

# *Herbaspirillum huttiensis* 引起之薑黃葉枯病

許秀惠<sup>1</sup> 宋嘉仁<sup>1</sup> 林俊義<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 行政院農委會農業試驗所 植物病理組

<sup>2</sup> 亞洲大學 健康學院

<sup>3</sup> 聯絡作者，電子郵件：yihlin@asia.edu.tw

接受日期：中華民國 97 年 9 月 26 日

## 摘要

許秀惠、宋嘉仁、林俊義. 2009. *Herbaspirillum huttiensis* 引起之薑黃葉枯病. 植病會刊 18: 13-22.

2006 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由 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 引起之薑黃葉枯病，同時發現另一病原菌可引起相同的病徵，該病原菌經生理生化特性確認屬於 *Burkholderia* 屬，再以對 *Burkholderia* 屬內不同的病原菌如 *B. andropogonis* (引子對 Pf/Pr)，*B. caryophylli* (引子對 20L/20R、nL/ nR)，*B. cepacia* (引子對 CMG23-1/CM23-2)，*B. gladioli* (引子對 CMG-23-1/G-23-2) 及 *B. glumae* (引子對 1418S/1418A、1419S/1419A) 具專一性之引子對進行 PCR 鑑定，結果均無反應，顯示供試病原菌與已知 *Burkholderia* 屬內的植物病原菌不同，經 Biolog、脂肪酸分析及 16S rDNA 等分析結果顯示該病原菌為 *Herbaspirillum huttiensis*。供試 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，顯示除鋅錳滅達樂對該病菌之生長無抑制作用外，其餘供試藥劑均能抑制此病原菌之生長，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、鏈四環黴素、嘉賜黴素、嘉賜銅、多保鏈黴素、鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、歐索林酸及三元硫酸銅。

關鍵詞：薑黃、細菌性葉枯病、聚合酶連鎖反應、藥劑篩選

## 緒言

薑黃 (Turmeric) 在台灣主要栽培品種為鬱金 (*Curcuma 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<sup>(19)</sup>，其成份含薑黃素 (curcumin)、精油、樹脂、蛋白質、纖維素、澱粉和礦物質等，具抗氧化作用，為一常用之中藥材植物<sup>(8, 19, 20)</sup>。在薑黃上已知之細菌性病害包括 *Pseudomonas cichorii* 引起的葉枯病<sup>(25)</sup>，*Pseudomonas* spp. 引起的斑點病及 *Ralstonia solanacearum* 引起的青枯病等<sup>(21)</sup>。在台灣種植的薑黃植株上已發現由 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 引起之薑黃葉枯病<sup>(17)</sup>，但同時在相同病徵之不同病斑上也分離到另一種病原菌，此與 1991 年徐等人<sup>(15)</sup> 在玉米植株同時發現 *A. avenae* subsp. *avenae* (原 *P. avenae*) 及 *Burkholderia andropogonis* (原 *P. andropogonis*) 兩種病原菌均可引起玉米條斑病之情形相同，因此本研究主

要探討該未知病原菌之特性，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植株 (春鬱金及秋鬱金) 組織上具水浸狀，褐斑及黃褐化斑等病徵之樣品，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 Bu 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培養於 NA 斜面上，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 ( $A_{600}$ ) 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 Bu01、Bu07、Bu22 為供試菌株，以無菌水當對照，依上述方法製備接種源後，以噴霧方式接種於薑黃 (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病斑中分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

## 病原菌生理生化測定

選取 Bu01、Bu07 及 Bu22 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% 鎢酸染色液 (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。並依 Schaad 等<sup>(29)</sup> 及 Garrity 等人<sup>(12)</sup> 所述進行生理生化測定，以鑑定其分類地位。

## Biolog Identification System 之細菌鑑定

選取 Bu01、Bu07 及 Bu22 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  $\mu$ 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 Bu01 及 Bu22 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, ddH<sub>2</sub>O 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, ddH<sub>2</sub>O 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<sup>(28)</sup>。

## 16S rDNA 定序及鑑定

選取 Bu01 及 Bu22，在 NA 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<sup>(23)</sup> 進行 PCR 增幅，引子濃度約 1.0 mM，分別加入 PCR 各反應物：10 mM dNTPs, 1 units/  $\mu$ l *RealTaq* DNA polymerase (Real Biotech Corporation, ROC)，以及 5.0  $\mu$ l 10 $\times$  的 PCR 反應緩衝液，總反應體積為 50  $\mu$ l。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。

