

臺灣胡瓜萎凋病菌生理分化型之驗證¹

王照仁^{2*}、黃明進³、陳任芳⁴、鍾文鑫³、林益昇³

摘 要

危害胡瓜的尖鐮胞菌(*Fusarium oxysporum*)有兩個生理分化型，分別是引起萎凋病的 *F. oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* (*Foc*)和引起根腐與莖腐病的 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-Cucumerinum* (*Forc*)。為鑑定臺灣胡瓜萎凋病菌屬於哪一種分化型，本研究比較臺灣產胡瓜萎凋病菌菌株與 *Foc* 標準菌株(ATCC16416)於病徵、寄主範圍及最適發病溫度之差異性。結果顯示利用土壤混菌法接種胡瓜苗，除 ATCC16416，其餘臺灣產菌株均會造成根腐與莖腐的病徵。在寄主範圍測試結果指出，菌株 *Foc*151 可感染胡瓜、洋香瓜、香瓜及西瓜，但 ATCC16416 與 *Foc*100 只能感染前三者，不會感染西瓜。而最適發病溫度試驗結果顯示，菌株 *Foc*100 與 *Foc*829 在 17 和 28°C 條件下均會使胡瓜發病，其餘臺灣產供試菌株與 ATCC16416 均在 28°C 為最適發病溫度。利用 12 個 *Foc* 與 *Forc* 之 VCG 標準菌株來鑑定臺灣產胡瓜萎凋病菌之營養菌絲親合群(vegetative compatibility group, VCG)，證實只有 1 個菌株(*Foc*100)是屬於 *Foc* 中 VCG 0180 的一群。另透過 RAPD 法鑑定，顯示臺灣產胡瓜萎凋病菌株(*Foc*100、*Foc*106、*Foc*151 及 *Foc*183)與 ATCC16416 較為接近。此外利用國外所發表對 *Forc* 專一性引子對(*Forc*F1, *Forc*R2)進行鑑定，結果僅有 *Forc* 的 VCG 標準菌株被增幅出 277 bp DNA 條帶，然臺灣產菌株、ATCC16416 及 *Foc* 之 VCG 標準菌株皆不會被增幅出專一條帶。綜合上述測試結果，將臺灣產胡瓜萎凋病菌鑑定為 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*。

關鍵詞：胡瓜萎凋病、鑑定、營養菌絲親合群、專一性引子對

前 言

胡瓜萎凋病於 1898 年美國俄亥俄州首次被發現，而於 1925 年被證實是由鐮胞菌 *Fusarium* sp. 所引起，之後在世界各地胡瓜栽培區陸續有本病危害的報導⁽¹⁹⁾。本病原於 1955 年在佛羅里達州引起胡瓜嚴重的損失⁽¹²⁾，並於 1956 年證明是由尖鐮胞菌(*F. oxysporum* Synd. & Hans.)新的生理分化型所引起，命名為 *F. oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* (*Foc*) Owen，與感染西瓜及香瓜的尖鐮胞菌的生理

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0964 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。*通訊作者 chaowang@tdais.gov.tw

