植物保護學會會刊　39: 195～205, 1997

榕樹細菌性癌腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在臺灣之發生

許秀惠[1]　林俊義[1]　陳福旗[2]

1. 台中縣霧峰鄉臺灣省農業試驗所植病系
2. 屏東縣內埔鄉國立屏東技術學院農園系

(接受日期：85國年5月10日)

摘　　要

許秀惠、林俊義、陳福旗　1997　榕樹細菌性癌腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在臺灣之發生　植保會刊　39: 195-205.

於田尾地區田間及盆栽栽培之金門榕 (*Ficus microcarpa* L. f. var. *pusilifolia* Liao cv. Kin-men)，中葉榕 (*Ficus microcarpa* L. f. cv. Middle-leaf) 及屏東地區之小葉榕 (*Ficus microcarpa* L. f. var. *pusilifolia* Liao) 植株上發現腫瘤病，腫瘤大小可達10～20餘公分，主要發生於根冠、樹幹或枝條之修剪處或其它傷口處。由腫瘤處分離所得之細菌在PDA培養基上形成黏濕，圓形具亮光，不透明的白色菌落，爲革蘭氏陰性，好氣性，具有1～6根週生鞭毛的桿狀細菌。該細菌以Biolog GN Microplate鑑定結果與 *Agrobacterium tumefaciens* 相近，再依選擇性培養基及各種生理生化試驗結果屬於biovar 1。該細菌接種於胡蘿蔔肉質根切塊上，經4～5 天後於形成層處形成淡綠色癒合組織狀之腫大，但未出現根狀增生；以針刺及剪枝條的方法接種於盆栽金門榕及中葉榕之枝條上及農友301番茄植株之莖或葉柄處，榕樹於接種後約三星期於接種處出現淡黃色小腫瘤，顏色隨著腫瘤增大而加深，而番茄植株則於接種後7～10天於接種處形成淡白綠色之腫瘤，之後瘤漸增大且顏色轉爲淡黃色，整個瘤約可大到1公分，且在近感染處同側的葉片呈現失水狀，該葉片最後萎凋。根據上述試驗結果顯示造成榕樹癌腫病之病原菌爲 *Agrobacterium tumefaciens biovar* 1。

(關鍵詞：榕樹，癌腫病，癌腫病菌，鑑定)

緒　　言

榕樹屬桑科 (Moraceae) 榕屬 (*Ficus*)，約有近千種，適於庭園及盆栽種植，尤其

是觀賞用盆景(Bonsai)之榕樹常被藝術化栽培，頗受舉世青睞，極具外銷潛力，而且榕樹是本省分佈最普遍的觀賞樹種之一，本省各地商業化栽培頗多，價格在數千至數萬元之間，經濟價值頗高。

由 *Agrobacterium tumefaciens* 引起之癌腫病是一種相當古老的病害，自從 Smith & Townsend[37] 發現此病害距今已近百年，除少數菌株寄主範圍狹窄外，大部份菌株之寄主範圍相當廣泛[7,11,16,23,26]，至少可感染138科588屬1193種以上的植物，主要以感染被子植物中之雙子葉植物爲主，但也感染少數的被子植物中之單子葉植物及裸子植物，其中較具經濟重要性的寄主有桃、梨、蘋果、杏、葡萄等果樹類，菊花、玫瑰等觀賞作物以及松、樺木、白楊等森林植物，而感染榕樹最早的報告是1919年，在Florida的Everglades地區的 *Ficus aurea Nutt* 上發現大腫瘤[19]，現今已知可被本病菌感染的榕樹有黃果榕(*F. aurea* Nutt.)，垂榕(*F. benjamina* L.)，假麗雅榕(*F. carica* L.)，膠榕(*F. elastica* Roxb.)，及 *F. pandurata* Hort. 等(10,16)，而本省普遍分佈的 *F. microcarpa* 卻未見任何癌腫病之記載。本省有關癌腫病最早之記載爲朱及胡[2]於1959年調查甜菜病害時首度紀錄，孫[3]於1967年調查本省溫帶果樹病害時於蘋果上發現癌腫病，謝[6]於1980年調查臺灣木本植物病害時也紀錄了檸檬桉癌腫病，但這些報告都僅是調查記錄而未有任何詳細的病原菌分離及鑑定之敘述，直到1992年王氏[1]曾分離造成臺灣赤桉及玫瑰桉植株上腫瘤之病原菌，發現係由癌腫病菌(*Agrobacterium tumefaciens*)所引起，除此之外，本省一直未有癌腫病菌在其他寄主或癌腫病菌特性之相關研究，本文即探討 *Agrobacterium tumefaciens* 造成本省金門榕、中葉榕及小葉榕等榕樹癌腫病之病徵，病原菌特性及分類等，以供進一步研究參考。

