Plant Pathology Bulletin 19: 213-224, 2010

Bacillus pumilus 引起的山藥細菌性葉斑病

許秀惠[1]　賴婉綺[1]　黃依涵[2]　鄧汀欽[3, 4]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所 植物保護系
[2] 臺中市 亞洲大學生物科技學系
[3] 臺中市 行政院農委會農業試驗所植物病理組
[4] 聯絡作者，電子郵件：tcde@tari.gov.tw
接受日期：中華民國 99 年 12 月 2 日

摘　要

許秀惠、賴婉綺、黃依涵、鄧汀欽. 2010. *Bacillus pumilus* 引起的山藥細菌性葉斑病. 植病會刊 19: 213-224.

2008 年起，陸續在臺北士林、臺中霧峰及南投埔里等山藥栽培地區，發現山藥植株出現不規則形壞疽病斑，且病斑周圍具黃暈，隨後逐漸擴大，嚴重者葉片乾枯萎凋。分離所得細菌，經柯霍氏法則確認具有病原性。進一步進行生理生化、Biolog、脂肪酸組成、專一性引子對聚合酶連鎖反應以及 16S rDNA 定序等病原菌的生理生化及分子鑑定分析，結果顯示該病原菌爲 *Bacillus pumilus*，並根據其引起之病徵，定名爲山藥細菌性葉斑病。*B. pumilus* 可於 CVP 培養基上形成淺凹，致腐試驗顯示該病原菌對山藥塊莖及馬鈴薯塊莖均有致腐能力，對於白菜葉梗則不具致腐能力。測試 10 種藥劑對 *B. pumilus* 菌株的抑制圈大小，依序爲歐索林酸、鏈四環黴素、鋅錳乃浦、多保鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氯氧化銅、鏈黴素、三元硫酸銅、嘉賜銅及嘉賜黴素等，其中歐索林酸之抑制效果明顯優於其他藥劑。此爲全世界首次 *Bacillus pumilus* 危害山藥之紀錄。

關鍵詞：山藥、葉斑病、*Bacillus pumilus*、藥劑感受性

緒　言

山藥 (Chinese yam 或common yam) 爲薯蕷科 (*Dioscoreaceae*) 薯蕷屬 (*Dioscorea* spp.) 之蔓性多年生宿根植物。根據國際農糧組織 (FAO) 的資料 (http://www.fao.org/docrep/t0207e/t0207e01.htm)，山藥的原產地可追溯自南亞及熱帶非洲。中國栽培極早，秦漢時期的神農本草便有記載，主要作爲食用及藥用。別名極多，常見的稱呼有淮山、薯蕷、山薯及山芋等。

山藥可食用之部位爲根狀莖或塊莖 (tuber)，塊莖依形狀可分爲長形、圓形及塊狀等，由顏色則可分爲白肉及紅肉兩大系統。營養成分高，含有澱粉、蛋白質、維生素、膳食纖維以及鉀、鎂等礦物質，可作爲食用、藥用及保健食品等。臺灣常見之山藥品種有大薯 (田薯) (*D. alata*)、長薯 (家山藥) (*D. batatas*)、日本山藥 (*D. japonica*)、紫田薯 (條薯) (*D. alata* L. var. *purpurea*)、恆春山藥 (戟葉田薯) (*D. doryophora*)、基隆山藥 (*D. japonica* Thunb. var. *pseudojaponica*) 等[(20)]。

山藥爲國際間重要糧食之一，2008 年全世界山藥總生產量約爲 5 千萬噸，主要生產國在熱帶非洲的奈及利亞、象牙海岸、迦納、貝南等國家爲主[(11)]，中南美地區的古巴和海地次之，而亞洲地區主要生產國爲日本和菲律賓[(12)]。臺灣可查詢之紀錄極早，但多小規模栽培。1991 年在政府鼓勵之下，面積始逐漸增加。2009 年種植面積已達約 600 公頃[(2)]，主要種植於南投縣名間、埔里及彰化芳苑等地區，年產約爲 1.8 萬噸。由於栽培面積增加，新興病蟲害增多，因此農民對病蟲害管理技術仍待加強。

已知山藥病害種類繁多，眞菌性病害有炭疽病 (anthracnose，病原：*Colletotrichum* spp.)、乾腐病 (dry black rot disease，病原：*Botryodiplodia theobromae*)、葉斑或萎凋病 (leaf spot or wilting disease，病原：*Scle-*

rotium rolfsii)、軟腐病 (soft rot，病原：*Rhizopus* spp.)、立枯病 (*Rhizoctonia solani*) [3]、薯塊腐爛病 (*Nattrassia mangiferae*) [24]、莖枯病 (*Phompsis* spp.) [28]等。病毒類有 *Yam Mosaic Virus* (YMV) [3]、Carla-Like Virus [18]、Dioscorea Latent Virus (DLV) 及 Dioscorea Greenbanding Virus (DGBV) 所引起的病毒病害 [14]。線蟲則有根瘤線蟲 (*Meloidogyne* spp.)[4, 21]。細菌性病害則有葉斑病 (leaf spot，病原：*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *dioscorea*) [27]、濕腐病 (wet rot，病原：*Erwinia carotovora*) [3] 等等。

2008 年起，一種未知的山藥葉斑病陸續發生於中北部的山藥栽培區，嚴重者造成葉片枯萎掉落，影響產量。本文主要描述本病的病徵，病原菌之鑑定，並進行初步藥劑感受性試驗，以供日後防治參考。

材料與方法

菌株來源

採集自臺北士林、臺中霧峰以及南投埔里等地所栽種之山藥疑似罹病之葉片，主要爲周圍具黃暈之不規則形壞疽病斑，經 75% 酒精表面消毒後，0.1% 的次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗數秒，再用無菌水漂洗，取健康處及患病處之間的組織切碎置於無菌水中做成懸浮液，將懸浮液劃線培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar，PDA) 平板上，放置於 30℃ 培養。培養一天後挑選單菌落，再劃線於 PDA 平板上，重複 3 次後移至 PDA 斜面 4℃ 保存備用。

病原性測定

將分離所得之細菌菌株分別移植於 PDA 上，於 30℃ 下培養一天後選取單菌落加入無菌水中，製成懸浮液以注射接種方法注射於萬國士菸草 (*Nicotiana tabacum*.) 葉片，置於室溫下觀察。將造成菸草過敏性反應的菌株再純化後分別編號爲 yam1~ yam17。

