

作物銹病之診斷鑑定

鍾文鑫 助理教授

國立中興大學植物病理學系

電子郵件：wenchung@nchu.edu.tw

摘 要

銹菌(rust fungi)為作物之重要病原真菌，其寄主範圍廣泛，可造成蕨類、裸子植物與單/雙被子葉植物的病害。台灣銹菌最早於日本人澤田兼吉氏所發表之台灣產菌類調查報告中有記載，爾後經多位研究學者之採集鑑定，目前於台灣有記錄的銹菌有 41 個屬，334 個種，另只發現無性世代(春孢子或夏孢子)之種類有 109 種(王也珍等, 1999)。其中以 *Puccinia* 屬所引起禾本科、蔥蒜科及菊科作物的銹病，*Uromyces* 屬所引起豆科與蔥蒜科作物的銹病，*Phakopsora* 屬所引起大豆與葡萄的銹病，*Gymnosporangium* 屬所引起的梨赤星病，*Cronartium* 屬所引起的松毛銹病，與 *Hemileia* 屬所引起咖啡銹病等銹菌為最重要。作物銹病之診斷鑑定主要以銹菌的形態學及寄主專一性為最重要依據。近年來，鍾氏等人利用 internal transcribed spacer (ITS) 去氣核糖核苷酸序列研究豆科銹菌 *Uromyces* 屬之親緣性，並已建立完整之分子資料庫。

緒 言

銹菌屬於銹菌目(Uredinales)，為擔子菌類(Basidiomycotina)中相當大的一群，包含 13 科、129 屬，目前全世界約有 7,000 種(Cummins & Hiratsuka, 2003)。根據化石記錄，銹菌的存摺可追溯到白堊紀約 130 至 150 萬年前(Littlefield, 1981)。銹菌遍佈全世界，除少數幾屬，如 *Ravenelia*、*Diabole*、*Phakopsora* 及 *Prospodium* 分佈於較溫暖地區外，其餘的屬從寒帶到熱帶都可被發現(Littlefield, 1981)。因其為重要之作物病原真菌而受到重視，如小麥稈銹菌(*Puccinia graminis* Persoon)、小麥葉銹菌(*P. recondite* Roberge)、玉米銹菌(*P. polysora* Underw 與 *P. sorghi* Schw)、大豆銹菌(*Phakopsora pachyrhizi* H. & P. Sydow)、豆科銹菌(*Uromyces appendiculatus* (Persoon) Link、*U. viciae-fabae* (Persoon) J. Schroeter 與 *U. vignae* Barelay)、咖啡銹菌(*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome)等(徐世典等,

2002; Cummins & Hiratsuka, 2003)。銹菌之寄主範圍相當廣泛，包括蕨類、裸子植物與單/雙被子葉植物都可發現其踪跡 (Littlefield, 1981)。銹菌為絕對寄生菌，通常需要依賴寄主植物生存，因此寄主專一性為作物銹病診斷的重要要素之一 (Cummins & Hiratsuka, 2003)。

依形態及生理的差異，銹菌生活史中包含有 5 個時期，即精子期(0)、春孢子期(銹孢子期)(I)、夏孢子期(II)、冬孢子期(III)及擔孢子期(IV)。具有 0~IV 時期的稱為大生活史(macrocytic life cycle)，缺夏孢子時期的稱為半生活史(demicyclic life cycle)，只具精子時期、冬孢子時期與擔孢子期的稱為小生活史(microcytic life cycle)，另具有精子時期、春孢子/夏孢子時期(此兩類孢子具冬孢子的功能)與擔孢子期稱為內生活史(endocyclic life cycle)(Cummins & Hiratsuka, 2003)。各時期孢子的核變化與侵染寄主植物有密切對應的關係(Ono, 2002)。其中夏孢子時期為引起作物銹病最主要的時期，可隨氣流造成遠距離或大面積傳播，為田間重要的二次感染源(Agrios, 2005)。依銹菌對植物寄生性而言，可分成同主寄生(autoecious life cycle)與異主寄生(heteroecious life cycle)；同主寄生為銹菌在完成其生活史過程中不須有中間寄主的存在，反之，異主寄生必須有中間寄主存在才可完成其生活史，如梨赤星病菌 (Agrios, 2005)。目前為止，銹病之診斷鑑定仍以銹菌的形態學與寄主植物為主，由於銹菌具有不同時期的孢子，孢子形態的特徵為診斷鑑定之重要基準(Cummins & Hiratsuka, 2003)。此外，孢子堆的形態與孢子的生長方式亦可提供銹菌診斷鑑定的依據。近年來，利用分子生物學技術所發展的分子標識，已應用在有害微生物之診斷鑑定，鍾氏等人(2004a; 2004b)利用 internal transcribed spacer(ITS)之核酸序列成功的區分寄生於豆科植物上四種 *Uromyces* 屬的銹菌。本篇文章可提供未來從事作物銹病之診斷鑑定相關工作時應注意的事項與搜尋可用的特徵。

