

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/ Phylotype II/Sequevar 7) 引起之番茄青枯病

蔡佳欣^{1,*} 黃淑苓² 李佳蓉² 林靜宜³ 呂昫陞¹

摘要

蔡佳欣、黃淑苓、李佳蓉、林靜宜、呂昫陞。2020。青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7) 引起之番茄青枯病。台灣農業研究 69(4):274–285。

宜蘭縣地區一處番茄栽植田於 2016–2017 年出現番茄植株生長不良及萎凋現象，萎凋之番茄植株枝葉仍呈青綠色，與青枯病徵狀相似。將罹病番茄莖部切開，可見維管束組織褐化蔓延，從病組織可在 triphenyl tetrazolium chloride 培養基分離出與青枯病菌相似的中間粉紅色，周圍白色流質狀之細菌菌落。該細菌分離株經生理生化特性分析、Biolog 細菌鑑定系統測試、16S rDNA 序列比對、青枯病菌專一性引子對，將該分離株鑑定為 *Ralstonia solanacearum*。進一步再經寄主範圍測試、生化型測試、青枯病菌演化型鑑別之引子對及親緣關係分析，將其歸類為第 1 生理小種 (race 1)/第 1 生化型 (biovar 1)/第 2 演化型 (phylotype II)/第 7 序列變種 (sequevar 7)。又將該分離株進行科霍氏法則試驗，接種番茄植株後可造成與田間所見相同之萎凋病徵，並從罹病植物再分離出相同的第 2 演化型青枯病菌。該分離株尚無在台灣危害番茄的紀錄，此為青枯病菌第 1 生理小種/第 1 生化型/第 2 演化型/第 7 序列變種感染番茄在台灣的首度報導。

關鍵詞：青枯病菌、第 1 生理小種、第 1 生化型、第 2 演化型、第 7 序列變種。

前言

植物青枯病 (bacterial wilt) 為青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起之維管束病害，該分離株為全球重要的植物病原細菌，寄主範圍極為廣泛，高達 250 種植物以上 (Peeters *et al.* 2013)。在台灣該分離株已經被報導感染許多植物，尤其在番茄、甜椒等茄科作物之青枯病，普遍在台灣各地發生，造成番茄植株枯萎及減產的嚴重經濟損失。由於青枯病菌在全球地理分布廣、基因歧異度高，被認為是由許多不同菌系所組成的複合種 (species complex)。在傳統上青枯病菌菌系的區分，有 2 種方式：第 1 種方式為利用寄主範圍將青枯病菌區分為 5 個生理小種 (race) (Buddenhagen *et al.* 1962;

He *et al.* 1983)；第 2 種方式是以青枯病菌利用及氧化碳水化合物能力，將其區分為 6 種生化型 (Hayward 1964, 1994; Denny 2006)。之後隨著分子生物學的發展，Fegan & Prior (2005) 提出演化型 (phylotype) 的分類系統，以設計自 16S–23S 核糖體核酸基因間之內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 之引子進行複合式聚合酶連鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction; multiplex PCR) 可將青枯病菌區分為 4 個演化型，此演化型的分類系統與地理起源相關。此外，利用青枯病菌內切葡聚糖酶基因 (endoglucanase; *egl*) 的部分序列進行親緣關係分析，可進一步再將青枯病菌區分為不同的序列變種 (sequevar)，每個演化型均由多個序列變種所組成。

投稿日期：2019 年 3 月 28 日；接受日期：2020 年 7 月 1 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計畫助理。台灣 台中市。

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。

2016–2017 年期間在宜蘭縣壯圍鄉 1 處番茄栽植田，部分植株出現萎凋，初期罹病株在白天正午時分，葉片呈現下垂（圖 1A），傍晚時恢復。數日之後植株病勢加重，出現萎凋徵狀，無法恢復，受害之番茄植株枝葉仍呈青綠色，與青枯病徵狀相似（圖 1B），該田區發病率達 30% 以上。縱切番茄莖部，可見番茄維管束褐化蔓延（圖 1C），將罹病組織置於光學顯微鏡下觀察，可見大量細菌湧出，疑似細菌性病害。採集萎凋番茄病株後，切取番茄莖部罹病組織抽取植物總核酸，以青枯病菌專一性引子以及鑑別青枯病菌演化型之引子進行 multiplex PCR 快速診斷分析後發現，所採集之罹病番茄植株樣本，絕大多數已被青枯病菌感染，因此推測該田區番茄萎凋徵狀應為該分離株所引起。同時，在 multiplex PCR 演化型鑑別結果中發現，該田區番茄罹病株，部分病

株組織內偵測到第 1 演化型 (phyloptype I) 青枯病菌感染，部分植株卻出現第 2 演化型 (phyloptype II) 青枯病菌訊號。由文獻資料可知，第 1 演化型青枯病菌為台灣最常見的青枯病菌系，分布在台灣各地，感染許多種植物。第 2 演化型青枯病菌在台灣目前僅在馬鈴薯上發現 (Wu *et al.* 2011)，尚無第 2 演化型青枯病菌感染番茄的紀錄，為瞭解出現在罹病番茄植株之第 2 演化型青枯病菌特性。本試驗擬從罹病番茄植株分離該第 2 演化型青枯病菌進行鑑定，並對其進行寄主範圍測試、生理生化特性以及核酸序列分析，以釐清該青枯病菌菌株分類地位。