接種試驗係將前述菌源製成濃度爲 10^8 cfu/ml 的懸浮液，並以噴霧接種法將懸浮液均勻噴灑於山藥植株上 (大汕 3 號)，葉片不製造傷口，另以無菌水噴霧接種當對照。接種後植株以塑膠袋套袋保濕，觀察並記錄病徵發生情形。試驗至少進行三次。

病原菌形態

選取 yam3、yam7、yam11、yam15 及 yam17 等菌株 (包含來自臺北士林、臺中霧峰以及南投埔里等地區所分離之菌株)，培養於 PDA 上，置於 30℃ 定溫箱培養 1 天及 5 天之後，吸取菌液並以 pH 7.5 之鎢酸 (0.5% phosphotungstic acid，含 0.1% bovine serum) 染色，再以 Hitach -7000 的穿透式電子顯微鏡以 20 萬倍觀察細菌形態、鞭毛以及內生孢子的型態。

生理生化特性測定

選取 yam3、yam7、yam11、yam15 及 yam17 等，供試菌株分別在 PDA 斜面上 30℃ 下培養一天，進行下列各項生理生化試驗 [26]：格蘭氏染色 (KOH) 測試，葡萄糖之利用方式 (氧化/發酵試驗，O/F test)，精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase) 測定，55℃ 下之生長能力，白明膠 (gelatin) 液化能力，澱粉 (starch) 分解能力，氧化酶 (oxidase) 測定，10% NaCl 之生長能力，過氧化氫放氧酶 (catalase) 測試，酪胺酸酶 (tyrosinase) 測定，果聚糖之生成 (production of levan)，果膠 (pectolytic) 分解能力及醣類產酸能力等測定。

Biolog 細菌鑑定

將 yam3、yam7、yam11、yam15 及 yam17 等菌株，培養於 BUG (biolog universal growth medium, medium 36 g, Bacto agar 15 g) 培養基且兩次更新後，以接種環挖取單菌落懸浮於 IF buffer (0.4% NaCl, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gellan gum) 中，將濃度調整爲 20% T，分別在 Biolog GP2 反應盤中每孔加入 150 μl 細菌懸浮液，置於 30℃下培養 16~24 hr，之後以全自動菌種鑑定系統測讀，最後將資料輸入電腦與 Biolog GP2 資料庫 (Biolog 6.1版) 中比對，以鑑定其種屬。

脂肪酸組成分析及鑑定

取 yam3、yam7、yam11、yam15 及 yam17 等菌株分別培養於 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，依 Sasser [25] 所述之方法進行脂肪酸組成分析：(1)皂化 (saponification)：先加入 1 ml reagent 1 (NaOH 15 g, methanol 50 ml, ddH_2O 50 ml)，震盪 5-10 sec，100℃水浴 5 min，再振盪 5-10 sec，100℃水浴 25 min；(2)甲基化 (methylation)：加入 2 ml reagent 2 (6 N NaOH 67 ml, methanol 55 ml)，震盪 5-10 sec，80℃水浴 10 min，冷卻試管 (置冷水中)；(3)萃取 (extraction)：加入 1.25 ml reagent 3 (85% Hexane 50 ml, methyl-tert butyl ether 50 ml) 並上下混勻 10 min，靜置待分層，移除底層的水層；(4)鹼洗 (base wash)：加入 3 ml reagent 4 (NaOH 1.08 g, ddH_2O 90 ml)，上下混勻 5 min，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 2/3 有

機層置 GC 小管。完成前處理後，以氣相層析質譜儀 GC-MS (HP 6890N, USA) 進行分析，並以 MIDI Sherlock® Microbial Identification System (MIS) 之資料庫分析比對結果。

專一性引子對聚合酶連鎖反應分析

選取 yam 1~20 等 20 支菌株作爲供試菌株，另以 Bacillus 屬內之 *B. amyloliquefaciens* B (澱粉液化芽孢桿菌) 及 *B. cereus/thuringiensis* A (仙人掌桿菌/蘇力菌) 作爲對照，將供試菌株加熱 100℃ 10 min，離心轉速爲 10,000 rpm 1 min 後取上清液 DNA，各取 2.5 μl 作爲 DNA 模版。以 SE2-10-f / SE2-10-r (此引子對是根據 sequence characterized amplified region [SCAR] 之方式而設計，對 *B. pumilus* 菌株具專一性) 爲引子對 [15]，進行 PCR 鑑定。引子濃度約 8.0 μM，分別加入 PCR 各反應物：5.0 mM dNTPs，1.0 units/μl Pro Taq DNA polymerase (Protech Technology, ROC) 以及 2.5 μl 10×的反應緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 1.0% Triton X-100)，總反應體積爲 25 μl。PCR 增幅條件先以 94℃ 反應 1 min，之後進行 94℃ 30 sec，58℃ 1 min，72℃ 1 min，共 35 個循環，最後再進行 72℃ 5 min 1 個循環。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) 爲大小標幟，最後以溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5 μg/ml) 染色觀察，照相並記錄。

16S rDNA 定序及鑑定

選取 yam3 及 yam11 在 NA 培養基上之單一菌落，以 DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 抽取染色體 DNA 後，用細菌 16S rDNA universal primers f8-27/r1510 [19] 進行 PCR 增幅，引子濃度約 10 μM，分別加入 PCR 各反應物：5.0 mM dNTPs，2.5 units/μl RealTaq DNA polymerase (Real Biotech Corporation, ROC)，以及 5.0 μl 10×的PCR反應緩衝液，總反應體積爲 50 μl。PCR 增幅條件先以 94℃ 反應 5 min，之後進行 94℃ 30 sec，55℃ 30 sec，72℃ 140 sec，共 30 個循環，最後再進行 72℃ 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 程式 (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

致腐能力試驗

玻璃皿中以滅菌衛生紙襯底，加入適當的無菌水維持飽和溼度。將胡蘿蔔、馬鈴薯、白菜梗、山藥及洋蔥用清水洗淨，利用 75% 酒精消毒後，將供試作物切片置入玻璃皿中。選取菌株 yam3、yam7、yam9、yam11、yam15 及 yam17，並以 *Pectobacterium* (原屬於 *Erwinia*) *carotovorum* subsp. *carotovorum* Pos17 及 *Burkholderia cepacia* (BCRC13208；購自食工所) 分別作爲對照組，使用滅過菌的牙籤挑取單菌落的菌泥，以穿刺法接種於供試作物，觀察致腐情形。

