

台灣發生由 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 引起之薑黃葉枯病

許秀惠¹ 宋嘉仁¹ 高瑞隆² 陳柏昇¹ 林俊義^{1,3}

¹ 行政院農委會農業試驗所 植物病理組

² 行政院農委會農業試驗所 生技組

³ 聯絡作者：電子郵件：cylin@wufeng.tari.gov.tw

接受日期：中華民國 年 月 日

摘要

許秀惠、宋嘉仁、高瑞隆、陳柏昇、林俊義. 2008. 台灣發生由 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 引起之薑黃葉枯病. 植病會刊 17 : 43-52.

民國 95 年夏天，於南投縣名間及草屯等地區栽培之薑黃植株上發現外圍黃化的不規則形褐斑問題，病徵通常從葉緣水孔開始發生，之後顏色漸加深，並沿著葉脈擴散，周圍伴隨著黃化，從葉背可見明顯水浸狀，嚴重時葉片枯萎，葉鞘也出現同樣的病徵。經柯霍氏法則確認分離自薑黃的病原為細菌，且生理生化，Biolog，SPA 選擇性培養基及脂肪酸分析等特性均與 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 相近，再以 Aaaf3/Aaar2 及 Aaaf5/Aaar2 二組引子對進行巢式 PCR (Nested-PCR) 鑑定，確認該細菌為 *A. avenae* subsp. *avenae*，其所引起之病徵定名為薑黃葉枯病 (bacterial leaf blight of turmeric)。以市售 11 種藥劑測試在一般使用濃度下對該病菌生長之抑制效果，所有供試藥劑均能抑制病原菌之生長，其中又以四環黴素之藥劑效果最佳，其效果依序為四環黴素、歐索林酸、嘉賜黴素、鏈四環黴素、嘉賜銅、多保鏈黴素、鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、三元硫酸銅及鋅錳滅達樂。

關鍵詞：薑黃、細菌性葉枯病、鑑定、藥劑篩選

緒言

薑黃 (turmeric) 屬於薑科 (Zingiberaceae) 薑黃屬 (*Curcuma*) 之單子葉植物，俗稱鬱金，實際上包含 *Curcuma* 屬內多個種的植物，原產於熱帶亞洲，在台灣主要栽培品種為鬱金 (*C. longa* L.，又稱秋鬱金) 及香鬱金 (*C. aromatica* Salisb.，又稱春鬱金)，主要種植於中南部一帶，其中高雄縣及屏東縣是其主要產地⁽¹³⁾。薑黃為植物性天然黃色素原料之一，其色素在食品及飲料加工業已被廣泛使用，其根莖部含薑黃素 (curcumin) 為抗氧化物質，可抑制代謝活化、抗癌、消炎及促進血液循環等作用，為一具潛力之中藥材植物^(5, 14)。

由薑科作物之病害資料顯示，1995 年日本的薑

(*Zingiber officinale* Rosc., ginger)，茗荷薑 (*Z. mioga* Rosc., mioga) 和薑荷花 (*C. alismatifolia* Hort., curcuma) 等薑科作物上發現由 *Ralstonia* (原為 *Pseudomonas*) *solanacearum* 引起的青枯病^(11, 33, 36)，而在巴西曾發現由 *Pseudomonas cichorii* 引起的薑黃細菌性病害⁽¹⁷⁾，在中國大陸薑黃病害調查報告發現黑斑病 (*Alternaria* spp.) 及炭疽病 (*Colletotrichum* spp.) 二種真菌性病害，而細菌性病害包含由 *Pseudomonas* sp. 引起的細菌性斑點病，以及由 *R. solanacearum* 引起的青枯病等⁽¹⁵⁾，在台灣種植的薑黃則尚未有任何病害發生的記錄。筆者等於九十五年間在草屯及名間種植的薑黃植株葉片上發現不規則褐斑，因此本研究主要探討引起薑黃褐斑之病因及病原菌之特性，並進行初步藥劑篩選，供日後防治參考。

材料與方法

菌株來源

從南投縣名間鄉及草屯鎮採集薑黃 (春鬱金及秋鬱金) 外圍具黃化褐斑之葉片及葉鞘，經 75% 酒精表面消毒後，以 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗 30 秒後，再經無菌水漂洗 3 次之後切取罹病與健康交界處之組織，置於無菌蒸餾水中，經振盪後以移殖環沾取細菌懸浮液，劃線於營養培養基 (nutrient agar, NA) 平板上，並置 30°C 下培養一天後，挑取單一菌落，再劃線於 NA 平板，重覆三次後以 Aa 編號，並移至 NA 斜面備用。

病原性測定

將分離自薑黃之細菌菌株分別移植於 NA 斜面上，在 30°C 下培養一天後，懸浮於無菌蒸餾水中，以分光光譜儀 (spectrophotometer, Bausch & Lomb) 調整其吸收值 (A_{600}) 為 0.3 (10^8 CFU/ml) 作為接種源，以注射接種方法分別注射於萬國土煙草葉片內，置室溫下觀察有無過敏性反應。另外選取 Aa4、Aa5、及 Aa9 為供試菌株，以無菌水當對照，依上述方法製備 Aa4、Aa5 及 Aa9 混合之接種源，以噴霧方式接種於約二葉大小之玉米 (台南白)、水稻 (台農 63 號) 及薑黃 (秋鬱金) 植株上，以塑膠袋套袋保濕後，置 30°C 溫箱中，兩天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵。再從接種之薑黃植株中分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

病原菌生理生化測定

選取 Aa4 為供試菌株在 NA 斜面上 30°C 下培養一天後，加入少許無菌水及等量的 2% 錳酸染色液 (PTA, pH 7.5, 含 0.1% bovine serum)，置於 Hitach -7000 的穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope) 觀察細菌形態及鞭毛。並選取 Aa4、Aa5、Aa8 及 Aa9 為供試菌株，依 Jones 等⁽¹⁶⁾ 及 Willems 等人⁽³⁵⁾ 所述進行生理生化測定，以鑑定其種類。

Song 等人⁽²⁶⁾ 針對 *A. avenae* subsp. *avenae* 開發之選擇性培養基-- sorbitol pyroglutamic acid agar (SPA)，依其在 SPA 上之菌落型態可確認供試菌株是否為 *A. avenae* subsp. *avenae* 菌株，因此將供試薑黃菌株分別劃線培養於 SPA 上，供試對照菌株為檳榔葉斑病菌 *Burkholderia andropogonis* BA17、康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli* TW7 (來自興大植病系)、洋蔥細菌性軟腐病菌 *B. cepacia* 13208 (購自食工所)、唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladioli*、水稻穀枯病菌 *B. glumae*、芹菜細菌性葉斑病菌 *P. cichorii* 12682 (購自食工所) 等。SPA

