

溫度對青枯病菌致病力之影響與馬鈴薯品種 (系) 對青枯病反應之初步評估

莊明富¹ 羅淑芳² 林靜宜^{3,*}

摘要

莊明富、羅淑芳、林靜宜。2015。溫度對青枯病菌致病力之影響與馬鈴薯品種 (系) 對青枯病反應之初步評估。台灣農業研究 64(2):89–98。

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起之細菌性萎凋病為熱帶及亞熱帶地區作物關鍵病害之一。多數青枯病菌株於高溫對寄主具有病原性，部分菌株在 20°C 以下則會失去其病原性。然而，分類上屬於第三生理小種、第二生化型 (R3Bv2) 的菌株於冷涼的溫度條件下仍可感染寄主植物，造成病害。本研究中調查 2013 年 11 月至 2014 年 3 月期間，台灣雲林縣及嘉義縣馬鈴薯栽培區萎凋病之發病率為 0–32%，分離其病原菌，發現皆為青枯病菌，其中 64.7% 之分離株為第二生化型之菌株，其餘為第三生化型之菌株，顯示青枯病菌第二生化型之菌株為目前危害台灣馬鈴薯之主要菌株。此外，亦於不同溫度下比較台灣常見 3 種 *R. solanacearum* 生化型菌株對茄科作物之致病力差異。結果顯示在 24°C 及 28°C，3 種生化型菌株 (RS1102、RS1118 及 RS1125) 皆對試驗植物具有良好的致病力，接種後 20 d 罹病度 (disease severity) 介於 77–100%。但於 20°C 時，RS1125 (第三生化型) 則對馬鈴薯失去其病原性，而 RS1118 (第二生化型) 則表現較其他兩種生化型菌株較強之毒力，接種 20 d 後馬鈴薯及番茄上之罹病度為 80–100%。青枯病為馬鈴薯生產栽培之限制因子之一，故本研究利用 10 種不同之馬鈴薯品種 (系) [P86 (「克尼伯」)、P90 (「大西洋」)、P91 (「種苗 2 號」)、P92 (「吉比達」)、P95 (「pike」)、P117 (「Chipeta」, 「聯華」)、P120 (「台農 1 號」)、P89、16-13 及 T3] 針對第二生化型之菌株進行抗病分析，以期篩選對青枯病具有抗性之品種。結果顯示，品種間表現出不同程度之耐性，但未獲得表現高抗 (無萎凋) 之抗病品種。接種 35 d 後，品種間罹病度為 10–100%，其中以 T3 品種之罹病度最低。經上述試驗結果可知，溫度為影響青枯病發病率之因素之一，台灣常見之 3 種青枯病菌生化型菌株中，則以第二生化型菌株在低溫時對馬鈴薯之危害程度為最高、威脅性最大。

關鍵詞：青枯病菌、生化型、溫度、抗感病性。

前言

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L., 英名 potato) 為茄科茄屬 1 年生草本植物，原產於南美洲秘魯及安地斯山一帶。馬鈴薯球莖內含豐富的澱粉、蛋白質、礦物質及維生素等養分，且單位面積產量高，為多數歐美地區的主食，亦為世界重要糧食作物之一。馬鈴薯偏好冷涼

且不潮濕的氣候條件，因此台灣普遍於秋、冬季栽種馬鈴薯。根據農委會 2012 年統計年報資料 (<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>) 顯示，每年栽培總面積約為 2 千多公頃，以中南部為主要栽培地區，其中以雲林縣栽培面積最大，其次分別為台中市、嘉義縣及台南市等地區。馬鈴薯依生長期長短，可分為早生及中晚生品種，薯肉則有白色

投稿日期：2014 年 8 月 14 日；接受日期：2014 年 12 月 1 日。

* 通訊作者：eris2024@dns.caes.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系前助理研究員。台灣 嘉義市。

² 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

³ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

與黃色之分。目前台灣生產之馬鈴薯主要提供鮮食與加工之用，栽培品種主要有「克尼伯」(大葉種)、「種苗 2 號」、「五峰」等，其中以薯大、白皮白肉、薯形好且兼具鮮食、加工特性的早生種「克尼伯」栽培面積最廣。

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 為世界最重要的植物病原菌之一，屬於格蘭氏陰性菌，寄主範圍廣泛，可危害多達 53 科 200 種以上寄主植物，主要寄主為番茄、馬鈴薯等茄科作物 (Denny 2006)。青枯病菌適合熱帶、亞熱帶及溫暖潮濕地區，感染後在罹病植株造成葉片失水、萎凋及維管束褐化等病徵，最終導致作物萎凋死亡，造成嚴重的經濟損失 (Hayward 1991; Elphinstone 2005; Denny 2006)。青枯病菌為一複合種 (species complex)，由許多不同的菌系組成，在生理特性、遺傳表現及寄主範圍等方面具有豐富的多樣性 (Hayward 2000; Genin & Boucher 2004; Fegan & Prior 2005)，目前有數個不同的系統用於定義與分類菌系間的差異。傳統分類系統利用菌株來源及寄主範圍的差異，將青枯病菌區分為 5 個生理小種 (race) (Buddenhagen *et al.* 1962; He *et al.* 1983)；或是根據菌株對碳水化合物利用能力的利用能力，區分為 6 種生化型 (biovar; bv) (Hayward 1964; Denny 2006)，然而，生理小種與生化型之間並無絕對的相關性；近來則根據 16S-23S 核糖體核酸基因間之內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 序列設計專一性引子 (Fegan & Prior 2005)，配合青枯病菌的專一性引子對 (Opina *et al.* 1997) 進行多重聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR)，依電泳圖譜結果將 *R. solanacearum* 區分為 4 演化型 (phyloptype)，此演化型分類系統與菌株的地域來源有相關性 (Fegan & Prior 2005; Prior & Fegan 2005)。

