

# 金門一條根簇葉病發生報導

蘇秋竹\* 楊文仁 高清文

台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

(接受日期：2006年8月30日)

## 摘 要

蘇秋竹\*、楊文仁、高清文 2006 金門一條根簇葉病發生報導 植保會刊 48：203 - 216

闊葉大豆 (*Glycine tomentella* Hayata) 俗稱金門一條根，為金門地區特殊之傳統藥用野生植物，近年來由於產品為消費者所喜愛而供不應求，逐漸盛行人工經濟栽植，但在栽植區新發現一種病害，植株呈現葉片變小、莖節變短、莖葉叢生、植株衰弱及矮化等病徵，與植物菌質體所引起之簇葉病病徵相似，嚴重者影響產量。本研究進行田間實地調查 20 區一條根栽植園，包括 5 區兩年生及 15 區一年生，結果顯示兩年生皆有發生簇葉病，發生率為 7%至 24%不等，平均發生率為 16%，一年生有 9 區有發生簇葉病，見最高發生率為 11.4%，平均發生率為 2.9%，調查時亦發現一條根罹病園鄰近之甘藷園植株簇葉病普遍發生。田間一條根罹病組織經超薄切片觀察，可於篩管內發現多型態植物菌質體存在；以廣效性引子對 P1/Tint 及專一性引子對 19a/19b 對採自 5 區不同罹病園一條根與甘藷簇葉病樣品進行 PCR 反應，皆可增幅出約 1600 bp 及 750 bp 之 16S rDNA 基因片段，而兩者之健康組織均無任何產物，進一步將此約 1600 bp 大小之 16S rDNA 基因片段選殖及解序，一條根及甘藷分別為 1640 bp 及 1638 bp，兩者核苷酸相同度 (identify) 為 99.6%，具有高度同源性，與基因庫 9 種植物菌質體菌系包括落花生、太陽麻、萊姆、蠶豆、甜椒、番茄、白蠟樹、棕櫚及桃等寄主，以鄰聚法 (neighbor-joining method) 親緣關係分析可區分為 6 個菌群，金門地區一條根及甘藷簇葉病菌系與落花生及太陽麻菌系屬同一菌群，歸屬於植物菌質體 16SrII -A 之菌群，亦皆為落花生簇葉病菌群之一。

(關鍵詞：闊葉大豆、金門一條根、簇葉病)

---

\* 通訊作者。E-mail: auba@tactri.gov.tw

## 緒 言

闊葉大豆 (*Glycine tomentella* Hayata) 爲豆科匍匐性多年野生草本植物，分佈於金門、台灣、中國、菲律賓、澳洲及巴布幾內亞等地，金門地區常見於田野曠地中，因其細長主根直入土壤中生長，一根直下，故俗稱金門一條根，爲金門地區民眾普遍使用之民間草藥，可用於治療風濕症、強筋骨、壯身及止盜汗等症狀<sup>(1, 5)</sup>。

金門一條根早期來源爲採集野外之自生植物，但自金門地區開放觀光後，近年來已造成一條根相關產品需求量大增，因而民眾競相採取野生之一條根，使得野生一條根瀕臨絕跡，爲維護金門地區植物資源之永續利用，金門縣政府極力推廣一條根之人工栽植；人工栽植之一條根於每年 4 至 5 月間於田間作畦，以種子直接播種，栽培初期需除草以免妨礙生長，中後期可粗放栽培，經栽植兩年即可採收，收穫後植株稍作整理陰乾即可上市出售，每公斤可達數千元，目前已成爲爲金門地區之特殊栽培作物<sup>(1)</sup>。

近年來金門地區農友反應部份一條根植株，呈現葉片變小、莖節變短、莖葉叢生及植株衰弱等病徵，於栽培區普遍發生，嚴重影響產量，爲一條根生產之重要限制因子之一，此病害病徵與植物菌質體 (phytoplasma) 所引起之簇葉病病徵相似，經現場調查發現，除一條根栽植園內之植株普遍發生外，鄰近種植之甘藷植株亦有典型簇葉病之植株，根據文獻報導在金門地區甘藷簇葉病 (sweet potato witches' broom, SPWB) 已有 40 年以上之發生紀錄<sup>(8)</sup>，因此懷疑金門一條根簇葉病 (witches' broom of *G. tomentella*, WBGT) 之發生可能爲植物菌質體所引起。

植物菌質體爲一群不具細胞壁、型態大小不一致之植物病原細菌，棲息於植物篩管組織內，可引起許多植物病害；植物

菌質體病害早期診斷主要藉由病徵、嫁接或傳播試驗及配合電子顯微鏡觀察等方式進行<sup>(4, 21)</sup>，鑑於植物菌質體無法人工培養，故無法應用傳統細菌型態及生理生化特性進行植物菌質體的鑑定分類，近年來由於分子生物學進展與聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 檢測技術之開發，提供另一簡便、快速及高靈敏度之偵測診斷植物菌質體病害之方法<sup>(11, 12, 13, 20)</sup>，例如陳與林氏設計對落花生簇葉病 (peanut witches' broom) 與甘藷簇葉病之專一性引子對 19a/19b，其靈敏度可達到 100 pg 總量 DNA，可應用於落花生簇葉病田間樣品之快速檢測<sup>(12)</sup>；此外 PCR 技術還可應用於植物菌質體之系統性分類，利用 PCR 技術增幅植物菌質體高度保留性 (conserved) 核糖體 (rDNA) 序列，藉此序列分析深入探討植物菌質體菌群或菌系之間親緣相關性<sup>(2, 3, 15, 21, 23, 24, 26, 28)</sup>，例如 1998 年 Lee 等人以 PCR-RFLP 技術分析 34 種不同植物來源之菌質體菌系之 16S rDNA 序列，可將此 34 種植物菌質體菌系區分爲 14 個主要菌群及 32 個次要菌群<sup>(21)</sup>。植物菌質體於 1994 年新命名爲 *Candidatus Phytoplasma*<sup>(19)</sup>，近年來依據 16S rRNA 序列差異性、病原性及媒介昆蟲種類等特性，將來自不同寄主植物菌質體菌系已歸類命名 20 多個新種<sup>(27)</sup>。