的配方如下：每公升培養基中含有 K_2HPO_4 0.5 g, Na_2HPO_4 3.0 g, D-sorbitol 2.0 g, L-pyroglutamic acid 0.2 g, Tween 80 10.0 ml, victoria blue B 40.0 mg, bromthymol blue 15.0 mg, agar 15.0 g, ampicillin 150.0 mg, vancomycin 25.0 mg⁽²⁶⁾。

Biolog Identification System 之細菌鑑定

選取 Aa5、Aa8 及 Aa9 為供試菌株，分別培養於 BUGM (Biolog Universal Growth Medium, medium 36 g, Bacto Agar 15 g) 培養基中約 16-24 小時，重複劃線於 BUGM 上，培養 24 小時後，將細菌懸浮於 GN/GP-IF buffer (0.4% NaCl, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gellan gum) 中，調整濃度為 63 % T (Turbidity)，分別加入 Biolog GN2 反應盤 (Biolog Inc. Hayward, CA) 中，每孔加入 150 ul 細菌懸浮液，置於 30°C 下培養 4-24 小時，之後以光譜儀 ($OD_{590/750}$) 測讀，最後將資料輸入電腦與 Biolog GN2 資料庫 (Biolog 6.1 版) 中比對，以鑑定其種屬 (依廠商指示使用)。

細胞脂肪酸組成分析及鑑定

選取 Aa5、Aa8 及 Aa9 為供試菌株，分別培養於 TSA (BBL tryptic soy broth 15 g, agar 20 g) 培養基中，更新兩次後，取菌泥至試管中，進行第一步驟皂化 (saponification) 反應：先加入 1 ml reagent 1 (NaOH 45 g, methanol 150 ml, ddH₂O 150 ml)，震盪 5-10 秒，100°C 水浴 5 分鐘，再震盪 5-10 秒，100°C 水浴 25 分鐘，第二步驟為甲基化 (methylation) 反應：加入 2 ml reagent 2 (6 N NaOH 325 ml, methanol 275 ml)，震盪 5-10 秒，80°C 水浴 10 分鐘，冷卻試管 (置冰上)，第三步驟為萃取 (extraction)：加入 1.25 ml reagent 3 (Hexane 200 ml, Methyl-tert Butyl Ether 200 ml) 並上下混勻 10 分鐘，靜置待分層，移除底層 (水層)，第四步驟為鹼洗 (base wash)：加入 3 ml reagent 4 (NaOH 10.8 g, ddH₂O 900 ml)，上下混勻 5 分鐘，靜置待分層，若分層不完全，可取飽和食鹽水滴入試管中，將有機層中之乳化與雜質滴至下層，分層完全後取上層之 2/3 有機層置於 GC 小管。完成上述前處理後，以氣相層析質譜儀 GC-MS (HP 6890N, Agilent, Palo Alto, CA, USA) 進行分析，並以 MIDI Sherlock® Microbial Identification System (MIS) 之資料庫比對分析，以確認病原菌種類⁽²³⁾。

應用巢式 PCR (Nested Polymerase Chain Reaction, Nested-PCR) 鑑定薑黃菌株

選取 Aa4、Aa5、Aa8 及 Aa9 以及供比較試驗用之

細菌菌株，包含玉米條斑病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* CH12 (來自興大植病系)，檳榔葉斑病菌 *B. andropogonis* BA17、康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli* TW7 (來自興大植病系)、洋蔥細菌性軟腐病菌 *B. cepacia* (購自食工所)、唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladioli*、水稻穀枯病菌 *B. glumae*、芹菜細菌性葉斑病菌 *P. cichorii* 12682 (購自食工所)、大豆葉斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *glyciniae* P154、菜豆葉燒病菌 *P. syringae* pv. *phaseolicola* P343、豌豆葉枯病菌 *P. syringae* pv. *pisi* P11 及番茄葉斑病菌 *P. syringae* pv. *tomato* P133 (*P. syringae* pathovars DNA 均來自中興大學植病系細菌研究室) 等，進行 nested-PCR。

Nested-PCR 所使用之引子對 Aaaf3/Aaar2 及 Aaaf5/Aaar2 係依 *A. avenae* subsp. *avenae* 之 16S-23S rDNA 基因之核酸序列所設計^(25, 27)。反應總體積為 25 μ l (200 μ M 的 dNTPs、0.4 μ M 的引子、0.8 U 的 Pro-Taq DNA polymerase、1 \times 反應緩衝液及 125 ng 的 DNA 模版等，加去離子水至總體積 25 μ l)。先以用來鑑定 *Acidovorax* spp. 之外圍引子對 Aaaf3/Aaar2 進行 PCR 反應，反應條件為 94 $^{\circ}$ C，10 分鐘，再以 94 $^{\circ}$ C，30 秒，53 $^{\circ}$ C，30 秒及 72 $^{\circ}$ C，30 秒進行 30 個循環後，最後以 72 $^{\circ}$ C，5 分鐘終止反應，反應完成後將其產物稀釋 100 倍，取 10 μ l 作為模版，再加入針對 *A. avenae* subsp. *avenae* 之內部鑑定引子對 Aaaf5/Aaar2 進行第二次 PCR 反應，反應條件為 94 $^{\circ}$ C，5 分鐘，再以 94 $^{\circ}$ C，30 秒、60 $^{\circ}$ C，30 秒、72 $^{\circ}$ C，30 秒進行 3 個循環後，以 94 $^{\circ}$ C，30 秒、48 $^{\circ}$ C，30 秒、72 $^{\circ}$ C，30 秒進行 3 個循環，接著以 94 $^{\circ}$ C，30 秒、53 $^{\circ}$ C，30 秒、72 $^{\circ}$ C，30 秒進行 25 個循環後，72 $^{\circ}$ C，7 分鐘終止反應，反應完成後以 1X TAE 緩衝溶液製成之 2.3% agarose 進行電泳分析。

