

種苗傳播細菌性病害之診斷

曾國欽 教授

國立中興大學植物病理學系

電子郵件:kctzeng@nchu.edu.tw; 電話:22840780-333

摘 要

細菌為引起植物病害之重要病原，植物病原細菌可經由種苗、土壤、灌溉水、雨水飛濺、農具與昆蟲等方式傳播。由於帶菌之種苗可經由銷售而使病原細菌傳播或入侵至新地區或國家，而嚴重影響作物之生產，因此種苗傳播細菌性病害常為世界各國植物檢疫防疫單位所重視。快速且正確地對病害進行診斷鑑定，方能有效防範與降低此些病害之發生與散播，而種苗傳播細菌性病害診斷技術之研究發展更為建立健康種苗制度中重要之一環，本文舉例說明種苗傳播細菌性病害之診斷技術，以提供相關人員之參考。

關鍵詞：聚合酵素連鎖反應、血清學技術、選擇性培養基

緒 言

植物病原細菌所引起之植物病害，其病徵與真菌所引起的病徵相類似，常見之病徵有葉斑、葉枯、葉燒 (leaf blight)、萎凋、軟腐、腫瘤 (gall) 等。然由真菌所引起的植物病害，其病組織用肉眼或是光學顯微鏡觀察，常可見到真菌菌絲或其孢子；而由細菌所引起的植物病害，將其病組織切下片段，滴一小水滴於其上，在光學顯微鏡下觀

察，則可常見大量細菌由病組織的切口處湧出，尤其在系統性細菌性病害之罹病組織中菌流更是明顯。在田間進行植物細菌性病害之診斷通常可先依據作物種類及病徵特性等來對病害先進行推定診斷，之後再將標本帶回實驗室進行罹病組織之鏡檢，以及病原細菌之分離純化，再依據其培養特性與生理生化特性之測試及接種試驗等之結果進行鑑定，以確認病原菌之種 (species) 或病原型 (pathovar)。傳統的診斷鑑定方法常需費時費力，近年來由於分子生物技術迅速之發展，使得植物病原細菌之鑑定與病害之診斷更為快速與準確，本文舉例說明種苗傳播細菌性病害之診斷技術。

瓜類細菌性果斑病 **Bacterial blotch of cucurbits**

本病害係由 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (原名 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*) 所引起。本病害之病徵依其所感染之寄主不同而有所差異，其中西瓜於苗期受感染時，子葉和真葉初期呈現水浸狀斑點，之後呈現褐色壞疽斑，當胚軸部分受到感染時，則可引起幼苗倒伏死亡，易誤判為疫病菌所引起。於成株時，罹病植株真葉呈現褐色病斑，然相對溼度高時，病斑可沿葉脈中肋擴展。西瓜果實受害時，果實朝上之表面初期出現水浸狀小斑點，逐漸擴大成為不規則的橄欖色水浸狀塊斑。罹病初期病組織只侷限在果皮，內部果肉組織正常，後期罹病的果實表皮常有龜裂現象，伴隨腐生菌的入侵可使內部果實腐爛。甜瓜苗期受瓜類細菌性果斑病菌感染時，病徵與西瓜相似，成株真葉受感染時，亦會出現褐色病斑，高溼度時病斑上可見乳白色菌泥溢出，葉部病斑處後期常破裂。光滑表皮之甜瓜果實病徵與西瓜果實上之病徵類似，可呈現大型不規則的橄欖色水浸狀塊斑，在網紋洋香瓜品系之罹病果實，表面則呈現凹陷之褐色壞疽斑點與果實蠅危害之斑點類似，病斑不會擴大，但內部果肉呈現褐壞疽腐情形。瓜類細菌性果斑病菌亦可感染苦瓜，罹病葉片呈現褐色壞疽病斑，罹病之果實表面則則呈現水浸狀褐色病斑，溼度高時可逐漸擴

大。本病害之診斷可藉由田間病徵進行初步之推測診斷，將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害，可以king's B 培養基進行分離純化，於30°C培養48小時後，挑取可疑之菌落，將其劃線於改良之半選擇性培養基WFB68（宋，1999。）上，經30°C培養48小時，觀察是否有細菌性果斑病菌菌落出現，典型之細菌性果斑病菌之菌落呈黃綠色圓形，菌落周圍有沉澱帶產生。由於細菌性果斑病菌可引起菸草葉片之過敏性反應，因此分離出之細菌，亦可先以菸草葉片的過敏性反應來測試其是否為病原菌。鑑定本病原細菌時，可依傳統之生理生化特性及病原性測定或以Biolog GN Microplate™ (Biolog Inc. CA, USA)測試，以鑑定是否為細菌性果斑病菌。此外以細菌性果斑病菌專一性引子對SL1/SR1，應用PCR技術，則可快速準確地診斷鑑定罹病組織內之細菌性果斑病菌（宋，1999。），而以細菌性果斑病菌之抗血清應用酵素聯結抗體檢測法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）亦可進行瓜類細菌性果斑病之快速診斷，其靈敏度可達 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml，若結合免疫磁珠分離法與聚合酵素連鎖反應（Immunomagnetic separation and polymerase chain reaction, IMS-PCR）則可將其靈敏度更提高（楊，2001。）。