本文爲首次報導金門地區一條根簇葉病之致病因子及一條根人工栽植園簇葉病發生情況，並利用 PCR 技術對金門地區一條根及甘藷簇葉病樣品進行特定 16S rDNA 基因片段增幅、選殖及解序，分析比較與其它不同寄主植物菌質體菌系間親緣相關性。部份研究成果已以摘要形式發表<sup>(10)</sup>。

## 材料與方法

### 金門地區一條根簇葉病發生調查

2005 年 10 月根據金門縣政府農業試驗所輔導一條根人工栽植之農友名冊實地進行田間病害調查，調查區域涵蓋金沙鎮、金湖鎮、金寧鄉及金城鎮等四鄉鎮共調查 20 區栽植園，調查園先衛星定位，並紀錄栽植園之一條根為一年生或二年生之植株，調查方法以目測檢視一條根之植株，有簇葉病徵之植株即認定為罹病株，調查園逢機選取三個栽植行進行調查，每行各調查 200 株植株共 600 株，發生率即為罹病株數除以調查株數再乘以 100%。

#### 穿透性電子顯微鏡觀察

將田間採集出現典型簇葉病徵之一條根樣品，切取葉柄組織以陳與劉氏等人的方式加以修改進行樣品固定與脫水<sup>(4)</sup>，首先以 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 及 1% 四氧化鉻 (osmium tetroxide) 行雙重固定後，以丙酮系列脫水，並進行樹脂包埋，包埋後的樣品以超薄切片機進行切片，最後以飽和醋酸鈾 (uranyl acetate) 及 0.2% 檸檬酸鉛雙重染色後，置於銅網上以穿透式電子顯微鏡 (JEM-1010, JEOL, Japan) 觀察。

#### DNA 抽取

採取具有典型簇葉病病徵的一條根與甘薯植物組織樣品以酒精表面消毒，各取 0.1 克的植物組織樣品以植物 DNA 純化套組 (GeneMark, Taiwan) 進行 DNA 粹取，並依廠商建議之使用說明進行，首先將植物組織樣品置於研磨袋內加入 2 ml SCPAP 緩衝液 (0.1% disodium succinate, 0.1% trisodium citrate, 0.15 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02 M sodium ascorbate, and 5% acid-washed insoluble polyvinylpyrrolidone, pH 7.0) 研磨，將植物粹取液倒入 2 ml 離心管內，離心 8,000 rpm 1 分鐘 (Sigma 3K18, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Germany) 去除上清液，分別加入 DNA 純

化套組所附 630  $\mu$ l 粹緩衝液 A、70  $\mu$ l 粹緩衝液 B 及 7  $\mu$ l RNAase，最終濃度為 50  $\mu$ g/ml，混合均勻置於 65  $^{\circ}$ C 乾浴槽加熱 20 分鐘，加熱完畢後添加 230  $\mu$ l 沉降溶液 (precipitation solution) 混合均勻，再置於冰上 5 分鐘，離心 12,000 rpm 5 分鐘，取上清液置於 2 ml 離心管並加入 10  $\mu$ l proteinase k，最終濃度為 100  $\mu$ g/ml 置於 56  $^{\circ}$ C 1~3 小時，反應完後置入含有濾膜離心子管之離心管中以 12,000 rpm 離心，取離心後的液體置於 1.5 ml 離心管以 1000 rpm 離心 1 分鐘，取上清液置於 2 ml 離心管加入 1,100  $\mu$ l 鍵結溶液 (binding solution) 混合均勻，取 650  $\mu$ l 混合液加入含有分子篩離心子管之離心管以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除濾液再加入 700  $\mu$ l 清洗溶液 (wash solution) 以 12,000 rpm 1 分鐘離心，重覆清洗兩次，10,000 rpm 5 分鐘去除剩餘清洗溶液，將含有 DNA 分子篩離心子管至於新的離心管中，於 65  $^{\circ}$ C 蒸發殘餘清洗溶液，加入 50  $\mu$ l 預熱 65  $^{\circ}$ C 離液溶液 (elution solution) 處理 2 分鐘，再以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，離心液置於 4  $^{\circ}$ C 備用，所純化的 DNA 樣品進一步進行 PCR 檢測。

#### 金門一條根及甘薯簇葉病樣品 PCR 檢測

以 Smart 等人所開發的植物菌質體廣效性引子對 P1/Tint (5'-AAGAGTTTG ATCCTGGCTCAGGATT-3'/5'-TCAGGCG TGTGCTCTAACCAGC-3')<sup>(25)</sup> 與 Chen 及 Lin 兩人所設計的落花生及甘薯簇葉病專一性引子對 19a/19b (5'-GCCTTC ATCATCAATTTTA-3'/5'-TGGTTTAGGTA TTAGATTA-3')<sup>(12)</sup> 對來自於金門地區 5 個罹病園之一條根與甘薯簇葉罹病組織進行 PCR 檢測，引子對 P1/ Tint PCR 反應條件參照 Smart<sup>(25)</sup> 等人稍微修改，反應物濃度：模版 DNA 濃度 20ng、引子對濃度 0.5  $\mu$ M、dNTPs 250 mM、0.8 單位的 GenTap

