

茄苳青枯病之發生

蔡佳欣^{1,*} 安寶貞² 黃淑苓³ 呂昫陞¹ 李佳蓉³ 洪子晴³

摘要

蔡佳欣、安寶貞、黃淑苓、呂昫陞、李佳蓉、洪子晴。2017。茄苳青枯病之發生。台灣農業研究 66(1):44–52。

2011年彰化縣田中地區一處茄苳栽植田，茄苳樹木出現生長緩慢、萎縮，葉片褪色及枝條枯萎等病徵，觀察罹病樹木枝條內部組織，可見維管束組織明顯褐化。從褐化的病組織可在 Triphenyl tetrazolium chloride 培養基分離出中間粉紅色，周圍白色流質狀之菌落。將該菌回接至茄苳植株，造成與田間相同之莖部維管束褐化及萎凋病徵，並可回分出相同細菌，完成科霍氏法則。該菌經生理生化分析、Biolog 鑑定系統分析、16S rDNA 序列比對、寄主範圍測試及專一性引子測定，將該菌鑑定為 *Ralstonia solanacearum*，第 1 生理小種 (Race 1)/第 3 生化型 (Biovar 3)/第 1 演化型 (Phylotype)。此為 *R. solanacearum* 感染茄苳之全球首度報導。

關鍵詞：茄苳、青枯病、青枯病菌。

前言

茄苳 (*Bischofia javanica* Blume)，又稱為重陽木、秋楓樹，英文名為 Autumn maple tree、Red Cedar，屬大戟科 (Euphorbiaceae)，重陽木屬 (*Bischofia*) 樹木，分布於平地及中低海拔地區，樹木生長快速，樹齡長，枝葉茂密，為國內常見之行道樹與庭園遮陰樹種。2011年彰化縣田中地區之茄苳栽培田，部分茄苳樹木出現衰弱現象，病樹初期葉片褪色，部分枝條葉片失水下垂 (圖 1A)，之後枝條逐漸褐化枯萎 (圖 1B)。將病枝條縱切及橫切，在其莖部維管束發現褐化現象 (圖 1C、1D)，切取罹病莖部病組織於光學顯微鏡下觀察，可見大量的細菌湧出，疑似細菌性病害。從罹病的莖部組織分離細菌，可在 TTC 培養基平板分離並純化出中間粉紅色，周圍白色流質狀似青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 菌落 (圖 1E)，因此可能為該菌所引起。

青枯病菌為全球重要的植物病原細菌，被

認為是由許多不同的菌系組成一複合種 (Species complex)，寄主範圍極為廣泛，種類達 54 科 250 種植物以上 (Peeters *et al.* 2013)，引起許多經濟作物產量損失，並且陸續不斷有新的寄主被報導。在台灣已有許多植物受該病菌感染危害，大多數為草本植物，如番茄、甜椒、馬鈴薯、蓖麻、落花生、煙草、草莓、天堂鳥、黃麻、紫蘇、蘿蔔、康富利、火鶴花、蕓菜、絲瓜、薑、洛神葵、萵菜等，以及少數幾種木本植物如桉樹、蓮霧、銀柳、番荔枝等 (Hsu 1991; Hsu *et al.* 2002; Tzeng & Chang 2013; Wu *et al.* 2013; Lin *et al.* 2015)。茄苳為多年生木本植物，經查詢國內外文獻及病害資料庫尚無茄苳受青枯病菌危害之報告 (Hsu *et al.* 2002; Elphinstone 2005; Crop Protection Compendium 2016)。因此，本文擬對此病害之病因及病原菌特性進行研究，以作為栽培防治參考。

投稿日期：2016年1月21日；接受日期：2016年6月23日。

* 通訊作者：tsaich@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組前研究員兼組長。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