材料與方法

菌株分離及其來源

由本省田尾地區之金門榕(*Ficus microcarpa* L. f. var. *pusilifolia* Liao cv. Kin-men)及中葉榕(*Ficus microcarpa* L. f. cv. Middle-leaf)植株上及屏東地區的小葉榕(*Ficus microcarpa* L. f. var. *pusilifolia* Liao)植株上發現不明原因之腫瘤，切取腫瘤內部組織置無菌蒸餾水中，經振盪後以移植環(loop)沾取懸浮液，劃線於PDA (potato dextrose agar)平板上，置25℃下數天後挑取不透明白色、圓形突起、黏濕具光澤之單菌落，再劃線於PDA平板，重覆三次後移至PDA斜面備用。本研究中共選取85007，85011(分離自田尾金門榕)，chung 001，chung002～2(分離自田尾中葉榕)，F001(分離自屏東小葉榕)，及Chry 5(Dr. Pueppke, S. G. 提供，分離自菊花癌腫病菌株，已知爲 *A. tumefaciens* biovar 1)[13,27,31]等6個分離株爲供試菌株。

接種試驗

胡蘿蔔(*Daucus carota*)肉質根切片接種[8,29]：將胡蘿蔔肉質根表面消毒後橫切成片狀，置培養皿內以衛生紙(舒潔)加無菌水保濕，以移植環沾取培養於PDA培養基一天之細菌菌落，直接塗抹於胡蘿蔔切片之形成層處，觀察並記錄病徵，並以無菌水接種當對照。另外，將菌落直接抹於胡蘿蔔切片之正面及反面，以比較其產生腫瘤反應是否相同。

番茄及榕樹接種：將供試菌株分別培養於PDA斜面上，置28℃下二天後，直接以菌泥爲接種源，以蟲針刺傷及剪刀剪傷等方法製造傷口，之後直接將接種源塗抹於供試植物之傷口處，供試植物爲盆栽之農有301番茄，金門榕及中葉榕，接種

後放置28℃下，以塑膠袋套袋保濕24小時，並以無菌水接種當對照組，觀察並記錄病徵出現情形。

最低致病濃度測定：將培養於PDA上24小時之榕樹腫瘤病菌懸浮於無菌水中，作10倍系列稀釋後展佈於PDA平板以確定在該培養條件下之細菌懸浮液其A_{590}光譜儀吸收值與細菌濃度之關係，再將相同培養條件之細菌懸浮於無菌蒸餾水中，將細菌濃度調整爲10^8cfu/ml，並經10倍系列稀釋之細菌懸浮液當接種源，分別取0.1ml滴於已製造傷口之番茄植株上，或分別塗抹於胡蘿蔔切片上，以進行不同接種源濃度之致病性測定。

病原菌之鑑定

形態觀察：在28℃下PDA斜面上培養一天之細菌，加入少許無菌水約5秒後，輕輕吸起並滴於載玻片上，再加入等量的2%鎢酸染色液(PTA，pH7.5，含0.1% Bovine serum albumin)，二分鐘後以覆有formvar支持膜的銅網沾取，再以濾紙吸乾，並以Hitachi-7000的穿透式電子顯微鏡觀察細菌形態，鞭毛著生位置及鞭毛數目。

碳源利用測定：在28℃，TSA培養基(Tryptic soy agar; Bacto Tryptone 15g, Bacto Soytone 5g, Sodium Chloride 5g, Bacto Agar 15g)上培養過夜之細菌，事先以Suslow等人(38)的方法確定其爲革蘭氏陰性菌後，再依Biolog產品所述方法測試榕樹癌腫病菌對Biolog GN MicroPlate (Biolog Inc., Hayward, Calif.)反應盤中95種基質之利用能力，再將結果輸入電腦資料庫中比對，藉以鑑定菌株之分類地位。