材料與方法

番茄植株核酸抽取與 multiplex PCR 快速診斷

將採集自宜蘭縣壯圍鄉，疑似受到青枯病菌感染之番茄罹病株，切取罹病株莖部在 1% 次氯酸鈉中浸泡 30 s，進行表面消毒之後，再以無菌水清洗 3 次。再將莖部組織以刀片切碎，之後將組織碎片放置在無菌水中釋放細菌。核酸萃取方法參考 Wang *et al.* (1993) 所述略為修改後，先吸取細菌懸浮液 50 μL 與 0.4 N NaOH 50 μL 混合均勻後靜置 10 min，再加入 100 μL 的 1 M Tris-HCl 震盪混合均勻。吸取 20 μL ，以無菌水稀釋 10 \times 製備成 multiplex PCR 的反應模板。Multiplex PCR 參考 Fegan & Prior (2005) 所述，以 5 條設計自青枯病菌 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region (ITS) 區域之引子 (Nmult21 : 1F, Nmult21 : 2F, Numlt23 : AF, Nmult22 : InF, Numlt22 : RR) 鑑別其演化型，並配合青枯病菌專一性引子 AU759f/AU760r (Opina *et al.* 1997) 一起進行 multiplex PCR 檢測。Multiplex PCR 反應條件如下：各反應物的總體積為 25 μL ，包括濃度 1 \times PCR buffer、1.50 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 μL 模板。PCR 在熱循環反應器 (2720 Thermal Cycler, Applied BiosystemsTM, Leicestershire, UK) 內進行，PCR 溫度循環條件：先以 96 $^{\circ}\text{C}$ 進行 5 min；再以 94 $^{\circ}\text{C}$ 進行

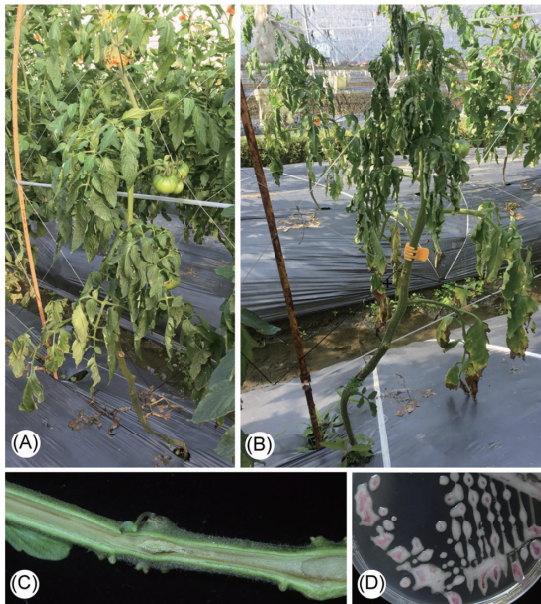


圖 1. 番茄青枯病。(A) 番茄病株葉片下垂；(B) 番茄發病嚴重，整株萎凋；(C) 莖部維管束褐化；(D) 病原細菌在 triphenyl tetrazolium chloride 培養基上的菌落型態。

Fig. 1. Bacterial wilt of tomato. (A) Diseased tomato plant showing drooping leaves; (B) the whole plant wilt in the severe diseased tomato; (C) the browning of vascular tissues; and (D) the bacterial colony morphology on triphenyl tetrazolium chloride medium.

1 min, 59°C 進行 1 min, 72°C 進行 2 min 共 30 循環; 最後 72°C 進行 10 min。PCR 產物以 2.0% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析, 植株檢測的電泳圖譜結果依據 Fegan & Prior (2005) 所述, 分析植株是否被青枯病菌感染及其演化型。

病菌分離

以移植環沾取上述由番茄組織所釋放的細菌懸浮液, 用畫線平板的方式將細菌懸浮液塗在 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 培養基上 (Kelman 1954), 培養基在 28°C 定溫箱培養 2 d 後挑選單一菌落至新培養基培養及純化。並挑選來自不同番茄植株之細菌分離株, 冷凍保存在實驗室, 供後續進一步鑑定菌株種類。

Biolog 鑑定

隨機挑選分離自不同的罹病番茄植株之 3 株細菌分離株, 分別編號為 TBW01 (2016 年分離所得)、TBW02 及 TBW03 (2017 年分離所得), 以 Biolog 鑑定系統進行鑑定。先將 3 株細菌分離株培養在 5.7% BUG™ agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 培養基, 置於 30°C 定溫箱培養 16–24 h。待細菌長出後, 以 IF-A 接種液 (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 將細菌懸浮, 並將細菌懸浮液震盪混合均勻。細菌懸浮液濃度以波長 590 nm 之濁度計 (Turbidity, Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 調整至 90–98% T (turbidity)。之後將細菌懸浮液加入 Biolog GEN III 反應盤 (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 中, 每個孔加入 100 µL 細菌懸浮液, 培養 25–35 h, 以光譜儀測讀。所得資料以 Biolog MicroLog™ 3 ver. 5.2.2 系統及 Biolog GEN III 資料庫 2.6.1 版分析, 以鑑定細菌種類。