藥劑感受性測定

利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method) [1] 於 NA 培養基上測定供試山藥菌株對不同藥劑不同濃度之感受性。各菌株濃度爲 10^8 cfu/ml 分別取 0.1 ml，混於 0.8% 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 滴於每片直徑 13 mm 的圓盤濾紙上，每皿放 3 個含藥之濾紙圓盤，並以浸無菌水之濾紙圓盤爲對照組，在室溫下培養 2~3 天後，測量抑制圈大小。取 yam1~17 等 17 株菌株爲供試菌株，供試 10 種藥劑如下：鏈四環黴素 (streptomycin + tetracycline，商品名爲枯萎寧，全臺公司，10.0% SP)、鏈黴素 (streptomycin，商品名爲立農黴素，豈農公司，12.5% SL)、多保鏈黴素 (thiophanate methyl + streptomycin，商品名爲安達菌，瑞穗公司，68.8% WP)、嘉賜黴素 (kasugamycin，商品名爲加收米，大勝化工，2.0% WP)；含銅劑類藥劑之鹼性氯氧化銅 (copper oxychloride，商品名爲健果銅，益欣公司，85.0% WP)、氫氧化銅 (copper hydroxide，商品名爲可產多，kocide chemical corporation，77.0% WP)、三元硫酸銅 (tribasic copper sulfate，商品名爲銅高尚，日產化工公司，27.12% SC)；含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (mancozeb，商品名爲萬生- 200，杜邦公司，80.0% WP)；混合類藥劑之嘉賜銅 (kasugamycin + copper oxychloride，商品名爲統統好，大勝化工，81.3% WP)；其他類藥劑之歐索林酸 (oxolinic acid，商品名爲金星，住友化學公司，20% WP)，各藥劑使用濃度如表四所示。

結　果

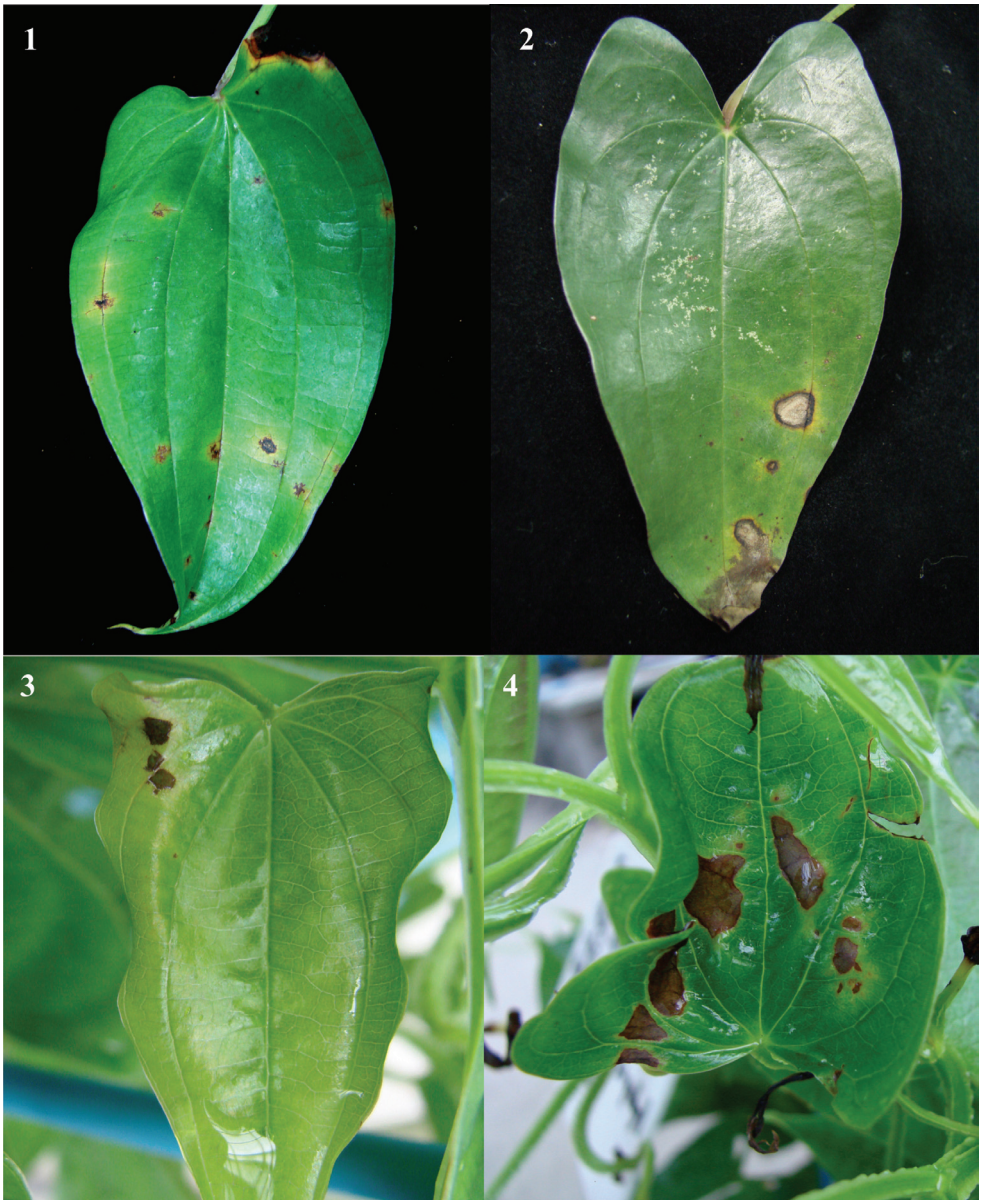
病徵

田間所採集疑似罹病山藥之病徵，初期爲不規則形壞疽病斑、周圍具黃暈，病斑漸擴大 (圖一，1, 2)，嚴重者造成葉片乾枯萎凋。從山藥分離所得之細菌菌

株分別注射接種至萬國士煙草葉片內，置室溫下於 6 hr 內注射處即形成黑褐色壞疽病斑，部分周圍黃化，之後壞疽病斑沿葉脈產生軟爛。以無傷口噴霧方式人工接種山藥，病徵在接種 48 hr 後於成熟葉片上出現細小水浸狀之病斑，及不規則淺褐色病斑，莖部上之翅邊緣往葉片之葉脈延伸亦可見淺褐化；接種 3 天後有些葉片前端小部分出現褐化；4 天後水浸狀病徵漸漸消失；5 天後轉爲褐化病斑或壞疽，色澤也由淺褐轉爲深褐；一星期後則出現壞疽病斑且外圍略呈黃暈 (圖一，3)，病斑無擴大或蔓延之跡象，但嫩葉也開始顯現病徵，不規則褐化且外圍具黃暈，病徵皆較成熟葉明顯且嚴重；11~18 天嫩葉感染情形增加 (圖一，4)，甚至整片黑化死亡，嚴重者延伸至葉柄。