生理生化特性測定：在28℃，PDA斜面上培養一天之細菌，依Moore等人(32)所述方法測定細菌之生理生化特性，項目包括3-ketolactose production，在含2% NaCl之培養基上生長的能力，在35℃之生長能力，litmus milk反應，利用sucrose，erythritol及melezitose產酸的能力，利用malonic acid、L-tartaric acid、propionic acid及mucic acid產酸鹼之能力，及ferric ammonium citrate，L-tyrosine utilization，citrate utilization等試驗之反應，並測試在medium 1A，medium 2E及Roy-Sasser等三種選擇性培養基上生長的能力。

結　　果

細菌形態，菌落及生理生化特性

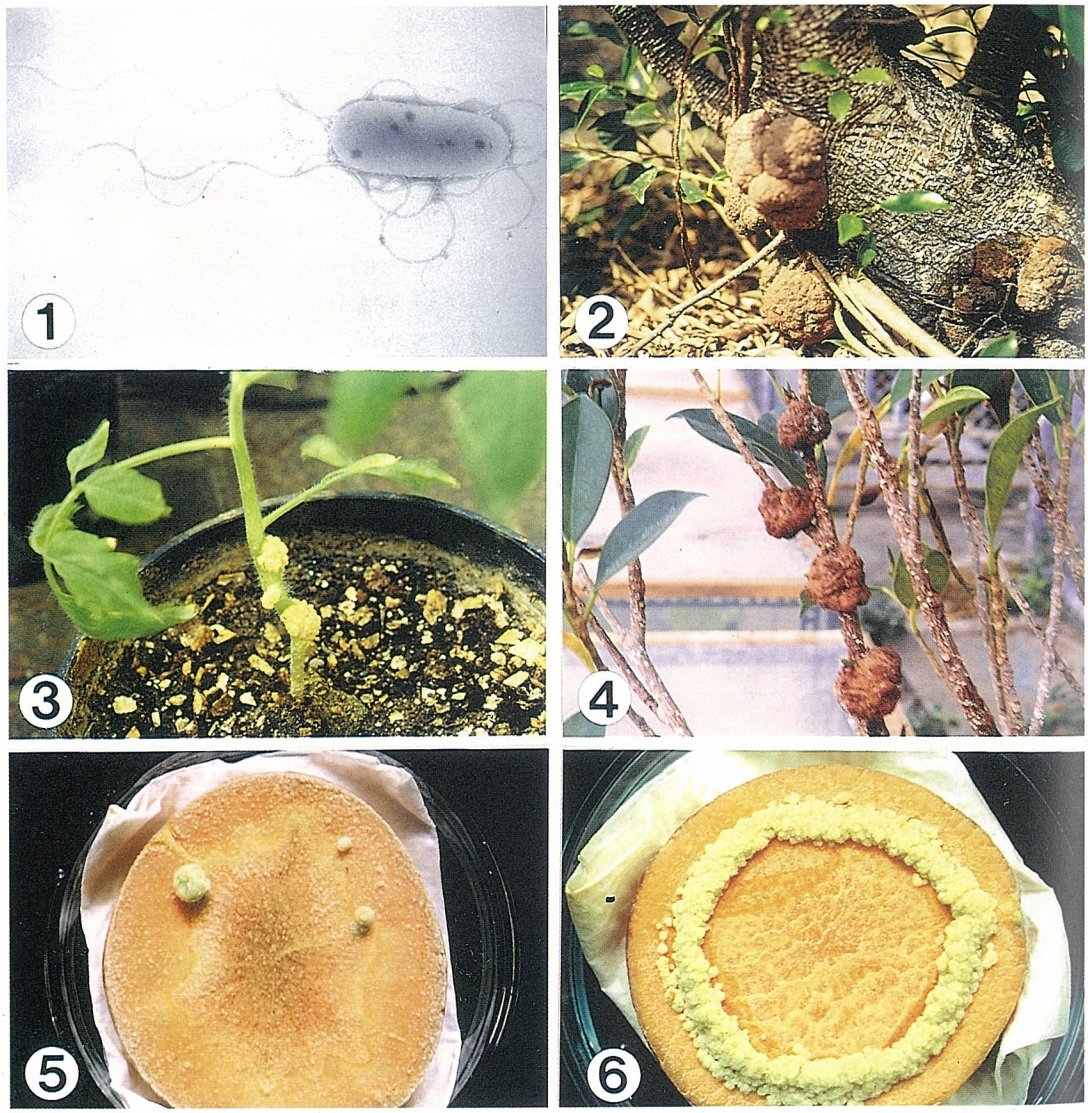
在PDA培養基上爲黏濕，圓形，突起，具亮光，不透明的白色菌落，爲具有1～6根週生鞭毛的桿狀細菌，且鞭毛數以3～4根所占比率最高(圖一)。該細菌爲革蘭氏陰性，好氣性，依Moore等所述利用選擇性培養基及各種生理生化試驗，結果所有供試菌株之反應與biovar 1反應相同(表一)。

