

臺東地區薑軟腐病與青枯病之診斷鑑定與發生調查

王誌偉¹ 蔡恕仁²

摘 要

薑地下部病害主要為腐霉病菌 *Pythium myriotylum* Drechsler 造成之軟腐病 (Soft rot) 與青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* Smith 感染造成之細菌性青枯病 (Bacterial wilt)，兩者皆為薑栽培上重要的限制因子。診斷上除以病徵判斷外，亦可分別利用 Pmy5/ITS2 與 759f/760r 引子對，輔助鑑定罹病薑塊樣本為軟腐病菌或青枯病菌所致。2019 至 2020 年間，共採集臺東地區 12 處不同田區之罹病薑塊樣本，綜合病原菌分離與罹病薑塊萃取 DNA 後進行分子檢測之結果，3 處田區為軟腐病造成，5 處田區為青枯病造成，另有 3 處為軟腐病與青枯病複合感染，1 處未測出，推測可能為其他病原菌所造成。

關鍵詞：軟腐病、青枯病、薑

¹ 行政院農業委員會臺東區農業改良場 助理研究員

² 行政院農業委員會臺東區農業改良場 副研究員兼課長

前 言

薑 (*Zingiber officinale* Roscoe) 為重要傳統香辛類佐料蔬菜，臺灣近10年來栽培面積約為1,100公頃，臺東縣為主要產地之一。生薑的種植因病害發生形成產業問題，嚴重時造成連作障礙，故多數農友以新植地(數十年以上未曾種植生薑或未開墾的土地)進行開墾，以減少病害問題。但病害的發生往往造成重大損失，且缺乏有效的防治方法。根據 Gupta 等人(2017)的報導，薑常見的病原微生物與其他有害生物種類包括軟腐病菌(*Pythium myriotylum* Drechsler)、根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) chitwood)、白星病菌(*Phyllosticta zingiberi* Hori)、萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi*)、青枯病菌(*Ralstonia solanacearum* Smith)、胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、薑褪綠斑點病毒(*Ginger chlorotic fleck virus*, GCFV)與亞洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis* Guenee)等⁽⁷⁾，近來亦發現新興害蟲-秋行軍蟲(*Spodoptera frugiperda* Smith)的危害⁽⁶⁾。此外，由*Pyricularia zingiberi*引起的薑熱病亦為田間常見之葉部病害⁽²⁾。根據2019年田間病害調查，臺東地區薑病害以軟腐病與青枯病為主⁽¹⁾。

薑軟腐病主要由腐霉病菌(*P. myriotylum*)所造成，好發於夏季與秋季，*P. myriotylum*在感染的植株上，產生大量的游走孢子，配合下雨或是澆灌系統產生的流動水，短時間內就能從罹病的區塊擴大感染至全區。根據Stirling等人(2009)的報導，田間薑軟腐病可在2個月的時間由零星發生擴散為100 %感染，造成完全無收成的損失。在具有坡度的農田，病害傳播的速度可達每日4.5公尺。實驗室接種實驗顯示，本病原菌在土壤水飽和與溫度介於26 - 30℃的環境下，1 - 2週即可完全破壞根莖(rhizome)⁽¹³⁾。隨著每年11 - 12月下旬氣候轉涼且薑根莖較為成熟後，軟腐病病害發生趨於減緩。Wang等人(2003)開發薑軟腐病的專一性引子對 Pmy5/ITS2，該專一性引子對可以有效偵測田間由薑軟腐病菌所感染的薑病害樣本，對於其他植物病原真菌或卵菌，包括*F. oxysporum* f. sp. *zingiberi*、*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary、*Phytophthora capsici* Leonian，或植物病原細菌，包括*Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula、*Xanthomonas zingiberi* (Uyeda) Savulescu、*Erwinia chrysanthemi* Burkholder等皆不會有非專一性反應⁽¹⁵⁾。

青枯病菌為土壤傳播細菌，其寄主範圍與地理分布範圍廣泛，主要造成茄科、薑荷科和芭蕉科等多種經濟作物損失⁽¹²⁾。青枯病菌主要分類系統有二：一是依照寄主範圍分類成5個生理小種(race)⁽³⁾，二是依照菌株對碳水化合物的利用能力分成5種生物型(biovar)⁽⁸⁾。臺灣目前感染茄科和芭蕉科等作物的青枯病菌主要是race 1/biovar 3 or biovar 4，和race 3/biovar 4⁽¹⁷⁾。在泰國，造成薑青枯病的*R. solanacearum*屬於race 1/biovar 4⁽¹⁴⁾；其他各國的薑青枯病菌屬於race 4/biovar 3或biovar 4⁽¹²⁾。薑青枯病發病初期，薑葉片濃綠但捲曲下垂，病勢發展約3至4天後，全株植物呈黃褐色並乾枯死亡。罹病的薑組織切面可以觀察到菌泥或是菌流。Opina等人(1997)利用逢機增幅多態型

DNA (RAPD)技術開發出偵測青枯病菌的專一性引子對759f/760r，該引子對針對分離自薑、茄子與馬鈴薯分別屬於biovar 4、biovar2與biovar 3的青枯病菌菌株，皆可以增幅出281 bp大小之專一性條帶⁽¹¹⁾。

