

# 植物細菌病害之診斷

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；傳真：04-22854633

## 前 言

台灣係屬高溫多濕的熱帶與亞熱帶地區，適合植物細菌病害之發生。由細菌所引起之植物病害常見之病徵有葉斑、葉枯、葉燒、萎凋、軟腐及腫瘤等，此些病徵與真菌所引起者相類似。然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，常可見大量細菌由病組織的切口處湧出，尤其在系統性之罹病組織，此現象更是明顯；而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。植物病害之診斷可先依據病徵、病組織鏡檢及病原菌關鍵性之一、二項特性或血清反應等進行推定診斷(presumptive diagnosis)，以推斷該病害由何種病原所引起，然必要時則需進行確認診斷(confirmatory diagnosis)以確認推定診斷之正確性。確認診斷常需進一步進行病原細菌之分離培養、病原性試驗、生理生化特性及核酸特性之測試，以確認病原菌之種或病原型。此外商品化之細菌鑑定套組如 Biolog 或 API 之鑑定系統，亦可被用來輔助植物病原細菌之鑑定。本文將對台灣地區不同病徵型之植物重要防疫檢疫細菌病害之診斷進行介紹。

## 青枯病 (Bacterial wilt)

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* (原 *Pseudomonas solanacearum*) 為革蘭氏陰性之好氣菌，生長適溫約為 30 。青枯病菌是由許多不同菌系組成的一個複合種 (complex species)，依據寄主範圍的差異，可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) 係由菲律賓罹病薑植株分離而得之菌株，只能感染薑，故稱為薑菌系 (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）。此外依據青枯病菌對 lactose、maltose 及 cellobiose 等三種雙醣類與 mannitol、sorbitol 及 ducitol 等三種醣醇之氧化能力，可將其區分為五種生化型（biovar）。在台灣常見之菌株皆屬於第一生理小種，分別屬於第三或第四生化型；然前些年於台灣中部地區，馬鈴薯青枯病之罹病植株則分離到屬於第三生理小種第二生化型之菌株，其來源可能與農民將自國外進口之食用馬鈴薯薯塊作為種薯有關。青枯病菌可危害 30 多科，200 多種植物大部分為草本植物，亦有少數木本植物。在台灣地區青枯病菌之寄主植物，如番茄、甜椒、馬鈴薯、黃麻、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、空心菜及薑等。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，最後會導致植株枯萎死亡。將罹病植株之根部或莖部切開時，可見其維管束產生褐化，將罹病組織置於含無菌水之試管中，可見細菌自維管束中大量釋出呈雲霧狀。本菌係屬土壤傳播性病害，可在土壤中存活，在濕潤土壤中存活較淹水或乾燥中之土壤為長。此外，植物殘體有利於此菌存活，本菌亦可藉由機械、種苗及昆蟲傳播。本病害之診斷可藉由田間病徵進行初步之推測診斷，並將罹病植株帶回研究室，鏡檢是否有大量細菌自罹病組織切口處釋出。病原菌之分離則可利用 TTC（casein hydrolysate, 1.0 g; Peptone, 10.0 g; Glucose, 5.0 g; Agar, 17.0 g; after autoclave add 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride）培養基進行分離純化，於 30 培養，菌落初呈圓形，之後則略呈橢圓、紡錘或不規則形，中間呈粉紅色，外圍乳白色、平滑、黏液狀之菌落，有些菌株會產生褐色素。此外亦可利用半選擇性培養基 SM-1（TTC medium after autoclaving add Merthiolate tincture 5~50  $\mu$ l, Crystal violet 50 mg, Polymyxin  $\beta$  sulfate 100 mg, Tyrothricin 20 mg, Chloromycetin 5 mg, Cycloheximide 50mg）進行分離純化，必要時可再進行生理生化測試加以確認，此外亦可利用引子對 759（5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3'）760（5'-GTCGCCGTCAAGCAATGCGGAATCG-3'）（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快速檢測，而血清技術與 Biolog 細菌鑑定系統等亦皆被應用於青枯病菌之鑑定。