## 應用 PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR) 鑑定薑黃菌株

選取 Bu1~3、Bu6~7、Bu10~23 等 19 支菌株作為供試菌株及 *Burkholderia* 屬內的植物病原細菌為對照，包括檳榔葉斑病菌 *B. andropogonis*、康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli* (來自興大植病系)、洋蔥細菌性軟腐病菌 *B. cepacia* (購自食工所)、鳳梨果腐病菌 *B. gladioli* 及水稻穀枯病菌 *B. glumae* 等，依 Wang 等<sup>(32)</sup> 之方法略加修改後抽其 DNA，再各取 2  $\mu$ l 作為 DNA 模版。以引子對 Pf/Pr 鑑定 *B. andropogonis* 菌株<sup>(3)</sup>，以 20L/20R 及 nL/ nR 鑑定 *B. caryophylli*<sup>(10)</sup>，以 CMG-23-1/CM-23-2 鑑定 *B. cepacia* 菌株<sup>(6)</sup>，以 CMG-23-1/G-23-2 鑑定 *B.*

*gladioli* 菌株<sup>(6)</sup>，以 1418S/1418A 及 1419S/1419A 鑑定 *B. glumae* 菌株<sup>(14)</sup>，分別進行 PCR 分析。所用引子對增幅後之產物分別以 1.5 % agarose (1×TAE buffer) 之電泳分析 (100 V)，並以 Gen-100 DNA ladder (GeneMark Technology, ROC) 為大小標幟 (size marker)，最後以溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5  $\mu$ g/ml) 染色觀察，並照相記錄。

### 藥劑感受性測定

利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)<sup>(1)</sup> 於 NA 培養基上測定供試分離自薑黃之葉枯病原菌株對不同藥劑不同濃度之感受性。選取 Bu01、Bu07、Bu11、Bu13、Bu15、Bu18、Bu20 及 Bu22 為供試菌株，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 0.1 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°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 種藥劑種類及稀釋濃度如下，抗生素類藥劑：四環黴素 (Tetracycline，商品名為鉑美樹，臺灣氰氨公司，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，商品名為果菜多-101，Nufarm Americas, Inc.，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具水浸狀之不規則型褐斑，病斑多從葉緣水孔開始發生，初呈水浸狀，之後形成褐色斑點，並沿著葉緣擴散，周圍伴隨著黃化，最後葉片枯萎，葉鞘也出現水浸狀及外圍黃化之不規則形褐斑。以病原菌注射接種之萬國土菸草葉片於 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，7~10 天後出現外圍黃化之褐色斑點，並沿著葉緣擴散。此未知病原菌在薑黃植株引起之病徵與 *A. avenae* subsp. *avenae* 引起之病徵相同，但病勢發展較慢。

### 生理生化特性

依 Schaad 等<sup>(29)</sup> 及 Garrity 等人<sup>(12)</sup> 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 1 至 3~4 根單極生鞭毛之桿狀細菌，在 NA 及 PDA 培養基上為白色菌落，在 YDC (yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>) 培養基上培養 2~3 天後仍不產生色素，可於 40°C 生長，具有 Kovacs 氧化酶，可利用山梨糖醇，無法利用蔗糖、纖維素糖，KB 培養基上不具螢光色素，不具有果膠分解酶活性，不具精氨酸二水解酶，無法分解澱粉及白明膠，上述結果顯示供試菌株與 *Burkholderia* spp. 之生理生化特性相近 (表一)。

### Biolog system 鑑定結果

供試薑黃菌株 Bu01、Bu07、Bu22 以 Biolog Identification System 24 小時之鑑定結果與 *Herbaspirillum huttiensis* (舊名為 *Pseudomonas huttiensis*) (*Burkholderia*-like) 之相似值依序為 0.52、0.41、0.27。

### 脂肪酸分析之鑑定結果

供試薑黃菌株 Bu01 及 Bu22 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<sup>®</sup> Microbial Identification System (MIS) 比對，鑑定為 *H. huttiensis*，其相似值依序為 0.961 及 0.625。

## 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 搜尋 NCBI 和 SDSC-Biology Workbench database 之相似序列，結果顯示 Bu01、Bu22 與 *H. huttienensis* DNA for 16S rRNA, strain ATCC 14670T (GenBank accession number AB021366) 序列相似度 (identity) 達 98%。