火鶴花細菌性葉枯病 Bacterial blight of anthurium

本病害係由*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*所引起，為火鶴花產業上，極具破壞性及威脅性之病害。本病害之病徵會因寄主品種不同而有所差異，但主要之病徵為初期自葉尖或葉緣處開始出現水浸狀斑點，後漸轉為壞疽斑，並逐漸擴大呈不規則形，最後葉片乾枯而死。此病原菌亦可由輸導組織向內蔓延，而使得葉片除葉脈外全面出現黃化病徵，在一般火鶴花栽培場中可同時發現水浸狀斑、黃化及壞疽斑等病徵，病勢進展較快，則可快速擴展至葉柄，並蔓延至莖部，當葉柄出現黃化時，此葉柄則極易掉落，此時將掉落之葉柄稍加擠壓可見黃色菌泥，植株最後整株由黃化轉為灰褐色死亡。本病害在

高溫高濕之環境下，病勢進展迅速，在28~32°C下之病害發生最為嚴重。本病原菌可經由自然開口（如：氣孔、葉緣水孔）及傷口等侵入感染，病害傳播除可經罹病植株與健株之接觸感染進行傳播外，還可經雨水飛濺、灌溉水、機械傳播及帶菌種苗等傳播。將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害，可利用NA培養基或Esulin-trehalose medium (Schaad et al., 2001) 進行分離純化，經過純化之細菌可進一步利用菸草葉片的過敏性反應來測試其是否為病原菌，此外可利用引子對Dif1/Dir1 (林氏1999) 進行聚合酵素連鎖反應來偵測鑑定罹病組織中之葉枯病菌，其它如血清技術及Biolog等鑑定方式亦可利用來鑑定火鶴花細菌性葉枯病菌之用 (Schaad et al., 2001)。

茄科植物細菌性斑點病 **Bacterial spot of tomato and pepper**

本病害主要由*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 與*X. vesicatoria* (Xv) 所引起，此兩種病原細菌皆可感染甜椒與番茄，在病原菌感染寄主組織3~5天後，可出現水浸狀斑點，之後斑點轉為壞疽病斑，病斑可發生在葉片、花、果實、枝條（易形成條斑），嚴重時引起落葉。此兩類病原細菌多從葉背之氣孔或從葉片之傷口入侵。本病害常藉由種子傳播而成為最初感染源，在田間則主要藉由灌溉水及雨水飛濺散佈，使病害迅速擴散。本病害之診斷可藉由田間病徵進行初步之推測診斷，將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害後，可利用NA培養基或半選擇性培養基Tween medium (Schaad et al., 2001) 進行分離純化，因本菌可分解Tween 80產生脂肪酸，而與鈣結合沈澱故會有白色之沉澱帶出現，因此可依此特性與其他病原細菌進行區別，此外還可利用引子對RST13/RST14與C-2-2L/C-2-2R進行聚合酵素連鎖反應以偵測鑑定罹病組織中之病原菌，而利用此兩組引子對則可鑑定本病害是由*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*或*X. vesicatoria*所引起 (呂, 2003)。

十字花科黑腐病 **Black rot of crucifers**

由 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 所引起，本病可藉由葉緣水孔侵入，因此常見之病徵為自葉緣向內形成V字型之黃褐色病斑，其周圍有黃暈，病斑內葉脈變黑，黃褐色部分乾枯而破裂。因本病害為系統性病害，在適宜環境下，病原細菌可由葉脈之維管束向上向下蔓延。病原細菌可附著在種子表面或經維管束感染存在於種子內，可引起苗期 damping off，並成為最初感染源。本菌亦可藉由雨水飛濺或灌溉（高灌）傳播，有時在風雨過後，病原細菌可經由葉片傷口入侵，而在葉片上出現散布之點狀病斑。本病害之診斷可藉由田間病徵進行初步之診斷，將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害，可利用NA或PDA培養基進行分離純化，挑取黃色、平滑圓形之菌落再將之純化，或利用選擇性培養基SM進行偵側分離，必要時可再進行相關之生理生化測試以進行確認診斷，而其它鑑定技術如血清學技術與Biolog鑑定系統等則皆可應用於快速鑑定 *X. campestris* pv. *campestris* 之用 (Schaad et al., 2001)，並可應用核酸探針技術進行病原菌之鑑定及罹病組織之診斷 (石, 1994)。