DNA Polymerase (GenMark, Taiwan) 及 1 倍的反應緩衝液 (10 mM Tris-HCl; pH 8.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100,)，加入去離子水至總反應體積 20  $\mu$ l。增幅條件如下(a) 94  $^{\circ}$ C 5 分鐘, 1 個循環; (b) 94  $^{\circ}$ C 1 分、60  $^{\circ}$ C 1 分、72  $^{\circ}$ C 1 分, 30 個循環; (c) 72  $^{\circ}$ C 10 分鐘, 1 個循環。引子對 19a/ 19b PCR 反應條件參照 Chen 及 Lin<sup>(12)</sup>之方法加以修改, PCR 反應物濃度為參照引子 P1/ Tint 的反應物濃度, 增幅條件如下(a) 94  $^{\circ}$ C 1 分鐘, 1 個循環; (b) 94  $^{\circ}$ C 30 秒、46  $^{\circ}$ C 30 秒、72  $^{\circ}$ C 50 秒, 30 個循環。完成 PCR 增幅後產物則以水平式電泳進行分析, 取 10 $\mu$ l 增幅後的 DNA 產物, 與 1  $\mu$ l 的追蹤液 (loading dye; 0.25% bromophenol blue, 30% glycerol in H<sub>2</sub>O), 經充分混合後, 以微量吸管吸出, 將其置入以 0.5 倍 TAE 緩衝液 (20 mM Tris-acetate, 0.5 mM EDTA, pH 8.0) 所製成之 1.5%瓊脂凝膠 (agarose gel) 之樣品槽中, 並置入 4  $\mu$ l Gen-100 DNA Ladder (GenMark, Taiwan) 為其大小標幟, 以 150V 的電壓進行電泳分析, 約 50 分鐘後取出膠體, 經溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5 mg/ml) 染色 10 分鐘後置於 UV 燈箱上觀察, 並利用拍立得照相機及 Polaroid Type 667 底片照相記錄。

#### 基因選殖與解序

以引子對 P1/Tint 對一條根與甘薯簇葉病樣品進行 PCR 反應後所得 16S rDNA 片段產物, 經 Montage<sup>TM</sup> PCR 離心過濾膜 (Millipore, U.S.A.) 純化 DNA 純化, 將 20  $\mu$ l PCR 產物及 380  $\mu$ l 去離子水加入含有分子篩之離心管使總體積為 400  $\mu$ l, 以 2000 rpm 離心 10 分鐘 (Sigma 3K18, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Germany), 倒除下層液並將分子篩倒置再加入 20  $\mu$ l 去離子水, 以 2000 rpm 離心 2 分鐘, 收集離心液以供基因選殖之用。

選殖套件以 pOSI-T PCR 選殖套組 (GenMark, Taiwan) 來進行 DNA 片段之轉殖。取 1  $\mu$ l 經純化之專一性 DNA 片段, 加入 1  $\mu$ l 的滅菌之去離子水、5  $\mu$ l 之 2X 黏接緩衝液 (ligation buffer)、1  $\mu$ l 之 T vector 及 1  $\mu$ l 之 T4 DNA ligase 混合均勻, 置於 4  $^{\circ}$ C 隔夜, 完成黏接反應 (ligation), 取出套組內所附之 *Escherichia coli* (TOP10F') 勝任細胞 (competent cell) 置於冰上, 再加入上述完成黏接反應之混合物 2  $\mu$ l, 均勻混勻, 置於冰上 30 分鐘後, 轉置於 42  $^{\circ}$ C 之水浴中 30 秒, 再置於冰上 2 分鐘後, 加入 250  $\mu$ l 的 SOC 培養液 (0.5% Yeast extract, 2.0% tryptone, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glucose) 於 37  $^{\circ}$ C 震盪培養 1 小時, 將此培養菌液均勻塗抹於含有 kanamycin (50 ppm) 的 Luria-Bertani (LB, 1% bacto-Tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) 平板培養基, 於 37  $^{\circ}$ C 隔夜培養後, 挑選單一菌落, 培養於含有 kanamycin (50 ppm) 的 LB 平板培養基, 進行質體抽取以確認選殖片段被殖入 *E. coli* 轉殖株內。

#### 細菌質體 DNA 的抽取

細菌質體 DNA 的抽取, 以質體微量純化套組 (GeneMark, Taiwan) 來進行, 將上述所獲得之準轉殖株接種於含有 kanamycin (50 ppm) 之 5 ml LB 培養液中, 於 37  $^{\circ}$ C 震盪培養 16 小時後, 取 1.5 ml 至微量離心管, 以 7,000 rpm 離心 5 分鐘收集菌體, 倒去上清液, 加入純化組件內附之 200  $\mu$ l 的溶液 I (solution I) 懸浮沉澱的菌體, 加入 200  $\mu$ l 的溶液 II (solution II) 使其澄清, 再加入 200  $\mu$ l 的溶液 III (solution III) 混合, 再放入含有分子篩的離心管中, 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘, 倒除下清液, 加入 700  $\mu$ l 的清洗溶液 (wash solution) 淋洗兩次, 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘, 以

60 °C 蒸發殘留酒精，最後加入 60 °C 預熱的 25 µl 滅菌的去離子水，置於新的收層管中，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，下層液即為選殖株重組質體 DNA，將其收集備用。取 1 µl 前述抽取之選殖株重組質體 DNA、1 µl 的限制酵素反應緩衝液、0.3 µl (12 U/µl) 的 *EcoRI* 限制酵素 (Promega, U.S.A.)，再與 8.7 µl 的去離子水混合均勻，使總體積為 10 µl，於 37 °C 水浴中反應 1 小時後，以 1 % 的瓊脂凝膠進行電泳分析，並以溴化乙錠染色於紫外光下觀察是否含有欲選殖的專一性 DNA 片段。

將上述選殖後得到之選殖株培養於含有 kanamycin (50 ppm) 之 LA 培養基上，送至明新生物科技公司(台北)，進行選殖株重組質體 DNA 嵌入片段之核甘酸定序。