Biolog GN MicroPlate測定結果

該細菌經Biolog GN Microplate (Biolog, Inc., Hayward, Calif.)測定結果鑑定爲*Agrobacterium tumefaciens*，其相似度介於0.73～0.92之間。

榕樹癌腫病田間病徵

84年春天在屏東市區種植之小葉榕植株上發現之腫瘤，由於腫瘤一直沒有被去除，所以有些腫瘤已大到20公分以上，而且由於植株常被修剪所以不斷被傳播造成整棵樹佈滿大大小小的腫瘤，腫瘤發生於根冠、樹幹或枝條之修剪處或其他傷口處，有些腫瘤上產生許多黃綠色小芽。85年夏天從田尾花卉栽培區農民栽培於田間及專供觀賞用盆栽之金門榕及中葉榕植株上亦發現腫瘤(圖二)，因農民會將腫瘤



圖一至圖六、榕樹癌腫病之田間及接種病徵。

Figs. 1-6. *Agrobacterium turnefaciens* and symptoms it causesd.

Fig. 1. The negative stain reveals flagella of *Agrobacterium turnefaciens*.

Fig. 2. The crown galls caused by *Agrobacterium turnefaciens* ocurred on *Ficus microcarpa*.

Fig. 3. The symptoms of crown gall occurred on tomato through artifical inoculation.

Fig. 4. The galls occured on the juvenile canes of *Ficus microcarpa*.

Fig. 5. The galls occurred on carrot slice even when the bacterial concentration was diluted down to few individuals/ml.

Fig. 6. The callus occurred in a circular form on the carrot slice when bacterial mas was spreaded on cambium layer.

拔除，所以腫瘤通常長不大，但有些腫瘤可達 10 餘公分以上，腫瘤常發生於地際部之樹幹上，有時則發生於枝條之修剪處或其它傷口處，在中葉榕之腫瘤上也偶而可見黃綠色小芽產生，但在金門榕之腫瘤上則未見小芽產生。

表一、榕樹及菊花癌腫病菌菌株之生物型鑑定

Table 1 The identification of biovar of *Agrobacterium tumefaciens* from *Ficus microcarpa* and *Chrysanthemum morifolium*

Diagnostic test	Biovar 2[1)]	Chrysanthemum[2)] (Chry 5 strain)	*Ficus* (5 strains)
3-Ketolactose production	−	+	+
Growth in 2% NaCl	−	+	+
Growth at 35℃	−	+	+
Action on litmus milk			
Alkaline	−	+	+
Acid	+	−	−
Acid from：			
Sucrose	−	+	+
Erythritol	+	−	−
Melezitose	−	+	+
Alkali from：			
Malonic acid	+	−	−
L-tartaric acid	+	−	−
Propionic acid	−	−	−
Mucic acid	+	−	−
Ferric ammonium citrate	−	+	+
L-tyrosine utilization	+	−	−
Citrate utilization	+	+	+

1) Data from L. W. Moore *et al.* 1988. *Agrobacterium* in "Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria ".

2) The known biovar 1 strain used as a reference strain and was provided by Dr. S. G. Pueppke.