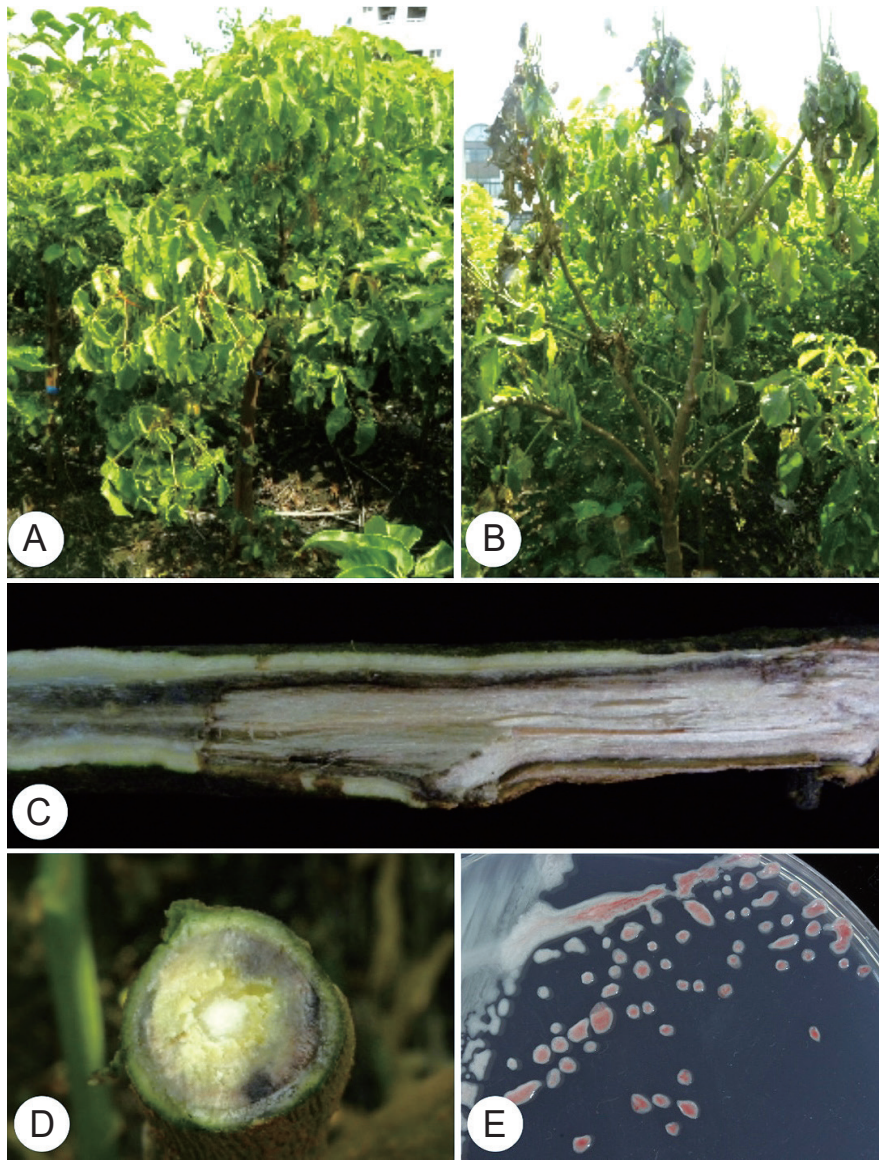


圖 1. 茄苳青枯病。(A) 病樹葉片褪色及萎凋；(B) 嚴重感染樹木枝梢褐化枯萎；(C)、(D) 維管束褐化；(E) 病原菌在 triphenyl tetrazolium chloride 培養基菌落形態。

Fig. 1. Bacterial wilt of autumn maple trees. (A) Diseased tree showing leaf chlorosis and wilt symptoms. (B) The branches with blight on the severely infected tree. (C), (D) The brownish vascular tissue. (E) The bacterial colonies on triphenyl tetrazolium chloride medium.