³ 國立中興大學植物病理學系研究助理、教授、榮譽教授。

⁴ 行政院農業委員會花蓮區農業改良場退休人員。

分化型有所區別⁽¹³⁾。本病害為一嚴重的維管束病害，可危害胡瓜的各生長期，引起幼苗猝倒；於成株則引起葉片黃化萎凋，在根部與莖部的維管束組織有褐化現象，後期導致全株死亡；此外常引起罹病株之根系發育不良，支根少，但未有腐爛病徵^(4,7,12)，另被感染後之胡瓜植株可延伸至 6~8 個莖節⁽¹²⁾。然 Vakalounakis 氏⁽¹⁸⁾在調查溫室胡瓜萎凋病害時，除觀察到罹病胡瓜維管束褐化與萎凋病徵外，亦觀察到罹病植株產生根腐與莖腐(root and stem rot)的病徵，故將引起此種病徵之病原命名為 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc)Vakalounakis。前人研究指出，除病徵外，區別 *Foc* 與 *Forc* 還包括寄主範圍與最適發病溫度之差異；以剪根接種 *Foc* 可引起胡瓜與洋香瓜幼苗之發病率分別達 38~100%與 65~100%，具強毒性，此外亦可感染西瓜幼苗引起 6~33%的發病率^(12,22)；而 *Forc* 則對胡瓜以外之洋香瓜、西瓜及絲瓜等幼苗具致病性，發病率約介於 50~75%之間⁽¹⁵⁾。於最適發病溫度方面，*Foc* 之最適溫度為 29°C，*Forc* 之最適溫為 17°C⁽¹⁸⁾。然以病徵、寄主範圍及最適發病溫度區分由 *F. oxysporum* 所引起萎凋病的生理分化型，仍十分不完整。利用營養體親和性試驗(vegetative compatibility tests)與隨機增幅多形性 DNA (random amplification of polymorphic DNA, RAPD)可用來區別萎凋病菌 *F. oxysporum* 之不同生理分化型^(15,20)。Katan 與 Primo 兩氏⁽⁶⁾曾報告 *Foc* 與 *Forc* 分屬於不同的營養體親和群(vegetative compatibility group, VCG)，其中 *Foc* 包含 VCG 0180、0181、0182 及 0183 四個群，而 *Forc* 則是 VCG 0260 與 0261 兩群。另 Vakalounakis 與 Fragkiadakis 兩氏⁽¹⁹⁾指出，*Foc* 與 *Forc* 之 RAPD 結果證實兩者屬於不同的親源分支。近來 Lievens 氏等人⁽⁹⁾更設計專一性引子對，提高了區別 *Foc* 與 *Forc* 靈敏度。

在臺灣田間，由 *F. oxysporum* 所引起的胡瓜萎凋病相當嚴重，已成為田間栽種胡瓜之主要限制因子，然針對病原菌相關研究，僅 Lin 與 Chang 氏於 1980 年的研究，將病原菌初步鑑定為 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*⁽⁷⁾，爾後未有其他進一步的相關研究報告。近來筆者於田間調查胡瓜病害時，觀察到受萎凋病菌感染的胡瓜幼苗在一星期內即產生猝倒病徵，且根部與莖基部維管束有褐變現象；而成株受到感染後，則出現半側黃化萎凋，維管束褐變，最後整株萎凋死亡的典型病徵。此外，田間罹病株除了萎凋病徵外，亦出現莖腐與根腐的病徵，與 Vakalounakis 氏⁽¹⁸⁾所描述由 *Forc* 所造成的胡瓜根腐與莖腐病徵類似。為釐清引起臺灣胡瓜萎凋病之病原種類，本研究目的依據前人鑑定 *Foc* 與 *Froc* 之方法，即透過接種後的病徵、寄主範圍、最適發病溫度、VCG、RAPD 及胡瓜萎凋病專一性引子對等方式，確定臺灣產胡瓜萎凋病菌之分化型。

材料與方法

一、供試菌株來源與培養條件

自田間採集胡瓜萎凋病罹病植株組織，經表面消毒並以無菌水進行漂洗，再去除多餘水分後，置於 1.5%水瓊脂(water agar, WA)培養基及五氯硝苯蛋白腴瓊脂(pentachloronitrobenzene peptone agar, PCNB)培養基進行組織分離。經單孢分離培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar, PDA)斜面培養基上，生長 14 天後刮取其分生孢子，製備孢子懸浮液供病原性檢定之用。本研究所使用

之 7 株胡瓜萎凋病菌供試菌株，是由南投(Foc100、Foc143、Foc151、及 Foc917)、嘉義(Foc105、Foc183、Foc829)及屏東(Foc106)等地區的罹病植株中分離得到；此外，本研究亦使用絲瓜萎凋病菌菌株 Fol-529 與香瓜蔓割病菌菌株 Fom-05 作為對照分析用(表一)。經剪根接種與溫室混菌土接種試驗後，確定皆有病原性且都會產生與田間相同萎凋病徵。加上購自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)之 *Foc* 標準菌株(ATCC 16416)，以及 *Foc* 和 *Forc* 的營養體配對群標準菌株(VCG testers)為本研究主要供試菌株(表二)。各菌株另培養於 PDA 平板，5 天後切取其菌絲尖端(直徑約 0.5 cm)的菌絲塊，隨後置於含有砂管瓊脂培養基(含 1% Water agar 與 10%砂土)的螺旋試管(長 12 cm，直徑 1.5 cm)內以進行保存。