本研究於2019 - 2020年間，自臺東地區調查採集薑地下部病害樣本，以軟腐病菌或青枯病菌的選擇性培養基進行病原菌分離，純化培養病原菌後，萃取DNA後定序核糖體RNA基因片段，於美國國家生物資訊中心(NCBI)資料庫進行比對確認菌株菌種。樣本採集後同時將罹病組織保存於-20 °C冷凍櫃，再以專一性引子對檢測病組織內是否含有軟腐病菌或青枯病菌之核酸片段，建立快速診斷鑑定平台，作為爾後病害防治策略之指引。

材 料 與 方 法

一、病害調查與樣本採集

病害樣本採集自臺東縣臺東市、卑南鄉、鹿野鄉與東河鄉，於田間挖取罹病植株帶回實驗室後，以自來水洗淨樣本，罹病組織樣本分別以選擇性培養基進行軟腐病菌與青枯病菌之病原菌分離培養，剩餘組織樣本存放於-20 °C冷凍櫃，作為後續核酸萃取與分子檢測之用。

二、薑軟腐病之病原菌分離

薑軟腐病之病原菌以卵菌選擇性培養基⁽¹⁰⁾進行組織分離；培養基配方為5 % Campbell's V8 juice, 0.02 % CaCO₃, 100 ppm ampicillin, 50 ppm mycostatin和1.5 % agar。罹病組織樣本經表面消毒後，放置於選擇性培養基一天後即可觀察到菌絲生成，將新生菌絲切下，移至不含抗生素培養基上，3天後將培養基切塊放置於無菌水中供作長期保存。

三、薑青枯病之病原菌分離

切取罹病薑莖部或塊莖浸泡1 %次氯酸鈉進行表面消毒30秒，再經過3次無菌水清洗，將組織切碎後置入無菌水中震盪以釋出細菌。以移植環沾取懸浮液，再以劃線平板方式將懸浮液塗抹於triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 培養基⁽⁹⁾，之後將培養基置於30 °C培養箱培養，並挑選單一菌落進行純化培養。

四、核酸萃取與分子檢測

卵菌類菌株進行核酸萃取時，以無菌刀片刮取菌絲後置於DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen, Germany) 所提供之2 mL研磨管，並加入500 µL之CD1溶液；細菌類則以無菌移植環挖取3 - 5個菌落並懸浮於含CD1溶液之研磨管。罹病薑塊之核酸

萃取，採集後先存放於 -20°C ，萃取時以刀片切取靠近健康部位的罹病組織約0.5 g置於研磨管，將研磨管放置在Fastprep-24 5G (MP Biomedicals, USA) 研磨機上，以6,000 rpm震盪30秒，暫停30秒，共進行3循環。震盪研磨後以12,000 xg離心2分鐘，取上清液到新的1.5 mL微量離心管。加入200 μL 之CD2溶液，以12,000 xg離心1分鐘。再取上清液至新的1.5 mL微量離心管，加入500 μL 之Buffer App並震盪5秒。取600 μL 溶液至MB Spin column，以12,000 xg離心1分鐘。去除column下方溶液，將1.5 mL微量離心管剩下之溶液加入MB Spin column中，再以12,000 xg離心1分鐘。將MB Spin column移至新的2 mL collection tube，加入650 μL 之Buffer AW1，以12,000 xg離心1分鐘。去除column下方溶液，加入650 μL 之Buffer AW2，以12,000 xg離心1分鐘。去除column下方溶液，直接以16,000 xg離心2分鐘後，將column放到新的1.5 mL微量離心管。最後，在column中央滴入40 μL 之無菌水，以12,000 xg離心1分鐘後，移除column留下微量離心管，萃取完成的DNA存放在 -20°C 供後續聚合酶連鎖反應(PCR)實驗。

五、聚合酶連鎖反應實驗

本研究所使用的核酸引子對包括：(1) Pmy5 / ITS2、(2) ITS1 / ITS4、(3) P18SF / P18SR、(4) 759f / 760r與(5) V6/V8 (表1)。Pmy5 / ITS2之PCR反應條件為 94°C 5分鐘，進入 94°C 30秒， 57°C 30秒， 72°C 10秒，共25個循環，最後再進行 72°C 10分鐘。ITS1 / ITS4之PCR反應條件為 94°C 5分鐘，進入 94°C 30秒， 57°C 30秒， 72°C 1分鐘，共30個循環，最後再進行 72°C 10分鐘；P18SF/P18SR之PCR反應條件為 94°C 5分鐘，進入 94°C 30秒， 55°C 30秒， 72°C 30秒，共30個循環，最後再進行 72°C 10分鐘。759f/760r之PCR反應條件為 94°C 3分鐘，進入 94°C 30秒， 55°C 30秒， 72°C 45秒，共30個循環，最後再進行 72°C 5分鐘。V6/V8之PCR反應條件為 94°C 5分鐘，進入 94°C 30秒， 52°C 20秒， 72°C 45秒，共30個循環，最後再進行 72°C 10分鐘。PCR產物以2 %瓊脂凝膠 (含50 ppm HealthView™ Nucleic Acid Stain)，使用1X TAE電泳緩衝溶液 (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)，以100 V電壓進行電泳30分鐘，將膠體放置於紫外光燈箱照射，觀察DNA增幅結果。

表1. 本研究使用之核酸引子對

Table 1. A list of oligonucleotide primers used in this study.