藥劑感受性測定

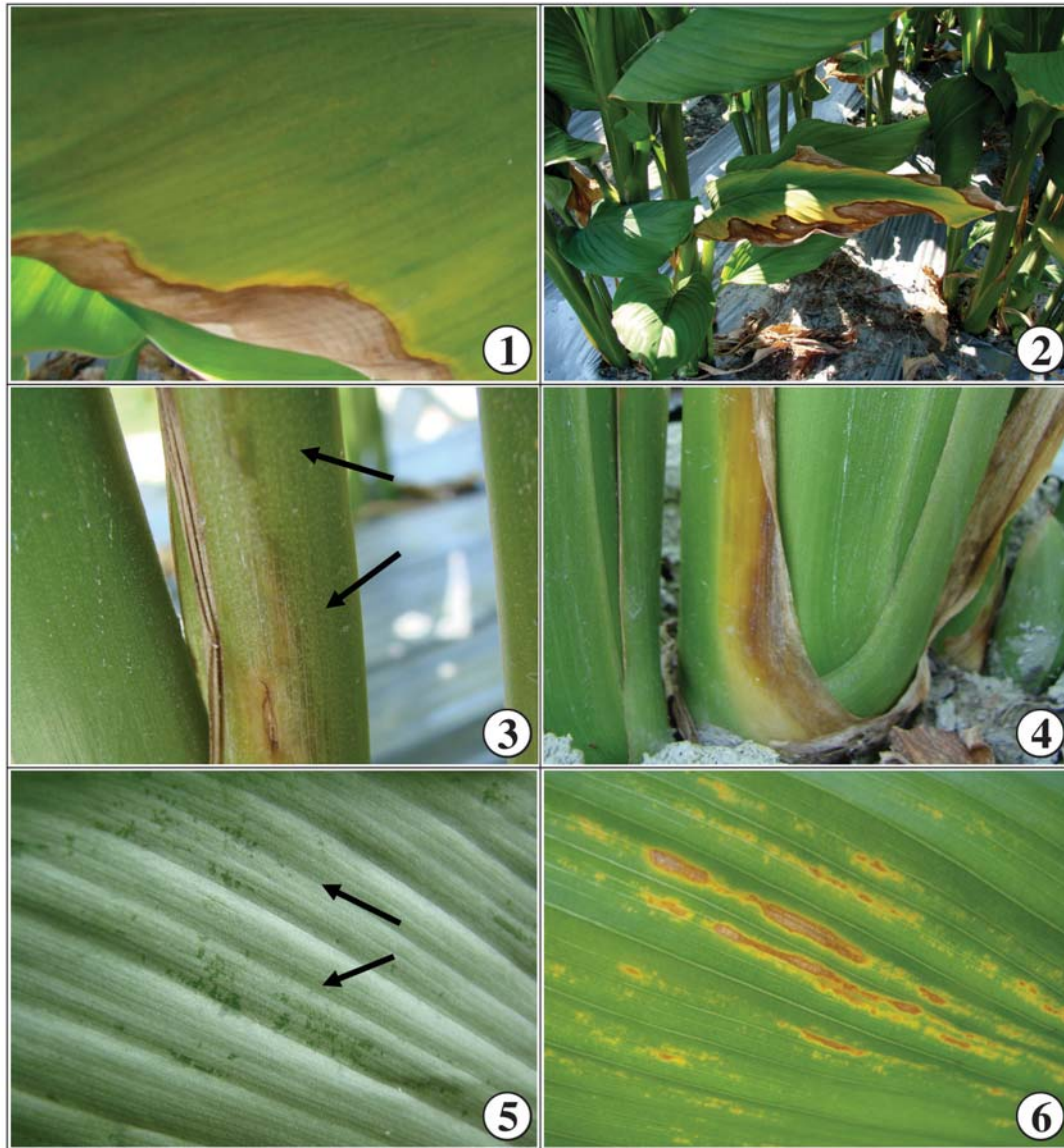
利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)⁽¹⁾ 於 NA 培養基上測定供試分離自薑黃之葉枯病菌菌株對不同藥劑及濃度之感受性。選取 Aa4、Aa5、Aa8 及 Aa9 為供試菌株，濃度為 10⁸ CFU/ml，分別取 0.1 ml 混於水瓊脂 (water agar) 中，再覆於 NA 平板上；將各種藥劑稀釋成不同濃度後，分別取 0.1 ml 滴於每片濾紙 (直徑 12.7 mm) 上，之後每皿放 3 個含藥之濾紙圓盤，並以浸無菌水之濾紙盤為對照組，在 30 $^{\circ}$ C 下培養 1-2 天後，測量抑制圈大小，若無抑制圈產生表示此藥劑在所測試的濃度下對供試菌株之生長無抑制效果。供試 11 種市售藥劑及稀釋濃度如下，抗生素類藥劑：四環黴素 (Tetracycline，商品名為鉑美樹，臺灣氫氨公

司，30.3% SP，使用劑量為 200 ppm、400 ppm、600 ppm)、鏈四環黴素 (Streptomycin Tetracycline，商品名為枯萎寧，全台公司，10.0% SP，使用劑量為 100 ppm、200 ppm、400 ppm)、鏈黴素 (Streptomycin，商品名為立農黴素，豈農公司，12.5% S，使用劑量為 100 ppm、200 ppm、400 ppm)、多保鏈黴素 (Thiophanate methyl + Streptomycin，商品名為安達菌，瑞總公司，68.8% WP，使用劑量為 500 ppm、1000 ppm、1500 ppm)、嘉賜黴素 (Kasugamycin，商品名為加收米，大勝化工，2.0% S，使用劑量為 100 ppm、200 ppm、400 ppm)；含銅劑類藥劑之鹼性氯氧化銅 (Copper Oxychloride，商品名為健果銅，益欣公司，85.0% WP，濃度為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)、氫氧化銅 (Copper hydroxide，商品名為可產多，Kocide Chemical Corporation，77.0% WP，使用劑量為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)、三元硫酸銅 (Tribasic Copper Sulfate，商品名為銅高尚，日產化工公司，27.12% SC，使用劑量為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)；混合類藥劑之嘉賜銅 (Kasugamycin + Copper oxychloride，商品名為統統好，大勝化工，81.3% WP，使用劑量為 500 ppm、1000 ppm、1500 ppm)、鋅錳滅達樂 (Ridomil-MZ，58% WP，商品名為利露滅-鋅錳，汽巴嘉基股份有限公司，濃度為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)，其他類藥劑之歐索林酸 (Oxolinic acid，商品名為金星，住友化學公司，20% WP，使用劑量為 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)。

