

馬鈴薯青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* phyloptype II/race 3/biovar 2) 於雲林縣斗南地區田 間之族群密度與馬鈴薯罹病率調查

吳雅芳¹ 林志鴻^{2,3} 王肇芬² 鄭安秀¹

¹ 行政院農業委員會台南區農業改良場

² 亞蔬-世界蔬菜中心

³ 聯絡作者, E-mail: chih-hung.lin@worldveg.org; 傳真: +886-6-5830009

接受日期: 中華民國 101 年 7 月 4 日

摘要

吳雅芳、林志鴻、王肇芬、鄭安秀. 2011. 馬鈴薯青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* phylotype II/race 3/biovar 2) 於雲林縣斗南地區田間之族群密度與馬鈴薯罹病率調查. 植病會刊 20: 68-77.

2006 年冬作於雲林縣斗南地區之馬鈴薯栽培田發現萎凋病株, 分離純化之病原菌經鑑別培養基、菸草過敏性反應、病原性測定、生化型測定、及專一性聚合酶鏈鎖反應 (PCR), 證實該地區分離之病原菌為馬鈴薯青枯病菌, 屬於第二演化型 (phylotype II) 與第二生化型 (biovar 2) 之第三生理小種 (race 3) 菌系。利用選擇性培養基與增量 PCR 偵測土壤樣品, 經 2007 至 2009 年三期作偵測與調查結果, 顯示 2007 年期作之 10 處調查田區, 除田區一與田區二之罹病率高低與土壤含菌量多寡相符外, 在其他田區並不一致, 而爾後兩期作此兩田區皆未發生青枯病, 亦偵測不到病原菌。在非馬鈴薯產期之土壤則偵測不到病原菌, 但隔年期作有某些田區發生青枯病且罹病率極低。田區四前兩期作皆未發生青枯病, 且土壤中偵測不到病原菌, 但 2009 年期作之罹病率為 40%, 土壤含菌量每克乾土達 10^5 CFU; 由此推測該地區馬鈴薯青枯病的主要初次感染源為帶菌種薯而非土壤。人為混菌接種馬鈴薯結果, 發現泥炭土含菌量多寡不影響種薯分芽之發芽率, 但會影響青枯病的罹病率。病勢進展及罹病率皆隨著病原菌菌量增加而升高, 但泥炭土中病原菌含量每克泥炭土低於 10^5 CFU 時則不發病; 故降低田間土壤中的病原菌密度, 應能有效降低罹病率。在雲林縣斗南地區的馬鈴薯栽培慣與水稻輪作, 依據本研究調查結果, 病菌在田土中存活機率低, 故主要感染源最可能為帶菌種薯而非土壤, 因此使用健康種薯是防治該地區馬鈴薯青枯病的重要關鍵。

關鍵詞: 馬鈴薯青枯病、青枯病菌、演化型、生理小種、生化型、殘存

緒言

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* Yabuuchi *et al.* 1995 (原名 *Pseudomonas solanacearum* [Smith] Smith 1914) ^(16, 20) 是全球重要的植物病原細菌之一, 可造成多種植物的經濟損失, 特別是茄科植物。該病原細菌寄主種類高達 50 科

200 多種植物, 且持續有新的寄主植物受到嚴重危害的報告 ^(6, 7, 16)。青枯病菌是由許多不同菌系所組成的一個複合種 (species complex) ^(9, 10, 16)。為了定義與分類種間的差異, 傳統的系統有二, 一是依據菌株來源及寄主範圍的差異, 區分為 5 個生理小種 (race) ^(3, 6, 17); 二是依據菌株對九種碳水化合物利用能力, 區分為 6 種生化型 (biovar) ^(6, 13, 17)。生理小種與生化型兩種分類系統之間並無絕對的相關性,

但 race 3 菌株均屬於 biovar 2⁽²⁾。Fegan 和 Prior 二位學者根據 16S-23S 核糖體核酸基因間之內轉錄區 (internal transcribed spacer, ITS) 的基因序列設計引子進行複合式聚合酶鏈鎖反應 (multiplex PCR)，於 2005 年提出演化型 (phylotype) 分類系統，共分為 4 群演化型，此分類系統與地理的起源有相關性。迄今分布在台灣的青枯病菌主要是 race 1 /biovar 3 或 biovar 4^(18, 24)，皆屬於 phylotype I，受危害的寄主多達 19 科 28 種植物⁽²⁴⁾。而 phylotype II race 3 /biovar 2 菌株於 1999 年冬天發現於台中縣神岡鄉，造成馬鈴薯青枯病的發生^(4, 24)。2006 年 12 月至 2007 年 1 月於雲林縣斗南地區的馬鈴薯栽培田出現多處且大面積的萎凋病徵，經診斷鑑定結果顯示該地區發生之馬鈴薯萎凋病徵皆由 *R. solanacearum* race 3 /biovar 2 引起⁽²⁹⁾，受害嚴重之田區其罹病率高達 90%，導致多處田區廢耕，造成極大的經濟損失。