表一、本研究之供試尖鏹胞菌菌株來源

Table 1. Sources of isolates of *Fusarium oxysporum* in this study

Isolate	Host	Symptom ¹	Location	Isolation date
Foc-100	Cucumber	RSR	Pu Li/Nan Tou	1998
Foc-151	Cucumber	RSR	Pu Li/Nan Tou	2003/7
Foc-183	Cucumber	RSR	Jhong Pu/ Jia Yi	2005/3
Foc-829	Cucumber	RSR	Wu Feng/Taichung	2005/9
Foc-143	Cucumber	W	Jhong Pu/Jia Yi	2003/5
Foc-917	Cucumber	W	Yu Chi/Nan Tou	2004/10
Foc-105	Cucumber	— ²	Zhu Qi/Jia Yi	1997/12
Foc-106	Cucumber	—	Li Gang/Bing Dong	1997/12
ATCC 16416 ³	Cucumber	—	Florida	—
Fol-529	Loofah	—	Pu Li/Nan Tou	2005
Fom-5	Melon	—	Taichung/Da Li	2005

¹ RSR = Root and stem rot of field diseased cucumber plants; W = Wilt of field diseased cucumber plants.

² No data.

³ It was from American Type Culture Collection (ATCC).

二、菌株之病原性和寄主範圍測定

(一)、供試植物的培養

供試植物的種子，包括購自農友種苗公司的胡瓜〔*Cucumis sativus*，萬吉(Vantage)〕、洋香瓜〔*C. melo* subsp. *melo* ‘Cantalupensis group’，秋香(Autumn Favor)〕、香瓜〔*C. melo* subsp. *melo* ‘Conomom group’，銀輝(Silver Light)〕與西瓜〔*Citrullus lanatus*，富寶二號(Empire No.2)〕和中興大學植病系土壤傳播性作物病害研究室保存的「水蛙窟白(‘Whiteloofah-SWK’)」絲瓜(*Luffa cylindrica*)種子，以流水催芽 12~24 hrs (依作物種類而有所差別)，待胚根長出後，將其移植於盛有泥炭土(peat moss, TKS 2 Istant)和珍珠石(perlite)混合物(3:1, v/v)的穴盤(50 或 60 格，每格直徑 5 cm，深 5 cm)中育苗，待幼苗長出 1~2 片真葉後備用。

表二、購自 ATCC 的胡瓜萎凋病菌之營養體配對群標準菌株

Table 2. Vegetative compatibility group testers of the *Fusarium* wilt pathogen on cucumber obtained from ATCC

VCG tester	ATCC number	Phenotype ¹	Description ²	Isolation ³
0260	204369	Nit M	<i>Forc</i>	AFu-14A/4
	204370	Nit M	<i>Forc</i>	AFu-15B/2
0261	204371	Nit M	<i>Forc</i>	AFu-4C/8
	204372	<i>nit 1</i>	<i>Forc</i>	AFu-4C/9
0180	204373	Nit M	<i>Foc</i>	FOCU-56L/12
	204374	Nit M	<i>Foc</i>	FOCU-57N/18
0181	204375	Nit M	<i>Foc</i>	NETH 10782A/2
	204376	Nit M	<i>Foc</i>	NETH 10782A/5
0182	204377	Nit M	<i>Foc</i>	ATCC 36332B/1
	204378	<i>nit 1</i>	<i>Foc</i>	ATCC 36332B/2
0183	204379	Nit M	<i>Foc</i>	FOC-1A/1
	204380	Nit M	<i>Foc</i>	FOC-1A/4

¹ The three phenotypic classes recovered from *F. oxysporum* presumably reflect mutations in a nitrate structural locus (*nit 1*), a nitrate-assimilation pathway-specific regulatory locus (*nit 3*), and one of five loci that affect the assembly of a molybdenum-containing cofactor necessary for nitrate reductase activity (Nit M)(compiled from Garrett and Amy (1978) and Marzluf (1981) on the basis of analysis of mutants from *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*).

