

# *Xanthomonas* 屬細菌引起的作物病害之臨床診斷

李永安 副教授

輔仁大學生命科學系

電子郵件：bio1007@mails.fju.edu.tw；傳真：02-2905-2193

## 摘要

*Xanthomonas* 屬之植物病原細菌，寄主範圍廣泛，可感染多種具有重要經濟價值的作物，此屬目前分為二十一個種，而每一種內又依感染寄主植物的不同，包含有多個病原小種。目前台灣有甘藍、番茄、水稻、豆類作物、火鶴花、檬果、桃樹、柑桔、香菜、白色海芋、及聖誕紅等作物有此病害的記錄。此屬植物病原細菌感染植物，可造成病斑、條斑、或潰瘍等病徵，有些病徵會逐漸擴大，致使植物組織大面積的死亡。此植物病原細菌可經由種苗傳播，有可能自進口的種苗引入不同的 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌，因此，台灣種植的作物中，將可能有此屬病原細菌為害的新病例，因此本報告著重在介紹當發現作物有病害時，如何診斷以確定為 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌所引起，待診斷後，即可採取適當的防治措施，以免病原細菌的持續擴張。

**關鍵詞：***Xanthomonas* 屬、診斷、分子檢測法、PCR

## 緒言

*Xanthomonas* 屬之植物病原細菌，寄主範圍廣泛，可感染具有重要經濟價值的穀類、蔬菜、果樹及花卉等至少 392 種被子植物，包含 124 種單子葉 (monocotyledon)，及 268 種雙子葉 (dicotyledon) 植物 (李, 2002; Leyns, et al., 1984; Hayward, 1993)。 *Xanthomonas* 屬之植物病原細菌目前分為二十一個種 (species)，而每一種內又依感染寄主植物的不同，包含有多個病原小種 (pathovars) (李, 2003; Bradbury, 1984; Van den Mooter and Swings, 1990; Vauterin et al., 1990; 1995; Trébaol et al., 2000; Saddler and Bradbury, 2005)。依目前台灣植物病害名彙，在台灣有記錄的 *Xanthomonas* 屬之植物病原細菌，有可感染十字花科作物的 *X. campestris* pv. *campestris*、感染茄科作物的 *X. vesicatoria*、感染水稻的 *X. oryzae* pv. *oryzae*、感染豆類作物的 *X. axonopodis* pv. *glycines* 及 *X. axonopodis* pv.

*phaseoli* (Hsu and Tzeng, 1979)、感染火鶴花的 *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (許與黃, 1991)、感染椗果的 *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (黃等, 1977)、感染桃樹的 *X. arboricola* pv. *pruni* (翁與吳, 1977)、及感染柑桔的 *X. axonopodis* pv. *citri*。

*Xanthomonas* 屬植物病原細菌可感染植物的葉、莖、及果實，形成病斑 (spot)、條斑 (stripe)、或潰瘍 (canker) 等病徵，有些病徵會逐漸擴大，致使被感染器官上的大面積的死亡 (blight)。此植物病原細菌可經由種苗傳播，因此只要有自國外進口花卉、蔬菜、及果樹等種苗，就有可能引入不同的 *Xanthomonas* 屬之植物病原細菌。例如，近年來才發現的感染感染香菜的 *X. campestris* pv. *coriandri* (Lee et al., 2004)、白色海芋的 *X. campestris* pv. *zantedeschiae* (Lee et al., 2005)、及感染聖誕紅的 *X. axonopodis* pv. *poinsettiicola* (Lee et al, 2006)，均有可能經由進口的種苗引入。因此為防止 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌對作物的為害，若種植的作物有疑似病害，應需立即進行診斷 (diagnosis)，並儘速採取防治措施，以免病原細菌持續擴張，另外對進口種苗，也要進行檢測 (detection)，以防此病原細菌引入國內。

本報告著重在作物有疑似 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌引起病害時，如何進行診斷的方法介紹。病害的診斷主要仍要依循柯霍氏法則 (Koch's postulate)，當中的實驗方法，除病徵觀察外，包含有病原細菌的分離及純化 (isolation and purification)、病原細菌的接種 (inoculation)、以及病原細菌的鑑定 (identification) 等部份，簡要敘述如下。

