

Xanthomonas campestris pv. *armoraciae* 引起之辣根細菌性葉斑病

許秀惠¹ 宋嘉仁¹ 陳美德¹ 高瑞隆² 郭克忠^{3,4}

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 生物技術組

³行政院農委會動植物防檢疫局 植物檢疫組

⁴聯絡作者：kckuo@mail.baphiq.gov.tw

接受日期：中華民國 98 年 8 月 31 日

摘要

許秀惠、宋嘉仁、陳美德、高瑞隆、郭克忠. 2009. *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* 引起之辣根細菌性葉斑病. 植病會刊 18: 145-154.

民國 96 ~ 97 年間，於嘉義縣太保市及六腳鄉等二處隔離試種栽培之辣根植株上發現初期葉片出現淡褐色或褐色的不規則型斑點，病斑擴大呈淡褐色，隨後病斑癒合且組織變薄，偶有破裂的現象，嚴重時整個葉片呈淡褐色或褐色乾枯，若發生於葉脈時，則呈現條狀褐色壞疽，病勢擴展並蔓延，最後轉為黑褐色壞疽，嚴重時可擴展至葉片中肋，葉柄，造成壞疽死亡，罹病嚴重時根部外觀完好，但剖開後輸導組織出現黑色壞疽。該病原經柯霍氏法則確認為細菌，由生理生化、Biolog 及脂肪酸鑑定分析結果顯示引起辣根的病病原菌屬於 *Xanthomonas campestris* (Xc)。再由碳源利用及 16S rDNA 定序鑑定分析結果顯示本病原菌為 *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* (Xca)，接種結果顯示該病原主要危害十字花科作物，確認該病害為 Xca 引起之辣根細菌性葉斑病 (bacterial leaf spot of horseradish)。該病原細菌被列為檢疫病原，因此二處隔離試種田已銷毀，並淹水處理。室內測試 10 種商品化藥劑，以鏈四環黴素之效果最佳，其效果依序為鏈四環黴素、歐索林酸、鏈黴素、多保鏈黴素、嘉賜銅、氫氧化銅、鹼性氯氧化銅、三元硫酸銅、鋅錳乃浦及嘉賜黴素。

關鍵詞：辣根，細菌性葉斑病，*Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*，室內藥劑篩選

緒言

辣根 (*Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. & Scherb.)，英文名為 horseradish，屬十字花科 (Brassicaceae)，洋山葵屬，又名西洋山薺菜、山葵蘿蔔，為多年生宿根草本植物，原生東歐及西亞^(7, 13)。辣根的葉、根、種子均可食用，可做為沙拉或調味劑⁽⁷⁾，在醫藥上辣根有抗細菌、防腐、通便、利尿、祛痰等作用，辣根的根含過氧化酵素 (peroxidase)，開發應用於生化檢測、醫藥或醫事檢驗及農業抗蟲、抗菌等^(11, 14, 34)。辣根與山葵同屬於十字花科，但山葵是山葵屬的植物，特徵為香、辛辣味高，顏色鮮明，而辣根所具的辛辣味比山葵更為辛辣，二者具相輔相成之功能，但

山葵生長期需二年，且須種植於較高的緯度，而辣根的生長期短，又不須於高緯度栽植，因此 96 年農業試驗所農藝組從中國大陸引進辣根種苗，分別在嘉義縣太保市及六腳鄉二處園圃試種，進行田間觀察，以評估建立產業之可行性。本研究主要探討辣根試種期間所發生之一未知病害的病徵，病原鑑定，發生生態及初步藥劑篩選結果，以供栽培防治參考。

材料與方法

菌株來源

分別自嘉義縣太保市及六腳鄉等二處辣根隔離試

種栽培區，採回罹病之植株，切取罹病主根、側根及葉柄組織，以 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗 30 秒進行表面消毒，再經三道無菌水漂洗後，置入無菌水中振盪均勻，以移殖環沾取懸浮液，劃線於 PDA (potato dextrose agar) 平板培養基上，置室溫下培養二至三天，挑取單一菌落移至新的 PDA 平板培養基，重覆三次後以 Hr 編號，共得到 50 株菌株，移至 PDA 斜面培養基保存備用。

病原性測定

將分離自辣根之細菌菌株分別培養於 PDA 培養基上，30°C 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_{620}) 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士煙草葉片內，置室溫下觀察有無過敏性反應。另外選取 Hr8、Hr17、Hr24、Hr31 及 Hr45 等為供試菌株，依上述方法製備接種源後，以中肋穿刺法接種辣根植株葉脈，將接種後植株置入 30°C 定溫箱中，以塑膠袋套袋保濕，兩天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵，再從接種之辣根植株病斑中分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

細菌形態及生理生化測定

為了觀察型態及鞭毛，選取 Hr8、Hr17、Hr24、Hr31 及 Hr45 等為供試菌株，室溫下，在 PDA 培養基培養 2 天後，加入少許無菌水，輕輕吸起滴於載玻片上，再加入等量的 2% 錳酸染色液 (PTA, pH 7.5, 含 0.1% Bovine serum albumin)，2 min 後以覆有 formvar 支持膜的銅網沾取，再以濾紙吸乾，置於 Hitachi-7000 的穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope) 觀察細菌形態及鞭毛。並依 Schaad 等⁽³⁰⁾ 及 Saddler & Bradbury 等^(3,27) 所述進行生理生化測定，以鑑定其分類地位。

