之情況

Figure 2. A chrysanthemum grafting plant, with the chrysanthemum scion held to the artemisia understock with a grafting clip.

## 第四章 結果



### 一、臺灣主要杭菊產區杭菊萎凋病害之田間調查

於 2014 年夏季至 2015 年夏季，針對杭菊主要產區之萎凋病及相關病害進行田間調查，地點包括苗栗公館鄉及銅鑼鄉、屏東江夏有機農場、臺東知本地區等。除了記錄杭菊萎凋病等病害發生情形外，亦調查去年產量及輪作情形，苗栗地區結果記錄如表 5，屏東地區結果如表 6，臺東地區結果如表 7。特將結果概述如下：

苗栗地區的杭菊農友多輪作水稻及芋頭，2015 年多於清明節後約國曆四月中下旬即移植杭菊苗入本田。重要案例有：(1) 公館鄉羅先生之杭菊在 2014 年前期與芋頭輪作，田間有零星分布萎凋植株如圖 3，且萎凋植株上可能同時有炭疽病葉。2015 年延後到五月初移植，於調查時間 (6 月) 尚未觀察到萎凋病株。(2) 銅鑼鄉曾逸弘先生之杭菊未輪作，2014 年萎凋病況相對較嚴重，然而去年單位面積產量反而較其他農友高 (表 5)。(3) 李聲章先生之杭菊：2014 年前期種植水稻，為苗栗地區少數首次種植杭菊的地點，杭菊植株相對健康 (圖 4)。(4) 葉金城先生之杭菊：2015 年由於部分畦面高度不足，且適逢移植後梅雨季淹水，萎凋病害達到兩成。韓順雄先生之杭菊：採用較粗放管理方式，不使用慣行農藥，產量也較其它苗栗地區農友低。

屏東江夏有機農場之杭菊：該農場之杭菊有二地點種植杭菊，其一地點位於內埔鄉，杭菊為二年生宿根植株，且採用較粗放管理方式，田內雜草密度偏高 (圖 5)，植株間通風較差，而有觀察到萎凋病及白絹病之發生。另一地點為鹽埔鄉永隆村，此部分田地勢較低，區域排水不良而有萎凋病及較多葉斑病害發生。屏東江夏農場完全以有機栽培且栽培品系與其他地區不同，單位面積產量也明顯低於其他地區 (表 6)。

臺東知本地區杭菊田：由於今年苗株移植入本田時機延後，故尚無明顯萎凋病病情發生，於 2015 年 6 月僅有觀察到葉部炭疽病（圖 6），然而於 7 月持續追蹤，結果有萎凋病害發生（表 7）。臺東地區杭菊由於行情不如苗栗地區，近年來休耕與轉作農友漸多。



表 5、苗栗地區 2014 年至 2015 杭菊田間萎凋病及主要之病害與相關施作情形  
調查結果

Table 5. The results of field investigation on wilt diseases and major chrysanthemum  
diseases and related farming situations in Miaoli in 2014-2015.

地點	杭菊品 系	2014 年 萎凋病 罹病率	2015 年 萎凋病 罹病率	2014 年產 量(斤/分)	輪作 作物	主要病害	備註
公館鄉 羅輝鳳 先生	白花	5%	-	近 300	芋頭	萎凋病、炭 疽病	施用枯草桿 菌
銅鑼鄉 曾逸弘 先生	白花、黃 花	10%	10%	400	無	萎凋病	施用木黴 菌，連作
銅鑼鄉 李聲章 先生	白花、黃 花	0	-	近 300	水稻	健康	首次種杭菊 新農地
銅鑼鄉 葉金城 先生	白花、黃 花	10%	近 30% **	近 300	水稻	萎凋病、炭 疽病	-
銅鑼鄉 韓順雄 先生	白花、黃 花、	20%	20%	不到 200	無	萎凋病、葉 斑病	施枯草桿 菌，連作， 不除草用藥

- 未取得資料

\*由於延遲定植故還未有明顯發病

\*\*畦面高度不足於梅雨季節淹水嚴重



圖 3、苗栗縣公館鄉在 2014 年夏季觀察田間杭菊萎凋病徵。

Figure 3. The wilt plants found in a chrysanthemum garden in Mioali in summer, 2014.



圖 4、苗栗銅鑼鄉地區 2014 年種植之健康杭菊，前期與水稻輪作。

Figure 4. The healthy chrysanthemum garden in Mioali, where the last cultivated crop was rice, 2014.

表 6、屏東江夏有機農場 2014 年杭菊田間主要病害調查之結果

Table 6. The results of field investigation on major chrysanthemum diseases at Jiang-Xia organic farm in Pingtung in 2014.

地點	杭菊 品系	主要病害	萎凋病 罹病率	輪作 作物	2014 年產 量	備註
江夏有機農場屏 一(東縣內埔鄉 科大路三段)	小朵 黃花	萎凋病、白絹 病、葉斑病	10%	無	50~75 臺 斤/分地	宿根二 年生植 株連作
江夏有機農場二 (屏東縣鹽埔鄉 永隆村)	小朵 黃花	葉斑病、萎凋 病	20%	地瓜	50~75 臺 斤/分地	淹水灌 溉

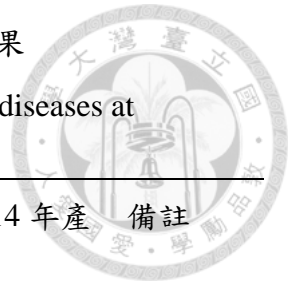




表 7、臺東地區 2015 杭菊田間主要之病害與相關施作情形調查結果

Table 7. The results of field investigation on major chrysanthemum diseases and related farming situations in Zhiben, Taitung in 2015.

農友	品系	2014 年 產量	輪作情形	2015 年主要 病害	萎凋病 罹病率	備註
臺東縣知本里 陳鏡榮先生	黃花	200 臺斤 /分地	前期休耕	炭疽 病、萎 凋病	10%	2015 年本田 期延遲至 5 月中旬
臺東縣知本里 林金德先生	黃花	200 臺斤 /分地	與玉米及 水稻輪作	炭疽 病、萎 凋病	10%	2015 年本田 期延遲至 5 月中旬
臺東縣知本里 劉慶嘉先生	黃花	200 臺斤 /分地	與玉米及 水稻輪作	-	-	2015 年休耕



圖 5、屏東江夏有機農場位於內埔地區之杭菊田。

Figure 5. The chrysanthemum garden at Jiang-Xia organic farm in Ne-Pu, Pingtung.



圖 6、臺東杭菊植株於 2015 年所觀察到之炭疽病。

Figure 6. The anthracnose disease on chrysanthemum plants found in Taitung chrysanthemum garden in 2015.

## 二、杭菊萎凋病之相關病原菌之分離及初步鑑定

### (一) 病原菌之分離及初步鑑定

苗栗地區之萎凋病分離株，係採組織分離法以及稀釋分離法進行分離。利用此二方法分離的結果列如表 8。結果發現苗栗銅鑼鄉地區分離所得之真菌具有鐮刀狀大分生孢子，初步判定為鐮胞菌屬。上述鐮胞菌分離株依其形態可分為大分生孢子兩端尖細之尖鐮胞菌（如圖 7、10）。及孢子兩端橢圓之茄形鐮胞菌（如圖 8、9）。

統計自苗栗地區杭菊病株以組織分離及稀釋分離得到之分離菌株共有 6 株真菌分離株如表 9，其中 4 株為鐮胞菌，此些分離株之編號以 F 後加不同代碼，另有兩株為尚無法鑑定之土黃色及橘黃色真菌菌落，編號以 GK122 及 TL322 表示。在細菌方面共有 3 分離株，此些分離株之編號皆以 HG 後加不同代碼表示，由於所分離之細菌菌落具有類似青枯病菌 (*Ralstonia* sp.) 高度流動性之特性，故另以 TTC 鑑別培養基 (Schaad *et al*, 2001) 培養之，以供初步之鑑定。因自杭菊萎凋病株分到似青枯病菌之菌株，且分離率甚高，故本研究亦自食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 訂購典型青枯病菌株 (編號 12605)，以來相互比較。此些細菌性分離株在 PDA 培養基上呈高度流動性，在 TTC 培養基上則呈現中央紅色，四周略有透明白色菌泥之特性，如圖 11，此一特性與青枯病菌十分相似，故暫歸類為「似青枯病」。

表 8、自苗栗地區杭菊萎凋病株分離可疑病原菌之結果

Table 8. The suspect pathogens from the wilt diseased chrysanthemum in Mioali.