#### 基因序列比對分析

一條根與甘薯簇葉病菌系選殖之核甘酸片段經由自動定序儀所得之序列，先以 Bioedit 5.09 進行排序<sup>(16)</sup>，並與基因庫

(GenBank) 其它 9 種植物菌質體菌系之 16S rDNA 核甘酸序列進行比對 (表一)，9 種植物菌質體菌系包括落花生簇葉病菌系 (peanut witches' broom, PnWB, L33765, 16SrII)、太陽麻簇葉病菌系 (sunhemp witches' broom, SUNHP, X76433, 16SrII)、萊姆簇葉病菌系 (witches' broom of lime, WBDL, U15442, 16SrII)、蠶豆花器葉化病菌系 (faba bean phyllody, FBP, X83432, 16SrII)、甜椒菌質病菌系 (stolbur, STOL, X76427, 16SrVII)、番茄大芽病菌系 (tomato big bud, BB, L33760, 16SrI)、白蠟樹黃化病菌系 (ash yellows, AsHY, X68339, 16SrVII)、棕櫚致死黃化病 (coconut lethal yellows, LY3, U18747, 16SrIV) 及桃 X-菌質病菌系 (X-disease, WX, L04682, 16SrIII)，將所有序列以 Clustal X 1.8 軟體進行多序列比對 (multiple sequences alignment)<sup>(18)</sup>，所得一致性序列後再以人工校正，多序列比對完畢後再以 PHYLIP 程式 3.6<sup>(14)</sup> 內的

表一、本研究所引用不同植物菌質體菌系及其 16S rDNA 序列基因之來源

Table.1. Phytoplasma strains from different hosts used in this study and their 16S rDNA sequence accession numbers

Strain	16Sr group	Original source	Accession No.	Reference
Tomato big bud, BB	16SrI-A	tomato	L33760	15
Witches' broom of <i>Glycine tomentella</i> , WBG	16SrII -A	<i>G. tomentella</i>	DQ452416	1) <sup>1)</sup>
Sweet potato witches'-broom, SPWB	16SrII -A	sweet potato	DQ452417	1) <sup>1)</sup>
Peanut witches' broom, PnWB	16SrII -A	peanut	L33765	15
Sunhemp witches' broom, SUNHP	16SrII -A	sunhemp	X76433	24
witches' broom of lime, WBDL	16SrII -B	lime	U15442	29
Faba bean phyllody, FBP	16SrII -C	faba bean	X83432	22
X-disease, WX	16SrIII -A	peach	L04682	23
Coconut lethal yellows, LY3	16SrIV-A	palm	U18747	28
Ash yellows, AshY	16SrVII -A	ash	X68339	24
Stolbur, STOL	16SrXII-A	pepper	X76427	24

<sup>1)</sup> The 16S rDNA gene cloned and sequenced in this study.

DNADIST 程式進行序列相似度計算及親緣關係之推衍，親緣關係推衍首先以 bootstrap 法重複取樣 1000 次，以鄰聚法 (Neighbor Joining method) 演算遺傳距離 (genetic distance)，並以 TreeView 1.66 軟體繪出親緣關係之演化樹，以了解金門一條根與甘薯簇葉病植物菌質體菌系與其他寄主植物菌質體間的親緣關係。

## 結 果

### 金門一條根簇葉病病徵及發生現況

金門地區一條根種子播種後約 3-4 個月，部份栽植園即可零星發現罹患簇葉病之一條根植株，呈現葉片變小、莖節變短、莖葉叢生及植株衰弱等病徵，鄰近種植之甘藷植株亦有典型簇葉病之病徵 (圖一)；大金門地區 4 個鄉鎮共調查 20 區一條根人工栽植園，包括 5 區兩年生栽植園

(前一年播種) 及 15 區一年生栽植園 (當年播種)，結果顯示兩年生的栽植園皆有簇葉病變，其發生率為 7%至 24%不等，平均發生率為 16%；一年生栽植園中 6 區無簇葉病發生，9 區有簇葉病發生，其發生率最高可達 11.4%，平均發生率為 2.9%，20 區調查園一條根簇葉病平均發生率為 6.1% (圖二)，而 20 個調查園有 14 個罹病園，顯示一條根簇葉病普遍分佈於大金門地區 4 個鄉鎮之人工栽植園內。

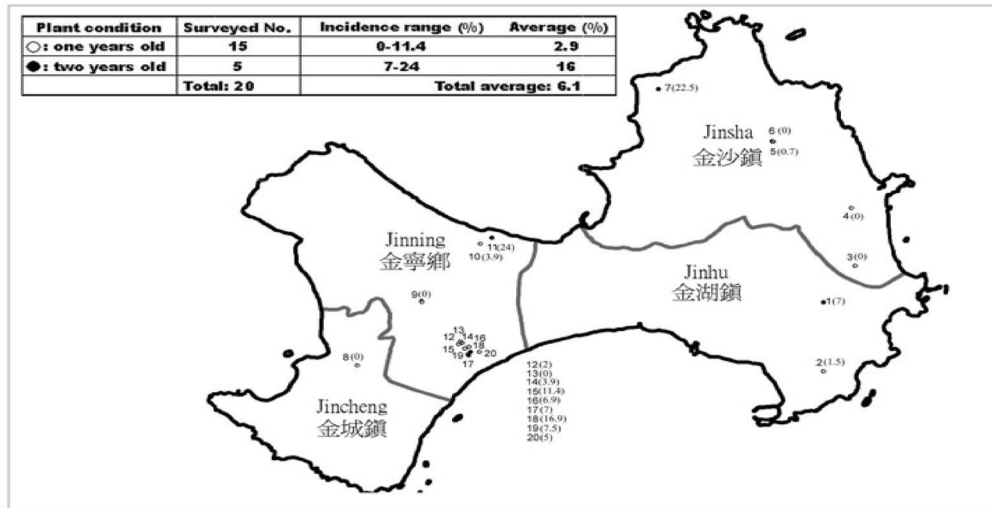
### 穿透性電子顯微鏡觀察

由電子顯微鏡觀察結果可以發現金門一條根簇葉病罹病樣品之維管束組織篩管細胞內具有植物菌質體存在 (圖三)，菌質體呈現大小不一致之型態，於篩管細胞內具有典型之單位膜 (single unit membrane)，但不具細胞壁，而健康之一條根維管束組織之篩管細胞則無植物菌質體存在。