材料與方法

病菌分離

切取罹病茄苳莖部浸泡 1% 次氯酸鈉進行表面消毒 30 s，再經 3 次無菌水清洗後，將莖病健部組織切碎後，置入無菌水中震盪以釋出

細菌。再以移植環沾取懸浮液，以畫線平板方式將懸浮液塗抹 Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 培養基 (Kelman 1954)。之後將培養基置於 30°C 培養箱培養 2 d 後，挑選單一菌落至新的培養基平板，以純化細菌。

生理生化特性測定

將分離自不同樣品之供試菌株 3 株編號 AMBW01、AMBW02 及 AMBW03，參考 Huang *et al.* (2000) 及 Schaad *et al.* (2001) 所述進行各項生理生化特性測定。測定項目包括革蘭氏反應 (Gram reaction)，對葡萄糖利用方式 (氧化/發酵試驗；O/F test)、在 King's B 培養基上產生螢光色素的測定、在 YDC (yeast extract-dextrose-CaCO₃) 培養基上的菌落型態、氧化酵素 (oxidase)、過氧化氫放氧酵素 (catalase)、尿素酵素 (urease)、精氨酸二水解酵素 (arginine dihydrolase)、苯丙氨酸脫氨酵素 (phenylalanine deaminase)、硝酸鹽還原能力 (nitrate reduction)、白明膠水解作用 (hydrolysis of gelatin)、澱粉水解作用 (hydrolysis of starch)、硫化氫的產生 (production of H₂S)、吲哚的產生 (production of indole) 測定，在 40°C 下的生長能力，在分別含有 1% 及 2% NaCl 之 nutrient broth (NB) 的生長能力。

生化型 (Biovar) 測定

參考 Hayward (1964, 1994) 所述，測試供試菌株對碳水化合物化合物的利用及氧化能力以測定其生化型，測試的碳水化合物種類包括以下 4 種雙醣：乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙醣 (cellobiose)、海藻糖 (trehalose) 及 3 種六醣醇：甘露糖醇 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、甜己醇 (dulcitol)。

Biolog 鑑定系統

將供試菌株利用 Biolog 鑑定系統進行分析，菌株先培養在 5.7% BUGTM agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., CA, USA) 培養基，在 30°C 定溫箱培養 16–24 h。之後以棉棒沾取細菌菌落，將細菌懸浮在 IF-A 接種液 (Biolog Inc., CA, USA)，並接種液調整濃度至 90–98% T (turbidity) 後，將其加入 Biolog GEN III 反應盤 (Biolog Inc., CA, USA) 中。每孔加入 100 μ L 之接種液，培養 25–35 h 以光譜儀測讀，將所得資料經 Biolog MicroLogTM 3 ver. 5.2.2 系統分析與 Biolog GEN III 資料庫 (2.6.1 版) 比對，以鑑定細菌種類。

病原性試驗

將上述供試菌株以 TTC 培養基，在 30°C 定溫箱培養 2 d 以後，將細菌懸浮在無菌水中。並以分光光度計 (spectrophotometer, spectronic 70, Bausch & Lomb Inc., USA)，設定波長 600 nm 調整細菌懸浮液至吸收值 0.3 (約 10⁸ cfu mL⁻¹) 作為接種源，進行接種試驗。接種方式分別以地上部莖部穿刺接種及地下部剪根接種兩種方式，各接種茄苳苗木 (約 20 cm) 3 株，穿刺接種法為先在植株莖部置放 1 小滴之細菌懸浮液，之後以滅菌針頭在莖部該處刺一傷口供細菌感染。剪根接種法為以剪刀剪除植株部分根系後，將根系浸泡在細菌懸浮液 20 min 再種回盆鉢。上述 2 種接種法，均以無菌水接種植株作為對照組，每 1 供試菌株接種茄苳 3 株，接種後植株套上透明塑膠袋保濕 48 h。之後除去塑膠袋，將植株放置在 30°C 生長箱觀察病徵發展情形。發病後再從罹病茄苳莖部組織分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