地點	杭菊品系	分離樣本數	镰胞菌之分離率	似青枯病菌之分離率
苗栗縣公館鄉	白花	2	0/2(0%)	1/2(50%)
苗栗縣銅鑼鄉	白花	7	4/7(57%)	5/7(71%)

表 9、自苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得真菌及細菌分離株之編號及其來源。

Table 9. Number and source of fungus or bacterium isolates derived from wilt diseased chrysanthemum in Mioali.

分離株編號	來源地	分離部位	菌株歸類
F412	苗栗銅鑼	白花萎凋莖基部	<i>Fusarium oxysporum</i>
F421	苗栗銅鑼	白花萎凋莖基部	<i>Fusarium oxysporum</i>
F522	苗栗銅鑼	白花萎凋莖基部	<i>Fusarium solani</i>
F322	苗栗銅鑼	白花萎凋莖基部	<i>Fusarium solani</i>
GK122	苗栗公館	白花萎凋莖基部	未明土黃色真菌菌落
TL312	苗栗銅鑼	白花萎凋莖基部	未明橘黃色真菌菌落
HG01	苗栗公館	白花萎凋莖基部	疑似青枯病菌落
HG02	苗栗銅鑼	白花萎凋莖基部	疑似青枯病菌落
HG05	苗栗銅鑼	白花萎凋莖基部	疑似青枯病菌落

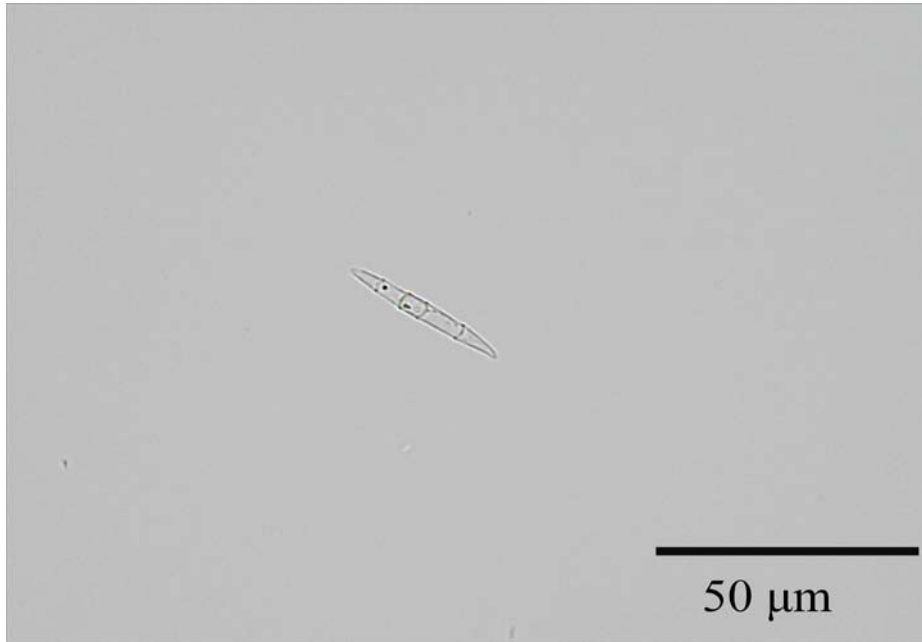


圖 7、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F412 之分生孢子型態。

Figure 7. The conidia of *Fusarium* isolate F412 isolated from wilt chrysanthemum in Mioali.

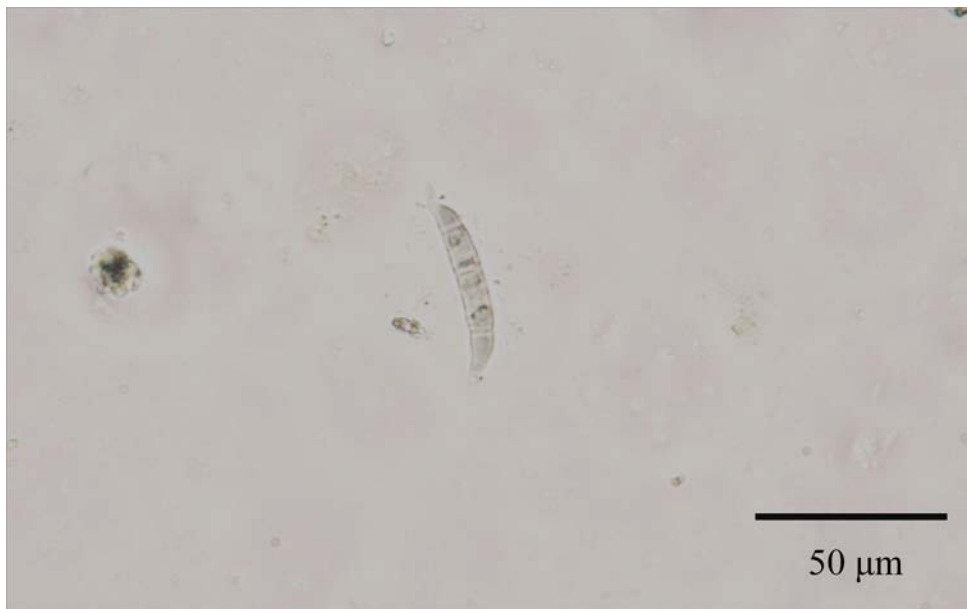


圖 8、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F322 之分生孢子形態。

Figure 8. The conidia of *Fusarium* isolate F322 isolated from wilt chrysanthemum in Mioali.



圖 9、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F522 之分生孢子形態。

Figure 9. The conidia of *Fusarium* isolate F522 isolated from wilt chrysanthemum in Mioali.



圖 10、苗栗地區杭菊萎凋病株分離所得鐮胞菌 F421 之分生孢子形態。

Figure 10. The conidia of *Fusarium* isolate F421 isolated from wilt chrysanthemum in Mioali.





圖 11、自杭菊萎凋病株分離所得細菌分離株 HG02 於 TTC 培養基上生長之菌落特徵。

Figure 11. The colony morphology of bacterial isolate HG02 on TTC medium.

### 三、杭菊萎凋病分離菌株病原性檢定

#### (一) 杭菊健康苗之繁殖

自屏東江夏有機農場提供小朵黃花品系之杭菊、苗栗農友曾逸弘先生提供黃花品系之杭菊、以及苗栗改良場作物改良課提供白花品系之杭菊，以此些杭菊植株作為扦插穗母株來源，用以扦插繁殖，結果可以發根育出健康菊苗。(圖 12)



圖 12、臺大中非大樓頂樓簡易溫室中扦插成功之健康杭菊苗。

Figure 12. The healthy chrysanthemum seedlings grown in NTU green house.

## (二) 杭菊病株分離所得鏤胞菌分離株之病原性測試

自苗栗杭菊發病之病株分離所得之鏤胞菌株共 4 菌株，經由剪根浸泡菌液接種法接種健康杭菊盆苗結果如表 10。接種一個月後，發現所有實驗組及對照組皆未出現萎凋病徵。



表 10、自苗栗萎凋病杭菊分離所得四株镰胞菌分離株對健康菊苗剪根浸泡接種之結果

Table 10. The pathogenicity test results from *Fusarium* isolates through a root pruning method on healthy chrysanthemum seedlings.

镰胞菌株	F412	F421	F522	F322	水對照組
萎凋病發病率	0/3(0%)	0/3(0%)	0/3(0%)	0/3(0%)	0/3(0%)

\*為接種一個月後觀察所得。

### (三) 杭菊病株分離所得細菌分離株之病原性測試

#### 1. 細菌分離株對葉片注射之病原性測試

細菌分離株係以壓力注射法接種杭菊葉片，注射後無反應者維持原樣 (圖 13)。有反應者會在原注射部位產生水浸狀之區域呈現壞疽 (圖 14)。本項之測試結果如表 11。發現供測菌株中，分離株 HG02 有最明顯的壞疽產生，故後續試驗皆以 HG02 作為主要接種分離株。另一分離株 HG01 亦有反應但較不明顯，故後續盆栽試驗也會以此分離株進行比較測試。

表 11、杭菊病株分離所得細菌分離株以壓力注射法對離體葉片接種結果

Table 11. The inoculation results of bacteria isolates derived from diseased chrysanthemum by syringe infiltration method on detached leaf.