病原性測定

將PDA培養一天之榕樹癌腫病菌直接塗抹於胡蘿蔔切塊上，經4～5天後於形成層處形成淡綠色癒合組織狀腫大，且腫瘤漸增大及數目漸增加，最後整圈形成層處擠滿小腫瘤(圖六)，但未出現任何根狀增生，而Chry 5菌株同樣只產生腫瘤未產生根狀增生，且不論接種葫胡蘿蔔切片之正面或反面均可引起腫瘤，以無菌水接種當對照組之胡蘿蔔切塊未出現任何病徵。

以金門榕分離之菌株接種於金門榕及中葉榕植株後，約於三星期時陸續於接種處產生極小的淡褐色腫瘤且腫瘤隨著時間加大，顏色也漸加深(圖四)，以中葉榕及小葉榕分離之菌株接種於金門榕及中葉榕植株，產生腫瘤之情形與金門榕分離之菌株相似，而Chry 5菌株接種於金門榕及中葉榕也產生腫瘤，但腫瘤生長速度比榕樹菌株慢，另外，對照組於觀察四個月後仍未產生任何腫瘤。供試細菌接種於農友301番茄植株之莖或葉柄處，7～10天後於接種處形成淡白綠色之腫瘤，之後瘤漸增大且顏色轉爲淡黃色至褐色(圖三)，整個瘤約可大到1公分，且在近感染處同側的葉片呈現失水狀，該葉片最後萎凋，對照組之番茄則未發現腫瘤。

經平板稀釋試驗得知培養於PDA上

一天之細菌懸浮後其濃度與吸收值之關係爲 $A_{590} = 0.35$ 時菌濃度爲 10^8cfu/ml，將此濃度接種源10倍系列稀釋後接種於番茄植株莖部，發現接種源濃度在個位數時仍能使番茄產生腫瘤。將接種源10倍系列稀釋後接種於胡蘿蔔切塊之形成層處，可見腫瘤數依稀釋倍率依次遞減，當接種源濃度在個位數時在胡蘿蔔切塊上只見數個腫瘤形成(圖五)。

討　論

癌腫病菌是否存在臺灣地區向有爭議，自朱氏1959年發現甜菜癌腫病，距今已近40年，其間雖有四篇記載[1,2,3,6]，但除了1992年王氏的報告曾對癌腫病以柯霍氏法則證明其存在外[1]，其餘如朱氏之甜菜癌腫病[2]，孫氏的蘋果癌腫病[3]及謝氏的檸檬桉癌腫病[6]等報告僅只是發現的記載，未有分離及接種等試驗，王氏雖從玫瑰桉及赤桉分離到之癌腫病菌，也因爲未保存該病原菌，所以現今也無從比對或確認。在此之後本省一直未有癌腫病研究之相關資料可供參考，推其原因，可能是從田間植株上老的腫瘤不易分到病原菌所致，因而無法成功地接種至其寄主上來完成柯霍氏法則以證明其病原性，許多從事 *Agrobacterium* 的研究者[10,14,32]也認爲從腫瘤上被分離到的細菌常是無病原性的 *Agrobacterium* 細菌而不是病原菌，另外可能是所遇到的寄主本身在受傷情形下會產生腫大，但卻不是病原性之腫瘤，因此癌腫病菌在臺灣之存在僅止於被懷疑的階段。由 *Agrobacterium tumefaciens* 引起之癌腫病雖然罹病之植株不一定會死亡，但會影響植物生長造成樹勢衰弱及矮化等現象[20,23,35]。筆者調查盆栽及田間苗圃種植之罹病榕樹也發現相同現象，罹病植株雖已產生明顯腫瘤卻不會很快死亡，但若植株罹病則農民必將其丟棄，勢必造成經濟損失，而國外資料顯示，也有因癌腫病造成重大傷害及經濟損失之報告，如澳州及美國種植之核果類作物如桃(peach)、杏(almond)、櫻桃(cherries)，保加利亞、希臘及匈牙利之葡萄，以及網室栽培之菊花等[23,26]。

