

植物疫病菌之 診斷技術開發



撰文/安寶貞·蔡志濃

植物疫病之簡介

早年疫病菌 (*Phytophthora deBary*) 被歸類在低等真菌中，隨著分子生物學技術之進步，現代化的分類則屬於藻菌界 (Chromista or Stramenopila)、不等鞭毛類 (Heterokonta)、卵球菌綱 (Oomycetes)、露菌目 (Peronosporales)、腐霉菌科 (Pythiaceae)、疫病菌屬。目前世界上的疫病菌種 (species) 約有 80 餘種，有 30 餘種為近 10 年才新浮現的；疫病菌危害的作物則高達千屬以上，是非常重要之植物病原菌之一。歷史上著名的病害包括十八世紀的歐洲馬鈴薯晚疫病，曾造成百萬人飢饉死亡與百萬人的遷徙美洲；近年來的櫟樹猝死病、山毛櫸疫病及多種新浮現的樹木疫病，均造成重大的經濟損失與生態、景觀的破壞，備受世人關注與重視。

台灣地處熱帶與亞熱帶，氣候高溫多濕，非常適合疫病菌的繁殖與傳播，依據「台灣植物病害名彙」及近年論文發表之記載，危害台灣農作物之疫病菌共有 28 種，受害作物則在 150 屬 (genus) 以上，包括多種果樹、蔬菜、花卉等。大部分的疫病菌之寄主範圍非常廣泛，會相互感染與四散蔓延，而大部分的感病作物整株均可被害。尤其疫病菌的生活史需時甚短，有時僅需 3-5 天；而疫病的危害往往是爆發性的，常於颱風豪雨後 2-3 星期內摧毀整片田園，造成的經濟損失非常慘重。

要如何降低疫病菌的危害？疫病的防治首重“預

防”，因此疫病菌之診斷鑑定為明瞭“植物是否罹患疫病或處於受疫病菌威脅的環境”之首要工作，亦為採取何種防治策略與開立處方簽之判別依據，在此介紹國內外經常使用之疫病與病原菌之診斷鑑定技術。

植物疫病之診斷與疫病菌之鑑定技術

植物疫病之診斷與疫病菌之鑑定技術大致分別為兩類，傳統方法與分生技術，各有其優點，應可以合併使用，增強診斷鑑定效率。傳統方法之優點為正確、直接、經濟，可篩檢大量樣品中極微量的病菌，並可將病菌純化培養，供往後實驗，這一點是分生技術目前無法達成的。傳統方法最大的困難點為需要專業人才操作，而人才培養實屬不易。

分生診斷技術是近二、三十年新發展的先端科技，隨著技術日新月異，方法越趨簡便、快速、精準及高靈敏度。依據檢測原理之不同，技術又可以分為「血清抗體」與「核酸」兩類。利用「血清抗體」開發之分生技術最常用的為 ELISA、晶片及反應試紙；「核酸法」需經限制酶切割、或雜合反應、或 PCR 增量與電泳染色，常用的為點墨法、電泳膠片及晶片。與傳統方法相比，分生技術的優點為流程操作需時較短、客觀、不需要植病專業人才，缺點為價格高昂、無法獲得活體、無法檢測新的病原；而血清抗體法與核酸探針法兩者相比，前者較便宜、快速、簡便，而後者精準度較高，但價格最為昂貴。

植物疫病之傳統診斷鑑定技術

目前有關疫病菌之分類鑑定仍然以形態特性作為主要之判別依據，例如孢囊、卵孢子、菌絲膨脹體的形態等等，而生理與生化特性、病原性等為輔助依據。近年來為增加疫病菌鑑定之精確度，常輔以分子特性之分析，最常用的為核醣體內轉錄區間(ITS)之DNA基因序列。