生理小種測定

生理小種之測定參考 Buddenhagen *et al.* (1962) 及 He (1983) 所述，將 3 供試菌株以上述穿刺接種方式接種 5 種茄科植物包括「紅番」番茄、「農友金華星」甜椒、「克尼伯」馬鈴薯、「麻薯長茄」茄子、「萬國土」菸草以及非茄科植物「台農 7 號」花生之莖部各 3 株，以接種無菌水作為對照組。接種後植株套上透明塑膠袋保濕 48 h，之後除去塑膠袋，並置於 30°C 生長箱中觀察發病情形。

16S rDNA 序列分析

挑選供試菌株編號 AMBW01 及 AMBW02 進行核酸序列分析，核酸萃取法參考 Wang *et al.* (1993) 之簡易方法並略為修改後進行。將純化後之細菌單一菌落以滅菌牙籤沾取後，放入 20 μ L 之無菌水中懸浮，之後加入 0.4 N NaOH 20 μ L 震盪均勻後靜置 15 min，再加入 40 μ L 之 1 M Tris-HCl。震盪混合均勻後，取 20 μ L 以無菌水稀釋 10 \times 製備為 PCR 模板。之後聚合酵素連鎖反應 (PCR)，以細

菌 16S rDNA 通用引子對 f8-27/r1510 (Lipson & Schmidt 2004) 進行，所得之 PCR 產物以以 1.4% agarose 進行電泳分析，確定是否產生預期之 DNA 片段。所得之 PCR 產物以 TOP-fast PCR cloning kit (GeneMark, Taichung, Taiwan) 進行 DNA 片段選殖後，將帶有目標 DNA 片段之細菌菌株，委由明欣生物科技股份有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行 DNA 定序，再進行序列比對。

演化型 (Phylotype) 測定

將供試菌株以上述簡易方法進行核酸萃取後，依 Fegan & Prior (2005) 所述進行複合式聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR) 並略微修改如下。PCR 引子包括 5 條設計自 ITS 區域之引子 (Nmult21:1F、Nmult21:2F、Numlt23:AF、Nmult22:InF、Numlt22:RR)，用以鑑別青枯病菌之演化型，以及 2 條對青枯病菌具專一性之引子 AU759f、AU760r (Opina *et al.* 1997)，用以確認供試菌株為青枯病菌，共以 7 條引子進行反應。Multiplex PCR 反應在 25 μ L 的混合物進行，各反應物的濃度為 1 \times PCR buffer、1.5 mM 的 $MgCl_2$ 、0.25 mM 的 dNTP，Taq DNA polymerase 0.3 units、引子 Numlt23:AF 為 40 ng，其餘的引子濃度皆為 20 ng，並加入 2 μ L 模板。在熱循環反應器 (GeneAmp PCR System 2400) 內進行，PCR 溫度循環條件：先以 96 $^{\circ}C$ 進行 5 min；再以 94 $^{\circ}C$ 進行 1 min，59 $^{\circ}C$ 進行 1 min，72 $^{\circ}C$ 進行 2 min 共 30 循環；最後 72 $^{\circ}C$ 進行 10 min。PCR 產物以 2.0% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，再依據電泳的圖譜結果判定演化型。

結果與討論

Biolog 鑑定系統

以 Biolog 鑑定系統鑑定上述 3 株供試菌株，供試菌株培養在 Biolog GEN III Microplate 以測定其生理特性及對碳素源利用情形，將試驗所得資料再以 Biolog MicroLogTM 3 ver. 5.2.2 系統分析及資料庫比對。分析結果顯示，供試菌株 AMBW01、AMBW02 及 AMBW03 與 *R. solanacearum* 之相似值最高，

分別為 0.630、0.630 及 0.651，並超過分析系統設定之臨界值 0.5，因此鑑定供試菌株均為 *R. solanacearum*。

16S rDNA 序列分析

進一步將供試菌株 AMBW01 及 AMBW02 萃取核酸後，以細菌 16S rDNA 通用引子對 f8-27/r1510 進行 PCR 增幅，可增幅出約 1,500 bp DNA 片段，該片段經選殖與定序後，在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫比對。結果顯示，供試菌株 (GenBank Accession Number: KX132896 及 KX132897) 之 DNA 序列比對結果與 NCBI 資料庫之 *R. solanacearum* 序列相同度最高，達 100% (GenBank Accession Number KT748524.1、CP011997.1)，因此供試菌株最可能為 *R. solanacearum*。