以 Biolog Identification System 鑑定細菌

選取 Hr8、Hr17、Hr24、Hr31 及 Hr45 等為供試菌株，分別培養於 BUG™ Agar (每升加入 Biolog Universal Growth Agar 57 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 μ l 細菌懸浮液，置於 30°C 下培養 4-24 小時，之後以光譜儀測讀，最後將資料輸入

電腦與 Biolog GN2 資料庫 (Biolog 6.1版) 比對，以鑑定其種屬 (依廠商豐技生物科技股份有限公司指示使用)。

細胞脂肪酸組成分析及鑑定

選取 Hr17 及 Hr45 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，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，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，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，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⁽²⁹⁾。

16S rDNA 定序及鑑定

選取 Hr8、Hr17 及 Hr45，在 PDA 培養基上之單一菌落，以 DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 抽取 genomic DNA 後，用細菌 16S rDNA universal primers f8-27/r1510⁽¹⁹⁾ 進行 PCR 增幅，反應總體積為 50 μ l，分別加入 100 μ M 的 dNTPs、0.5 mM Mg²⁺、0.2 μ M 的引子、0.05 units/ μ l *RealTaq* DNA polymerase 及 1X PCR 反應緩衝液等 (Real Biotech Corporation, ROC)。PCR 增幅條件先以 94°C 反應 5 min，之後進行 94°C 10 sec，55°C 30 sec，70°C 90 sec，共 30 個循環，最後再進行 72°C 5 min 1 個循環。增幅後之產物則以 1.0 ~ 1.5% agarose 進行電泳分析，將所得之片段進行定序 (sequencing)，再將序列以 NCBI (National Center for Biotechnology Information，美國國家生物科技資料中心) 和 SDSC-Biology Workbench (加州大學之聖地牙哥分校高速電腦中心) 之 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

辣根病原細菌寄主範圍測定

供試植物包括甘藍 (*Cabbage, Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.，農友種苗，初秋)、蘿蔔 (*Radish, Raphanus sativus* L.，農友種苗，高雪)、皺葉小白菜 (Chinese mustard, *Brassica chinensis* L. *crispifolius*. 農友種苗)、包心芥菜 (Mustard, *Brassica juncea* var. *capitata* Hort, 農友種苗) 等十字花科作物；辣椒 (Hot pepper, *Capsicum annuum* L. 農友種苗，長香)、番茄 (Tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill.，農藝種苗，神奇 208)、屏東長茄 (Eggplant, *Solanum melongena* L.)、甜椒 (Sweet pepper, *Capsicum annuum* L. var. *grossum* seudt.，農友種苗，藍星 406) 等茄科作物，綠豆 (Green gram, *Vigna radiata* (L.) R. Wilcz.，冠億食品股份有限公司) 及紅豆 (Adsuki Bean, *Vigna angularis*, 日正食品工業股份有限公司) 之豆科作物，胡瓜 (Cucumber, *Cucumis sativus* L.，華實種苗，生科 2 號)、洋香瓜 (Melon, *Cucumis melo* L. 農友種苗，秋華 2 號)、西瓜 (Watermelon, *Citrullus lanatus*.，農友種苗，鳳光) 等葫蘆科作物。選用 Hr8、Hr17、Hr24、Hr31 及 Hr45 等供試菌株，以等比例混菌方式，懸浮於無菌蒸餾水中 (濃度約為 10^8 cfu/ml)，作為接種源，以噴霧接種方法測定不同寄主植物之病原性，並以無菌水接種作為對照組，將接種後植株置入 30°C 定溫箱中，以塑膠袋套袋保濕，兩天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵出現情形。

藥劑感受性測定

利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)⁽¹⁾ 於 NA 培養基上測定供試辣根菌株對不同藥劑不同濃度之感受性。選取 Hr8、Hr17、Hr24、Hr31 及 Hr45 等為供試菌株，各菌株濃度為 10^8 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 0.14 ml 滴於每片濾紙 (直徑 13 mm) 上，之後每皿放置 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°C 下培養 2~3 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 10 種藥劑種類如下，抗生素類藥劑：鏈四環黴素 (Streptomycin Tetracycline, 商品名為枯萎寧，全台公司，10.0% SP)、鏈黴素 (Streptomycin, 商品名為立農黴素，豈農公司，12.5% SL)、多保鏈黴素 (Thiophanate methyl + Streptomycin, 商品名為安達菌，瑞總公司，68.8% WP)、嘉賜黴素 (Kasugamycin, 商品名為加收米，大勝化工，2.0% WP)；含銅劑類藥劑之鹼性氫氧化銅 (Copper oxychloride, 商品名為健果

