

作物環境 植物保護

唐菖蒲萎凋病菌之鑑定與偵測

陳昱初

唐菖蒲萎凋病菌由於缺乏鑑別檢測之方法，因此本菌在田間土壤之分佈資料尚付闕如。一般研究人員為有效偵測植物病原菌之初次感染源與探究其生態行為，多設法研製選擇性或半選擇性培養基，作為調查與偵測工具。Nash PCNB 及 Komada 選擇性培養基可分別有效分離土壤中的鐮孢菌(*Fusarium* spp.)及尖鐮孢菌種(*Fusarium oxysporum*)，但是對唐菖蒲萎凋病菌尖鐮孢菌之分化型(*F.oxysporum* f. sp. *gladioli*)則無專一性。以 Komada 培養基為基礎每公升分別加入 1 g 50%免賴得、1 g 40%腐絕、1 g 四氯異苯氰及 1 g 貝芬替之培養基，唐菖蒲萎凋病菌及百合萎凋病菌菌絲仍可生長，其中以在每公升含 1 g 50%免賴得之培養基上菌絲生長最快，且孢子發芽率最高，其它三種藥劑顯然對唐菖蒲及百合萎凋病菌孢子發芽有程度不等之抑制作用(表 1)。以 Komada 培養基為基礎每公升加入 1 g 50%免賴得可濕性粉劑後，於 50℃時以 10%磷酸調整酸鹼值為 pH4.0 測試供試菌株孢子之發芽及菌絲生長，結果唐菖蒲萎凋病菌菌株之大孢子(macroconidia)，小孢子(microconidia)及厚膜孢子(chlamydospores)發芽生長正常，而其它供試菌株之孢子經培養七天後仍無發芽(表 1)(圖 1、2)，顯然每公升加入 1 公克之免賴得藥劑可抑制大部份尖鐮孢菌菌株孢子的發芽。但是 pH 4.0 之培養基並不能抑制百合萎凋病菌菌絲的生長，但其菌落生長速度明顯與唐菖蒲萎凋病菌不同容易區別。如果把培養基之酸鹼值調整至 pH 2.0 時，唐菖蒲萎凋病菌之菌絲仍然能緩慢生長，但百合萎凋病菌則停止生長(圖 2)。唐菖蒲萎凋病菌以厚膜孢子及病株殘體存活於土壤及種球，如以厚膜孢子製成人工病土置放於溫室經 30 天後，以 pH 4.0 之選擇性培養基分離病土中的病原菌繁殖體，其回收率可達 96%，最低可偵測出 50 個繁殖體/每公克土壤(圖 3)，但是以此選擇性培養基實際應用於分離種植唐菖蒲的田間土壤，則不容易偵測到病原菌，究其原因可能是花農嚴格執行種球之浸藥消毒，田間一旦發現病害時就避免連作，以輪作方式降低土壤中病原菌密度，這也說明了近年來臺灣唐菖蒲種植區萎凋病很少發生的原因，田間病原菌密度如低於每克土壤含 50 個繁殖體時，選擇性培養基則失去其功效，但仍可利用病原菌增殖法偵

測出病原菌之存在。而 pH 2.0 之培養基應用在病組織分離時，能於三天內偵測到唐菖蒲種球罹病部位是否由該病原菌引起，可快速有效提供進口種球之檢驗。本研究所研發之選擇性培養基對供試菌株雖具專一性，但是尚有許多尖鏟孢菌分化型尚需作進一步測試。