16S rDNA 序列分析

將細菌分離株 TBW01 與 TBW02 進行核酸萃取, 細菌核酸萃取方法參考 Wang *et al.* (1993) 所述略為修改後進行。首先以滅菌牙籤沾取已純化之單一細菌菌落後, 將細菌懸浮至 20 µL 無菌水中, 然後加入 0.4 N NaOH 20 µL 與之混合。靜置 10 min 後, 再加入 40 µL 的

1 M Tris-HCl 震盪混合均勻後, 取 20 µL 以無菌水稀釋 10× 即可作為 PCR 的反應模板。萃取細菌核酸之後, 以細菌 16S rDNA 通用引子對 f8-27/r1510 (Lipson & Schmidt 2004) 進行 PCR, 增幅之 PCR 產物以 1.4% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析, 比較是否增幅出預期 DNA 片段。預期大小之 DNA 片段以 T&A™ cloning kit (Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan) 將目標 DNA 片段選殖至大腸桿菌質體, 確認預期之目標 DNA 片段的轉殖成功後, 將該轉殖菌株委由生物科技公司進行 DNA 序列定序, 所得資料在美國國家生物技術信息中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 網站進行比對。

生理小種測定

為測定本次分離所得之青枯病菌的生理小種, 參考 Buddenhagen *et al.* (1962) 及 He *et al.* (1983) 所述進行接種測試, 先將上述 3 株分離株在 TTC 培養基在 28°C 定溫箱培養 2 d 之後, 以無菌水懸浮, 利用分光光度計 (spectrophotometer, Spectronic 70, Bausch & Lomb., Bridgewater, NJ, USA), 波長 600 nm, 將細菌懸浮液之吸收值調整至 0.3 (濃度約 10^8 cfu mL⁻¹), 作為接種源。試驗植物包含「農友 301」番茄、「農友金華星」甜椒、「麻糬長茄」茄子、「克尼伯」馬鈴薯之 4 種茄科植物及「台農 7 號」花生。接種方式為先滴 1 滴製備好的細菌懸浮液至試驗植物莖部後, 以滅菌針頭穿刺莖部製造傷口供細菌感染, 3 分離株對上述試驗植物各接種 3 株, 以接種無菌水的植株作為對照組。接種後之植株套上塑膠袋保濕, 48 h 之後打開塑膠袋, 放置在 28°C 生長箱觀察發病情形, 以供生理小種判別。

生理生化特性分析

為瞭解該田區所分離之細菌分離株之生理生化特性, 參考 Hayward (1964)、Huang *et al.* (2000)、Schaad *et al.* (2001) 測定上述 3 株細菌分離株之特性, 試驗重複 2 次。試驗項目包括有革蘭氏反應 (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)、硝酸鹽之還原能力 (nitrate reduction)、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 1.0、1.5 及 2.0% NaCl 之 nutrient broth (NB) 的生長能力。

生化型 (biovar) 測定

為瞭解本次分離所得之 3 株分離株的生化型，參考 Hayward (1964, 1994) 所述，測試 3 株分離株對於 7 種碳水化合物之利用及氧化能力，包括對甘露糖醇 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、甜己醇 (dulcitol) 之三種六醣醇及海藻糖 (trehalose) 的利用能力；對乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙醣 (cellobiose) 之三種雙醣的氧化能力。

演化型測定

為瞭解分離所得菌株之演化型，將上述 3 株分離株，進行青枯病菌演化型測定，並將已知為第 1 演化型青枯病菌分離株編號 105137 (來自台中霧峰番茄罹病株) 及已知為第 2 演化型青枯病菌分離株編號 RS1118 (來自嘉義馬鈴薯病株) 作為對照組，以確認本次從宜蘭所分離所得分離株之演化型。分離株核酸以上述細菌核酸抽取方法製備，演化型的測定以上述 multiplex PCR 條件進行，PCR 產物以 2.0% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析後，所得之電泳圖譜結果依據 Fegan & Prior (2005) 判定青枯病菌演化型。

序列變種鑑定

為瞭解本次出現的青枯病菌之序列變種，將上述 3 株分離株以 *egl* 之引子對，Endo-F (ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC) 及 Endo-R (GCGTTGCCCGGCACGAACACC) (Fegan *et al.* 1998) 增幅 *egl* 部分基因序列，PCR 產物如上所述進行 *egl* 基因選殖後，委由生物科技公

司定序。所得之分離株基因序列在 NCBI 網站以 BLASTn 比對，並參考文獻從 NCBI 下載不同演化型及序列變種的青枯病菌 *egl* 基因序列，作為參考菌株，進行親緣關係分析 (phylogenetic analysis)。親緣關係分析以 MEGA X 軟體進行，先以該軟體中之 Clustal W 對分離株以及參考菌株之序列進行多序列比對，並整理成一致性序列後，再以鄰近法 (neighbor joining)，1,000 次重複取樣 (bootstrap) 法建立親緣樹狀圖 (phylogenetic tree)，親緣關係分析之參考菌株如表 1。

科霍氏法則測試

將上述 3 株分離株培養在 TTC 培養基，以上述之分光光度計將細菌懸浮液之吸收值調整至 0.3 (濃度約 10⁸ cfu mL⁻¹) 作為接種源。試驗植物為種植在盆鉢約 3 個月之「農友 301」番茄，以上述之穿刺接種方式接種番茄植株。3 株分離株各接種 3 株番茄，以接種無菌水的番茄植株作為對照組，接種後將番茄植株套上塑膠袋保濕 48 h。之後打開塑膠袋，將其放置在 28°C 生長箱觀察記錄發病情形，發病之番茄植株從莖部再分離病原細菌，所分離的細菌以 multiplex PCR 確認是否與接種的分離株相同。