## 應用 PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR) 鑑定薑黃菌株

應用對 *Burkholderia* 屬內的病原菌具有專一性之引子對進行 PCR，結果顯示供試薑黃菌株與引子對 Pf/Pr (對檳榔葉斑病菌 *B. andropogonis* 具專一性，產生 410 bp 之 DNA 條帶) (圖一、B)，引子對 20L/20R、nL/nR (對康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli* 具專一性，分別產生 500 bp 及 400 bp 之 DNA 條帶) (圖一、B)，引子

對 CMG23-1/CM23-2 (對洋蔥細菌性軟腐病菌 *B. cepacia* 具專一性，產生 388 bp 之 DNA 條帶) (圖一、A)，引子對 CMG-23-1/G-23-2 (對鳳梨果腐病菌 *B. gladioli* 具專一性，產生 388 bp 之 DNA 條帶) (圖一、A)，引子對 1418S/1418A、1419S/1419A (對水稻穀枯病菌 *B. glumae* 具專一性，分別產生 571 bp 及 628 bp 之 DNA 條帶) (圖一、A) 等引子對進行 PCR 皆未形成專一性 DNA 條帶，但供試對照菌株可分別產生專一性條帶，顯示供試菌株不是 *B. andropogonis*、*B. caryophylli*、*B. cepacia*、*B. gladioli* 或 *B. glumae* 等植物病原菌。

## 藥劑感受性

供試 11 種藥劑測試在一般使用濃度下對該病原菌生長之抑制效果，顯示除鋅錳滅達樂對該病原菌之生長無抑制作用外，其餘供試藥劑均能抑制病原菌之生長 (表三)，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、鏈四環黴素、嘉賜黴素、嘉賜

表一、薑黃葉枯病菌之生理生化特性

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of *Herbaspirillum huttienensis* of bacterial leaf blight of turmeric

Character	Strains from turmeric	<i>Burkholderia</i> spp. <sup>a</sup>	<i>H. huttienensis</i> <sup>b</sup>
Gram positive	—	—	—
Grows anaerobically	—	—	—
Grows aerobically	+	+	+
Diffusible pigment on PDA	—	—	—
Colonies mucoid on YDC	—	—	—
Fluores pigment on KB	—	—	—
Kovacs' oxidase	+	+ <sup>c</sup>	+
Urease	+	+	+
Grows at 40°C	+	+ <sup>d</sup>	+
Levan	—	—	—
Flagella	Polar1 or 3 or 4	Polar1 or multitrichous	Polar1 or multitrichous
Arginine dihydrolase	—	— <sup>e</sup>	—
Gel hydrolysis	—	+ <sup>f</sup>	—
Starch hydrolysis	—	— <sup>g</sup>	—
Pectate hydrolysis	—	— <sup>h</sup>	—
Carbon sources utilized for growth:			
Adonitol	+	+	+
Cellobiose	—	+	—
D-Sorbitol	+	+	+
Sucrose	—	— <sup>i</sup>	—
Trehalose	—	+	—
Pathogenicity on:			
Tobacco HR	+		

In Table 1, except specifically stated, + indicated positive reaction, and — indicated negative reaction.

<sup>a</sup>Data from Schaad, N. W., Chun, W. and Jones, J. B. 2001; <sup>b</sup>Data from Leifson, *et al.*, 1962. and Obradovic, *et al.*, 2007.; <sup>c</sup>*B. andropogonis* is oxidase negative.; <sup>d</sup>*B. andropogonis* and *B. glumae* pv. *agricola* are negative.; <sup>e</sup>*B. caryophylli* and *B. glumae* are positive.; <sup>f</sup>*B. caryophylli* and *B. cepacia* are negative.; <sup>g</sup>*B. gladioli* pv. *agricola* are positive.; <sup>h</sup>*B. cepacia* and *B. gladioli* are positive.; <sup>i</sup>*B. andropogonis* and *B. glumae* are negative.