## *Xanthomonas* 屬細菌引起的作物病害之臨床診斷

### 1. 病原細菌的分離及純化:

將作物被感染部位表面，先以清水沖洗乾淨，並在無菌操作台內風乾後，切下一小塊 (大致 0.5X0.5 cm) 病徵邊緣部份，利用病徵邊緣部份進行分離，將可避免分離到腐生菌，將切下之病組織放在無菌之培養皿內，加入無菌水，使病組織浸泡在無菌水中 5-10 分鐘後，以接種棒沾取無菌水 (含自病組織移出之細菌)，以四區劃線方式，將該無菌水劃 Nutrient agar (Beef extract 3 g/L; Peptone 5 g/L; Agar 15 g/L)、LA (Luria-Bertani agar; Bacto-tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl, 10 g/L)、或 YDC (yeast extract dextrose CaCO<sub>3</sub>; yeast extract 10 g/L; dextrose 20 g/L, calcium carbonate 20 g/L, agar 15 g/L) 等培養基上，並放置在 26-28°C 培養箱中，培養 2-10 天，若為 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌，則會長出光滑且黃色的菌落 (圖一)。有些 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌的菌落呈淡黃 (如 *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 菌株)，或因形成 xanthomonadins 黃色色素的基因突變或未表現，而使菌落呈現白色光滑 (如 *X. axonopodis* pv. *manihotis* 的菌株)，不過

xanthomondins 的形成與否，並不影響其病原性(Schaad and Stall, 1988)。菌株若分離 YDC 培養基中，菌落會明顯的上凸、且呈光滑黃色，並且此培養基含有碳酸鈣，可中和細菌生長時產生的酸，有利於菌株的存活，因此待菌株在生長後，可放在 4°C 中，至少可保存一個月以上。除病原菌外，可能會長出各種不同顏色的腐生細菌，若有呈黃色者，則可將其劃在 YDC 上，觀察其菌落是否呈上凸且光滑黃色，多數黃色而非 *Xanthomonas* 屬的細菌，如 *Pantoea* spp. 及 *Pseudomonas* spp. 等在 YDC 上，並不呈上凸且光滑狀。

## 2. 病原細菌的接種:

將培養約 1-2 天的細菌取出，以無菌水配製濃度約為  $10^8$  cfu/ml 的細菌懸浮液，以小剪刀沾菌液，在植物寄主的葉緣剪下約 0.5-1.0 cm 長的傷口，剪下時，稍為停頓一下，以使細菌可自葉部傷口侵入，另外，也可先將金剛砂灑在植物葉面，以毛刷(如水彩筆)沾菌液，在含金剛砂的植物葉面上塗抹幾次即可，或以注射針筒直接將菌液注入植物葉內。接種後，放入 22-28°C 的培養箱中，並且務必要維持濕度，可在植物表面噴灑一層水，再以塑膠袋套出整株植物或接種部位，一天後再將塑膠袋移開，7-14 天後，觀察病徵出現情形 (Schaad and Stall, 1988)。

## 3. 病原細菌的鑑定:

若所分離的病原細菌具有病原性，則可先依植物寄主的名稱及學名，查詢該寄主是否有 *Xanthomonas* 屬細菌為害的病害記錄，可推測該 *Xanthomonas* 屬細菌為那一種(species)及那一病原小種(pathovar)。可參考李(2002)所整理的 "*Xanthomonas* 屬植物病原細菌學名及植物寄主"表進行查詢。

要實際確定所分離的病原細菌為 *Xanthomonas* 屬細菌，則要進行鑑定，鑑定方法主要有生理生化以及分子測試方法，這兩種方法最好能同時進行，才可得到正確的鑑定結果。在 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌在生理生化的主要特徵為，革蘭氏陰性(Gram negative)，絕對好氧性(obligately aerobic)，不產生孢子(non-sporing)，呈桿狀(rod-shaped)，大小約為 0.4-0.7 x 0.7-1.8  $\mu\text{m}$ ，具有一條側生鞭毛(single polar flagella)，具有 catalase 活性，但不具(或有微弱) oxidase 活性，無法將硝酸(nitrate)還原成亞硝酸(nitrite)，可產生稱為 xanthomonadins 的黃色色素 (Vauterin et al., 1993; Schaad et al., 2001; Saddler and Bradbury, 2005)。生理生化測試方法，可參考 Schaad et al. (2001)書籍。上述特徵中，可先做革蘭氏染色(Gram stain)、oxidase 活性、及 xanthomonadin 產生等三種測試，若測試結果與上述特徵相同，則所分離的黃色的病原細菌應為 *Xanthomonas* 屬細菌。在生理生化測試上，也可同時配合使用 Biolog GN2 microplate (BIOLOG, Hayward, CA)進行鑑定，測試結果可與該公司提供的資料進行比對，若結果也為 *Xanthomonas* 屬細菌，即可進一步確定所鑑定的結果。

除生理生化測試外，最好也能進行分子測試，在此測試中主要為 16S rDNA 基因的核酸序列分析，可以 16S-Fm (5'-AGTTT GATCC TGGCT CAGAG TGAA-3')