銅，益欣公司，85.0% WP)、氫氧化銅 (Copper hydroxide, 商品名為果菜多-101, Nufarm Americas, Inc., 77.0% WP)、三元硫酸銅 (Tribasic copper sulfate, 商品名為銅高尚，日產化工公司，27.12% SC)；含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (Mancozeb, 商品名為萬生-200, 杜邦公司，80.0% WP)；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)；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)，各藥劑測試濃度如表三所示。

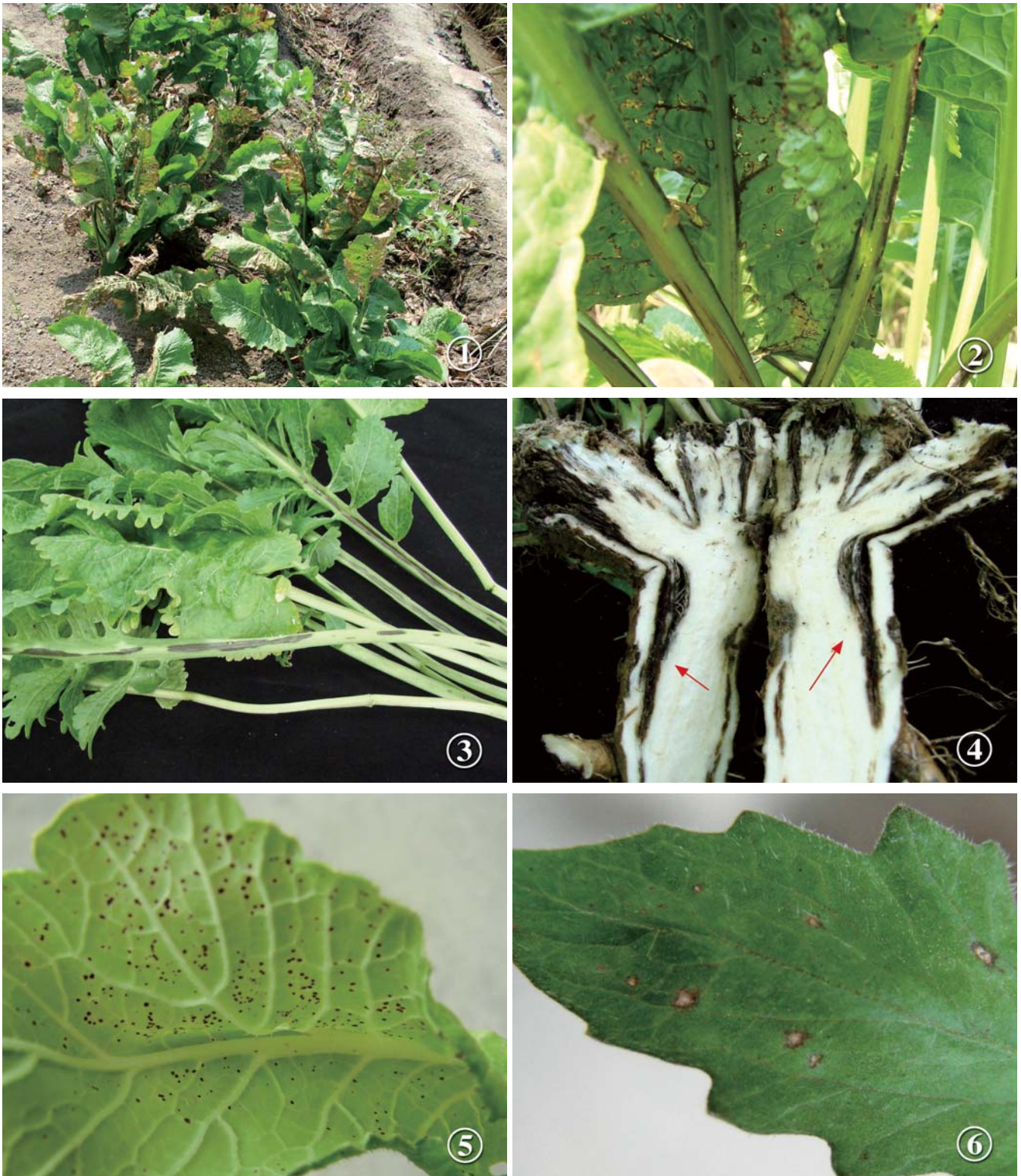
結 果

病徵

罹病辣根初期葉片出現淡褐色或褐色的不規則型斑點，病斑擴大呈淡褐色，隨後病斑癒合且組織變薄，偶有破裂的現象，嚴重時則整個葉片呈淡褐色或褐色乾枯 (圖一、1)，葉片上的病徵若蔓延至葉脈，則呈現條狀褐色壞疽，病勢擴展並蔓延，最後葉脈呈黑褐色壞疽 (圖一、2)，葉脈病徵蔓延至葉片中肋，並擴展至葉柄，則整個葉片中肋及葉柄出現條狀黑褐色壞疽 (圖一、3)，觀察其根部外觀完好，但剖開後輸導組織出現黑色壞疽 (圖一、4)。將分離所得之病原菌菌株，注射接種至萬國土煙草葉片內，室溫下 24 hr 後逐漸形成過敏性反應，48 hr 後呈現完整壞疽病斑且外圍產生黃暈，以中肋注射方式接種於辣根葉片，於接種 1~2 天後在葉脈出現水浸狀，並沿著葉脈擴散至葉片，7 天後葉脈褐化延伸至葉柄漸產生黑色條斑，30 天後取出辣根植株，剖開其根部同樣發現其內部組織出現黑色條斑，且從接種之植株上可再分離出同種病原菌。