結果與討論

病菌分離

2016 年在田區隨機採集番茄樣品，經由 multiplex PCR 偵測植株青枯病菌，8 株植株可增幅出青枯病菌專一性之 280 bp 片段。其中，1 株罹病番茄檢測到第 2 演化型青枯病菌感染之 372 bp 訊號，7 株番茄植株檢測出第 1 演化型青枯病菌感染之 144 bp 訊號，隔年 (2017 年) 該田區番茄持續發生青枯病。隨機採集得到 17 株番茄青枯病株，經偵測發現有 15 株番茄植株檢測出第 2 演化型青枯病菌，2 株番茄植株為第 1 演化型青枯病菌感染。為瞭解第 2 演化型青枯病菌的特性，將檢測到第 2 演化型青枯病菌感染之番茄罹病株，從莖部分離病原細菌，可在 TTC 培養基平板上分離出與青枯病菌型態相似之中間粉紅色，周圍為白色的流質狀的菌落。因此，將該細菌菌落

表 1. 青枯病菌親緣關係分析之參考菌株。

Table 1. *Ralstonia solanacearum* reference strains for phylogenetic analysis.

Strain	Host	Origin	<i>egl</i> -tree Phylotype ^z	Sequevar	GenBank No.
A3909	Heliconia	United States	IIA	6	EF371812.1
ACH732	Tomato	Australia	IV	8	GQ907150.1
AW1	Tomato	Alabama	II	7	KC188082.1
CFBP2957	Tomato	Martinique	IIA	36	AF295265
CFBP734	Potato	Madagascar	IIIa	19	AF295274.1
CIP120	Potato	Peru	IIA	38	GQ907152.1
ICMP7963	Potato	Kenya	IIA	7	AF295263.1
JT516	Potato	Reunion	IIB	1	AF295258.1
J25	Potato	Kenya	III	20	AF295279.1
CFBP2047	Tomato	United States	IIA	7	AF295262.1
MOLK2	Banana	Philippines	IIB	3	EF371841.1
P822	Blueberry	Florida	IIA	7	MF783889.1
Po82	Potato	Mexico	IIB	4	FJ561070.1
Pss81	Tomato	Taiwan	I	14	EU407270.1
Pss358	Tomato	Taiwan	I	15	EU407298.1
Psi7	Tomato	Indonesia	IV	10	EF371804.1
UW21	Banana	Honduras	IIA	6	DQ011546.1

^z *egl*: endoglucanase.

以移植環移植至新的 TTC 培養基上純化 (圖 1D)，共分離出 22 株分離株。之後該發病田區轉種水稻，在該田區未再繼續收集菌株。從所分離的細菌分離株中隨機挑選 3 株分離自不同植株之分離株，編號為 TBW01、TBW02 及 TBW03，以供進一步鑑定該病菌種類及生物特性等，確認田間番茄罹病植株是否被第 2 演化型青枯病菌株感染。

Biolog 鑑定

將上述分離純化所得與青枯病菌菌落型態相似之 3 株細菌分離株，以 Biolog 鑑定系統進行分析，將 3 株細菌分離株培養在 Biolog GEN III 反應盤，測定該分離株的生理特性及對各種碳素源的利用情形。培養 25–35 h 時，以光譜儀測讀反應盤顏色變化結果，所得讀值資料經 Biolog MicroLog™ 分析及比對資料庫後，3 株細菌分離株，系統顯示與 *R. solanacearum* 相似值最高，相似值分別為 0.738、0.704、0.736，已超過系統設定臨界值 0.5。因此，3 株細菌分離株最可能為 *R. solanacearum*。

16S rDNA 序列分析

將細菌分離株 TBW01 及 TBW02，以細菌通用 16S rDNA 通用引子對 f8-27/r1510 進行 PCR。經電泳分析後，2 株分離株均可增幅出約 1,500 bp DNA 片段。將該 DNA 片段成功轉殖至大腸桿菌質體後，進行核酸定序，所得之 2 株分離株 DNA 序列彼此之間相同度為 100%，以 TBW01 之 16S rDNA 序列為代表上傳 NCBI (GenBank accession number MK418540.1)。將該序列在 NCBI 上比對，結果與 *R. solanacearum* strain K60-1 (GenBank accession number NR 044040.1) 以及 *R. solanacearum* LMG 2299 (GenBank accession number EF016361.1) 相同度最高，達 100%。

生理小種測定

為瞭解本次發生的青枯病菌之生理小種，因此進行寄主範圍測試，將上述 3 株分離株，以穿刺方式接種病菌至番茄、甜椒、茄子、馬鈴薯、花生植株。接種 2 d 後，4 種茄科植物包括番茄、甜椒、茄子、馬鈴薯以及非茄科之