作物銹病標本的採集與保存

作物銹病標本的製作與保存，除可研究銹菌之分類與分佈外，亦可作為其病原學與生態學的研究材料。由於銹菌分類學的位置常與寄主植物有密不可分的關係，因此在分類鑑定上需參照相同分類群之病害標本。在採集銹病標本時需廣泛採集，此舉可正確掌握銹菌之地理分佈與寄主範圍，同時亦可對其傳播時期與傳播路徑作全盤的追蹤調查。以下為採集銹病標本時應注意之事項：

1. 採集典型銹病病徵之發病部位，即具新鮮成熟的孢子堆，避免採集發病初期之未成熟孢子堆或已腐敗之發病部位。
2. 由於銹菌與植物有密切關係，為能正確診斷鑑定銹菌，除植物發病部位外，亦須同時採集發病植株之不同部位，如花器、果實等。
3. 採集過程中須確實記錄採集地之發病狀態、環境條件與周遭生長植物，以利

日後從事銹菌之生態學與寄主特異性研究。

4. 採集的標本須儘速將其乾燥，在採集過程中可先將標本放入塑膠袋中，並避免陽光直接照射造成枯萎。帶回到實驗室後，可以舊報紙將標本水份吸乾，每天更換報紙，約 7-10 天完全乾燥後即可保存。
5. 完成乾燥的標本須明確記錄標本採集地、採集年月日、採集者姓名與登錄標本號碼。
6. 待完成所有資訊填寫後，可將標本置於標本箱並保存於標本櫃或標本室，此時須注意防潮及防止昆蟲取食。

作物銹病病害標本之診斷鑑定

作物銹病之診斷鑑定須與已確定的銹病標本比較，並確認它們在形態學上的異同點，進而鑑定所採集銹菌的種類。若手邊無可供比較之銹病標本時，可根據文獻所描述之銹菌形態學特徵、圖片或照片作比較。以下為銹病之診斷鑑定的順序：

1. 正確的鑑定寄主植物，但只局限於文獻記錄或已存在之標本。
2. 觀察測量銹菌之孢子堆的性狀與構造、孢子形成的方式、孢子的形態、大小、發芽孔的數目與分佈、表面構造及附絲的形態與大小。
3. 記錄觀察測量所得之形態學特徵，利用銹菌檢索表檢索該銹菌所屬的科與屬，並參照前人所發表該屬之專題著作(monograph)中種的描述。如上所述，若手邊有已確定之該銹病的標本時，可善加利用以增加診斷鑑定的正確性。
4. 若研究者本身無法確定所採集之銹病標本時，可請教其他銹菌分類研究學者。

作物銹病之病徵與銹菌形態學的觀察—以豆科銹菌的夏/冬孢子為例

病徵之觀察(圖一)

於解剖或光學顯微鏡下觀察孢子堆的形態、發生部位及孢子生長方式。

夏孢子形態之觀察(圖二)

將夏孢子以挑針挑起，並置於光學顯微鏡下觀察孢子形態，包括形狀、大小、表面構造、發芽孔的數目與分佈位置、孢子壁的厚薄等特徵。

冬孢子形態之觀察(圖三)