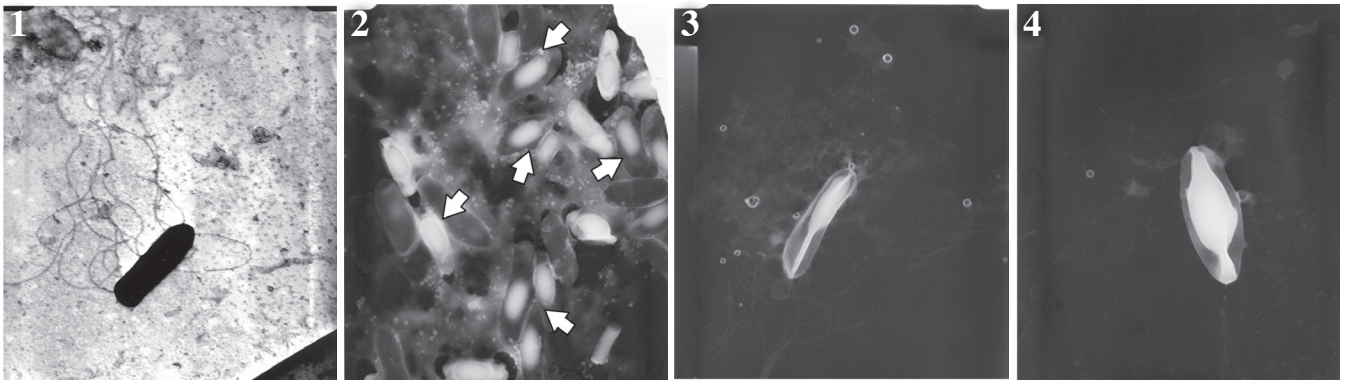
病原菌形態

於 PDA 培養基上呈現乳色，周圍具不規則稍具凸起具光澤之菌落，以 KOH 測試結果菌株爲革蘭氏陽性菌，TEM 觀察具周生鞭毛 (圖二，1)。培養 5 天後之菌株可以觀察到內生孢子，內生孢子型態爲卵形多數爲中生孢子，少部分位於末端或次末端 (圖二，2, 3, 4)。



圖一、山藥細菌性葉斑病之病徵。1，2，爲田間罹病之山藥葉片病徵 (1：大汕3號山藥；2：蓼味山藥)；3，山藥 (大汕 3 號) 植株接種 *Bacillus pumilus* 一星期後之葉片病徵；4，接種二星期後之病徵。

Fig. 1. Symptoms of bacterial leaf spot of yam in Taiwan. 1, Early symptoms of yam leaf. 2, Field symptom showed dark lesions and necrosis of yam leaf. 3, Leaf symptoms were shown one week and 4, two weeks after inoculation.



圖二、*Bacillus pumilus* 之穿透式電子顯微鏡 (TEM) 觀察。1，爲 yam3 菌株之周生鞭毛；2，爲培養 5 天後產生之卵形內生孢子 (箭頭所指)；3，內生孢子位於細菌體之末端，4，內生孢子位於細菌體之次末端。

Fig. 2. TEM micrographs of *Bacillus pumilus* isolated from yam in Taiwan. 1. Peritrichous flagella; 2. Oval shape of endospore (arrow); 3. formation of terminal endospore; and 4. formation of subterminal endospore.

表一、臺灣山藥細菌性葉斑病菌之生理生化測試

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of *Bacillus pumilus* isolated from yam

Characteristic	*Bacillus pumilus* Strains from yam[1]	*Bacillus pumilus*[2]	*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *dioscorea*[3]
KOH test	G (+)[4]	G (+)	G (+)
Spore forming	+	+	−
O/F test	O/F	O/F	O/F
Oxidase	−	−	−
Growth at 55℃	+	+	ND
Catalase	+	+	+
Arginine dihydrolase	−	−	−
Gelatin hydrolysis	+	+	ND
Pectolytic activity	+	+	ND
Tyrosinase	−	−	ND
Starch hydrolysis	−	−	+
Levan	−	−	−
Growth in 10% NaCl	+	+	ND
Tabacco HR	+	+	−
Acid from:			
Cellobiose	+	−	ND
Glucose	+	+	+
Lactose	V-	−	ND
Maltose	V-	−	ND
Mannitol	+	+	ND
α-Methyl-Glucoside	V-	−	ND
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	ND

[1] Five isolates: yam 3, 7, 11, 15 and 17 were used.
[2] Data were cited from Saleh, *et al*., 1997 (23).
[3] Data of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *dioscorea* were cited from Wang, 2006 (27).
[4] G (+): Gram positive; O: oxidative; F: formation; +: positive reaction; −: indicated negative reaction; V-: 21~79% negative.

病原菌生理生化特性

以兼性方式 (氧化及發酵) 利用葡萄糖，具液化明膠及分解果膠能力，具過氧化氫放氧酶，不產生果聚醣、不具氧化酶、酪氨酸酶，無法分解精氨酸，可在 10% NaCl 及 55℃ 生長，亦不具澱粉分解能力及可利用 Cellobiose、Glucose、Mannitol、Sucrose 及 Trehalose 等醣類產酸 (表一)。

Biolog 鑑定

以 Biolog 系統鑑定結果供試菌株 yam3、yam15、yam17 與 *B. pumilus* C 之相似值爲 0.66、0.64、0.17；yam11、yam26 與 *B. pumilus* B 之相似值爲 0.14、0.38；yam7與 *B. licheniformis* 之相似值爲 0.19。

