

瓜類細菌性果斑病之診斷及其病原菌之鑑定

國立中興大學植物病理學系

曾國欽、徐世典

緒言

瓜類細菌性果斑病 (Bacterial fruit blotch of cucurbits) 係由 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (原名 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*) 所引起。於 1969 年美國佛羅里達州西瓜田即發現此細菌性病害，由於病害發生並不嚴重而未受到重視。直到 1989 年美國佛羅里達州，南卡羅來納州及印地安那等州相繼發生此病害，此後其他西瓜栽培地區亦陸續發生，使得美國西瓜產業遭受嚴重損失，並引起美國數家種子公司與西瓜栽培業者之間的司法訴訟，而受各界重視。西瓜細菌性果斑病菌除了危害西瓜外還可以危害甜瓜、苦瓜、及南瓜等瓜類作物。1994 年在台灣高屏地區，以及台南善化等地栽培之西瓜果實出現類似細菌性果斑病之病徵，由於農民及種苗商皆未見過此病，所以常將此病視為疫病或是炭疽病。此後在台東、花蓮、雲林、嘉義、台中、苗栗、及宜蘭等地亦有此病害發生。在台灣受感染之瓜類作物主要有西瓜、甜瓜與苦瓜，發病嚴重之瓜田罹病率可達 60% 以上，造成農民損失甚鉅。瓜類細菌性果斑病菌目前列為我國檢疫病原之一，此病菌主要係經種子傳播，因此輸入之瓜類種子應予檢測，以防止病菌之入侵及擴散，如何快速診斷或準確地偵測種子帶菌情形實為防範本病害之重要課題。

病原菌特性

瓜類細菌性果斑病菌為革蘭氏陰性細菌、好氣性、具單極生鞭毛，可在 41 °C 生長，無法利用葡萄糖作為唯一的碳素源，在 king's B 培養基上為非螢光性，不具精氨酸二水解酵素 (arginine dihydrolase)，在 crystal violet pectate (CVP) 培養基上不引起凹陷，不水解澱粉 (starch hydrolysis)，具有解脂作用 (lipolytic activity)，能引起菸草葉片之過敏性反應 (hypersensitivity reaction)。

病原菌可以殘存於種子內部及表面，帶菌種子與種苗為此病害主要的初次感染源，病原菌於種子發芽時入侵子葉呈現水浸狀斑點，病原菌常藉雨水或噴灌之水飛濺，而由少數之罹病幼苗散播至附近健康之幼苗。此些帶菌之幼苗移植於田間後，可再藉雨水或灌溉水而將病原菌散播於田間；在高溫多濕環境下，罹病組織常可泌出菌泥，而為田間重要之感染源。果斑病菌由氣孔和傷口侵入，而成熟之瓜果表面會被臘質所覆蓋，所以幼果較成熟果實感病。罹病果實後期於田間腐爛時，殘留於田間之帶菌種子所長出之自生瓜苗與罹病植株殘體及葫蘆科野生植物等，亦為此病原菌可能之感染源。

病徵

茲將西瓜、甜瓜與苦瓜細菌性果斑病之病徵分別說明，以作為病害診斷之參考。

西瓜：於苗期受感染時，子葉和真葉初期呈現水浸狀斑點，後為褐色壞疽斑(圖一)，當胚軸部分受到感染時，則可引起幼苗倒伏死亡，而易被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，果皮朝上表面出現水浸狀小斑點，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(圖一)，內部伴隨腐生菌的入侵使果實腐爛。

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(圖二)。光滑表皮之甜瓜果實病徵與西瓜果實上之病徵類似，常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(圖二)。

苦瓜：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，罹病之果實表面則呈現水浸狀褐色病斑，溼度高時可逐漸擴大(圖三)。

診斷鑑定技術

植物病原細菌病害之診斷通常可依病徵、罹病組織之鏡檢、病原細菌之分離培養、生理生化特性、接種實驗等加以診斷，此外血清反應、噬菌體反應、核酸探針及聚合酵素連鎖反應等技術，亦常應用於植物病原細菌性病害之診斷與病原之鑑定。常見細菌性病害的推定診斷 (presumptive diagnosis) 通常可依病徵、病組織鏡檢及少數關鍵性之檢測項目即可完成。而確認診斷 (confirmatory diagnosis) 則是依據推定診斷之結果進一步確認其正確性，需要鑑定出病原細菌的種 (species) 或病原型 (pathovar)，因此常需進行病原菌之分離與較詳盡之生理生化特性測定及接種試驗。傳統例行的診斷及鑑定步驟大多費時耗力，近年來發展之血清與核酸技術及細菌之自動鑑定系統等則可作為快速之診斷及鑑定工具。

