

蔬菜細菌性病害之接種技術

許秀惠

臺灣農業試驗所

在整個自然界中，到處都有細菌的蹤跡，如空氣中、水中、人、動植物表面或體內等，但是大部份的細菌是腐生的(saprophytic)，不會引起植物病害，只有小部份的細菌是植物病原細菌，可引起植物病害，目前已發現可感染植物的病原細菌約有 200 多種，除少數外，大部分的植物病原細菌為桿狀，大小約 $0.5-1.0 \times 1.0-4.0 \mu\text{m}$ ；細菌為單細胞，構造簡單，必需用光學顯微鏡，在 1000 倍的放大倍數下才能觀察其菌體，也可用電子顯微鏡觀察菌體形態及構造。

通常植物病原細菌可分泌果膠分解酵素(pectic enzymes)或纖維分解酵素(cellulolytic enzymes)來分解或破壞植物組織，或者形成細胞外多醣體(extracellular polysaccharides)或產生毒質(toxins)影響植物體內水份或養分之輸導系統，或干擾植物生長激素(plant growth hormones)之平衡，而使植物細胞異常分裂或生長等。但植物病原細菌不像病原真菌具有侵入構造，無法直接自植物表層細胞侵入植物體內，必需藉由傷口(如風雨、人、昆蟲或線蟲等因素造成的)或植物的自然開口(如氣孔、水孔、皮目、葉痕或蜜管等開口)進入，若此時環境條件適合，則植物病原細菌可進入植物體內造成感染並在植物體內迅速繁殖，就能引起植物細菌性病害。

簡而言之，植物之所以會發生病害，一定要有三大因子同時存在，即病原菌，感病的寄主及適合病原菌感染及病害發生的環境等。因此當我們進行人工接種試驗時如進行細菌病原性測定或寄主範圍測定或抗病篩選或抗病育種等，就必需同時兼顧此三因子，方能獲得成功的人工接種結果，或得到真正抗病的品種。今分別就此病害發生三要件：接種源，植物及環境條件等逐一說明進行人工接種試驗時所應注意之事項。

一、接種源：

細菌可造成植物病害主要是因為具有病原性(pathogenicity)，因此我們在選定供試之菌株時首要留意的是此菌株是否具有病原性？又其毒力(virulence)之強度如何？另外，部份病原細菌具有不同的生理小種(race)，而不同的生理小種其對不同的寄主植物有不同的致病能力或毒力，甚至不同的生理小種對同一種寄主其致病能力或毒力也有所差異，因此選定供試菌株之前必需對此病原菌之病原性及生理小種等特性有所了解方能正確選擇，若所選菌株為弱毒力之菌株將使我們選出之植株不是真正抗病的植株，或接種時只用一種生理小種進行試驗而沒有測試其他生理小種，則所選出之植株將對該病原菌之其他生理小種可能不具抗性而造成問題，因此供試菌株之選擇非常重要。

植物病原細菌在人工培養過程中仍可維持其病原性，但是有些細菌若在培養基上培養時間太長有時會失去毒力，當然我們可利用不同方法培養菌株而不會失去毒力。倘若太老的菌株失去其毒力，我們或可將該菌株再接再種至其原寄主後，再從該寄主分離細菌，則此細菌在寄主體內繁殖後或可再恢復其毒力。因此，選定供試之菌株後就必需了解該供試菌株培養的適當條件、培養的時間，方能獲得處於生長對數期(log phase)之病原菌，另外，接種源濃度也影響接種後病徵之表現，所以必需依所使用的接種方法調配適合的接種濃度。

二、植物：

一般要了解細菌病原性或寄主範圍時，供試植株之數量依品種純度特性而選擇適當的株數，通常每一個品種需準備 4 棵，而進行植物抗細菌性病害篩選或育種時，每一供試品種均需準備 10 株或 10 株以上。供試植株的株齡，生長階段，生理營養狀況等也是影響病害發生的因子，若植株年青、有活力，正是最適合接種的時期，一般認為較弱的植株會較感病，其實此觀念並不正確。另外，接種時選擇適當的接種部位，可使接種結果又快又正確，又能顯示真正的抗感性反應，且最好能同時接種一已知的感病及抗病的對照品種，可協助分析試驗結果。