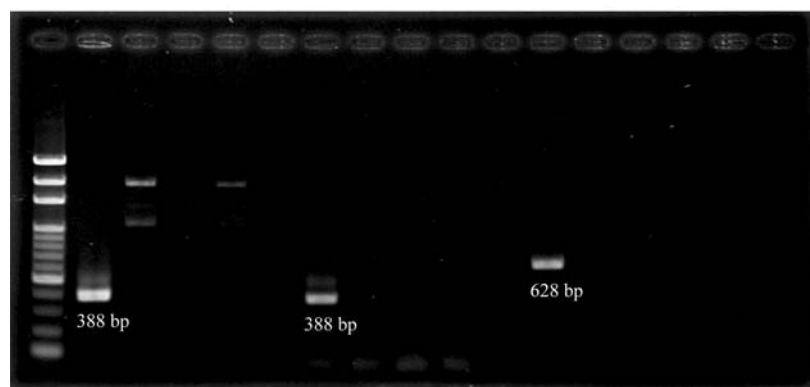
表二、薑黃葉枯病菌之脂肪酸組成分析

Table 2. Cellular fatty acid analysis of *Herbaspirillum huttiensis* of bacterial leaf blight of turmeric

Fatty acid	Bu1	Bu22
10 : 0	0.15	0.24
10 : 0 3OH	1.61	1.50
12 : 0	3.31	3.38
12 : 1 3OH	—	—
12 : 0 2OH	0.34	0.28
12 : 0 3OH	2.85	3.27
14 : 0	0.59	0.58
14 : 0 2OH	2.40	2.08
Unknown 14.263	—	—
Unknown 14.502	—	—
Sum In Feature2 (14 : 0 3OH/16 : 1 ISO I)	—	0.05
Sum In Feature3 (16 : 1 w7c/15 iso 2OH)	36.83	32.03
16 : 00	25.06	25.78
17 : 0 CYCLO	1.47	3.49
17 : 00	0.31	0.30
16 : 0 3OH	—	0.20
18 : 1 w7c	23.40	23.51
18 : 00	1.41	1.74
11 methyl 18 : 1 w7c (un 18.846/19 : 1 w6c)	—	0.27
Sum In Feature 7	—	0.09
Similarity Index	0.961	0.625
Result from database	<i>Pseudomonas huttiensis</i>	<i>Pseudomonas huttiensis</i>

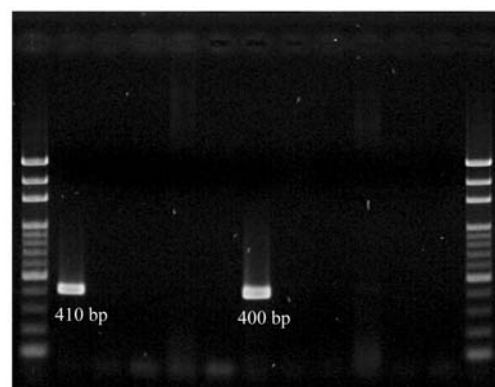
(A)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



(B)

M 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 M



圖一、應用 PCR 鑑定薑黃葉枯病菌。M 為 DNA Bio-100 marker；16，27 為 ddH<sub>2</sub>O 控制組；1-5，以專一性引子對 CMG-23-1/CM-23-2 鑑定 *Burkholderia cepacia*；6-10，以專一性引子對 CMG-23-1/G-23-2 鑑定 *B. gladioli*；11-15，以專一性引子對 1419S/1419A 鑑定 *B. glumae*；17-21，以專一性引子對 Pf/Pr 鑑定 *B. andropogonis*；22-26，以專一性引子對 nL/nR 鑑定 *B. caryophylli*；1，*B. cepacia* 13208；6，*B. gladioli* Bg2；11，*B. glumae*；17，*B. andropogonis* BA17；22，*B. caryophylli* TW9；2，7，12，18，23，薑黃菌株 Bu01；3，8，13，19，24，薑黃菌株 Bu07；4，9，14，20，25，薑黃菌株 Bu10；5，10，15，21，26，薑黃菌株 Bu22。

Fig. 1. Identification of *Herbaspirillum huttiensis* isolated from diseased tissues of turmeric by polymerase chain reaction. specific primer pair : CMG-23-1/CM-23-2 (lanes 1-5); CMG-23-1/G-23-2 (lanes 6-10); 1419S/1419A (lanes 11-15); Pf/Pr (lanes 17-21); nL/nR (lanes 22-26); M, DNA Bio-100 marker; lanes 16, 27, negative control (ddH<sub>2</sub>O). lane 1, *Burkholderia cepacia* 13208; lane 6, *B. gladioli* Bg2; lane 11, *B. glumae*; lane 17, *B. andropogonis* BA17; lane 22, *B. caryophylli* TW9; lanes 2, 7, 13, 18, 23, strain Bu01 from turmeric; lanes 3, 8, 14, 19, 24, strain Bu07 from turmeric; lanes 4, 9, 15, 20, 25, strain Bu10 from turmeric; lanes 5, 10, 16, 21, 26, strain Bu22 from turmeric.