台灣氣候高溫多濕，青枯病常於夏季或高溫多濕的氣候條件下發生嚴重，在冬季則較少發生。然而，台灣馬鈴薯主要栽培區中的台中市神岡區、后里區及雲林縣斗南、虎尾地區分別於 1999 年冬天與 2006 年底至 2007 年初期間於馬鈴薯栽培田出現大面積的萎凋病徵，受害嚴重的田區其罹病率高達 90%，造成極大的

經濟損失，經診斷鑑定結果顯示引起萎凋的病原菌為 *R. solanacearum* 第 3 生理小種，第 2 生化型 (R3Bv2) (Chiou 2002; Wu *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011)，而非台灣本土普遍分布、可感染茄科等多種植物之第 1 生理小種 (race 1)、第 3 或第 4 生化型 (bv 3 或 bv 4) (Hsu 1991; Lin 2008)。*R. solanacearum* race 3/bv 2 的寄主範圍較第 1 生理小種窄，主要對馬鈴薯、番茄具有強病原性，且其耐寒性較第 1 生理小種強，在冷涼的氣候條件下可造成嚴重病害，此菌株所造成之馬鈴薯青枯病，又稱為褐腐病 (brown rot)，罹病之馬鈴薯植株地上部出現萎凋病徵，地下部薯塊則出現褐腐徵狀，已成為國外馬鈴薯栽培區的重要病害，並造成熱帶高地及溫帶地區馬鈴薯嚴重的經濟損失 (Ciampi & Sequeira 1980)。

溫度對青枯病菌危害寄主植物的能力具有關鍵性影響，多數的青枯病菌株於高溫環境下具有良好的致病力，部分的菌株則於低溫的條件下仍具有致病力。先前研究報告指出，在不同的溫度條件下 (16、20、24 及 28°C)，將馬鈴薯植株分別接種 race 1 或 race 3 菌株，結果發現於高溫 (28°C) 下，所有的供試菌株其致病力並無差異，但於低溫環境下 (16°C)，僅有 2 株 race 3 菌株對馬鈴薯仍具有強致病力 (Ciampi & Sequeira 1980)。於番茄上分別接種 race 1 或 race 3 菌株，亦發現相似的結果，於高溫 (28°C) 環境下，race 1 與 race 3 供試菌株毒力並無顯著差異，但於 20°C 環境下，race 3 菌株則對番茄有較強的毒力 (Milling *et al.* 2009)。此外，研究指出來自相同地區的 11 株青枯病菌株，在 30°C 環境下對番茄或馬鈴薯皆具有良好的致病力，但於 18°C 之低溫環境下，部分 race 1 的菌株不會對寄主植物造成病徵，但 race 3 菌株對寄主植物仍具致病力 (Bocsanczy *et al.* 2012)。

青枯病菌為土壤傳播性細菌，可於土壤中存活 (Denny 2006)，主要經由根部自然傷口、移植或機械性等方式造成的傷口侵入寄主植物之維管束造成系統性感染、阻塞水分輸送，最後使植物萎凋死亡 (Denny 2006)。青枯病菌亦可經由根與根之間的接觸感染鄰近植株，或藉

由受污染的水源、種苗或病土傳播 (Kelman & Sequeira 1965; McCarter & Jaworski 1968; Denny 2006)，在防治上具有相當的困難度。目前尚未有合適的化學藥劑可供使用，僅能以選擇健康種苗 (薯)、田間衛生管理、與非寄主輪作及抗病育種等方式加以管理 (Hsu 1991; Denny 2006)，其中以種植抗病品種為根本的防治方法。因此，本研究除了探討 3 種台灣常見之茄科青枯病生化型菌株在不同溫度條件下，對茄科作物 (馬鈴薯及番茄) 致病力之影響，以瞭解台灣茄科青枯病菌的發病特性，提供病害管理及防治參考，並利用農業試驗所嘉義分所收集保存的馬鈴薯品種作為材料，以人工接種方式分析其對馬鈴薯青枯病 race 3/bv 2 之抗/感病性，藉以篩選出可作為日後抗病育種之潛力品系 (種)。