一般而言，病原菌可在其感病寄主上引起典型的病徵，若在不親合性植物上則造成不典型病徵(即所謂的過敏性反應，hypersensitive reaction)，即會在接種部位或周圍形成壞疽，這種過敏性反應出現的壞疽病徵與病原菌在感病寄主上造成之壞疽病徵不同，一般過敏性壞疽出現的時間比典型的壞疽病徵出現得早，而且只有乾燥的特性不會有水浸狀現象；此種不典型過敏性的病徵會在病原菌與抗性品種，病原菌與非寄主植物，及無毒力的突變菌株與感病品種等幾種不親合性組合之間形成，但在病原菌與感病寄主之親合性組合之間則不會出現過敏性之壞疽。但當我們所使用之接種方法不當或其接種源濃度過高時也會引起過敏性壞疽，或感病寄主處於不適當的生物氣候下時，如植株太老，或是某些植物雖是感病但其子葉是抗病的，若我們接種子葉也會出現過敏性壞疽，當然，若供試之病原菌失去其毒力，也會出現過敏性壞疽。

三、最有利於植物感染之環境條件：

植物病原細菌除經由自然開口進入植物體內外，最重要的是靠傷口侵入植物體內，因此除了引起斑點型病徵之病原菌外，若想成功地進行人工接種則最好能提供病原菌新鮮的傷口，對於萎凋型維管束病害則需提供病原菌一個能深至維管束之傷口，而對於癌腫病菌(*Agrobacterium* spp.)引起之腫瘤病害，一定要提供新鮮的傷口，癌腫病菌才能感染並增生形成腫瘤病徵。

通常適合植物生長的環境也是適合病原細菌感染及病害發生的環境。環境因子不但影響寄主本身，也影響病原細菌甚大，其中溫度和濕度為最主要的因子，一般而言，溫暖潮濕的環境是細菌性病害發生最有利的環境，當溫度升高尤其高至對寄主植物有壓力時，再加上高濕(80-90%以上)的環境，則細菌容易侵入並造成感染，植物表面若有水膜時，細菌可藉著水膜從殘存的植物體表面移至靠近的傷

口或自然開口處，再加上相對濕度高時(80-90%以上)植物氣孔會打開，則細菌經由氣孔侵入感染的機會增加，而且高濕的環境下可使傷口新鮮度維持較長的時間，有利於病原菌侵入感染。因此要能成功地完成人工接種，就必需提供該病原菌侵入感染的最佳環境。但對少數低溫之細菌性病害若提供高溫的環境則病害不會發生，另外，若接種後植株放置之環境突然溫度下降至非常低溫，則可能造成病徵延遲或甚至不發病的現象，濕度的變化也會造成同樣的問題。

目前臺灣蔬菜作物上之重要細菌性病害有十字花科黑腐病(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、茄科細菌性斑點病(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 或 *Xanthomonas vesicatoria*，原為 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)、西瓜果斑病(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)、細菌性軟腐病(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 或 *Erwinia chrysanthemi*)、馬鈴薯輪腐病(*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)及茄科青枯病(*Ralstonia solanacearum*，原為 *Pseudomonas solanacearum*)等。而用於植物接種的方法頗多，如噴灑(spraying)，壓力噴灑(pressure spraying)，真空滲透法(vacuum infiltration)，磨擦接種(rubbing)，果實或莖穿刺法(fruit or stem pricking)，浸根法(root dipping)，土壤混菌法(soil infestation)，根部傷害及土壤灌注法(root injury & soil drenching)，剪葉或剪莖法(leaf or stem clipping)，注射法(syringe injection)，及傷口滴菌或抹菌法(dropping or smearing on wounds)等。一般而言，細菌所引起之病徵有葉斑(leaf spot)、葉枯或葉燒(leaf blight)、萎凋(bacterial wilt)、軟腐(soft rot)、腫瘤(gall)等，進行接種試驗時可依病原菌所造成之病徵不同及所需的試驗目的不同等因子而選擇適當的接種方法，目前臺灣蔬菜上已知之病害，可依其病徵不同將之分為斑點型，軟腐型及萎凋型等三大類病徵，今分別舉出幾種較常用之接種技術及應注意事項以供參考。