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 *Herbaspirillum huttiensis* 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	8/8	1.47-3.03
	400	8/8	1.83-3.27
	600	8/8	1.90-3.43
Streptomycin (12.5% S)	100	8/8	0.07-0.83
	200	8/8	0.43-1.07
	400	8/8	0.70-1.30
Streptomycin +Tetracycline (10% SP)	100	8/8	0.83-1.73
	200	8/8	1.07-2.03
	400	8/8	1.20-2.43
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8% WP)	500	8/8	0.63-0.87
	1000	8/8	0.87-1.20
	1500	8/8	0.97-1.30
Kasugamycin (2% S)	100	8/8	0.83-1.47
	200	8/8	1.10-1.87
	400	8/8	1.23-2.23
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3% WP)	500	8/8	0.73-1.20
	1000	8/8	1.00-1.57
	1500	8/8	1.23-1.80
Copper oxychloride (85% WP)	1000	8/8	0.23-0.93
	1500	8/8	0.30-1.00
	2000	8/8	0.33-1.10
Copper hydroxide (77.0% WP)	1000	8/8	0.30-0.97
	1500	8/8	0.37-1.07
	2000	8/8	0.47-1.17
Tribasic Copper sulfate (27.12% SC)	1000	4/8	0.10-0.20
	1500	4/8	0.13-0.37
	2000	5/8	0.40-0.53
Oxolinic acid (20% WP)	1000	8/8	0.30-0.70
	1500	8/8	0.37-0.77
	2000	8/8	0.63-0.83
Ridomil MZ (58% WP)	1000	0/8	0.00
	1500	0/8	0.00
	2000	0/8	0.00

銅、多保鏈黴素、鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氯氧化銅、歐索林酸及三元硫酸銅等。

## 討 論

已知薑黃病害包含細菌性的斑點病<sup>(25)</sup>、青枯病<sup>(21)</sup>及葉枯病<sup>(17)</sup>等，以及真菌性的黑斑病及炭疽病<sup>(21)</sup>等。本研究於南投縣名間及草屯等地區栽培之薑黃植株上觀察到在葉片出現具水浸狀及外圍黃化之不規則型褐斑，病斑多從葉緣水孔開始發生，初呈水浸狀，之後形成褐色斑點，並沿著葉緣擴散，周圍伴隨著黃化，

最後葉片枯萎，葉鞘也出現水浸狀及外圍黃化之不規則形褐斑的病徵<sup>(17)</sup>，從樣品中分離所得的病原細菌已知有 *A. avenae* subsp. *avenae*<sup>(17)</sup>，同時從相同病徵不同病斑上可分離到另一種細菌，此細菌經柯霍氏法則確認為病原細菌，統計相同病徵分離之病原菌發現 *A. avenae* subsp. *avenae* 所占比率為 17.4 %，而該未知之病原菌占 82.6 %。該未知的病原細菌依 Schaad 等<sup>(29)</sup> 及 Garrity 等人<sup>(12)</sup> 所述方法，進行各項生理生化性質測定，結果如表一，由此結果初步推論該病原細菌在分類上應為 *Burkholderia* 屬的細菌。

