Plant Pathology Bulletin 16: 131-139, 2007

Burkholderia andropogonis 引起之檳榔葉斑病及藥劑篩選

許秀惠[1]　賴婉綺[1]　潘雅碧[1]　林俊義[1, 2]

[1] 行政院農委會農業試驗所 植物病理組

[2] 聯絡作者，電子郵件：cylin@wufeng.tari.gov.tw

接受日期：中華民國 96 年 月 日

摘　要

許秀惠、賴婉綺、潘雅碧、林俊義. 2007. *Burkholderia andropogonis* 引起之檳榔葉斑病及藥劑篩選. 植病會刊 16：131-139 .

民國 95 年間於台中縣大坑、嘉義縣阿里山鄉、屏東縣高樹鄉、高雄縣美濃鎮及花蓮縣鳳林鎮等地種植之檳榔葉片上發生褐化壞疽病斑，病斑周圍伴有黃暈，病斑隨著葉脈擴散呈不規則形，由柯霍氏法則、生理生化、Biolog 鑑定及脂肪酸組成分析結果顯示供試檳榔病原菌株為 *Burkholderia andropogonis*，進一步應用對 *B. andropogonis* 具有專一性之引子對進行 PCR 反應，結果由該病原菌可增幅出 410 bp 之專一性 DNA 條帶，並且以 16S rDNA 進行定序與鑑定，確認該病原菌為 *B. andropogonis*，由其引起之病徵定名為檳榔葉斑病 (bacterial leaf spot of betel palm)。

以市售 12 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 12 種藥劑均能抑制病原菌於 PDA 培養基上的生長，其中又以四環黴素效果最佳，依其抑制效果依序為四環黴素、歐索林酸、嘉賜黴素、嘉賜銅、氫氧化銅、鏈四環黴素、多保鏈黴素、三元硫酸銅、鋅錳乃浦、鏈黴素、鹼性氯氧化銅及鋅錳滅達樂等。

關鍵詞：檳榔、葉斑病、藥劑篩選

緒　言

檳榔 (*Areca catechu* L.)，英名為 areca nut palm、betel palm，屬棕櫚科 (*Palmae*)多年生之單子葉植物，屬肉穗花序，原產馬來西亞，果實可生食，也可製成紅色染料及提煉丹寧[8]。台灣山坡地普遍栽植檳榔，依據民國 95 年農業統計年報[3] 顯示台灣檳榔種植總面積為 50,554 公頃，主要種植地區為南投、嘉義、屏東、花蓮及台東等地，因為檳榔容易雜交產生變種，植株外觀差異甚少，所以檳榔之品種區分不易。若依果實來分有正仔 (圓頭仔)、長圓仔、尖仔、大肚仔 (雞心仔)、二段仔 (凹凸形)、哈拉仔以及鬍鬚仔；若依果肉顏色可分為白肉種 (包括粉仔、特白肉)、紅肉種及黑肉種；依產期可分為早生種、中生種及晚生種[5]。由於種植檳榔易導致水土保持問題，且食用果實添加其他添加物可能導致口腔癌，故政府並不鼓勵種植，因此有關檳榔病害之報告甚少，而已知之病害包括疫病 (phytophthora disease)[2]，黃化病 (yellow leaf disease)[4, 23, 29]，以及細菌性條斑病 (leaf stripe disease)[1, 6, 19, 26, 27] 等，其中引起細菌性條斑病的病原菌為 *Xanthomonas campestris* pv. *arecae*[1,6,19,27] 或 *Xanthomonas vasculorum*[26]，病徵為暗綠色至淺褐色的水漬狀條斑，條斑穿透葉片兩面，擴散部位半透明，數個條斑可融合成長條狀病斑或不規則狀病斑，發病嚴重時病葉破裂轉褐化枯死，亦可感染葉鞘、葉柄[1, 6, 26, 27]，而筆者於民國 95 年間發現於不同時期台灣各地區種植之檳榔葉片上發生褐化壞疽病斑，病斑周圍伴有黃暈，並隨著葉脈擴散漸呈不規則狀，使整片葉片佈滿斑點，進而乾枯，該病徵與細菌性條斑病不同，且幾乎全年可發生。因此本研究探討造成此病害之病因，分析病原菌之特性，並進行藥劑篩選，供日後防治參考。

材料與方法

菌株來源

於台中大坑、嘉義阿里山、屏東及花蓮等地區栽培之檳榔採集葉片上具有褐化壞疽病斑，且周圍伴有黃暈產生之樣品，經 75% 酒精表面消毒後，以 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗 30 sec 後，再經無菌水漂洗 3 次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，劃線於馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar，PDA) 平板上，置 30℃ 下培養一天後，挑取單一菌落，再劃線於 PDA 平板，重覆 3 次後移至 PDA 斜面備用。或直接將漂洗後之組織塊置於 PDA 平板上置 30℃培養，待長出菌落後，挑選單一菌落，移至新的 PDA 平板，重覆 3 次後移至 PDA 斜面，將這些菌株編號爲 Ba 備用。