同夏孢子之觀察模式，將冬孢子以挑針挑起，並置於光學顯微鏡下觀察孢子

形態，包括形狀、大小、細胞數目、孢子頂端是否突起、表面構造與附著物、孢子壁的厚薄等特徵。

銹菌之分子診斷的研究—以豆科銹菌為例

rDNA 之萃取

由於銹菌為絕對寄生菌，無法在一般培養基下培養，因此在從事銹菌之分子層次相關研究時，萃取 DNA 或 RNA 的方式與一般可培養之真菌所使用的方法不同，特別是在非新鮮材料下更突顯其困難度。作著參考 Suyama 氏等人與 Virtudazo 氏等人的方法，萃取銹菌之夏孢子或冬孢子的總 DNA，供豆科銹菌親緣關係之研究。其操作方法如下：

1. 自單一孢子堆(夏孢子堆或冬孢子堆)挑起 100 至 150 個孢子，置於兩片已滅菌之載玻片中間並將孢子壓碎。
2. 待孢子被壓碎後，以 20-25 μ l 之萃取緩衝溶液(10mM Tris-HCl pH=8.3, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.01% Proteinase K, 0.01% SDS)，將載玻片上的總 DNA 洗下。
3. 待總 DNA 完全洗下後，將所收集之溶液置放在 37°C 下培養 60 分鐘，爾後再調整到 95°C 下培養 10 分鐘。
4. 吸取 2-3 μ l 之萃取液進行 PCR 反應。

PRC 反應與 DNA 解序

本研究所使用的引子、引子序列及其在 PCR 反應均以 Chung 氏等人(2004a)為主，PCR 之反應物及成份如下：

總量 DNA	2 μ l
ITS5-u 引子	0.2 μ M
ITS4-u 引子	0.2 μ M
DNA polymerase	1unit
dNTP	2.5mM
MgCl ₂	2mM
ddH ₂ O	to total 40 μ l

將所增幅之 ITS 片斷解序，並以 Cluster X 電腦軟體排列所有分析之 ITS 序列，待排序完成後，以電腦軟體 PUAP 分析三種豆科銹菌菌株間的親緣性。(圖四)

結 論

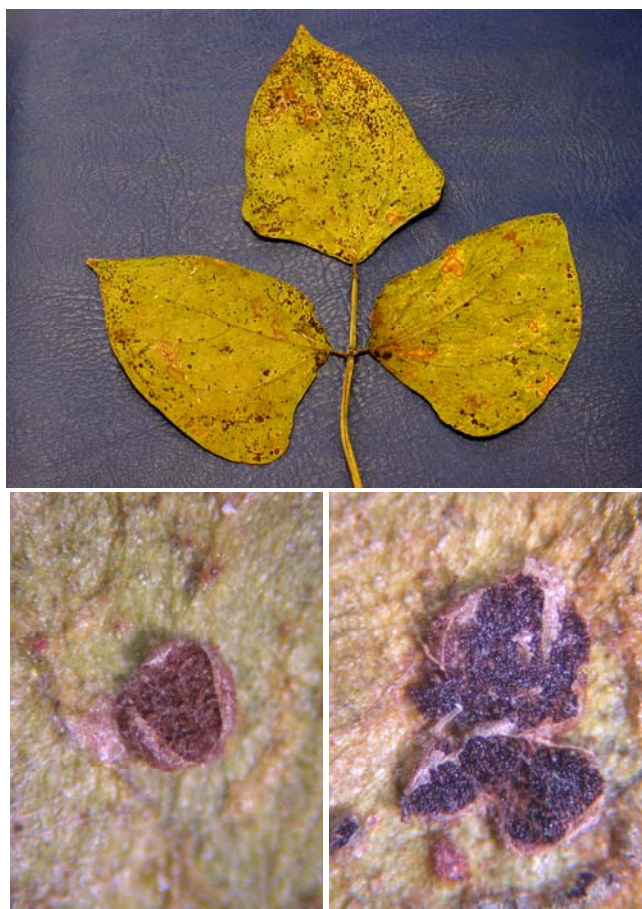
銹病的診斷鑑定仍以寄主植物與銹菌形態學特徵為主，由於銹菌為絕對寄生菌，因此在作物銹病診斷鑑定上須考慮標本的採集與保存，狀況良好的標本對日後研究該銹菌之形態學與分子生物學有很大的助益。由於銹菌具有不同世代的孢子，在形態學鑑定時，須確實觀察不同時期孢子的特徵，並找出該銹菌在分類鑑定上的基準。但在田間採集時常常無法同時收集每個時期的孢子，因此在採集銹病標本時，須收集不同時間所發生之病害標本。若仍無法採集到不同世代的標本時，應以冬孢子形態學特徵為主要鑑定依據。一般而言，冬孢子代表了銹菌的有性世代，故按照真菌分類基準，分類地位必需以有性世代的形態學特徵為主。