花生植株葉片開始發生輕微失水下垂情形，7 d 之後植株陸續出現莖部維管束褐化及葉片失水的萎凋病徵，接種無菌水之對照植株未出現萎凋病徵。

青枯病菌被認為由許多不同的菌系所組成的複合種，這些菌系可依照寄主範圍的差別將其區分為 5 個生理小種。第 1 生理小種可以感染多種茄科植物，包括番茄、甜椒、馬鈴薯、茄子、菸草等以及多種非茄科植物，亦稱為茄科菌系。第 2 生理小種，主要感染 3 倍體香蕉以及赫蕉屬 (*Heliconia*) 植物，亦稱為芭蕉科菌系。第 3 生理小種主要感染馬鈴薯與番茄，稱為馬鈴薯菌系，對其他茄科植物毒性 (virulence) 較低。第 4 生理小種為自菲律賓罹病薑所分離之菌系，只能感染薑，亦稱為薑菌系。第 5 生理小種為從中國大陸罹病桑樹所分離之菌系，主要為害桑樹，對茄子與馬鈴薯病原性較弱，亦稱為桑菌系 (Buddenhagen *et al.* 1962; He *et al.* 1983)。

台灣田間常見的青枯病菌之生理小種，幾乎都是寄主範圍廣泛的第 1 生理小種，僅有在馬鈴薯上發現第 3 生理小種。由本次接種試驗可知，3 株分離株均可對多種茄科作物，包括番茄、甜椒、茄子、馬鈴薯以及非茄科作物花生，造成植株維管束褐化以及萎凋的病徵。因此，3 株分離株依據其寄主範圍較廣泛，並且可對上述多種試驗植物造成萎凋的病徵。符合上述第 1 生理小種特性，因此將該分離株鑑定為第 1 生理小種。

生理生化特性以及生化型測定

為了瞭解本次分離所得青枯病菌之生理生化特性，將上述 3 株分離株測定其生理生化特性及生化型，試驗重複 2 次。3 株分離株測定結果相同，均屬於革蘭氏陰性菌 (gram negative)，好氣性，在 King's B 培養基上培養無螢光色素產生，在 YDC 培養基上菌落為淡褐色，該分離株在氧化酵素、尿素酵素、過氧化氫酵素及硝酸鹽還原能力測試屬於正反應。在精氨酸二水解酵素、苯丙胺酸脫胺酵素、白明膠水解作用、果聚糖產生、澱粉水解作用、硫化氫的產生、吲哚的產生等，則屬於負反應。另外，該分離株可在含有 1.0% 及 1.5% NaCl 之 NB 下生

長，但在 2.0% NaCl 及 40°C 下無法生長 (表 2)，其基本生理生化特性與青枯病菌相同。在生化型測定上，所測定的 3 株分離株對下列 7 種碳水化合物測定結果相同，不能氧化乳糖、麥芽糖、纖維雙糖 3 種雙糖，不能利用甘露糖醇、山梨聚糖醇、甜己醇 3 種六糖醇，但可以利用海藻糖。因此，對照 Hayward (1994) 資料，將 3 株分離株歸類為第 1 生化型 (表 3)。

據 Hsu (1991) 及 Lin (2008) 研究，在台灣田間普遍分布，可感染茄科等多種寄主植物的青枯病菌均為第 1 生理小種，且屬於第 3 或第 4 生化型。近年在馬鈴薯上，則有第 3 生理小種/第 2 生化型菌系出現，造成馬鈴薯青枯病的報告 (Wu *et al.* 2011)。本次從宜蘭的萎凋番茄植株所分離之青枯病菌分離株，經上述 7 種碳水化合物進行生化型測定，屬於第 1 生化型，而非台灣田間普遍分布的青枯病菌第 3 及第 4 生化型菌系或馬鈴薯上發現的第 2 生化型菌系。結果顯示，該分離株為台灣新出現菌系，與以往的青枯病菌具有不同的生化特性。

演化型測定

將分離純化所得之 3 株分離株抽取核酸後，進行青枯病菌專一性引子及演化型測定。由 multiplex PCR 結果顯示，從宜蘭罹病番茄所分離出之分離株 TBW01、TBW02 及 TBW03，均可增幅出第 2 演化型 372 bp 及青枯病菌 280 bp 之 DNA 特異性片段。第 1 演化型對照組之番茄青枯病菌分離株編號 105137，增幅出第 1 演化型之 144 bp 與青枯病菌之 280 bp 特異性 DNA 片段。而第 2 演化型對照組之馬鈴薯分離株編號 RS1118，增幅出第 2 演化型之 372 bp 及青枯病菌之 280 bp 特異性 DNA 片段，證實從宜蘭番茄罹病株分離所得的分離株屬於第 2 演化型青枯病菌 (圖 2)。

青枯病菌為表現型與基因型具有高度歧異度之複合種，Fegan & Prior (2005) 提出青枯病菌演化型的分類系統，利用 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region (ITS) 的核酸序列，設計出 5 條引子，可將青枯病菌菌系區分為 4 個演化型。配合青枯病菌專一性引子 Au759f/Au760r 進行 multiplex PCR，可同時鑑定所分離的菌株是否為青枯病菌 (Fegan &

表 2. 番茄青枯病原細菌之生理生化分析。

Table 2. Physiological and biochemical analyses of tomato bacterial wilt pathogen.