### 馬鈴薯輪腐病（Ring rot of potato）

本病由 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 引起，本菌屬革蘭氏陽性菌。本病初期在地上部呈現半邊萎凋，病勢進展甚慢，病徵常由下位葉開始，葉緣向上捲起，捲葉處呈灰綠色，後期呈現深褐色壞疽現象。地下部塊莖則沿維管束部分形成黃褐色病徵，形成輪狀之褐變，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，薯塊完全腐爛。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，本菌可引起菸草之過敏性反應，故可利用菸草作為檢測之工具(張, 1982)。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研究室後，經鏡檢確定為細菌性病害後，再進行分離純化。本菌可利用 Tryptose 培養基 (peptone 3 g, tryptose 3 g, yeast extract 3 g, glucose 3 g, agar 20 g) 進行分離，本菌最適生長溫度為 18~26℃，因菌落形成緩慢，於 20℃ 下需經培養三天後方出現圓形小點菌落，然一旦出現後即迅速擴大，直徑甚至可達 8~10 mm，有時菌落間會互相癒合，成為乳滴狀或紡錘狀，表面極濕潤光滑之乳白色菌落。本菌亦可利用引子對 SP1f (5'-CCTTGTGGGGTGGGAAA-3')、SP1r (5'-TGTGATCCACCGGTA-3')(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檢測與鑑定，此外血清學技術及 Biolog 快速鑑定系統等皆亦可作為本菌之快速鑑定。

### 細菌性軟腐病 (Bacterial soft rot)

在台灣植物細菌性軟腐病係由 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 或 *Erwinia chrysanthemi* (Ech) 所引起，其中 Ecc 最適生長溫度為 28-30℃，普遍存在於各地，其寄主範圍廣泛，可引起大部分蔬菜之軟腐。Ech 可在較高溫度下生長，其最適生長溫度為 34-37℃，可引起特殊農藝或園藝花卉作物（如蝴蝶蘭、青蔥、玉米）之軟腐萎凋等。*Erwinia* 軟腐細菌具周生鞭毛，使該菌具游動性與趨化性，可逃離或避開不良環境，到達有利於存活或感染寄主組織之位置，並有助於其對寄主組織之致腐能力；此菌為兼性嫌氧菌，可在無氧環境下生長，因而增加其與其他微生物在自然環境中競爭之能力；常由傷口侵入寄主之幼嫩組織或貯藏器官；可分泌大量之果膠分解酵素將植物細胞壁和中膠層中之果膠物質分解，因而造成植物組織之軟腐。本病之病徵最初會在被害部位出現水浸狀斑點，環境適宜時病斑迅速擴大腐爛軟化。*Erwinia* 軟腐細菌之侵入方式以傷口為主，若葉表或薯塊具有水膜可幫助軟腐細菌之感染。本病菌常以低量殘存於作物或雜草根圈土壤中，若有植株殘體或低溫時，可延長其存活時期。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研究室後，經鏡檢確定為細菌性病害，本菌可利用 NA 培養基進行分離純化，在 30℃ 培養約 24 小時後，自其中挑取半透明圓形之菌落，進一步利用 CVP 培養基(1 N NaOH, 4.5 ml; 10% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3.0 ml; NaNO<sub>3</sub>, 1.0 g; Agar, 1.5 g; Sodium polypectae, 10.0 g; 0.075% crystal violet, 1.0 ml; DW, 500 ml) 確認其是否具有果膠分解酵素，必要時可再進行相關之生理生化測試或接種試驗以進行確認診斷。此外也可利用引子對

5A (5'-GCGGTTGTTACACAGGTGTTTT-3')

5B (5'-ATGGCACGCTACCTGGAAGTAT-3')