菊花品種	離體葉片注射不同菌株菌液之發病率			
	HG01	HG02	HG05	None(CK)
小黃菊	1/3(33%)**	3/3(100%)*	0/3(0%)	0/3(0%)
大黃菊	1/3(33%)**	3/3(100%)	0/3(0%)	0/3(0%)
大白菊	0/3(0%)	3/3(100%)*	0/3(0%)	0/3(0%)

\*有部分葉片病斑會擴散。

\*\*沒有明顯壞疽但產生顏色變化。



圖 13、杭菊葉片以壓力注射接種無病原性細菌分離株 HG05 之結果

Figure 13. The chrysanthemum leaf after infiltration with nonpathogenic bacterium isolate HG05.



圖 14、杭菊葉片以壓力注射接種 HG02 菌液後產生過敏反應壞疽。

Figure 14. Necrosis on a chrysanthemum leaf caused by syringe infiltrating with the suspect pathogen HG02.

## 2. 菌液對杭菊苗灌根接種之病原性測試

本病原性測試係將製備好之 HG02 細菌懸浮液，直接定量灌入受試菊苗基部（植株未斷根處理）以進行接種，試驗結果如表 12。本實驗結果發現在 6 株處理中，在接種三週後只有一株發生萎凋。

表 12、杭菊病株分離所得似青枯病菌 HG02 以菌液灌根接種之結果。

Table 12. The inoculation results of the bacterial isolate HG02 derived from diseased chrysanthemum on healthy seedlings by a soil drenching method.

菊花品系	杭菊盆苗灌根接種之發病率*	
	HG02	None (CK)
白花	1/6(17%)	0/6(0%)

\*發病率係處理 3 週後觀察而得，一株為一重複，共 6 重複。

### 3. 菊苗以菌液浸根接種之病原性測試

本試驗係以細菌分離株 HG01 及 HG02 進行對黃花、白花、小朵黃花三種品系杭菊之病原性測試，方法為取剪去三分之一長度根處理之裸根盆苗浸泡於 150 mL 菌液中各 30 分鐘。結果呈現如表 13 及表 14。表 13 中比較兩細菌分離株致病力之差異，結果顯示細菌分離株 HG01 和無菌水對照組沒有顯著差異。表 14 比較三種杭菊品系對分離株 HG02 之感受性差異，結果顯示小朵黃花接種後完全沒有發病，在三個品系中最不感病；黃花品系介於兩者之間，而白花品系在三者之中最為感病。罹病之病株多由下位葉開始萎凋，將生病植株全株拔起可見根部部分褐化、完全褐化或根部殘缺不完整 (圖 15)。

另有關本病以發病之植株莖段插入水中以觀察菌流之現象並不易觀察，只有少數有被觀察到 (圖 16)。

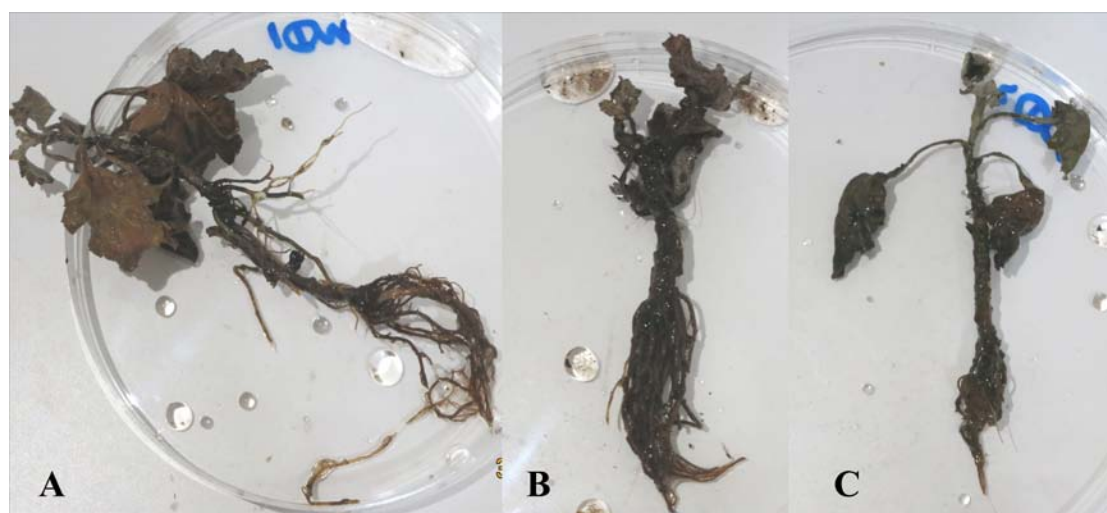


圖 15、接種後發病之植株根部。A，部分根部褐化；B，根部完全褐化；C，根部殘缺不全。

Figure 15. The diseased chrysanthemum plants and their roots. A, The diseased plant with partial browning roots; B, All the roots of the plant were browning; C, The diseased plant with incomplete roots.

表 13、二種可能具病原性之細菌分離株進行剪根浸根接種病原性測試之結果

Table 13、The inoculation results of the suspect chrysanthemum wilt isolates by a cut root dipping method.

處理	不同品系菊花浸根接種之發病率*		不同品系菊花浸根接種之發病嚴重度(%)**	
	黃花	白花	黃花	白花
對照組	0/6(0%)	0/6(0%)	0	0
HG01	0/6(0%)	1/6(17%)	0	11
HG02	4/6(66%)	5/6(83%)	28	50

\*發病率係處理 2 週後觀察而得。

\*\*發病嚴重度為 6 重複之平均值，每處理 6 株，一株為一重複。

表 14、病原性細菌分離株 HG02 對三種品系杭菊進行剪根浸根接種病原性測試之結果

Table 14. The inoculation results of pathogenic bacterium isolate HG02 on 3 different chrysanthemum varieties by cut root dipping method.

杭菊品系	不同菊花浸根接種之發病率*		不同菊花浸根接種之發病嚴重度(%)**	
	HG02	對照組	HG02	對照組
小黃花	0/6(0%)	0/6(0%)	0	0
白花	5/6(83%)	0/6(0%)	50	0
黃花	4/6(66%)	0/6(0%)	28	0

\*發病率係處理 2 週後觀察而得

\*\*發病嚴重度為 6 重複之平均值，每處理 6 株，一株為一重複。

#### 4. 病原性測試後以稀釋分離法進行病原菌再分離之結果

將上述浸根接種發病之萎凋病株取 6 株以稀釋分離法進行再分離，再分離的結果為所有病株樣本都可分離到與 HG02 形態相似之菌落 (如圖 17)，但尚需要進一步以生化或分子生物方法進行鑑定確認。



圖 16、接種後發病之白花品種杭菊植株，莖段插入水中可呈現菌流現象

Figure 16. The bacterial stream emerged from the stem section of inoculated white-flower chrysanthemum in the water.

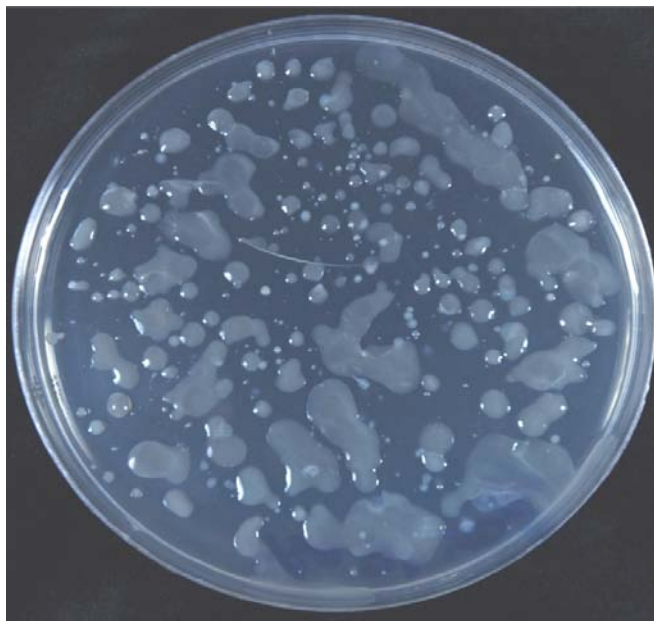


圖 17、病原性測試後以稀釋分離法對 6 發病杭菊進行病原菌再分離所得之菌落型態。

Figure 17. The colony morphology of bacteria reisolated from diseased plant, which was inoculated by isolate HG02.