Primer set	Sequence(5'→3')	Description	Reference
Pmy5	GCTGCTGTTATGGCGGACT	<i>Pythium myriotylum</i> specific primer	Wang <i>et al.</i> , 2003
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Fungi universal primer	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
P18SF	AACGGCTACCACATCCAAGG	Plant ribosomal RNA gene, for positive control of DNA extraction	Thomas <i>et al.</i> , 2003
P18SR	CCGAAGGCCAACACAATAGG		
759f	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	<i>Ralstonia solanacearum</i> specific primer	Opina <i>et al.</i> , 1997
760r	GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG		
V6	AACGCGAAGAACCTTAC	Bacterial universal primer	Engelbrektsen <i>et al.</i> , 2010
V8	ACGGGCGGTGWGTRC		

結 果 與 討 論

一、薑軟腐病與青枯病之田間病徵與病原菌分離

田間病害調查診斷時，薑軟腐病發生初期葉片失水呈現下垂現象，隨後莖基部呈水浸狀軟腐並造成植株倒伏（圖1）。青枯病為細菌造成維管束阻塞，植株失水後到乾枯時都還呈現直立的狀態（圖2A），切取一段罹病莖部靜置於清水中，數分鐘後可見維管束中乳白色細菌菌泥自切面流出（圖2B）。除病徵的判斷，田間發病的植株常常因發病程度的不同或者複合感染等問題，造成無法僅憑外觀病徵於現場進行病害診斷。因此，還需利用病原菌分離與分子檢測的方法輔助病害種類的診斷鑑定。



圖1. 軟腐病菌造成植株莖基部腐敗軟化而易倒伏。

Fig. 1. Symptoms caused by ginger soft rot. Upon infection by *Pythium myriotylum*, the collar region of ginger pseudostem becomes water soaked and then rotten. As a result, lodging occurs frequently from the rhizomes.



圖2. 青枯病的病徵為葉片黃化、植株乾枯無倒伏情形(A)，切取一段罹病莖部靜置於清水中，約數分鐘後可見維管束中乳白色細菌菌泥自切面流出(B)。

Fig. 2. Symptoms caused by ginger bacterial wilt. **A.** Upon infection by *Ralstonia solanacearum*, green ginger leaves roll, curl, and eventually turn yellow and brown. The stem dried out with no appearance of lodging; **B.** Part of the infected stem was cut and put in water, whitish strands of bacterial masses streaming out after several minutes.

本研究於2019年7月至2020年12月間，自12處薑田（分別由5位農友所種植）採集薑根莖病害樣本，以V8選擇性培養基共分離得到30個卵菌菌株，以TTC培養基共分離得到17個細菌菌株，各採樣田區與分離得到之菌株代號詳列於表2。

表2. 2019 - 2020年間自12處薑田所分離的菌株

Table 2. Information of the 12 ginger fields where pathogen isolates were collected during 2019 and 2020 as well as names of the isolates collected from each field.

Field No.	Sampling Date	Place (GPS)	Farmer	by V8 selection medium	by TTC medium
F1	2019/7/3	Longtian#1 (N22.6817181, E121.0110287)	Wu (吳)	CWR-191 ~CWR-193	ND*
F2	2019/8/13	Tonggong#1 (N22.9448322, E121.1214482)	Lee (李)	CWR-225 ~CWR-227	ND
F3	2019/9/4	Longtian#2 (N22.9409076, E121.1253465)	Wu (吳)	CWR-228	WFZ-384
F4	2019/9/18	Chulu (N22.8636238, E121.1149623)	Yang (楊)	CWR-422 ~CWR-424	WFZ-402
F5	2019/9/18	Zhiben (N22.6817181, E121.0110287)	Zhan (詹)	CWR-425 ~CWR-427	WFZ-406 WFZ-409
F6	2019/10/9	Banjiu#1 (N22.8183895, E121.0865708)	Lin (林)	CWR-246 ~CWR-248	ND
F7	2019/10/21	Tonggong#2 (N22.916331, E121.192565)	Lee (李)	CWR-288	CWR-523
F8	2020/7/29	Tonggong#3 (N22.919245, E121.193772)	Lee (李)	CWR-337	WFZ-693 ~WFZ-695
F9_1	2020/9/23	Luliao (N22.938495, E121.132058)	Wu (吳)	ND	WFZ-723 ~WFZ725
F9_2	2020/9/25	Luliao (N22.938495, E121.132058)	Wu (吳)	CWR-364 ~CWR366	WFZ-734 ~WFZ-736
F10	2020/9/28	Tonggong#4 (N22.918763, E121.193245)	Lee (李)	CWR-374 ~CWR-376	ND
F11	2020/10/26	Longtian#3 (N22.911055, E121.114403)	Wu (吳)	CWR-416 ~CWR-418	ND
F12	2020/12/2	Banjiu#2 (N22.819175, E121.087533)	Lin (林)	CWR-413 ~CWR-415	WFZ-748 ~WFZ-750