依文獻資料顯示 *Burkholderia* 屬內包含 19 種細菌

(12, 29)，其中 *B. andropogonis*、*B. caryophylli*、*B. cepacia*、*B. gladioli* 及 *B. glumae* 等已知為植物病原細菌(12, 29)。在台灣，*B. andropogonis* 可引起玉米(15)、高粱及掃高粱(27) 以及檳榔(16) 之病害；*B. caryophylli* 可危害康乃馨(31)、洋桔梗(10)、滿天星(24) 及星辰花(33) 等花卉，造成植株萎凋；*B. gladioli* 危害蝴蝶蘭，造成蝴蝶蘭葉部病徵及落蕾(30)，可危害鳳梨，造成鳳梨果腐病(18)；*B. glumae* 可危害水稻，造成穀枯病(9)。本研究為確認此 *Burkholderia* 屬的未知病原菌之分類地位進行了多項測定，由生理生化測定發現 *B. andropogonis*、*B. caryophylli* 及 *B. glumae* 具有澱粉水解酶及精氨酸二水解酶活性(29)，而 *B. cepacia* 及 *B. gladioli* 則不具有澱粉水解酶及精氨酸二水解酶活性(29)，這二種特性雖與供試菌株相同，但 *B. cepacia* 及 *B. gladioli* 可分解果膠，利用蔗糖等特性則與供試菌株不同(29)，由此生理生化特性顯示，供試病原菌並不屬於上述 *Burkholderia* 屬 5 種已知之植物病原菌。

由文獻資料顯示已有許多研究者致力於 *Burkholderia* 屬植物病原細菌之研究並設計了專一性的引子對，包括 Pf/Pr 是以 *B. andropogonis* 16s rDNA 基因的核酸序列設計而得(3)；20L/20R 及 nL/ nR 此二組引子對是 Operon Technologies Inc, Alameda, CA 針對 *B. caryophylli* 設計而得(10)；CMG-23-1/CM-23-2 引子對是以 *B. cepacia* 23S rDNA 基因的核酸序列設計而得(6)；CMG-23-1/G-23-2 引子對是以 *B. gladioli* 23S rDNA 基因的核酸序列設計而得(6)；1418S/1418A 及 1419S/1419A 此二組引子對是以 *B. glumae* IS3 基因的核酸序列設計而得(14)，而本研究分別利用上述引子對以 PCR 方法針對危害薑黃之未知病原菌進行鑑定，結果顯示僅已知對照菌株分別與對其專一性之引子對產生專一性條帶外，供試菌株對任何引子對均無任何 DNA 條帶產生(圖一)，顯示危害薑黃之未知病原菌並非上述已知之 *Burkholderia* 屬的植物病原菌。

以 Biolog 系統鑑定結果顯示與 *H. huttienis* (*Burkholderia*-like) 相似值在 0.27~0.52 之間。另外，由脂肪酸分析結果顯示供試未知病原菌為 *H. huttienis*，其相似值為 0.625 及 0.961，分析其組成以 C<sub>16:1</sub> w7c / C<sub>15:0</sub> iso 2-OH (36.8%) 及 C<sub>16:0</sub> (25.1%) 及 C<sub>18:1</sub> w7c (23.4%) 三種脂肪酸含量為主(表二)。而 Obradovic 等(26) 及 Ding 等人(11) 針對 *H. huttienis* 菌株研究其脂肪酸組成，亦是以 C<sub>16:1</sub> w7c / C<sub>15:0</sub> iso 2-OH (38.4%) 及 C<sub>16:0</sub> (26.5%) 及 C<sub>18:1</sub> w7c (19.3%) 三種脂肪酸含量最高。進一步以 16S rDNA 定序及鑑定結果顯示該病原菌與 *H. huttienis* 序列相似度達 98%。根據前人對 *Herbaspirillum huttienis* 之生理生化特性研究發現其為

革蘭氏陰性，非螢光好氣菌，具有氧化酶、尿素酶活性，可於 40°C 生長等特性(4) 與 *Burkholderia* 屬相近。不具有果聚糖、果膠分解酶及精氨酸二水解酶活性(26)，無法利用蔗糖、乳糖等特性(22)，具 1 至 3~4 根單極生鞭毛(7, 12, 22, 26, 29)，皆與本研究結果相近(表一)。綜合上述生理生化、Biolog 系統鑑定、脂肪酸分析、16S rDNA 等結果推測分離自薑黃之未知病原菌為 *H. huttienis*。