植物病原真菌之分子診斷鑑定技術已逐漸應用在田間，但作物銹病之分子診斷的研究仍然十分缺乏，這與銹菌本身為絕對寄生菌不易培養以及具有不同世代孢子有關。即 DNA 或 RNA 的萃取，常因銹病標本保存狀況不良而降低核苷酸萃取的效率。近年來，Virtudazo 氏等人(2001)與 Chung 氏等人(2004a; 2004b)已建立作物銹菌之 Large subunit (LSU) rDNA 與 ITS 的核苷酸序列資料，而這些核苷酸序列也已登錄於 GenBank 中。目前為止，作物銹菌的分子資料仍十分缺乏，祈於未來能建立更多的核苷酸序列資料，提供日後發展具專一性與高穩定性的分子標幟，並藉由這些分子標幟快速診斷鑑定田間作物銹菌的種類，並追蹤其在田間分佈的情形，研擬有效的防治策略。

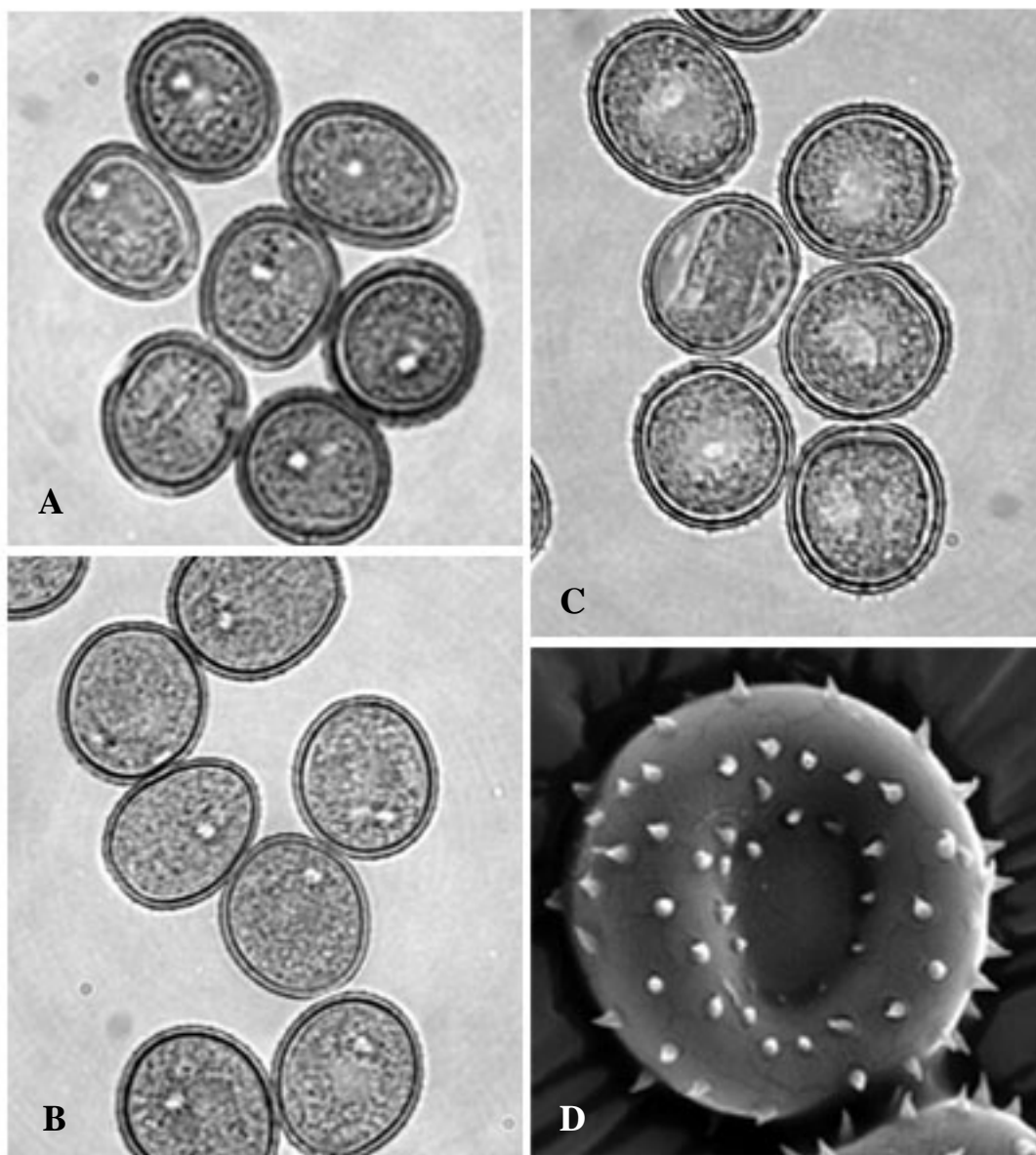
引用文獻

- 徐世典等。2002。台灣植物病害名彙·中華民國植物病理學會出版。386 頁。
- 王也珍等。1999。台灣真菌名錄·行政院農業委員會出版。289 頁。
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. 922pp.
- Chung, W. H., Tsukiboshi, T., Ono Y. and Kakishima, M. 2004a. Phylogenetic analyses of *Uromyces viciae-fabae* and its varieties on *Vicia*, *Lathyrus*, and *Pisum* in Japan. Mycoscience 45: 1-8.
- Chung, W. H., Tsukiboshi, T., Ono, Y. and Kakishima, M. 2004b. Morphological and phylogenetic analyses of *Uromyces appendiculatus* and *U. vignae* on legumes in Japan. Mycoscience 45: 233-244.
- Cummins, G. B. and Hiratsuka, Y. 2003. Illustrated Genera of Rust Fungi. Third Ed. Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota.
- Littlefield, L. J. 1981. Biology of the Plant Rusts. Iowa State University Press. 103pp

