

淺談植物菌質體與其發生現況

An Overview of Phytoplasmas and Their Current Occurrence in Taiwan

馮雅智¹、邱燕欣²

一、前言

植物菌質體 (*Candidatus Phytoplasma*) 最早在 1967 年被 Doi 等學者發現，經電子顯微鏡觀察後發現為一種寄生在植物篩管細胞內的無細胞壁原核生物，因其外觀特性與感染動物體之黴漿菌 (*mycoplasma*) 相似，因此早期以擬菌質體 (*mycoplasma-like organism, MLO*) 稱之，沿用到 1994 年才正式更名為植物菌質體 (以下簡稱菌質體)，該病原菌目前尚未能在體外純培養，在缺乏模式屬和模式種的情況下被命名，故使用 "*Candidatus*" (暫定之意) 這詞來保留推定的低階分類單元 (屬和種)，通常以 "*Candidatus Phytoplasma*" 表示之。菌質體是一群無細胞壁且局限於韌皮部的細菌，可感染近千種植物包括蔬菜、香料植物、藥用植物、觀賞植物、經濟作物、棕櫚樹、果樹、雜草、木材等，在全球造成嚴重的經濟損失。罹病的植株會出現枝條增生 (*proliferation*)、花器葉

化 (*phyllody*)、花器綠化 (*virescence*)、葉片變小 (*rosette*)、萎凋 (*wilt*)、矮化 (*dwarf*; *stunting*)、黃化 (*yellowing*) 及簇葉 (*witches' broom*) 等不同樣態病徵，有學者提出在 *aster yellows witches' broom phytoplasma* 中發現的一種菌質體效應蛋白 SAP54，可以操縱植物宿主的形態，例如將正常花變成葉狀和綠化的花，並增加葉蟬的取食和產卵 (Orlovskis *et al.*, 2016)。在自然界中，菌質體可以下列途徑傳播：(1) 經由取食韌皮部的刺吸性昆蟲，如葉蟬、飛蝨和木蝨傳播 (Asudi *et al.*, 2021; Gonella *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2021)；(2) 寄生性菟絲子 (*dodder*) 傳播至健株 (Akhtar *et al.*, 2009; Montano *et al.*, 2001)；(3) 無性繁殖及嫁接繁殖方式 (Bertaccini, 2007; Tedeschi & Alma, 2006)；(4) 在某些情況下，也會透過種子傳播 (Kirdat *et al.*, 2023a)。這些刺吸汁液的昆蟲媒介一般以持續傳播的方式傳播，首先，昆蟲在

¹ 種苗改良繁殖場種苗檢驗科 助理研究員

² 種苗改良繁殖場種苗檢驗科 副研究員兼科長



刺吸取食同時亦從植物中獲得菌質體，病原由口針進入並穿透昆蟲的腸壁（第一道障礙）並在血淋巴中循環後再進入唾腺（第二道障礙），並於此繁殖，此後成為終生帶毒之傳播媒介昆蟲。

二、植物菌質體之分子檢測

主要利用菌質體 16S rRNA（16S ribosomal RNA）的基因區域開發設計廣效性引子（universal primers），將增幅片段進行序列定序，而後比對以確認為菌質體。目前國際上可查詢到用於菌質體的廣效性引子對有多種組合可應用，因考量病原的濃度及分布，一般以巢式PCR（nested PCR）或半巢式PCR（semi-nested PCR）進行病原菌之檢測。第一次PCR可應用的引子對包括P1/P7、f1/r1、P1/16S-SR（Deng *et. al.*, 1991）、P1A/P7A，第二次PCR可應用的引子對包括U5/rU3、R16F2n/R16R2n、P1A /16S-SR（Lee *et. al.*, 2004），依材料選擇最佳化之兩組引子對的搭配，進行巢式PCR或半巢式PCR反應。

三、植物菌質體之分類

為進一步進行菌質體的群 / 亞群確認，可依據 Lee 等人（1998）所建立的 17 種限制酵素（AluI, BamHI, BfaI, BstUI, DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, MboI (Sau3AI), MseI, RsaI, SspI 及 TaqI），針對 16S rRNA 基因區域的 R16F2n/R16R2 序列進行限制酶片段長度多型性圖譜（RFLP）分析，Wei 等人

（2007）開發的電腦模擬（*in silico*）軟體，可生成模擬限制酵素酶切後的 RFLP 電泳圖譜，提供了簡單快速的鑑別及分類植物菌質體的方法。接續在 2009 年以上述鑑定條件開發一套線上工具 "iPhyClassifier" 網路平臺（免費系統），可直接在線上呈現模擬實驗室進行限制酵素酶切後的 RFLP 電泳圖譜。基於 RFLP 模式相似性係數得分，iPhyClassifier 對目標菌質體菌株的組別和亞組分類狀態給予即時建議。iPhyClassifier 也可將查詢序列與所有先前描述的「*Candidatus Phytoplasma*」物種的參考菌株的序列進行比對，計算序列相似性得分，並將所研究的菌質體分配到各自的「*Candidatus*」中，尚可描繪潛在的新菌質體類群和亞類，iPhyClassifier 網路平臺可提供更方便及快速的鑑定及菌質體分類（Zhao *et. al.*, 2013）。某些情況下，僅靠上述標準可能不足以區分不同物種，因此除了 16S rRNA 基因外，其他遺傳標記的多位點序列分析（multi-locus sequence analysis, MLSA）也廣泛用於菌質體之更細微區分（Wei & Zhao, 2022），這些標記包括編碼核糖體蛋白（rp）、蛋白質轉位酶亞基 SecY 和轉譯延長因子 Tu-EF 的基因。例如，基於 16S rRNA、rp 和 secY 基因的 MLSA 特徵分析顯示，杜鵑花小葉菌質體（azalea little leaf phytoplasma）屬於 aster yellows phytoplasma group 組中的一個不同譜系。