利用傳統技術來診斷病害是否由疫病菌引起，水源、介質是否被疫病菌污染，可經由病徵檢查與葉片誘鈞、組織分離等技術來判斷。診斷鑑定者需為專業人士，要熟知疫病菌的一些重要形態特徵。完成一個診斷鑑定作業流程，快則幾分鐘，慢則一星期，一般需要2-3天的時間。在檢定過程中，如果檢出疫病菌，則百分百可以確定其為病因；但如果檢定不出疫病菌，則病害可能為其他原因造成，但也可能因採樣技術與檢定技術的限制，而無法檢出。

1. 病徵與病兆檢定

依據染病部位之病徵，再經顯微鏡觀察，可以幫助病害快速診斷，需時幾分鐘而已。而環境中濕度的高低也可以幫助判別，露天栽培之植物，地上部位罹患疫病，一般都發生在陰雨季節或連續降雨後；溫室植物，只要濕度過高，隨時可被疫病菌感染。疫病病徵依染病部位之不同，可大別為三類。

(1) 新梢、葉部、花器之病徵

植物地上部組織感染疫病後之共同病變過程為，被害部出現水浸狀病斑，組織褪色而後褐變。在感染初期，病組織仍保有相當之韌性並不軟化，到後期，患部才腐敗、崩潰、瓦解，但無惡臭味。疫病因有特殊之發病條件，易與其他病害區別，唯一困擾的是較易與腐霉菌(*Pythium spp.*)引起者混淆，宜加注意。

(2) 莖基部、主根之病徵

植物出現萎凋或枯死現象時，往往是莖基部或主根受土傳病原菌危害，此時切開患部，由疫病菌引起者，其莖基部稍微隘縮，罹病組織呈褐色，腐

敗但未被水解，組織偶而乾裂崩潰，有特殊之霉腥味道，為其特徵。除疫病菌外，一些土傳病原菌亦會引起植物萎凋，此時需輔以鏡檢、病原分離或分生診斷鑑定技術，幫助鑑定。

(3) 根部染病之病徵

疫病菌引起之根腐病，在病害輕微時，地上部不會出現明顯病徵；病害嚴重時，地上部顯現黃化、萎凋、生長衰弱、甚而死亡之情形。但因疫病造成之地上部病徵往往與營養缺乏、施肥不當、藥害、土壤理化性質不佳、或其他根部病原菌引起者相似，區別十分困難。且根部病害常為複合感染，病因較複雜，需經科學方法鑑定，才能確定病因。

(4) 病兆鑑定

在潮濕的環境下，病斑上的病菌會長出球形或近似球形的孢囊，在顯微鏡下非常容易觀察。此外經由切片與染色，可以看到組織內的管狀菌絲，亦容易與其他非藻菌類病菌引起者區別。一般檢定方法(圖一)，可將病組織放在高濕密封盒或塑膠袋內於24°C下經過24小時再鏡檢，診斷率會顯著提高。

2. 葉片誘鈞法診斷植體、土壤與流水中之疫病菌

其原理為在淹水的狀態下，疫病菌易形成孢囊，釋放游走子，再用葉片來誘鈞游走子，24小時內葉緣部份會長出大量的孢囊(圖一)，經顯微觀察後，判斷疫病之精確度達100%，專家甚至則可判斷由何種疫病菌引起。說明如下：

(1) 植體與土壤之檢測

將5-10g(或大量)要檢定的病根、種球或土壤置於廣口瓶(或水桶)內，加入蒸餾水淹蓋組織與土壤1-2cm以上，再將寄主葉片之片段(1.0 × 1.0cm)懸浮其上(圖一)，放置於有光線且通風良好之處，2-5天後葉片會變色，鏡檢變色葉片，如果是疫病菌引起者，可以見到非常多的疫病菌孢囊。此法亦可用來偵測灌溉水中是否有疫病菌存在。



圖一 疫病菌的診斷鑑定流程、增量方法及分生技術之切入點 (紅色箭頭部份)。

菌 (*Phytophthora infestans*) 甚而 A² 菌系污染, 或是花卉種苗被 *P. ramorum* 或 *P. kernoviae* 感染。由於進口種球或種苗多半先經藥劑處理, 須先將種球放入含蒸餾水之容器內, 於低溫 15-20°C 下放置 24 小時, 稀釋掉農藥, 再將種球移至高溼的塑膠容器內, 並覆蓋潮溼紙巾, 放置於 20°C