*ND: No pathogens isolated from this sample

二、罹病樣本分離之卵菌類菌株菌種鑑定

卵菌萃取DNA後，以Pmy5/ITS2專一性引子對進行PCR增幅，並且以ITS1/ITS4引子對之增幅結果作為DNA萃取成功之正對照；成功增幅出專一性條帶者，判定該菌株為*P. myriotylum*；Pmy5/ITS2專一性引子對無法增幅成功者，進一步將ITS1/ITS4引子對增幅之產物進行定序，並至NCBI資料庫進行序列比對，以瞭解該菌株的種類。軟腐病菌專一性引子之PCR增幅產物的電泳分析結果如圖三所示，以Pmy5/ITS2 增幅成功之菌株包括CWR191、CWR192、CWR193、CWR225、CWR226、CWR227、CWR288、CWR337、CWR364、CWR365、CWR366、CWR374、CWR375和CWR376共14株菌株，分別自薑田編號F1、F2、F7、F8、F9_2與F10共6個田區分離獲得，推測此6田區之薑根莖病害為軟腐病菌所引起。其他以Pmy5/ITS2引子對無法增幅出片段的菌株，將其ITS1/ITS4擴增產物定序後，經由序列比對發現這些菌株包括*Pythium splendens* Hans Braun、*Pythium graminicola*以及*Phytophthora vexans* de Bary (表3)。

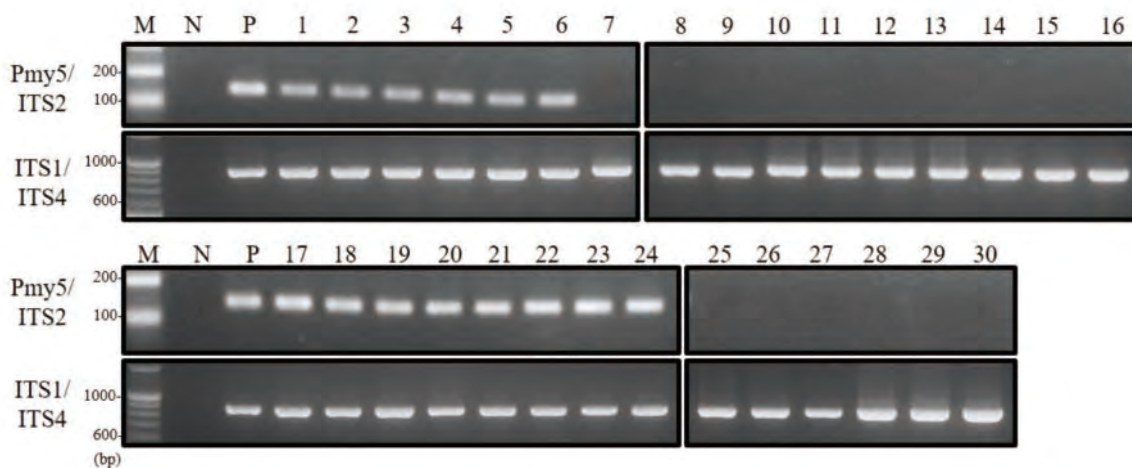


圖3. 田間罹病薑塊分離之卵菌類菌株以軟腐病菌專一性引子Pmy5/ITS2或真菌通用引子ITS1/ITS4進行PCR分析之結果。PCR產物以2 %瓊脂膠體進行電泳分析。M：DNA條帶標準品；N：無模板之負對照；P：*Pythium myriotylum*菌株；Lanes 1-30如表3中菌株編號1-30。

Fig. 3. PCR analysis of fungal isolates collected from the ginger fields. PCR was performed by using *P. myriotylum*-specific Pmy5/ITS2 or universal ITS1/ITS4 as the primer set. The amplified products were analyzed by 2 % agarose gel electrophoresis. M: 100 bp Plus DNA Ladder as molecular weight markers; N: no template; P: with *P. myriotylum* DNA as the template; Lanes 1-30: oomycete isolates No. 1-30 obtained in this study as detailed in Table 3.

表3. 30株卵菌類菌株之菌種學名與其分離之田區代號

Table 3. Species names and collection place of 30 oomycete isolates obtained in this study.

Numbers on top of the agarose gel shown in Fig. 3	Isolate code	Species name	Field no.
1	CWR-191	<i>Pythium myriotylum</i>	F1
2	CWR-192	<i>Pythium myriotylum</i>	F1
3	CWR-193	<i>Pythium myriotylum</i>	F1
4	CWR-225	<i>Pythium myriotylum</i>	F2
5	CWR-226	<i>Pythium myriotylum</i>	F2
6	CWR-227	<i>Pythium myriotylum</i>	F2
7	CWR-228	<i>Pythium splendens</i>	F3
8	CWR-422	<i>Pythium graminicola</i>	F4
9	CWR-423	<i>Pythium graminicola</i>	F4
10	CWR-424	<i>Pythium splendens</i>	F4
11	CWR-425	<i>Pythium splendens</i>	F5
12	CWR-426	<i>Pythium splendens</i>	F5
13	CWR-427	<i>Pythium splendens</i>	F5
14	CWR-246	<i>Pythium splendens</i>	F6
15	CWR-247	<i>Pythium splendens</i>	F6
16	CWR-248	<i>Pythium splendens</i>	F6
17	CWR-288	<i>Pythium myriotylum</i>	F7
18	CWR-337	<i>Pythium myriotylum</i>	F8
19	CWR-364	<i>Pythium myriotylum</i>	F9_2
20	CWR-365	<i>Pythium myriotylum</i>	F9_2
21	CWR-366	<i>Pythium myriotylum</i>	F9_2
22	CWR-374	<i>Pythium myriotylum</i>	F10
23	CWR-375	<i>Pythium myriotylum</i>	F10
24	CWR-376	<i>Pythium myriotylum</i>	F10
25	CWR-416	<i>Phytopythium vexans</i>	F11
26	CWR-417	<i>Phytopythium vexans</i>	F11
27	CWR-418	<i>Phytopythium vexans</i>	F11
28	CWR-413	<i>Pythium splendens</i>	F12
29	CWR-414	<i>Pythium splendens</i>	F12
30	CWR-415	<i>Pythium splendens</i>	F12