將分離自榕樹腫瘤之細菌經由接種至不同榕樹品種測定其病原性，可確定供試細菌爲具致癌腫性之病原菌，甚至在榕樹寄主以外之番茄及胡蘿蔔上也可引起腫瘤；而且由本試驗之資料顯示接種源濃度稀釋至每毫升僅含個位數細菌，在番茄植株及胡蘿蔔切片上仍有致病性，此結果與 Lippincott & Heberlein[28] 的報告相同，第一作者曾報告臺灣滿天星腫瘤病並鑑定其由 *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* 引起[4]，但本研究分離自榕樹腫瘤之細菌不論在菌落形態或其他特性均與 *E. herbicola* pv. *ghypsophilae* 不同，而與 *Agobacterium* 屬之特性相近，因此造成本省榕樹腫瘤之細菌應屬於 *Agrobacterium* 屬內之細菌[23,24,25,26,32]。Conn 於 1942 年提出 *Agrobacterium* 屬[15]，而 *Agrobacterium* 屬是屬於 *Rhizobiaceae*[26]，至目前 *Agrobacterium* 屬內種之分類及命名仍頗有爭議，在1984年的 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 一書[26]及 Skerman 等之 Approval Lists of Bacterial Names[36]報告將該屬依病原性區分爲四個種(species)，即無病原性的(如腐生菌)稱爲 *A. radiobacter* (Beijerinck & van Delden 1902) Conn1942，造成腫瘤的被稱爲 *A. tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942，引起 *Rubus* spp. 上 cane gall 的被稱爲 *A. rubi* (Hildebrand 1940) Starr & Weiss 1943，而造成根增生的則被稱爲 *A. rhizogenes* (Riker, Banfield, Wright, Keitt & Sagen 1930) Conn 1942；但有些研究者[22,30,39,40,41]認爲該屬細菌的病原性是由質體所帶的基因

所操控，而質體是可在不同菌之間轉移的，因質體之轉移使細菌因而失去或獲得病原性，則此細菌因病原性不同勢必改變其分類名稱，如此則沒有一個穩定的分類，所以認爲以病原性來區分"種"是不適當的，而且此種分類及命名的方法與染色體所控制的型態及基因特性無相關性(26)；若依表現型 (phenotype) (21,25,42)，染色體(17)及蛋白型(24)來區分可將此屬細菌至少分爲三種分類群(23)；若依病原性分法再依其生理生化特性來區分，除了 *A. rubi* 之外其他的菌在種之內可被分爲不同的生物型即biovar 1，2及3等(26)；之後Holmes & Roberts(21)及Ophel & Kerr(33)等之研究認爲不管其病原性如何，只要是屬於biovar 1的菌就相當於 *A. tumefaciens*，屬於biovar 2的菌相當於 *A. rhizogenes*，屬於biovar 3的菌相當於 *A. vitis*，而屬於不同生理型的菌均有可能是造成腫瘤或根狀增生或無病原性的菌；因此可知該屬的的分類及命名仍有頗多看法，但一般以Bergey's Manual的分法爲主，依病原性分爲不同的種，並以生物型爲附屬的分類(26)。以Biolog反應盤測定榕樹腫瘤細菌，其中hydroxy-L-proline是選擇性分離 *A. tumefaciens* 的好基質(9)，本研究供試菌均可利用hydroxy-L-proline，且整個反應鑑定結果也確認榕樹腫瘤之細菌爲 *Agrobacterium tumefaciens*。另外，利用病原菌在胡蘿蔔肉質根上是否造成根狀增生或腫瘤之特性以區分該細菌是 *A. rhizogenes* 或 *A. tumefaciens* (18,29,32)，結果供試的所有菌株都是具有致瘤能力的病原菌，因此應爲 *A. tumefaciens*，此與Biolog反應鑑定結果相同。

目前可用於區分 *Agrobacterium* 屬內生物型 (biovar) 的選擇性培養基有，Brishane & Kerr的medium 1A(12)適合biovar 1生長，medium 2E適合biovar 2生長(12)，及Roy & Sasser(34)培養基(RS medium)適合biovar 3生長。前人資料顯示(9,12,26)，medium 2E所含之i-erythritol是選擇性分離 *A. rhizogenes* 的特別基質，所以只有 *A. rhizogenes* 能利用，而Roy & Sasser培養基適合於biovar 3生長，但Bouzar等(9)證實除了biovar 3之外的其他 *agobacterium* 亦可利用，而我們的研究結果榕樹菌株可在medium 1A及RS medium上均可生長，但在2E上則無法生長，顯示榕樹菌株應該不是biovar 2。供試細菌再經生理生化試驗測定其生物型(26,32)，在這些試驗中litmus milk試驗具有診斷價值，biovar 1的菌可產生鹼性反應(藍色)，而biovar 2產生酸性反應(紅色)，而利用lactose產生3-ketolactose之生化特性也是biovar 1不同於biovar 2及biovar 3的一個簡單且專一的診斷試驗，biovar 1的菌可利用並產生黃色反應。由這些試驗測定結果造成榕樹腫瘤之病原菌應屬於biovar 1，因其結果與Moore所述之biovar 1及已知爲biovar 1之Chry 5(13,27,31)反應相同。