由 *R. solanacearum* race 3/biovar 2 引起的馬鈴薯青枯病 (bacterial wilt) 或稱褐腐病 (brown rot)，在熱帶、亞熱帶高地及溫帶地區的馬鈴薯產地常造成嚴重的經濟損失。此馬鈴薯菌系的菌株主要為害馬鈴薯及番茄，對其他茄科作物的致病力較弱⁽³⁾，相較於 race 1 菌系，race 3 被認為具有較窄的寄主範圍⁽²⁸⁾，且在冷涼的氣候條件下，才會發生嚴重危害。在台灣冬季引起馬鈴薯青枯病的病原菌並非台灣本土的 race 1 菌株，此病原菌在較低的溫度環境下，只對馬鈴薯及番茄具有強致病力，符合 race 3 菌株的特性⁽⁴⁾。青枯病菌為土壤傳播性細菌，可在土壤中存活^(14, 20)，在連續種植非寄主植物的田土中，青枯病菌可存活 10 年之久，在休耕地土壤中亦可存活 4 年以上⁽²⁰⁾。此病原菌可藉由植株殘體或帶菌種薯作為田間長期存活的重要場所⁽¹¹⁾，亦可長期存活在田間野生寄主植物或非寄主植物的根圈^(12, 25, 28)。

青枯病菌對寄主植物的危害受溫度影響甚鉅，Ciampi 與 Sequeira 的研究報告指出供試的 race 1 或 race 3 菌株在 28°C 的高溫環境下，兩者皆可殺死感病品種的馬鈴薯，但某些適應低溫環境的 race 3 菌株，在 16°C 的低溫環境下，對馬鈴薯仍具有強致病力⁽⁵⁾。Milling 等人亦發現相較於 race 1 菌株，race 3 /biovar 2 菌株在 28°C 環境下對番茄的毒力並無顯著差異，但在 20°C 環境下則具有較強毒力⁽²⁷⁾。雲林縣斗南地區在每年 10 至 11 月種植馬鈴薯，翌年 2 至 3 月採收馬鈴薯，接著種植一或二期水稻後再種植馬鈴薯，與水稻輪作的耕作型態加上夏季高溫，應不利於 race 3/biovar 2 菌株在田間土壤中存活，而不致於成為

當地馬鈴薯的風土病害。故本研究目的藉由定期採集田間土壤樣品進行青枯病菌偵測，以了解 *R. solanacearum* race 3/biovar 2 菌株於田間土壤中之殘存情形，及其成為隔年馬鈴薯青枯病初次感染源之機率，並瞭解土壤含菌量對病害發生之影響，以供爾後防治之參考依據。

材料與方法

病原菌分離與鑑定

於 2006 年冬季 (12 月至翌年元月)，在雲林縣斗南地區採集馬鈴薯青枯病罹病株，利用 TTC 鑑別培養基⁽²¹⁾或 MSM-1 選擇性培養基⁽²⁵⁾進行菌株分離及純化，再將純化之菌株依 race 3/biovar 2 菌株之專一性引子對 630 與 631 進行 PCR 反應⁽⁸⁾，作為馬鈴薯菌株之初步鑑定依據。另以葉肉注射方法，於菸草植株上進行過敏性反應測試⁽²²⁾，並以滅菌牙籤沾菌穿刺番茄及馬鈴薯植株進行病原性測試⁽²³⁾，最後將菌株置於裝有 30% 甘油或無菌蒸餾水的滅菌塑膠保存管中，分別於 -80°C 冰箱或室溫下保存，以供爾後試驗使用。

接種源製備

將保存於無菌蒸餾水或 30% 甘油中的馬鈴薯菌株 Pss1388 劃線於 TTC 培養基平板上，經 30°C 培養 48 小時後，挑取中央粉紅色外圍乳白色之流質狀不規則圓形菌落，懸浮於無菌蒸餾水中，吸取 0.2 ml 的細菌懸浮液置於 523 培養基⁽¹⁹⁾平板上，以滅菌的 L 型玻棒均勻塗抹，經 30°C 培養 24 小時後，將增量之細菌懸浮於無菌蒸餾水中，利用 Ultrospec 2100 pro 分光光度計在波長 600 nm 下，調整細菌懸浮液的吸光值 (O.D., Optical Density) 至 0.3 作為接種源，此接種源之細菌濃度約為 10⁸ CFU/ml。試驗中如需較低濃度作為接種源時，則以此濃度進行適當稀釋使用。

供試植物

供試植物包含菸草 (*Nicotiana tabacum* L.)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L., 克尼伯品種)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill., now *Solanum lycopersicum*，西施品種)。

生化型測定

根據 Hayward 敘述之方法^(13, 15)，測定供試馬鈴薯青枯病菌菌株利用碳水化合物之能力，作為區分 biovar 之依

據。測定的碳水化合物包括四種雙醣，如乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙糖 (cellobiose)、海藻糖 (trehalose) 及三種六醣醇，如甘露糖醇 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、甜己醇 (dulcitol)。

演化型測定

根據 Fegan 及 Prior 敘述之方法⁽⁹⁾，將供試馬鈴薯青枯病菌菌株進行複合式聚合酶鏈鎖反應 (multiplex PCR)，PCR 各反應物濃度分別為 1× 的緩衝液、1.5 mM 的 MgCl₂ 及 0.25 mM 的 dNTPs，PCR 引子 Nmult23:AF 之濃度為 80 ng，其餘引子 (如 Nmult21:1F、Nmult21:2F、Nmult22:InF、Nmult22:RR、AU759f、AU760r) 之濃度皆為 40 ng，Taq DNA 聚合酶為 1 單位，PCR 反應之模版 DNA 濃度為 50 ng (或以 2 μl 的細菌懸浮液取代模版 DNA)，加無菌水至總反應體積為 25 μl。PCR 反應條件如下：以 96°C 初始變性 (initial denaturation) 5 分鐘；再以 94°C 變性 (denaturation) 15 秒，59°C 煉合 (annealing) 30 秒，72°C 延伸 (extension) 30 秒，進行 35 循環；最後再以 72°C 最終延伸 (final extension) 10 分鐘以完成反應。將 PCR 反應之產物於 2% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，作為區分 phylotype 之依據。根據電泳圖譜結果，phylotype I 菌株可產生 144 與 282 bp 條帶；phylotype II 菌株可產生 282 與 372 bp 條帶；phylotype III 菌株可產生 91 與 282 bp 條帶；phylotype IV 菌株可產生 213 與 282 bp 條帶。