三、罹病樣本分離之細菌類菌株菌種鑑定

罹病樣本經由TTC培養基分離純化培養後的細菌菌株，以759f/760r引子對進行PCR反應，得到專一性片段者判斷為青枯病菌。17株菌株中，只有WFZ693、WFZ694與WFZ695此3株細菌無法得到專一性條帶，其餘分離自田區F3、F4、F5、F7、F9_1、F9_2以及F12共14個菌株，皆可得到專一性條帶(圖4)，推測這些田區皆有青枯病菌感染。

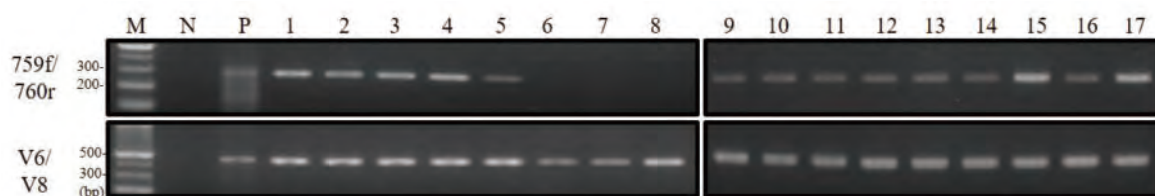


圖4. 田間罹病薑塊分離之細菌類菌株以青枯病菌專一性引子對759f/760r或通用引子對V6/V8進行PCR分析之結果。PCR產物以2 %瓊脂膠體進行電泳分析。M：DNA條帶標準品；N：無模板之負對照；P：R. solanacearum菌株；Lanes 1-17如表4中菌株編號1-17。

Fig. 4. PCR analysis of bacterial isolates collected from the ginger fields. PCR was performed by using *R. solanacearum*-specific 759f/760r or universal V6/V8 as the primer set. The amplified products were analyzed by 2 % agarose gel electrophoresis. M: 100 bp Plus DNA Ladder as molecular weight markers; N: no template; P: with *R. solanacearum* DNA as the template; Lanes 1-17: bacterial isolates No. 1-17 obtained in this study as detailed in Table 4.

表4. 17株細菌類菌株之菌種學名與其分離之田區代號

Table 4. Species names and collection place of 17 bacterial isolates obtained in this study.

Numbers on top of the agarose gel shown in Fig. 4	Isolate No.	Species	Field no.
1	WFZ-384	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F3
2	WFZ-402	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F4
3	WFZ-406	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F5
4	WFZ-409	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F5
5	WFZ-523	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F7
6	WFZ-693	<i>Scandinavium goeteborgense</i>	F8
7	WFZ-694	<i>Scandinavium goeteborgense</i>	F8
8	WFZ-695	<i>Bacillus subtilis</i>	F8
9	WFZ-723	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F9_1
10	WFZ-724	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F9_1
11	WFZ-725	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F9_1

Numbers on top of the agarose gel shown in Fig. 4	Isolate No.	Species	Field no.
12	WFZ-734	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F9_2
13	WFZ-735	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F9_2
14	WFZ-736	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F9_2
15	WFZ-748	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F12
16	WFZ-749	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F12
17	WFZ-750	<i>Ralstonia solanacearum</i>	F12

四、以分子檢測罹病薑塊組織之軟腐病菌與青枯病菌

罹病薑塊組織抽取DNA後，分別使用軟腐病菌與青枯病菌的專一性引子對進行PCR，並利用植物核糖體基因片段的專一性引子對 (P18SF/P18SR) 作為DNA抽取是否成功的正對照。電泳分析結果發現，使用P18SF/P18SR引子對自所有樣本可成功增幅出專一性條帶，表示這些由薑組織樣本萃取的DNA品質良好。田區編號F1、F2、F10的樣本使用軟腐病菌專一性引子對可增幅出專一性條帶，推測該田區為軟腐病菌造成。田區F3、F4、F5、F6、F9_1、F9_2和F12的樣本增幅出青枯病菌專一性條帶，因此判定為青枯病菌所感染。田區F7與F8同時增測到軟腐病菌與青枯病菌之專一性條帶，推測為複合感染軟腐病與青枯病。

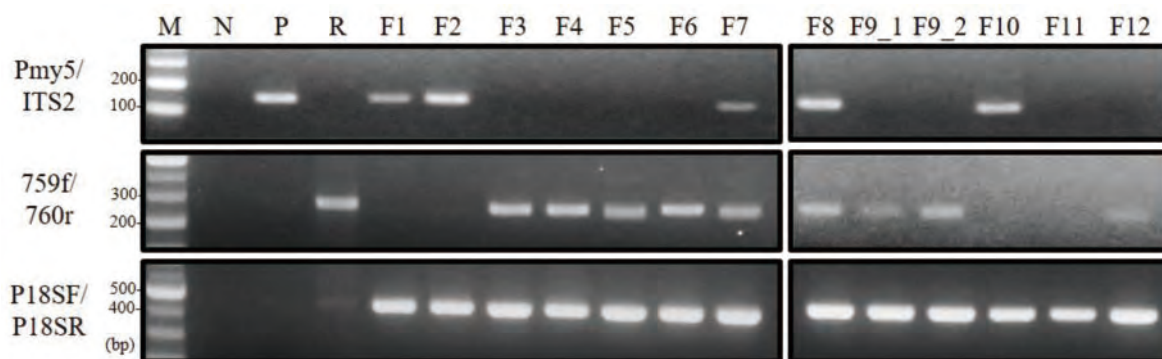


圖5. 罹病薑塊DNA分別以前述軟腐病菌、青枯病菌專一性引子或P18SF/P18SR進行PCR分析之結果。PCR產物以2 %瓊脂膠體進行電泳分析。M：DNA條帶標準品；N：無模板之負對照；P：P. myriotylum菌株；R：R. solanacearum菌株；Lanes F1-F12，採集自如表2中田區代號之罹病薑塊組織DNA。