(2) 盆栽苗之檢測

檢查 (進口) 盆苗攜帶疫病菌之流程, 進口種苗可能來自疫區, 一般會經藥劑處理, 直接用上述誘釣方法檢測時, 可能因藥劑的抑制作用, 而無法成功。此時, 先將帶介質之盆苗置於一個大的水桶內, 在水桶內加入無菌水於室溫下靜置 24 小時, 稀釋掉農藥, 將污水倒入另一桶內後滅菌, 再將新的無菌水加入放置盆栽的桶內, 水表面懸浮寄生葉片, 置於 20-24°C 下 2-5 天, 如果苗木帶菌, 則可以誘釣到疫病菌。使用此方法, 多起自歐洲進口之外觀健康的杜鵑盆苗, 均被檢測出疫病菌 (圖一)。

(3) 灌溉流水之檢測

將葉片的 (一般用柳橙) 邊緣剪掉, 放在尼龍網做的籠內 (10×10×10cm), 將尼龍網籠以繩子固定於岸邊並懸浮於灌溉流水上, 3-4 天後可將葉片取出, 直接在顯微鏡下觀察。誘釣的方法很多, 除葉片誘釣者可以直接觀察外, 其餘均需與病原菌分離技術一起使用, 才可以診斷檢體中是否有疫病菌。

3. 誘病法診斷植物、種球內潛伏之疫病菌

此法多用於檢測進口貨品是否被檢疫疫病侵染或污染, 例如檢查馬鈴薯種薯是否被晚疫病

下 1-2 星期, 至發芽組織或種球表皮出現褐變斑塊時, 再鏡檢、分離、或以分生技術檢測。如果檢查的是苗木時, 則以自來水沖洗地上部莖葉後再以蒸餾水沖洗, 在溼潤的狀態下隨即以大塑膠袋將地上部套住, 放置於 20°C 下 1-2 星期, 促進其發病後再檢查 (圖一)。檢查每一種作物之檢疫疫病均有其各自的標準作業流程 (Standard Operating Procedure, SOP)。

4. 選擇性培養法直接分離病原菌

該方法最為費時, 但是其最大優點是可以獲得病原菌, 供往後實驗使用。作業流程約需 1-5 天, 先將要檢定的罹病組織或根段洗淨, 經表面消毒或不經消毒均可, 瀝乾水分後, 放置於選擇性培養基上, 1-5 天後檢查有無疫病菌自組織邊緣長出。此外, 一般誘釣法誘釣到疫病菌時, 均會再進行分離手續, 並將病菌純化保存, 以供病原菌分類鑑定、配對型測定、病原性及生理小種測定及其他試驗使用, 並可以配合分生技術進行種間分類鑑定、基因型鑑別及親緣關係分析等。

常用的選擇性培養基有兩大類 (表一), 一類是柯文雄教授等人開發的選擇性培養基, 疫病菌與腐霉菌均可生長, 休眠孢子與厚膜孢子均可發芽,

表一 疫病菌選擇性配養基之配方

添加化合物*	柯氏培養基	Massago氏培養基
Ampicillin	100 ppm	500 ppm
Mycostatin	50 ppm	25 ppm
PCNB	10 ppm	25 ppm
Benomyl		10 ppm
Rifampicin		10 ppm
HMI (Tachigarin) 3-Hydroxy-5-methylisoxazole		25-50 ppm

*基礎培養基為5%CV8A，每公升培養基中含50mL V-8蔬菜汁、2g CaCO₃及1.5g瓊脂，蔬菜汁與碳酸鈣須先混合，經1500 rpm離心5 min。

適合地上部組織之分離；另一類是日人 Massago 等人開發的選擇性培養基，大部分疫病菌種與極少數的腐霉菌種可以生長，但是疫病菌之孢囊、游走子及厚膜孢子無法發芽，適合根部組織與菌類相複雜時（如誘釣時）之分離使用。