病原性測試

將 3 供試菌株製備成細菌懸浮液 (約 10^8 cfu mL^{-1}) 進行接種試驗，分別以莖部穿刺接種及剪根浸泡菌液 2 種方法各接種茄苳苗木 (約 20 cm) 3 株。結果顯示，莖部接種及根部接種之茄苳苗木，均可造成植株感染，莖部在接種 3 d 即出現葉片略為下垂狀。之後莖部逐漸褐化病蔓延，7 d 後試驗植物陸續萎凋 (圖 2A、2B)。根部接種之植株亦在接種 3 d 出現葉片略為下垂現象，接種 7 d 之後植株萎凋，與田間所見之萎凋病徵類似。褐化的莖部組織在顯微鏡下觀察，可見大量細菌湧出，顯示該細菌於植株體內大量感染繁殖。並可從病徵蔓延處再回分出相同的細菌，經 multiplex PCR 鑑定與原來接種細菌相同，完成科霍式法則，證實該病害由此病原細菌引起。

生理小種 (race) 測定

為瞭解危害茄苳之青枯病菌菌系種類，將供試菌株進行生理小種測定。將 3 供試菌株分別以莖部穿刺法接種在馬鈴薯、番茄、甜椒、茄子、菸草以及花生植株，結果顯示接種後 2 d 後上述植物種類葉片均開始即出現輕微失水下垂，3 d 之後植株莖部逐漸褐化，最後均出現萎凋病徵，接種無菌水之對照組無病徵出現。

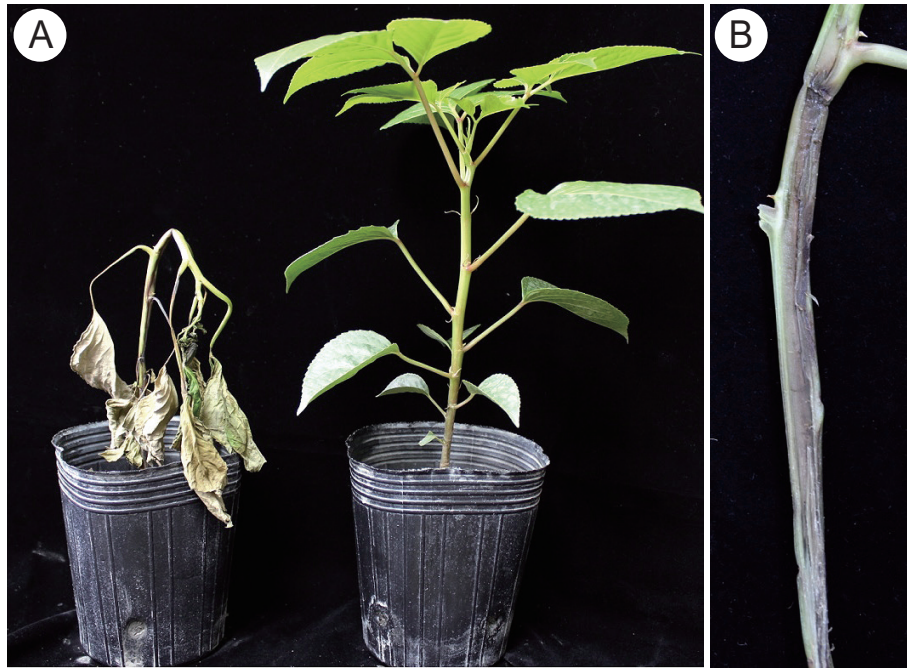


圖 2. 茄苳苗木接種病原細菌 7 d 後植株萎凋 (A 左)，對照植株無病徵 (A 右)；植株接種後莖部維管束褐化放大圖 (B)。

Fig. 2. Wilt symptoms of autumn maple plants observed 7 days after inoculation (A left), and check plants without symptoms (A right); Close-up of brownish vascular tissue of stem after inoculation (B).