病原性測定

將分離所得之細菌菌株分別於 PDA 斜面上，於 30℃ 下培養一天後，懸浮於無菌蒸餾水中，以分光光譜儀 (spectrophotometer) 調整其吸收值 (A_{600}) 爲 0.3，相當於 10^8 cfu/ml 作爲接種源，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 Ba4、Ba8 (阿里山)、Ba12 (高樹)、Ba17 (美濃) 及 Ba21 (鳳林) 等 5 支菌爲供試菌株，依上述方法製備接種源後，以消毒後之注射針 (23G) 刺傷約 5-6 葉片大小之檳榔植株的葉片，同時用消毒後之棉花沾取菌液或無菌水 (接種對照) 均勻塗抹於傷口，再分別以塑膠袋套袋保濕，放置 30℃ 定溫箱中，兩天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵出現情形。再從接種植株之病斑中分離細菌，所得之細菌再接種至檳榔葉片以確定其病原性。

病原菌形態及生理生化特性測定

將 30℃ 下於 PDA 斜面上培養一天及二天之供試菌株 Ba4 (阿里山)、Ba21 (鳳林)，加入少許無菌水靜置約 5 sec 後，輕輕吸起滴於載玻片上，加入等量的 2% 鎢酸染色液 (PTA，pH 7.5，含 0.1% Bovine serum) 2 min 後，以覆有 Formvar 支持膜的銅網沾取，再以濾紙吸乾多餘水分，置於 Hitach-7000 的穿透式電子顯微鏡觀察細菌形態及鞭毛。供試菌株 Ba4 (阿里山)、Ba8 (阿里山)、Ba12 (高樹)、Ba17 (美濃)、Ba21 (鳳林) 在 PDA 斜面上於 30℃ 培養一天，進行 KOH 溶解度測試、葡萄糖之利用方式 (氧化/發酵試驗，O/F test)、氧化酶 (oxidase) 測定、菌果聚醣 (levan) 的生成、精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase) 測定、過氧化氫放氧酶 (catalase) 測試、明膠 (gelatin) 液化能力、螢光色素 (fluorescent pigment) 測定、澱粉 (starch) 水解測試、YDC (yeast extract-dextrose-$CaCO_3$) 培養基上之菌落顏色、及在 PDA 培養基上是否產生色素等生理生化性質測定[13, 15, 17, 28]。

Biolog Identification System 之細菌鑑定

將 Ba3、Ba4、Ba8 (阿里山)、Ba12 (高樹)、Ba17 (美濃)、Ba21 (鳳林) 及 Ba30 (大坑) 等 7 支菌株，分別培養於 TSA (tryptic soy agar，Bacto tryptone 15 g，Bacto soytone 5 g，sodium chloride 5 g，Bacto agar 15 g) 培養基中約 16-24 hr，之後懸浮於 IF buffer (0.4% NaCl，0.03% pluronic F-68，0.01% gellan gum) 中，調整濃度爲 63% T，分別加入 Biolog GN2 反應盤 (Biolog Inc. Hayward，CA) 中，每孔加入 150 μl 細菌懸浮液，置於 30℃ 下培養 4 - 24 hr，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) 中比對，以鑑定其種屬 (依廠商指示使用)。

脂肪酸組成分析及鑑定

取 Ba4 (阿里山) 及 Ba21 (鳳林) 分別培養於 TSA (BBL tryptic soy broth 15 g, agar 20g) 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，Mathanol 150 ml，ddH_2O 150 ml)，震盪 5-10 sec，100℃水浴 5 min，再震盪 5-10 sec，100℃ 水浴 25 min；第二步驟爲甲基化 (methylation) 反應：加入 2 ml reagent 2 (6 N NaOH 325 ml，Mathanol 275 ml)，震盪 5-10 sec，80℃水浴 10 min，冷卻試管；第三步驟爲萃取 (extraction)：加入 1.25 ml reagent 3 (Hexane 200 ml，Methyl-tert Butyl Ether 200 ml) 並上下混勻 10 min，靜置待分層，移除底層 (水層)；第四步驟爲鹼洗 (base wash)：加入 3 ml reagent 4 (NaOH 10.8 g，ddH_2O 900 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，分層完全後取上層之 2/3 有機層置 GC 小管。完成上述前處理後，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) 之資料庫比對分析結果。

