

大豆細菌性斑點病之研究

朱啓魯 陳建忠

一、前 言

大豆細菌性斑點病 (Bacterial Blight) 在臺灣僅見有文獻之記載而缺乏系統性之研究，因而就發生病學及生態學方面探討本病害之特性以作鑑定之根據。

本病害常發生於濕冷之季節而普遍侵害葉部，但有時也侵及莖部及豆莢，在新竹、苗栗及屏東一帶之大豆田中可發現此病。葉部發病時形成小而多角形之黃色斑點且其中心處呈水浸狀，其四週由狹窄而黃綠色之暈環所圍繞，嚴重時病斑變褐或變黑甚而小型病斑癒合而成不規則之塊狀病斑，有時病菌也可沿葉脈侵入。

引起本病害之病原細菌為 *Pseudomonas glycinea* Coerper 具有綠色螢光，本病之傳播係種子着生 (Seed borne) 感染，同時也可經病葉而感染，為大豆最嚴重之細菌病，被害嚴重時，引起早期落葉，影響大豆生育甚為顯著。本研究承農復會補助並蒙蘇鴻基博士之指導，特此謹致謝忱。

二、材料與方法

(一) 試驗材料：

1. 大豆品種：(1)臺大高雄五號(2)臺農二號(3)三國(4)64—91。
2. 病原菌 *Pseudomonas glycinea* Coerper (自苗栗農校農場田分離)。
3. 枯草菌 *Bacillus subtilis* (取自中興大學)。
4. 大腸菌 *Escherichia coli* (取自中興大學)。
5. 金剛砂：(600mesh)

(二) 試驗方法：

1. 接種：

於溫室盆栽大豆品種為臺大高雄五號、臺農二號、三國及 64—91 等四品種，俟其植株長達 20~25cm 時施以人工接種，其法為先用脫脂棉沾以75%之酒精消毒健全之葉面，蒸餾水沖洗之，待其乾燥後再以金剛砂輕微擦傷葉片並以無菌水沖去金剛砂，然後將病原菌懸浮液噴佈或塗於葉片，置接種室中保持適當溫濕度，經 24 小時移出，待一定期間後觀察其發病反應。

2. 病菌形態之觀察：

菌體用陰染色法染色以油鏡頭鏡檢並用測微計測其大小。

3. 染色性：

利用單染色法，Gram 氏染色法，抗酸性染色法及鞭毛染色法以觀察病原菌之染色性質，並用枯草菌及大腸菌作對照。

4. 培養性質：

用斜面培養，穿刺培養及液體培養等方法觀察菌體之發育生長狀況。本試驗進行時固體培養基採用 pH7.0 之 Medium B (Proteose peptone 20 gm, Glycerol 15gm, $K_2 HPO_4$ 1.5 gm, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3gm, Agar 15gm per liter of H_2O) 液體培養基為 Nutrient Broth (Beef extract 3 gm, Peptone 5 gm, Nacl 5gm, Agar 18gm per liter of H_2O)

5. 生理性質：

利用化學或物理的方法以測定本病原菌之各種生理性質反應並用枯草菌及大腸菌為對照，記

錄其反應以作鑑定之依據。

三、試驗結果

1. 接種：

於 24.5°C 溫度下，經接種後之葉片 4—5 天即出現黃褐色之斑點，嚴重時則病斑癒合而為大型之黑色病斑，若於葉片背面接種則較葉片表面易於發病，有時病菌也可沿葉脈蔓延，較罹病之品種為 64—91，臺農二號，較抗病者為臺六高雄五號及三國。

2. 病菌形態：

病原菌用陰染色法 (Negative staining) 鏡檢結果，在陰染之背影中呈現短桿狀近橢圓形之桿狀菌，由所測 52 個菌體之平均為 $2.402 \times 2.065 \mu$ 。

3. 染色性質

細菌施以 Gram 氏染色法，抗酸性染色法及鞭毛染色法觀察其反應結果如表一。

表一：菌體之染色反應

染色種類	菌類別	<i>Pseudomonas glycinea</i> Coerper	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
The gram stain	呈色 反應	紅	濃紫	紅
		—	+	—
The acid fast stain	呈色 反應	藍	藍	藍
		—	—	—
Flagella staining		單極鞭毛	周鞭毛	周鞭毛