材料與方法

馬鈴薯青枯病田間萎凋率調查

本研究於 2013 年 11 月至 2014 年 3 月期間，調查雲林及嘉義地區共 22 處之馬鈴薯栽培田區，每個田區隨機調查 3 點，每點調查 100 棵植株之萎凋率 (萎凋植株數/調查總株數 × 100%)，取其平均數，以計算各田區呈現萎凋病徵之萎凋率。並將自田間蒐集之萎凋馬鈴薯植株或薯塊，攜回實驗室後，以 0.5% 次氯酸鈉表面消毒 3 min，並經 3 次無菌水漂洗後置於無菌操作箱風乾，再切取病健部組織加入無菌水研磨，利用 TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 鑑別培養基 (Kelman 1954) 進行菌株分離與純化，經 3 次單一菌落純化培養後，利用青枯病專一性引子對 (759 : 5'-GTCGCC-GTCAACTCACTTTCC-3'; 760 : 5'-GTCGC-CGTCAGCAATGCGGAATCG-3') (Opina *et al.* 1997) 進行聚合酶連鎖反應，以鑑定馬鈴薯青枯病菌。

生化型測定

根據 Hayward (1964) 之方法，測定供試馬鈴薯青枯病菌株利用碳水化合物之能力，作為區分青枯病菌株生化型之依據。測定的碳水化合物分別為乳糖 (lactose)、麥芽糖 (malt-

ose)、纖維雙糖 (cellobiose) 等 3 種雙醣及甘露糖 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、半乳糖醇 (dulcitol) 等 3 種六醣醇。

供試菌株來源及保存

本研究中使用之青枯病菌株有 RS1118 (bv 2)、RS1125 (bv 3) 及 RS1102 (bv 4)。其中 RS1118 及 RS1125 菌株係分離自嘉義市罹青枯病之馬鈴薯，RS1102 菌株則是來自嘉義市罹病番茄之分離株。上述之菌株皆利用青枯病專一性引子對 (Opina *et al.* 1997) 進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 檢測確認為青枯病菌，並根據 Hayward (1964) 的方法，測定青枯病菌菌株利用碳水化合物之能力，確認其生化型後，保存於生理食鹽水中以供日後試驗使用。

青枯病菌接種源製備

將保存於生理食鹽水中之青枯病菌利用滅菌過後的移植環畫線培養於 TTC 培養基 [1 g 酪蛋白 (casein hydrolysate), 10 g 蛋白胨 (peptone), 5 g 葡萄糖 (glucose), 20 g 瓊脂 (agar)，配製成 1 L 培養基經高溫滅菌後再加入 5 mL 之 1% TTC] (Kelman 1954)，挑取單一菌落於 YDC (Yeast extract dextrose calcium carbonate) 培養基 [10 g 酵母抽出物 (yeast extract), 20 g 葡萄糖 (dextrose), 20 g 碳酸鈣 (calcium carbonate) 及 15 g 瓊脂 (agar) 配製成 1 L 培養基] (Wilson *et al.* 1967)，經 48–72 h 增量培養後，以無菌水洗出成為細菌懸浮液。懸浮液利用光電比色計於 600 nm 波長下測定並調整其吸光值 (optical density; OD) 為 0.3，菌量濃度約為 10^8 cfu mL⁻¹ 即成為接種源。

溫度對不同青枯病菌株致病力之影響

試驗使用之植物分別為番茄 (*Solanum lycopersicum*，「農友 301」，農友種苗股份有限公司) 與馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.，P86，「阿拉斯加大葉種」)。番茄種子於發芽後移植至培養土中生長 4–5 wk 作為接種試驗使用；馬鈴薯則是使用馴化後 10 wk 之組織培養苗作為接種植物。接種使用的青枯病菌株有 RS1118 (bv 2)、RS1125 (bv 3) 及 RS1102

(bv 4)。接種方法參考 Tans-Kersten *et al.* (1998) 之土壤灌注法，並做適當修正，其方法如下：接種前先以解剖刀在植株莖基部周圍穿刺 3 個孔，製造根系傷口，再以微量吸管吸取 1 mL 青枯病菌懸浮液 (10^8 CFU mL⁻¹)，平均加入孔中進行接種，每組分別接種處理 10 株番茄與馬鈴薯，試驗共進行 2 次。接種後的植株分別移入設定 20、24 及 28°C 之定溫生長箱中 (照光時間白天/夜晚分別為 11 與 13 h) 定期觀察其罹病等級及發病情形。青枯病罹病指數分為 5 級，0 級：無病徵、1 級：植物有逆境徵兆、2 級：1–33% 葉片萎凋或黃化、3 級：34–66% 葉片萎凋或黃化、4 級：67–100% 葉片萎凋或黃化、5 級：植株完全萎凋 (Swanson *et al.* 2007)，再依照公式計算其罹病度 (disease severity)。