專一性引子對 Pf/Pr 聚合酶連鎖反應分析

選取檳榔葉斑病之病原菌株 Ba1~6、Ba8~10 (阿里山)、Ba11~15 (高樹)、Ba17 (美濃)、Ba21~23 (鳳林) 及

Ba30 (大坑) 等 19 支菌株作爲供試菌株，並以已知之 *B. andropogonis* (玉米條斑病病原菌，購自食工所)、*B. caryophylli* (康乃馨萎凋病病原菌)、*B. glumae* (稻穀枯病病原菌) 和 *B. gladioli* pv. *gladioli* (唐菖蒲首腐病病原菌) 爲對照菌株，將各供試菌株於 PDA 培養基分別培養 24 hr 後，挑選單一菌落，個別置入微量試管中，微量試管中皆加入 400 μl 之無菌水，取完試樣後將微量試管放置於 100℃ 之水浴槽中維持 10 min，取出後以 6,000 rpm 之轉速離心 2 min，取上清液 2 μl 作爲 DNA 模版[24]。並同時以 Pf/Pr 爲引子對 (此引子對是以 16S rDNA 基因的核酸序列設計而得，對 *B. andropogonis* 菌株具專一性)[11]，進行 PCR (polymerase chain reaction) 分析。引子濃度約 0.7 mM，分別加入 PCR 各反應物：10 mM dNTPs，2 units/μl DyNazyme™ II DNA polymerase (Finnzymes Oy Inc., Finland)，以及 2.5 μl 10×的 PCR 反應緩衝液 (10 mM Tris-HCl，pH 8.8，1.5 mM $MgCl_2$，50 mM KCl 及 0.1% Triton X-100)，總反應體積爲 25 μl。PCR 增幅條件先以 96℃ 反應 5 min，之後進行 94℃ 15 sec，62℃ 15 sec，72℃ 45 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 1.5 % 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 (size marker)，最後以溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5 μg/ml) 染色觀察，並照相記錄。

16S rDNA 定序及分析

選取 Ba21 (鳳林)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[21] 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/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℃ 10 sec，55℃ 30 sec，70℃ 90 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 (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