馬鈴薯青枯病菌在田間之殘存調查

2007 年初，於斗南地區選定 10 處不同發病率之田區定期進行土壤偵測，在馬鈴薯種植期間每個月偵測一次，而非種植期間每三個月偵測一次。在各田區對角線上距離中心點四分之三處設定為一採樣區，加上中心點，每個田區共有五個採樣區，每個採樣區各逢機採取 4 至 5 個土壤次樣品，再將次樣品混合為一個土壤樣品，故每一田區共採集五個土壤樣品。偵測時取 10 g 土壤樣品置於 90 ml 無菌蒸餾水中，於室溫下以 180 rpm 震盪 30 分鐘，將樣品溶液進行十倍系列稀釋，再分別吸取 0.1 ml 不同稀釋倍數之樣品溶液，均勻塗抹於 MSM-1 培養基平板上進行培養，直接偵測土壤中青枯病菌之含量，每一土壤樣品偵測三次，即三重複。另根據增量 PCR 方法⁽²⁵⁾，取 1 ml 土壤樣品溶液置於 9 ml 液態 MSM-1 培養基中進行增量培養，於 30°C 下以 160 rpm 震盪培養 2-3 天後，進行 multiplex PCR 反應。

馬鈴薯青枯病在田間之罹病率調查

於 2007 至 2009 年三年期間，在斗南地區選定之 10 處田區，除上述定期採集土樣偵測之外，並調查各田區呈現萎凋病徵之罹病株率，而當年期之罹病率結果皆以該年期馬鈴薯採收前最後一次記錄為主。

