

楊桃細菌性斑點病之診斷鑑定

黃秀珍 教授

國立中興大學生物科技學研究所

電子郵件：hchuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：04-22853527

前 言

民國八十六年間，於中部楊桃主要產區苗栗縣卓蘭鎮發生不明之病害，其病徵為葉片上之紫紅色斑點，周圍有明顯黃暈現象，且嚴重時造成葉片黃化，並提早落葉，在枝條上為黑褐色之凹陷斑點，逐漸擴展為圓形或不規則形病斑，幼果感染則易造成果實畸型，甚至落果。經初步鑑定為由 *P. syringae* 所引起之病害，定名為楊桃細菌性斑點病(蔡，1998; 蘇，1998; 陳，2000)。此病原細菌主要危害葉片、枝條及果實，可全年危害馬來西亞、蜜絲、二林、軟枝及秤錘等之楊桃品種。病原細菌可存活於楊桃枝葉及果實中，罹病之枝葉及果實成為病害發生之主要感染源，藉雨水及風傳播，由氣孔及傷口侵入感染(蔡，1999; 陳，2000)。關於楊桃細菌性斑點病菌，最早在1995年，中國大陸的地方性期刊曾有報告，其指出廣東及海南島一帶有楊桃細菌性褐斑病之發生，並將此病原菌歸屬於 *P. syringae* 的一種新病原型 (pathovar)，定名為 *P. syringae* pv. *averrhoi* (文，1995)，而在臺灣的楊桃細菌性斑點病菌，經前人進行 Biolog system 的生理生化鑑定及寄主範圍接種試驗等，其結果皆顯示此病菌與 *P. syringae* 之其它多種病原型菌株間皆有很大的差異，此應屬於 *P. syringae* 的新病原型(陳，2000)，因此以 *P. s.* pv. *averrhoi* (Pav) 為名。*Pseudomonas syringae* 為革蘭氏陰性菌，桿狀，不形成內生孢子，需氧性，具一至多根極生鞭毛，菌落常呈白色，在 King's B (KB) (King et al., 1954) 培養基中可產生螢光色素，適宜生長溫度為 30 左右，酸鹼值為 7.0 左右。依據危害寄主及病原性的不同，可被分成至少有 57 種病原型 (pathovar) (Hirano and Upper, 1990; Gardan et al., 1997)。

病害診斷及病原菌偵測

此病害可根據病徵、病原菌、生理生化特性及接種試驗判定為主，然而此

傳統方法耗時且費力，近來由於分子生物技術的進步，聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 常被應用於病害之診斷及病菌之鑑定及偵測，近來宋氏及徐氏(2002)已發展 PCR 技術應用於此病害的診斷鑑定，他們乃是利用 RAPD 策略，找到具有專一性引子對 S1/R-S1，在 PCR 的增幅條件為 (a) 94°C 5 分鐘，1 個循環；(b) 94°C 60 秒、55°C 30 秒、72°C 60 秒，30 個循環；(c) 72°C 10 分鐘，1 個循環。在此條件下，由楊桃細菌性斑點病菌全 DNA 能增幅出一條 125 bp 之特定條帶，然對其他細菌菌株則皆無此 DNA 條帶產生，故可作為專一性檢測楊桃細菌性斑點病菌之依據(宋，2002)。當引子對 S1/R-S1 測試楊桃細菌性斑點病菌之染色體 DNA 時，其靈敏度為 10 pg，而用於偵測其細菌數時靈敏度可以達到約 10^4 cfu/ml。當應用於楊桃罹病葉片之診斷時，PCR 反應物中添加 dimethyl sulfoxide (DMSO)，可測得特定的 125 bp 片段，但若未添加 DMSO 則否。由楊桃葉表分離之三種腐生菌，不影響引子對 S1/R-S1 對楊桃細菌性斑點病菌之偵測專一性。應用 PCR 技術偵測人工混菌之楊桃葉片組織萃取液時，未能增幅出 125 bp 的片段，若添加 DMSO 後則有特定的 125 bp 片段出現，但只有在高菌量時才能測得，而若利用管柱純化法則可提高靈敏度至約 10^2 cfu./ml，表示楊桃葉片組織內可能含有 PCR 抑制物(宋，2002)。

參考文獻

1. 文衍堂、黃智輝。1995。楊桃細菌性褐斑病研究初報。熱帶作物學報 16：65-69。
2. 宋子承。2002。鑑定及偵測楊桃細菌性斑點病菌之聚合酶連鎖反應技術。國立中興大學植物病理學系。碩士論文。
3. 陳谷婷。2000。楊桃細菌性斑點病菌之特性。國立中興大學植物病理學研究所。碩士論文。
4. 蔡志濃、安寶貞、林俊義、吳雅芳。1998。楊桃細菌性斑點病之發生及防治。植物病理學會刊 7：216 (摘要)。
5. 蔡志濃、安寶貞。1999。楊桃細菌性斑點病之發生及防治。農業世界。189：60-61。
6. 蘇秋竹，徐世典。1998。在台灣由 *Pseudomonas syringae* 引起之楊桃細菌性葉斑病，植物病理學會刊 7：216-217 (摘要)。
7. Gardan, L., H. Shafif, and P. A. D. Grimont. 1997. DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria. In : K. Rudolph, T. J. Burr, J. W.

Mansfield. D. Stead. A. Vivian, and J. Von Kietzell. (ed.), *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. P445-448 Kluwer Academic Publishers, London, United Kingdom.

8. Hirano, S. S. and C. D. Upper. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:155-177.
9. King, E. O., N. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyrocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