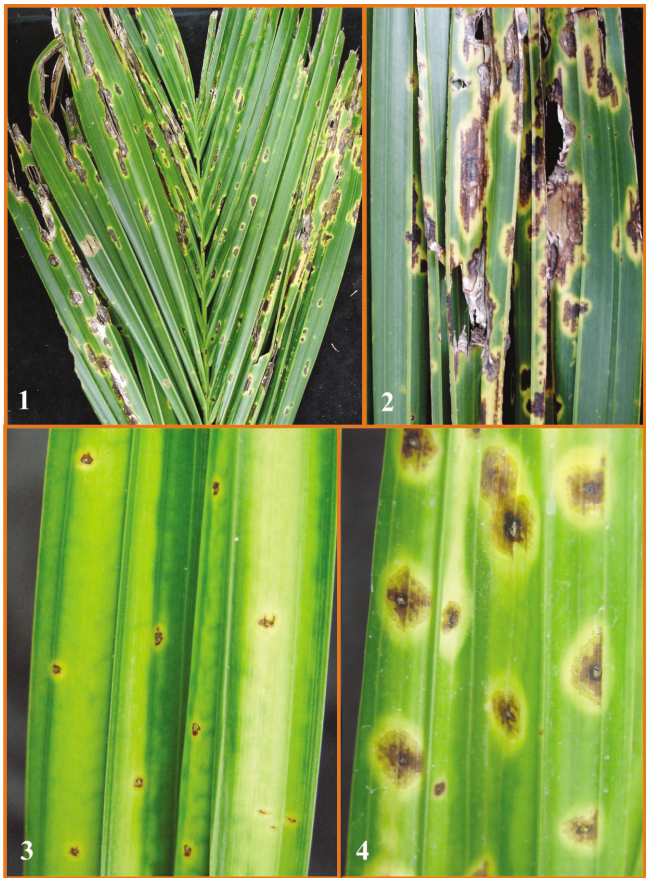
藥劑感受性測定

利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)[9] 於 PDA 培養基上測定供試檳榔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 混於水瓊脂 (water agar) 中，再覆於 PDA 平板上；將各種藥劑稀釋成不同濃度後，分別取 0.1 m l 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爲對照組，在 30℃ 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。供試菌株爲 Ba1~2、Ba4~6、Ba8、Ba10 (阿里山)、Ba11~13、Ba15 (高樹)、Ba17 (美濃)、Ba22~23 (鳳林) 及 Ba30 (大坑) 等 15 支菌株，供試 12 種市售藥劑及稀釋濃度如下：四環黴素 (Tetracycline，商品名爲鉑美樹，臺灣氰氨公司，30.3% SP，使用劑量爲 200 ppm、400 ppm、600 ppm)、鏈四環黴素 (Streptomycin Tetracycline，商品名爲枯萎寧，全台公司，10.0% SP，使用劑量爲100 ppm、200 ppm、400 ppm)、鏈黴素 (Streptomycin，商品名爲立農黴素，豈農公司，12.5% S，使用劑量爲 100 ppm、200 ppm、400 ppm)、多保鏈黴素 (Thiophanate methyl + Streptomycin，商品名爲安達菌，瑞穗公司，68.8% WP，使用劑量爲 500 ppm、1000 ppm、1500 ppm)、嘉賜黴素 (Kasugamycin，商品名爲加收米，大勝化工，2.0% S，使用劑量爲 100 ppm、200 ppm、400 ppm)；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，濃度爲 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)、氫氧化銅 (Copper hydroxide，商品名爲可產多，Kocide chemical corporation，37.5% EC，使用劑量爲 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)、三元硫酸銅 (Tribasic copper sulfate，商品名爲銅高尚，日產化工公司，27.12% SC，使用劑量爲 1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)；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，使用劑量爲1000 ppm，1500 ppm，2000 ppm)；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，使用劑量爲 500 ppm、1000 ppm、1500 ppm)、鋅錳滅達樂 (Mancozeb + Metalxyl，商品名爲全滅露-鋅錳，富農公司，80.0% WP，使用劑量爲 1000 ppm，1500 ppm，2000 ppm)；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，使用劑量爲1000 ppm、1500 ppm、2000 ppm)。

結 果

病徵

於台中縣大坑、嘉義縣阿里山鄉、屏東縣高樹鄉、高雄縣美濃鎮及花蓮縣鳳林鎮等地區栽培之檳榔葉片上出現褐化壞疽病斑，周圍伴有黃暈，之後病斑融合擴大呈不規則狀 (圖一，1)，病斑中心逐漸加深至褐化壞死 (圖一，2)。將分離所得之細菌菌株以 10^8 cfu /ml 細菌懸浮液注射接種至萬國士煙草葉片內，室溫下 24 hr內即可形成壞疽病斑，推測菌株應具病原性，再選取 Ba4 、Ba8 、Ba12 、Ba17 、Ba21 等菌株以針刺傷口接種方法分別接種於檳榔葉片上，至第四天開始出現水浸狀斑，第五天葉片出現周圍具黃暈之褐色不規則斑 (圖一，3)，之後病斑顏色漸加深呈褐色，且外圍具黃暈，病斑及黃暈漸擴大，約四星期後整個病斑中心部位壞死 (圖一，4)，接種後之病徵與田間病徵相同，且從接種之植株上可分離出同種病原菌。



圖一、檳榔葉斑病之病徵，田間自然感染之病徵 (1, 2)；人工接種後第 5 天 (3) 及 28 天 (4) 之病徵。
Fig. 1. Symptoms of bacterial leaf spot of betel palm. Naturally infected leaves (1, 2), 5 (3) and 28 (4) days after artificial inoculation with *Burkholderia andropogonis*.

表一、檳榔葉斑病菌之生理生化特性

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of *Burkholderia andropogonis* from bacterial leaf spot of betel palm

Character	Strains from betel palm	*B. andropogonis*[a]
KOH test	G (−)[b]	G (−)[b]
O/F test	O[c]	O[c]
Catalase	+	+
Fluorescent pigment on KB	−	−
Levan production	−	−
Yellow colonies on YDC	−	−
Flagellar number	1	1
Diffusible pigments	−	−
Arginine dihydrolase	−	−
Gelatin hydrolysis	−	V[d]
Starch hydrolysis	−	−
Kovacs' oxidase	−	−

In Table 1, except specifically stated, + indicated positive reaction, and − indicated negative reaction.
[a] Data from George, *et al*., 2005 and Chun, *et al*., 2001.
[b] G(-) = Gram negative.
[c] O = oxidative
[d] V：21~79% positive; positive data were from George, *et al*., 2005, and negative data were from Chun, *et al*., 2001.

形態及生理生化特性

供試檳榔菌株為革蘭氏陰性，具一根單極生鞭毛之桿狀細菌，但此細菌不易觀察到鞭毛，在 KB 培養基上不會產生螢光色素，在 YDC 培養基上不會產生黃色色素，在 PDA 培養基上不會產生色素，以氧化方式利用葡萄糖，不具氧化酶及精氨酸二水解，不能水解明膠及澱粉，不能產生菌果聚醣，具有過氧化氫放氧酶 (表一)。上述結果顯示供試菌株與 *B. andropogonis* 之生理生化特性相近。

Biolog Identification System 之細菌鑑定

以 Biolog 系統鑑定結果供試 Ba3 、Ba4 、Ba8 、Ba12 、Ba17 、Ba21 及 Ba30 等 7 株菌株，與 *B. andropogonis* 之相似值依序分別為 0.73 、0.59 、0.48 、0.65 、0.60 、0.71 及 0.71 ，而這些供試菌株符合 *B. andropogonis* 之機率 (probability) 為 99~100% 。