Character	TBW01, TBW02 and TBW03 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	-	-
Oxidase	+	+
Urease	+	+
Catalase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	-
Nitrate reduction	+	+
Levan production	-	-
Hydrolysis of starch	-	-
Production of H ₂ S	-	-
Production of indole	-	-
Growth at 40	-	-
Growth in broth with 1.0% NaCl	+	+
Growth in broth with 1.5% NaCl	+	+
Growth in broth with 2.0% NaCl	-	-

^z Data adapted from Huang *et al.* (2000) and Schaad *et al.* (2001).

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

表 3. 番茄青枯病菌生化型測定。

Table 3. Biovar test of *Ralstonia solanacearum* of tomato plants.

Carbohydrate	TBW01, TBW02 and TBW03 strains	<i>R. solanacearum</i> biovar 1 ^z
Utilization of		
Mannitol	- ^y	-
Sorbitol	-	-
Dulcitol	-	-
Trehalose	+	+
Oxidation of		
Lactose	-	-
Maltose	-	-
Cellobiose	-	-

^z Data adapted from Hayward (1994).

^y +: positive; and -: negative.

Prior 2005)。此青枯病菌的 4 個演化型菌系與其地理位置起源相關，第 1 演化型，主要為亞洲 (Asia) 菌株，multiplex PCR 可增幅出第 1 演化型之 144 bp 特異性 DNA 片段以及青枯

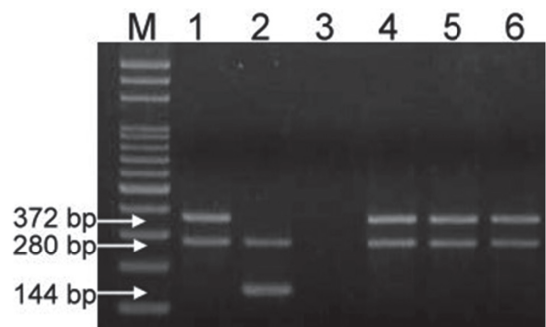


圖 2. 番茄青枯病菌演化型鑑定。行 M: 100-bp marker; 行 1: 第 2 演化型青枯病菌分離株編號 RS1118 之 DNA 對照; 行 2: 第 1 演化型青枯病菌分離株編號 105137 之 DNA 對照; 行 3: 未含有 DNA 模板之負對照; 行 4-6: 分離自宜蘭番茄的青枯病菌分離株 TBW01、TBW02、TBW03。

Fig. 2. Phylotype identification of *Ralstonia solanacearum*. Lane M: 100-bp marker; Lane 1: DNA control of *R. solanacearum* phylotype II isolate RS1118; Lane 2: DNA control of *R. solanacearum* phylotype I isolate 105137; Lane 3: no template control; and Lane 4-6: DNA of tomato bacterial wilt pathogen TBW01, TBW02 and TBW03 isolates.

病菌之特異性 DNA 片段 280 bp，第 2 演化型主要為美洲 (America) 菌株，可增幅出 372 bp 與 280 bp 之特異性片段。第 3 演化型 (phylotype III) 主要為非洲及其周圍島嶼 (Africa and surrounding islands) 菌株，可增幅出 91 bp 與 280 bp 之特異性片段。第 4 演化型 (phylotype IV) 主要為印尼 (Indonesia) 菌株，可增幅出 213 bp 與 280 bp 之特異性片段。台灣田間存在第 1 演化型與第 2 演化型青枯病菌；第 1 演化型青枯病菌為田間最常見之菌系，目前均屬於第 1 生理小種，可感染多種寄主；第 2 演化型青枯病菌僅在馬鈴薯青枯病株上發現，屬於第 3 生理小種，尚無感染其他作物的紀錄。本次所分離所得的菌株，屬於第 2 演化型青枯病菌，首次發現感染田間番茄。

序列變種測定

為瞭解本次新發生的青枯病菌序列變種，以 *egl* 基因之專一性引子對 Endo-F/Endo-R

對上述 3 株青枯病菌分離株進行 PCR，可增幅出約 850 bp DNA 片段。該片段經基因選殖及定序所得之序列，3 株分離株比對彼此 DNA 序列相同度為 100%。因此，以 TBW01 為代表上傳 NCBI (GenBank accession number MT497919)，在 NCBI 資料庫中以 BLASTn 比對分析，發現 TBW01 分離株與 *R. solanacearum* strain AW1 (GenBank KC188082.1)，在可比對的區域中，相似度達 99% 以上。進一步將分離株 TBW01 之 *egl* 部分序列與國際上已發表的不同序列變種菌株進行親緣關係分析，在親緣關係分析結果顯示 TBW01 分離株屬於第 2 演化型中的 A 群 (phylotype IIA)，並與 IIA 中第 7 序列變種之青枯病菌參考菌株 *R. solanacearum* strain P822、ICMP7963、K60 及 AW1 歸類在一起 (圖 3)。因此，將本次所分離之青枯病菌分離株，鑑定為第 7 序列變種。