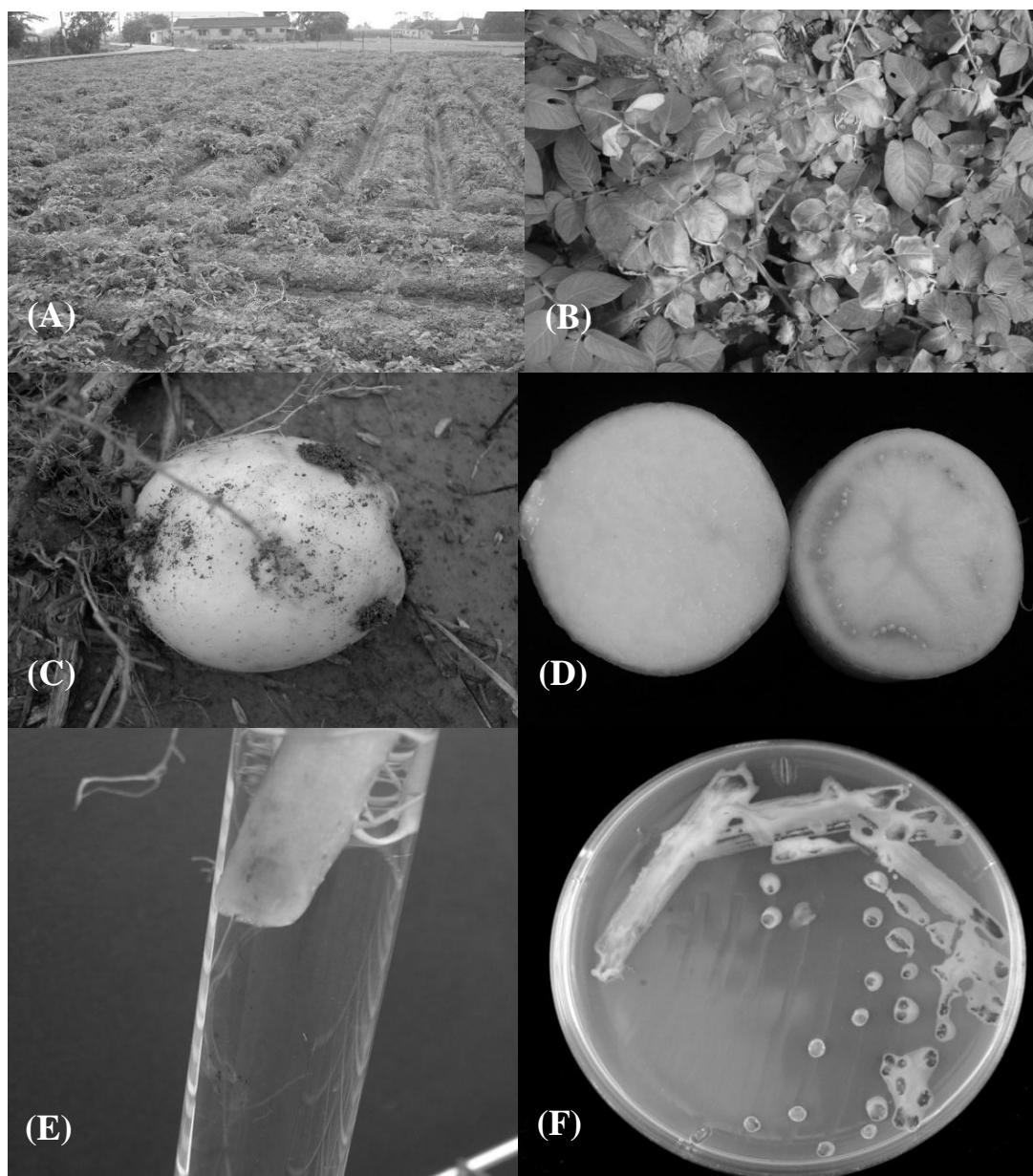
不同含菌量之栽培介質對馬鈴薯青枯病發病之影響

將馬鈴薯菌株 Pss1388 依照上述接種源製備之方法，取得細菌濃度約為 10⁸ CFU/ml 的細菌懸浮液之後，再利用無菌蒸餾水以十倍系列稀釋方法，將細菌懸浮液分別調製成 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² CFU/ml 等 7 種不同的細菌濃度，以 1:3 (v/w) 比例方式，將上述 7 種不同濃度之細菌懸浮液分別與經高溫高壓滅菌處理及未經滅菌處理之泥炭土均勻混拌，作為供試病土，其病土含菌量分別為每克泥炭土約含有 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² CFU。另外以無菌水混拌之泥炭土作為對照組，混拌後之泥炭土皆分裝於 5 吋盆中。於雲林未罹病田區採收之健康種薯，經過春化處理分芽後，再分別種植於含有上述不同青枯病菌濃度之泥炭土中，共 16 個處理組，每一處理組種植 12 盆。於 25°C 之溫室環境下，記錄馬鈴薯之發芽率，並觀察馬鈴薯植株之發病情形，每星期記錄一次萎凋率，直到病害進展穩定為止。

結果

病原菌分離與鑑定

2006 年冬作 (12 月至翌年元月) 於雲林縣斗南地區之馬鈴薯栽培田發現萎凋型病株 (圖一、A)，田間成株病徵初期呈現葉緣褪色、稍微上捲 (圖一、B)，隨病勢進展葉片呈現萎凋徵狀，嚴重時全株枯萎，切開已結球之薯塊，可見維管束褐化及菌泥 (ooze) 滲出 (圖一、C、D)；幼株罹病則直接呈現青枯狀病徵，橫切莖基部維管束均有褐化現象，將維管束褐化之莖組織直立於裝有清水之試管中，可見菌流 (streaming) 自維管束中大量湧出 (圖一、E)。將罹病植株帶回實驗室後，利用 TTC 鑑別培養基或 MSM-1 選擇性培養基進行分離及純化，經 30°C 培養 2-3 天後，於培養基上出現流質狀不規則圓形或橢圓形，中間呈粉紅色，外圍為乳白色之典型的青枯病菌菌落型態 (圖一、F)，共分離純化 58 個 *R. solanacearum* 菌株。所有供試菌株經專一性引子對 630 與 631 之 PCR 鑑定結果，皆出現 357 bp 條帶，屬於馬鈴薯 race 3 / biovar 2 菌株。另外



圖一、馬鈴薯青枯病病徵及其病原菌。(A) 罹病田區；(B) 初期病徵；(C) 薯球嚴重罹病，可見細菌泌出；(D) 切開罹病薯球(右)，可見維管束褐化及細菌菌泥；(E) 罹病株莖基部切口處有大量細菌湧出；(F) 馬鈴薯青枯病菌於 TTC 培養基上的菌落形態。

Fig.1. Symptoms and pathogen of potato bacterial wilt. (A) Infected field. (B) Initial symptom. (C) Whitish bacterial mass can be seen on serious infected tuber. (D) Vascular browning and whitish bacterial mass observed when cutting the infected tuber (right). (E) Bacterial streams from the cut site of infected stem immersed in water. (F) Colonies of *Ralstonia solanacearum* phylotype II/race 3/biovar 2 on TTC medium.

以葉肉注射菸草方法進行過敏性反應測定，所有供試菌株皆呈現過敏性反應，且對馬鈴薯及番茄植株皆具有病原性。

生化型測定

經碳水化合物利用能力之測定結果，顯示 58 個供試

的 *R. solanacearum* 菌株只會氧化 lactose、maltose 與 cellobiose 等三種雙醣，對於 mannitol、sorbitol 與 dulcitol 等三種六醣醇及 trehalose 皆無法利用，屬於普遍分佈的第二生化型菌株，故在 2006 年底至 2007 年元月於雲林縣斗南地區分離純化的 58 個馬鈴薯菌株，其生化型皆為 biovar 2。

演化型測定

經 multiplex PCR 反應結果，顯示 58 個供試的 *R. solanacearum* 菌株在電泳分析圖譜上皆出現 282 bp 與 372 bp 兩條帶，屬於演化型分類上之第二演化型菌株，即在 2006 年底至 2007 年元月於雲林縣斗南地區分離純化的 58 個馬鈴薯菌株，皆屬於 phylotype II。