結 果

病徵

田間薑黃葉枯病病徵在葉片出現外圍黃化的不規則型淡褐斑，通常病徵從葉緣水孔開始發生，初呈水浸狀，之後形成淡褐色斑點，並沿著葉脈擴散，周圍伴隨著黃化，最後葉片枯萎 (圖一-1, 2)，葉鞘也出現水浸狀 (圖一、3) 及外圍黃化的不規則形淡褐斑 (圖一、4)。以病原菌注射接種之萬國士菸草葉片於 24 小時內形成壞疽斑。以噴霧方式接種至薑黃 (秋鬱金) 植株，於接種 1~2 天後在葉片出現水浸狀斑 (圖一、5)，七天後出現外圍黃化之不規則形淡褐色斑，並沿著葉緣擴散 (圖一、6)。水稻植株於接種二天後觀察發現葉片出現黃化斑點，並沿著葉脈擴散，七天後形成黃褐色至褐色病斑，十四天後形成紅褐色條斑 (圖一、7)。玉米植株於接種二天後觀察發現葉片出現白色斑塊，七天後形成黃化條斑，並沿葉脈擴散，十四天後



圖一、薑黃葉枯病之病徵，田間自然感染薑黃葉片之病徵 (1, 2)；田間自然感染薑黃葉鞘之病徵 (3, 4)；薑黃菌株經人工接種 1-2 天葉片之水浸狀病徵 (5)；接種後 7 天葉片病徵 (6)。

Fig 1. Symptoms of bacterial leaf blight of turmeric. Naturally infected leaves (1, 2), leaf sheath (3, 4), and artificially inoculated leaves at 1-2 (5) and 7 (6) days after inoculation with strains of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*.

形成紅褐色條斑(圖一、8)。

生理生化特性

依 Jones 等⁽¹⁶⁾ 及 Willems 等人⁽³⁵⁾ 所述進行各項生理生化試驗，測試結果顯示供試薑黃菌株為革蘭氏陰性，好氣菌，通常具一根偶有二~三根單極生鞭毛之桿狀細菌，在 NA 上為白色菌落，在 YDC (yeast extract dextrose CaCO₃) 培養基上培養二~三天會產生乳黃色菌落，可於 40°C 生長，具有 Kovacs 氧化酶、尿素酶活性，可分解乳酸，能在含阿拉伯糖、果糖、甘露醇及山梨糖醇的培養基中產生酸，在 NA 及 KB

上不具螢光色素，不具有果膠分解酶活性，無法從含蔗糖培養基產生酸，上述結果顯示供試菌株與 *A. avenae* subsp. *avenae* 之生理生化特性相近(表一)。

供試 Aa4、Aa5、Aa8 及 Aa9 薑黃菌株，經劃線培養於 SPA 選擇性培養基，四天後皆呈中央微白色之有光澤圓形藍色菌落，而對照組檳榔葉斑病菌 *B. andropogonis* BA17、康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli* TW7、洋蔥細菌性軟腐病菌 *B. cepacia*、唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladioli*、水稻穀枯病菌 *B. glumae*、芹菜斑點病菌 *P. cichorii* 12682 等菌株在 SPA 培養基上均形成圓形或不規則形白色菌落。顯示供試薑黃菌株在

SPA 培養基上之菌落特性與 *A. avenae* subsp. *avenae* 相同⁽²⁶⁾。

Biolog System 鑑定結果

供試薑黃菌株 Aa5、Aa8 及 Aa9 以 Biolog Identification System 鑑定結果顯示，經 16 小時培養與 *A. avenae* subsp. *avenae* 相似值依序分別為 0.85、0.79 及 0.84，而經 24 小時培養與 *A. avenae* subsp. *avenae* 相似值依序分別為 0.87、0.81 及 0.735。

脂肪酸分析鑑定結果

供試薑黃菌株 Aa5 及 Aa9 經細胞脂肪酸組成分析，結果如表二，所得資料與電腦中資料庫 MIDI Sherlock[®] Microbial Identification System (MIS) 比對，鑑定為 *A. avenae* subsp. *avenae*，其相似值依序分別為 0.902 和 0.903。

巢式 PCR (Nested-PCR) 鑑定結果

以 Song 等^(25, 27) 所設計之外圍引子 Aaaf3/Aaar2 進行 PCR 反應，結果如圖二~三所顯示，供試薑黃菌株 Aa4、Aa5、Aa8、Aa9 及玉米條斑病菌 *A. avenae* subsp. *avenae* CH12 均可在 262 bp 處產生專一性 DNA 條帶，而供試 *Burkholderia* 屬(圖二)及 *Pseudomonas* 屬(圖三)等菌株(詳見材料方法)，則未產生任何 DNA 條帶。以此產物為模版再加入內圍鑑定引子對 Aaaf5/Aaar2 進行 PCR 反應^(25, 27)，結果如圖二~三所顯示，供試薑黃菌株 Aa4、Aa5、Aa8、Aa9 及玉米條斑病菌 *A. avenae* subsp. *avenae* CH12 均可在 241 bp 處產生專一性 DNA 條帶，而供試 *Burkholderia* 屬(圖二)及 *Pseudomonas* 屬(圖三)等全菌 DNA，則未產生任何 DNA 條帶，由 nested-PCR 結果顯示供試薑黃菌株為 *A. avenae* subsp. *avenae*。