1. 斑點型(如葉斑、果斑、葉枯等)病害之接種技術：

(1) 噴灑法(Spraying)

此方法是最自然的接種方法，病原菌主要由氣孔進入，在植物細胞間隙繁殖而引起斑點狀病徵，但此種接種方法的病斑數並不恆定，因病斑數多寡取決於氣孔打開的頻率，因此接種後最重要的是需提供一個高濕度的環境，以增加病原菌侵入、繁殖，病徵發展及病害發生的理想環境；而此環境之光線若太強或太弱也不適當，需依植物不同而選擇適當的光照度，且一般光照的時間約12 - 14小時。另外，接種源濃度可高至 10^8 cfu/ml，因為噴灑接種之病原菌主要由氣孔進入，所以不會因高濃度而造成不典型之病徵。

(2) 壓力噴灑法(pressure spraying)

顧名思義，此方法與一般噴灑方法最大不同點在於壓力，因壓力噴灑法是藉由噴槍之壓力將細菌懸浮液噴灑至植株表面，此壓力同時會對植株造成極細小之傷口，而提供細菌更多侵入之機會，因此此方法出現之病斑數會較噴灑法多且分佈較均勻，但為避免噴槍之壓力過大而傷害植株之上表皮細胞，接種時需留意噴槍之壓力(約1.5 atm/cm)及噴槍與植株葉表之距離。另外，除接種濃度不可太高(約 10^{6-7} cfu/ml)外，其餘條件與噴灑方法相同。

(3) 浸泡或真空滲透法(dipping or vacuum infiltration)

浸泡滲透：將供試植株地上部浸於一種含有可減少表面張力藥劑之細菌懸浮液中約 30秒或一分鐘(依植物而定)，之後將供試植株放置適合發病之環境下。此種藥劑如L-77(Union carbide)，藥劑濃度為 0.02% (v/v)。接種源濃度約 10^{6-7} cfu/ml。

真空滲透：將供試之植株整棵浸於細菌懸浮液中，並放置抽真空盒中，控制適當壓力下抽真空約 30秒或一分鐘(依植物而定)，之後將供試植株放置適合發病之環境下。接種濃度約 10^{6-7} cfu/ml。

以滲透法接種所得之病斑相當均勻且病斑清楚，頗適合不同品種抗感性病斑之比較。

(4) 磨擦接種法(rubbing)

通常以手指或消毒過之棉花沾細菌懸浮液直接磨擦葉表，或以細小如灰塵之金鋼砂先灑至葉表，再以手指或消毒過之棉花沾菌液磨擦葉表，之後將供試植株放置適合發病之環境下。接種濃度約 10^6 cfu/ml。

2. 軟腐型病害之接種技術：

(1) 組織穿刺法(tissue pricking)

通常以細小蟲針或牙籤沾細菌懸浮液再穿刺先經表面消毒之白菜葉梗或馬鈴薯塊莖上；或先以蟲針或牙籤製造傷口，再將定量之細菌懸浮液滴於傷口處；或以微量吸管吸取定量之細菌懸浮液直接穿刺入供試組織內，並將此吸管留滯組織內；最後將接種完之供試組織放置保濕之培養皿內，觀察軟腐病菌之致腐能力。接種濃度為 10^8 cfu/ml。

(2) 莖穿刺或莖注射法(stem pricking of syringe infiltration)

以牙籤或細小蟲針沾細菌懸浮液，並穿刺於植株之莖上，需確定維管束部位已有傷口，否則只在接種處形成小斑。或以注射針將細菌懸浮液注入莖內，接種後將植株放置高濕及適當的環境下。接種濃度為 10^{6-7} cfu/ml。

(3) 真空滲透法(vacuum infiltration)