² *Forc* = *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*; *Foc* = *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

³ The parental isolates of VCG testers of the *Fusarium* wilt pathogen on cucumber.

(二)、接種方式

供試植株以流水去除殘留於根上之栽培介質去除乾淨後，將培養於 PDA 斜面 2~3 週的供試菌株(*Foc*100、*Foc*151 及 ATCC16416)，以無菌水洗下孢子並用雙層 microcloth 過濾，稀釋配製成孢子懸浮液($1.0\sim 5.0\times 10^5$ spores/ml)，將供試植株浸泡於孢子懸浮液中，同時剪斷根部 1/3~1/2 的長度，持續浸泡中 20~30 mins，完成接種動作。接種完畢的植株移植於 13 cm 的栽培盆中，盆內僅含有珍珠石(perlite)，每處理 2 重複，每重複 4 株，定期觀察病勢發展並記錄其發病度，調查後再從接種之植株分離萎凋病原菌。胡瓜發病分級如下：主要將植物發病等級區分為五級，0 級 = 無任何病徵；1 級 = 胡瓜出現矮化及第一片子葉黃化及維管束出現褐化；2 級 = 胡瓜半數葉片以下出現萎凋黃化的情形；3 級 = 胡瓜半數葉片以上出現萎凋黃化的情形；4 級 = 植株全株乾枯死亡。然後按照下列公式換算植株的罹病度(disease severity)：

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4}{N \times 4} \times 100$$

$n_0 \sim n_4$ = 各級罹病的株數；N = 總植株數

三、溫度對胡瓜萎凋病病勢發展之影響

供試菌株經單孢培養於 PDA 斜面 2 至 3 週後，加入 9 ml 無菌水洗下孢子，連續 2 次，直接加入經高溫高壓滅菌(121°C, 1.2 Kg/cm², 20 min)的去殼燕麥粒砂土培養基(燕麥粒：砂土：水=100：100：20, w/w/v)中(Scher & Baker, 1982)。於室溫(25~28°C)下培養，12 hrs 光照，每週將燕麥砂土培養基均勻搖晃，使內部菌絲均勻生長，2 週後加入相同體積的田土(20 mesh, 0.840 mm 網篩過濾後滅菌)，並加入 10~20 ml 無菌水將其潤濕，再次培養 1 週後，取出陰乾，1 週後以粉碎機(RT-04, 榮聰精密科技, 臺灣)磨碎完畢便可進行菌量測試(秤取 1 g 的土壤樣品，加入無菌水補足至 10 ml，均勻震盪後，依序進行 10 倍系列稀釋。取各濃度稀釋液 1 ml 均勻平展於五氯硝苯蛋白胰瓊脂培養基平板上，5~7 天後依菌落出現的數目，推算每克土壤中的病原菌含量。)作為試驗的人工混菌土接種源，並依試驗所需濃度與溫室無胡瓜萎凋病菌之自然土混合均勻，配製成濃度為 1.0-5.0×10³(propagules/g soil)之供試人工混菌土壤備用。將上述供試植株移至人工混菌土壤以完成接種，每處理 4 盆，每盆 3 株。隨後分別置於 17 及 28°C 植物生長箱中，逐週觀察並記錄其發病度。

四、營養菌絲親和群(VCG)之測定

本試驗參照 Correll 氏等人於 1987 年⁽³⁾的研究，並加以修改進行之。硝酸的營養缺陷株之產生(generation of nitrate nonutilizing mutants)：將 Foc100、Foc143、Foc151、Foc829、Foc917 及 ATCC16416 等供試菌株單孢培養在完全培養基(complete medium, CM)上，經 5-7 天後，以打孔器切下菌絲塊(直徑 7 mm)移植於含氯酸(chlorate)之馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar with chlorate, PDC)或含氯酸之最小瓊脂(minimal agar with chlorate, MMC)培養基上。所有供試菌株培養在上述條件下，篩選能快速生長的扇形菌絲部份(sectors)，再將其移植於最小瓊脂培養基(minimal agar, MM)與 CM 培養基上。所得到之菌株在 MM 上，菌落稀疏且無氣生菌絲，即視為硝酸的營養缺陷株(*nit* mutants)，而其在 CM 培養基上可恢復成野生型態，即菌落緻密且有氣生菌絲。