#### 四、抗菰細菌萎凋病分離株之分子生物學鑑定



##### (一) 目標片段之增幅 (PCR 反應)

圖 16 為 HG01 以及 HG02 以對青枯病 *Ralstonia solanasearum* 具專一性之引子對 759/760 進行 PCR 反應之產物電泳圖譜。其中 BCRC12605 為購自食品工業研究所菌種保存中心之青枯病菌作為正對照組 PCR 產物之電泳條帶。CK 表示只加入 dd H<sub>2</sub>O 而沒有 DNA 模板之負對照組。由此結果顯示，正對照組有產生預期之條帶，然而受測之此二分離菌株皆未產生相應之條帶，故皆不屬於青枯病菌。再以廣用之引子對 27F/1492R 進行 PCR 反應，所得之部份 16S rDNA 基因序列之產物電泳圖譜如圖 18。受測之菌株皆有條帶產生，可供後續之定序作業。

##### (二) 本研究之細菌分離株 HG01 及 HG02 及再分離菌株基因片段之定序

PCR 產物經委託基龍米克斯生物技術公司純化並定序，將所得到之序列如圖 20、圖 21 及圖 22。

再分離菌株之 DNA 序列與 HG02 之 DNA 序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果如表 15。由表 15 可見，再分離菌株與分離株 HG02 之 DNA 序列比對結果相當近似。

細菌分離株 HG01、HG02 及再分離菌株之 DNA 序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果列如表 16。比對結果顯示細菌分離株 HG01 為 *Klebsiella oxytoca*，而 HG02 及再分離菌株皆為 *Burkholderia gladioli*。



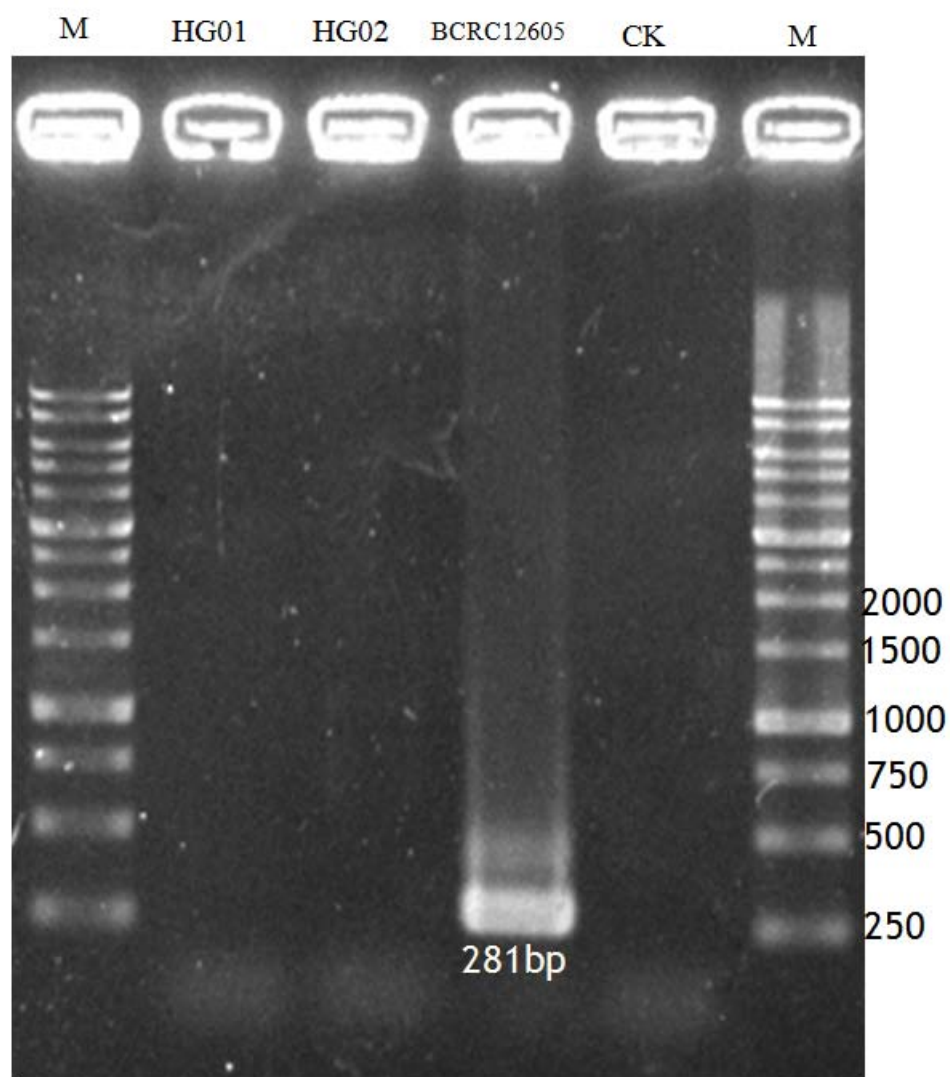


圖 18、以專一性引子對 759/760 進行核酸聚合酶連鎖反應產物電泳圖譜。

Figure 18. Electrophoresis patterns of PCR products of isolates HG02 and HG01, amplified with primers 759 and 760. M, 1kb marker. CK, water control.

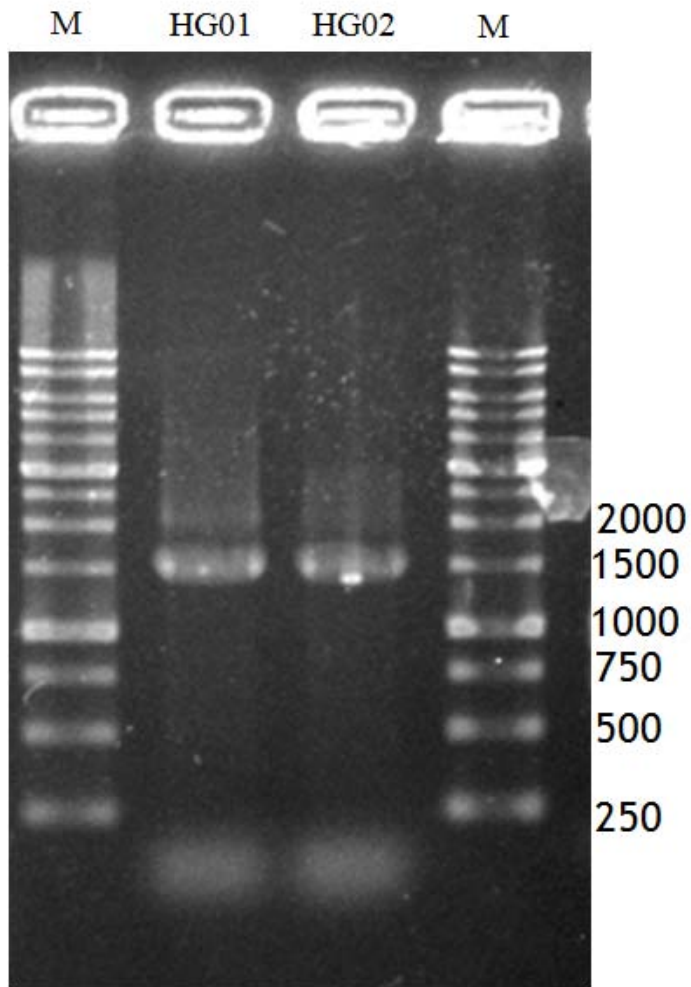


圖 19、以廣用之細菌 16S rDNA PCR 序列引子對 *Escherichia coli* 27F/1492R 進行核酸聚合酶連鎖反應之產物電泳圖。

Figure 19. Electrophoresis pattern of PCR products of isolate HG02 and isolate HG01, amplified with primers 27F and 1492R. M, 1kb marker.

圖 20、HG01 分離株以引子 27F/1492R 增幅後產物之部份 DNA 之序列。

Figure 20. The DNA sequence of PCR products of isolates HG01 amplified with primer 27F and 1492R.