馬鈴薯青枯病菌在田間之殘存調查

於 2007 年期作，即 2007 年 10 月至翌年 3 月期間進行 2 次採樣，第 1 次 (1 月 23 日) 採樣在馬鈴薯採收前，只有田區一、二及八等 3 處的土壤樣品以 MSM-1 選擇性培養基進行偵測時，可偵測到 *R. solanacearum*，其土壤含菌量分別為未檢出至每克乾土 2.22×10^5 CFU、每克乾土 2.33×10^3 CFU 至每克乾土 1.10×10^5 CFU 及未檢出至每克乾土 2.66×10^2 CFU，以 multiplex PCR 進行偵測，除了田區三、四及六等 3 處的土壤樣品為負反應之外，其餘 7 處田區的土壤樣品皆為正反應，即產生 282 bp 與 372 bp 兩條帶 (表一)。第 2 次 (2 月 20 日) 採樣在馬鈴薯採收後，10 處田區的土壤樣品均偵測不到 *R. solanacearum*，且僅 4 處田區 (田區七、八、九及十) 的 multiplex PCR 結果呈現正反應。而 2008 年 3 月至 9 月非種植期間共採樣 2 次，皆未檢出青枯病菌。於 2008 年期作，即 2008 年 10 月至翌年 3 月期間進行 5 次採樣，結果顯示相同 10 處田區的土壤樣品均偵測不到 *R. solanacearum*，以 multiplex PCR 進行偵測時，5 次的採樣偵測結果僅有 1 (田區六)、4 (田區一、二、八及九)、0、2 (田區六及九) 及 1 (田區九) 處田區呈現正反應 (表一)。而 2009 年 3 月至 9 月非種植期間共採樣 2 次，亦未檢出青枯病菌。於 2009 年期作，即 2009 年 10 月至翌年 3 月期間進行 3 次採樣，第 1 次 (11 月 12 日) 採樣在馬鈴薯定植後，10 處田區的土壤樣品均偵測不到 *R. solanacearum*，僅田區六的 multiplex PCR 結果呈現正反應。於第 2 次 (12 月 14 日) 採樣時，在田區六的土壤樣品中偵測到 *R. solanacearum*，其土壤含菌量為未檢出至每克乾土 4.60×10^5 CFU，且 5 個土壤樣品中有 2 個樣品的 multiplex PCR 呈現正反應結果。於第 3 次 (1 月 12 日) 採樣時，多達 5 處田區的土壤樣品可偵測到 *R. solanacearum*，分別為田區四、五、六、七及八，其土壤含菌量為未檢出至每克乾土 1.59×10^5 CFU、至每克乾土 5.97×10^3 CFU、至每克乾土 1.07×10^4 CFU、至每克乾土 2.58×10^4 CFU 及至每克乾土 2.48×10^3 CFU，以 multiplex PCR 偵測結果，顯示 9 處田區的土壤樣品呈現

正反應 (表一)。

馬鈴薯青枯病在田間之罹病率調查

2007 年期作於 10 處田區進行馬鈴薯青枯病之罹病率調查，顯示罹病率介於 0 至 85% 之間 (表一)，其中偵測到 *R. solanacearum* 的田區一、二及八之罹病率分別為 85、80 及 55%，MSM-1 選擇性培養基與 multiplex PCR 皆未檢出之田區三、四及六，除田區四未發生青枯病之外，其餘二田區亦發生青枯病，但罹病率較低。2008 年期作於相同的 10 處田區進行馬鈴薯青枯病之罹病率調查，發現田區一、三及四改種植胡蘿蔔，其餘 7 處田區中僅田區五、六、八及十等 4 處有零星發病，罹病率極低 (表一)，而土壤偵測結果亦多呈現負反應。2009 年期作於相同的 10 處田區進行馬鈴薯青枯病之罹病率調查，發現田區二及前期作改種胡蘿蔔的田區一及三皆未發生青枯病，但一直未發生青枯病的田區四反而出現 40% 罹病率 (表一)，其餘田區之罹病率為 13 至 30%，與上述偵測結果不完全相符。

不同含菌量之栽培介質對馬鈴薯青枯病發病之影響

種植健康種薯於滅菌與未經滅菌的 *R. solanacearum* Pss1388 病土，種植二星期開始發芽，除種植於未經滅菌處理之泥炭土，每克泥炭土 10^2 CFU 之發芽率為 91.7% 之外，其餘處理組的發芽率皆為 100%。除了對照組及低於每克泥炭土 10^5 CFU 之處理組之外，其餘處理組的植株皆於第五星期開始出現萎凋徵狀，且罹病率隨時間增加而逐漸升高 (表二)，種植後第九星期，每克泥炭土 10^8 CFU 之處理組其罹病率達 100%，但混拌細菌濃度低於每克泥炭土 10^5 CFU 之處理組，無論泥炭土有無滅菌處理，其罹病率皆為 0%，混拌細菌濃度高於每克泥炭土 10^4 CFU 之處理組，無論泥炭土有無滅菌處理，其罹病率會隨著混拌細菌濃度增加而升高 (表二)。

討論

青枯病菌馬鈴薯菌系 race 3/biovar 2 主要危害馬鈴薯及番茄，對其他茄科作物的致病力較弱，相較於 race 1 菌系，race 3 的寄主範圍較窄，常在熱帶、亞熱帶高地及溫帶地區的馬鈴薯產地造成嚴重的經濟損失。2006 年底至 2007 年元月期間，於雲林縣斗南地區發生的馬鈴薯萎凋病徵，經診斷鑑定確認為青枯病，且病原菌屬於馬鈴薯菌

表一、2007 至 2009 年斗南地區馬鈴薯種植期 (10 月至隔年 3 月) 青枯病菌在田間之族群密度及罹病率調查

Table 1. Detection and population densities of *Ralstonia solanacearum* race 3/biovar 2 in soil and incidence of bacterial wilt of potato winter crops (October to March of the following year) in Dounan area during 2007 to 2009