脂肪酸組成分析及鑑定

以 GC-MS 進行分析後，得知 yam 菌株的脂肪酸組成主要爲 $C_{14:0\ iso}$、$C_{15:0\ iso}$、$C_{15:0\ anteiso}$、$C_{16:0\ iso}$、$C_{16:0}$、$C_{17:0\ iso}$ 及 $C_{17:0\ anteiso}$，將所得資料輸入 MIDI Sherlock® (MIS) 電腦資料庫中比對，結果顯示 yam3、yam7、yam11、yam15 及 yam17 相似度分別爲 0.735、0.663、0.729、0.737 及 0.745 (表三)，符合 *B. pumilus* 之機率爲 98.76~99.21 %。

專一性引子對聚合酶連鎖反應分析

以 *B. pumilus* 之專一性引子對 SE2-10-f / SE2-10-r 進行 PCR 分析，結果顯示供試之 20 株山藥病原菌株均可增幅出大小約爲 500 bp 之專一性 DNA 條帶，而供試 *B. amyloliquefaciens* B (澱粉液化芽孢桿菌) 及 *B. cereus/thuringiensis* A (仙人掌桿菌/蘇力菌) 則無任何條帶產生 (圖三)。

16S rDNA 定序及鑑定

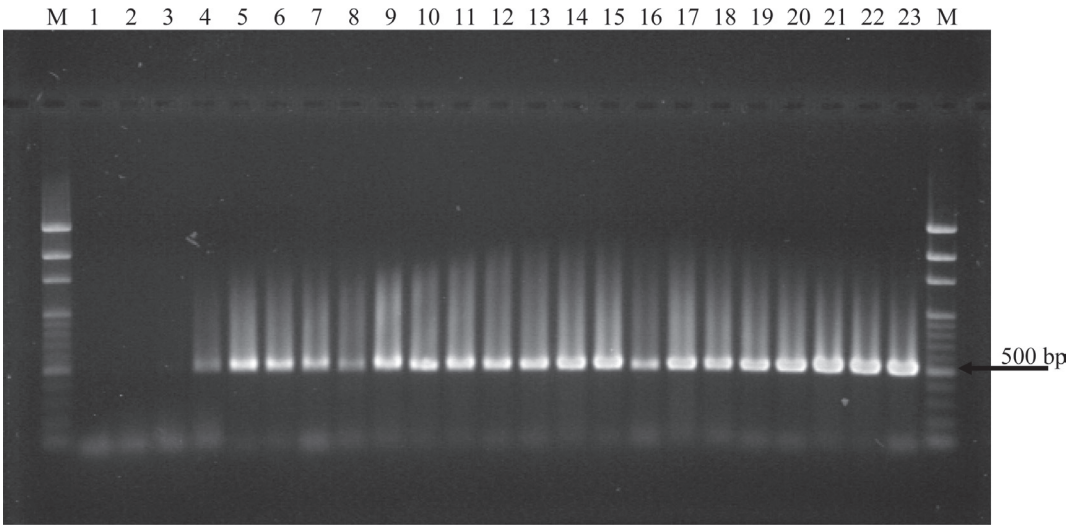
以對細菌 16S rDNA 具專一性之引子對 f8-27/r1510 進行 PCR 增幅，分別從菌株 yam3 及 yam11 得到大小爲 1,404 及 1,339 bp 之 DNA 片段。將此片段進行 DNA 定序分析後，再將所得序列以 BLAST 程式搜尋 NCBI 和 SDSC-Biology Workbench 核苷酸資料庫中相似的序列，結果顯示 yam3、yam11 菌株與 *B. pumilus* (isolate EI-44-7 與 strain BOH116 GenBank accession number 分別爲 AJ494734 及 AY94753)，其 16S rDNA 部分序列間達 99~100% 相同性；而 yam3、yam11 菌株與 *C. flaccumfaciens* 16S rDNA (isolate SAFR-001 及 strain 2P04PE GenBank accession number 分別爲 AY167859 及 EU977762)，其16S rDNA部分序列間的相同性僅 81~83%。

表二、山藥葉斑病菌致腐能力測試

Table 2. Tissue maceration test of yam-isolated *Bacillus pumilus* strains

Plant / tissue	*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* (Pos 17)[1]	*Burkholderia cepacia* (BCRC 13208)[1]	*Bacillus pumilus*					
			yam3	yam7	yam9	yam11	yam15	yam17
Dioscorea spp. (yam) / tuber	+[2]	+	+	+	+	+	+	+
	3.5×2.3~4.2×3.5[3]	2.2×1.6~2.6×2	0.5×0.3~3.5×2.7	1×0.5~4.7×3	0.5×0.3~4.2×3.5	1×0.5~4.5×2.8	2×1.7~3.5×3	2.5×1.8~5×3
Daucus carota (carrot) / root	+	+	−	+	+	−	+	−
	2×1.5~3.5×3.5	0.5×0.4~1.1×0.7		1×0.5~4×3	1×0.8~6×4		1.8×1.5~5×4	
Solanum tuberosum L. (potato) / tuber	+	−	+	+	+	+	+	+
	3.5×3~5.5×4		5×4~6.5×5	5×4~6.5×5.2	4×3~6.7×3	4.5×3~6×4.5	4.5×3~5.7×4	6.5×5~6.7×5.2
Allium cepa L. (onion) / bulb	−	+	−	−	−	+	−	+
		1.1×0.4~1.4×1				3.3×0.5~4×3.5		3.5×3.3~5×4
Brassica rapa.(chinese cabbage) / petiole	+	−	−	−	−	−	−	−
	4×3~4.7×4.5							

[1] Bacterial strain used in this test.
[2] Strain showed ability to macerate plant tissue (+) or not (−).
[3] Numbers indicated the range of rotten area (cm^2) caused by the given strain.



圖三、應用 PCR 技術以引子對 SE2-10-f/ SE2-10-r 鑑定山藥細菌性葉斑病菌。M，100 bp DNA marker；1，negative control；2，*Bacillus cereus/thuringiensis* A (仙人掌桿菌/蘇力菌)；3，*B. amyloliquefaciens* B (澱粉液化芽孢桿菌)；4~23 菌株，yam 1~20 (山藥細菌性葉斑病菌，*B. pumilus*)。

Fig. 3. Identification of *Bacillus pumilus* by using PCR with primer pair SE2-10-f/ SE2-10-r. Lane M, 100 bp DNA marker; lane 1, negative control, lane 2, *Bacillus cereus/thuringiensis* A, lane 3, *B. amyloliquefaciens* B, lanes 4~23, *B. pumilus* strains yam1~20 isolated from yam.