$$\text{Disease severity} = \frac{\sum ni \times i}{N \times 5} \times 100\%$$

i：發病等級；ni：發病 i 級的株數；
N：調查的總株數。

馬鈴薯品種 (系) 對青枯病之抗 (感) 病性測定

供試馬鈴薯品種 (系) 共有 10 個，其中

屬於馬鈴薯品種的有 P86 (‘Kennebec’，「克尼伯」)、P90 (‘Atlantic’，「大西洋」)、P91 (‘Tss-II’，「種苗 2 號」)、P92 (‘Chipeta’，「吉比達」)、P95 (‘pike’)、P117 (‘Chipeta’，「聯華」) 與 P120 (‘TN-1’，「台農 1 號」)，而屬於品系的有 P89、16-13 及 T3 (表 1)，上述供試植物皆由行政院農委會農業試驗所嘉義分所農藝系提供。供試馬鈴薯採用薯球苗進行接種。薯球為前 1 年以組培苗繁殖後收集，經 4°C 冰箱保存一段時間打破休眠。發芽之薯球切塊後，種植於 4 吋黑色塑膠軟盆中，3–4 wk 後以灌注法接種青枯病菌生化型 2 (RS1118; bv 2)，接種前先以解剖刀穿刺土壤製造 3 個根系傷口，每株加入 1 mL 細菌懸浮液 (濃度約 10^8 CFU mL⁻¹)，每 1 品種接種 10 株，接種後植株置於定溫箱 (26°C/20°C) 中管理，定期依照罹病等級調查青枯病發病情形。

結果

馬鈴薯青枯病田間萎凋率調查

2013 年 11 月至 2014 年 3 月於雲林及嘉義地區共 22 處田區進行馬鈴薯青枯病罹病率調查。結果顯示其萎凋率介於 0–32% 之間，

表 1. 不同馬鈴薯品種 (系) 對青枯病菌之抗感性測試。

Table 1. Susceptibility of potato cultivars to *R. solanacearum* (R3Bv2).

No.	Cultivar/line	Days of post inoculation (dpi)					
		9		20		35	
		Wilt (%) ^z	DS (%) ^y	Wilt (%)	DS (%)	Wilt (%)	DS (%)
P86	Kennebec	- ^x	-	10	8	50	38
P89	P89	-	-	50	44	80	72
P90	Atlantic	-	-	50	44	60	60
P91	Tss-II	10	10	10	10	30	18
P92	Chipeta	-	-	10	8	60	44
P95	Pike	-	-	50	38	80	58
16-13	16-13	10	4	50	40	100	100
T3	T3	-	-	10	8	10	10
P117	Chipeta	10	6	50	30	50	50
P120	TN-1	10	10	20	18	20	20

^z Wilt (%): percentage of wilted plants calculated from each potato cultivar.

^y DS (%): percentage of disease severity calculated from potato cultivar.

^x -: no symptom was observed.

其中來自雲林地區的田區 1、2、3 及 10 之萎凋率分別為 6.4、10.8、32 及 15% (表 2)，此 4 處田區採集之罹病株於橫切莖基部之維管束均有褐化的現象，將具有維管束褐化之莖段組織直立於裝有清水之燒杯中，可發現菌流 (streaming) 自維管束中湧出。進一步利用 TTC 鑑別培養基進行分離與純化，經 27°C 培養 3–4 d 後，可於培養基上發現流質狀不規則圓形或橢圓形，中間為粉紅色，外圍為乳白色之典型青枯病菌菌落型態，共分離純化 17 株菌株，並以青枯病菌之專一性引子對進行 PCR 鑑定，確認為青枯病菌 (表 2)。

生化型測定

將分離純化之 17 株菌株經碳水化合物利用能力檢測，發現其中 11 株菌株 (64.7%) 僅會對 3 種雙糖，包含乳糖、麥芽糖及纖維雙糖產生氧化作用，卻無法利用測試之 3 種六醣醇，如甘露糖、山梨聚糖醇及半乳糖醇，分類上屬於第 2 生化型菌株；其他 6 株菌株 (35.3%) 則可利用試驗之 3 種雙糖及 3 種六醣醇，分類上屬於第 3 生化型菌株 (表 2)，而此 6 株菌株分別分離自田區 1 及田區 10，而田區 2 及田

區 3 分離之菌株皆為第 2 生化型 (表 2)。由測定結果可知，於 2013 年 11 月至 2014 年 3 月於雲林地區分離純化之馬鈴薯青枯病菌，分離菌株之生化型分別為 bv 2 或 bv 3。

溫度對不同青枯病菌株致病力之影響

利用青枯病菌 RS1118 (bv 2)、RS1125 (bv 3) 及 RS1102 (bv 4) 分別接種馬鈴薯及番茄，並觀察其在不同溫度下之發病情形，結果顯示在 20°C 下馬鈴薯分別接種 bv 2、3 及 4 之青枯病菌後第 7 天，罹病度皆為 0%，至第 20 天為 80、0 及 77% (表 3)。番茄接種後第 7 天罹病度分別為 8、0 及 0%，第 20 天分別為 100、68 及 77% (表 4)。在 24°C 下馬鈴薯接種 bv 2、3 及 4 之青枯病菌後第 4 天，罹病度分別為 18、5 及 6%，第 15 天為 85、92 及 100%，第 20 天為 98、92 及 100% (表 3)。番茄接種後第 4 天，罹病度皆為 0%，第 15 天為 92、74 及 100%，第 20 天為 92、77 及 100% (表 4)。在 28°C 下馬鈴薯接種 bv 2、3 及 4 之青枯病菌後，第 4 天罹病度分別為 0、0 及 6.7%，第 15 天為 78、98 及 92%，第 20 天為 80、100 及 92% (表 3)。番茄接種後第 4 天，罹病

表 2. 雲林及嘉義地區馬鈴薯種植期 (2013 年 11 月至 2014 年 3 月) 調查田間青枯病萎凋率與其發生菌株生化型鑑定。

Table 2. Incidence of bacterial wilt of potato winter crops in Yunlin and Chiayi area (November 2013 to March 2014) and identification of *Ralstonia solanacearum* biovars.