脂肪酸組成分析及鑑定

以 GC-MS 進行分析後，將所得資料與輸入 MIDI Sherlock® (MIS) 電腦資料庫中比對，結果顯示 Ba4 及

Ba21 與 *B. andropogonis* 之相似值分別爲 0.74 與 0.87。

專一性引子對 Pf/Pr 聚合酶連鎖反應分析

以 *B. andropogonis* 之專一性引子對 Pf/Pr[11] 進行 PCR 之結果，顯示供試之 19 支檳榔葉斑病菌株及玉米條斑病菌 *B. andropogonis* 均可產生大小約爲 410 bp 之專一性 DNA 條帶，而稻穀枯病菌 *B. glumae* (data not shown) 、康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli* 以及唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladiol* 皆無此一條帶產生 (圖二)。

16S rDNA 定序及鑑定

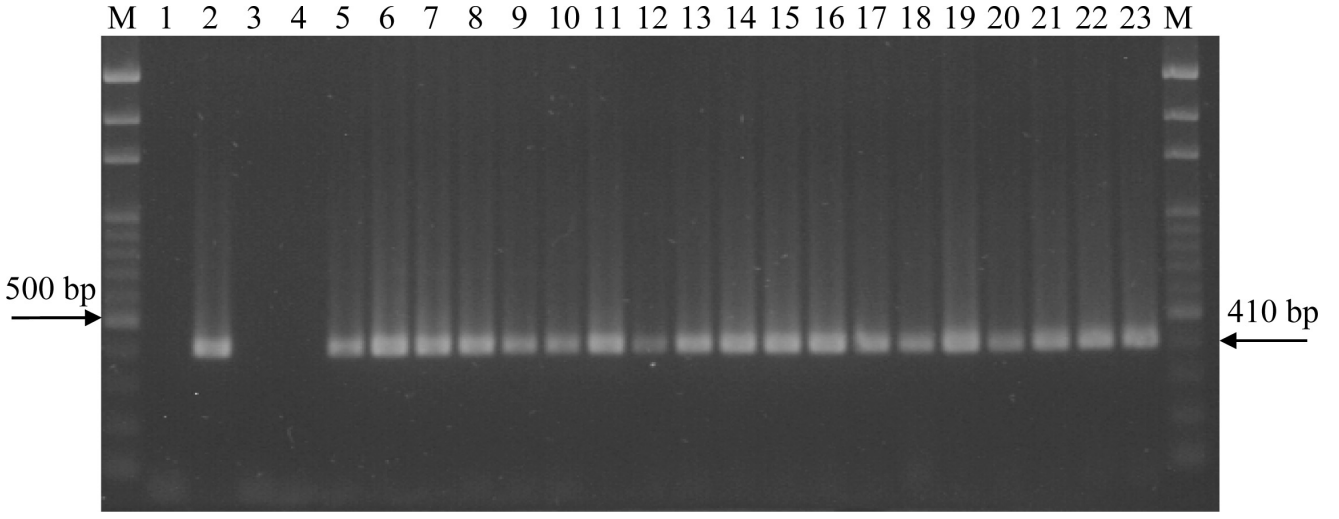
以對細菌 16S rDNA 具專一性之引子對 f8-27/r1510[21] 進行 PCR 增幅與 DNA 定序分析，再將所得序列以 BLAST 搜尋 NCBI 和 SDSC-Biology Workbench database 之相似序列，結果顯示 Ba21 與 *B. andropogonis* 16S rDNA partial sequences (GenBank accession number DQ786950 for *B. andropogonis* strain 6329 and DQ786951 for *B. andropogonis* strain 6369) 序列相似度 (identity) 達99%。

藥劑之感受性

供試 15 株檳榔葉斑病菌株對市售 12 種藥劑在一般使用濃度下感受性測試之結果顯示 12 種藥劑在測試之濃度下對葉斑病菌之生長均有抑制效果 (表二)，其中又以四環黴素之效果最佳，依其抑制效果之順序爲四環黴素、歐索林酸、嘉賜黴素、嘉賜銅、氫氧化銅、鏈四環黴素、多保鏈黴素、三元硫酸銅、鋅錳乃浦、鏈黴素、鹼性氯氧化銅及鋅錳滅達樂。