硝酸的營養缺陷株之表現型測定(*Nit* mutant phenotypes)：根據 Correll 氏等人⁽³⁾所報告的方法，將供試營養缺陷株培養在 MM 培養基上，經 5~7 天後，以打孔器切下其菌絲塊(直徑 7mm)移植於含有五種不同氮素源的基本培養基(basal medium, BM)上，包含(1)硝酸培養基(nitrate medium = MM)、(2)亞硝酸培養基(nitrite medium = BM plus 0.5 g/L NaNO₂)、(3)次黃嘌呤培養基(hypoxanthine medium = BM plus 0.2 g/L hypoxanthine)、(4)銨培養基(ammonium medium = BM plus 1 g/L ammonium tartrate)和(5)尿酸培養基(uric acid = BM plus 0.2 g/L uric acid)。培養條件同上述，並以野生型菌株作對照，於 4 天後觀察並記錄菌落型態。根據 Garrett 和 Amy⁽⁵⁾及 Marzluf⁽¹¹⁾等學者報告，利用來自 *Aspergillus nidulans* 與 *Neurospora crassa* 之硝酸營養缺陷株在上述五種培養基上的生長情形，可分成五個表現型。但若換成 *F. oxysporum* 後，只能測出三型即 *nit 1*、*nit 3*、Nit M。表現型 *nit 1* 除在硝酸培養基上生長形態與缺陷株一樣，在其他四種培養基上菌落型態均呈野生型；表現型 *nit 3* 在硝酸培養基與亞硝酸培養基上生長與缺陷株一樣，在其他三種培養基上菌落型態均呈野生型；表現型 Nit M 硝

酸培養基與次黃嘌呤培養基上生長形態與缺陷株一樣，在其他三種培養基上菌落型態均呈野生型。

親和性試驗(Compatibility tests)：將供試營養缺陷株(*nit* mutants)的菌絲塊與 *Forc* 配對群標準菌株 ATCC 204369、ATCC 204370、ATCC 204371 及 ATCC 204372 以及 *Foc* 配對群標準菌株 ATCC 204373、ATCC 204374、ATCC 204375、ATCC 204376、ATCC 204377、ATCC 204378、ATCC 204379 及 ATCC 204380 共 12 株(兩菌株為一群，分別屬於 VCG 0260、VCG 0261、VCG 0180、VCG 0181、VCG 0182 及 VCG 0183)的菌絲塊以所有可能的配對方式對峙培養(距離 1~3 cm)在 MM 培養基上，在上述條件下培養 7~14 天後，檢視並記錄其配對情形。將配對菌株於菌絲接觸處會形成濃密的氣生菌絲者，視為配對成功。藉此鑑定出各供試菌株之營養體親合群。

五、逢機增幅多形性 DNA 分析

將已培養於 PDA 斜面 2 週後的供試菌株，參照 Saitoh 等人於 2006 年的方式⁽¹⁷⁾抽取其 DNA 並調整最終濃度在 50 ng/μl。依 Punja 與 Parker⁽¹⁵⁾所使用的引子序列(UBC 438、UBC 489 及 UBC 890)進行 RAPD 的反應物，每一樣本參與反應的總體積為 25 μl，包含 50 ng 模版 DNA、100 μM 的去氧核糖核苷三磷酸鹽(dNTPs; GeneMark Technology Co., Ltd., Tainan, Taiwan)、含 1 倍反應緩衝液 [10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 0.1 % (w/v) gelatin; 1.75 mM MgCl₂; 0.1 % Triton X-100; GeneMark Technology Co., Ltd., Taiwan、0.4 μM 的引子及 1 單位(unit, U)的 Gen *Taq* DNA 聚合酵素 (GeneMark Technology Co., Ltd., Taiwan)。於核酸增幅反應系統(PTC-200, MJ research, Inc., Watertown, MA, USA)中進行 DNA 增幅，其增幅條件為：95°C、60 sec；95°C、30 sec；35°C、30 sec；72°C、90 sec，共 35 個循環；72°C、10 min。完畢後取出反應產物進行瓊脂(agarose)電泳分析。