Baldani 等人(4, 5) 及 Hale & Wilke(13) 的研究指出 *Herbaspirillum* 屬中 *H. rubrisubalbicans* 可感染高粱及甘蔗，造成條斑病，確定 *H. rubrisubalbicans* 為植物病原菌，而 *H. huttienis* 於 1962 年分離自水源(22)，最早名為 *Pseudomonas huttienis*，2000 年 Anzai 等(2)，Baldami 等(5) 及 Ding & Yokota(11) 依據 16S rRNA 分析後才將其重新分類至 *Herbaspirillum* 屬，此種細菌不屬於植物病原細菌，直到 2007 年 Obradovic 等人(26) 發現 *H. huttienis* 可引起溫室番茄苗的病害，才確定其屬於植物病原細菌，但在台灣 *H. huttienis* 尚無感染植物的任何報告。Obradovic 等人(26) 將 *H. huttienis* 與 *H. rubrisubalbicans* 同時進行脂肪酸及 16S rRNA 分析比較，結果顯示此二種細菌脂肪酸組成相近，16S rRNA 分析也有 99.8% 相似度。Obradovic 等人(26) 提到 *H. huttienis* 為弱病原菌，在高濕環境下才可以感染番茄苗，其在植株上形成大小不一之不規則斑點的病徵，並從葉頂或葉緣開始蔓延，最後形成紅棕色壞疽斑，本研究從薑黃植株分到的未知病原菌接種於薑黃植株後，其病勢發展也較 *A. avenae* subsp. *avenae* 慢。因為供試菌株在薑黃植株上引起之病徵與 *A. avenae* subsp. *avenae* 引起之薑黃葉枯病之病徵相同(17)，所以仍將由 *H. huttienis* 引起之薑黃病害定名為薑黃葉枯病 (bacterial leaf blight of turmeric)。

在藥劑測試中發現，所有藥劑均能抑制薑黃葉枯病菌 *A. avenae* subsp. *avenae*(17) 之生長，四環黴素、歐索林酸對薑黃葉枯病菌 *A. avenae* subsp. *avenae* 抑菌效果最佳(17)，本研究之藥劑試驗顯示，除鋅錳滅達樂對 *H. huttienis* 之生長無抑制作用外，其餘藥劑均能抑制該病原菌之生長，效果依序為四環黴素、鏈四環黴素、嘉賜黴素、嘉賜銅、多保鏈黴素、鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氫氧化銅、歐索林酸及三元硫酸銅等(表三)，顯示抗生素類藥劑可用於防治薑黃葉枯病，且效果優於銅劑類的藥劑，此結果可提供日後防治參考。