藥劑之感受性

供試 Aa4、Aa5、Aa8 及 Aa9 薑黃菌株對市售 11 種藥劑在一般使用濃度下之感受性，結果顯示所有藥劑在測試之濃度下對供試薑黃菌株之生長均有抑制效

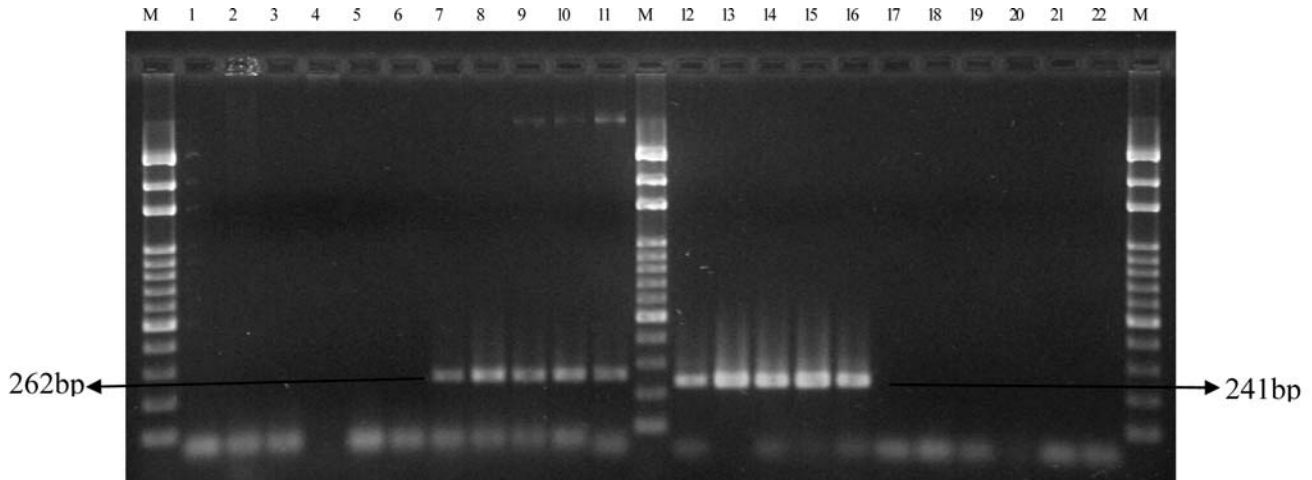
表一、薑黃葉枯病菌之生理生化特性

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* from bacterial leaf blight of turmeric

項目	供試菌株	
	<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ^a	Strains from turmeric
Gram positive	—	—
Grows anaerobically	—	—
Grows aerobically	+	+
Yellow insoluble pigment on nutrient agar	—	—
Yellow colonies on YDC at 30 °C	+	+
Fluores pigment on KB	—	—
Diffusible non-fluorescent pigments on KB	—	—
Pectolytic activity	—	—
Urease	+	+
Kovacs oxidase	+	+
Grows at 40 °C	+	+
Flagella	Polar 1 or 2	Polar 1 to 3
Carbon sources utilized for growth:		
L-arabinose	+	+
Sucrose	—	—
D-fucose	+	+
D-mannitol or D-arabitol	+	+
Sorbitol	+	+
Lactalysate or beef extract ppt.	+	+
Pathogenicity on:		
Corn	+	+
Rice	+	+
Tobacco HR	+	+

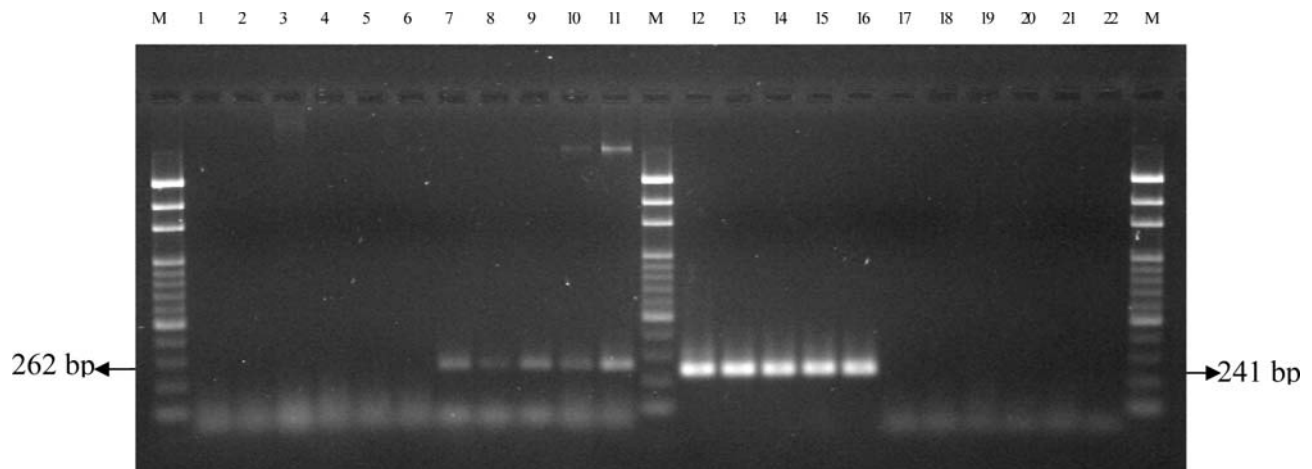
Except specifically stated, + indicated positive reaction, and — indicated negative reaction.

^aData from Willems, *et al.*, 2005 and Jones, *et al.* 2001.



圖二、應用巢式 PCR (Nested-PCR) 鑑定 *Burkholderia* 屬及薑黃葉枯病菌。lane 1-11, 以 Aaaf3/Aaar2 外圍引子對之第一次 PCR ; lane 12-22, 以 Aaaf5/Aaar2 內圍引子對之第二次 PCR ; Lane M, DNA Bio-100 marker ; lane 1, 22, negative control (ddH₂O) ; lane 2, 21, *B. andropogonis* BA17 ; lane 3, 20, *Burkholderia caryophylli* TW7 ; lane 4, 19, *B. cepacia* ; lane 5, 18, *B. gladioli* pv. *gladioli* ; lane 6, 17 *B. glumae* ; lane 7, 16, *A. avenae* subsp. *avenae* CH12 ; lane 8, 15, 薑黃菌株 Aa4 ; lane 9, 14, 薑黃菌株 Aa5 ; lane 10, 13, 薑黃菌株 Aa8 ; lane 11, 12, 薑黃菌株 Aa9 。

Fig. 2. Identification of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* isolated from diseased tissues of turmeric by nested polymerase chain reaction with primer pairs Aaaf3/Aaar2 (lane 1-11) and Aaaf5/Aaar2 (lane 12-22). Lane M, DNA Bio-100 marker; lane 1 and 22, negative control (ddH₂O); lane 2 and 21, *Burkholderia andropogonis* BA17; lane 3 and 20, *B. caryophylli* TW7; lane 4 and 19, *B. cepacia*; lanes 5 and 18, *B. gladioli* pv. *gladioli*; lane 6 and 17 *B. glumae*; lane 7 and 16, *A. avenae* subsp. *avenae* CH12; lane 8 and 15, strain Aa4 from turmeric; lane 9 and 14, strain Aa5 from turmeric; lane 10 and 13, strain Aa8 from turmeric; lane 11 and 12, strain Aa9 from turmeric.