本試驗研製選擇性培養基之過程中，發現 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* 及 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* 在 pH 4.0 之選擇性培養基上均可生長，需降低培養基 pH 值至 2.0，才可區分二者，因此擬利用核酸增幅技術，選取專一性核酸引子，以區分百合及唐菖蒲萎凋病菌，並準確的偵測 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*。由於核酸增幅技術成熟，許多學者以此技術應用於微生物之分類鑑定及偵測，現今常用於微生物之分類鑑定之核酸增幅技術有 RAPD、RFLP、ITS 序列或 IGS 序列之比對等。本試驗初步以唐菖蒲標準病原性菌株、百合病原性菌株以及非病原性菌株，進行 RAPD 隨機核酸引子篩選出編號 OPAW-06 (5'-TTTGGGCCCC-3')核酸引子在反應後，於 890bp 位置得到一特殊去氧核糖核酸片段，將其成功選殖到 TA 載體上，經由解序得到此專一性去氧核糖核酸片段之核酸序列，並選出核酸引子 FOG-W6L-001F 與 FOG-W6L-006R，利用供試菌株菌絲萃取去氧核糖核酸，經 PCR 增幅及電泳分析結果顯示唐菖蒲萎凋病菌皆會在 721bps 位置產生專一性之去氧核糖核酸片段，其他菌株則無(圖 4)。利用專一性核酸引子與 PCR 增幅去氧核糖核酸來偵測唐菖蒲萎凋病菌，具有專一性、靈敏度高且比較不易受到核酸聚合酶(DNA polymerase)之品質或廠牌之影響，試驗結果之再現性高等優點。惟罹病唐菖蒲植體、種球及土壤帶菌之偵測部分，本試驗尚未有足夠之採樣測試數據，日後研究應可大量採樣，利用專一性核酸引子與 PCR 增幅技術詳細深入探討。

綜上述研究結果，本試驗之選擇性培養基能偵測 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*；合成之專一性核酸引子能有效增幅專一性去氧核糖核酸片段，精確鑑別 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*。結合選擇性培養基及專一性的核酸引子兩項工具，可偵測鑑定唐菖蒲種球及萎凋病發生田區土壤是否帶有 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*，提供研究人員應用於探討病原菌之初次感染源與生態之研究。

表 1.不同化學藥劑對唐菖蒲及百合萎凋病菌菌絲生長與孢子發芽之影響

Fungicide ¹	Conc. (ppm)	Colony diam. ² (mm)		Spore germination rate (%) ³	
		FOG051	F016	FOG051	F016
Prochloraz	1000	0.0d ⁴	0.0d	0d5	0d
Prochlorate manganese	1000	0.0d	0.0d	0d	0d
Benomyl	1000	38.9b	17.6b	97b	21c
Mertect	1000	38.1b	14.0b	88b	88b
Mancozeb	1000	0.0d	0.0d	0d	0d
Carbendazim	1000	13.9c	8.1c	38c	18c
Chlorothalonil	1000	14.7c	5.9c	31c	11c
Iprodione	1000	0.0d	0.0d	0d	0d
CK	0	56.8a	44.8a	97a	100a

¹ Each of fungicides was added into Komada media respectively.

² Colony size of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG051) and *F. oxysporum* f. sp. *lilii* (F016) at 28°C for 7 days.

³ Spore germination rate of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG051) and *F. oxysporum* f. sp. *lilii* (F016) at 28°C for 7 days.

⁴ Means (n=4) in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

表 2.利用選擇性培養基偵測混菌土壤中唐菖蒲萎凋病原菌

Propagules density ^a (propagules / g soil)	Colony number(No./7days) ^b			
	Sterilized soil		Unsterilized soil	
	Selective medium	Nash PCNB medium	Selective medium	Nash PCNB medium
1×10^2	2 ^c	4	0	— ^d
1×10^3	11	11	3	2
1×10^4	24	37	4	3

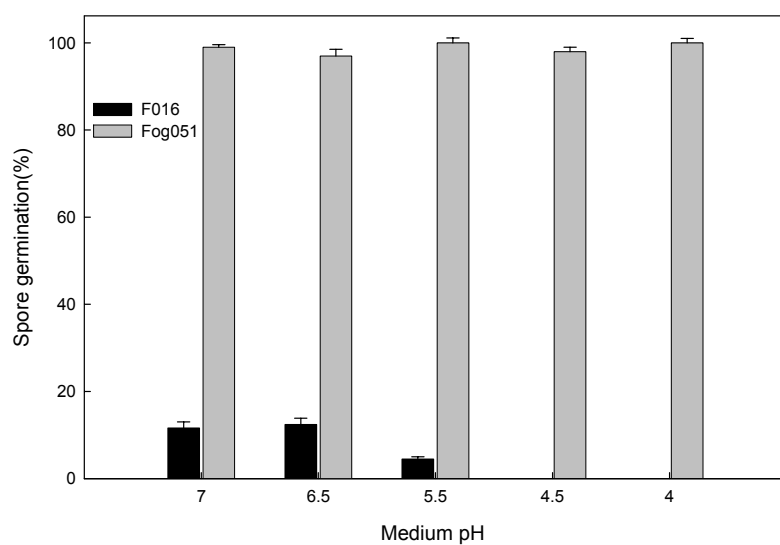
^a Each of infested soil was diluted with sterilized soil and unsterilized soil into 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 propagules /g soil inoculate density respectively