馬鈴薯輪腐病 **Ring rot of Potato**

馬鈴薯輪腐病係由革蘭氏陽性細菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 所引起。本病最初在地上部呈現半邊萎凋，病勢進展甚慢，初期由下位葉葉緣向上捲起、葉片褪色，後期呈現壞疽、褐變。地下部塊莖則沿維管束部分形成輪狀黃褐色病徵，最後維管束變為乳白色至淡褐色腐爛，並呈空腔狀，之後隨軟腐細菌侵入，造成薯塊腐爛。本菌主要藉由種薯傳播，亦會藉由切種薯之刀具傳播。低溫有利於本病害發生，人工接種常需 30 天後才發病，本菌可引起菸草葉片之過敏性反應，因此可利用菸草作為此病菌之指示植物 (張, 1982)。本病害之診斷可藉由田間病徵進行初步之診斷，將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害，可利用 tryptose 培養基

進行分離純化，因其菌落形成緩慢，於20°C下需經培養三天後方出現圓形小點菌落，然一旦出現後即逐漸擴大，直徑甚至可達8~10 mm，有時菌落兼會互相癒合，成為乳滴狀或紡錘狀，表面極濕潤光滑之乳白色菌落。本菌最適生長溫度為18~26°C。此外本菌可利用引子對SP1f/SP1r (Li et al., 1995) 進行聚合酵素連鎖反應進行罹病組織中病原菌之偵測與鑑定，此外血清學技術及Biolog鑑定系統等皆可作為快速鑑定*C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*之用 (Schaad et al., 2001)。

馬鈴薯青枯病 Bacterial wilt of potato

馬鈴薯青枯病係由*Ralstonia solanacearum* (原名*Pseudomonas solanacearum*) 引起。此菌可危害 30 多科，200 多種植物大部分為草本植物，亦有少數木本植物，在台灣之寄主，如番茄、甜椒、馬鈴薯、蓖麻、蘿蔔、紫蘇、落花生、煙草、康富利 (comfrey)、草莓、天堂鳥、火鶴花、洋桔梗、萬壽菊、銀柳、蓮霧、番荔枝、絲瓜、苦瓜等。青枯病菌是由許多不同菌系組成的一個複合種 (complex species)，用於界定青枯病菌菌系的分類系統主要有兩種：一為依據菌株來源及寄主範圍的差異，將青枯病菌區分為五個生理小種 (race)，第一生理小種 (race 1) 菌株能感染番茄、菸草等多種茄科植物、雜草及某些雙倍體香蕉，故又稱茄科菌系 (solanaceous strain)；第二生理小種 (race 2) 菌株主要引起三倍體香蕉及赫蕉屬 (*Heliconia*) 之萎凋病 (又稱 moko disease)，亦稱芭蕉科菌系 (musaceous strain)；第三生理小種 (race 3) 菌株主要危害馬鈴薯及番茄，但對其他茄科植物的病原性較弱，故稱馬鈴薯菌系 (potato strain)；第四生理小種 (race 4) 自菲律賓的薑上分離而得的菌株，且只能感染薑，故稱薑菌系 (ginger strain)；第五生理小種 (race 5) 為自中國大陸由桑樹分離到的菌株，主要危害桑樹，對馬鈴薯、茄子為弱病原性，又稱桑菌系 (mulberry strain)。另一分類系統為依據菌株

的生理生化特性，特別是氧化三種雙醣（lactose, maltose 及 cellobiose）和三種六醣醇（mannitol, sorbitol 及 ducitol）產酸之能力，將其區分為五種生化型（biovar）；生理小種與生物型之間並無絕對相關性，但第三生理小種（race 3）都屬於第二生物型（biovar 2）。近年來隨著生物科技的發展，許多學者以分子生物技術來區分病菌菌系，其中Seal等人利用16S rRNA核酸片段之相似性，將5個 biovar 區分為二個演化群（evolutionary divisions），第一演化群（division I）包括第三、第四與第五的生物型；第二演化群包括第一及二生物型。而在台灣常見之*R. solanacearum* 菌株皆屬於第一生理小種。本病所造成之病徵在初期會造成葉片褪色、下垂、矮化、植株萎凋而嚴重時會導致植株枯萎死亡，若將罹病植株根部及莖部切開時，可見其維管束產生褐化，將切開植株置於含有無菌水之試管中時，可見細菌自維管束中大量釋出，而產生菌流。*R. solanacearum*之傳播方式主要為土壤傳播，然亦可藉由機械傳播、灌溉水與種苗傳播。2000年在后里地區大發生之馬鈴薯青枯病大部份係由*R. solanacearum* race 3, biovar 2 菌株所引起，此些菌株並非台灣本土之race 1 菌株，其原因可能與農民栽種自國外進口之食用馬鈴薯薯塊有關，此些食用之馬鈴薯薯塊可能已受*R. solanacearum* race 3, biovar 2 菌株之感染。本病害之診斷可藉由田間病徵進行初步之推測診斷，將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害，可利用TTC培養基（Schaad et al., 2001）進行分離純化，經28°C培養2~3天後形成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，有些菌株亦可產生褐色素。此外還可利用半選擇性培養基SM-1（Schaad et al., 2001）進行分離純化，必要時可再進行其他生理生化測試加以確認，此外還可利用引子對759/760（Opina et al., 1997）應用聚合酵素連鎖反應進行罹病組織中病原菌之偵測與鑑定，而若需進一步鑑定其生理小種可先利用引子