Survey field	2007 winter crop ¹			2008 winter crop ¹			2009 winter crop ¹		
	MSM-1 ²	PCR ³	W% ⁴	MSM-1	PCR	W%	MSM-1	PCR	W%
Field 1	n.d. ⁵ - 2.22×10^5	+	85	n.d.	+	--- ⁶	n.d.	+	0
Field 2	2.33×10^3 - 1.10×10^5	+	80	n.d.	+	0	n.d.	-	0
Field 3	n.d.	-	15	n.d.	-	---	n.d.	+	0
Field 4	n.d.	-	0	n.d.	-	---	n.d. - 1.59×10^5	+	40
Field 5	n.d.	+	10	n.d.	-	0.01	n.d. - 5.97×10^3	+	15
Field 6	n.d.	-	20	n.d.	+	0.01	n.d. - 4.60×10^5	+	30
Field 7	n.d.	+	25	n.d.	-	0	n.d. - 2.58×10^4	+	0
Field 8	n.d. - 2.66×10^2	+	55	n.d.	+	2	n.d. - 2.48×10^3	+	0
Field 9	n.d.	+	50	n.d.	+	0	n.d.	+	13
Field 10	n.d.	+	80	n.d.	-	1	n.d.	+	20

¹ Combined results of detection and population densities of *R. solanacearum* from two, five, and three times of sampling during the winter crop in 2007, 2008, and 2009, respectively.

² Values are range of means of *R. solanacearum* density (CFU per gram of dry soil) over 5 samples.

³ + / -: with / without amplification of 282 bp and 372 bp bands (phylogroup II strain-specific) from enriched soil samples by multiplex PCR with Nm21:1F, Nm21:2F, Nm23:AF, Nm22:InF, Nm22:RR, AU759f, and AU760r.

⁴ W%: percentage of wilted plants in each surveyed field at the end of that crop.

⁵ "n.d.": not detected.

⁶ ---: means the crops changed from potato to carrot for 2008 winter crop.

系 race 3/biovar 2，而非台灣普遍存在的茄科菌系 race 1/biovar 3 或 biovar 4，其演化型為 phylogroup II，屬於寄主範圍較窄的一群，主要感染馬鈴薯作物，此結果與 Fegan 及 Prior 的報告⁽⁹⁾相符。根據過去田間觀察，在雲林縣斗南地區種植之馬鈴薯極少遭受青枯病危害，何以 2006 年冬天會爆發大規模的馬鈴薯青枯病，經查詢當地栽培馬鈴薯之農民得知，當期作栽種的種薯主要來自中部的馬鈴薯青枯病疫區，推測當年度之種薯帶菌率極高，而導致馬鈴薯青枯病在該地區大發生，使得自 1999 年以來只發生在台中市神岡及后里地區馬鈴薯產地的青枯病⁽⁴⁾，隨著帶菌種薯向台灣南部地區散播。

Race 3/biovar 2 菌株適應於低溫環境，已知地理分布位於冷涼的熱帶、亞熱帶高地及溫帶地區。雲林縣地區的馬鈴薯產期是 10 月至翌年 3 月，根據交通部中央氣象局農業氣象資料 (資料來源 http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/agri/agri_month.htm) 得知，2006 至 2009 年間此時期的平均溫度分別為 17.1-25.2°C、16.8-24.6°C、14.7-26.1°C 及 14.8-24.9°C，在此溫度範圍的環境下，適合馬鈴薯青枯病發生。故台灣雖處於亞熱帶及熱帶地區，平地冬天的

氣候條件仍適合馬鈴薯青枯病的發生。雲林縣斗南地區之耕作制度經常是馬鈴薯與水稻輪作，期間有短暫時間休耕，2006 至 2009 年間的馬鈴薯產期，該地區平均溫度範圍為 23.1-28.7°C，平均最高日溫達 34.0°C，故適應低溫環境的 *R. solanacearum* race 3/biovar 2 菌株是否能在田土中殘存度過高溫的夏季，成為翌年馬鈴薯青枯病的初次感染源，是本試驗探討重點。在 10 個田區定期採土偵測 *R. solanacearum* race 3/biovar 2，並記錄馬鈴薯青枯病發病情形，結果顯示發病情形與土壤偵測結果並不完全一致，有時土壤樣品偵測到 race 3/biovar 2 菌株，但田間並無萎凋病株出現，有時田間出現萎凋病株，但偵測結果呈現負反應。同一田區內 5 個樣品的青枯菌的密度不一，主要歸因於青枯病菌在田間的分布呈不均勻狀態⁽²⁵⁾，此外，土壤中含有 PCR 的抑制物質亦會影響偵測結果⁽²⁵⁾。所有偵測到 race 3/biovar 2 菌株的土壤樣品都採集自發病或曾經發病的馬鈴薯田區，僅田區四例外，該田區連續兩期作都未檢出 race 3/biovar 2 菌株，且未發生青枯病，但 2009 年期作卻有 40% 罹病率，偵測到的土壤含菌量高達每克乾土 1.59×10^5 CFU，推測病害由種薯帶菌所引起，而土壤中

表二、泥炭土中不同濃度的馬鈴薯青枯病菌對病害發生之影響

Table 2. Effect of different densities of *Ralstonia solanacearum* race 3/biovar 2 in peat moss on incidence of potato bacterial wilt

Density ¹	Final percent of wilting (%)									
	Sterilized peat moss					Non-sterilized peat moss				
	5WAT	6WAT	7WAT	8WAT	9WAT ²	5WAT	6WAT	7WAT	8WAT	9WAT
10 ⁸	11.0	23.0	60.0	86.0	100.0	10.0	29.3	75.7	92.1	99.3
10 ⁷	6.7	15.6	39.3	56.3	83.0	6.1	15.7	61.7	80.0	93.9
10 ⁶	0.0	6.1	14.8	41.7	74.8	0.8	6.7	28.3	56.7	84.2
10 ⁵	5.4	7.7	10.0	17.7	27.7	5.7	13.3	41.9	70.5	84.8
10 ⁴	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10 ³	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

¹ Unit of the pathogen density is CFU per gram of peat moss.