圖三、應用巢式 PCR (Nested-PCR) 鑑定 *Pseudomonas* 屬及薑黃葉枯病菌。lane 1-11, 以 Aaaf3/Aaar2 外圍引子對之第一次 PCR ; lane 12-22, 以 Aaaf5/Aaar2 內圍引子對之第二次 PCR ; Lane M, DNA Bio-100 marker ; lane 1, 22, negative control (ddH₂O) ; lane 2, 21, *Pseudomonas cichorii* 12682 ; lane 3, 20, *P. syringae* pv. *glycinae* P154 ; lane 4, 19, *P. syringae* pv. *phaseolicola* P343 ; lane 5, 18, *P. syringae* pv. *pisi* P11 ; lane 6, 17 *P. syringae* pv. *tomato* P133 ; lane 7, 16, *A. avenae* subsp. *avenae* CH12 ; lane 8, 15, 薑黃菌株 Aa4 ; lane 9, 14, 薑黃菌株 Aa5 ; lane 10, 13, 薑黃菌株 Aa8 ; lane 11, 12, 薑黃菌株 Aa9 。

Fig. 3. Identification of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* isolated from diseased tissues of turmeric by nested polymerase chain reaction with primer pairs Aaaf3/Aaar2 (lane 1-11) and Aaaf5/Aaar2 (lane 12-22). Lane M, DNA Bio-100 marker; lane 1 and 22, negative control (ddH₂O); lane 2 and 21, *Pseudomonas cichorii* 12682; lane 3 and 20, *P. syringae* pv. *glycinae* P154; lane 4 and 19, *P. syringae* pv. *phaseolicola* P343; lane 5 and 18, *P. syringae* pv. *pisi* P11; lane 6 and 17 *P. syringae* pv. *tomato* P133; lane 7 and 16, *A. avenae* subsp. *avenae* CH12; lane 8 and 15, strain Aa4 from turmeric; lane 9 and 14, strain Aa5 from turmeric; lane 10 and 13, strain Aa8 from turmeric; lane 11 and 12, strain Aa9 from turmeric.

表二、薑黃葉枯病菌之脂肪酸組成分析

Table 2. Cellular fatty acid analysis of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* from bacterial leaf blight of turmeric

Fatty acid	Aa5	Aa9
10 : 0	0.35	0.40
10 : 0 3OH	3.78	3.95
12 : 0	2.32	2.70
12 : 1 3OH	0.15	—
12 : 0 2OH	—	—
12 : 0 3OH	0.13	—
14 : 0	2.20	2.55
14 : 0 2OH	—	—
Unknown 14.263	—	—
Unknown 14.502	—	—
Sum In Feature2 (14 : 0 3OH/16 : 1 ISO I)	0.69	0.31
Sum In Feature3 (16 : 1 w7c/15 iso 2OH)	39.88	41.63
16 : 00	33.03	33.21
17 : 0 CYCLO	0.88	1.02
17 : 00	0.21	0.24
16 : 0 3OH	0.08	0.06
18 : 1 w7c	15.39	13.33
18 : 00	0.37	0.28
11 methyl 18 : 1 w7c (un 18.846/19 : 1 w6c)	0.21	0.14
Sum In Feature 7	—	0.06
Sim Index	0.902	0.903
Result from data base	<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>

果(表三),其中又以四環黴素之藥劑效果最佳,其抑制效果依序為四環黴素、歐索林酸、嘉賜黴素、鏈四環黴素、嘉賜銅、多保鏈黴素、鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、三元硫酸銅及鋅錳滅達樂等。

討 論

已知薑黃病害包含真菌性的黑斑病及炭疽病,細菌性的斑點病及青枯病等^(15, 17)。但在台灣薑黃尚未有任何病害之文獻,本研究於南投縣名間及草屯等地區栽培之薑黃植株上分離所得之細菌經柯霍氏法則確認為病原菌之後,初步依 Jones 等⁽¹⁶⁾ 及 Willems 等人⁽³⁵⁾ 所述進行各項生理生化性質測定,顯示該病原細菌在分類上應為 *Acidovorax* 屬的細菌。以穿透式電子顯微鏡觀察發現此病原菌大部分為單極生一根,少部份有二~三根鞭毛,與前人研究所提及 *Acidovorax* spp. 是具有單極生一根,偶有二根鞭毛之特性相同^(3, 12, 35)。徐等人指出 *A. avenae* subsp. *avenae* 菌株的特性與本研究結果(表一)大致相同^(8, 12, 18, 22)。再以 Biolog 鑑定系統測試

分離自薑黃的病原菌,結果與 *A. avenae* subsp. *avenae* 相似值在 0.735~0.870 之間。Gardan 研究 *A. avenae* subsp. *avenae* 菌株的脂肪酸組成,以 C16 : 1W7C (42.9%)、C16 : 0 (32.2%) 及 C18 : 1W7C (15.9%) 三種脂肪酸含量最高^(6, 7),與本研究分析薑黃菌株的結果相同(表二),由脂肪酸組成鑑定結果也顯示供試薑黃菌株為 *A. avenae* subsp. *avenae*。將薑黃菌株劃線培養至 SPA 選擇性培養基上,結果顯示供試薑黃菌株在 SPA 上形成中央微白色,有光澤之藍色圓形菌落,與已知 *A. avenae* subsp. *avenae* 菌落特性相同。綜合上述生理生化, Biolog, 脂肪酸分析及 SPA 培養特性等結果初步確認分離自薑黃之病原菌為 *A. avenae* subsp. *avenae*。

Song 等^(25, 27) 針對 *A. avenae* 設計多組引子對,以 nested-PCR 方法進行鑑定,其原理是針對目標基因區域設計兩對引子,其中一對是針對 *Acidovorax* 屬菌株所設計之外圍引子 Aaaf3/Aaar2 和另一對針對 *A. avenae* subsp. *avenae* 菌株所設計之內圍引子 Aaaf5/Aaar2,共進行二次 PCR,此方法與傳統 PCR 比較,nested-PCR 具較佳之專一性及靈敏度,但相對的其缺點為容易污染,因此實驗過程須特別小心^(10, 30, 32)。nested-PCR 分析結果顯示供試薑黃菌株與已知為 *A. avenae* subsp. *avenae* CH12 玉米條斑病菌株,在第一次以 Aaaf3/Aaar2 引子對進行 PCR 時均可在 262 bp 處形成條帶(圖二~三),而其他供試 *Burkholderia* 屬(圖二)及 *Pseudomonas* 屬的 DNA(圖三)則均未在 262 bp 處產生條帶,確定供試薑黃菌株屬 *Acidovorax* 屬。繼而以第一次 PCR 之產物為模版加入 Aaaf5/Aaar2 引子對進行第二次 PCR,供試薑黃菌株及已知為 *A. avenae* subsp. *avenae* 菌株 CH12 均可增幅出 241 bp 之專一性條帶(圖二~三),而 *Burkholderia* 屬(圖二)及 *Pseudomonas* 屬(圖三)內的供試 DNA 在第二次 PCR 反應則未產生任何條帶,確定供試薑黃菌株為 *A. avenae* subsp. *avenae*。