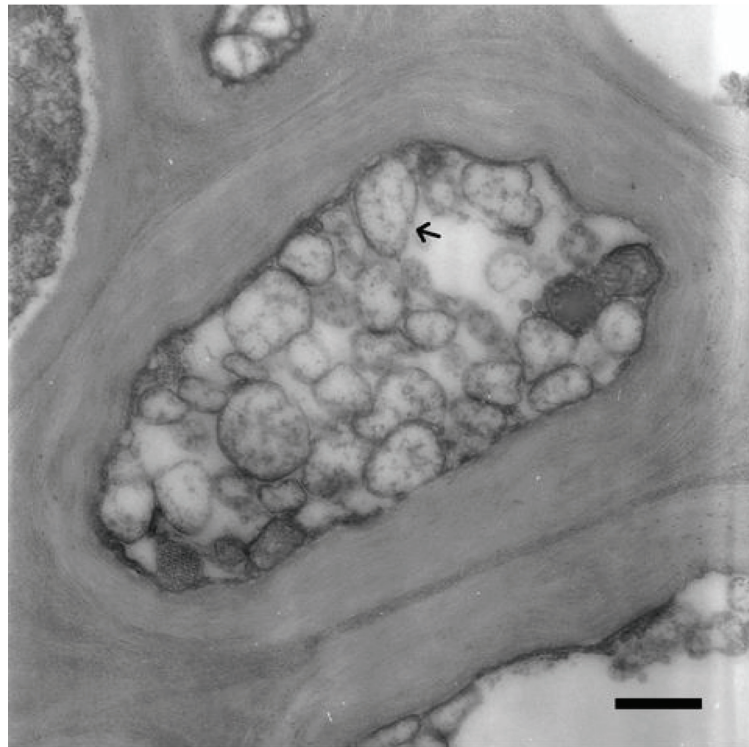
圖一、金門地區一條根與甘薯簇葉病之典型病徵。

Fig. 1. Typical symptoms of witches' broom of *Glycine tomentella* (A) and sweet potato (B) observed in Kinmen county.



圖二、金門一條根簇葉病在金門地區發生與分佈。

Fig. 2. Occurrence and distribution of witches' broom of *Glycine tomentella* in Kinmen county. Number in paranthesis represents incidence percentage of witches' broom of *G. tomentella* at the location surveyed.



圖三、一條根簇葉病罹病株維管束組織之篩管內聚集多型態菌質體顆粒(箭頭)之電顯圖。  
Fig. 3. Micrograph of pleomorphic phytoplasma particle (arrow) found in sieve tube of vascular tissue of *Glycine tomentella* infected with witches' broom. Bar, represents 500 nm.

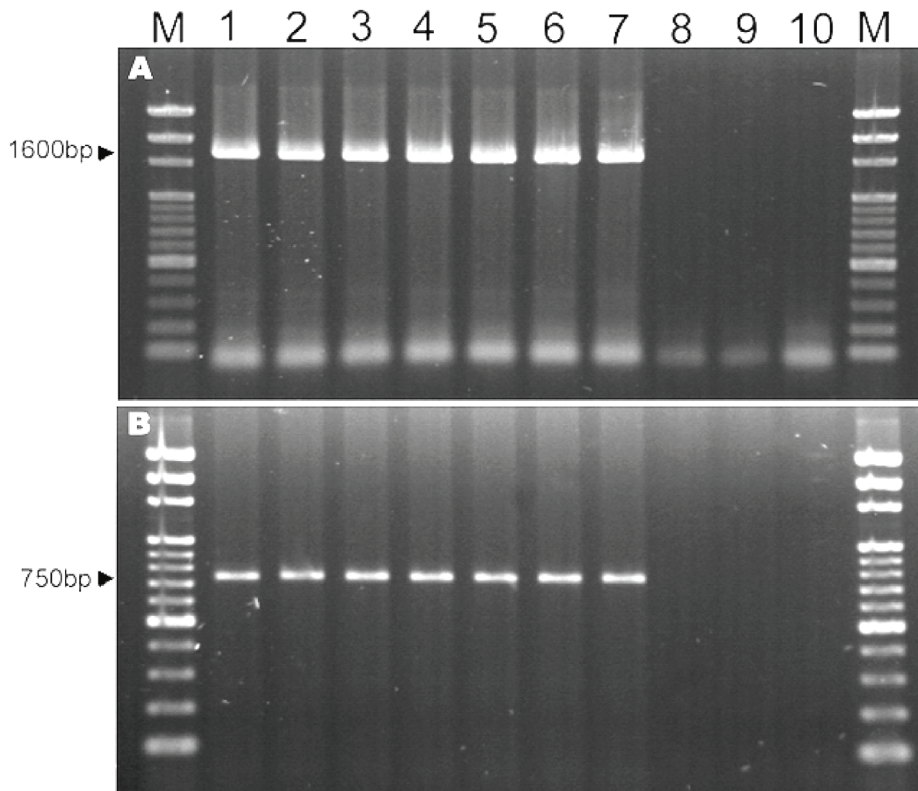
### 金門地區一條根及甘薯簇葉病樣品 PCR 檢測

由廣效性引子對 P1/Tint 與專一性引子對 19a/19b 分別對於五區不同罹病園所採集之金門一條根及甘薯簇葉病罹病樣品進行 PCR 檢測，皆可分別增幅出約 1600 bp 與 750 bp DNA 片段，而健康植株之一條根與甘薯樣品皆則無法增幅出任何產物 (圖四)。