R. solanacearum 係由許多不同的菌系組成一複合種 (species complex)，依不同的寄主範圍可區分 5 個生理小種 (race)。第 1 生理小種又稱茄科菌系，能危害菸草、番茄等多種茄科植物及其他植物。第 2 生理小種又稱芭蕉科菌系，主要感染三倍體香蕉及赫蕉屬 (*Heliconia*)。第 3 生理小種又稱馬鈴薯菌系，主要為害馬鈴薯與番茄，對其他茄科植物病原性較弱。第 4 生理小種又稱薑菌系，分離自菲律賓罹病薑株，只能感染薑。第 5 生理小種又稱桑菌系，分離自中國大陸罹病桑樹，主要危害桑樹，對茄子及馬鈴薯病原性較弱 (Buddenhagen *et al.* 1962; He 1983; Tzeng & Chang 2013)。在台灣青枯病菌系已有第 1 及第 3 生理小種之報告，第 1 生理小種為田間主要菌系，已在許多植物上發現，第 3 生理小種則僅在馬鈴薯上發現 (Hsu 1991; Wu *et al.* 2011)。由本次的接種試驗顯示，3 供試菌株對上述各種茄科植物以及非茄科之花生，均可感染，顯示寄主廣，

並且造成萎凋病徵，因此參照上述分類，將其判別為第 1 生理小種。

生理生化特性及生化型 (Biovar) 測定

為瞭解此茄苳青枯病菌之生理生化特性，將 3 株青枯病菌之菌株 AMBW01、AMBW02 及 AMBW03，測定其生理生化的特性。3 供試菌株測試結果相同，均屬於革蘭氏陰性菌 (Gram negative)，好氣性，在 King's B 培養基不產生螢光色素，在 YDC 培養基上產生黏液狀之乳白色菌落，在氧化酵素、過氧化氫放氧酵素、尿素酵素、硝酸鹽還原能力測試為正反應，在精氨酸二水解酵素、白明膠水解作用、澱粉水解作用、苯丙氨酸脫氨酵素、硫化氫的產生、吲哚的產生測定為負反應。菌株可生長在含有 1% NaCl 之 NB；但在含有 2% NaCl 之 NB 以及 40°C 下不生長，3 供試菌株與青枯病菌之生理生化特性相同 (表 1)。

在青枯病菌生化型之鑑別上，以菌株利用及氧化碳水化合物特性，可分為 6 種生化

型 (Hayward 1964, 1994)。然而，生理小種與生化型之間並無絕對的關連性，但第3生理小種均屬於第2生化型。台灣常見之青枯病菌，大多數屬於第3及第4生化型，且為第1生理小種 (Hsu 1991)。本次所分離之茄苳青枯病菌，3供試菌株可氧化乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙醣 (cellobiose) 3種雙醣，並且可利用甘露糖醇 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、甜己醇 (dulcitol) 3種六醣醇及海藻糖 (trehalose)。因此，對照 Hayward (1994) 資料，將茄苳青枯菌株判別為第3生化型菌系 (表2)，與台灣常見的本土菌系相同。

演化型 (Phylotype) 測定

Fegan & Prior (2005) 以 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region (ITS) 之核酸序列，設計出 5 條引子，以複合式聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR) 可將青枯病菌分成 4 種演化型。此演化型分類系統與菌株地理的起源有

相關性，第1演化型，主要為亞洲 (Asia) 菌株，Multiplex PCR 增幅條帶為 144 bp；第2演化型，主要為美洲 (America) 菌株，增幅條帶為 372 bp；第3演化型，主要為非洲及周圍島嶼 (Africa and surrounding islands) 菌株，增幅條帶為 91 bp；第4演化型，主要為印尼 (Indonesia) 菌株，增幅條帶為 213 bp。在此 Multiplex PCR 中，再加入青枯病菌的專一性引子對，可同時確認所測定之細菌為青枯病菌以及其演化型。為瞭解本次所分離的茄苳青枯病菌之地理起源，以 Multiplex PCR 測定其演化型，PCR 增幅出 280 bp 之青枯病菌專一性 DNA 片段及 144 bp 之第1演化型 DNA 片段 (圖3)，與分離自台灣番茄青枯病菌株結果相同，顯示供試菌株為青枯病菌，且為第1演化型，屬於亞洲菌系。

結論

本次自萎凋茄苳病株莖部所分離之病菌，

表 1. 茄苳青枯病原細菌之生理生化分析。

Table 1. Physiological and biochemical analysis of autumn maple tree bacterial wilt pathogen.