Survey field	Potato winter crop		
	PCR ^z	Wilt (%) ^y	Biovar
Yunlin			
Field-1	+	6.4	2 (67%) & 3 (33%)
Field-2	+	10.8	2 (100%)
Field-3	+	32.0	2 (100%)
Field-4-9	-	0.0	n.d. ^x
Field-10	+	15.0	2 (45%) & 3 (55%)
Field-11-15	-	0.0	n.d.
Chiayi			
Field-1-7	-	0.0	n.d.
Total fields			2 (64.7%) & 3 (35.3%)

^z PCR reactions were performed on the field-collected strains using specific diagnostic primers for *R. solanacearum*. +, positive amplification of a 300 bp DNA fragment; -, no amplification.

^y Wilt (%): percentage of completely wilted plants in the surveyed field.

^x n.d.: not detected.

表 3. 馬鈴薯接種 3 種青枯病菌生化型菌株後於不同溫度下之罹病度。

Table 3. Response of potato plants inoculated with three biovars of *Raltonia solanacearum* under different temperatures.

Days after post inoculation	Disease severity (%) of potato ^z								
	20°C			24°C			28°C		
	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)
4	0	0	0	6	5	18	0	0	6.7
7	0	0	0	58	28	28	13	55	63
11	38	0	18	98	80	83	47	78	90
15	65	0	51	100	92	85	78	98	92
20	80	0	77	100	92	98	80	100	92

^z Disease severity (%) = (Σ number of diseased plants in each disease index × disease index)/(total number of plants inoculated × 5) × 100%.

度分別為 0、1.7 及 20%，第 15 天為 72、92 及 100%，第 20 天為 87、92 及 100% (表 4)。

馬鈴薯品種(系)對青枯病之抗(感)病性測定

在馬鈴薯青枯病抗感病性接種測定中，選定 7 個供試品種：P86、P90、P91、P92、P95、P117 與 P120，及 3 個品系：P89、16-13 及 T3 進行抗(感)病性測定。接種後第 9 天在 P91、16-13、P117 及 P120 出現青枯病徵，其萎凋率皆為 10%，罹病度 (disease severity) 則分別為 10、4、6 及 10%；至接種後第 20 天，所有供試馬鈴薯品種(系)均出現青枯病徵，其中品種 P86、P91、92 及品系 16-13 之萎凋率與罹病度都未超過 10% (表 1)；接種 35d 後，

罹病度在 10–100% 之間 (表 1)，顯示品種(系)間存在發病差異，其中罹病度達 100% 者是 16-13 品系，其次為 P89 品系之 72% 與 P90 品種(‘Atlantic’，「大西洋」)之 60%，罹病度最低者是 T3 品系之 10%，次低者為 P91 品種(‘Tss-II’，「種苗 2 號」)之 18% 與 P120 品種(‘TN-1’，「台農 1 號」)之 20% (表 1)。由此可知，所篩選之 10 種不同馬鈴薯品種(系)中並未獲得對青枯病菌 bv 2 具有高抗性之品種，但其中以 T3 品系對青枯病之耐性較其他試驗品種(系)強。

討論

青枯病菌為熱帶及亞熱帶地區最重要的植

表 4. 番茄接種 3 種青枯病菌生化型菌株後於不同溫度下之罹病度。

Table 4. Response of tomato plants inoculated with three biovars of *Raltonia solanacearum* under different temperatures.

Days after post inoculation	Disease severity (%) of Tomato ^z								
	20°C			24°C			28°C		
	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)
4	0	0	0	0	0	0	0	1.7	20
7	8	6	0	32	23	57	10	33	87
11	83	30	38	88	68	89	53	92	100
15	88	42	63	100	74	92	72	92	100
20	100	68	77	100	77	92	87	92	100

^z Disease severity (%) = (Σ number of diseased plants in each disease index × disease index)/(total number of plants inoculated × 5) × 100%.