表三、山藥葉斑病菌 *Bacillus pumilus* 之脂肪酸組成

Table 3. The fatty acid components of yam-isolated *Bacillus pumilus* strains

Fatty acid	yam3	yam7	yam11	yam15	yam17	Reference[1]
13:0 iso	0.28	0.28	0.29	0.24	0.43	0.92
12:0 iso 3OH	0.03	0.03	0.04	0.04	0.10	ND[2]
14:0 iso	1.31	1.41	1.30	1.14	1.75	ND
14:0	0.48	0.29	0.44	0.30	0.66	0.87
15:0 iso	50.82	50.7	50.68	52.98	53.01	61.15
15:0 anteiso	23.35	21.71	24.91	20.43	26.38	16.95
16:1 w7c alcohol	0.36	0.95	0.38	0.93	0.51	0.90
16:0 iso	4.13	4.21	4.24	3.58	3.39	2.47
16:0 anteiso	0.05	0.08	0.04	0.08	0.04	ND
16:1 w11c	0.30	0.55	0.32	0.67	0.54	ND
16:0	1.94	1.42	1.87	1.40	1.66	2.30
15:0 iso 3OH	0.15	0.15	0.13	0.15	0.13	ND
15:0 2OH	0.04	0.05	0.04	0.05	0.08	ND
17:1 iso w10c	0.85	2.53	1.00	2.84	0.96	ND
Sum In Feature 4 (17:1 anteiso B/iso 1)	0.31	0.72	0.31	0.72	0.34	ND
17:0 iso	7.71	8.93	8.27	8.84	5.66	6.04
17:0 anteiso	5.29	5.04	5.20	4.89	3.66	2.56
16:0 iso 3OH	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	ND
18:1 w9c	0.07	0.05	0.03	0.05	0.08	ND
Sim Index	0.735	0.663	0.729	0.737	0.745	ND
Result from date base	B. pumilus	*B. pumilus*	*B. pumilus*	*B. pumilus*	*B. pumilus*	*B. pumilus*

[1] Data are combined by referring to Galal, *et al.*, 2006 [(13)]

[2] ND: not detectable.

致腐能力試驗

從山藥分離出來的菌株接種在山藥的塊莖上均具致腐能力，與 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pos17 (Pcc) 及 *B. cepacia* BCRC13208 (Bc) 的致腐能力比較，致腐能力強弱依序爲 *B. pumilus*，Pcc，Bc，且對照菌株在塊莖上表面顏色較淺，軟化程度較低；接種在白菜梗上則無病徵，yam 菌株在白菜上不具有致腐能力；接種在洋蔥鱗莖上菌株 yam11 及 yam17 具致腐能力，菌株 yam3、yam7、yam9 及 yam15 在洋蔥上皆無病徵，不具致腐能力；所有測試之 yam 菌株接種在馬鈴薯塊莖上，造成腐爛並產生水泡，且表面淺凹成褐色，致腐能力較 Pcc 及 Bc 強；接種在胡蘿蔔塊根上，菌株 yam7、yam9 及 yam15 皆具致腐能力，菌株 yam3、yam11 及 yam17 則無病徵，顯示不具致腐能力 (表二)。

藥劑感受性

供試 17 株山藥病原菌株以 10 種藥劑在一般使用濃度下進行感受性測試，結果顯示所有供試藥劑在測試之濃度下，對供試山藥菌株之生長均有抑制效果 (表四)，其抑制效果之強弱依序爲歐索林酸、鏈四環黴素、鋅錳乃浦、多保鏈黴素、氫氧化銅、鹼性氯氧化銅、鏈黴素、三元硫酸銅、嘉賜銅及嘉賜黴素。

討　論

雖然供試病原細菌在煙草上引起的過敏性反應與軟腐病菌 (Pcc) 造成之過敏性反應相同，在 6 hr 內即出現壞疽斑，之後引起菸草全株腐爛的系統性病徵，但是革蘭氏測定 (KOH 試驗) 確認該細菌屬革蘭氏陽性菌，顯然與革蘭氏陰性菌之軟腐病菌有所不同。依照 Shaad [26] 植物病原細菌分類所述革蘭氏陽性菌包含 coryneform bacteria (*Arthrobacter*，*Clavibacter*，*Curtobacterium*，*Rhodococcus*)，*Streptomyces*，*Bacillus* 及 *Clostridium* 等屬，但是這些屬中具內生孢子的屬僅有 *Clostridium* 及 *Bacillus*，進一步以生理生化相關試驗進行鑑定，發現山藥病原細菌具周生鞭毛且爲兼性好氧之細菌，具 *Bacillus* 屬的特性。依照 Chun 與 Vidaver [9] 對於 *Bacillus* 屬產生之內生孢子可分爲：Group I 爲內生孢子呈卵形或圓筒狀，內生孢子位於桿菌體內中間或次末端或末端，桿菌菌體稍微膨潤或非所有皆有膨潤的情形；Group II 爲內生孢子呈卵形或少數圓筒狀，內生孢子位於桿菌體內次末端或末端，桿菌菌體本身明顯膨潤；Group III 爲內生孢子呈球狀，內生孢子位於桿菌體內次末端或末端，桿菌菌體膨潤。依照其描述之條件與所分離之山藥病原菌相比對，發現山藥病原菌應屬於 Group I。由文獻資料顯示，目前全世界山藥已知之細菌性病害爲葉斑病，其病原菌鑑定爲 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *dioscorea*，可以引起山藥葉片呈現周圍具淺褐色暈環的暗褐色圓形病斑 [27]，與本研究所分離之山藥病原菌株雖同爲革蘭氏陽性菌，但卻不具有內生孢子，並且不會引起菸草過敏性反應等特性有所差異，顯示 Wang [27] 報告之山藥葉斑病菌，與本研究可引起山藥葉片呈現周圍具黃暈的不規則形壞疽病斑之病原菌顯然不同。