六、專一性引子對(ForcF1/ForcR2)偵測臺灣產胡瓜萎凋病菌

將前述不同來源地之供試菌株(Foc100、Foc106、Foc151、Foc183 及 Foc829)依上述方法抽取其 DNA 並調整最終濃度在 50 ng/μl。並利用 PCR Master Mix Kit (Genemark Technology Co., Ltd, Taiwan)進行 PCR 反應。反應液組成包括 0.2μM 專一性引子對、200 μM dNTP、1.25 U *Taq* DNA polymerase、1.75mM MgCl₂、反應緩衝液與 1μl 的 DNA，最後補去離子水至總體積為 25μl。利用 Programmable Heat Block (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation)進行 PCR 反應，其反應條件如下：94°C、2 min；94°C、45 sec，65°C、45 sec，72°C、45 sec，共 30 個循環；72°C、10 min，完畢後取出反應產物進行瓊脂(agarose)電泳分析。

研究結果

一、寄主範圍

供試葫蘆科作物(胡瓜、絲瓜、西瓜、香瓜及洋香瓜)以剪根接種法分別處理 Foc100、Foc151 及 ATCC16416(濃度為 1.0-5.0×10⁵ spores/ml)，接種後置於溫室觀察其病勢發展。結果顯示供試菌株 Foc151 除可感染胡瓜、洋香瓜、香瓜以外，也會感染西瓜，接種 28 天後，其發病度介於 16-100%

之間。而 Foc100 與 ATCC16416 菌株皆僅能感染胡瓜、洋香瓜及香瓜，接種 28 天後，其發病度介於 9~96% 之間，而對西瓜則不具病原性。所有供試菌株對絲瓜皆不具病原性(表三)。

表三、Foc 標準菌株(ATCC 16416)與臺灣產胡瓜萎凋病菌之寄主範圍

Table 3. Host range of isolate ATCC 16416 and the Fusarium wilt pathogen of cucumber collected from Taiwan

Isolate	Disease severity (%)				
	Cucumber	Muskmelon	Melon	Watermelon	Loofah
Foc-100	96	57	62	0	0
Foc-151	100	16	34	72	0
ATCC 16416	38	9	13	0	0

¹ Eight plants of each treatment were recorded on a scale of 0~4; where 0=Health, 1=< 1/2 cotyledon and first leaf with yellowing symptom, 2= stunting, or> 1/2 leaves with yellowing symptom, 3=stem yellowing, vascular discoloration, and <1/2 leaves with wilt symptom, and 4=Plant wilt and dead. Data was recorded 28 days after inoculation.