Y1 (5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3')  
Y2 (5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3') (朱 1995、Darrasse et al., 1994)  
應用 PCR 技術針對罹病組織進行檢測鑑定，其中引子對 5A/5B 可針對 *E. chrysanthemi* 增幅出 500 bp 之 DNA 片段，引子對 Y1/Y2 可針對 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 增幅出 434 bp 之 DNA 片段。其它鑑定方式如血清技術與 Biolog 快速鑑定系統等亦可用來快速鑑定 *Erwinia* 軟腐細菌。

## 十字花科黑腐病 (Black rot of crucifers)

本病由 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 所引起，本菌屬革蘭氏陰性之好氣菌，具單極生鞭毛，可產生黃色素 (xanthomonadin)，使菌落成為黃色。在含碳水化合物之培養基中，可產生細胞體外多醣體 (xanthan gum)，故菌落呈濕潤、黏稠狀。本病可藉由葉緣水孔入侵，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，病斑內葉脈常呈黑色。本菌屬系統性病害，在適宜環境下，病原細菌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，若菌量過高可引起苗期 damping off，並成為最初感染源。本菌亦可藉由雨水飛濺或灌溉（噴灌）傳播，有時在風雨過後，會在葉片上出現散布之點狀病斑。十字花科黑腐病菌可在雜草的根圈土壤中以低量殘存，而植物殘體亦有利於其存活。本病害之診斷可藉由田間病徵進行初步之推測診斷或將罹病植株樣本帶回研究室後，鏡檢以確定為細菌性病害。本菌可利用 NA 或 PDA 培養基進行分離純化，於 30 經 72 小時培養後，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 SMA (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.6 g; NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 g; NaCl, 2.0 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 67.0 mg; Glucose, 1.0 g; L-methionine, 0.2 g; Starch (soluble potato), 10.0 g; Methyl violet 2B, 1.0 ml; Methyl green, 2.0 ml; Trace element solution, 1.0 ml; Triphenyl tetrazolium chloride, 1.0 ml; Cycloheximide, 50.0 mg, Agar 20.0 g) 進行檢側分離，必要時再進行相關之生理生化及病原性測試等，以進行確認，而血清學技術與 Biolog 快速鑑定系統等亦可應用於本菌之快速鑑定。

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

本病係由 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 所引起，為火鶴花生產上，極具破壞性及威脅性之病害。本病原細菌屬革蘭氏陰性之好氣菌，具單極生鞭毛，含有黃色素 (xanthomonadin)，使菌落成為黃色，在含碳水化合物之培養基

中，可產生細胞體外多醣體 (xanthan gum)，故菌落外表為光滑、黏稠。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。此外病原菌亦可侵入維管束而進行系統性蔓延，使得罹病植株呈現黃化型病徵，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，並感染鄰近之葉柄，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 ℃ 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、機械傳播及帶菌介質或帶菌病土等進行傳播。將罹病植株樣本帶回研究室後，鏡檢以確定其為細菌性病害。本菌可利用 NA 培養基進行分離純化，於 30 ℃ 培養 3 天後，自上挑取黃色、平滑圓形之菌落再將之純化，或利用 Esculin-trehalose medium ( Esculin 1.0 g, Trehalose 0.5 g, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5g, NaCl 5.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, Agar 15.0 g, after autoclaving add Cycloheximide(1 g to 10 ml of 75% ethanol) 1.5 ml, Cephalexin(100 mg to 10 ml of 75% ethanol) 5 ml, Tirmethoprime 3.0 ml, Pyridoxine(1 mg/ml) 1.0 ml, D-methionine (1 mg/ml) 3.0 ml, Triphenyl-tetrazolium chloride(1% aqueous) 5.0 ml) 進行分離，分離純化之細菌可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 ( 5'-CCGGTATGCGAAAGTCCCATCA-3' ) 及 Dir1 ( 5'-GCGTATGGCCCCGAGGCAAC-3' ) ( 林氏 1999 ) 進行聚合酵素連鎖反應來檢測鑑定罹病組織中之葉枯病菌，此外血清技術及 Biolog 等鑑定方式亦可利用來鑑定火鶴花細菌性葉枯病菌。