討　論

檳榔已知之病害有疫病[2]，細菌性條斑病[1, 6, 19, 26, 27]及黃化病等[4, 23, 29]，其中細菌性條斑病與本研究之檳榔葉片上的病徵有所不同，從檳榔病葉上分離所得之細菌經柯霍氏法則確認爲病原菌之後，初步進行生理生化性質測定，顯示該病原細菌爲革蘭氏陰性，桿狀之好氣菌，而在前人研究中 *B. andropogonis* 是具有單極生一或二根鞭毛[12, 16]，具游動性[7, 16]，而在本試驗之病原菌以 TEM 進行觀察時，並不容易觀察到鞭毛，經多次觀察發現此病原菌大部分爲無鞭毛狀態，偶而可見單極生一根鞭毛，顯示縱使培養一天的檳榔葉斑病菌其鞭毛脫落情形普遍，而培養兩天之病原菌鞭毛脫落及斷裂情形更嚴重，此病原菌在 KB 培養基上不會產生螢光色素，在 YDC 培養基上不會產生黃色色素，推論此病原細菌屬於 *Burkholderia* 屬。在 *Burkholderia* 屬內有 19 種細菌[16]，包括 *B. andropogonis*、*B.*



圖二、應用 PCR 反應以引子對 Pf/Pr 鑑定檳榔細菌性葉斑病菌。Lane M, DNA marker；lane 1, negative control；lane 2, *B. andropogonis* (玉米條斑病病原菌)；lane 3, *B. caryophylli* (康乃馨萎凋病病原菌)；lane 4, *B. gladioli* pv. *gladioli* (唐菖蒲首腐病病原菌)；lane 5 - 23, 檳榔菌株 Ba1~6、Ba8~15、Ba17、Ba21、Ba22、Ba23、Ba30。

Fig. 2. Identification of Burkholderia andropogonis isolated from diseased tissues of betel palm using polymerase chain reaction with primer pair Pf/Pr. Lane M, Bio 100 DNA marker; lane 1, negative control ; lane 2, *B. andropogonis* from bacterial stripe of corn; lane 3, *B. caryophylli* from wilt disease of orchids; lane 4, *B. gladioli* pv. *gladioli* from neck rot of gladioli; lane 5 - 23, strains Ba1~6, Ba8~15 , Ba17, Ba21, Ba22, Ba23, and Ba30, respectively, from bacterial leaf spot of betel palm.

表二、各種農藥在不同濃度下對檳榔葉斑病菌生長之抑制效果

Table 2. Growth inhibition of strains of *Burkholderia andropogonis* by various agrochemicals at different concentrations

Chemical	Concentration (in ppm)	No. of strains inhibited/ No. of strains tested	Inhibition zone (cm in diam.)
Tetracycline	200	12/12	2.07-3.67
(30.3% SP)	400	12/12	2.17-3.97
	600	12/12	2.43-4.23
Streptomycin	100	12/12	0.10-1.93
+Tetracycline	200	12/12	0.47-2.47
(10.0% SP)	400	12/12	0.67-2.67
Streptomycin	100	12/12	1.30-1.87
(12.5% L)	200	12/12	1.50-2.20
	400	12/12	1.60-2.47
Thiophanate methyl	500	12/12	1.27-2.17
+ Streptomycin	1000	12/12	1.57-2.43
(68.8% WP)	1500	12/12	1.67-2.57
Kasugamycin	100	12/12	0.57-3.07
(2.0% S)	200	12/12	0.87-3.20
	400	12/12	1.20-3.37
Copper oxychloride	1000	12/12	1.13-2.00
(85.0% WP)	1500	12/12	1.30-2.20
	2000	12/12	1.40-2.33
Copper hydroxide	1000	12/12	1.37-2.13
(77.0% WP)	1500	12/12	1.07-2.43
	2000	12/12	1.10-2.80
Tribasic copper sulfate	1000	12/12	0.47-2.20
(27.12% F)	1500	12/12	0.67-2.20
	2000	12/12	0.77-2.27
Mancozeb	1000	12/12	1.00-2.03
(80.0% WP)	1500	12/12	1.23-2.13
	2000	12/12	1.33-2.50
Kasugamycin	500	12/12	1.27-2.17
+ Copper oxychloride	1000	12/12	1.57-2.63
(81.3% WP)	1500	12/12	1.67-2.80
Mancozeb + Metalxyl	1000	12/12	0.50-1.53
(58.0% WP)	1500	12/12	0.60-1.63
	2000	12/12	0.67-1.80
Oxolinic acid	1000	12/12	2.13-3.20
(20.0% WP)	1500	12/12	2.27-3.60
	2000	12/12	2.40-3.73

caryophylli、*B. cepacia*、*B. gladioli*、*B. glumae* 及 *B. mallei* 等 6 種植物病原菌[16]。Chun 等人[13] 指出 *B. andropogonis* 具有水解白明膠的能力，與本研究結果不同，但徐[7]、Bradbury[12]、Moffett[22] 以及 George 等人[16] 研究指出 *B. andropogonis* 不具有水解白明膠之能力，顯示並非所有之 *B. andropogonis* 皆能水解白明膠。此外，以 *B. andropogonis* 16S rDNA 序列設計的專一性引子對 Pf/Pr[11] 進行 PCR 測試，可自供試檳榔菌株及玉米條斑病菌 *B. andropogonis* 萃取而得的全菌 DNA 中增幅出大小約 410 bp 之專一性 DNA 條帶，而 *Burkholderia* 屬內的其他植物病原菌，例如 *B. caryophylli* (康乃馨萎凋病菌)、*B. gladioli* pv. *gladioli* (唐菖蒲首腐病菌) 及 *B. glumae* (稻穀枯病原菌) 則沒有此一條帶產生。綜合上述各項生理生化測定結果，又根據 Biolog 鑑定系統測試、脂肪酸組成分析及 16S rDNA 序列比對的結果，鑑定自檳榔葉片所分離之致病菌株爲 *B. andropogonis*。