Fegan & Prior (2005) 提出青枯病菌演化

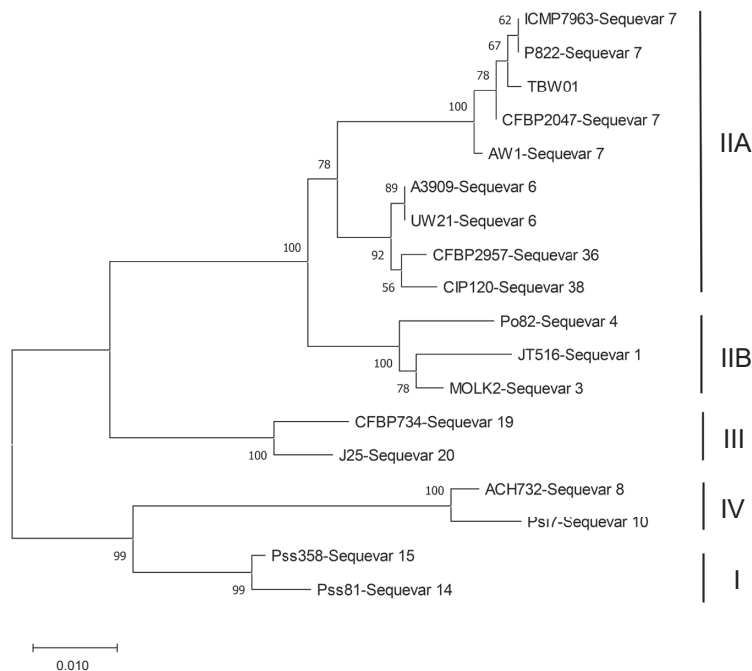


圖 3. 番茄青枯病菌 TBW01 分離株與參考菌株之部分內切葡聚糖酶基因序列，經鄰近結合法建立親緣樹狀圖，枝條處的數字代表 bootstrap 值。各菌株之 *egl*-tree 演化型 (I, IIA, IIB, III, IV) 標示在樹狀圖右側。比例尺表示每 100 個核苷酸有 1 個核苷酸變化。

Fig. 3. A neighbor-joining phylogenetic tree of tomato bacterial wilt TBW01 isolate and reference strains based on the partial endoglucanase (*egl*) gene sequences. The numbers on the branches represent bootstrap values. The endoglucanase (*egl*)-tree phylotypes (I, IIA, IIB, III and IV) of each strain are marked on the right side of the tree. The scale bar indicates 1 nucleotide change per 100 nucleotides.

型的分類系統，每個演化型均包含多個序列變種。一個序列變種，是指在特定基因範圍內具有高度保守性的一群青枯病菌菌株。在序列變種分析上，可利用青枯病菌之 *egl* 部分基因序列進行親緣關係分析。目前全球青枯病菌序列變種已達 64 個 (Chen 2018)，台灣的青枯病菌序列變種至少有 11 個 (10 個序列變種屬於第 1 演化型，1 個序列變種屬於第 2 演化型 B 群) (Lin *et al.* 2014)，仍不斷的在增加中。本次宜蘭地區發生的番茄青枯病菌，經親緣分析為第 7 序列變種且屬於第 2 演化型 A 群，為台灣新發生之序列變種菌株。第 7 序列變種青枯病菌在全球已被記載出現在非洲肯亞 (Kenya)、美國東南各州包括阿拉巴馬州 (Alabama)、路易斯安納州 (Louisiana)、佛羅里達州 (Florida)、喬治亞州 (Georgia)、北卡羅萊納州 (North Carolina)、南卡羅萊納州 (South Carolina) (Hong *et al.* 2012; Norman *et al.* 2018; Jimenez Madrid *et al.* 2019) 以及千里達島 (Trinidad) (Ramsubhag *et al.* 2012) 等地，可感染番茄、馬鈴薯、菸草、藍莓等作物。

科霍氏法則試驗

將上述 3 株分離株，以穿刺接種法接種至紅番番茄後，在接種 2 d 後，所接種之番茄植株開始出現葉片下垂的失水病徵，7 d 之後植株逐漸萎凋，植株維管束褐化，植株仍呈青綠色 (圖 4)，與田間所見的番茄病株病徵相同。接種無菌水的對照組番茄植株，則無出現萎凋的病徵。從發病的番茄莖部可再回分出病菌，該病菌再以上述 multiplex PCR 確認為與原接種病菌相同之第 2 演化型青枯病菌，完成科霍氏法則，確認該分離株為病原菌。

結論

作物青枯病在台灣田間發生已久，從過去的紀錄絕大多數的青枯病菌屬於第 1 生理小種/第 3 或 4 生化型/第 1 演化型，僅在馬鈴薯上發現第 3 生理小種/第 2 生化型/第 2 演化型青枯病菌。2016–2017 年在宜蘭縣 1 處番茄栽培田區所發生的番茄萎凋現象，檢測發現罹病植株疑似有第 2 演化型青枯病菌感染，因此從病組



圖 4. 番茄植株人工接種分離到的細菌，7 d 後植株萎凋 (左)，接種無菌水之對照植株 (右) 無病徵。

Fig. 4. The tomato plants showed wilt symptoms in 7 days after inoculation with the isolated bacteria (left) and no symptom in plants inoculated with sterile water (right).