細菌形態及生理生化測定

供試辣根菌株為革蘭氏陰性，好氣菌，通常具 1 根單極生鞭毛之桿狀細菌，在 PDA 培養基上為黃色光滑、具黏稠狀菌落，在 NA 及 YDC (yeast extract-dextrose- CaCO_3) 培養基上為黃色菌落，具有觸酶活性 (catalase)，具有澱粉及七葉樹苷水解作用 (esculin hydrolysis)，可於 35°C 生長，不具有 Kovacs' 氧化酶，KB 培養基上不產生螢光，上述結果顯示供試菌株與 *Xanthomonas campestris* (Xc) 之生理生化特性相同 (表一)。進一步探討及碳源利用，發現供試辣根菌株可利用丙氨酸、D-丙氨酸、 α -丁酮酸、L-丙氨酸、L-丙氨酸甘氨酸、L-酰胺酸，無法利用 L-阿拉伯糖、D-棉



圖一、辣根細菌性葉斑病之病徵，田間自然感染之病徵 (1) 葉片，(2) 葉片及葉柄，(3) 葉片中肋及葉柄，(4) 縱剖根部之病徵，(5) 蘿蔔葉片接種病徵，(5) 番茄葉片接種病徵。

Fig. 1. Symptoms of bacterial spot of horseradish. (1) field symptoms, (2) close-up view of symptoms on leaves and petioles, (3) petioles showed black streak, (4) vertical section of root showed black necrosis along vascular tissue; (5) symptoms of radish leaf and (6) tomato leaf inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* isolated from bacterial spot of horseradish, respectively.

子糖，上述結果顯示供試菌株與 *X. campestris* 中之 *X. campestris* pv. *armoraciae* (Xca) 之生理生化特性相同 (表一)。

Biolog system 鑑定結果

供試菌株以 Biolog Identification System 24 小時之鑑定結果 Hr8 與 *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) 之相似值為 0.523，Hr17 及 Hr24 與 *X. campestris* pv. *poinsettiiicola* 之相似值為 0.726、0.784，Hr31 與 *X. campestris* pv. *begonia* B 之相似值為 0.572，Hr45 與 *X. campestris* pv. *juglandis* 之相似值為 0.627。

表一、辣根細菌性葉斑病菌之生理生化特性

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* from bacterial spot of horseradish

Item \ isolates	<i>X campestris</i> ^a	Strains from horseradish	Xca ^{a, b}	Xcc ^{a, b}
Gram positive	—	—	—	—
Grows anaerobically	—	—	—	—
Grows aerobically	+	+	+	+
Diffusible pigment on PDA	+	+	+	+
Flagella	1, Polar	1, Polar	1, Polar	1, Polar
Colonies mucoid on YDC	+	+	+	+
Fluores pigment on KB	—	—	—	—
Kovacs' oxidase	—	—	—	—
Urease activity	—	+	—	—
Grows at 35°C	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+
Carbon sources utilized :				
Adonitol	+	+	—	—
Alaninamide	D	+	+	—
Arabinose	+	—	—	+
D-Alanine	D	+	+	—
D-Raffinose	D	—	—	+
D-Sorbitol	+	+	—	—
Glycyl-L-aspartic acid	D	—	+	—
Glucose-1- phosphate	D	—	+	—
DL- α -Glucose phosphate	D	—	+	—
α -Ketobutyric acid	D	+	+	—
L-Alanine	D	+	+	—
L-Alanyl-glycine	D	+	+	—
L-Aspartic acid	D	—	+	—
L-Threonine	D	+	+	—
Melibiose	+	+	—	—
Pathogenicity on:				
Tobacco HR	+	+	+	+

In Table 1, except specifically stated, +: indicated positive reaction, and —: indicated negative reaction, D: different reactions occur in different taxa (e.g., species of a genus or genera of family)

^aData from Schaad, *et al.*, 2001. and Saddler, *et al.*, 2005.; ^bData from Mihail, *et al.*, 1993.

脂肪酸分析之鑑定結果

供試辣根菌株 Hr17 及 Hr45 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 *X. campestris* pv. *campestris*，其相似值依序為 0.370 及 0.312 (表二)。

16S rDNA 定序及鑑定

以對細菌 16S rDNA 具專一性之引子對 f8-27/r1510 進行 PCR 增幅與 DNA 定序分析，再將所得序列以 BLAST 程式搜尋 NCBI 和 SDSC-Biology

Workbench database之相似序列，結果顯示 Hr8、Hr17 及 Hr45 與 *X. campestris* pv. *armoraciae* (GenBank accession number EU089711 for *X. campestris* pv. *armoraciae* strain NCPPB 3471 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)，序列相似度 (identity) 達 99%。