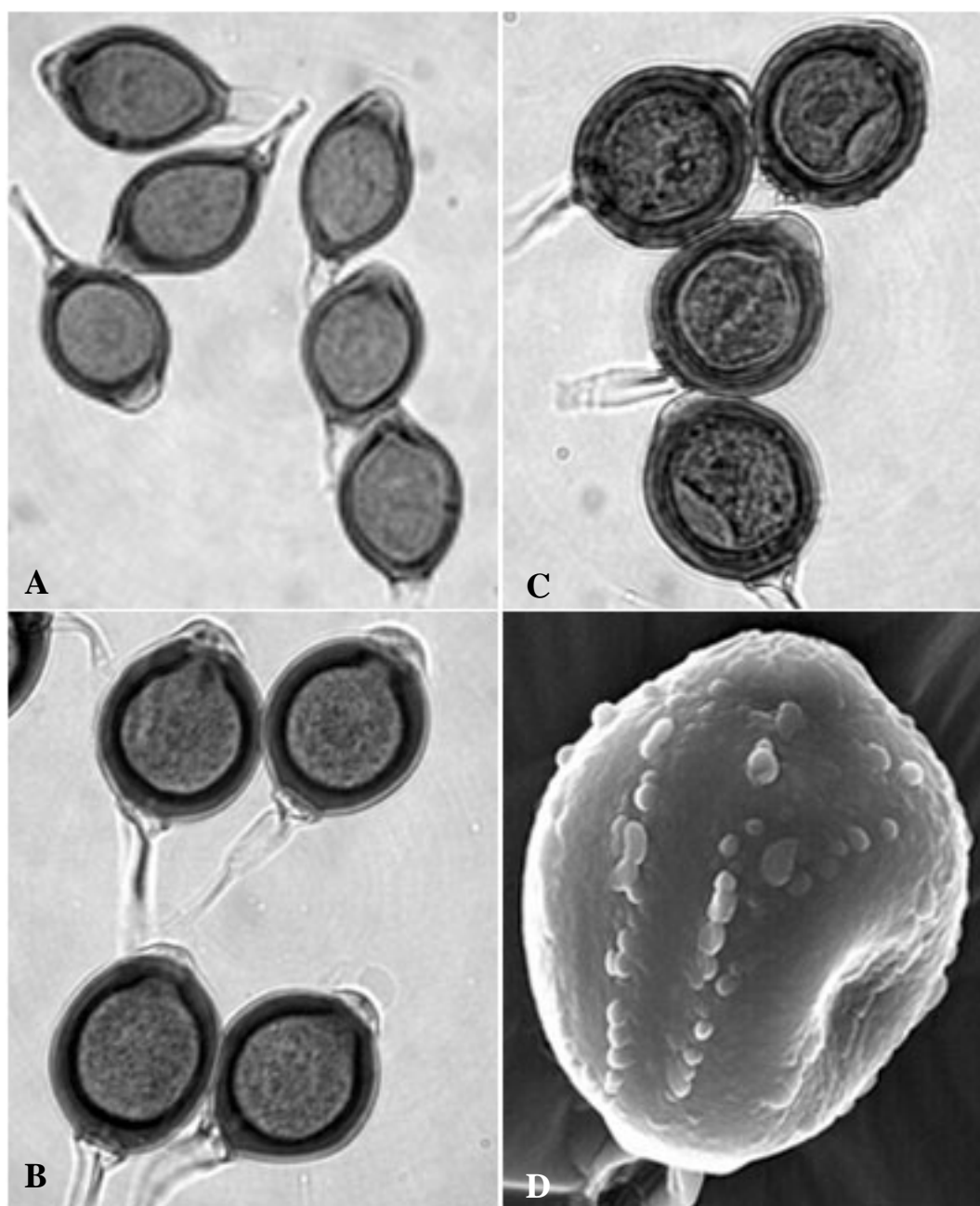
- Ono, Y. 2002. The diversity of nuclear cycle in microcyclic rust fungi (Uredinales) and its ecological and evolutionary implications. *Mycoscience* 43: 421-439.
- Suyama, Y., Kawamuro, K., Kinoshita, I., Yoshimura, K., Tsumura, Y. and Takahara, H. 1996. DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes Genet. Syst.* 71: 145-149.
- Virtudazo, E. V., Nakamura, H. and Kakishima, M. 2001. Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. *J. Gen. Plant Pathol.* 67: 28-36.