B. andropogonis 之寄主範圍廣泛，包括單子葉與雙子葉植物，如玉米、高粱、黑麥、大芻草、齒舌蘭等單子葉植物[7, 12, 22, 30]，以及角豆、鷹嘴豆、苕子、藜豆、野豌豆、九重葛、康乃馨、星辰花、天堂鳥、苜蓿、巴西水竹、紫錦草、咖啡、油栗、高叢藍莓等雙子葉植物[10, 12, 14, 18, 20, 22, 25]，通常在植物葉片上造成深紅色、紅色、黃色、棕褐色或黑色帶黃暈之條斑病紋，或者在莖上形成聯合狀及環狀之淺紅褐色帶有水浸狀之病斑[10, 20, 30]，Bradbury[12] 指出 *B. andropogonis* 寄生於單子葉植物時，最主要寄主種類爲禾本科植物，病斑呈現條狀，而雙子葉植物中主要寄主爲豆科植物，病徵爲葉斑，有時亦會使植物之莖部腐爛。供試檳榔菌株接種檳榔引起之病徵與田間發生之病徵均爲不規則之褐化壞疽病斑，且周圍伴有黃暈產生，嚴重者導致整片葉片黃化乾枯，因此依其病徵定名爲檳榔葉斑病 (bacterial leaf spot of betel palm)。

雖已有許多文獻探討 *B. andropogonis* 在植物上造成之病害及病徵，但探討之植物多爲禾本科[7, 12]、豆科[12] 或蘭科[30]，尚未見與檳榔或棕櫚科相關病害之報導，而以檳榔爲寄主之細菌性病害僅有條斑病的報導[1, 6, 19, 26, 27]，其致病原屬於 *Xanthomonas*，與本研究之病原屬 *Burkholderia* 不同。在台灣目前僅發現 *B. andropogonis* 可引起玉米、高粱以及掃高粱之病害[7]，徐等人[7] 曾針對玉米條斑病進行病原菌之分離與生理生化特性之分析，確認其致病菌爲 *B. andropogonis*，但尚未有該菌可引起檳榔病害的報告，因此本研究首次確認 *B. andropogonis* 亦可引起檳榔葉斑病。

以市售 12 種藥劑測試在一般使用濃度下對該病菌生長之抑制效果，顯示均能抑制病原菌生長，依照抑制效果之順序爲四環黴素、歐索林酸、嘉賜黴素、嘉賜銅、氫氧化銅、鏈四環黴素、多保鏈黴素、三元硫酸銅、鋅錳乃浦、鏈黴素、鹼性氯氧化銅及鋅錳滅達樂等，顯示含鏈黴素或四環黴素以及含銅類之藥劑對於防治檳榔葉斑病菌生長具有抑制效果，而所有藥劑中又以四環黴素效果爲最佳，因此可利用含鏈黴素或四環黴素及含銅劑類之藥劑進行田間防治試驗，以證實其防治效果。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. 文衍堂、洪祥千. 1989. 海南島檳榔細菌性條斑病病原菌鑑定. 熱帶作物學報 10：77-82。
2. 安寶貞、王姻婷、蔡志濃. 2004. 台灣檳榔疫病之研究。植病會刊 13：341 (摘要)。
3. 行政院農業委員會. 2006. 農業統計年報. 86 頁. 行政院農業委員會. 台北市。
4. 金開璿、孫福生、陳慕容、羅大全、蔡希灼. 1995. 檳榔黃化病的病原研究初報. 林業科學 31：556-558。
5. 柯立祥. 2005. 檳榔. 農作篇二 (果樹)， 145-146 頁. 黃美華編. 行政院農業委員會. 台北市。
6. 洪祥千、陳家俊、葉清仰、餘映忠、陳勇輝. 1992. 海南島檳榔細菌性條斑病的發生規律. 熱帶作物學報 13：87-94。
7. 徐世典、張瑞璋、曾國欽、梁榮光. 1991. 台灣發生之玉米細菌性條斑病. 植保會刊 33：376-383。
8. 劉業經、呂福原、歐辰雄. 1994. 台灣樹木誌. 中興大學農學叢書. 733 頁。
9. 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.
10. Anderson, D. and Tisserat, N. 1994. Bacterial leaf spot of statice caused by *Pseudomonas andropogonis*. Plant Dis. 78: 1218.
11. Bagsic, 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.
12. Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C. A. B. International, U. K. pp 114-115.
13. Chun, W. and Jones, J. B. 2001. E. *Burkholderia*. Pages 142-144. in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
14. Cother, E. J., Noble, D., Peters, B. J., Albiston, A. and Ash, G. J. 2004. A new bacterial disease of jojoba (*Simmondsia chinensis*) caused by *Burkholderia*