根據上述試驗結果證實臺灣已有癌腫病菌存在，而且造成榕樹癌腫病之病原菌爲 *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 1)。然而很多報告均指 *Agrobacterium tumefaciens* 爲廣寄主之病原菌，若病原菌被廣爲傳播並危害本省其他高價值的經濟作物，如此不但造成本省農民經濟損失，更可能影響農產品出口，將造成更大損失，因此調查本省已有那些農作物受其危害，建立早期偵測技術及尋求防治癌腫病的方法是吾人下一步所要探討的問題。

誌　　謝

本研究中榕樹之分類，承國立自然科學博物館嚴新富博士協助，謹此致謝。

引用文獻

1. 王維洋 1992 臺灣桉樹病害調查報告。林業試驗所研究報告季刊 7(2): 179-194。
2. 朱學曾、胡舉和 1959 甜菜病害之調查研究一臺灣甜菜病害。臺灣糖業試驗所研究彙報 19: 21-34。
3. 孫守恭 1967 臺灣溫帶果樹之病害。植保會刊 9: 96-97。
4. 許秀惠、杜金池、徐世典 1991 在台灣發生由 *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* 引起的滿天星腫瘤病。植保會刊 33: 420 (摘要)。
5. 許秀惠、林俊義、陳福旗 1996 榕樹細菌性癌腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在臺灣之發生。中華植物保護學會民國八十五年年會論文摘要 14-15。
6. 謝煥儒 1980 臺灣木本植物病害調查報告 (三)。中華林學季刊 13: 129-139。
7. Anderson, A. R., and Moore. L. W. 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. Phytopathology 69: 320-323.
8. Ark, P. A., and Schroth. M. N. 1958. Use of slices of carrot and other fleshy roots to detect crown gall bacteria in soil. Plant Dis. Reptr. 42: 1279-1281.
9. Bouzar, H., Jones, J. B., and Hodge, N. C. 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. Phytopathology 83: 733-739.
10. Bouzar, H., Chilton, W. S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J. B., and Hodge, N. C. 1995. A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. Appl. Environ. Microbiol. 61: 65-73.
11. Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C. A. B. International, U. K. pp.6-15.
12. Brisbane, P. G., and Kerr. A. 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. J. Appl. Bacteriol. 54: 425-431.
13. Bush, A. and Pueppke, S. G. 1991. Characterization of an unusual new strain of *Agrobacterium tumefaciens* from *Chrysanthemum morifolium* Ram. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2468-2472.
14. Chase, A. R. 1987. Compendium of Oramental Foliage Plant Diseases. APS Press, St. Paul, Minn.
15. Conn, H. J. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. J. Bacteriol. 44: 353-360.
16. De Cleene, M., and De Ley, J. 1976. The host range of crown gall. Bot. Rev. 42: 389-466.
17. De Ley, J., Bernaerts, M. Rassel, A., and Guilmot. J. 1966. Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*. J. G. Microbiol. 43: 7-17.
18. Gelvin, S. B. 1990. Crown gall disease and hairy root disease. Plant Physiol. 92: 281-285.
19. Galloway, B. T. 1919. Giant crown galls from the Florida Everglades. Phytopathology 9: 207-208.
20. Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., and Manulis, S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium strains*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2879-2884.
21. Holmes, B., and Roberts. P. 1981. The classification, identification and

nomenclature of agrobacteria. J. Appl. Bacteriol. 50: 443-467.