### 親緣相關性分析

將引子對 P1/Tint 對一條根與甘薯簇葉病樣品進行 PCR 反應後所得之 16S

rDNA 序列片段產物，進一步進行基因選殖及解序，所得序列大小分別為 1640 bp 及 1638 bp，與基因庫中其它 9 種植物菌質體菌系之 16S rDNA 基因序列比較，結果顯示金門地區一條根與甘薯簇葉病之植物菌質體 16S rDNA 基因序列最為接近，其核苷酸相同度 (identify) 為 99.6%，其中只有六個鹼基有差異，而金門地區一條根菌系與基因庫中 4 種植物菌質體包括來自於落花生、太陽麻、萊姆及蠶豆寄主菌系比較接近，其核苷酸相同度分別為 99.5%、99.1%、98.4%及 98.2%，另金門一條根菌



圖四、利用引子對 P1/Tint (A)及 19a/19b (B) 分別進行金門地區一條根與甘薯簇葉罹病組織之 PCR 檢測。

Fig. 4. PCR amplified products of witches' broom from *Glycine tomentella* and sweet potato in Kimmen county with primers P1/Tint (A) and 19a/19b (B). Lanes 1-5, diseased tissues of *G. tomentella*; lanes 6 and 7, diseased tissues of sweet potato; lane 8, healthy tissue of *G. tomentella*; lane 9, healthy tissue of sweet potato; lane 10, control; M, Gen-100 DNA ladders.

系與其它 5 種植物菌質體菌系包括來自於甜椒、番茄、白蠟樹、棕櫚及桃寄主菌系關係比較疏遠，其核苷酸相同度介於 89.0%至 91.7%之間 (表二)；進一步以鄰聚法演算遺傳距離，並以 TreeView 1.66 軟體繪出親緣關係之演化樹，結果顯示金門一條根及甘薯簇葉病菌系與 9 種前述植物菌質體菌系可區分為 6 個菌群，分別為一條根、甘藷、落花生及太陽麻菌群、萊姆及蠶豆菌群、桃菌群、白蠟樹及棕櫚菌群、甜椒菌群及番茄菌群，金門地區一條根及甘藷簇葉病簇葉病菌系與落花生及太陽麻菌系屬同一菌群，歸屬於植物菌質體 16SrII -A 之菌群，亦皆為落花生簇葉病菌群之一 (圖五)。

## 討 論

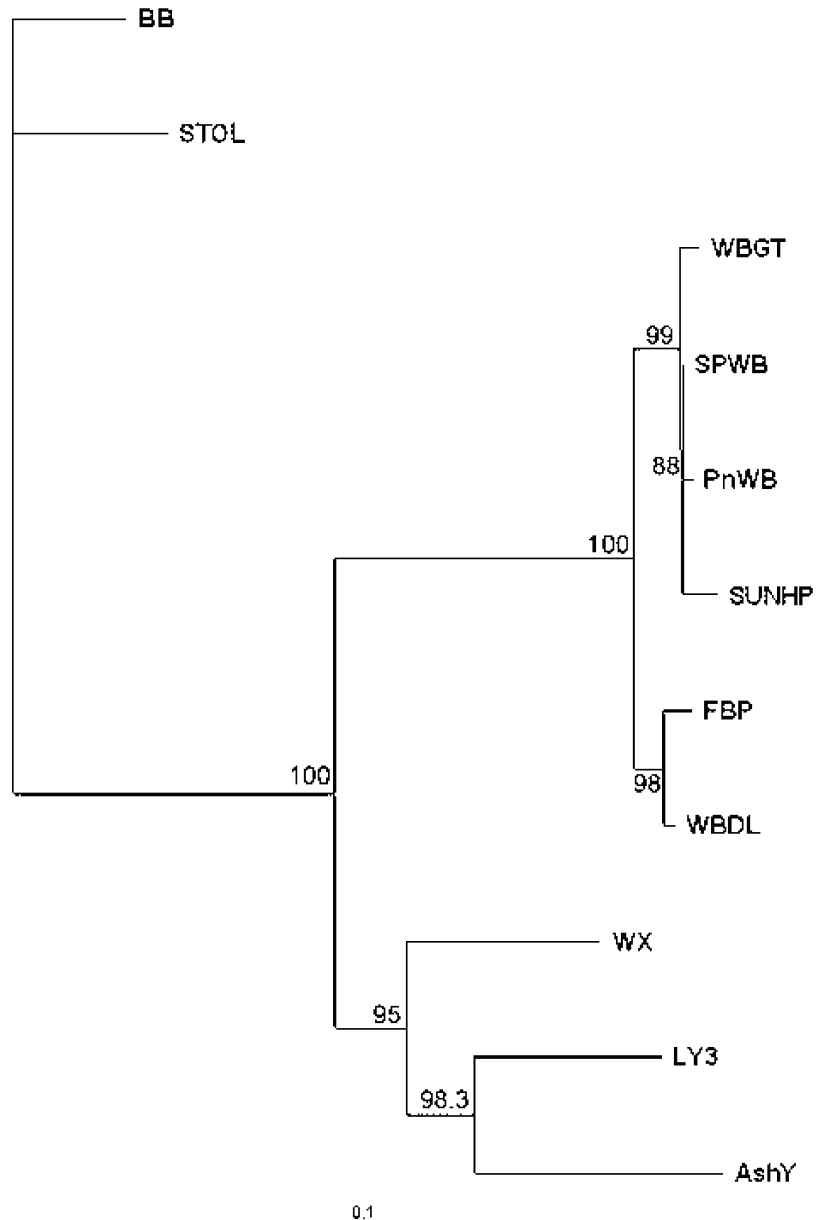
一條根為金門縣政府農業試驗所近年來極力輔導人工栽植之特殊藥用經濟作物，根據輔導栽植農友名冊資料顯示，目