二、溫度對胡瓜萎凋病病勢發展之影響

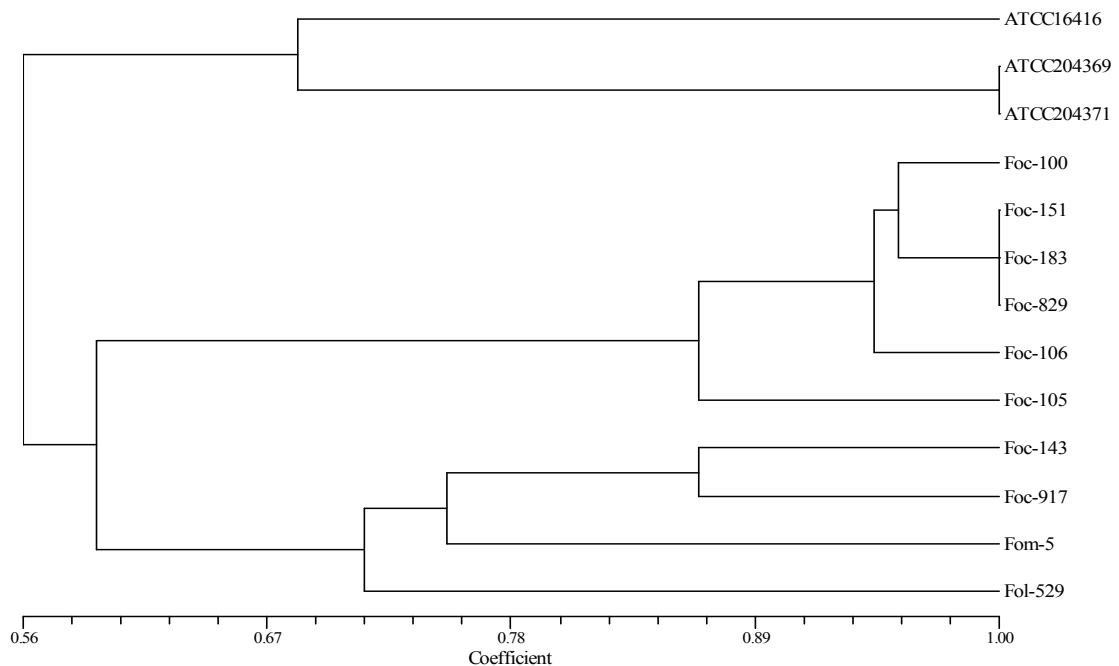
將長至 2~3 片真葉的胡瓜「萬吉」移植於盛有供試菌株 Foc100、Foc143、Foc151、Foc829、Foc917 或 ATCC16416 之混菌土(濃度為 $1.0\sim 5.0\times 10^3$ propagules/g soil)中，分別置於 17 與 28°C 之植物生長箱中，21 天後，接種植株開始發病，隨天數增加其發病度愈趨嚴重。於接種後 42 天，17°C 處理下，除接種 Foc100 與 Foc829 之植株，其發病度分別為 88.9 與 45.8% 之外，其餘菌株之發病度為 0 或低於 20%。而在 28°C 處理下，接種所有臺灣產供試菌株之植株均會發病，其發病度介於 38.9~100%。而接種 ATCC16416 之植株在 28°C 處理下，其發病度為 89.6%，但在 17°C 處理下其發病度僅有 6.3% (表四)。

三、營養體親和性試驗

每一供試菌株至少篩選出 20 株營養缺陷株，其表現型(Nit mutant phenotypes)最多含有 3 型(nit 1、nit 3 及 Nit M)，一般至少有 2 型(nit1 與 nit3)。每一供試菌株挑選 2-3 株不同表現型的菌株與營養菌絲配對群標準菌株(VCG testers)(VCG 0260、0261、0180、0181、0182 及 0183)在 MM 培養基上進行對峙培養。營養體親合的缺陷株，會產生異核現象(heterokaryon)，在 MM 培養基中央形成濃密的氣生菌絲。目前已測試的臺灣產菌株有 Foc100、Foc143、Foc151、Foc829、Foc917 及 ATCC16416。缺陷株 100M16 屬於 VCG 0180；缺陷株 100P01、143P14、143M11、151M13、151P15、829M02、829M07 及 829P04 屬於 VCG 018-(各營養缺陷株與所有供試 VCG testers 均不親和，但其彼此間會親和)⁽¹⁴⁾；缺陷株 917P12、917M01、16416P04、16416P06 及 16416M05 屬於 VCG 018-HSI(各營養缺陷株與所有供試 VCG testers 均不親和，且其彼此間亦不親和)⁽¹⁴⁾(表五)。

四、隨機增幅多形性 DNA 分析

本研究選出 3 個能展現分化型變異性的引子分別為 UBC 438、UBC 489 及 UBC 890，對 13 株 *Fusarium oxysporum* 菌株所增幅的 DNA 片段大小分別在 300 至 3,000 bp 之間。結合 UBC 438 增幅的 RAPD 指紋(300~1,000 bp 間之 DNA 片段)、UBC 489 增幅的 RAPD 指紋(500~3,000 bp 間之 DNA 片段)以及 UBC 890 增幅的 RAPD 指紋(400~1,000 bp 間之 DNA 片段)，以 Jaccard's similarity coefficient 計算菌株之間的相似度，依 UPGMA 程序建構樹狀圖。以絲瓜萎凋病菌 Fol-529 與香瓜萎凋病菌 Fom-5 為外群，則臺灣產胡瓜萎凋病菌約可分成兩群：Foc-143 與 Foc-917 為一群，Foc-151、Fco-183、Foc-829、Fco-100、Foc-106 及 Foc-105 為另一群，兩群相似度分別都在 86% 以上，其中 Foc-151、Fco-183 及 Foc-829 三株菌株之相似度為 100%。另外，ATCC 204369 與 ATCC 204371(*Foc* 的營養體配對群標準菌株)之相似度亦為 100%，兩菌株與 ATCC 16416(*Foc* 標準菌株)之相似度為 69%。而 ATCC 204369、ATCC 204371 及 ATCC 16416 與臺灣產胡瓜萎凋病菌菌株之相似度在 56% 以上(圖一)。