² WAT: weeks after transplanting.

病原菌應由罹病植株釋出。於非馬鈴薯產期的土壤樣品中皆偵測不到青枯病菌，10 處調查田區之田區一與田區二在 2007 年期作之罹病率分別為 85% 及 80%，且偵測到的最高土壤含菌量分別為每克乾土 2.22×10^5 CFU 及每克乾土 1.10×10^5 CFU，田區一及二之農民於採收後隨即種植水稻，於第二次採樣時已是水稻田，故在土壤樣品中未偵測到病原菌。研究報告指出與水稻輪作不利於病原菌在土壤中存活^(18, 26)。田區一於 2008 年期作改種胡蘿蔔而田區二仍種植馬鈴薯，於 2008 與 2009 年期作均未觀察到青枯病發生，故在慣行的水稻輪作制度及夏季高溫的環境下，race 3/biovar 2 菌株於田土中殘存作為隔年冬作的感染源的機率不大。田間調查結果亦發現，本病害在雲林縣斗南地區並非全面性普遍發生，各發病田之罹病率介於數株至 90% 之間，推測主要感染源來自帶菌種薯，病原菌再經由罹病植物組織、灌溉水、工具等進行傳播，造成田間病害發生。青枯病菌在土壤中之存活可能受到土壤的理化性質及生物等多種因素影響⁽¹⁴⁾，故在土壤中存活的時間長短不一，且不同菌系在土壤中的存活能力亦有差別，一般而言，race 1 菌株在土壤中的存活時間較 race 2 及 race 3 菌株長久^(1, 4, 12)。根據土樣偵測及田間病害調查結果，在雲林縣斗南地區的耕作模式下，病原菌在田土中殘存機率低，由此推測 *R. solanacearum* race 3/biovar 2 菌株引起之馬鈴薯青枯病的主要初次感染源為帶菌種薯而非土壤。

田間土壤偵測結果發現馬鈴薯發病田區的土壤含菌量介於每克乾土 10^2 - 10^5 CFU，通常高罹病率田區偵測到的土壤含菌量亦高。人為混菌接種發現泥炭土含菌量的多寡會影響馬鈴薯青枯病的罹病率，隨著泥炭土中病原菌含量的增加，感染速率及罹病率皆隨之增加，但泥炭土中病原菌含量若低於每克泥炭土 10^5 CFU，皆未發生馬鈴薯青枯病，且泥炭土滅菌與否不影響上述結果，可能因泥炭土中僅含有少量微生物之故。相似的結果亦發生在番茄青枯病上，當土壤均勻混合 race 1/biovar 3 或 biovar 4 菌株接種番茄，若土壤含菌量為每克乾土 10^5 CFU 則罹病率低，若低於每克乾土 10^5 CFU 則無青枯病發生（林，未發表之資料）。故人為製造病土與田間自然病土的病原菌含量對病害發生之影響，二者之間存在很大的差異，但可確認的是土壤病原菌含量愈低愈不利於青枯病發生，故若能降低田間土壤中的病原菌密度，應能有效降低病害的罹病率。

2008 及 2010 年相似的疫情分別發生在嘉義縣新港及六腳地區（未發表之資料），推測也是由帶菌種薯引起。帶菌種薯是青枯病菌長期存活的最佳場所，也是遠距離散播的重要途徑⁽¹⁶⁾。因此欲杜絕 *R. solanacearum* phylotype II/race 3/biovar 2 菌株持續在台灣馬鈴薯產區蔓延危害，健康種薯的供應是成敗關鍵，而種薯檢測扮演著非常重要的角色。因該病原細菌可經由維管束進入薯塊，故目前農民可採行之因應措施為(1)檢查植株莖基部與薯塊連接處是否有褐化病徵，有褐化病徵之薯塊不可留置田間或灌溉

用排水系統中，更不能留作種薯使用；(2)種薯分芽時若薯塊切面之維管束有褐化現象，所使用之刀具需以 70% 酒精殺菌後方能再使用；(3)本研究已證實在斗南地區夏季高溫及水稻輪作的耕作模式下，馬鈴薯青枯病菌 *R. solanacearum* phylotype II/race 3/biovar 2 於田間殘存而成為下期作感染源的機率極低，但為能杜絕本病害的發生，於田間管理上，針對本期作已罹病之田區，仍需將所有馬鈴薯植株移除銷燬，避免因土壤中病原菌密度增加或在田間殘存時間增長，而有機會在未輪作水稻的田區或氣候條件改變的情況下成為二次感染源。未來將進一步研究採收自罹病田之種薯帶菌率與帶菌種薯發芽率，及種薯帶菌率對田間病害發生之影響，以供爾後生產健康種薯之參考依據。