前栽植面積約 10 公頃，主要分佈於 4 鄉鎮；當地農友習慣於每年 4 至 5 月間開始整地作畦，以種子直接播種，播種後約 3-4 個月，部份栽植園即可零星發現罹患簇葉病之植株，經實地調查發現 4 個鄉鎮栽植園之一條根簇葉病確實普遍發生，尤其二年生栽植園簇葉病發生率遠高於一年生栽植園，同時在栽植園內有蔓延傳播現象，嚴重發生會導致一條根產量銳減；金門地區一條根簇葉病罹病植株之組織經電子顯微鏡觀察，發現維管束組織之篩管內有植物菌質體顆粒存在，此外以植物菌質體 16S rDNA 廣效性引子對 P1/Tint 與落花生及甘薯簇葉病之專一性引子對 19a/19b 進行 PCR 檢測之結果，皆可增幅出特定基因產物，由選殖特定 16S rDNA 核苷酸序列分析之結果，可確認金門一條根簇葉病為植物菌質體所引起，其菌系歸屬於植物菌質體 16SrII -A 之菌群，亦屬於落花生簇葉病菌群之一。

表二、金門地區一條根及甘薯簇葉病之植物菌質體與其它寄主植物菌質體菌系之 16S rDNA 相同度比較

Table 2. Comparison of the 16S rDNA nucleotide sequences of phytoplasma strains from witches' broom of *Glycine tomentella* and sweet potato from Kinmen with those of phytoplasma strains from other hosts available in GenBank

Phytoplasma strain	nucleotide sequence similarity (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
WBGT 1	100											
SPWB 2	99.6	100										
FBP 3	98.2	98.5	100									
WBDL 4	98.4	98.7	99.4	100								
PnWB 5	99.5	99.8	98.3	98.5	100							
SUNHP 6	99.1	99.5	98.0	98.2	99.3	100						
LY3 7	90.8	91.1	90.6	91.1	90.9	90.8	100					
ASHY 8	89.9	90.2	89.7	90.3	90.0	89.9	94.0	100				
WX 9	91.7	91.9	91.4	91.9	91.8	91.7	93.8	93.0	100			
BB 10	89.6	89.6	89.6	89.9	89.5	89.1	90.2	89.6	90.4	100		
STOL 11	89.0	89.1	89.3	89.4	89.0	88.6	89.4	89.4	89.6	96.3	100	



圖五、金門地區一條根及甘薯簇葉病之植物菌質體與其它寄主植物菌質體菌系之 16S rDNA 序列之親緣演化樹分析。

Fig. 5. A phylogenetic tree of the 16S rDNA sequences of witches' broom of *Glycine tomentella*(WBGT), sweet potato witches' broom (SPWB), Peanut witches' broom (PnWB), sunhemp witches' broom (SUNHP), faba bean phyllody (FBP), witches' broom of lime (WBDL), X-disease (WX), coconut lethal yellows (LY3), ash yellows (AshY), tomato big bud (BB), and stolbur (STOL). The Numbers at the selected nodes indicate the levels of bootstrap support (percentage) based on 1000 re-sampled data sets. The scale bar represents 1% of sequence divergence.

田間進行一條根簇葉病調查時亦發現鄰近之甘薯植株普遍有簇葉病發生現象，而甘薯簇葉病為台灣、澎湖及金門地區已記錄之重要植物菌質體病害<sup>(6, 8)</sup>，徐與林氏之研究中曾指出台灣地區落花生簇葉病與甘藷簇葉病親緣關係十分接近，應可視為同一種<sup>(2, 3)</sup>，過去並無金門地區甘藷簇葉病植物菌質體菌系進行特定 16S rDNA 核苷酸序列分析探討，本研究採自金門地區甘藷簇葉之組織經由 PCR 檢測及特定 16S rDNA 核苷酸序列分析結果，顯示金門地區甘藷簇葉病與基因庫中之台灣地區落花生簇葉病菌系 16S rDNA 核苷酸序列相同度高達 99.8%，此結果與徐與林氏研究結果相似，顯示金門地區甘藷簇葉病與台灣地區落花生簇葉病兩者之間應為同源；而金門地區甘藷簇葉病與一條根簇葉病菌株之 16S rDNA 核苷酸序列相同度為 99.6%，推測田間甘藷簇葉病與一條根簇葉病之植株可能為相互感染源，仍待利用菟絲子或蟲媒傳播試驗證實。

雜草植物除可作為田間病原殘存場所並成為病害之初次感染源外，還可作為媒介昆蟲棲息之場所<sup>(9, 17)</sup>，楊與吳氏之研究中曾指出落花生簇病罹病發生程度與落花生田附近雜草分佈有相關性，而田間雜草可能為落花生簇葉病之寄主植物及蟲媒昆蟲南斑葉蟬 (*Orosius orientalis* Matsumra) 棲息場所，這些田間雜草寄主可週年發生簇葉病，並成為落花生簇葉病之田間重要感染源<sup>(9)</sup>；近年來金門地區一條根人工栽培後，簇葉病才逐漸被發現並突顯其重要性，但一條根原為金門地區廣泛分佈的野生植物<sup>(5)</sup>，簇葉病可能早就零星存在，因此野生一條根及鄰近雜草植物或傳統雜糧作物甘薯皆有可能為栽植園區一條根簇葉病之初次感染源，此推論需詳細進行田間偵測調查方能證實。

植物菌質體病害田間傳播途徑主要藉由蟲媒來進行，例如南斑葉蟬被證實為甘

薯簇葉病及落花生簇葉病病害傳播的蟲媒<sup>(7, 8)</sup>，根據農試所應用動物組石憲忠博士進行金門地區農作物蟲相調查，顯示金門地區亦有類似南斑葉蟬之記錄（未發表資料），因此金門地區一條根簇葉病及甘藷簇葉病是否藉由類似南斑葉蟬進行病害傳播，仍待進一步探討。

本研究利用引子對 P1/Tint 及 19a/19b 對金門一條根與甘薯簇葉病罹病組織進行 PCR 檢測，對來自不同罹病園之罹病組織皆可增幅出預期之基因產物片段，不過引子對 P1/Tint 為植物菌質體之廣效性引子對，若應用於田間蟲媒或是中間寄主植物之偵測調查，可能會遇到其他種類植物菌質體之干擾問題，而林與陳氏設計之引子對 19a/19b 對落花生與甘薯簇葉病具高度專一性，且上述親緣關係分析亦顯示金門地區一條根簇葉病及甘藷簇葉病具有高度同源性，因此引子對 19a/19b 極具潛力直接應用於金門地區一條根簇葉病罹病組織、蟲媒與中間寄主植物之偵測調查。