及 16S-R4 (5'-GCACC TTCCG ATACG GCTAC CTTG-3')引子組，對分離的病原細菌進行 polymerase chain reaction (PCR)，可擴增出約 1.5 kb 的核酸片段，將此片段進行核苷酸定序，將定序結果可至 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 進行序列比對，若比對結果，與 *Xanthomonas* 屬各種的細菌的 16S rDNA 序列，有高達 97% 以上的相同度 (identity)，則所分離的細菌即為 *Xanthomonas* 屬細菌。

在分子測試上，目前已有許多針對不同 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌，設計的專一性的 PCR 引子組，這些 *Xanthomonas* 屬植物病原細菌有，*X. campestris* pv. *campestris* (Park et al., 2004)，*X. campestris* 內多個 pathovars (Berg et al., 2005)，*X. campestris* pv. *citri* (Hartung et al., 1993; Hartung et al., 1996)，*X. campestris* pv. *phaseoli* (Audy et al., 1996)、*X. campestris* pv. *manihotis* (Verdier et al., 1998)、*X. albilineans* (Pan et al., 1997; Wang et al., 1999)、*X. fragariae* (Pooler et al., 1996; Roberts et al., 1996)、及 *X. translucens* (Maes et al., 1996) 等。

本實驗室已自行設計出對 *X. oryzae* pv. *oryzae* 具有專一性的引子組，Xo-ucp-F: 5'-GGGTG CCGGT GGTCG AGTGG-3'及 Xo-ucp-R:5'-GCCGA CGCTG CCGCT GTACT-3' (李, 2006)，可利用此引子組對 *X. oryzae* pv. *oryzae* 進行診斷及檢測。進行 PCR 反應前，先將細菌懸浮液放入沸水中 10 分鐘後，立即插入冰中，再自管中取出 3  $\mu$ l，以進行 PCR 反應，對 *X. oryzae* pv. *oryzae* 進行 PCR 反應，可擴增出約 640-bp 之特定片段 (圖二)。

PCR 反應物及成分如下：

沸水處理之細菌懸浮	3 $\mu$ l
Xo-ucp-F 及 Xo-ucp-R 引子 (5 $\mu$ M each)	3 $\mu$ l
10 x <i>Taq</i> reaction buffer	3 $\mu$ l
dNTP (2.5 mM each)	3 $\mu$ l
<i>Taq</i> DNA polymerase (1 Unit/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	15 $\mu$ l
反應總體積	30 $\mu$ l

## 討 論

若有具專一性的 PCR 引子組，在病原菌的鑑定及檢測上，將可達到簡易及省時的目的，但是由於細菌會有變異，因此若 PCR 反應無法得到特定大小的核酸片段，也無法確定分離出的病原菌並不是所要鑑定的病原菌，因此在鑑定上一定要配合生理生化測試以及 16S rDNA 基因的核酸序列分析。