andropogonis. Plant Pathol. 53: 129-135.
15. De Boer, S. H. and Kelman, A. 2001. B-2. *Erwinia* soft rot group. Page 60. in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
16. George, M. G. Julia, A. B. and Timothy, L. 2005. Family I. Burkholderia *fam. nov*. Pages 575-600. in: Bergey's manual of systematic bacteriology. part c. Springer. N.Y, USA.1388 pp.
17. Kiewnick, A. B. and Sands, D. C. 2001. C. *Pseudomonas*. Page 93. in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
18. Kobayashi, D. Y., Stretch, A. W. and Oudemans, P. V. 1995. A bacterial leaf spot of highbush blueberry hardwood cutting caused by *Pseudomonas andropogonis*. Plant Dis. 79: 839-842.
19. Kumar, S. N. S. 1983. Epidemiology of bacterial leaf stripe disease of arecanut palm. Trop. Pest Manage. 29: 249-252.
20. Li, X. and Boer, S. H. D. 2005. First report of *Burkholderia andropogonis* causing leaf spots of *Bougainvillea* sp. in Hong Kong and clover in Canada. Plant Dis. 89: 1132.
21. 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.
22. Moffett, M. L., Hayward, A. C. and Fahy, P. C. 1986. Five new hosts of *Pseudomonas andropogonis* occurring in eastern Australia: host range and characterization of isolates. Plant Pathol. 35: 34-43.
23. Nayar, R. and Seliskar, C. E. 1978. Mycoplasma like organisms associated with yellow leaf disease of *Areca catechu* L. Eur. J. For. Path. 8: 125-128.
24. Opina, N., Tavner, F., Holloway, G., Wang, J. F., Li, T. H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A.C., Krishnapillai, V., Hong, W. F., Holloway, B. W. and J. N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5: 19-33.
25. Ramundo, B. A. and Claflin, L. E. 2005. Identification of *Burkholderia andropogonis* with a repetitive sequence BOX element and PCR. Cur. Microbiol. 50: 52-56.
26. Rao, Y. P. and Mohan, S. K. 1970. A new bacterial leaf stripe disease of arecanut (*Areca catechu*) in Mysore State. Indian Phytopath. 23: 702-704.
27. Rao, Y. P. and Mohan, S. K. 1976. Bacterial leaf stripe of arecanut caused by *Xanthomonas arecae* sp. nov. Indian Phytopath. 29: 251-255.
28. Schaad, N. W. 2001. Initial identification of common genera. Pages 7-10. in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
29. Srinivasan, N. 1982. Significance of deranged chlorophyllase-chlorophyll system associated with yellow leaf disease of arecanut. Indian Phytopath. 35: 530-531.
30. Takahashi, Y. Takahashi, K., Watanabe, K. and Kawano, T. 2004. Bacterial black spot caused by *Burkholderia andropogonis* on *Odontoglossum* and intergeneric hybrid orchids. J. Gen. Plant Pathol. 70: 284-287.

ABSTRACT

Hseu, S. H.[1], Lai, W. C.[1], Pan, Y. P[1]. and Lin, C. Y.[1, 2] 2007. Occurrence of bacterial leaf spot of betel palm caused by *Burkholderia andropogonis* and inhibition of bacterial growth by agrochemicals. Plant Pathol. Bull. 16: 131-139 ([1] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.; [2] Corresponding author, E-mail: cylin@wufeng.tari.gov.tw)

In 2006, a leaf spot disease was found on betel palm in several locations in Taiwan. The infected leaves showed irregular brown necrotic spots surrounded by yellowish halo. A gram-negative, rod-shaped bacterium was consistently isolated from the diseased tissues. The bacterium was identified as *Burkholderia andropogonis* based on its physiological characteristics, the Biolog GN MicroPlate system, the MIS system for cellular fatty acid analysis, polymerase chain reaction (PCR) with a pair of primers specific for *B. andropogonis*, 16S rDNA sequence and pathogenicity tests. In *vitro* screening for the efficacy of different agrochemicals to inhibit bacterial growth on PDA plates showed that all tested chemicals, including copper bactericides, antibiotics, oxolinic acid, and carbamates, were effective. Among them, tetracycline was most effective.

Key words: betel palm, bacterial leaf spot, agrochemical screening