謝 辭

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局經費補助及雲林縣斗南鎮農會的協助，特致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Akiew, E. B. 1986. Influence of soil moisture and temperature on the persistence of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 77-79 in: Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. G. J. Persley, ed. ACIAR Proc. 13, Canberra, Australia, 145 pp.
2. Buddenhagen, I. and Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2: 203-230.
3. Buddenhagen, I., Sequeira, L., and Kelman, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52: 726.
4. Chiou, Y. S. 2002. Characteristics of strains of *Ralstonia solanacearum* recently affecting potatoes in central Taiwan. Master Thesis, National Chung Hsing University, 46 pp. (in Chinese)
5. Ciampi, L., and Sequeira, L. 1980. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. Am. Potato J. 57: 307-317.
6. Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pages 573-644 in: Plant-associated bacteria. S. S. Gnanamanickam ed. Springer, Dordrecht, Netherlands, 718 pp.
7. Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pages 9-28 in: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. C. Allen, P. Prior., and A. C. Hayward, eds. APS Press, St. Paul, MN, 510 pp.
8. Fegan, M., Holoway, G., Hayward, A. C., and Timmis, J. 1998. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. Pages 34-43 in: Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects. P. Prior, C. Allen, and J. G. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 447 pp.
9. Fegan, M. and Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? Pages 449-461 in: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. APS Press, St. Paul, MN, 510 pp.
10. Gillings, M. R. and Fahy, P. 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. Pages 95-112 in: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK, 259 pp.
11. Graham, J., Jones, D. A., and Lloyd, A. B. 1979. Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in plant debris and in latently infected potato tubers. Phytopathology 69: 1100-1103.
12. Granada, G. A. and Sequeira, L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. Can. J. Microbiol. 29: 433-440.
13. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27: 265-277.
14. Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 65-87.

15. Hayward, A. C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Pages 123-135 in: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK, 259 pp.
16. Hayward, A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. Pages 32-42 in: Encyclopedia of Microbiology, Vol. 4. J. Lederberg, ed. Academic Press, San Diego, CA, 1142 pp.
17. He, L. Y., Sequeira, L., and Kelamn, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357-1361.
18. Hsu, S. T. 1991. Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 33: 72-79. (in Chinese)
19. Kado, C. I., and Heskett, M G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
20. Kelman A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *N. C. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. No. 99*, 194 pp.
21. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.
22. Klement, Z., Farkas, G. L., and Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
23. Lin, C. H., Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 1994. Radish (*Raphanus sativus* L.), a new host of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 3: 147-155.
24. Lin, C. H. 2008. Application of population profiling and detection of *Ralstonia solanacearum* on integrated management of tomato bacterial wilt. Doctoral Dissertation, National Chung Hsing University, 101 pp.
25. Lin, C. H., Hsu, S. T., Tzeng, K. C., and Wang, J. F. 2009. Detection of race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. *Eur. J. Plant Pathol.* 124: 75-85.
26. Michel, V. V., Hartman, G. L., and Midmore, D. J. 1996. Effect of previous crop on soil populations of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. *Plant Dis.* 80: 1367-1372.
27. Milling, A., Meng, F., Denny, T. P., and Allen, C. 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.
28. Persley, G. J. 1986. Ecology of *Pseudomonas solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt. Pages 71-76 in: Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. G. J. Persley, ed. ACIAR Proceedings No.13, Canberra, Australia, 145 pp.
29. Wu, Y. F., Lin, C. H., Chen, T. M., Huang, Y. F., Chen, S. H., Wang, J. F., and Cheng, A. S. 2010. Ecological survey of brown rot of potato in Dounan, Yunlin. *Plant Pathol. Bull.* 19: 87. (in Chinese)

ABSTRACT

Wu, Y. F.¹, Lin, C. H.^{2,3}, Wang, J. F.², and Cheng, A. S.¹ 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. (¹Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Sinhua, Tainan 712, Taiwan, ²AVRDC - The World Vegetable Center, Shanhua, Tainan 741, Taiwan, ³Corresponding author, Email: chih-hung.lin@worldveg.org; Fax: +886-6-5830009)

Potato plants showing wilting symptoms were found in potato production areas of Dounan, Yunlin in winter 2006. Isolates collected from wilted potato stems or tubers were identified using differential medium, tobacco hypersensitive reaction, pathogenicity test, biovar test, race 3/biovar 2-specific polymerase chain reaction (PCR), and phylotype-specific multiplex PCR. Results of identification showed that the pathogen belongs to potato strain of *Ralstonia solanacearum* phylotype II/race 3/biovar 2. The presence and density of the pathogen were monitored in 10 fields from 2007 to 2009 using selective medium and Bio-PCR. Results showed that soil pathogen density from all surveyed fields did not correlate with disease incidence except for Field #1 and #2. However, the pathogen was not detected in these two fields and no disease incidence was observed after 2007. The pathogen was not detected between two potato crops, but bacterial wilt was found in a few fields even though disease incidence was very low in 2008. Although bacterial wilt was not observed in 2007 and 2008 in Field #4, 40% of disease incidence and 10^5 CFU/g of dry soil of pathogen density were found in the 2009 crop. Germination of seed tubers in infested peat moss was as high as that in non-infested peat moss. Disease progress and incidence increased with the increase of pathogen density in the peat moss. But the disease did not occur when pathogen density of peat moss was less than 10^5 CFU/g of peat moss. Thus reducing inoculum density in the soil could reduce disease incidence. Potato is regularly rotated with paddy rice in Dounan, Yunlin. The chance of survival in soil is low for *R. solanacearum* phylotype II/race 3/biovar 2 strains. Based on our results, the primary inoculum source of potato bacterial wilt is most probably contaminated seed tubers, but not soil. Thus, using healthy seed tubers is the key to control potato bacterial wilt in the area.

Keywords: bacterial wilt of potato, *Ralstonia solanacearum*, phylotype, race, biovar, survival