## 謝 辭

本研究承蒙金門縣政府農業試驗所李有世及洪篤如先生協助田間一條根簇葉病調查及行政院農業委員會農業試驗所石憲忠博士首次提供一條根簇葉病之樣品，謹此致謝。

## 引用文獻

1. 柯裕仁、謝文全、邱年永、陳忠川。1999。市售一條根類藥材之藥用植物學考察。中國醫藥學院雜誌 8：33-46。
2. 徐仕美、林長平。1998。從 16S rDNA 限制片段長度多型性分析台灣植物菌質體之親緣關係。植病會刊 7：43-53。
3. 徐仕美、林長平。2002。從 16S-23S rDNA spacer 核酸序列分析台灣植物菌

- 質體之親緣關係。植病會刊 11：199-206。
4. 陳脈紀、劉興業。1974。水稻黃萎病之電子顯微鏡研究。植保會刊 16：42-55。
  5. 葉茂生、劉啓東、鄭隨和。1997。臺灣及金門地區野生大豆種源之收集與變異研究的研究。中華農學會報 177：11-26。
  6. 楊一郎。1969。甘藷簇葉病之研究(I)。農業研究 18：50-60。
  7. 楊一郎。1975。台灣落花生簇葉病之研究。台灣農業 32：93-108。
  8. 楊一郎、周樑鎰。1982。台灣甘藷簇葉病之南斑葉蟬媒介傳播。中華農學研究 31：169-172。
  9. 楊一郎、吳淑雅。1987。落花生田發生之草本植物簇葉病。植保會刊 61：449 (摘要)。
  10. 蘇秋竹、楊文仁、楊秀珠、蘇文瀛、高清文。2005。金門地區闊葉大豆簇葉病初步報導。植保會刊 47：433-434 (摘要)。
  11. Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16 rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
  12. Chen, M. F., and Lin, C. P. 1997. DNA probes and PCR primers for the detection of a phytoplasma associated with peanut witches'-broom. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 137-145.
  13. Chen, T. A. 1993. Recent advances in phytopathogenic mycoplasma. *Plant Pathol. Bull.* 2: 195-202.
  14. Felsenstein, J. 2004. PHYLIP: Phylogeny inference package (version 3.61). Department of genome sciences and Department of Biology University of Washington, Seattle, WA, USA.
  15. Gundersen, D. E., Lee, I. M., Rehner, S. A., Davis, R. E., and Kingsbury, D. T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176: 5244-5254.
  16. Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
  17. Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 271-290.
  18. Jeannmougin F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403-405.
  19. Judicial Commission of IJSB. 1995. Minutes of the meetings, 2 and 6 July 1994, Prague, Czech Republic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 195-196.
  20. Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and application of cloned DNA Probes for a mycoplasma-like organism associated with sweet potato witches'-broom. *Phytopathology* 84: 468-743.
  21. Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., and Bertaccini, A. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.
  22. Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., and Bartoszyk, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153 -1169.

23. Schneider, B., Ahrens, B. U., Kirkpatrick, B. C., and Seemüller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 139: 519-527.
24. Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K-H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B.B., and Stackebrandt, E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 44: 440-446.
25. Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.
26. Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
27. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma working team-Phytoplasma taxonomy group. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1243-1255.
28. Tymon, A. M., Jones, P., and Harrison, N. A. 1998. Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. *Annu. Appl. Biol.* 132: 437-452.
29. Zreik, L., Carle, P., Bové, J. M., and Garnier, M. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, "*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 449-453.

## ABSTRACT

**Su, C. C.\*, Yang, W. J., and Kao, C. W. 2006. Witches' broom of *Glycine tomentella* caused by phytoplasma in Kinmen. Plant Prot. Bull. 48: 203-216. (Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan (ROC))**

Wild *Glycine tomentella* Hayata is used as a traditional medicine plant in Kinmen county. With its increasing demand and limited supply, it started to be grown commercially. However, a new witches' broom disease of *G. tomentella* (WBGT) has become the limiting factor in the production of *G. tomentella*. Typical symptoms are small leaf, short internode, and declining of plant vigor and stunting. The disease caused significant yield losses in severe cases. A total of 20 locations were selected for field survey, including 5 locations of two year-old cultivated plants and 15 locations of one year-old cultivated plants. Two year-old cultivated plants showed WBGT disease incidence ranging from 7% to 24%, with an average of 16%. One year-old cultivated plants among fifteen locations showed an average disease incidence of 2.9%. The sweet potato witches' broom (SPWB) disease was also found commonly nearby the locations with WBGT disease. Pleomorphic phytoplasmas were observed in sieve tubes of the phloem in ultrathin sections of petioles of WBGT infected plants. About 1600 bp and 750 bp DNA products were consistently obtained from samples collected from five different locations of plants infected with WBGT and SPWB. The DNA template was used to amplify 16S rDNA by polymerase chain reaction (PCR) with a universal primer P1/Tint and a specific primer 19a/19b. However, no DNA fragment could be amplified from healthy plant control. The amplified DNA fragments of WBGT and SPWB was cloned and sequenced. The 16S rDNA sequenced fragment of WBGT and SPWB showed high homology, with 99.6% nucleotide similarity. The phylogenetic trees consisted of WBGT and SPWB, and 9 other strains from GenBank showed 6 distinct clads. The strains of WBGT and SPWB from Kinmen, and peanut and sunhemp were in the same clads, belonging to phytoplasma 16SrII -A group and the members of peanut witches' broom group.

(Key words: *Glycine tomentella*, witches' broom, phytoplasma)

\*Corresponding author. E-mail: auba@tactri.gov.tw