---

GCCTTGCGGCAGTCTACCATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGC  
TCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTG  
ATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCA  
AGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGAT  
GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGC  
TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT  
GCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA  
GCGGGGAGGAAGGGAGTAAGGTTAATAACCTTATTCATTGACGTTACCCGC  
AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG  
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGT  
CAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAAC  
TGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA  
CAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
ACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTG  
AGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACG  
GCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG  
GAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGAC  
ATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACA  
GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGG

---

圖 21、HG02 分離株以引子 27F/1492R 增幅後產物之部份 DNA 之序列。

Figure 21. The DNA sequence of PCR products of isolates HG02 amplified with primer 27F and 1492R.

---

GCGTGGCGGCAGCTTAACATGCAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCAC  
CTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAG  
TGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGAT  
GAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGAT  
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT  
CTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG  
CAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCG  
GAAAGAAATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAA  
TAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA  
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGA  
CCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCA  
AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATG  
CGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAAT  
ACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT  
GGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCCTT  
AGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAA  
GATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATG  
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCCG  
GAATCCTAGAGAGATCTGGGAGTGCTCGAAAGAGACCGATAACACAGTGCT  
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAA

---

圖 22、再分離之分離菌株以引子 27F/1492R 增幅後產物之部份 DNA 之序列。

Figure 22. The DNA sequence of the PCR products amplified from genomic DNA of reisolated bacteria using primer pair 27F/1492R.

---

GCGGGGGGGGCAGCTTACCATGCAGTCGAACGGCAGCACGGGGGCAACCC  
TGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTG  
GGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTGTGGATGAA  
AGCGGGGGATCCTTCGGGACCTCGCGCTACAGGGGCGGCCGATGGCAGATTA  
GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGA  
GAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCC  
GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAA  
ACCTCGTGGTTAATACCCGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCG  
GAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTCCGCTAAGACAGATGTGAAA  
TCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGC  
AGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG  
GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACG  
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC  
GATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTTAGTAACGTAGCTACGCGTGA  
AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGAC  
GGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAA  
ACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGGAGTGCCC  
GAAAGGGAGCCATAACACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA  
GATGTTGGGG

---



表 15、再分離之菌株序列與 HG02 分離株序列比對之結果

Table 15. Comparison of the alignment of HG02 sequence and the reisolated bacteria sequence.

Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
913	913	99%	0.0	99%	Query_54329

表 16、分離株 HG01 及 HG02 以引子對 27F/1492R 經 PCR 增幅所得之 DNA 序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果。

Table 16. The identification result of isolates HG01, HG02, and the reisolated bacteria DNA sequences submitted to NCBI gene bank.

菌株編號	序列比對結果	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
HG01	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain TauN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1906	1906	99%	0.0	99%	AY823620.1
HG02	<i>Burkholderia gladioli</i> strain IHB B 15123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	99%	0.0	99%	KP306792.1
再分離菌株	<i>Burkholderia gladioli</i> strain N312 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1181	1181	100%	0.0	99%	KP306792.1

## 五、相關資材防治杭菊細菌性萎凋病之研究

### (一) 微生物製劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究

本項係已接種 HG02 分離株一天後，以三種市售生物防治資材分別使用其推薦濃度配製成水懸浮液澆灌於杭菊苗之介質，其結果以萎凋病嚴重度與對照組比較。結果顯示，裸根浸泡病原菌菌液（未斷根）接種處理後 7 天，對照組發病率達到 100%，枯草桿菌製劑金雞牌賜倍效以及鏈黴菌製劑安心寶發病率皆高達 83%；而各個處理的嚴重度則是金雞牌賜倍效較其他處理嚴重度較低一些（表 17）。

表 17、以白花品系杭菊盆栽進行 3 種生物製劑對分離株 HG02 防治之效果

Table 17. The effects of three biocontrol agents on controlling the chrysanthemum wilt in the greenhouse.

處理	接種 7 天後發病率	杭菊萎凋病之嚴重度(%)*
對照組	6/6(100%)	89
金雞牌賜倍效	5/6(83%)	50
臺灣寶	5/6(83%)	56
安心寶	5/6(83%)	56

\*發病嚴重度為每處理組 6 重複之平均值，每一植株為一重複。

### (二) 抗生素藥劑防治杭菊細菌性萎凋病之研究

#### 1. 以 Kirby-Bauer 法測試抗生素對 HG02 分離株之抑制性

本試驗首先測試所選用之 8 種抗生素，即皆以修改過之 Kirby-Bauer 法進行對分離株 HG02 生長抑制之定性測試，測量其抑制圈直徑大小。由表 18 可見，各個處理皆對 HG02 分離株有不同程度之抑制效果，故後續即選擇抑制圈直徑

最大之三者 (Keflex、Rifampicin 以及 Tetracycline) 進行盆栽測試。

## 2. 抗生素防治杭菊細菌性萎凋病盆栽測試

本實驗選擇前置實驗中抑制圈半徑最大之三種藥劑於接種病菌後一天澆灌濃度 200 ppm 之藥劑水溶液進行盆栽測試。所選擇之藥劑分別為 Keflex、Tetracycline 以及 Rifampicin，其結果如表 19。結果顯示，病原菌菌液浸泡裸根苗接種 (未斷根) 處理 7 天後，對照組發病率達到 100%，各個處理組發病率也皆高達 83%。各處理之萎凋病嚴重度也皆達到 56%，嚴重度僅比對照組 (萎凋病嚴重度 89%) 稍低。

表 18、不同抗生素藥劑對於杭菊萎凋菌株 HG02 之抑制情形

Table 18. The inhibitory effects of antibiotics on the chrysanthemum wilt isolate HG02.

Chemicals	Inhibition diameter of the inhibition zone (cm)
Ampicillin	1.10±0.14
Neomycin	0.20±0.40
Keflex	1.35±0.07
Rifampicin	1.32±0.15
Tetracycline	1.97±0.22
Novobiocin	1.07±0.26
Streptomycin	1.20±0.14
None (CK)	0

數值為各處理之四重複平均及各處理組內樣本之標準差。

處理藥劑濃度為 200 ppm



表 19、盆栽測試 3 種抗生素防治杭菊萎凋病之效果

Table 19. The efficacy of 3 different antibiotics for the control of chrysanthemum wilt disease in potted plant control.

處理	接種 7 天後發病率	杭菊萎凋病之嚴重度(%)**
對照組	6/6(100%)	89
Keflex	5/6(83%)	56
Tetracycline	5/6(83%)	56
Rifampicin	5/6(83%)	56

所澆灌藥劑濃度為 200 ppm

\*\*發病嚴重度為每處理組 6 重複之平均值，每一植株為一重複。

## 六、嫁接防治杭菊細菌性萎凋病之研究

### (一) 根砧接種測試

本項試驗係選擇艾草及越山菊作為抗病根砧，以測試嫁接之防治可能性。首先將艾草及越山菊分別以浸根接種法接種分離株 HG02 並測試其發病率。結果顯示，兩種作為根砧之植株剪根浸泡病菌菌液接種後皆未產生萎凋病徵 (表 20)。

### (二) 嫁接株浸根接種

後續將杭菊接穗分別嫁接於艾草及越山菊根砧，以此嫁接株接種分離株 HG02，其結果如表 21。然而以艾草為根砧接種後之對照組以及接種病原菌處理組之接穗皆有部分呈現枯萎現象，應為嫁接失敗所致，而其餘植株之根砧與接穗皆健康。以越山菊為根砧之嫁接植株，對照組及接種病原菌處理組皆未發生萎凋病徵。

表 20、艾草及越山菊以剪根浸根接種分離株 HG02 之發病率

Table 20. The wilt incidence of Artemisia and Yue-Shan chrysanthemum inoculated by cut root dipping method with wilt isolate HG02.



艾草浸根接種之發病率		越山菊浸根接種之發病率	
HG02	None (CK)	HG02	None (CK)
0/6(0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)

\*發病數係接種後 2 週觀察而得，一植株為一重複，各為 6 重複。

表 21、以艾草及越山菊為根砧嫁接杭菊再剪根浸根接種分離株 HG02 之發病率

Table 21. The wilt incidence of grafting plants inoculated by cut root dipping method with isolate HG02.