22. Kerr, A. 1971. Acquisition of virulence by non-pathogenic isolates of *Agrobacterium radiobacter*. Physiol. Plant Pathol. 1: 241-246.
23. Kerr, A., and Brisbane. P. G. 1983. *Agrobacterium*. pp.27-43 In: A Diagnostic Guide, P. C. Fahy, and G. J. Persley (eds.) Plant bacterial diseases. Academic Press, Australia.
24. Kersters, K., and De Ley. J. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. J. Gen. Microbiol. 87: 333-342.
25. Kersters, K., and De Ley. J. Sneath, P. H. A. and Sackin. M. 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 78: 227-239.
26. Kersters, K., ad De Ley. J. 1984. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. pp.244-254. In: N. R. Kneg and J. G. Holt (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
27. Kovacs, L. G. and Pueppke, S. G. 1993. The chromosomal background of *Agrobacterium tumefaciens* Chry 5 conditions high virulence on soybean. Mol. Plant Microb. Int. 6: 601-608.
28. Lippincott, J. A., and Heberlein. G. T. 1965. The quantitative determination of the infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. Am. J. Bot. 52: 396-403.
29. Lippincott, J. A., and Lippincott. B. B. 1969. Tumor-initiation ability and nutrition in the genus *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 59: 57-75.
30. Loper, J. E., and Kado. C. I. 1979. Host range conferred by the virulence specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 139: 591-596.
31. Miller, H. N. 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in Chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathology 65: 805-811.
32. Moore, L. W., Kado, C. I. and Bouzar. H. 1988. *Agrobacterium*. pp. 16-36. In: 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed. N. W. Schaad (ed.) APS Press, St. Paul, Minn.
33. Ophel, K. and Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. Nor. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevine. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 236-241.
34. Roy, M. and Sasser. M. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. Phytopathology 73: 810.
35. Serfontein, S., and Staphorst, J. L. 1994. Crown fall of hop caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 in South Africa. Plant Pathol. 43: 1028-1030.
36. Skerman, V. B. D., Mc Gowan, V., and Sneath. P. H. A. 1980. Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 225-420.
37. Smith, E. F., and Townsend. C. O. 1907. A plant tumor of bacterial origins. Science 25: 671-673.
38. Suslow, T. V., Schroth, M. N., and Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for gram-differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology

72: 917-918.

39. Thomashow, M. F., Panagopoulos, C. G. Gordon M. P. and Nester. E. W. 1980. Host range of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti-plasmid. Nature 283: 794-796.
40. Van Larebeke, N., Engler, G. Holsters, M. Van Den Elsacker, S. Zaenen, I. Schilperoort, R. A. and Schell. J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature 252: 169-170.
41. Van Larebeke, N., Genetello, C. Schell, J. Schilperoort, R. A. Hermans, A. K. Hernalsteens, M. P. and Van Montagu. M. 1975. Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature 255: 742-743.
42. White. L. O. 1972. The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. J. Gen. Microbiol. 72: 565-574.

ABSTRACT

Hseu, S. H.[1], Lin, C. Y.[1], and Chen, F. C.[2] 1997. The occurrence of crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* on *Ficus microcarpa* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 39: 195-205. ([1]Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, R.O.C.; [2] Department of Plant Industry,National Pingtung Polytechnic Institute, Pingtung, Taiwan, R.O.C.)

Tumors were found on several cultivars of *Ficus microcarpa* from different areas of Taiwan. They mainly occurred on the wounded crown, trunk, and shoots. The size of these tumors were around 5-10 cm and sometimes could reach 30 cm in diameter. Five strains of bacteria isolated from gall tissues were characterized. They were Gram negative, aerobic rods with 1-6 peritrichum flagella and were identified as *Agrobacterium tumefaciens* by the Biolog Microplate system. Biovar identification tests showed that strains of the bacterium belong to biovar 1. Inoculation of the bacterium on to slices of carrot roots, small tumors produced on the cambium area 4-5 days after inoculation. Upon inoculation of tomato and *Ficus* plants with the bacterium, tumors was formed on wounded sites about 7-10 days and 3 weeks, respectively, after inoculation. The tumors on *Ficus* were small and light brown initially, and gradually increased in size and became brown to dark brown. The tumors on tomato were white to pale green at first, then gradually turned into yellowish with size about 1 cm in diameter. The leaves of tomato adjacent to the inoculated area were flaccid and gradually wilted. This is the first report of crown gall disease on *Ficus* in Taiwan.

(Key words: *Ficus microcarpa* L., crown gall disease, *Agrobacterium tumefaciens*, identification)