## 引用文獻

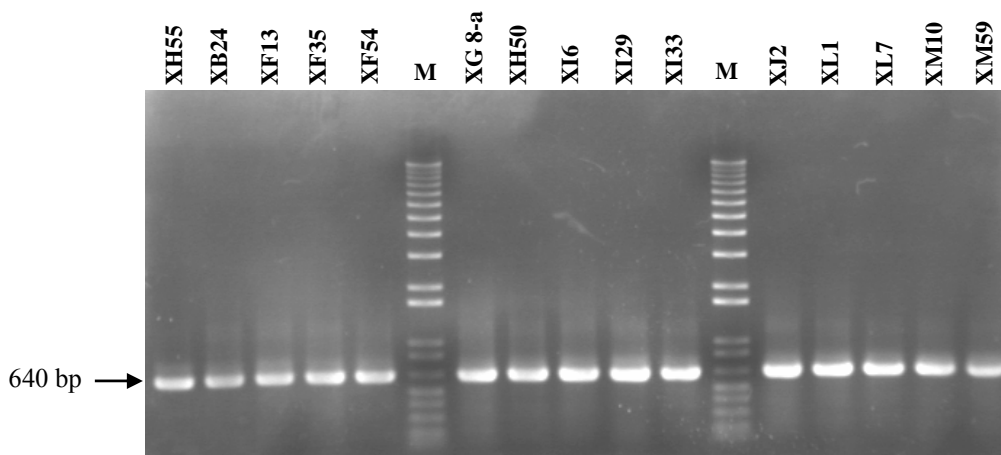
- 李永安. 2002. *Xanthomonas* 屬病原菌及甘蔗流膠病之診斷鑑定技術. 植物重要防檢疫疫病診斷鑑定技術研習會專刊 135-159.
- 李永安. 2003. *Xanthomonas* 屬植物病原細菌之診斷鑑定觀念及系統之研發. 重要防檢疫植物病原細菌綜合管理研討會專刊 15-21.
- 李京倫. 2006. *Xanthomonas* 屬植物病原細菌之兩段基因間序列之分析及應用. 輔仁大學生命科學研究所碩士論文。
- 許秀惠、黃秋雄. 1991. 火鶴花之細菌性葉枯病. 植保會刊 33:421.
- 翁秀蕙、吳文川. 1977. 台灣之桃細菌性穿孔病. 植保會刊 19:299.
- 黃秀珍、張治安、林元春、朱木貴、林信成、徐世典. 1997. 利用聚合酵素連鎖反應鑑定椪果黑斑病菌. 植物病理學會刊 6:1-9.
- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C., and Laroch, A. 1996. A rapid sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86:361-366.
- Berg, T., Tesoriero, L. and Hailstones, D. L. 2005. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. *Plant Pathology* 54: 416-427.
- Bradbury, J. F. 1984. Genus *Xanthomonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N. R., and Holt, J. G. eds.) 1st ed. vol. 1 pp. 199-209. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Hartung, J. S., Daniel, J. F., and Pruvost, O. P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1143-1148.
- Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Villemot, I., and Alvarez, A. 1996. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 86:95-101.
- Hayward, A. C. 1993. The host of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas* (Swings, J. G., and Civerolo, E. L. eds). pp. 1-120. Chapman & Hall Inc. Boundary Row, London.
- Hsu, S. -T., and Tzeng, K. -C. 1979. Occurrence of bacterial blight of bean in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 21: 244-246.
- Lee, Y.-A., Chen, K.-P., and Chang, Y.-C. 2005. First report of bacterial leaf blight of white flowered calla lily caused by *Xanthomonas campestris* pv. *zantedeschiae* in Taiwan. *Plant Pathol.* 54: 239.
- Lee, Y.-A., Liu, Y.-H., and Liu, H.-L. 2004. First report of bacterial leaf blight of coriander caused by *Xanthomonas campestris* pv. *coriandri* in Taiwan. *Plant Dis.* 88: 910.

- Lee, Y.-A., Wu, P.-C., and Liu, H.-L. 2006. First report of bacterial leaf spot of poinsettia caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* in Taiwan. Plant Pathol. (in press).
- Leyns, F., De Cleene, M., Swings, J. -G., and De Ley, J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. Bot. Rev. 50: 308-356.
- Naes, M., Garbeva, P., and Kamoen, O. 1996. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:63-69.
- Pan, Y.-B., Grisham, M. P., and Burner, D. M. 1997. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. Plant Dis. 81:189-194.
- Park, Y. J., Lee, B. M., Ho-Hahn, J., Lee, G. B., Park, D. S. 2004. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species specific primers based on *hrpF* gene sequences. Microbiological Research 159: 419-423.
- Pooler, M. R., Ritchie, D. F., and Hartung, J. S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. Appl. Environ. Microbiol. 62:3121-3127.
- Roberts, P. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., Stall, R. E., and Berger, R. D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. Plant Dis. 80:1283-1288.
- Saddler, G. S. and Bradbury, J. F. 2005. Genus *Xanthomonas*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner, D. J. Krieg, N. R., and Staley, J. T. eds.) 2nd ed. vol. 2 pp. 63-90. Springer Science+Business Media, Inc. New York, NY.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Trébaol, G., Gardan, L., Manceau, C., Tanguy, J. -L., Tirilly, Y., and Boury, S. 2000. Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new species that causes bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1471-1478.
- Van den Mooter, M., and Swings, J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:348-369.
- Vauterin L., Swings, J., Kersters, S., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M. N., Palleroni,

- N. J., Hildebrand, D. C., Stead, D. E., Civerolo, E. L., Hayward, A. C., Maraite, H., Stall, R. E., Vidaver, A. K., and Bradbury, J. F. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (3): 312-316.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:472-489.
- Verdier, V., Mosquera, G., and Assigbetse, K. 1998. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 82:79-83.
- Wang, Z. K., Comstock, J. C., Hatziloukas, E., and Schaad, N.W. 1999. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineas*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathol.* 48:245-252.



圖一: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 在 LA (Luria-Bertani agar) 培養基中，會長呈光滑且黃色的菌落。



圖二: 以 Xo-ucp-F/Xo-ucp-R 引子組對 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 不同菌株進行 PCR 反應後的電泳分離結果。1 kb 為 DNA 大小標記 (molecular size marker; 1-kb plus DNA ladder, Gibco Life Technologies)。PCR 產物大小以箭頭註記在左邊。