「註」：(+) 表示陽性反應 (—) 表示陰性反應

4. 培養性質：

固體培養時，置 28°C 之定溫箱中經 48 小時以觀察平面及斜面之培養性質，穿刺培養時經六天，液體培養時，置 37°C 定溫箱中經 48 小時，其結果如表二。

表二：菌體之培養性質

培養方法	菌類別	<i>P.glycinea</i> Coerper	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
平面培養 (菌落)	形狀 高度 周緣	點狀 (Point form)	鈍形	不規則
		穹隆狀 (Pulvinate)	穹隆狀	穹隆狀
		全緣	粗糙	全緣
斜面培養 (劃線)	形狀 呈色	小棘狀 (Echinulate)	小棘狀	小棘狀
		具綠色螢光	乳白色	白色
液體培養 (表面生長情況) (Nutrient broth)		環狀 (Ring)	表皮狀 (Pellicle)	膜狀 (Membranous)

5. 生理性質：

菌類之生理性質係種類鑑定上重要之一環，茲將有關之重要生理反應述之於後：

白明膠之液化 利用白明膠培養基培養結果 *P. glycinea* 及 *E. coli* 不能使白明膠液化而枯草菌則具有使白明膠液化之能力。

吡啶之反應：經 Kovacs 及 Gnezda 法測定結果 *P. glycinea* 及 *B. subtilis* 都不能產生吡啶而 *E. coli* 則有吡啶之生成。

表三 細菌硫化氫之生成及 Gram 氏染色反應

反應	細菌別	<i>P. glycinea</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Iron Agar	性狀	有	有	沒有
	強度	+++	++++	-
Lead acetate Agar	性狀	有	有	沒有
	強度	+++	+++	-
Gram反應	Iron Agar	-	+	-
	Lead acetate Agar	-	+	-

表四：細菌氨之生成

檢驗法	細菌別	<i>P. glycinea</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Nessler 法	呈色	橙黃色	橙黃色	淺橙黃色
	強度	++	++	+
石蕊試紙法	呈色	藍色	藍色	藍色
	強度	+++	+++	++

表五：以硫磺酸試液與 α -naphthylamine測定細菌之硝酸鹽還原作用

培養日數 及反應	細菌別	<i>P. glycinea</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
二日	呈色 強度	淡紅色 +	淡紅色 +	紅色 ++
四日	呈色 強度	血紅色 +++	橙紅色 ++	暗紅色 +++
六日	呈色 強度	暗紅色 ++++	暗紅色 +++	暗紅色 +++
八日	呈色 強度	淡紅色 ++	深橙紅 ++	淡紅色 ++
十日	呈色 強度	深橙黃色 +	橙黃色 +	橙黃色 +

表六：細菌於 Litmus milk 培養液中對牛乳之消化能力及醱酵

細菌別	反應性	凝乳		消化
		Acid	肉膜形成	
<i>P. glycinea</i>	-	藍色	沒有	-
<i>B. subtilis</i>	+	棕色	有	+
<i>E. coli</i>	+	紅棕色	沒有	-

表七：細菌之澱粉水解作用

細菌別	培養法呈色		過濾法呈色	
	呈色	強度	呈色	強度
<i>P. glycinea</i>	藍色	++	藍色	++
<i>B. subtilis</i>	紅褐色	+	紅褐色	+
<i>E. coli</i>	藍色	++	藍色	++

表八：細菌對碳水化合物之醱酵作用

細菌別		<i>P. glycinea</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Glucose	氣體之生成	-	-	+
	酸性反應	+	+	+
Lactose	氣體之生成	-	-	+
	酸性反應	-	-	+
Sucrose	氣體之生成	-	-	+
	酸性反應	-	-	+

表九：700m μ (光譜) 下 pH 值對 *P. glycinea* 之生育影響

pH 值	混濁度	pH 值	混濁度
2.8	0.01	6.8	0.33
3.6	0.03	7.6	0.29
4.4	0.30	8.4	0.19
5.2	0.46	9.2	0.12
6.0	0.42	10.0	0

表十：溫度與 *P. glycinea* 生長之關係（培養二十四小時）

溫 度	冰 箱 5°C	室 溫 21°C	25°C	28°C	30°C	35°C	40°C
生長狀況	-	+++	+++	++++	++++	+++	-

由以上結果顯示大豆細菌性斑點病(*Pseudomonas glycinea* Coerper)病原菌具綠色之螢光，菌落圓形，邊緣光滑，液體培養時表面呈環狀。菌體呈短桿狀近橢圓形，Gram氏陰性菌，非抗酸性反應，單極鞭毛菌。本病菌不能形成吡啶，可產生氨及硫化氫，能使硝酸鹽還原，對白明膠無液化之能力，對牛乳無消化或發酵之能力，不能使澱粉水解，對 glucose 可產生酸但無氣體之產生，不能使 Lactose 產生酸或氣體，pH 值之發育範圍為 pH 4.4~7.6 最適溫度 28~30°C 最低溫度為 5°C 最高溫度為 40°C