辣根病原細菌對不同寄主植物之病原性測試

供試辣根病原細菌接種甘藍、蘿蔔、小白菜、芥菜等十字花科作物及茄科作物中之番茄，結果均產生葉斑的病徵，其餘供試茄科、豆科及葫蘆科植物則不受感染(表三)。十字花科作物接種 2~3 天後，葉緣水孔出現水浸狀病斑，隨著病勢發展 7 天後葉部出現暗褐色周圍具黃暈病斑，14 天後病斑聚集產較大不規則褐化病斑，且病徵不受葉脈限制，後期病斑呈淺褐色或灰色斑點，嚴重者葉片乾褐裂化。番茄葉片出現暗棕色斑點周圍具黃暈，後期葉片黃化，嚴重者萎凋。

藥劑感受性測定

供試菌株 Hr8、Hr17、Hr24、Hr31 及 Hr45 對市售 10 種藥劑在一般使用濃度下，感受性測定之結果顯示對辣根病菌之生長均有抑制效果(表四)，其中又以鏈四環黴素之效果最佳，依其抑制效果之順序為鏈四環黴素、歐索林酸、鏈黴素、多保鏈黴素、嘉賜銅、氫氧化銅、鹼性氯氧化銅、三元硫酸銅、鋅錳乃浦及嘉賜黴素。

討 論

辣根不但可做食材⁽⁷⁾，又因根含過氧化酵素(peroxidase)具有醫藥用途，甚至在農業方面也具應用潛力^(11, 14, 34)，因此頗具經濟價值。由國外文獻資料顯示，辣根目前病害包含細菌性的斑點^(13, 22, 37)及根腐病⁽¹³⁾、真菌^(8, 24)及病毒^(9, 10, 26)病害等。本研究於嘉義縣太保及六腳等二處隔離試種田所分離得到之細菌經柯霍氏法則確認為病原菌後，依 Schaad 等⁽³⁰⁾及 Saddler & Bradbury 等⁽²⁷⁾所述進行各項生理生化性質測定，結果與前人研究所提及 *Xanthomonas* spp. 病原菌特性相同^(3, 12, 13, 22, 30, 31)。

本病原進行相關生理生化測試，結果發現辣根菌株具有觸酶、尿素酶活性，可水解澱粉及七葉樹苷，可於 35°C 下生長，不具有 Kovacs 氧化酶活性及螢光色素等特性(表一)，與 *Xanthomonas* 屬中 *X. campestris* (Xc) 菌株的生理生化特性最相近^(3, 27, 30)。再以 Biolog 鑑定系統測試供試辣根病原菌結果也屬於 *X. campestris*，但病原型(pathovar)的分類位置用 Biolog 分析結果則分屬於 *begonia* B 或 *campestris* 或 *juglandis* 或 *poinsettiicola* 等，顯示用 Biolog 鑑定無法確認病原型的種類。進一步分析其脂肪酸組成，鑑定結果為 *X. campestris* pv. *campestris*，其相似值為 0.312~0.370，雖相似值偏低，但分析其脂肪酸組成以 C16:1 w7c、C15:0 iso 及 C15:0 anteiso 三種含量最高，與 Yang⁽³⁹⁾及 Saddler & Bradbury 等⁽²⁷⁾研究 Xc 菌株的脂肪

表二、辣根細菌性葉斑病菌之脂肪酸組成分析

Table 2. Cellular fatty acid analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* isolated from horseradish

Fatty acids	<i>X. campestris</i> ^a	Hr 17	Hr 45
C _{16:0}	3.6	3.2	3.6
C _{15:1 ω8c}	0	0.1	0.1
C _{16:1 ω9c}	0.9	2.0	2.17
C _{16:1 ω7c}	12.7	14.5	14.3
C _{14:0 iso}	0.7	0.9	0.8
C _{15:0 iso}	26.5	19.3	17.2
C _{15:0 anteiso}	13.9	12.1	12.3
C _{16:0 iso}	3.2	5.2	4.7
C _{17:0 iso}	6.8	6.1	5.8
C _{17:0 anteiso}	0.8	0.8	0.9
C _{19:0 iso}	0	—	0.2
C _{15:1 iso G}	0	—	—
C _{17:1 iso ω9c}	8.5	10.6	9.7
C _{16:0 alc}	0	—	—
C _{17:0 cyclo}	0	—	—
Sim Index		0.370	0.312
Result from data base		<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	

^aData from Saddler, et al., 2005. and Yang, et al., 2007.