疫病菌之分生診斷鑑定技術

1970 年代以後，開始以分生技術來研究生物之分子特性，逐步深入探討生物的奧秘。早期的分生技術多為實驗室內的研究，例如蛋白質層次的電泳圖譜 (electrophoretic protein patterns) 與同工異構酵素圖譜 (isozyme patterns) 分析，主要在比較疫病菌種間與種內族群間的差異性。爾後，進展至核酸 (DNA 或 RNA) 層次之研究，多項不同功效的分生技術陸續被開發出來，尤其是聚合酶連鎖反應 (PCR) 技術發展後，配合探針（或引子對）與核酸限制酶的使用，諸如 RT-PCR、Nested-PCR、Multiplex-PCR、RAPD-PCR、SSR-PCR、PCR-RFLP、PCR-AFLP 等等，這些方法廣則可以區別疫病菌與非疫病菌，亦可用於疫病菌種間之區分，細則可以區分疫病菌之單一菌株、種內之演化、地緣性、系統型或基因型之異同等。其中最著名的為 RG57 探針的開發，它用於馬鈴薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 之指紋圖譜分析，來判別基

因型與演化追蹤。

有關利用分生技術來進行疫病菌的鑑定與病害診斷技術之開發說明如下：

1. 分生技術之應用於疫病菌之分類鑑定與親緣關係分析

目前，分子生物技術僅能作為疫病菌的分類鑑定之輔助依據，但可以彌補傳統分類之主觀性，與解決在鑑定相似種或變種時經常遇到之瓶頸。而分子標誌 (molecular markers) 可用為分類依據之原理為該基因伴隨菌種演化的程度而決定，因此需慎選有代表性的標誌。

最常用於分類依據的分子標誌為 ITS(internal transcribed spacer)，1990s 年代之後，發現真核生物之核糖體內轉錄區間 (internal transcribed spacer, ITS) 的 DNA 基因序列具有保守性，ITS1 與 ITS2 區域的 DNA 序列在同種間之相似度極高，可作為分種之輔助依據，因此國際間在學術研究上使用頻度非常高，ITS 序列已經成為發表新種、雜交種或變種的必備條件。

一般 ITS 定序方法非常格式化，須先獲得純粹培養之疫病菌，人工培養後（方法不拘），經冷凍乾燥後加入液態氮後研碎，低溫 -20°C 冷藏後，直接請生技公司進行 DNA 萃取、PCR 反應及後續之 DNA 定序作業流程。建議 PCR 反應時使用之通用引子對為 ITS5（非 ITS1）與 ITS4，可以將 ITS1/5.8S/ITS2 全長 DNA 序列夾出後直接總量定序；定序時使用之引子對包括 ITS5、ITS4 及 5.8S2-1、5.8S2-2，後兩者是專為疫病菌設計的引子對。定序後共有 4 條序列，可以經過 Vector NTI 軟體程式的重疊駢比接合，完成疫病菌單一菌株 ITS 基因序列定序。由於疫病菌的染色體為雙套，如果因鹼基的插入或缺失而導致兩條基因不等長時，此時就需要進行選殖 (clone) 步驟，進行單一 DNA 定序，一般需要定序 3-5 條。此後，可進入 NCBI 網站，利用 BLAST 工具上傳 ITS 序列與 Gene Bank 中已登錄的序列比對，判讀傳統鑑定結果的正確性。由

於疫病菌為國際間非常重要之病原菌，資訊庫中收集之疫病菌 ITS 序列資訊已經非常齊全，同種疫病菌之 ITS 序列相同度非常高，往往在 98.5% 以上，有時不同種的相同度亦有高達 99-100% 者，例如 *P. palmivora* 與 *P. arecae*，但差異度在 2% 以上者則不能視為同一種疫病菌。