### 茄科植物細菌性斑點病 (Bacterial spot of tomato and pepper)

本病可由 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*( Xav )或 *X. vesicatoria*( Xv )引起，此兩種病原細菌皆屬於革蘭氏陰性之好氣菌，具單極生鞭毛，含有黃色素 (xanthomonadin)，使菌落成為黃色，在含碳水化合物之培養基中，可產生細胞體外多醣體 (xanthan gum)，故菌落外表為光滑、黏稠。此兩種病原菌可利用澱粉及果膠分解能力之有無進行鑑別，其中 Xav 不具水解澱粉及果膠能力，而 Xv 則具有水解此兩種化合物之能力。此兩種病原細菌皆可感染甜椒與番茄，且其所造成之病徵相同，無法以病徵進行區分，在病原菌感染寄主 3~5 天後，可出現水浸狀斑點，之後斑點轉為壞疽病斑，常發生在葉片、花、果實、枝條(易形成條斑)，易引起落葉。此兩種病原細菌主要由心葉或嫩葉之葉背下方氣孔入侵。侵入寄主植物之最適溫度於 25 ~ 32 ℃，在高濕環境有利病害之發生，溫度低於 20 ℃，

就不適本病之發生。本病害可藉由種子傳播而成為最初感染源，在田間則藉由噴灌及雨水飛濺散佈，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研究室後，經鏡檢以確定其為細菌性病害。本菌可利用 NA 培養基進行分離純化，於 30 °C 培養 3 天後，挑取黃色、平滑圓形之菌落再將之純化。亦可利用選擇性培養基 Tween medium ( Peptone 10.0 g, Potassium bromide 10.0 g, CaCl<sub>2</sub> 0.25 g, Agar 15.0 g, after autoclaving add Tween 80 10 ml, Cycloheximide 75.0 mg, Cephalexin 25.0 mg, 5-Fluorouracil 6.0 mg, Tobramycin 0.4 mg ) 進行分離，因本菌可分解 Tween 80 產生脂肪酸，而與鈣結合而有白色之沉澱帶出現，因此可依此特性與其他病原菌區分，此外可利用引子對 RST13 ( 5'-TGGTTCCAGCCGTCCAGCAGGG-3' )、RST14 ( 5'-CCCTAAAGGCACTGGGCGTCGG-3' ) 與 C-2-2L ( 5'-CAGCAACACGCTGAAATCGTAG-3' )、C-2-2R ( 5'-TAGGGCGTCAGCTTGCAATG-3' ) 進行聚合酵素連鎖反應以檢測鑑定罹病組織中之病原菌，並可同時鑑定本病害是由 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 或 *X. vesicatoria* 所引起 ( 呂，2003 )。

### 柑橘潰瘍病 (Bacterial canker of citrus)

本病係由 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 所引起，可危害芸香科之植物。在經濟柑橘類中，以葡萄柚及甜橙對本病最為感病，檸檬次之，桶柑和柚子、文旦類為較抗性，椪柑則為強抗性。潰瘍病菌為革蘭氏陰性之好氣菌，具有單極生鞭毛，在 NA 平板上可形成圓形、中高、邊緣完整、表面光滑、具黏性之黃色菌落，最適生長溫度為 25~30 °C。 *X. axonopodis* pv. *citri* 可危害葉片、枝條及果實，病害嚴重時，葉片大量脫落使樹勢衰弱，罹病果實不但外觀難看，其所含之糖分、維生素 C、果膠酸皆減少，而蛋白質、檸檬酸及酚類等則增加，使果實市場價值降低，常造成經濟上很大的損失。因此潰瘍病為國際上柑橘產區重要之細菌病害。在台灣此病在葡萄柚、甜橙及檸檬等作物上普遍發生，且危害嚴重，為台灣柑橘栽培管理上之一重要病害。潰瘍病之病徵會依寄主種類不同而略有差異，一般而言，在葉片上首先出現水浸狀暗綠色細點，隨著病勢的進展，病斑逐漸擴大，中央部成灰白凹陷，周圍木栓化隆起，表皮破裂而粗糙；病斑形狀，初期雖為圓形，老舊病斑則頗不規則，病斑常融合成較大之不規則狀，同一病斑於葉片上下表面皆可見到，在病斑邊緣常有黃色暈環。病斑大小依寄主而定，葡萄柚上為最大，甜橙類上次之，檸檬上又次之。枝條上之病徵與葉片上相似，唯其邊緣缺乏黃暈。果實上病斑也常缺乏鮮明的黃暈，又其病斑表面木栓化更甚，外觀也更粗糙。將罹病植株樣本帶回研究室後，鏡檢以確定其為細菌性病害，此菌亦可利用 NA 培養基進行分離純化，於 30 °C 培養 3 天後，挑取黃色、平滑圓形之菌落再將