Biolog 鑑定系統中之 *Bacillus pumilus* 分爲 A、B及 C 三種類型，主要由碳源利用率不同而區分，以 Biolog 鑑定系統鑑定供試之山藥病原菌結果屬於 *Bacillus pumilus* B 及 C，但相似值不高，在 0.14~0.66 之間。另外，測定供試山藥菌株之脂肪酸組成，主要爲 $C_{15:0\ iso}$、$C_{15:0\ anteiso}$ 及 $C_{17:0\ anteiso}$，與資料庫內 *B. pumilus* 之脂肪酸組成相似度在 0.663~0.745 之間，機率爲 98.76~99.21%。Galal 等人[13]於 2006 年在芒果上新鑑定之病原菌 *B. pumilus*，其主要脂肪酸組成亦爲 $C_{15:0\ iso}$、$C_{15:0\ anteiso}$ 及 $C_{17:0\ anteiso}$，與本研究供試之病原菌的脂肪酸主要組成相同。在核酸分析方面，供試山藥菌株之 16S rDNA 於 NCBI 和 SDSC-Biology Workbench 之資料庫比對，結果均顯示和 *B. pumilus* 16S rDNA 部分序列間的相同性高達 99~100%，但是供試之山藥病原菌菌株與同樣引起山藥細菌性葉斑病的病原菌 *C. flaccumfaciens* [27] 的 16S rDNA 部分序列比對，其相同性僅 81~83%。再以對 *B. pumilus* 具有專一性的引子對 SE2-10-f / SE2-10-r [15] 進行 PCR 分析，結果顯示供試之山藥病原菌株均可產生 500 bp 之專一性 DNA 條帶。綜合上述生理生化、Biolog、脂肪酸、16S rDNA 序列分析及專一性引子對 PCR 分析等試驗結果，證實供試山藥病原菌爲 *Bacillus pumilus*，並由其引起之病徵將其定名爲山藥細菌性葉斑病。本文爲全球首次報告 *Bacillus pumilus* 危害山藥 (yam) 之紀錄。

B. pumilus 多半被發現於泥土中，或者是植物的內生菌，極少危害植物，該類細菌曾被用來作爲生物防治用[6, 8, 16, 17, 22]，Klopper 等人利用 *Bacillus* spp. 來誘導植物系統抗性及促進植物生長 [16, 17]，但自從 1997 年 Saleh 等首先在埃及桃樹 (*Prunus persica* cv. Balady) 的葉片及果實上發現 *B. pumilus* 可引起細菌性斑點病 [23]，確認 *B. pumilus* 也可引起植物病害；之後在2006年Galal 等發現該細菌也可以引起芒果的葉枯病 [13]；2008 年又發現由半翅目媒介昆蟲傳播之 *B. pumilus* 可導致棉花的棉鈴種腐病 [5]，最近 Font 等人 [10] 新發現 *B. pumilus* 可引起四季豆之葉斑病等。除上述雙子葉植物寄主外，

尚有 *B. pumilus* 引起孔石藻的大量死亡，稱之爲 coralline lethal algal disease[7]。另外，有資料顯示 *B. pumilus* 與 *Erwinia aroideae*、*E. phytophthora*、*B. polymyxa*、*B. subtilis* 等細菌共同引起窖藏的白菜腐爛病[13, 23]。Galal 等人將從芒果分離的 *B. pumilus* 菌株接種於不同寄主，顯示其不會在馬鈴薯塊莖上引起病徵[13]，本研究的致腐試驗發現所有供試的山藥葉斑病菌 *B. pumilus* 皆可在馬鈴薯塊莖上引起軟腐的病徵，其軟化程度比 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 及 *B. cepacia* 高；另外，依其在不同寄主上之致腐能力可分爲三類，第一類包含 yam3 菌株，具有強致腐能力，第二類包含 yam7、yam9 及 yam15 等菌株，具有中度致腐能力，第三類包含 yam11 及 yam17 等菌株，具有弱致腐能力，但菌株之致腐能力與分離地區及分離之品種無關。Galal 等人也發現芒果分離的 *B. pumilus* 病原菌可在十字花科的芥藍及花椰菜的葉片上造成病徵[13]，本試驗將供試的山藥葉斑病菌 *B. pumilus* 接種至十字花科白菜的葉梗後不會造成病徵，雖未進行芥藍及花椰菜植株

表四 、各種農藥在不同濃度下對山藥葉斑病菌生長之抑制效果

Table 4. Growth inhibition of Bacillus pumilus by various agrochemicals at different concentrations

Chemical	Dilution fold	No. of strains inhibited/ No. of strains tested	Inhibition zone (cm in diam.)
Streptomycin	1500	17/17	0.47-0.90
(12.5% SL)	1000	17/17	0.53-1.07
	500	17/17	0.73-1.20
Streptomycine	2000	17/17	1.20-2.13
+ Tetracyclin	1000	17/17	1.50-2.53
(10.0% SP)	500	17/17	1.77-2.87
Thiophanate methyl	1500	17/17	0.80-1.37
+ Streptomycin	1000	17/17	1.00-1.50
(68.8% WP)	500	17/17	1.17-1.73
Kasugamycin	400	4/17	0.03-0.20
(2.0% WP)	200	13/17	0.07-0.53
	100	17/17	0.23-0.83
Kasugamycin	1500	16/17	0.20-0.90
+ Copper oxychloride	1000	16/17	0.37-1.00
(81.3% WP)	750	16/17	0.40-1.07
Copper oxychloride	750	16/17	0.33-1.00
(85.0% WP)	500	16/17	0.40-1.07
	250	16/17	0.50-1.23
Copper hydroxide	1000	16/17	0.13-1.13
(77.0% WP)	750	16/17	0.33-1.23
	500	16/17	0.43-1.33
Tribasic copper sulfate	1000	17/17	0.10-0.90
(27.12% SC)	500	17/17	0.27-1.07
	250	17/17	0.50-1.20
Oxolinic acid	2000	17/17	2.23-3.57
(20.0% WP)	1000	17/17	2.23-3.73
	500	17/17	2.33-3.83
Mancozeb	1000	17/17	0.70-1.63
(80.0% WP)	500	17/17	0.83-2.03
	250	17/17	1.17-2.20

接種試驗，但接種結果初步顯示本研究之 *B. pumilus* 菌株病原性與 Galal 等人分離的 *B. pumilus* 菌株可能有差異，有關不同 *B. pumilus* 菌株病原性的比較則有待更進一步的研究方能得知。

藥劑感受性測試結果顯示，歐索林酸、鏈四環黴素、鋅錳乃浦和多保鏈黴素對供試山藥病原菌株之生長抑制效果較佳。但是嘉賜黴素或者是含銅類的氫氧化銅、鹼性氯氧化銅，或銅劑與抗生素混合之嘉賜銅等四種供試藥劑卻無法抑制所有供試的山藥病原菌株，因此，這些藥劑施用於田間的防治效果，則有待進一步田間試驗證實。