艾草浸根接種之嫁接植株發病率		越山菊浸根接種之嫁接植株發病率	
None(CK)	HG02	None (CK)	HG02
0/3(0%)**	0/3 (0%)**	0/3 (0%)	0/3 (0%)

\*發病數係接種後 2 週觀察而得，一嫁接株為一重複，各為 3 重複。

\*\*根砧健康但部分接穗嫁接失敗枯死

## 第五章 討論



### 一、臺灣苗栗、屏東與臺東地區杭菊萎凋病害之田間調查

本實驗自去年開始調查苗栗縣、屏東以及臺東杭菊田之病害狀況，並且訪問農友輪作與產量情形，發現連作田往往病害發生較嚴重，此結果與苗栗改良場以及台東改良場研究人員之觀察相符（陳和許，2012；朱和張，2010），然而發病嚴重之田區未必產量較低。例如農友曾逸弘先生以及葉金城先生之杭菊田雖然去年萎凋病害發病植株超過一成，然而收成卻並沒有比較少，甚至比其他發病情況較輕者更多。請教農友以及臺東改良場許育慈研究員及苗栗改良場朱盛祺研究員，推論可能最後收成和農友每畦補植株數及菊花植株分枝量有關。

本實驗於調查初期曾經考慮細菌造成杭菊萎凋病徵之可能性，故於苗栗田間調查時於田區當場將病株莖段插入水中觀察是否有菌流現象。然而結果皆未觀察到菌流。可能是由於靜置時間不足，或在田區不方便靜置檢視裝置而使菌流觀察受到影響，或可能有其它確切的原因仍待進一步之研究。

### 二、杭菊萎凋病之相關病原菌分離保存

本實驗以稀釋平板法及組織分離法分離得若干真菌分離菌株與鐮胞菌分離菌株以及若干細菌菌株，細菌菌株菌落外觀具有高度流動性，初步以 TTC 培養基培養，將此些細菌分離株於 TTC 培養基之型態與購自食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 之青枯病編號 12605 之菌株比較。與青枯病菌菌落相似之細菌分離株暫時歸類為青枯病菌。由於本研究自 2014 年夏季將自苗栗採得之病株於實驗室以顯微鏡檢視病株維管束組織，觀察到有大量細菌，故懷疑細菌為造成杭菊萎凋病之可能原因。

青枯病菌在 TTC 培養基上於 28°C 培養 2 至 3 天後形成之菌落具流質不規則圓形或橢圓形，中間為粉紅色，外圍乳白色、平滑、黏液狀之菌落 (Schaad *et al.*, 2001)。初步以此標準判斷，結果所有從 PDA 培養基上具有邊緣光滑、高

度流動性之細菌分離株菌落移到 TTC 培養基上均有產生中間為紅色，外圍平滑有黏液狀之菌落如圖 11。但是細菌鑑定仍然有賴生化測試及分子生物方法鑑定才能真正確定其分類所屬。



### 三、杭菊萎凋病病原性檢定

#### (一) 镰胞菌分離株病原性測試

關於臺灣杭菊萎凋病之病原，臺東改良場技術專刊記載係由 (*Fusarium* sp.) 引起，且於臺東地區之杭菊萎凋病株曾經分離得茄镰胞菌 (陳和許，2012；許，2012)；而杭菊之病害發生與管理手冊 (朱等，2012) 記載杭菊萎凋病係由尖镰胞菌所引起。筆者親自請教臺東改良場許研究員育慈及苗栗改良場朱研究員盛祺了解到過去僅以組織分離法分離杭菊萎凋病株，結果皆有尖镰胞菌及茄镰胞菌之分離記錄，然而尚未完成柯霍氏法則確認此些镰胞菌株之病原性。

本實驗將 2014 年自苗栗杭菊萎凋病株取得之镰胞菌分離株以剪根接種法接種杭菊植株，結果所有處理皆未發生萎凋病徵。然而镰胞菌在土壤環境中多樣性極高，變異性大，極有可能是本實驗並未確實分離到有致病力之菌株而導致此結果。筆者曾嘗試向發表臺灣觀賞用菊花萎凋病初次報告之楊秀珠博士索取其當初所分離之镰胞菌株以作為本實驗之正對照組，可惜該菌株並未得以保存。

由於過去自杭菊萎凋病株取得分離菌株多採用以水瓊脂培養基培養之組織分離法，可能由於水瓊脂培養基營養條件較有限，使細菌菌落較不易被培養、觀察以及分離。故本研究亦採取以 PDA 培養基培養之稀釋分離法，較能同時觀察到細菌與真菌菌落，藉此探討細菌造成杭菊萎凋病之可能性。

#### (二) 細菌分離株病原性測試

以細菌分離株接種實驗初時以參考亞洲世界蔬菜中心之實驗方法直接將細菌懸浮液倒入受試植株之介質中，然而自接種處理至觀察到萎凋病徵，植株發病

歷時較長且發病率較低，故後續改採浸根接種法，植株發病率較提高。臺東改良場研究員觀察杭菊萎凋病田間發病情形，萎凋病容易於淹水及風災過後大面積發生，推測此病原屬於弱病原性，需要在寄主受傷虛弱之情形下較易發生（陳和許，2012；許，2012）。本實驗以浸根接種處理之過程多少傷及植株根部，且浸泡菌液與田間淹水情形相似，此實驗結果可能與此推測互相印證。

以細菌分離株 HG01 及 HG02 接種杭菊，比較兩者之致病力，結果顯示以 HG01 浸根接種杭菊苗白花處理之中僅有一株呈現萎凋症狀，細菌分離株 HG02 致病力顯然較強。本實驗後續自 HG02 接種發病之病株莖段插水觀察到菌流現象，並且能夠再分離出菌株，足以證明細菌分離株 HG02 之致病力。然而分離株 HG01 之致病力尚待更多的佐證以進一步探討。將接種發病植株莖段插入水中檢視菌流情形，僅有少數病株之莖段有觀察到微弱菌流，與田間立即觀測水中莖段之結果相似，比較田間及實驗室處理病株莖段插水裝置條件之差異，推測除了杭菊萎凋病之本身特性造成菌流不易觀察外，裝置靜置的時間長度和觀察者視線的角度可能都影響到是否觀察到菌流。

比較三種品系之杭菊對有致病力之分離菌株 HG02 之感病性，結果顯示白花杭菊罹病嚴重度最高，視為最感病；而來自屏東之小朵黃花品系接種後完全未出現萎凋病徵，最不感病。提供此小朵黃花品系之江夏農場主黃克賢先生表示，此杭菊當初係來自臺灣東部地區友人所提供引進屏東種植，經過兩年有機種植後，特意自田間留取最健壯不生病之植株而得。如此刻意人為選汰之行為可能使此杭菊具有較其他杭菊更具有抗病性。然而確切的原因仍待進一步探究。現今臺灣市場主要流通之杭菊為較大朵之白花與黃花品系，然而此二品系杭菊對於萎凋病害較感病，比較不感病之小朵黃花品系杭菊可能具有取代現有感病品系或作為抗病育種材料之潛力。

#### 四、病原分離菌株之分子鑑定

本實驗將具有致病力之細菌分離株 HG02 定序並且與 NCBI 比對，結果顯

示此菌屬於伯克氏菌 *Burkholderia gladioli*。而細菌分離株 HG01 之序列分析比對結果為 *Klebsiella oxytoca*。

*Klebsiella oxytoca* 係 Enterobacteriaceae 科 *Klebsiella* 屬之格蘭氏陰性菌 (Brenner *et al.*, 2005)，為一種人類臨床病原菌 (Gebel *et al.*, 2002)，然而此菌較無對植物致病之相關報導，這可能解釋本研究接種此分離菌株令杭菊萎凋之發病率低。此菌或許並非植物病原菌，可能是實驗過程中有汙染或其他原因導致實驗結果誤差，尚需增加實驗之重複數並修改實驗方法以進一步探討。

*Burkholderia gladioli* 最初被報導是發生在唐菖蒲之萎凋病，其能造成唐菖蒲球莖之根腐 (root rot)(Severini, 1913)。除了唐菖蒲外，此病原尚有其他寄主如洋蔥、鳶尾花以及鳳梨 (Tsuchiya and Muko, 1963; 許等, 2008)。本研究結果顯示此細菌分離株能令杭菊萎凋，為國內首次發現杭菊為此病原之寄主。