之純化，經過分離之細菌可利用菸草葉片的過敏性反應來測試其是否為病原菌，或病原性接種測試確認診斷。此外亦可以 Hartung 等人所發表對潰瘍病菌菌專一性之引子對 2 (5'-TGGTGTCTCGTTCGCTTGTAT-3')

3 (5'-CACGGGTGCAAAAATC-3') (Hartung et al., 1993) 進行檢測，此組引子對可以針對潰瘍病菌增幅出 222 bp 之專一性 DNA 片段，可供快速診斷鑑定罹病組織內之潰瘍病菌，或以潰瘍病菌之單元抗體 (monoclonal antibodies) 亦可進行潰瘍病菌之快速血清檢測。

### 檬果黑斑病 (Black spot of mango)

本病係由 *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*，可危害檬果果實、葉片、花穗、枝條及枝幹，而引起落葉、落果，於颱風期尤為嚴重。本菌屬革蘭氏陰性好氣菌，具單一極生鞭毛，不具黃色素，故菌落呈白色，在含碳水化合物之培養基中，可產生細胞體外多醣體 (xanthan gum)，故菌落外表為光滑、黏稠。本病菌所產生之病徵，在葉片初期為水浸狀，後形成墨綠色病斑，上下表面均可發生，後期病斑呈黑色隆起狀，如柏油一般，病斑大小不一，且病斑常互相融合。在葉柄及枝條上均可產生不規則病斑，嚴重時病斑呈潰瘍狀，罹病花穗之小花會黑腐脫落，果實初期為水浸狀，稍隆起，而後呈黑色中央突起星狀破裂現象之病斑，亦可向內蔓延破壞果肉組織，果實罹病後易落果。在果梗或枝條形成之黑色條斑，於高濕時可出現菌泥為病害之重要感染源。本病原細菌主要由傷口侵入，高溫高濕之環境有利於病勢進展 (曾珍, 1995)。將罹病植株樣本帶回研究室後，經鏡檢確定為細菌性病害，可利用 NA 培養基進行分離純化，進行分離將細菌於 30℃ 培養 3 天後，自其上挑取白色半透明之菌落，將其培養於 PDA 培養基上，於 30℃ 培養 3 天後，若出現白色黏稠之菌落，則可將此菌落進行進一步之生理生化測試及病原性測定，以確認鑑定之結果。

### 瓜類細菌性果斑病 (Bacterial blotch of cucurbits)

本病係由 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (原名 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*) 所引起。細菌性果斑病菌除了危害西瓜外，亦可危害甜瓜、苦瓜、及南瓜等瓜類作物。瓜類細菌性果斑病菌為革蘭氏陰性好氣菌，可在 41℃ 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，具有解脂作用 (lipolytic activity)，能引起菸草葉片之過敏性反應 (hypersensitivity reaction)。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，後為褐色壞疽斑，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，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。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。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。