Character	AMBW01, AMBW02, AMBW03 strains	<i>Ralstonia solanacearum</i> ^z
Gram reaction	G (-) ^y	G (-)
O/F ^y test	O	O
Fluorescent pigment on KB	-	-
Colonies yellow or orange on YDC	-	-
Colonies mucoid on YDC at 30	+	+
Oxidase	+	+
Urease	+	+
Catalase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	-
Nitrate reduction	+	+
Hydrolysis of starch	-	-
Production of H ₂ S	-	-
Production of indole	-	-
Growth at 40°C	-	-
Growth in broth with 1% NaCl	+	+
Growth in broth with 2% NaCl	-	-

^z Data are from (Huang *et al.* 2000; Schaad *et al.* 2001).

^y G (-): Gram negative; O: oxidative; F: fermentation; +: positive; -: negative.

表 2. 茄苳青枯病菌生化型測定。

Table 2. Biovar test of *Ralstonia solanacearum* of autumn maple tree.

Carbohydrate	AMBW01, AMBW02, AMBW03 strains	<i>R. solanacearum</i> biovar 3 ^z
Utilization of		
Mannitol	+ ^y	+
Sorbitol	+	+
Dulcitol	+	+
Trehalose	+	+
Oxidation of		
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Cellobiose	+	+

^z Data are from Hayward *et al.* (1994).

^y +: positive.

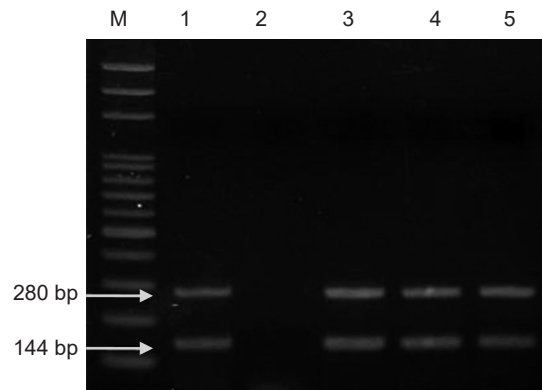


圖 3. 以 Multiplex PCR 鑑定茄苳青枯病菌之演化型。行 M：100-bp marker；行 1：為分離自番茄之青枯病菌 DNA；行 2：為未含有 DNA 模板之負對照；行 3-5：為茄苳青枯病菌之 DNA (AMBW01-03)。

Fig. 3. Identification of phylotype of *Ralstonia solanacearum*. Lane M: 100-bp DAN marker; Lane 1: DNA of *R. solanacearum* isolated from tomato; Lane 2: no template control; Lane 3-5: DNA from autumn maple bacterial wilt pathogen.

經在 TTC 培養基上菌落型態觀察，Biolog 鑑定系統、生理生化特性、16S rDNA 序列分析及青枯病菌專一性引子測試，確認所分離之細菌為 *R. solanacearum*，該病菌經寄主範圍測試為第 1 生理小種，生理生化特性分析鑑別為第 3 生化型，經 multiplex PCR 測定為第 1 演化型，為國內常見的菌系。並完成科霍氏法則，證實為該病害之病原菌，此為 *R. solanacearum* 感染茄苳之全球首次報告。