Willems 等人⁽³⁵⁾ 指出, *Acidovorax* 屬內包含 *A. avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *cattleyae*、*A. avenae* subsp. *citrulli* 及 *A. konjaci* 等 4 種植物病原菌, *A. avenae* subsp. *cattleyae* 主要感染蘭花,造成褐斑病⁽²⁾, *A. avenae* subsp. *citrulli*, 主要感染瓜類,造成果斑病^(29, 34), *A. konjaci*, 曾感染天南星科蒟蒻芋,造成葉斑病⁽⁹⁾, *A. avenae* subsp. *avenae* 主要感染單子葉植物⁽⁴⁾, 在水稻上引起細菌性葉斑病及條斑病^(24, 31), 在玉米上引起細菌性葉斑病、斑點病、條斑病及莖腐病^(12, 21, 28), 在燕麥、甘蔗及小米上引起細菌性條斑病及斑點病等^(8, 18, 19), 其典型病徵通常在植株上產生水浸狀、紅棕色條斑

表三、各種農藥在不同濃度對薑黃病菌之生長抑制效果

Table 3. Growth inhibition of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* strains by various agrochemicals at different concentrations

Chemical	Concentration (ppm)	No. of strains Inhibited / No. of strains tested	Inhibition zone (diameter in cm)
Tetracycline (30.3% SP)	200	4/4	1.70-3.07
	400	4/4	2.10-3.33
	600	4/4	2.23-3.53
Streptomycin (12.5% S)	100	4/4	0.83-1.13
	200	4/4	0.93-1.33
	400	4/4	1.10-1.43
Streptomycin +Tetracycline (10% SP)	100	4/4	1.20-1.50
	200	4/4	1.60-1.77
	400	4/4	1.77-2.03
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8% WP)	500	4/4	0.87-1.13
	1000	4/4	1.07-1.30
	1500	4/4	1.27-1.50
Kasugamycin (2% S)	100	4/4	1.27-1.50
	200	4/4	1.53-1.93
	400	4/4	1.87-2.50
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3% WP)	500	4/4	1.03-1.20
	1000	4/4	1.23-1.50
	1500	4/4	1.47-1.80
Copper oxychloride (85% WP)	1000	4/4	0.60-0.97
	1500	4/4	0.63-1.03
	2000	4/4	0.70-1.13
Copper hydroxide (77.0% WP)	1000	4/4	0.70-0.97
	1500	4/4	0.83-1.07
	2000	4/4	0.97-1.13
Tribasic Copper sulfate (27.12% SC)	1000	4/4	0.20-0.37
	1500	4/4	0.23-0.57
	2000	4/4	0.40-0.77
Oxolinic acid (20% WP)	1000	4/4	1.90-2.77
	1500	4/4	1.93-2.83
	2000	4/4	2.17-2.87
Ridomil MZ (58% WP)	1000	2/4	0.17-0.33
	1500	3/4	0.37-0.43
	2000	3/4	0.47-0.53

及葉斑，初期為橢圓形灰白色斑點，漸形成紅色邊緣病斑，最後形成紅色長條斑，部份形成水浸狀壞疽帶^(8, 12, 16, 35)，在臺灣 *A. avenae* subsp. *avenae* 曾引起玉米細菌性條斑病⁽¹²⁾ 及粟褐條斑病⁽²⁰⁾，但尚無感染薑黃的報告。本研究於南投縣名間及草屯等地區栽培之薑黃植株上發現褐斑，並沿著葉脈擴散，周圍伴隨黃化，最後整個葉片枯萎，由其病徵定名為薑黃葉枯病 (bacterial leaf blight of turmeric)。此病原菌可感染水稻及玉米，並在植株上形成紅褐色條斑，與徐等人報導的結果相似^(12, 22)。

在藥劑測試中發現，所有藥劑均能抑制薑黃葉枯病菌之生長，依照抑制效果之順序為四環黴素、歐索林酸、嘉賜黴素、鏈四環黴素、嘉賜銅、多保鏈黴

素、鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氯氧化銅、三元硫酸銅及鋅錳滅達樂等，顯示含鏈黴素或四環黴素以及含銅類之藥劑具有抑制薑黃葉枯病菌生長的效果，而所有藥劑中又以四環黴素效果為最佳，可提供日後防治參考。

引用文獻

1. Adaskaveg, J. E. and Hine, R. B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 69: 993-996.
2. Ark, P. A. and Thomas, H. E. 1946. Bacterial leaf spot and bud rot of orchids caused by *Phytomonas*