表三、辣根葉斑病菌對不同寄主植物之病原性測試

Table 3. Pathogenicity test of *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* on different hosts

Tested crops (Family) (Scientific name)	Inoculation results
十字花科 Cruciferae (Brassicaceae)	
甘藍 (Cabbage, <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L. 農友種苗, 初秋)	+
蘿蔔 (Radish, <i>Raphanus sativus</i> L. 農友種苗, 高雪)	+
皺葉小白菜 (Chinese mustard, <i>Brassica chinensis</i> L. <i>crispifolius</i> . 農友種苗)	+
包心芥菜 (Mustard, <i>Brassica juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort, 農友種苗)	+
茄科 Solanaceae	
辣椒 (Hot pepper, <i>Capsicum annuum</i> L. 農友種苗, 長香)	-
番茄 (Tomato, <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 農藝種苗, 神奇 208)	+
屏東長茄 (Eggplant, <i>Solanum melongena</i> L.)	-
甜椒 (Sweet pepper, <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>grossum</i> seudt. 農友種苗, 藍星 406)	-
豆科 Fabaceae	
綠豆 (Green gram, <i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilcz.)	-
紅豆 (Adzuki Bean, <i>Vigna angularis</i>)	-
葫蘆科 Cucurbitaceae.	
胡瓜 (Cucumber, <i>Cucumis sativus</i> L. 華實種苗, 生科 2 號)	-
洋香瓜 (Melon, <i>Cucumis melo</i> L. 農友種苗, 秋華 2 號)	-
西瓜 (Watermelon, <i>Citrullus lanatus</i> . (Thund.) Matsumura et Nakai. 農友種苗, 鳳光)	-

+: symptoms = Leaf spot, -: no symptoms

酸組成相同 (表二), 因此由脂肪酸特性也只能確定該病原菌屬於 *X. campestris*。

屬於 *X. campestris* 的病原型 (pathovar) 多達六十多種^(27, 32), 台灣已知的病原細菌包括 *X. campestris* pv. *campestris* (引起的十字花科黑腐病)⁽¹⁸⁾、*X. campestris* pv. *coriandri* (引起的香菜細菌性葉枯病)⁽¹⁶⁾、*X. campestris* pv. *incanae* (引起之紫羅蘭細菌性萎凋病)⁽³⁸⁾ 及 *X. campestris* pv. *zantedeschiae* (引起之白色海芋細菌性葉斑病)⁽¹⁵⁾ 等。進一步探討其碳源利用, 1993 年 Mihail⁽²³⁾ 對 *X. campestris* pv. *armoraciae* (Xca) 及 Xcc 進行碳源利用之結果比對, 發現其中 Xca 可利用丙氨酸、D-丙氨酸、 α -丁酮酸、L-丙氨酸、L-丙胺醯甘氨酸、L-酰胺酸, 無法利用阿拉伯糖、D-棉子糖等特性與本研究供試之辣根菌株相近 (表一)。另外從 16S rDNA 定序及鑑定結果, 顯示該病原菌與 NCBI 等基因庫中 Xca 序列相似度達 99%。因此綜合各項試驗、碳源利用及 16S rDNA 等結果推測分離自辣根之未知病原菌可能為 *X. campestris* pv. *armoraciae*。

以 *X. campestris* 不同病原型的菌株接種十字花科作物, 主要產生二大類病徵, 其中一種主要由 Xcc 引起的黑腐病^(2, 4), 其病徵多從葉緣開始逐漸蔓延, 呈 V 字型黑腐病害, 會造成系統性感染; 另一種由 Xca 或 *X. campestris* pv. *raphani* 等引起的葉斑病^(3, 4, 40), 通常造成葉斑病徵, 但不會造成系統性病害^(3, 4, 21, 40)。由文獻可知感染十字花科作物的包含 *X. campestris* pv. *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*,

raphani 及 *incanae* 等^(17, 33, 35), 而 *X. c.* pv. *armoraciae* 主要危害十字花科作物, 包括辣根⁽²²⁾、蘿蔔^(28, 36) 及甘藍^(21, 25) 等, 為確認供試辣根病原菌之病原型 (pathovar), 進一步進行接種試驗, 結果顯示該病原菌主要感染甘藍、蘿蔔、小白菜、芥菜等十字花科作物, 產生暗褐色, 周圍具黃暈葉斑病徵, 後期病斑聚集產生較大不規則淺褐色或灰色斑點, 病徵不受葉脈限制, 與 McCulloch⁽²²⁾、White⁽³⁷⁾、Zhao 等⁽⁴⁰⁾、Sahin & Miller 等⁽²⁸⁾、Pernezny⁽²⁵⁾ 及 Zhao 等⁽⁴⁰⁾ 所得結果相同。除此以外, 本病原也可感染茄科作物中之番茄, 產生環狀內圈亮褐色, 外圈暗棕褐色斑點, 且病斑外圍具水浸狀之葉斑病徵, 與 White⁽³⁷⁾ 及 Zhao 等⁽⁴⁰⁾ 的結果相似。因此由各項鑑定及接種結果可以確認供試辣根病原菌為 *X. campestris* pv. *armoraciae*, 與國外已知之辣根細菌性葉斑病 (bacterial leaf spot of horseradish) 為相同的病害。

X. campestris pv. *armoraciae* 引起之辣根細菌性病害, 依植物防疫檢疫法已被列為有條件輸入之病害, 依據 CABI 摘要的記載⁽⁶⁾ Xca 危害辣根在全世界的分佈地圖包含的地區或國家頗多, 如歐洲 (烏克蘭)、亞洲 (中國, 印度, 日本, 土耳其), 非洲 (辛巴威)、北美 (美國, 康乃迪克州, 德拉瓦州, 哥倫比亞州, 佛羅里達州, 伊利諾州, 愛荷華州, 路易斯安那州, 馬里蘭州, 密蘇里州, 北卡羅來納州, 俄亥俄州, 俄克拉荷馬州, 南達科塔州, 德州, 維吉尼亞州)、南美 (巴西)、大洋洲 (澳大利亞) 等, 所以由這些地區進口相關