## 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. Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563-1589.
  3. Bagic, R. D., Fegan, M., Li, X. and Hayward, A. C. 1995. Construction of species-specific primers for *Pseudomonas andropogonis* based on 16S rRNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 87-92.
  4. Baldani, J. I., Baldani, V. L. D. and Dobereiner, J. 2005. Family II. *Oxalobacteraceae* fam. nov. Pages 629-636 in: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Part c. Springer. N. Y., USA. 1388 pp.
  5. Baldani, J. I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L. D., Olivares, F. L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M. and Dobereiner, J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 802-810.
  6. Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R. and Roller, C. 1998. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2748-2751.
  7. Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. pp 116-117. C. A. B. International, U. K. 332 pp.
  8. 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. (in Chinese with English abstract)
  9. Chien, C. C., Chang, Y. C., Liao, Y. M. and Ou, S. H. 1983. Bacterial grain rot of rice-A new disease in Taiwan. *Journal of Agricultural Research of China* 32: 360-366.
  10. Chu, H. Y. 1999. Development and application of techniques for detection of *Burkholderia caryophylli*. graduate institute of plant pathology, National Chung Hsing University, Master Thesis. 60 pp. (in Chinese with English abstract)
  11. Ding, L. and Yokota, A. 2004. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiensis* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2223-2230.
  12. Garrity, G. M., Bell, J. A. B. and Lilburn, T. 2005. Family I. *Burkholderia* fam. nov. Pages 575-600. in: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Part c. Springer. N. Y., USA. 1388 pp.
  13. Hale, C. N. and Wilke, J. P. 1972. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. *N. Z. J. Agric. Res.* 15: 448-456.
  14. Hasebe, A. and Iida, S. 2000. The novel insertion sequences IS 1417, IS 1418, and IS 1419 from *Burkholderia glumae* and their strain distribution. *Plasmid* 44: 44-53.
  15. 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. (in Chinese with English abstract)
  16. Hsu, S. H., Lai, W. C., Pan, Y. P. and Lin, C. Y. 2007. Occurrence of bacterial leaf spot of betel palm caused by *Burkholderia andropogonis*. *Plant Pathol. Bull.* 16: 131-139. (in Chinese with English abstract)
  17. Hsu, S. H., Sung, C. J., Gao, R. L., Chen, B. S. and Lin, C. Y. 2008. Occurrence of leaf blight of turmeric caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. *Plant Pathol. Bull.* 17: 43-52. (in Chinese with English abstract)
  18. Hsu, S. H., Zeng, W. F., Lai, W. C., Pan, Y. P. and Lin, C. Y. 2007. Fruit rot disease of pineapple caused by *Burkholderia gladioli*. *Plant Pathol. Bull.* 17: 125-134. (in Chinese with English abstract)
  19. Hu, M. F. 1995. *Curcuma longa* Linn. Pages 276-277. in: *Taiwan Agriculture Encyclopedia*. V.2. Harvest Farm Magazine of Non-profit Organization. Taipei. 926 pp. (in Chinese)
  20. 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. (in Chinese with English abstract)
  21. 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 with English abstract)
  22. Leifson, E. 1962. The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon* 12: 161-170.
  23. 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.
24. Liu, H. L. 1990. Bacterial wilt of *Gypsophila parnuculata* caused by *Pseudomonas caryophylli*. Contribution from Taichung DAIS. 28: 33-42. (in Chinese with English abstract)
  25. Maringoni, A. C. 2003. First report of *Pseudomonas cichorii* on turmeric (*Curcuma longa*) in Brazil. *Plant Pathol.* 52: 794.
  26. Obradovic, A., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Dickstein, E. R. and Momol, T. M. 2007. A leaf spot and blight of greenhouse tomato seedlings incited by a *Herbaspirillum* sp. *Plant Dis.* 91: 886-890.
  27. Okabe, N. 1935. Bacterial disease of plant occurring in Taiwan (Formosa) IV. *J. Soc. Trop. Agr.* 7: 219-227.
  28. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Pages 199-204 *in*: *Method in Phytobacteriology*. Akademiai kiado. Budapest. 568pp.
  29. Schaad, N. W., Chun, W. and Jones, J. B. 2001. *Burkholderia*. Pages 1-16; 139-150 *in*: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3<sup>rd</sup> edition American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
  30. Sung, I. H., Wu, Y. F., Chen, Y. H., Chen, S. C., Lin, M. Y., Chen, S. K. and Cheng, A. S. 2006. The symptom of collapse of *Phalaenopsis* flowers in an environmentally controlled greenhouse. *Plant Prot. Bull.* 48: 65-70. (in Chinese with English abstract)
  31. Tzeng, K. C., Hsu, S. T. and Cheng, Y. W. 1987. Characteristics of the causal agent of bacterial wilt of carnation in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 29: 422. (in Chinese abstract)
  32. Wang, H., Qi, M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.
  33. Wu, Y. F., Chen, S. C., Huang, S. H. and Cheng, A. S. 2006. Studies on bacterial wilt of static. contribution from Tainan DAIS. 48: 1-8. (in Chinese)

## ABSTRACT

Hseu, S. H.<sup>1</sup>, Sung, C. J.<sup>1</sup> and Lin, C. Y.<sup>2,3</sup> 2009. Occurrence of leaf blight of turmeric caused by *Herbaspirillum huttiensis* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 18: 13-22. (<sup>1</sup> Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC., <sup>2</sup> College of Health Science, Asia University, Wufeng, Taiwan, <sup>3</sup> Corresponding author, E-mail: yihlin@asia.edu.tw)

Irregular browning lesion of the leaf margin was found on 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 and then spread along the leaf midrib. In later stage, lesions became darken and usually accompanied with yellowing halo and the color became darker. The same symptoms also appeared in the leaf sheath and finally the plant wilted. A gram-negative, rod-shaped bacterium was consistently isolated from the diseased tissues except *Acidovorex avenae* subsp. *avenae*. The unknown bacterium was identified as *Herbaspirillum huttiensis* based on its physiological and biochemical characteristics, the Biolog GN MicroPlate Identification System, fatty acid analysis, PCR, 16S rDNA and pathogenicity tests. According to the symptoms on the turmeric plants caused by *H. huttiensis* was also designed as bacterial blight of turmeric. *In vitro* screening for the efficacy of various agrochemicals to inhibit bacterial growth on NA plates showed that all tested chemicals except Ridomil MZ, including copper bactericides, antibiotics, oxolinic acid, and carbamates, were effective. Among them, tetracycline was the most effective.

Key words: turmeric, bacterial leaf blight, PCR, agrochemical screening