Fig. 5. PCR analysis of diseased ginger rhizomes collected from fields. PCR was performed by using *Pythium myriotylum*-specific Pmy5/ITS2, *Ralstonia solanacearum*-specific 759f/760r, or plant universal P18sF/P18sR as the primer set. The amplified products were analyzed by 2 % agarose gel electrophoresis. M: 100 bp Plus DNA Ladder as molecular weight markers; N: no template; P: with *P. myriotylum* DNA as the template. R: with *R. solanacearum* DNA as the template; Lanes F1-F12: DNA of diseased ginger rhizomes collected from Fields listed in Table 2.

五、病原菌分離鑑定與罹病薑塊分子檢測之病害發生調查方法結果比較

田間採集的薑病害樣本，利用組織分離方法分離培養出病原菌，一般需要3-7個工作天以上，且病原菌分離培養的樣本必須於採集回實驗室後盡快進行，否則很難成功分離到軟腐病菌或青枯病菌。直接以分子檢測罹病薑塊中軟腐病或青枯病的方法，最快1個工作天即可完成，且病害樣本可先存放於-20℃冷凍櫃，累積一定數量之樣本再一併進行DNA萃取、PCR反應與電泳分析等步驟。為了比較兩種方法的成效，將前述分析結果，包括表2至4以及圖5的資料統整如表5，採集自12不同田區樣本以病原菌分離方法，有分離到軟腐病菌或青枯病菌者標示為Y，無分離到任何病原菌菌株者標示為ND，分離到的菌株經專一性引子檢測非軟腐病菌或青枯病菌者標示為N。罹病薑塊分子檢測為正反應者表示為Y，未偵測到軟腐病菌或青枯病菌者標示為N (表5)。將ND的結果視為未檢測到軟腐病菌或青枯病菌，則只有F6、F8與F9_2共3個田區的樣本，其病原菌分離與分子檢測方法之結果有差異。在田區F6與F8沒有分離到青枯病菌，但分子檢測為青枯病菌正反應，田區F9_2則是分離到軟腐病菌但分子檢測未偵測到。其餘9個田區以兩種方法得到的結果相符，可以歸納出這些田區所發生的病因為何 (表5)。

表5. 薑根莖病害樣本病原菌分離鑑定與分子檢測結果

Table 5. A summary of pathogen identification for diseased ginger rhizomes collected from different fields of Taitung County by employing conventional pathogen isolation or PCR detection.

No.	Place	Farmer	Pathogen isolation ^a		PCR detection ^a		Disease
			V8 selection medium	TTC medium	Pmy5/ITS2	759f/760r	
F1	Longtian #1 (龍田#1)	Wu (吳)	Y	ND	Y	N	Soft rot
F2	Tonggong #1 (銅礦#1)	Lee (李)	Y	ND	Y	N	Soft rot
F3	Longtian #2 (龍田#2)	Wu (吳)	N	Y	N	Y	Bacterial wilt
F4	Chulu (初鹿)	Yang (楊)	N	Y	N	Y	Bacterial wilt
F5	Zhiben (知本)	Zhan (詹)	N	Y	N	Y	Bacterial wilt
F6	Banjiu #1 (斑鳩#1)	Lin (林)	N	ND	N	Y	Bacterial wilt
F7	Tonggong #2 (銅礦#2)	Lee (李)	Y	Y	Y	Y	Mixed infection

No.	Place	Farmer	Pathogen isolation ^a		PCR detection ^a		Disease
			V8 selection medium	TTC medium	Pmy5/ITS2	759f/760r	
F8	Tonggong #3 (銅礦#3)	Lee (李)	Y	N	Y	Y	Mixed infection
F9_1	Luliao (鹿寮)	Wu (吳)	ND	Y	N	Y	Bacterial wilt
F9_2	Luliao (鹿寮)	Wu (吳)	Y	Y	N	Y	Mixed infection
F10	Tonggong #4 (銅礦#4)	Lee (李)	Y	ND	Y	N	Soft rot
F11	Longtian #3 (龍田#3)	Wu (吳)	N	ND	N	N	Other disease
F12	Banjiu #2 (斑鳩#2)	Lin (林)	N	Y	N	Y	Bacterial wilt

^a *Pythium myriotylum* or *Ralstonia solanacearum* was isolated by using the indicated medium or detected by PCR using species-specific primers. Y: successful isolation or detection of *P. myriotylum* or *R. solanacearum*; N: failure to isolate or detect *P. myriotylum* or *R. solanacearum*; ND: No pathogen was isolated by using the indicated medium.