關於伯克氏菌屬之培養菌落型態，由 *Burkholderia caryophylli* 引起之星辰花萎凋病在 PDA 培養基上經 30°C 培養 2 至 3 天後形成邊緣完整、光滑、具有光澤、可產生褐色素之圓形菌落 (鄭等, 2007)。然而藉由菌落型特性不一定能準確斷定細菌之分類，若需要區分與 *Burkholderia gladioli* 相近之菌種，目前已具有自 23S rRNA 區段所開發出具有高度專一性及高敏感性之引子對可供鑑定 *Burkholderia gladioli* 此一物種 (Whitby *et al.*, 2000)。

自接種發病植株再分離之菌株與 HG02 分離株 DNA 序列比對結果，兩者相似度高，應可確認為同一物種。此結果確定 HG02 分離株確實為造成杭菊萎凋之病原。

## 五、相關資材防治杭菊細菌性萎凋病之研究

### (一) 生物防治資材防治杭菊細菌性萎凋病效果之研究

以三種市售生物防治資材盆栽測試防治效果，結果顯示枯草桿菌製劑金雞牌賜倍效較其他處理組有較明顯之防治效果。本研究於苗栗地區訪查農友使用之防治資材，發現許多苗栗農友依據過往經驗，認為施用枯草桿菌比施用化學藥劑防

治萎凋病效果較佳，故多有使用枯草桿菌之情形（如表 6、7）。然而農友使用之枯草桿菌產品來源不一定相同，也無確切記錄來源，故無法確定是否有特定之枯草桿菌菌株具有較佳之防治效果。

本實驗結果可能與此田間情形互相印證，但是本實驗中使用金雞牌賜倍效處理與另一項也是枯草桿菌之處理臺灣寶之發病率皆高達 83%，此效果在田間恐怕難有實際應用之價值。然而本實驗為接種致病細菌分離株後再加入各防治資材處理，於接種病原前即使用防治資材之效果是否會較佳仍有待進一步實驗與探討。

## （二）抗生素藥劑防治抗菊細菌性萎凋病之研究

關於抗菊萎凋病之防治較少有推薦使用化學防治方法，除了因為植保手冊尚無推薦藥劑外，目前應用化學防治效果並不佳（許，2012；朱等，2014）。

本實驗以抗生素藥劑進行盆栽測試結果顯示所有處理組與對照組均無顯著差異，換言之此盆栽測試抗生素防治效果並不顯著，此結果可能印證了田間應用化學防治效果不佳之情形。然而本實驗係先接種細菌分離株一天後再加入抗生素處理，若是於接種前即先施用抗生素處理是否會得到較佳之防治效果仍有待進一步實驗與探討。

## 六、嫁接防治抗菊細菌性萎凋病之研究

以艾草與越山菊作為抗病篩選根砧，將兩种植株直接以根浸法接種結果皆未發生萎凋病徵。以接上抗菊接穗之嫁接植株根浸法接種之結果亦未有萎凋病徵，然而以艾草為根砧之處理組與對照組之接穗皆各有一株乾枯，應當屬於嫁接失敗所導致之結果。研究過程中曾經嘗試以抗菊根砧嫁接抗菊接穗檢視嫁接技術的好壞，結果也多因嫁接失敗令接穗死亡，故未能作為接種實驗之對照處理。由抗菊嫁接抗菊失敗的結果，因為不具有嫁接親合性之疑慮，故應當可歸因於操作技巧不良所致。由於嫁接技術操作本身較具技巧性，本實驗所採用之嫁接方法為操作較簡易之合接法而非菊花嫁接較常用之頂劈法（許，2010；台北市政府工務局，

2014)，若參考前人嫁接成功之方法熟練操作技巧，可能增加嫁接成功機率進而增加此方法之應用性。然而此實驗結果顯示艾草與越山菊較杭菊對本實驗之細菌萎凋病株具有抗病性，故應用此嫁接根砧為防治方法應當具有發展之潛力。

## 七、結論及未來發展

杭菊在臺灣種植面積小，是地方的特色產業。相較於其他大宗作物不被受到重視。臺灣杭菊產量 2014 年產量約 47 公噸，而臺灣於 2013 年自大陸進口乾燥杭菊量高達 109 公噸，可見國人對杭菊的內需高於目前國內的產量 (劉和曾，2014)，然而國內杭菊之行情一直以來受到大陸低價競爭之影響，且市場上所流通多者為大陸杭菊，消費者過去並未重視國內外杭菊品質之差異等情形皆影響杭菊農民栽植之意願。唯近年由於食品安全問題層出不窮，進而使國人開始重視農產品農藥殘留問題，使得國內消費者轉而支持國產杭菊 (朱等，2014)。國產杭菊與大陸杭菊相較下，其價值在於對農藥殘留疑慮較低。若能持續合理有效用藥，或使用非化學防治方法則應當對於國產杭菊之附加價值有助益。


以往認為杭菊萎凋病可能是由鐮胞菌引起，然而本研究結果顯示細菌亦能造成杭菊萎凋病害。若能持續針對此確認之病原菌之生態等特性深入探討，應當對於杭菊萎凋防治有所助益。本研究探討嫁接防治之效果，顯示嫁接植株對於有致病性之菌株較杭菊抗病。雖然嫁接的技術性較高，也需要較高之人力成本，但是在臺灣絲瓜與番茄皆應用嫁接抗病根砧有良好之成效。杭菊之經濟價值較絲瓜及番茄有過之而無不及，若能將嫁接防治應用於杭菊，進而發展為更成熟之技術，將更有機會降低嫁接成本並減少因病害造成的損失。故利用嫁接技術防治杭菊萎凋病之可行性仍值得更進一步之實驗與探討。



## 參考文獻

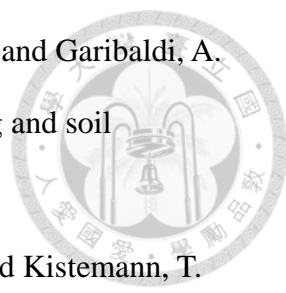


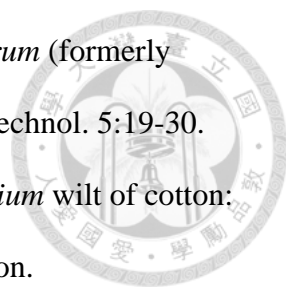
1. 上海花圃。1981。大立菊。上海科學技術出版。P50-P50。上海。
2. 中華民國植物病理學會。2002。台灣植物病害名彙。第四版。中華民國植物病理學會出版。386 頁。
3. 王惠亮、謝廷芳、莊益源。2009。植物病蟲害的非農藥防治。科學發展。443:42-48。
4. 百泰生物科技。2011。台灣寶。網址：  
[http://www.biontech.com.tw/biontech\\_ch/biopesticides/item/5-biobac-wp.html](http://www.biontech.com.tw/biontech_ch/biopesticides/item/5-biobac-wp.html)。上網日期 2015-5-26。
5. 朱盛祺、林秀榮、許育慈、楊秀珠、張訓堯。2012。杭菊之病蟲害發生與管理。合理、安全及有效使用農藥輔導教材。茶飲(2.1):杭菊。
6. 朱盛祺、張訓堯。2010。杭菊萎凋病發威，死亡率超過一成。苗栗區農情月刊 130:3-3。
7. 行政院農業委員會農糧署企劃組。2015。農情報告資源網。網址：  
[http://agr.afa.gov.tw/afa/afa\\_frame.jsp](http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp)。上網日期：2015-05-25。
8. 沈學根、汪濤、郭巧生。2010。杭菊不同加工工藝及其對品質影響。中國現代中醫。12(3): 28-29。
9. 沅美生物科技。2011。金雞牌賜倍效。網址：  
<http://yuan-mei.com.tw/tw/product-information/item/32-bacillus-subtilis/80-ymps.html>。上網日期 2015-5-26。
10. 吳雅芳、陳紹崇、黃淑惠、鄭安秀。2006。星辰花細菌性萎凋之研究。台南區農業改良場研究彙報 48:1-8。
11. 吳登琳、林志鴻、許宗銘、柏拉達。2008。甜椒根砧耐疫病與青枯病篩檢。臺灣園藝 54(1):47-58。