四、結 論

本病害於大豆春作時發病較重而於夏作時則發病甚少，此因春作時氣溫低濕度大，每使豆苗生長勢不佳，致枝葉有遲滯之現象而極易感染大豆細菌性斑點病，氣溫高而又乾燥之夏作期中，一般豆苗均生長良好，不易感染病害且也不宜於病菌之發育。病菌多侵害葉部，有時也侵及莖部及豆莢。

引發本病之病原菌為 *Pseudomonas glycinea* Coerper 在其培養物上可看到綠色之螢光，鏡檢時菌體短桿狀近橢圓形，在消毒之馬鈴薯塊上培養呈黃棕色，生長旺盛而無腐蝕性，能使硝酸鹽還原，對澱粉無水解作用，能使葡萄糖 (glucose) 發酵而產生酸但不產生氣體，此種特性可供作簡單之鑑定方法。

五、摘 要

1. 本病害常發生於濕冷之季節而普遍侵害葉部。
2. 引起本病之病原菌為 *Pseudomonas glycinea* Coerper 係種子着生菌，也可經由病葉感染，培養基斜面培養時，呈現綠色之螢光。
3. 病原菌呈短桿狀、Gram 陰性菌、非抗酸性、單極鞭毛。
4. 平面培養時，菌落圓形，邊緣光滑，斜面培養時，菌體呈小棘狀、液體培養基培養時，表面呈環狀。
5. 病原菌發育之最適溫度為 28~30°C 最低溫度為 5°C 最高溫度 40°C。
6. 病原菌發育之適當 pH 值為 pH 6.0~7.4。
7. 大豆品種三國及臺大高雄五號較為抗病，臺農二號及 64—91 則較為罹病。

六、參 考 文 獻

1. Donald Champerlain and Benjamin Koehler. 1964. Soybean Diseases in Illinois. Circular 676, pp. 16-17.
2. Cross, J.E. et al. 1966. Plant Disease Reporter. 50(8):557-564.
3. Howard w. Johnson et al. 1954. Diseases of Soybeans and Methods of Control Circular No. 391, pp. 2-4.
4. Howard w. Johnson et al. 1955 Soybean Diseases. Farmer's Bull. No 2077. pp. 3-5.
5. Lo. T. T. 1961. A Brief Report on the Plant Diseases and their Control in Taiwan. p17.

6. Pelcizar, M. J. 1957. Manual of Microbiological Method. pp. 140-166.
7. Robert, S. Breed et al. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th Edition. pp. 3-5.

STUDY ON BACTERIAL BLIGHT OF SOYBEAN CAUSED BY *PSEUDOMONAS GLYCINEA* COERPER

By

C. L. Chu and C. C. Chen

SUMMARY

This report deals with one of the most important bacterial disease of soybean caused by *Pseudomonas glycinea* Coerper. The results obtained are summarized as follows.

1. Bacterial blight of soybean is more serious during periods of cool weather and frequent rains especially in spring season of cultivated soybean field.

2. The disease is caused by *Pseudomonas glycinea* Coerper which are seed-borne and can survive also in diseased leaves from growing season to the next.

3. The pathogen is short rod in shape and showed reactions of Gram negative, non-acid fast stain, single flagellum.

4. The culture of the organism shaped circular, echinulate and ring forms in agar colony, agar stroke and nutrient broth respectively.

5. The optimum temperature of the pathogen are 28°-30°C, minimum 5°C, maximum 40°C.

6. The optimum pH value for the development of the pathogen are between 6.0-7.4.

7. Varieties of Sanko and TuKH No. 5 are less susceptible than Tainung No. 2 and 64-91.



Fig. 1: *Pseudomonas glycinea* Coerper

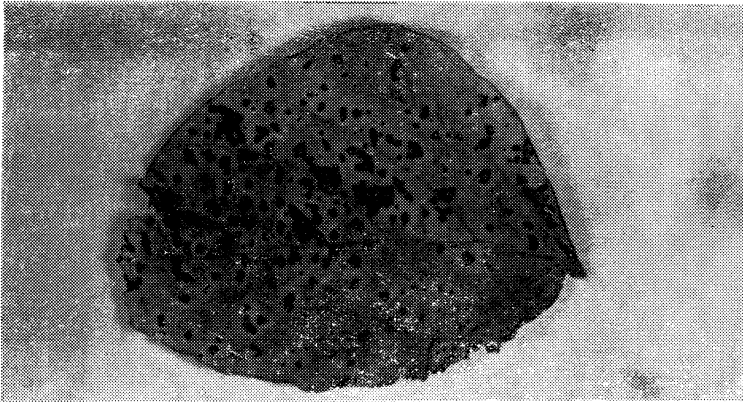


Fig 2: Bacterial blight on the upper surface of a soybean leaflet



Fig 3: Bacterial blight on the lower surface.