茄苳為國內常見的樹種，栽培業者將樹木育成後輸往各地供庭園遮陰及行道樹使用，帶

菌的樹木可能藉由此機會進行長距離的傳播，成為接種源。經此研究可知茄苳青枯病菌為第 1 生理小種，寄主範圍廣泛，因此需防範此病菌人為傳播的管道，以免再感染其他種類植物。由本次接種試驗可知，地上部莖部穿刺接種及地下部剪根接種法，均能造成植株萎凋病徵。因此，病菌在田間可能經由修剪工具從傷口侵入植物，以及經灌溉水由根部感染傳播。因此，在栽培管理上應注意修剪工具的消毒、及早清除病株、勿種植在青枯病田及勿從病田引水等，以減少青枯病菌感染的機會。

誌謝

本研究報告承蒙國立中興大學植物病理學系柯文雄講座教授協助校稿，特申謝忱。

引用文獻

- Buddenhagen, I., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.
- Crop Protection Compendium. 2016. *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt of potato) datasheet. <http://www.cabi.org/cpc/datasheet/45009> (visit on 1/12/2016)
- 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. St. Paul, MN. 510 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. St. Paul, MN. 510 pp.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 29:433–440.
- Hayward, A. C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. p.123–135. *in*: Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. (Hayward, A. C. and G. L. Hartman, eds.) CAB International. Wallingford, UK. 259 pp.
- He, L. Y. 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.
- Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsai. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
- Huang, J. C., S. H. Hseu, and B. K. Sen. 2000. Bacterial wilt of jute caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol. Bull.* 9:35–38.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693–695.
- Lin, C. H., M. H. Chuang, and J. F. Wang. 2015. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on chard in Taiwan. *Plant Dis.* 99:282.
- Lipson, D. A. and S. K. Schmidt. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2867–2879.
- 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. N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probe and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5:19–30.
- Schaad, N. W., J. B. Jone, and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 373 pp.
- Tzeng, K. C. and S. C. Chang. 2013. Development of identification and detection techniques on important crop bacterial pathogen. p.125–133. *in*: The Symposium on Important Crop Pathogen Detection and Management. October 18, 2013. Taichung, Taiwan. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153–4154.
- Wu, Y. F., A. S. Cheng, C. H. Lin, and C. Y. Chen. 2013. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on roselle in Taiwan. *Plant Dis.* 97:1375.
- Wu, Y. F., C. H. Lin, J. F. Wang, and A. S. Cheng. 2011. Population density of *Ralstonia solanacearum* potato strain, phylotype II/race3 biovar 2, and incidence of potato bacterial wilt in fields in Dounan, Yunlin County. *Plant Pathol. Bull.* 20:68–77.

Occurrence of Bacterial Wilt on Autumn Maple Tree

Chia-Hsin Tsai^{1,*}, Pao-Jen Ann², Shu-Ling Hwang³, Yun-Sheng Lu¹, Jia-Rong Li³, and Zi-Qing Hong³

Abstract

Tsai, C. H., P. J. Ann, S. L. Hwang, Y. S. Lu, J. R. Li, and Z. Q. Hong. Occurrence of bacterial wilt of autumn maple tree. *J. Taiwan Agric. Res.* 66(1):44–52.

In 2011 some decline autumn maple trees were observed in Changhua County. The diseased trees showed leaf chlorosis, stunting, and wilt symptoms. Internally, brown discoloration of vascular tissues was observed in the infected stem. The bacteria isolated from the stem with disease symptoms formed fluidal, white colonies with pink center on triphenyl tetrazolium chloride medium. In Koch's postulates test, the inoculated autumn maple plants developed brown vascular and wilt symptoms as those observed in the field. The same bacteria were re-isolated from symptomatic plants. Based on physiological and biochemical properties, Biolog identification system, 16S rDNA sequence analysis, host range test and multiplex PCR, the causal organism was identified as *Ralstonia solanacearum* race1/biovar3/phylo type 1. This is the first report of bacterial wilt of autumn maple tree caused by *R. solanacearum* in the world.

Key words: Autumn maple tree, Bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*.

Received: January 21, 2016; Accepted: June 23, 2016.

* Corresponding author, e-mail: tsaich@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Former Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.