- 
12. 汪碧涵。1985。臺灣豌豆萎凋病病因學與生態學之研究。東海大學生命科學系碩士論文。
  13. 邱奕璇。2012。菊花耐淹水指標與水分生理。國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文。135 頁。
  14. 林益昇、方敏男。1996。豆菜類-豌豆。蔬菜病蟲害綜合防治專輯，豆 20 頁-20 頁。台灣省政府農林廳。南投。436 頁。
  15. 林秀榮、邱垂豐、劉秋芳、曾信光。2014。杭菊健康管理技術—以苗栗銅鑼地區之推動為例。農政與農情 262:93-98。
  16. 陳進分、許育慈。2012。臺東地區杭菊栽培與病蟲害管理。行政院農業委員會臺東區農業改良場。25 頁。
  17. 張訓堯、王仁助。2010。銅鑼鄉杭菊產業發展概況。農業世界雜誌。325:23-29。
  18. 張訓堯。苗栗區農業專訓。2014。杭菊種苗量產技術。苗栗區農業專訓 66:15-17。
  19. 張明郎。1987。土壤添加物防治番茄青枯病之研究。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。
  20. 許秀惠、曾偉凡、賴婉綺、潘雅碧、林俊義。2008。*Burkholderia gladioli* 引起之鳳梨果腐病。植病會刊 17:157-167。
  21. 許育慈。2012。臺東縣杭菊病蟲害防治問題及輔導措施。臺東區農業專訊 80:19-22。
  22. 許謙信。2010。利用嫁接選育菊花耐淹水砧木。臺中區農業改良場研究彙報 106:1-9。
  23. 楊秀珠。1986。菊花病害。興農 214:67-71。
  24. 黃振文、孫守恭。1992。發展有機添加劑防治植物病害策略之研究。中國海峽兩岸植物病理學術研討會論文摘要集。P19-19 頁。
  25. 農業藥物毒物試驗所技術服務組、田間試驗技術小組。2013。植物保護手冊。

- 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。1079 頁。
26. 臺北市政府工務局。2014。大立菊栽培手冊。臺北市政府工務局公園路燈工程管理處。P17-17 頁。臺北。
27. 趙治平，王文哲，陳仁昭，楊秀珠，李淑英，袁秋英。2008。植物保護圖鑑系列 18—香蕉保護。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。59-62。
28. 鄭安秀、吳雅芳、林志鴻、王肇芬。2007。作物細菌病害診斷案例。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(六)：95-107。
29. 劉秋芳。2012。臺灣杭菊品系之生育調查。臺灣茶業研究匯報。31:41-52。
30. 衛生署臺灣中藥典編修委員會。2013。臺灣中藥典第二版。行政院衛生署。508 頁。
31. 劉秋芳、曾信光。2014。如何購買衛生安全之食用乾燥菊花?認明標章就對了!!。茶葉專訊。87:14-14。
32. 林奕德。2014。丹參細菌性軟腐病之研究。國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程碩士論文。66 頁。
33. Allen, C., Prior, P., and Hayward, A. C. 2005. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society. St. Paul. 510 pp. USA.
34. Agrios, G. N. 2004. Plant pathology/ George N. Agrios. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Academic Press, Burlington, MA. 922 pp.
35. Appel, D. N. 1995. The oak wilt enigma: Perspectives from the Texas epidemic. Annu. Rev. Phytopathol. 33:103-118.
36. Bonanomi G., Antignani V., Capodilupo M., and Scala F. 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. Soil. Biol Biochem 42:136-144.
37. Bauer, A. W., Kirby, W.M., Sherris, J. C., and Turck M. 1966. Antibiotic

- susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
38. Brenner G. G., Krieg D. J., Staley N. R., and James T. 2005. *Bergey's Manual of systematic bacteriology* 2<sup>nd</sup> ed vol. two. The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. Springer-Verlag. New York, USA. 1128 pp.
39. Crawford, D. L., Lynch, J. N., Whippes, J. N., and Qusley, M. A. 1993: Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.
40. Chandel S., Sharma I.M., and Mehta P. 2011. Mrigold (*Tagetes erecta* L)-a new host record of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *J Mycol Plant Pathol* 41(4):629-630.
41. Coenye, T. and Vandamme, P. 2007. *Burkholderia*, Molecular microbiology and genomics. Horizon bioscience. Wymondham, UK. 303pp.
42. Davis, A. R., Perkins-Veazie, P., Hassell, R., Levi, A., King, S. R., and Zhang, X. 2008. Grafting effects on vegetable quality. *HortScience.* 43(6):1670-1672.
43. De Vos .P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B..2009. *Bergey's Manual of systematic bacteriology* 2<sup>nd</sup> ed vol. three. The Firmicutes. Springer-Verlag. New York, USA. 1476 pp.
44. Douglast ,S. M., and MacHardy, W. E. 1981. The relationship between vascular alterations and symptom development in *Verticillium* wilt of chrysanthemum. *Physiol Plant Pathol.* 19:31-39.
45. Genova C., Schreinemachers P., Afari-Sefa V. 2013. An impact assessment of AVRDC's tomato grafting in Vietnam. AVRDC-The World Vegetable Center, Shanhua, Taiwan. AVRDC Publication No. 13-773. 52p.

- 
46. Gilard, G., Colla, P., Pugliese, M., Baudino, M., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2013. Control of *Colletotrichum coccodes* on tomato by grafting and soil amendments. J. phytopathol. 162:116-123.
47. Gebel, J., Sonntag, H. G, Werner, H. P, Vacata, V., Exner, M., and Kistemann, T. 2002. The higher disinfectant resistance of nosocomial isolates of *Klebsiella oxytoca*: how reliable are indicator organisms in disinfectant testing. J Hosp Infect. 50: 309-311.
48. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, J. H., Trujillo, M. E., Suzuki, K. I., Ludwig, L., and Whitman, W. B. 2012. Bergey's Manual of systematic bacteriology 2<sup>nd</sup> ed vol. five. The Actinobacteria, Part A and B. Springer-Verlag. New York, USA. 2102 pp.
49. Gordon, T. R., and Koike, S. T. 2015. Management of *Fusarium* wilt of lettuce. Crop Prot. 73:45-49.
50. Hoitink, H. A. J., and Fahy, P.C. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. Phytopathology 24:93-114.
51. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, K.F., Chater M.J., and Hopwood D.A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics (2nd ed.). John Innes Foundation, Norwich, England. 613 pp.
52. Koike, S. T., and Gordon, T. R. 2015. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. Crop Prot. 73:67-72.
53. Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., Goldschmidt, E. E. 2009. A history of grafting. Horticulture Rev. 35:437-493.
54. Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J. F., Li, T. H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A. C., Krishnapillai, V., Hong, W. F., Holloway, B. W., and Timmis, J. N. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA

- 
- probe and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia-Pacific J. Molec. Biol. Biotechnol. 5:19-30.
55. Pullman, G. S., and Devay J. E. 1982. Epidemiology of *Verticillium* wilt of cotton: A relationship between inoculum density and disease progression. *Phytopathology* 72:549-554.
56. Roux, B. Y. J., Wingfield, M. J., and Bouillet, J. P. 2000. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in central Africa. *Eur. J. Forest Pathol.* 20:175-184.
57. Reid, T. C., Hausbeck M. K., and Kizilkaya, K. 2002. Use of fungicides and biological controls in the suppression of *Fusarium* crown and root rot of asparagus under greenhouse and growth chamber conditions. *Plant Dis.* 86: 493-498.
58. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3<sup>rd</sup> ed. APS press, The American Phytopathological Society. Minnesota, U.S.A. 373pp.
59. Tsuchiya, Y., and Muko H. 1963. Occurrence of neck rot disease of *Freesia* sp. in Japan. *Chukan Hokoku Plant Pathol. Sect. NIAS.*16:82-84
60. Vuruskan, M.A., and Yammaz R. 1991. Effects of different grafting methods on the success of grafting and yield of eggplant/tomato graft combination. *ACTA Hort.* 287:405-409
61. Wells, C. G., and Roldan, E. F. 1923. Another economic host of *Bacterium solanacearum*. *Phytopath.* 13: 488-491.
62. Whitby, P. W., Pope, L. C., Carter, K. B., Lipuma, J. J., and Stull T. L. 2000. Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. *J. Clin. Microbiol.* 38(1):282-285.