OLI1 + Y2 + BV345先區分其演化群，再配合碳素源利用之測試來進行區分，或是以biovar 2A菌株的專一性引子630/631運用PCR反應來快速鑑定*R. solanacearum* biovar 2A之菌株。而其它鑑定方式如血清技術與Biolog鑑定系統等亦皆可應用於快速鑑定青枯病菌之用。

石竹科花卉細菌性萎凋病

石竹科花卉細菌性萎凋病主要由*Burkholderia caryophylli* (原名*Pseudomonas caryophylli*)所引起，此菌可感染康乃馨、星辰花、滿天星及洋桔梗等作物。由*B. caryophylli*引起之細菌性萎凋病最常見的病徵為葉片呈灰綠色而下垂萎凋，剝開罹病植株莖部表皮，可發現維管束呈黃褐色，以手觸摸可感覺其具黏性，此外，在罹病植株節間部份，在土壤溫度較低時有時會有縱裂現象發生，將罹病植株樣本帶回實驗室後，經鏡檢確定為細菌性病害後，可利用PDA培養基進行分離純化，此菌在PDA培養基上常可產生褐色素。此菌亦可引起菸草葉片之過敏性反應，因此可利用菸草葉片進行過敏性反應測試，必要時再進行生理生化測試或以Biolog系統鑑定病原細菌確為*B. caryophylli*。此外亦可利用引子對20L/21R運用PCR技術或以ELISA及組織轉漬免疫法等血清學之方式來檢測鑑定罹病組織中病原菌是否為*B. caryophylli* (朱，1999、顏，1998。)

結 語

植物病原細菌所引起之作物病害常可造成農民嚴重之損失，快速且準確的診斷鑑定技術為防治細菌性病害之重要關鍵，本文以種苗傳播細菌性病害為例說明植物細菌性病害之診斷要領，希望有助於植物檢防疫有關人員工作之進行。

參考文獻

1. 石信德。1994。十字花科蔬菜黑腐病菌專一性核酸探針之製備與病菌偵測應用。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
2. 朱軒宇。1999。*Burkholderia caryophylli* 偵測技術之發展與應用。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
3. 宋秉峰。1999。鑑定及偵測瓜類細菌性果斑病菌之聚合酵素連鎖反應技術。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
4. 呂昫陞。2003。鑑定及偵測茄科植物細菌性斑點病菌 *Xanthomonas vesicatoria* 之聚合酵素連鎖反應技術。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
5. 邱硯詩。2002。最近為害台灣中部馬鈴薯之青枯病菌菌系之特性。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
6. 林貝珊。1999。火鶴花細菌性葉枯病菌核酸探針及PCR引子之研發與應用。國立台灣大學植物病理學研究所碩士論文。
7. 楊文仁。2001。西瓜及甜瓜種子上細菌性果斑病菌之偵測。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
8. 張瑞璋。1982。馬鈴薯輪腐病菌之特性及血清診斷法。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
9. 顏久焯。1998。應用聚合連鎖反應偵測 *Burkholderia caryophylli*。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
10. Li, Xiang and de Boer, S. H. 1995. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology* 85:837-842.
11. 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. Mol. Biol. Biotechnology 5:19-30.

12. Schaad N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS press, The American Phytopathological Society. Minnesota, U.S.A. 373pp.

13.



A 馬鈴薯青枯病之田間病徵。



B 具毒力之青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 在 TTC 培養基上之菌落型態。



C *Burkholderia caryophylli* 引起之洋桔梗細菌性萎凋病之田間病徵。



D 石竹科花卉細菌性萎凋病菌 *Burkholderia caryophylli* 在 PDA 培養基上形成之褐色菌落。



E 馬鈴薯輪腐病之罹病植株出現葉緣褪色萎凋之病徵。



F 馬鈴薯輪腐病菌 *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* 在 tryptose 培養基上之菌落型態。



瓜類細菌性果斑病菌*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*危害洋香瓜幼苗，造成幼苗葉片出現壞疽病斑。



瓜類細菌性果斑病菌*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*於半選擇性培養基WFP68上之菌落型態。