F6田區於2019年採樣時(表2)，發病的區域僅零星位於田區邊緣，分離到的卵菌類菌株為*P. splendens*(表3)，薑塊組織亦未檢測到軟腐病菌*P. myriotylum*，當時沒有分離到任何細菌菌株，但是薑塊組織有偵測到青枯病菌(表5)，因此歸納F6田區之病因為青枯病。另外，F12田區(2019年尚未種薑)與F6田區為同一農友耕作且地點相鄰，該名農友於2020年時開始種薑，結果青枯病發生嚴重，幾乎全無收成。採樣F12田區同樣只分離到*P. splendens*，薑塊組織未檢測到軟腐病菌，但有分離並偵測到青枯細菌，推測F12田區土地2019年時即有青枯病菌存在，2020年種植時因田區耕作移動並造成大面積感染。

田區F8分離到的細菌菌株雖然不是青枯病菌，但是薑塊以分子檢測方式同時檢測到青枯病菌與軟腐病菌，因此歸納該田區為複合感染。F9田區採樣時分別於二個不同發病處進行採樣，且自二處罹病薑塊樣本皆成功分離並偵測到青枯病菌，但僅F9_2的樣本有分離培養出軟腐病菌，因此歸納該田區也可能複合感染，推測該田區軟腐病的發病位置與部位可能不平均，因此造成兩次切取罹病薑塊樣本組織萃取DNA時，皆無法偵測到軟腐病菌。F11田區只有分離到*Phytophthora vexans*菌株(表3)，罹病薑塊分子檢測未偵測到軟腐病菌或青枯病菌，由於未證實此*Phy. vexans*菌株是否具有病原性，因此暫時歸納此田區採集之樣本為其他病因所造成(表5)。

綜上所述，本研究採樣的12不同田區，同時歸納病原菌組織分離與罹病薑塊

分子檢測的結果後，有3田區之病因為軟腐病，5田區為青枯病，3田區為複合感染，1田區為其他病因。比較罹病薑塊分子檢測的結果與最後得到的結論(表5)，吻合率高達92 % (11/12)，推測本研究所使用的分子檢測方法，可以快速準確的判斷罹病薑塊樣本為軟腐病菌、青枯病菌或兩者複合感染。萃取罹病薑塊DNA進行PCR反應時，可增加採樣的樣本數，並同時切取數個不同罹病部位來進行分子檢測，提高診斷病因的正確率。

六、薑軟腐病與青枯病之病害發生觀察

2019年以空拍機進行大面積俯視空拍F1與F5田區以觀察病害發生的狀況與分布(圖6)，F1為軟腐病菌感染的病田，F5為青枯病菌感染的病田，兩田區皆為山坡地形，坡面由高至低如圖6所示，F1田區軟腐病的發生由地勢較高處開始，圖6A上半處多數植株地上部已死亡乾枯，導致畦面土壤露出，地勢較低處的植株可以觀察到靠近溝渠(圖6A紅色箭頭)處較先發病，且植株地上部乾枯死亡(圖6A黑色箭頭處)，推測原因為軟腐病菌隨著水流往低處傳播所致。F5青枯病發生田區最早發病位置位於田區中段靠下方處(圖6B黑色箭頭處)，但病害仍迅速的同時往上與往下傳播，幾乎造成全區無法收成的損失(圖6B)。其他青枯病發生的田區(F4與F12等)亦觀察到類似幾乎全無收成的狀況。推測田間薑青枯病大發生時，除了藉由水流的傳播，薑地下根莖的接觸或人員的走動亦造成病害傳播。田間調查或診斷薑田病害時，除了病徵的判斷並採集樣本進行病原菌分離培養與分子檢測等方法外，以空拍機取得田區大面積病害發生與傳播資訊，可輔助判斷病害發生之種類。

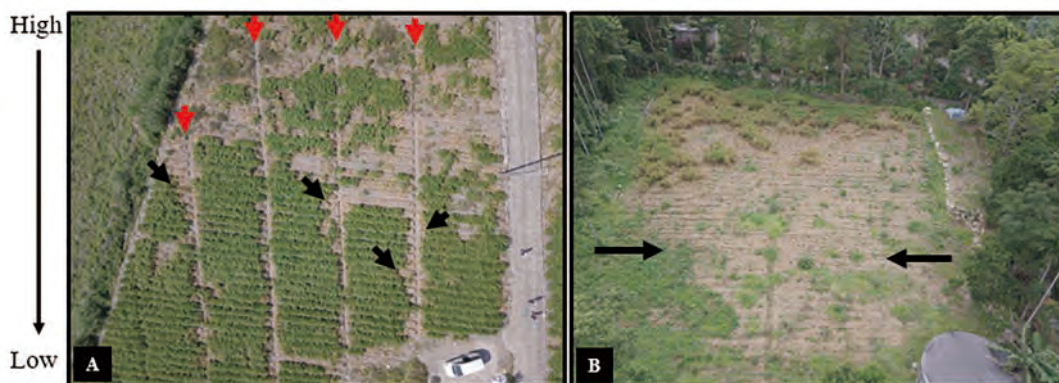


圖6. 以空拍機進行大面積俯視空拍F1(龍田#1)薑軟腐病(A)與F5(知本)青枯病之病田(B)。

Fig. 6. Aerial photographs of two ginger fields obtained by using aerial camera. A. F1 (Longtian #1), with the occurrence of ginger soft rot; B. F5 (Zhiben), with the occurrence of ginger bacterial wilt.