物病原菌之一，多數之菌株於 25–30°C 溫度條件下皆具有良好致病性，但於 20°C 以下之環境則無致病性，僅少數的青枯病菌株於低溫下仍可感染寄主並造成危害 (Ciampi & Sequeira 1980; Milling *et al.* 2009; Bocsanczy *et al.* 2012)。由此可知，溫度的高低對青枯病菌危害寄主植物的能力具有關鍵性影響。本研究亦有一致的發現，24°C 及 28°C 時，所有的供試菌株在番茄植株致病力並無顯著的差異，但 20°C 時，RS1125 (race 1, bv 3) 對馬鈴薯不會致病，其原因可能與青枯病菌之基因調控有關。已有研究報告指出，溫度可調控青枯病菌之致病因子 (virulence factors) 的表現，進而影響不同菌株之間於低溫時的致病力 (Bocsanczy *et al.* 2012; Bocsanczy *et al.* 2014)。然而，RS1125 (race 1, bv 3) 於 20°C 時對番茄仍具有致病力，推測 RS1125 在不同寄主植物誘發病害的能力可能與兩者之間的相互作用、寄主植物對病原菌毒力因子之感受性不同有關 (Genin 2010; Genin & Denny 2012)，但仍需進行更詳細之試驗加以佐證。

低溫環境下會延緩青枯病發病時間及病徵表現，且青枯病菌容易有潛伏感染的現象，常累積大量之細菌族群於寄主植物莖部，但寄主植物卻未見病徵之表現，此現象於冷涼環境下生長之馬鈴薯普遍發生 (Allen *et al.* 2001)。於本研究中，亦發現在 20°C 時接種植株表現病徵所需之時間較 24°C 及 28°C 生長的植株長，須於接種 7 d 之後才能觀察到病徵，其他溫度條件則於接種後 4 d 已出現病徵，至於接種後初期是否有潛伏感染的現象，則需進一步的分析。溫度亦會影響寄主之罹病度，在 20°C 時其罹病度相對較低，僅有 bv 2 (RS1118) 接種馬鈴薯及番茄後之罹病度分別可達 80% 及 100%，其他生化型皆不高於 77%；所有供試菌株於 24°C 接種 15 d 後其罹病度皆大於 74% 以上，在 28°C 之高溫環境下時，bv 3 (RS1125) 及 bv 4 (RS1102) 菌株對馬鈴薯及番茄具有較高之致病力，於接種後 15 d 植株罹病度皆為 92% 以上，相較之下，接種 bv 2 (RS1118) 菌株的植物罹病率則低於 80%。

目前已知 R3Bv2 青枯病菌株之耐寒性

較其他群菌株強 (Swanepoel 1990; Hayward 1991)，於冷涼的氣候條件下會造成嚴重病害發生 (Ciampi & Sequeira 1980)，而本研究之試驗結果亦有一致的結論，於 20°C 低溫環境下，bv 2 (RS1118) 與其他試驗菌株相比，對馬鈴薯及番茄之罹病度較高。近年來，由 R3Bv2 之青枯病菌株危害台灣馬鈴薯栽培田區之案例日益增加 (Chiou 2002; Wu *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011)，在 2013 年 11 月至 2014 年 3 月調查期間，雲林及嘉義地區馬鈴薯栽培田區發生之青枯病菌主要為 bv 2，次要菌株為 bv 3，但未發現 bv 4，說明 bv 2 菌株已成為台灣馬鈴薯生產栽培重要的限制因子之一，其餘 bv 3 及 bv 4 雖然對馬鈴薯仍具致病性，但台灣馬鈴薯生育季節以冬季為主，其重要性及危害威脅性均較 bv 2 為低。因為 bv 2 在低溫時對馬鈴薯之致病程度為最高，對馬鈴薯具有強病原性，且於低溫狀態下其殘存時間亦較其他群的菌株更長，甚至於 4°C 的環境下可殘存 2 年以上 (Shamsuddin *et al.* 1978; Milling *et al.* 2009)。而分布在台灣的青枯病菌 race 1/bv 3 或 bv 4，則常於夏季或高溫多濕的氣候條件下嚴重發生 (Hsu 1991; Lin 2008)。由此可知，台灣常見青枯病菌生化型菌株中，以第 2 生化型菌株對馬鈴薯生長栽培過程中之威脅性最大。

青枯病菌為土壤傳播菌，寄主範圍及其分布皆非常廣泛，因此防治上相當困難。種植抗病品種是防治青枯病最有效的方式之一，同時也有不少致力於抗病品種育成之研究，目前國外已有數個可耐青枯病之馬鈴薯品種，分別具有不同程度之耐病表現 (French 1994; Muthoni *et al.* 2014)。然而青枯病菌仍可經由潛伏感染存在於一些抗病品種所生成之種薯中，若為中度抗性之品系則須配合健康種薯的使用，才能達到較好之防治效果 (French 1994; Grimault *et al.* 1994)。此外，青枯病菌菌株型態與特性繁多，不同菌株間之毒力強度不同，抗病品種往往會因青枯病菌的菌株差異以及環境條件的改變，如有利之發病溫度、氣候、土壤濕度或傷口的存在等因素，造成植株之抗性失效，尤其是具有菌株專一性抗性之品種 (Lebeau *et al.*