表四、各種農藥在不同濃度下對辣根細菌性葉斑病生長之抑制效果

Table 3. Efficacy of different pesticides on the growth of *Xanthomonas campestris* pv. *armoracia*

Chemical	Concentration (ppm)	No. of strains Inhibited / No. of strains tested	Inhibition zone (diameter in cm)
Streptomycin (12.5% S)	100	5/5	1.07-1.27
	200	5/5	1.13-1.37
	400	5/5	1.33-1.60
Streptomycin+Tetracycline (10% SP)	100	5/5	1.60-1.73
	200	5/5	2.10-2.23
	400	5/5	2.23-2.47
Thiophanate methyl+ Streptomycin (68.8% WP)	500	5/5	0.93-1.20
	1000	5/5	1.10-1.30
	1500	5/5	1.23-1.47
Kasugamycin (2% S)	100	4/5	0.10-0.43
	200	5/5	0.07-0.93
	400	5/5	0.43-1.07
Kasugamycin+ Copper oxychloride (81.3% WP)	500	5/5	0.67-1.10
	1000	5/5	0.93-1.33
	1500	5/5	0.97-1.47
Copper oxychloride (85% WP)	1000	5/5	1.00-1.27
	1500	5/5	1.07-1.27
	2000	5/5	1.13-1.30
Copper hydroxide (77.0% WP)	1000	5/5	1.20-1.37
	1500	5/5	1.30-1.40
	2000	5/5	1.40-1.43
Tribasic copper sulfate (27.12%SC)	1000	5/5	0.97-1.13
	1500	5/5	1.03-1.27
	2000	5/5	1.17-1.30
Oxolinic acid (20% WP)	100	5/5	0.93-1.67
	200	5/5	1.03-1.73
	400	5/5	1.17-1.80
Mancozeb (80.0% WP)	1000	5/5	0.50-1.13
	1500	5/5	0.60-1.23
	2000	5/5	0.80-1.30

種苗需特別留意種苗的清潔度，以防範不當的病原菌被傳入台灣。

藉由國與國之間的貿易往來或引種，有可能將具危險性的植物疫病蟲害傳入國內，進而對我國的農業造成衝擊⁽⁵⁾，如木瓜輪點病每年造成 4.5 億元的損失，香蕉黃葉病每年造成 2 億元的損失，因此對於有害生物輸入的管控非常重要。依據植物防疫檢疫法第十六條第二項規定，對於輸入台灣之植物或植物產品經檢疫有罹染有害生物之虞時，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局得實施隔離檢疫。在嘉義的試種田係依上述規定隔離試種，但因栽培期間發現本病害，所以試種田於 97 年四月間耕除，並施以淹水處理，以避免病

害擴散。初步於室內進行病原菌生長的藥劑測試，發現所有藥劑均能抑制辣根葉斑病菌之生長，而且抗生素類藥劑抑制效果優於銅類藥劑，所有藥劑中以鏈四環黴素效果最佳。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

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. Alvarez, A. M., Benedict, A. A., Mizumoto, C. Y., Hunter, J. E., and Gabriel, D. W. 1994. Serological,