對於大量的樣品如馬鈴薯薯塊之接種可於採收後直接將薯塊浸於細菌懸浮液中，以抽真空方式讓細菌滲透入薯塊內，之後置 15°C 下乾燥過夜，低溫處理後再種於溫室或田間觀察。接種濃度為 10^{6-7} cfu/ml。

3. 萎凋型病害之接種技術：

一般造成植物萎凋之病原菌主要為害維管束，因此接種時必需讓病原菌進入植物之維管束部位，如經由莖、根或葉柄等處進入。一般輪腐病的接種環境通常溫度較低(約 $20 - 25^{\circ}\text{C}$)，青枯病較高(約 $30 - 32^{\circ}\text{C}$)，溫度太過高或太過低也會造成不典型病徵、病徵延遲或不出現病徵等現象。相對濕度影響病害發生及病勢發展，尤其是剛接種後的那段期間，相對濕度非常重要，因此接種後若將植物放置溫暖但乾燥的環境下，因病原菌不易進入維管束內則接種不易成功。接種源濃度高可加速病害發展，但需小心出現不典型病徵，一般若直接接種於植株之葉片、莖或子

葉等部位，其接種源濃度約需 10^{6-7} cfu/ml，若直接接種於土壤中則需 10^{7-9} cells/ml。

(1) 莖穿刺或莖注射法(stem pricking of syringe infiltration)

是萎凋型病害常用之簡單且有效的接種方法，以細小蟲針或牙籤沾細菌懸浮液直接插入植物之莖內，或以注射針(No.25)將小量細菌懸浮液直接注射入植物莖內即完成接種，之後將供試植株放置適合發病之環境下。接種濃度為 10^{6-7} cfu/ml。

(2) 剪葉或剪莖法(leaf or stem clipping)

此方法非常簡單方便，尤其測定萎凋型病害之病原性時，常使用此方法，只要將剪刀浸於細菌懸浮液中數秒鐘後，直接剪除植株之莖、葉片或葉柄，則病原菌可由傷口處進入維管束內造成感染，之後將供試植株放置適合發病之環境下。

(3) 浸根法(root dipping)

於移殖時將植株拔出，小心抖掉土壤，再浸於調好濃度之細菌懸浮液內，則病原菌可經由側根之小傷口侵入感染，或用剪刀剪去側根尾端 1 - 2 cm，造成傷口後，再於細菌懸浮液中浸泡，浸泡所需之時間則視植物而異，之後將供試植株放置適合發病之環境下。接種濃度為 10^{6-7} cfu/ml。

(4) 土壤混菌法(soil infestation)

是最自然的一種接種方法。通常於植株移殖時使用此種方法，因為移殖時將植株拔出會使植株側根出現小傷口，再立即種於已事先混合細菌懸浮液之土壤中，通常以菌：土壤=1：10(V/W)之比例混合；接種後需維持土壤潮濕，以利於病原菌侵入感染。最後將供試植株放置適合發病之環境下。接種源濃度為 10^8 cfu/ml。

(5) 根部傷害或土壤灌注法(root injury or soil drenching)

是最自然、有效的一種接種方法。以小刀在盆栽植株根部切數刀使側根形成小傷口後，再灌注定量的接種源；接種後需維持土壤潮濕，以利於病原菌侵入感染。最後將供試植株放置適合發病之環境下。接種源濃度為 10^8 cfu/ml。

(6) 真空滲透法(vacuum infiltration)

將供試之植株整棵浸於細菌懸浮液中，並放置抽空盒中，控制適當壓力下抽真空約30秒或一分鐘(依植物而定)，之後將供試植株放置適合發病之環境下。接種濃度為 10^{6-7} cfu/ml。

總之，可用於植物細菌性病害之接種技術頗多，方法也相當簡單，但要得到確實且可信任的病原性測定結果、寄主範圍、抗病品種等資料，則必需先對病害發生之適當環境，病原菌之病原性、毒力、適當之培養條件、接種源濃度、生理小種及供試植株之最佳培養條件等資訊有所了解，並提供病害發生之最適條件，才能得到正確的結果，或選育出真正具抗病性的品種，方不會事倍功半。