病原菌可殘存於種子內部及表面，成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，再藉雨水或噴灌之水飛濺，由少數之罹病幼苗散播。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。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研究室後，經鏡檢確定為細菌性病害，此菌可用 king's B 培養基進行分離純化，於 30 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 violet B, 15g Agar, 0.05g Carbenicillin, 0.05g Cefoperezone, 0.2g Cycloheximide, 1l H<sub>2</sub>O) 上，經 30 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是否為病原菌。必要時再進行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。或以細菌性果斑病菌專一性引子對 SL1/SR1，應用 PCR 技術，快速準確地診斷鑑定罹病組織內之細菌性果斑病菌 (宋, 1999。), 或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  $10^4$  -  $10^5$  CFU/ml，若結合免疫磁珠分離法與聚合酵素連鎖反應 (Immunomagnetic separation and polymearse chain reaction, IMS-PCR) 則可將其靈敏度提高 (楊, 2001。 )。

## 玫瑰癌腫病 (Crown gall of rose)

本病係由 *Agrobacterium tumefaciens* 所引起，本菌為革蘭氏陰性好氣菌，最適生長溫度介於 25~28 。癌腫病菌主要感染雙子葉植物，其中包含桃、梨、蘋果、杏等果樹及松、樺木、白楊等森林植物。本病菌之病原性與其細胞具有 Ti 質體(tumor inducing-plasmid)有關，會引起寄主植物細胞異常增生與增大之現象，而導致腫瘤病徵之出現。寄主植物為 *A. tumefaciens* 感染後，植株不會立即死亡，而會影響植物生長，造成植株生長衰弱及矮化等（許等，1997）。初生之癌腫組織易遭受昆蟲與腐生菌感染，而造成腐爛使植株受到傷害。本病原菌可殘存於土壤之中，因此病害之發生往往在根冠處發生，本病原菌在田間主要之傳播方式是藉由機械傳播，因此若修剪枝條之農具遭受污染，則於枝條之修剪處易見此病害之發生。台灣地區前些年在玫瑰花作物上，曾嚴重發生此菌所引起之癌腫病，究其原因可能與種苗買賣造成之傳播有關。在分離本菌時可先將植株進行表面消毒後，將腫瘤部位切碎，置入無菌水中製成細菌懸浮液，再劃線於 PDA 培養基上，於 28 下培養 48~72 小時後，若見白色黏稠之菌落，可將之進一步純化，並利用紅蘿蔔切片進行病原性接種測試，以確認所分離出之細菌確為 *A. tumefaciens*。此外還可利用引子對 VirD1F (5'-ATGTCGC AAGGCAGTAGGCCACCT-3') \ VirD1R (5'-CTACAAGGCGTCTTTCAGCAGCGA GC-3') 應用 PCR 技術進行檢測（廖氏 2000）。

## 結 語

細菌所引起之植物病害常可造成嚴重損失，快速且準確的診斷鑑定技術為防治植物細菌病害之重要關鍵。本文介紹台灣地區不同病徵型之植物重要細菌病害之診斷技術，希望有助於植物防檢疫工作之推展。

## 主要參考文獻

1. 朱木貴。1995。 *Erwinia chrysanthemi* 之遺傳差異性、藍色基因選殖及 PCR 偵測。國立中興大學植物病理學系博士論文。
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。

國立中興大學植物病理學系碩士論文。

3. 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。
4. 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。
5. 楊文仁。2001。西瓜及甜瓜種子上細菌性果斑病菌之偵測。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
6. 曾珍。1995。檬果黑斑病菌之特性與其在檬果葉組織顯微鏡觀察。國立中興大學植物病理學系碩士論文。
7. 許秀惠、林俊義、陳福旗。1997。榕樹細菌性癌腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在台灣之發生。植保會刊 39: 195-205。
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. 廖惠玲。2000。台灣植物癌腫病菌之 PCR 鑑定及偵測。國立台灣大學植物病理學研究所碩士論文。
10. Darrasse A, Priou S, Kotoujansky A, Bertheau Y, 1994. PCR and restriction fragment-length-polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato disease. Appl., Environ. Microbiol. 60:1437-1443.
11. Hartung, J. S., Daniel, J. F., and Pruvost, O.P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by polymerase chain reaction method. Appl. Env. Microbiol. 59:1143-1148.
12. 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.
13. 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. Biotechnology 5:19-30.
14. 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.