織分離病原細菌。依據該細菌在 TTC 培養基的菌落型態特徵，Biolog 鑑定、16S rDNA 序列比對以及青枯病菌專一性引子對測定，鑑定病原細菌為 *R. solanacearum*。該分離株經測試寄主範圍將其歸類為第 1 生理小種，測試生化特性屬於第 1 生化型，經核酸序列分析為第 2 演化型以及第 7 序列變種。該分離株寄主範圍廣泛的特性，與台灣常見第 1 生理小種菌系相同，但該分離株屬於第 1 生化型/第 2 演化型特性，又與台灣田間常見的第 1 生理小種屬於第 3 或 4 生化型/第 1 演化型特性不同，該分離株亦與在馬鈴薯上發現之第 3 生理小種/第 2 生化型/第 2 演化型菌株不同。此外，該分離株屬於第 7 序列變種，亦未在台灣報導過，顯示該分離株為台灣新發生的青枯病菌系，此為第 1 生理小種/第 1 生化型/第 2 演化型/第 7 序列變種青枯病菌感染台灣田間番茄的首次報告。

誌謝

本研究承美國農業部柑橘及其他亞熱帶產品研究 Jason C. Hong 博士，對青枯病菌序列變種分析提供協助，特此申謝。

引用文獻

- Buddenhagen, I., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.
- Chen, Y. 2018. The phylotype and sequevar of *Ralstonia solanacearum* and characteristics of bacterial wilt pathogen isolated from cucurbitaceae plants in Guangxi. Master Thesis, Department of Plant Pathology, Guangxi University, Guangxi, China. 63 pp. (in Chinese with English abstract)
- Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia species*. p.573–644. *in*: Plant-Associated Bacteria. (Gnanamanickam, S. S., ed.) Springer. Dordrecht, The Netherlands. 712 pp. doi:10.1007/978-1-4020-4538-7
- Fegan, M., M. Taghavi, L. I. Sly, and A. C. Hayward. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. p.19–33. *in*: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. (Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone, eds.) Springer Publishing. Berlin, Germany. 447 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.* 27:265–277. doi:10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x
- 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., L. Sequeira, and A. Kelman. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357–1361. doi:10.1094/PD-67-1357
- Hong, J. C., D. J. Norman, D. L. Reed, M. T. Momol, and J. B. Jones. 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. *Phytopathology* 102:924–936. doi:10.1094/PHYTO-12-11-0342
- Hsu, S. T. 1991. Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 33:72–79. (in Chinese with English abstract)
- 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. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.200003_9(1).0006
- Jimenez Madrid, A. M., V. P. Doyle, and M. L. Lewis Ivey. 2019. Characterization of *Ralstonia solanacearum* species complex strains causing bacterial wilt of tomato in Louisiana, USA. *Can. J. Plant Pathol.* 41:329–338. doi:10.1080/07060661.2019.1584588
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693–695.
- 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, Taiwan. 101 pp.
- Lin, C. H., K. C. Tsai, P. Prior, and J. F. Wang. 2014. Phylogenetic relationships and population structure of *Ralstonia solanacearum* isolated from diverse origins in Taiwan. *Plant Pathol.* 63:1395–1403. doi:10.1111/ppa.12209
- 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. doi:10.1128/AEM.70.5.2867–2879.2004
- Norman, D. J., A. M. Bocsanczy, P. Harmon, C. L. Harmon, and A. Khan. 2018. First report of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* on blueberries (*Vaccinium corymbosum*) in Florida. *Plant Dis.* 102:438. doi:10.1094/PDIS-06-17-0889-PDN
- 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 probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5:19–30.
- Peeters, N., A. Guidot, F. Vaillau, and M. Valls. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14:651–662. doi:10.1111/mpp.12038
- Ramsubhag, A., D. Lawrence, D. Cassie, R. Fraser, P. Umaharan, P. Prior, and E. Wicker. 2012. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum*

- strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. *Plant Pathol.* 61:844–857. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02572.x
- Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 373 pp.
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153
- 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 in Dounan, Yunlin County. *Plant Pathol. Bull.* 20:68–77. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.201112_20(3_4).0002

Occurrence of *Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/Phylotype II/Sequevar 7 Causing Tomato Bacterial Wilt in Taiwan

Chia-Hsin Tsai^{1*}, Shu-Ling Hwang², Jia-Rong Li², Ching-Yi Lin³, and Yun-Sheng Lu¹

Abstract

Tsai, C. H., S. L. Hwang, J. R. Li, C. Y. Lin, and Y. S. Lu. 2020. Occurrence of *Ralstonia solanacearum* race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7 causing tomato bacterial wilt in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(4):274–285.

During 2016–2017, growth decline and wilt were observed in a number of tomato plants in a tomato planting field in Yilan County. The leaves of the wilt tomato plants remained greenish, similar to the symptoms of the bacterial wilt. The stems of the diseased tomato were cut open, and the vascular tissues were found browning in appearance. The bacteria colonies isolated from the diseased stems were fluidal, white with pink center on triphenyl tetrazolium chloride medium. Based on physiological and biochemical properties, Biolog identification system, 16S rDNA sequence analysis and specific primer pair, the bacteria were identified as *Ralstonia solanacearum*. The bacteria were further classified as race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7 by the host range, biovar test, phylotype multiplex polymerase chain reaction and phylogenetic analysis. In Koch's postulates, the inoculated tomato plants developed wilt symptoms as those observed in the field, and the same bacteria were re-isolated from symptomatic plants. This is the first report of *R. solanacearum* race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7 causing tomato bacterial wilt in Taiwan.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, Race 1, Biovar 1, Phylotype II, Sequevar 7.

Received: March 28, 2109; Accepted: July 1, 2020.

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

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

² Project Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

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