- cattleyae*. Phytopathology 36: 695-698.
3. Bradbury, J. F. 1986. Pages 116-117 in: Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International, Farnham Royal, Great Britain 332pp.
 4. Che, F. S., Iwano, M., Tanaka, N., Takayama, S., Minami, E., Shibuya, N., Kadota, I. and Isogai, A. 1999. Biochemical and morphological features of rice cell death induced by *Pseudomonas avenae*. Plant Cell Physiol. 40: 1036-1045.
 5. Chen, H. E. and Tsai, P. L. 1975. Studies on the Natural coloring matters of horticultural crops. 3. Some properties of yellow natural color in curcuma rhizome and its application. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 21: 242-248. (Taiwan, R. O. C.)
 6. Cottyn, B., Van Outryve, M. F., Cerez, M.T., De Cleene, M., Swing, J. and Mew, T.W. 1996. Bacterial disease of rice. II. Characterization of pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. Plant Dis. 80: 438-445.
 7. Gardan, L., Stead, D. E., Dauga, C. and Gillis, M. 2003. *Acidovorax valerianellae* sp. nov., a novel pathogen of lamb's lettuce [*Valerianella locusta* (L.) Laterr.]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 795-800.
 8. Gitaitis, R., Wilson, J., Walcott, R., Sanders, H. and Hanna, W. 2002. Occurrence of bacterial stripe of pearl millet in Georgia. Plant Dis. 86: 326.
 9. Goto, M. 1983. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the causal agent of bacterial leaf blight of konjac (*Amorphophalus konjac* Koch.) Int. J. Syst. Bacteriol. 33:539-545.
 10. Grote, D., Olmos, A., Kofoet, A., Tuset, J. J., Bertolini, E. and Cambra, M. 2002. Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple and nested PCR. Eur. J. Plant. Pathol. 108: 197-207
 11. Horota, M., Yano, K. and Tsuchiya, K. 2004. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* race 4 strains. J. Gen. Plant. Pathol. 70:278-283.
 12. Hsu, S. T., Chang, R. J., Tzeng, K. C. and Leung, L. K. 1991. Occurrence of bacterial stripe of corn in Taiwan. Plant Prot. Bull. 33: 376-383. (Taiwan, R. O. C.)
 13. Hu, M. F. 1995. *Curcuma longa* Linn. Pages 276-277. in: Taiwan agriculture encyclopedia. Vol. 2. Harvest Farm Magazine of non-profit organization, Taipei, 926 pp. (Taiwan, R. O. C.)
 14. Hu, M. F., Tsai, S. J., Chang, I. F. and Liu, S. Y. 2003. Effect of combined chicken compost and chemical fertilizer application on the yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.). J. Agric. Res. China. 52: 334-340. (Taiwan, R. O. C.)
 15. Huang, C., Zhang, Z. G., Huang, R. M. and Song, B. A. 2002. Investigations of disease of important medical plants in Guizhou Province. Pesticides. 41: 6-9. (in Chinese)
 16. Jones, J. B., Gitaitis, R. D. and Schaad, N. W. 2001. *Acidovorax* and *Xylophilus*. Pages 121-138. in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition APS, St. Paul, Minnesota, USA, 373 pp.
 17. Maringoni, A. C. 2003. First report of *Pseudomonas cichorii* on turmeric (*Curcuma longa*) in Brazil. Plant Pathol. 52: 794.
 18. Mudingotto, P. J. 2002. First report of bacterial blight caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* associated with finger millet seeds from Uganda. Plant Pathol. 51:396.
 19. Nishiyama, K., Nishiharan, N. and Ezuka, A. 1979. Bacterial brown stripe of ragi caused by *Pseudomonas alboprecipitans*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45: 25-31.
 20. Okabe, N. 1934. Bacterial disease of plant occurring in Formosa IV. J. Soc. Trop. Agr. 6: 54-63.
 21. Pataky, J. K., du Toit, L. J. and Kerns, M. R. 1997. Bacterial leaf blight on shrunken-2 sweet corn. Plant Dis. 81:1293-1298.
 22. Ramundo, B. A. and L. E. Claflin. 1990. Demonstration of synonymy between the plant pathogens *Pseudomonas avenae* and *Pseudomonas rubrilineans*. J. Gen. Microbiol. 136:2029-2033.
 23. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Pages 199-204 in: Methods in Phytobacteriology. Z. Klement, K. Rudolph, and D. C. Sands eds. Akademiai Kiado, Budapest, 568 pp.
 24. Shakya, D. D., Vinther, F. and Mathur, S. B. 1985. Worldwide distribution of bacterial stripe pathogen of rice identified as *Pseudomonas avenae*. Phytopath Z. 111: 256-259.
 25. Song, W. Y., Kim, H. M., Hwang, C. Y. and Schaad, M. W. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. J. Phytopathol. 152:667-676.
 26. Song, W. Y., Kang, M. H. and Kim, H. M. 2000. A new selective medium for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in rice seeds. Plant. Pathol. J. 16:236-241.
 27. Song, W. Y., Hatziloukas E., Kim, H. M. and Schaad, N. W. 1997. Development of PCR primers for detection of *Pseudomonas avenae*. Phytopathology 87: S92.
 28. Ummer, D. R. and Schaad, N. W. 1977. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of corn (*Pseudomonas avenae*). Phytopathology 67: 1113-1118.

29. Sung, P. F. 1999. The polymerase chain reaction technique for identification and detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Graduate Institute of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Master Thesis 41 pp. (Taiwan, R. O. C.)
30. Takahashi, T. and Nakayama, T. 2006. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. J. Clin. Microbiol. 44: 1029-1039.
31. Tominaga, T., Kimura, K., and Goh, N. 1983. Bacterial brown stripe of rice in nursery box, caused by *Pseudomonas avenae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 49: 463-466.
32. Tsai, H. L., Huang, L. C., Ann, P. J. and Liou, R. F. 2006. Detection of orchid *Phytophthora* disease by nested PCR. Botanical Studies 47: 379-387.
33. Tsuchiya, K., Yano, K., Horita, M., Morita, Y., Kawada, Y. and d'Ursel, C. M. 1999. Occurrence of bacterial wilt of ginger in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65:363.
34. Webb, R. E. and Goth, R. W. 1965. A seedborne bacterium isolated from watermelon. Plant Dis. 49: 818-821.
35. Willems, A. and Gillis, M. 2005. Family IV. Genus II *Acidovorax*. Pages 696-703 in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Part C. G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Boone, P. De Vos, M. Goodfellow, F. A. Rainey, and K. Schleifer eds. Springer, New York, USA, 1388 pp.
36. Yano, K., Kawada, Y., Tsuchiya, K. and Horita, M. 2002. First report of bacterial wilt of mioga (*Zingiber mioga*) caused by *Ralstonia solanacearum* in Japan. Japan J. Phytopathol. 68:94 (abstract).

ABSTRACT

Hseu, S. H.¹, Sung, C. J.¹, Gao, R. L.², Chen, B. S.¹ and Lin, C. Y.^{1,3} 2008. Occurrence of leaf blight of turmeric caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 17: 43-52 (¹Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, ²Biotechnology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC., ³Corresponding author, E-mail: cylin@wufeng.tari.gov.tw)

Irregular browning lesions were seen at the leaf margins of turmeric plants cultivated in Minjeng and Tstun of NanTou county in the summer of 2006 in Taiwan. Water-soaked lesions first appeared at leaf hydathodes; as the disease progressed, necrotic lesions surrounded by a yellowish halo spread along the veins and eventually led to blighted plants. The same symptoms were also found on leaf sheath and finally the plant wilted. A gram-negative, rod-shaped bacterium was constantly isolated from the diseased tissues and identified as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* based on its physiological and biochemical characteristics, the Biolog GN MicroPlate Identification System, fatty acid analysis, and pathogenicity tests. The isolated bacteria were further confirmed by nested-PCR with Aaaf3/Aaar2 and Aaaf5/Aaar2 primers. According to the symptoms on the turmeric plants, the disease was designed as a baitenal leaf blight of turmeric. *In vitro* screening for the efficacy of various agrochemicals to inhibit the growth of *A. avenae* subsp. *avenae* on nutrient agar (NA) showed that all tested chemicals, including copper bacteriocides, antibiotics, oxolinic acid, and carbamates, were effective, and antibiotic tetracycline was the most effective.

Key words: turmeric, bacterial leaf blight, agrochemical screening