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. Agriculture and Food Agency. 2002. Crop yields of the order query-Yam. Retrieved Jan. 4, 2010, from Agricultural report resources network on the world wide web: http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp (in Chinese)
3. Amusa, N. A., Adegbite, A. A., Muhammed, S., and Baiyewu, R. A. 2003. Yam diseases and its management in Nigeria. Afr. J. Biotechnol. 12: 497-502.
4. Atu, U. G., Odurukwe, S. O., and Ogbuji, R. O. 1983. Root-knot nematode damage to *Dioscorea rotundata*. Plant Dis. 67: 814-815.
5. Bell, A. A. 2008. *Bacillus* seed and boll rot of cotton: Symptoms and transmission by *Hemiptera*. Phytopathology 98: S21. (Abstr.)
6. Benhamou, N., Kloepper, J. W., Quadt-Hallman, A., and Tuzun, S. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol. 112: 919-929.
7. Cervino, J. M., Littler, M., Littler, D., Polson, S., Goreau, T. J., Brooks, B., and Smith, G. W. 2005. Identification of microbes associated with coralline lethal algal disease and its relationship to glacial ice melt (global warming). Phytopathology 95: S120. (Abstr.)
8. Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez-Kabana, R., and Kloepper, J. W. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biol. Control 5: 83-91.
9. Chun, W. and Vidaver, A. K. 2001. III Gram-positive bacteria *C. Bacillus*. Pages 250-259. *in*: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. eds. APS, St. Paul, USA. 373 pp.
10. Font, M. I., Bassimba, D. D. M., Cebrián, M. C., Molina, L. M., and Jordá, C. 2009. Junly 1. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. New Disease Reports 19, 019054. Retrieved November 27, 2009, from http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=019054
11. Food and Agriculture Organization of United Nation. Crops primary equivalent-Yam in 2005. Retrieved Feb. 9, 2010, from FAOSTAT on the world wide web: http://faostat.fao.org/site/609/default.aspx#ancor
12. Food and Agriculture Organization of United Nation. Crops-Yam in 2008. Retrieved Feb. 9, 2010, from FAOSTAT on the world wide web: http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor
13. Galal, A. A., El-Bana, A. A., and Janse, J. 2006. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on mango plants. Egypt. J. Phytopathol. 34: 17-29.
14. Hearon, S. S., Corbett, M. K., Lawson, R. H., Gillaspie, A. G., Jr., and Waterworth, H. E. 1978. Two Flexous-rod Viruses in *Disocorea floribunds*: symptoms, identification, and ultrastructure. Phytopathology 68: 1137-1146.
15. Isenegger, D. A., Taylor, P. W. J., Mullins, K., McGregor, G. R., Barlass, M., and Hutchinson, J. F. 2003. Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures. Plant Cell Rep. 21: 814-820.
16. Kloepper, J. W., Rodriguez-Ubana, R., Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E., and Fernandez, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Austral. Plant Pathol. 28: 21-26.
17. Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259-1266.
18. Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, Z., and Alexander, B. J. R. 2005. Partial Characterization of a Carla-Like Virus Infecting Yam (*Dioscorea* spp.) from China. Plant Dis. 89: 912. (Abstr.)
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, S. L. 2005. Yam. (Special Crops). Pages 225-228. *in*: Taiwan agriculture encyclopedia. vol. 1. Harvest Farm Magazine of non-profit organization, Fang ed. Taipei, R.O.C. 404 pp. (in Chinese)
21. Ni, H. F., Hsu, S. L., and Yang, H. R. 2007. Evaluation of different method for inoculation for *Pratylenchus coffeae* on yam. J. Taiwan Agric. Res. 56: 99-106. (in Chinese)
22. Park, K. S. and Kloepper, J. W. 2000. Activation of

PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Biol. Control 18: 2-9.

23. Saleh, O. I., Hung, P. Y., and Hung, J. S. 1997. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature Balady peach in Egypt. J. Phytopathology 145: 447-453.
24. Sangoyomi, T. E. and Ekpo, E. J. A. 2002. First report of *Nattrassia mangiferae* as a postharvest fungal pathogen of white yam (*Dioscorea rotundata*) in Nigeria. Plant Dis. 86: 919.
25. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Pages 199-204. *in*: Methods in phytobacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., and Sands, D. C. eds. Akadémiai Kiadó. Budapest. 568 pp.
26. Schaad, N. W. 2001. Initial identification of common genera. Pages 1-10. *in*: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. eds. APS, St. Paul, USA. 373 pp.
27. Wang, G. J. 2006. Identifying pathogen of bacterial leaf spot disease in the yam. Henan Agricultural University, master's thesis. 55 pp. (in Chinese)
28. Yang, T. C. 2005. Study of incidences and control of major pests on yam, *Dioscorea* spp. in Hualien area. Bull. Hualien DAIS. 23: 15-29. (in Chinese)

Abstract

Hseu, S. H.[1], Lai, W. C.[1] , Hung, Y. H.[2], and Deng, T. C.[3, 4]. 2010. Yam bacterial leaf spot caused by *Bacillus pumilus*. Plant Pathol. Bull. 19: 213-224. ([1] Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute. Wenshan Rd. Fengshan, Kaohsiung, 83052, Taiwan, R.O.C.; [2] Department of Biotechnology, Asia University, Wufeng, Taiwan; [3] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; [4] Corresponding author, E-mail: tcde@tari.gov.tw)

In 2008, a new, moderately sever bacterial leaf spot disease was found on yam (*Dioscorea* spp.) leaves in commercial plantations throughout the central and northern Taiwan. At early stage, infected leaves showed brownish, water-soaked lesions. Later, the lesions turned black with yellow halos. In severe cases, the diseased leaves become wilted and eventually fall. The causal agent of the disease was isolated and identified to be *Bacillus pumilus* based on the results obtained from Biolog, fatty acid analysis, polymerase chain reaction with specific primers, and 16S rDNA sequencing. The pathogen is capable of digesting pectate on CVP medium, macerating potato and yam tubers, but it cannot macerate the petioles of Chinese cabbage (*Brassica rapa*). Disk diffusion tests were conducted and showed that oxolinic acid has better control efficacy in comparison with the other 9 commercial pesticides. This is the first report of *Bacillus pumilus* that causes yam leaf spot disease in the world.

Keywords: *Dioscorea* spp., leaf spot, *Bacillus pumilus*, agrochemical screening