目前很多學者亦依據 ITS 基因序列來探究疫病菌種間的親緣關係，而 Cooke 等人即依此將疫病菌分為八群，並認為疫病菌由腐霉菌 (*Pythium*) 演化而來，露菌則是從疫病菌再進化出來的。此外，一些具代表性的的分子標誌亦被逐年開發出來，能有效提升分子鑑定的可靠性，包括 β -微管蛋白 (β -tubulin)、細胞色素 C 氧化酶 I & II (cytochrome C oxidase I & II)、ATPase 等，已經有 7 種細胞核與粒線體的核酸分子標誌常用於疫病菌的鑑定與親緣關係分析。

2. 分生技術之應用於植物疫病之診斷檢測

對檢測疫病菌引起的病害，近年來已有越來越多的分子檢測技術被開發出來，包括各種廣效性或專一性的核酸探針，較常用的為專一性核酸序列配合南方雜合反應 (southern blot) 或聚合酶連鎖反應 (如 RT-PCR、Nested-PCR、Multiplex-PCR) 進行疫病菌快速檢測，不僅操作簡便，精確度與靈敏度高，也可節省不少時間。

在台灣，台灣大學劉瑞芬教授等人亦根據疫病菌 18S/ITS1/5.8S/ITS2/28S 核酸序列設計疫病菌廣效性引子對 (Phys-1/Phya-2) 可用於檢測台灣常見疫病菌種類。她亦針對 *P. palmivora*、*P. parasitica*、*P. capsici*、*P. cactorum*、*P. cinnamomi*、*P. cryptogea* 分別設計各種專一性引子對，並配合 Phys-1/Phya-2 之應用開發以 Nested PCR 快速檢測上述疫病菌之技術。檢測時需進行兩輪，一般將所收集之組織樣品以均質機研磨後，應用非常簡便的方法抽取 DNA，以廣效性引子對 Phys-1/Phya-2 進行第一輪的 PCR 反應，如果有疫病菌反應，則以第一輪 PCR 之增幅產物做為第二輪 PCR 之模板 DNA，再用種專一性

引子對進行 PCR 反應，可以判斷病害由何種疫病菌造成，因此 Nested PCR 具有提高專一性及增加靈敏度之優點。

此外，除核酸外，利用蛋白質抗原的特異性亦可製作血清抗體，開發成診斷鑑定試劑，結合酵素的血清抗體 (單元與多元抗體) 亦正式應用於疫病的田間診斷，國外市面已有廣效性的檢測試紙出售，唯價格十分高昂，多為學者使用。

結語

分生技術的開發對於疫病菌之分類鑑定與親緣關係分析之幫助非常大。目前，分子特性雖然僅作為生物分類鑑定之輔助參考依據，但終將有一日，生物之遺傳演化將被瞭若指掌，分子特性將會取代傳統的外觀特徵，成為生物分類鑑定的主要且客觀的憑證。然而無論在國內或國外，目前實際應用分生技術於田間疫病之診斷鑑定的案例非常稀少；更由於國內尚無商品化的疫病菌分生檢測試劑生產，而國外進口的試劑價格非常昂貴，一般農民送檢樣本之病害診斷仍然依靠傳統方法，使得為疫病菌設計之分生技術目前仍然為試驗研究的專用品。

此外，由於分生技術具專一性，必須與病菌本身的核酸或蛋白質反應，而作物在未發病時，疫病菌存在何處或是否存在？讓使用分生技術直接檢測田間植株、土壤、介質及水源時，往往較檢測純化後之疫病菌困難甚多，其原因除菌體微量不易取得外，組織內也可能有干擾因子，往往造成檢測成效不彰。因此，分生技術仍須仰賴傳統技術支援，例如先以分離技術與誘釣作業以增量疫病菌，再將長出之菌絲或誘釣的孢子進行分生檢測，則精準度與靈敏度將可大增。無論何時，傳統方法應與先端分生技術結合，以截長補短，發揮加成效應，讓病菌鑑定與病害診斷技術更趨完善，達到病害防治之最終目的。

AgBIO

安寶貞 行政院農業委員會農業試驗所 植物病理組 組長
蔡志濃 行政院農業委員會農業試驗所 植物病理組 副研究員