^b After 10 g infested soil added into 90 ml 0.1% agar broth 10 times dilution twice, a 0.8 ml of soil dilution suspension was smeared on each plate.

^c Means (n=4) of total *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* colony number on plate

^d Colonies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG051) could not be detected

圖 1. 選擇性培養基酸鹼值對唐菖蒲及百合萎凋病菌孢子發芽之影響。



FOG051：唐菖蒲萎凋病菌株；F016：百合萎凋病菌株。



圖 2. 唐菖蒲及百合萎凋病菌在不同酸鹼值選擇性培養基上之生長

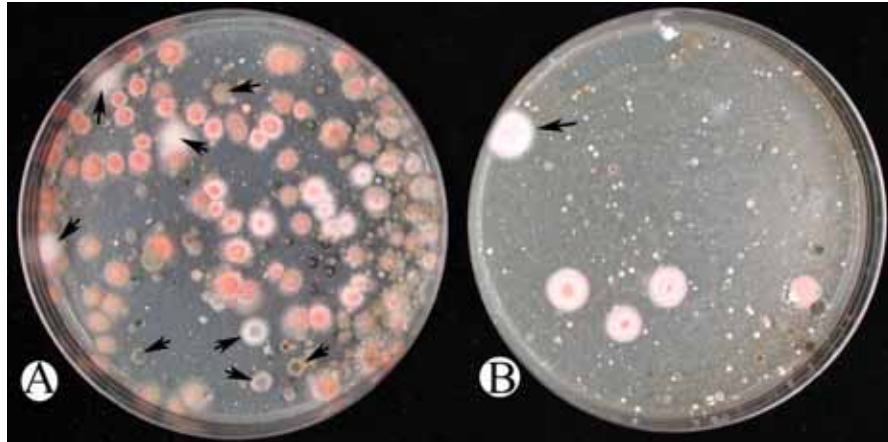


圖 3.選擇性培養基分離人工製作病土中之唐菖蒲萎凋病菌(A)每克土壤加入 1×10^3 繁殖體後所分離到的菌落(B)每克土壤加入 5×10^1 繁殖體後所分離到的菌落。黑色箭頭標示非唐菖蒲萎凋病菌落。

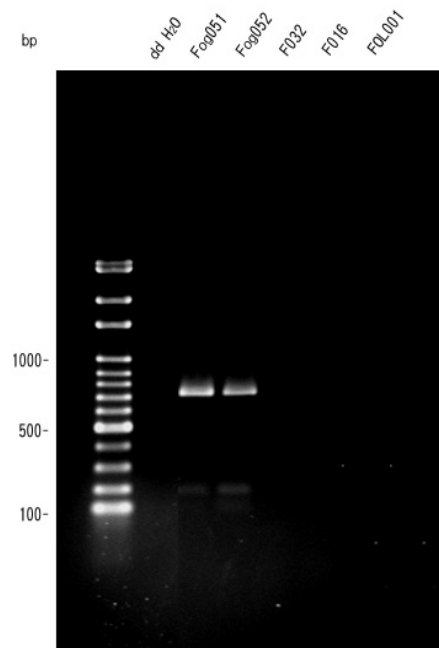


圖 4.專一性核酸引子 FOG-W6L-001F/FOG-W6L-006R 與唐菖蒲萎凋病菌 FOG051、FOG052 菌株之總量去氧核糖核酸進行 PCR 反應在 721 bps 產生之增幅產物。