結 論

薑軟腐病與青枯病一直是薑栽培上最嚴重的問題，病害一旦發生往往迅速蔓延造成巨大的損失。本研究於2019至2020年間共調查12處發病田區，綜合病原菌分離與薑塊分子檢測結果發現，25%的田區為軟腐病田，42%田區為青枯病田，25%田區為複合感染，1處田區為其他病因。單由軟腐病菌感染的田區只有3處，主要採集自臺東縣東河鄉銅礦山區與鹿野鄉龍田的1處山坡地薑園。其他田區皆為平地薑園，即使有分離或偵測到軟腐病菌，但同時可分離或偵測到青枯病菌的存在。綜合來說，12處病害發生田區，有67%田區的病害發生與青枯病菌感染有關，推測薑青枯病在臺東地區發生率較高。本研究分別自5處青枯病田區(F3、F4、F5、F6、F12)分離到*P. splendens*與F11田區分離到*Phy. vexans*等非*P. myriotylum*菌株，關於這些菌株之病原性以及對於青枯病傳播與發生的角色等問題，值得進一步探討。

誌 謝

本項試驗之核酸萃取、PCR與電泳分析等實驗主要由研究助理吳俊耀先生進行。田間採樣與病原菌分離等工作由本場植物保護研究室黃國興先生(已退休)、林裕峰先生及林子筠小姐等協助，謹致謝忱。本項研究部分經費承蒙行政院農業委員會科技計畫110農科-5.4.6-藥-P2(8)經費補助。

參 考 文 獻

1. 王誌偉。2020。薑軟腐病與細菌性青枯病之介紹。臺東區農業專訊113: 9-12。
2. 黃穗昌、李惠鈴。1998。薑主要病害及其防治。臺東區農業專訊24: 9-11。
3. Buddenhagen, I. and A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytophthol. 2: 203-230.
4. Cuenoud, P., V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Grayer, and M. W. Chase. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences. Am. J. Bot. 89: 132-144.
5. Engelbrektson, A., V. Kunin, K. C. Wrighton, N. Zvenigorodsky, F. Chen, H. Ochman, and P. Hugenholtz. 2010. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. ISME J. 4: 642-647.
6. Firake, D. M. and G. T. Behere. 2020. Biological attributes and physiological indices of invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) infesting ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) plants in India. Crop Prot. 137: 1-10
7. Gupta, M. and M. Kaushal. 2017. Diseases infecting ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review. Agri. Rev. 38: 15-28.
8. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27: 265-277.
9. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693-695.
10. Ko, W. H., H. S. Chang, and H. J. Su. 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 72: 496-499.
11. Opina, N., F. Tavner, G. Hollway, J. F. Wang, T. H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. Hayward, V. Krishnapilla, W. F. Hong, B. 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 Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5: 19-30.
12. Prameela, T. and R. Bhai. 2020. Bacterial wilt of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) incited by *Ralstonia pseudosolanacearum* - A review based on pathogen diversity, diagnostics and management. J. Plant Path. 102; 709-719.
13. Stirling, G. R., U. Turaganivalu, A. M. Stirling, M. F. Lomavatu, and M. K. Smith. 2009. Rhizome rot of ginger (*Zingiber officinale*) caused by *Pythium myriotylum* in

- Fiji and Australia. Australas. Plant Pathol. 38: 453-460.
14. Thammakijjawat, P., N. Thaveechai, W. Kositratana, J. Chunwongse, R. Frederick, and N. Schaad. 2006. Detection of *Ralstonia solanacearum* in ginger rhizomes by real-time PCR. Can. J. Plant Pathol. 28: 391-400.
 15. Wang, P. H., C. Y. Chung, Y. S. Lin, and Y. Yeh. 2003. Use of polymerase chain reaction to detect the soft rot pathogen, *Pythium myriotylum*, in infected ginger rhizomes. Lett. Appl Microbiol. 36:116-120.
 16. White, T., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor, M. Innis, D. Gelfand, and J. Sninsky. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols pp. 315-320. Academic Press.
 17. Wu, Y. F., C. H. Lin, T. M. Chen, Y. F. Huang, S. H. Chen, J. F. Wang, and A. S. Cheng. 2010. Ecological survey of brown rot of potato in Dounan, Yunlin. Plant Pathol. Bull. 19:87. (in Chinese)

Research in Survey and Diagnosis of Ginger Rhizome Soft Rot and Bacterial Diseases in Taitung

Chih-Wei Wang¹ and Shu-Jen Tsai²

Abstract

Rhizome rot diseases of ginger are mainly caused by *Pythium myriotylum* (soft rot) and *Ralstonia solanacearum* (Bacterial wilt). Those two diseases are the major restriction factors for ginger cultivation. Huge economic losses when diseases outbreak. Ginger rhizome diseases can be diagnosed either by symptoms or molecular methods. We used two primer sets, Pmy5/ITS2 and 759f/760r, to detect pathogen DNA in diseased ginger rhizomes or isolated pathogens. We collected samples from 12 different ginger farms in Taitung between 2019 and 2020. After pathogen isolation and PCR detection, we concluded that 3 of them were infected by *P. myriotylum*, 5 farms were infected by *R. solanacearum*. There are evidences to show 3 out of the 12 farms infected by both pathogens, still another proposed to be infected by other pathogens.

Keywords: Soft rot disease, Bacterial wilt disease, Ginger

¹Assistant Researcher of Taitung DARES, COA.

²Associate Researcher and Chief of Taitung DARES, COA.