- Pathological, and Genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84:1449-1457.
3. Bradbury, J. F. 1984. Genus II. *Xanthomonas*. Pages 199-210 in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. N. R. Krieg, and J. G. Holt, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 964 pp.
 4. Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C. A. B. International, U. K. 332 pp.
 5. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. 2007. Plant Pest Information Monitoring and Reporting System. Retrieved July 19, 2009, from brief introduction of important plant pests on the world wide web: <http://www.baphiq.gov.tw//ct.asp?xItem=264&ctNode=1438&mp=1> (in Chinese).
 6. Commonwealth Mycological Institute. 2006. Distribution Maps of Plant Disease No.993 (edition 1). *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*. CAB International, UK.
 7. Courter, J. W., and Rhodes, A. M. 1969. Historical notes on horseradish. *Econ. Bot.* 23:156-164.
 8. Eastburn, D. M., and Chang, R. J. 1994. *Verticillium dahliae*: A casual agent of root discoloration of horseradish in Illinois. *Plant Dis.* 74: 496-498.
 9. Eastman, C. E., Schultz, G. A., Hemmati, K., and Oldfield, G. N. 1984. Virescence of horseradish in Illinois. *Plant Dis.* 68: 968-971.
 10. Eiras, M. C., Alexandre, L. R., Colariccio, A., and Chagas, C. M. 2007. First report of *turnip mosaic virus* in horseradish in Brazil. *Fitopatol. Bras.* 32: 165.
 11. Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., and Lozniewski, A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 7610-7615.
 12. Hseu, S. H., and Lin, C. Y. 1998. Anthurium bacterial blight in Taiwan and the sensitivity of the pathogen to agrochemical. *Plant Pathol. Bull.* 40: 409-417.
 13. Kadow, K. J., and Anderson, H. W. 1940. A Study of Horseradish Disease and Their Control. 2nd edition. University of Illinois Agricultural Experiment station, USA. 53 pp.
 14. Lampe, J. W., and Peterson, S. 2002. Brassica, Biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *J. Nutr.* 132: 2991-2994.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Lin, C. Y. 1981. Studies on black rot of cruciferous crops caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 23: 157-167. (Taiwan, R. O. C. in Chinese)
 19. Lipson, D. A., and Schmidt, S. K. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the colorado rocky mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2867-2879.
 20. Liu, H. L., and Lee, Y. A. 2006. Disease incidence of coriander bacterial leaf blight-and its control. *Bulletin of Taichung District Agricultural Improvement Station* 92: 1-10. (Taiwan, R. O. C. in Chinese)
 21. Machumd, M., and Black, L. L. 1985. A *Xanthomonas* Leaf spot of crucifers caused by *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*. *Cent. Res. Inst. Food Crops (Bogor, Indones.)* 74: 1-13. (Cited in *Rev. Plant Pathol.* 67: 4170, 1988.)
 22. McCulloch, L. 1929. A bacterial leaf spot of horse-radish caused by *Bacterium campestre* var. *armoraciae*, n. var. *J. Agric. Res.* 38: 269-287.
 23. Mihail, J. D., Taylor, S. J., Verslues, P. E., and Hodge, N. C. 1993. Bacterial blight of *Crambe abyssinica* in Missouri caused by *Xanthomonas campestris*. *Plant Dis.* 77: 569-574.
 24. Percich, J. A., and Johnson, D. R. 1990. A root rot complex of horseradish. *Plant Dis.* 74: 391-393.
 25. Pernezny, K., Jones, J. B., Roberts, P. D., and Dickstein, E. 2003. An outbreak of a leaf spot disease of cabbage in Southern Florida caused by *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*. *Plant Dis.* 87: 873. (Abstr.)
 26. Richins, R. D., and Shepherd, R. J. 1986. Horseradish latent virus, a new member of the caulimovirus group. *Phytopathology* 76: 749-754.
 27. Saddler, G. S., and Bradbury, J. 2005. Family I. Xanthomonadaceae *fam. nov.* Pages 63-90 in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part C. Springer. N. Y, USA. 1388 pp.
 28. Sahin, F., and Miller, S. A. 1997. A new pathotype of *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* that causes bacterial leaf spot of radish. *Plant Dis.* 81: 1334. (Abstr.)
 29. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Pages 199-204 in: *Method in*

- phytobacteriology Akademiai kiado. Budapest. 568 pp.
30. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Lacy, G. H. 2001. G. *Xanthomonas*. Pages 175-199 in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
 31. 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.
 32. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 472-489.
 33. 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: 312-316.
 34. Veitch, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phytochemistry 65: 249-259.
 35. Vicente, J. G., Conway, J., Roberts, S. J., and Taylor, J. D. 2001. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. Phytopathology 91: 492-499.
 36. Vicente, J. G., Everett, B., and Roberts, S. J. 2006. Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. Phytopathology 96: 735-745.
 37. White, H. E. 1930. Bacterial spot of radish and turnip. Phytopathology 20: 653-662.
 38. Wu, Y. F., Chen, S. C., Huang, S. H., and Cheng, A. S. 2007. Bacterial blight of stocks caused by *Xanthomonas campestris* pv. *incanae*. Research Bulletin of Tainan District Agricultural Improvement Station 49: 66-72. (Taiwan, R. O. C. in Chinese)
 39. Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J., and Kersters, K. 1993. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol. 16: 47-71.
 40. Zhao, Y. F., Damicone, J. P., Demezas, D. H., and Bender, C. L. 2000. Bacterial leaf spot disease of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. Plant Dis. 84: 1008-1014.

ABSTRACT

Hseu, S. H.¹, Sung, C. J.¹, Chen, M. T.¹, Gao, R. L.², and Kuo, K. C.^{3,4} 2009. Occurrence and identification of bacterial leaf spot of horseradish. Plant Pathol. Bull. 18: 145-154. (¹ Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, ² Biotechnology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC., ³ Plant Quarantine Division, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Taipei, Taiwan, ⁴ Corresponding author, E-mail: kckuo@mail.baphiq.gov.tw)

An unknown leaf spot was occurred on horseradish in two experimental trails in Jiayi between 2007-2009. When diseased, the horseradish shows irregular brown flecks on the abaxial surface of the leaves and later these individual lesions coalesce to develop black streaks along veins. Dry, dead tissue may fall off from the lesion giving the leaves a shot hole or tattered appearance. The systemic development of the disease can cause internal necrosis in roots with black streaks on the root surface. The causal agent was identified as *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* based on molecular and physiological evidence. Due to the pathogen is recognized as quarantine pathogen, the produce of these two cultivation trails were totally destroyed and the fields were set fallow. Among ten pesticides screened *in vitro*, antibiotics and oxolinic acid showed better efficacy.

Keywords: horseradish, bacterial leaf spot of horseradish, *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*, agrochemical screening