根據 2004 年國際植物菌質體學比較研究計畫 (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology, IRPCM) 定義，一個新的菌質體物種需有大於 1,200 bp 的 16S rRNA 基因序列，並且應與已知的菌質體的序列相似度小於 97.5% (Firrao, 2004)。2022 年再進行了優化修定建議 (1) 16S rRNA 基因序列的長度應由原本大於 1,200 bp 延長到大於 1,500 bp (16S rRNA 基因的全長或近全長)；(2) 16S rRNA 基因同源性的閾值從 97.5% 提高到 98.65%。截至目前，根據 16S rRNA 基因序列，全球菌質體在該暫定屬下正式命名了 48 種 "*Candidatus* Phytoplasma"，區分成 37 群 150 個亞群 (Wei and Zhao, 2022)。

四、植物菌質體在臺灣之感染情況

梨衰弱病、落花生簇葉病、絲瓜簇葉病及甘藷簇葉病等為臺灣存在已久的本土植物菌質體病害，除了感染農作物，近期在國內陸續有多項雜草及植物被報導罹染菌質體，包括銀膠菊及碗豆 (Chiu *et. al.*, 2023)、鰐腸 (Liao *et. al.*, 2023)、青葙 (Mejia *et. al.*, 2023)、皺葉菸草 (Liao *et. al.*, 2022)、瘤果莧 (Mejia *et. al.*, 2022)、綠豆 (Chen *et. al.*, 2021)、大豆 (Wang *et. al.*, 2021)、蛇瓜 (Weng *et. al.*, 2021)、兔耳菜 (Chien *et. al.*, 2020)、紫背草 (Chien *et. al.*, 2020)、皺子白花菜 (Chien *et. al.*, 2020) 等。近期因氣候變遷等大自然因素導致農作物休耕，荒廢田到

處可見雜草叢生，成為昆蟲最佳棲息地，倘若鄰田種植農作物，造成提高病害傳播的機率及風險，值得注意。

筆者在去年 (2023) 在雲林臺西鄉秋作及今年 (2024) 雲林土庫鄉之春作落花生田區進行田檢時，於多處觀察到植株簇葉病徵 (圖 1、A & B)，將材料以 PCR 檢測，經序列定序及比對後確定為落花生簇葉病 (Peanut witches' broom phytoplasma, PnWB) (圖 2)，屬 16SrII。於田檢時也發現，田間管理不佳之田區，因未及時防除媒介昆蟲葉蟬與及時拔除田間病株，其田區粗估有 30% 感染落花生簇葉病 (約於播種後 100 天)，罹病之植株葉片明顯簇葉及小葉，植株矮化、節間縮短 (圖 1、C)，將植株拔起後多數未能結果或小果 (圖 1、D)，嚴重影響收成。

五、結語

臺灣氣候條件十分適宜菟絲子及葉蟬、木蝨、飛蝨等可傳播菌質體的傳染源生存並快速繁衍，菌質體在臺灣不同作物之罹染問題不容小覷。雖國際上對菌質體可否種傳仍未定調，但近期已有數篇研究指出種子帶菌質體的問題，漸漸已引起重視。種子 (苗) 為本場主業，本場長期以來也時刻關注各種種傳病害問題，無論面對植物檢疫與防疫工作，將持續開發種傳病原檢測技術以協助國內種子業者出口貿易順暢。



圖 1. 雲林臺西鄉秋作 (A) 及雲林土庫鄉春作 (B) 落花生植株小葉及簇葉病徵 (C) 罹病之植株葉片明顯簇葉及小葉，植株矮化、節間縮短等典型病徵 (D) 罹病株未能結果或結小果 (下處)

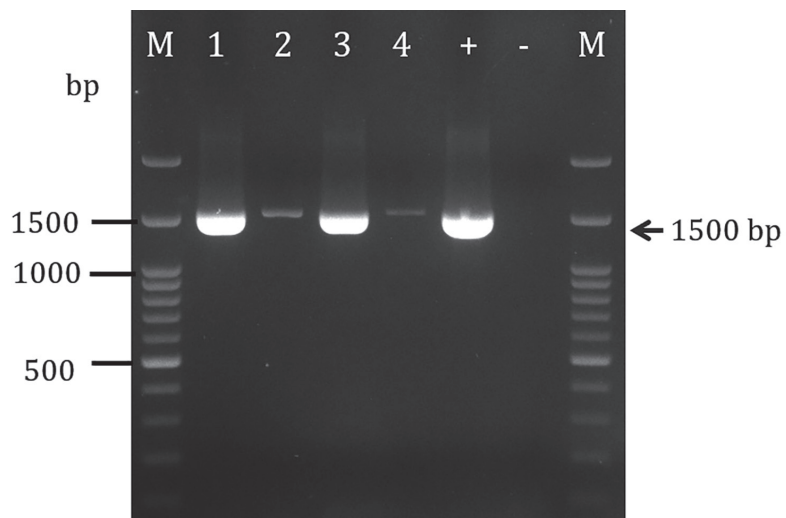


圖 2. 以 P1A/16S-Sr 進行巢式 PCR 檢測，經序列定序及比對後確定為落花生簇葉病 (Peanut witches' broom phytoplasma, PnWB)