茲將瓜類細菌性果斑病常用之診斷鑑定方法說明如下：1.病徵診斷：依上述瓜類細菌性果斑病之病徵進行苗圃或田間之推定診斷，並將可疑之標本採回研究室，進行進一步之診斷工作。2.組織鏡檢：將田間採回疑似本病害之罹病組織，置於光學顯微鏡下觀察是否有細菌菌流湧出，以診斷病害是否為細菌所引起。3.病原菌之分離與鑑定：將鏡檢時呈現細菌菌流之罹病組織，進行表面消毒後，置於無菌水中，以移植環挑取細菌懸浮液劃線於 king's B 培養基上，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 (5g

Bacto-peptone, 0.25g Calcium chloride dihydrate, 10ml Tween 80, 0.2g Berberine, 0.0001g Methyl VioletB, 15g Agar, 0.05g Carbenicillin, 0.05g Cefoperezone, 0.2g Cycloheximide, 1l H₂O)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。確認診斷鑑定時，則需進行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。4. 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction) 診斷：以細菌性果斑病菌專一性引子對 SL1/SR1，應用 PCR 技術，可增幅出 194bp 大小之細菌性果斑病菌專一性 DNA 片段，能快速準確地診斷鑑定罹病組織內之細菌性果斑病菌，其偵測靈敏度可達 1.2×10^2 CFU，若進行第二次 PCR 反應則可達 1.2 CFU。5. 血清診斷：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) 則可將其靈敏度提高。其原理係將磁珠 (magnetic bead) 與細菌性果斑病菌之抗體聯結後，利用此磁珠吸附樣品中之細菌性果斑病菌，再以磁力濃縮機 (magnetic particle concentrator) 收集吸附有細菌性果斑病菌之磁珠，再進行 PCR 反應，此方法可去除樣品中 PCR 之干擾物質，並可增加其偵測靈敏度。IMS-PCR 在瓜類種子中細菌性果斑病菌之檢測上，具有實際應用之潛力。

參考文獻

1. 王惠亮、鄭安秀. 2001. 瓜類細菌性果斑病菌血清偵測技術之研發. 植病會刊 10: 129-138
2. 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. 國立中興大學碩士論文.
3. 唐致仁. 1997. 西瓜細菌性果斑病菌之研究. 國立中興大學碩士論文.
4. 徐世典. 1998. 常見細菌性病原之鑑定與病害診斷. 植物病原鑑定與病害診斷研習會專刊 P.72-75. 中華民國植物病理學會出版 183pp.
5. 楊文仁. 2001. 西瓜及甜瓜種子上細菌性果斑病菌之偵測. 國立中興大學碩士論文.
6. 鄭安秀、許瑛玲、黃德昌、王惠亮. 2000. 甜瓜對細菌性果斑病菌之感受性及果斑病之防治. 植病會刊 9: 151-156.
7. 鄭安秀、黃德昌. 1998. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 引起的甜瓜和苦瓜細菌性果斑病. 植病會刊 7: 216 (摘要).

8. Fahy, P. C., and Persley, G. J. 1983. Plant Bacterial Diseases A Diagnostic Guide. Academic Press, Sydney, Australia. 393pp.
9. Hopkins, D. L., and Latin, R. X. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* 79:761-765
10. Latin, R., Tikhonova, I., and Rane, K. 1995. Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. *Phytopathology* 85: 1413-1417.
11. Minsavage, G. V., Hoover, R. J., Kucharek, T. A., and Stall, R. E. 1995. Detection of the watermelon fruit blotch pathogen on seeds with the polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85: 1162(Abst.).
12. Rane, K. K., and Latin, R. X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76:509-512.
13. 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.
14. Walcott, R. R., and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84:470-474.



圖一、細菌性果斑病在西瓜苗期子葉及果實上之病徵



圖二、細菌性果斑病在甜瓜葉片及果實上之病徵



圖三、細菌性果斑病在苦瓜果實及葉片上之病徵（鄭安秀、黃德昌提供）