2011; Jyothi *et al.* 2012)，因此尋求適合本土生長並對在地菌株具有抗/耐性之品種更加重要。台灣目前尚未發現有效之馬鈴薯抗青枯病品種，因而針對台灣之青枯病菌株篩選具有抗性之馬鈴薯品種，有其必要性。本研究中所篩選之 10 種不同馬鈴薯品種 (系) 中，並未獲得對青枯病菌 bv 2 具有免疫抗性之品種，但品種 (系) 之間對 bv 2 表現出不同程度之耐病性，其中以 T3 品系及 P91 品種 (「種苗 2 號」) 之罹病度最低，分別為 10% 及 18%。T3 品系薯球呈長形，產量高，遺傳特性仍須作進一步分析；P91 為「種苗 2 號」，中晚生品種，薯球呈圓形，皮色土黃，抗馬鈴薯病毒 Y 及晚疫病，可鮮食及加工成洋芋片。未來將對此兩品種進行進一步之抗性分析，如對不同青枯病菌株及菌量之抗性表現、子代抗性分析、抗感病植株體內菌量之測定與分析、模擬自然環境感染條件下之抗性表現或不同溫度及環境條件對抗性之影響等，以瞭解其抗病穩定度及特性。

寄主植物與青枯病菌之間相互作用機制非常複雜，且環境因素於兩者之間的相互作用亦有極大之影響力。本研究發現溫度為影響馬鈴薯青枯病菌致病能力的因素之一，且不同生化型其影響程度亦不同。在 20°C 時可使 bv 3 失去對馬鈴薯之致病力，而 bv 2 則仍具有強致病性。在 24°C、28°C 時則台灣常見之 bv 2、3、4 則仍有良好之致病能力。bv 2 為目前引起馬鈴薯青枯病之最主要菌株，經由抗病品種之篩選，發現馬鈴薯品種 T3 及 P91 對青枯病菌 bv 2 具有較好之抗性，未來可做為防治馬鈴薯青枯病之參考。

誌謝

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢局經費補助及黃哲倫助理研究員、陳幸葵小姐、許淑麗小姐、林江美華小姐及賴素玉小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Allen, C., A. Kelman, and E. R. French. 2001. Brown rot of potatoes. p.11–13. *in*: Compendium of Potato Diseases. 2nd ed. (Stevenson, W. R., R. Loria, G. D.

Franc, and D. P. Weingartner, eds.) American Phytopathological Society. Saint Paul. 106 pp.

- Bocsanczy, A. M., U. C. Achenbach, A. Mangravita-Novo, J. M. Yuen, and D. J. Norman. 2012. Comparative effect of low temperature on virulence and twitching motility of *Ralstonia solanacearum* strains present in Florida. *Phytopathology* 102:185–194.
- Bocsanczy, A. M., U. C. Achenbach, A. Mangravita-Novo, M. Chow, and D. J. Norman. 2014. Proteomic comparison of *Ralstonia solanacearum* strains reveals temperature dependent virulence factors. *BMC Genomics* 15:280.
- Buddenhagen, I., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.
- Chiou, Y. S. 2002. Characteristics of Strains *Ralstonia solanacearum* Recently Affecting Potatoes in Central Taiwan. Master thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung. 46 pp. (in Chinese with English abstract)
- Ciampi, L. and L. Sequeira. 1980. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Amer. Potato J.* 57:307–317.
- Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. p.573–644. *in*: Plant-Associated Bacteria. (Gnanamanickam, S. S., ed.) Springer. Dordrecht. 712 pp.
- Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: A global overview. p.9–28. *in*: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. (Allen, C., P. Prior, and A. C. Hayward, eds.) APS Press. Saint Paul. 528 pp.
- Fegan, M. and P. Prior. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? p.449–461. *in*: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. (Allen, C., P. Prior, and A. C. Hayward, eds.) APS Press. Saint Paul. 528 pp.
- French, E. R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. p.98–113. *in*: Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. (Hayward, A. C. and G. L. Hartman, eds.) CAB International. Oxfordshire. 259 pp.
- Genin, S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* 187:920–928.
- Genin, S. and C. Boucher. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:107–134.
- Genin, S. and T. P. Denny. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:67–89.