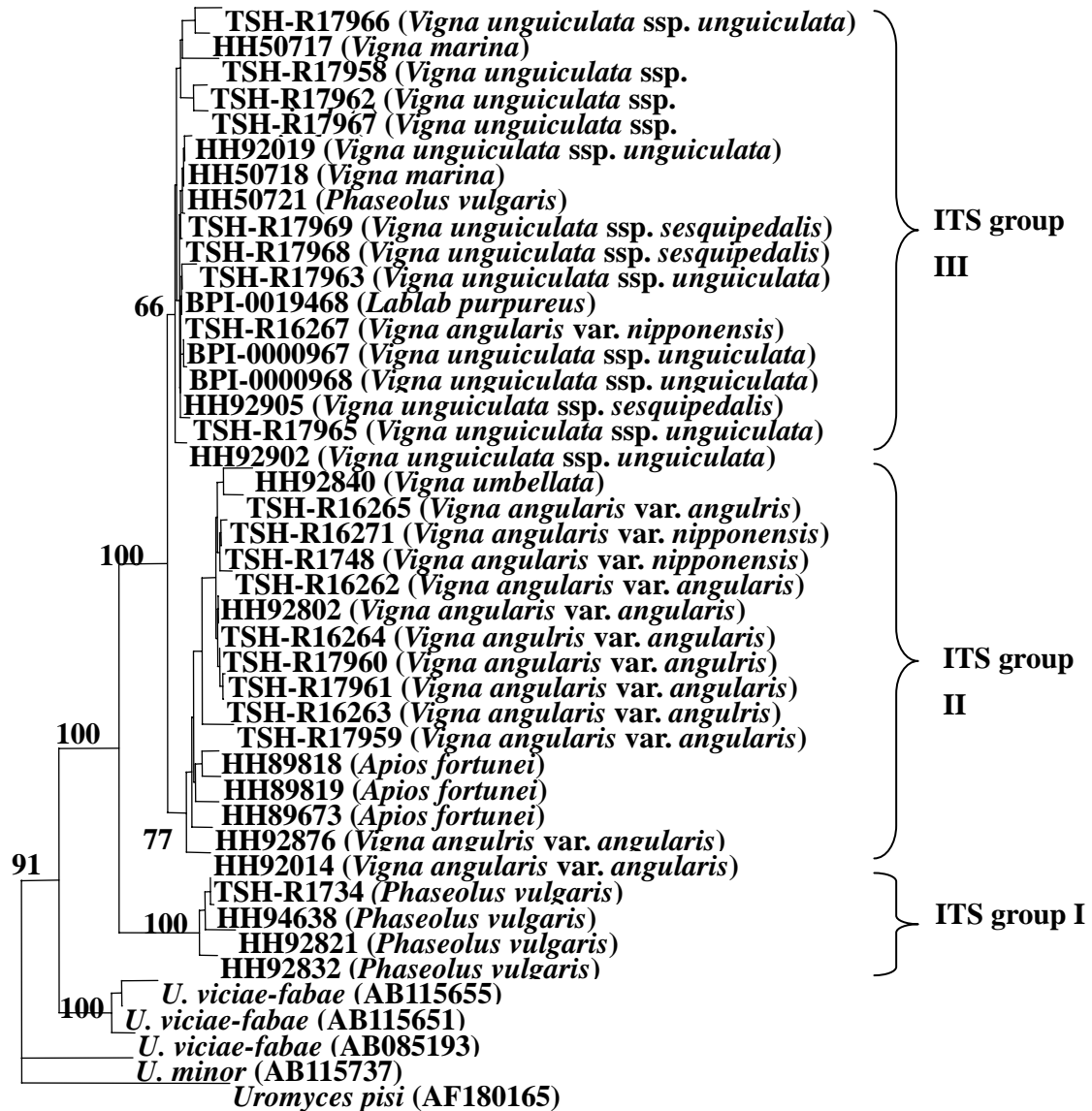
圖一、豇豆銹病之病徵(圖上)；左下方為豇豆銹菌的夏孢子堆；右下方豇豆銹菌的冬孢子堆。



圖二、利用光學顯微鏡與掃描式電子顯微鏡，所觀察到寄生於豆科植物上不同 *Uromyces* 屬銹菌的夏孢子形態；A：紅豆銹菌(*U. azukicola*)的夏孢子；B：豇豆銹菌(*U. vignae*)的夏孢子；C：菜豆銹菌(*U. appendiculatus*)的夏孢子；D：菜豆銹菌之夏孢子表面構造。



圖三、利用光學顯微鏡與掃描式電子顯微鏡，所觀察到寄生於豆科植物上不同 *Uromyces* 屬銹菌的冬孢子形態；A：紅豆銹菌(*U. azukicola*)的冬孢子；B：豇豆銹菌(*U. vignae*)的冬孢子；C：菜豆銹菌(*U. appendiculatus*)的冬孢子；D：菜豆銹菌之冬孢子表面構造。



圖四、利用最大相鄰法(Neighbor-joining method)分析寄生於不同豆科植物上 *Uromyces* 屬銹菌之 ITS 與 5.8S rDNA 核酸序列所得的系統樹(Phylogenetic tree)，於分歧點前的數據為該分歧點之信賴度(Bootstrap)。