- Grimault, V., G. Anais, and P. Prior. 1994. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathol.* 43:663–668.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265–277.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65–87.
- Hayward, A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. p.32–42. in: *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 4. (Lederberg, J., ed.) Academic Press. San Diego. 3848 pp.
- He, L. Y., L. Sequeira, and A. Kelamn. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357–1361.
- Hsu, S. T. 1991. Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 33:72–79. (in Chinese)
- Jyothi, H. K., H. M. Santhosha, and Basamma. 2012. Recent advances in breeding for bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) resistance in tomato- review. *Curr. Biotica* 6:370–398.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693–695.
- Kelman, A. and L. Sequeira. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 55:304–309.
- Lebeau, A., M. C. Daunay, A. Frary, A. Palloix, J. F. Wang, J. Dintinger, F. Chiroleu, E. Wicker, and P. Prior. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: Genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:154–165.
- Lin, C. H. 2008. Application of Population Profiling and Detection of *Ralstonia solanacearum* on Integrated Management of Tomato Bacterial Wilt. Doctoral dissertation, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung. 101 pp.
- McCarter, S. M. and C. A. Jaworski. 1968. Greenhouse studies on the spread of *Pseudomonas solanacearum* in tomato plants by clipping. *Plant. Dis. Rep.* 52: 330–334.
- Milling, A., F. Meng, T. P. Denny, and C. Allen. 2009. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2. *Phytopathology* 99:1127–1134.
- Muthoni, J., H. Shimelis, R. Melis, and Z. M. Kinyua. 2014. Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al.*) in the tropical highlands. *Amer. J. Potato Res.* 91:215–232.
- Opina, N., F. Tavner, G. Hollway, J. F. Wang, T. H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W. F. Hong, B. W. Holloway, and J. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 5:19–30.
- Prior, P. and M. Fegan. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Hort.* 695:127–136.
- Shamsuddin, N., A. B. Lloyd, and J. Graham. 1978. Survival of the potato strain of *Pseudomonas solanacearum* in soil. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 44:212–215.
- Swanepoel, A. E. 1990. The effect of temperature on the development of wilting and on progeny tuber infection of potatoes inoculated with South African strains of biovar 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. *Potato Res.* 33:287–290.
- Swanson, J. K., L. Montes, L. Mejia, and C. Allen. 2007. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in geranium. *Plant Dis.* 91:828–834.
- Tans-Kersten, J., Y. Guan, and C. Allen. 1998. *Ralstonia solanacearum* pectinmethylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4918–4923.
- Wilson, E. E., F. M. Zeitoun, and D. L. Fredrickson. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. *Phytopathology* 57:618–621.
- Wu, Y. F., C. H. Lin, J. F. Wang, and A. S. Cheng. 2011. Population density of *Ralstonia solanacearum* potato strain, phylotype II/race 3/biovar 2, and incidence of potato bacterial wilt in fields Dounan, Yunlin County. *Plant Pathol. Bull.* 20:68–77. (in Chinese with English abstract)
- Wu, Y. F., C. H. Lin, T. M. Chen, Y. F. Huang, S. H. Chen, J. H. Wang, and A. S. Cheng. 2010. Ecological survey of brown rot potato in Dounan, Yunlin. *Plant Pathol. Bull.* 19:87. (in Chinese with English abstract)

Effect of Temperature on Virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovars and Response of Potato Cultivars (Lines) to Bacterial Wilt

Ming-Fu Chuang¹, Shu-Fung Lo², and Ching-Yi Lin^{3,*}

Abstract

Chuang, M. F., S. F. Lo, and C. Y. Lin. 2015. Effect of temperature on virulence of *Ralstonia solanacearum* biovars and response of potato cultivars (lines) to bacterial wilt. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(2):89–98.

Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is an important disease of a wide range of crops in tropical and subtropical regions. Most strains of *R. solanacearum* are pathogenic at high temperatures, and some strains are nonpathogenic when the temperature drops below 20°C. However, race 3 biovar 2 (R3Bv2) strains can attack plants at cool temperatures. In this study, we surveyed the potato fields in Yunlin and Chiayi Counties in Taiwan during 2013–2014 and observed the incidences of wilting symptoms on potato, within 0–32%. The causal pathogens were identified and most of the strains were identified to be *R. solanacearum* biovar 2, indicating that the biovar 2 is a dominant strain to affect potato in Taiwan. In addition, the effects of temperature on the virulence of three *R. solanacearum* strains (RS1102, RS1118 and RS1125) and the representative biovars affecting solanaceous crops in Taiwan were evaluated on potato and tomato plants, respectively. Results indicated that all three strains showed strong virulence on potato and tomato plants at 24°C and 28°C, and the disease severity ranged from 77 to 100% at 20 days of post inoculation. At 20°C, the three strains showed differential reactions on the inoculated potato. Among them, RS1125 (biovar 3) was nonpathogenic to potato, whereas RS1118 (biovar 2) showed higher virulence than the other two strains with 80–100% disease severity at 20 days of post inoculation. To compare the resistance between the current commercial potato cultivars to *R. solanacearum* race 3 biovar 2, ten cultivars [P86 ('Kennebec'), P90 ('Atlantic'), P91 ('Tss-II'), P92 ('Chipeta'), P95 ('pike'), P117, P120 ('TN-1'), P89, 16-13, and T3] were examined in this study. It indicated a differential susceptibilities among them, from susceptible to various degrees of tolerance, to the infection of *R. solanacearum* race 3 biovar 2. The disease severity ranged between 10–100% at 35 days of post inoculation. One cultivar, T3, showed the lowest disease severity at 10%. No cultivar exhibited immunity to the bacterium. Based on our results, we concluded that temperature is one of the factors that can affect the virulence of *R. solanacearum*. Comparing the virulence of three commonly found biovars of *R. solanacearum* in Taiwan at different temperatures, we suggest that biovar 2, which showed high virulence at cool temperatures, might be a great threat to the potato production in Taiwan.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, Biovars, Temperature, Resistant.

Received: August 14, 2014 ; Accepted: December 1, 2014.

* Corresponding author, e-mail: eris2024@dns.caes.gov.tw

¹ Former Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.