圖一、由引子 UBC438、UBC489 與 UBC890 個隨機引子對胡瓜萎凋病菌菌株所增幅的 RAPD 指紋，由 Jaccard's similarity coefficient 算出菌株之間的相似度，依 UPGMA 程序建構樹狀圖。

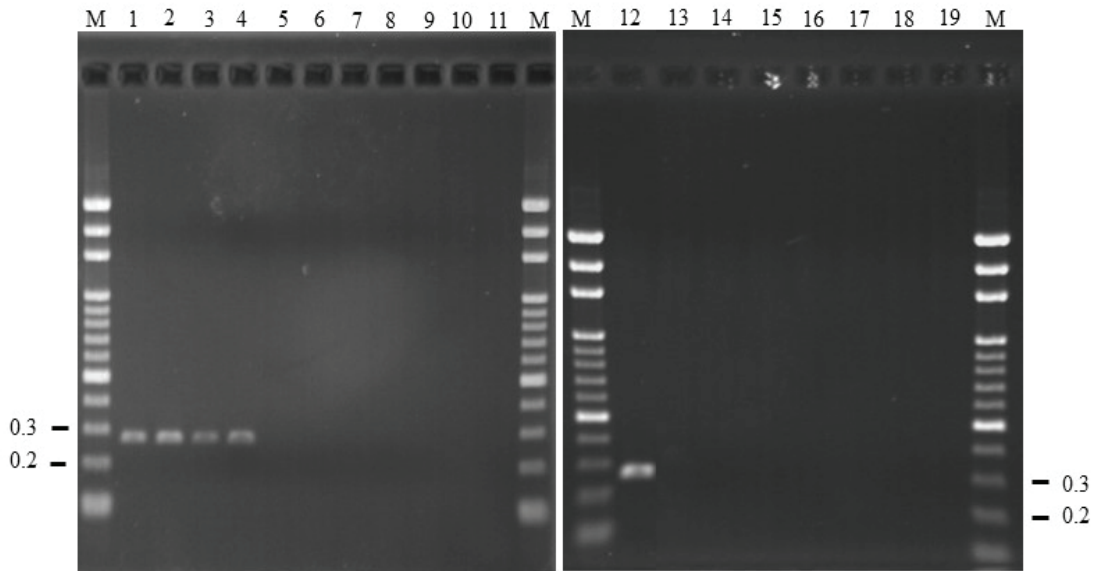
Fig. 1. UPGMA dendrogram of RAPD similarities among isolates of the *Fusarium* wilt pathogen on cucumber based on similarity index, primer UBC438, UBC489 and UBC890.

五、專一性引子對(ForcF1&ForcR2)偵測臺灣產胡瓜萎凋病菌

以 ForcF1&ForcR2 進行偵測臺灣產胡瓜萎凋病菌菌株(Foc100、Foc106、Foc151、Foc183 及 Foc829)，*Foc* 標準菌株 ATCC16416，和 VCG 標準菌株(*Forc* : ATCC204369、ATCC 204370、ATCC 204371 及 ATCC 204372；*Foc* : ATCC204373、ATCC 204374、ATCC 204375、ATCC 204376、ATCC 204377、ATCC 204378 及 ATCC 204379)。結果顯示僅在 ATCC204369、ATCC 204370、ATCC 204371 及 ATCC 204372 等四株菌株會出現大小為 277 bp 的專一條帶(圖二)且大小與國外報導相符，而臺灣產菌株、ATCC16416 及 *Foc* 的 VCG 標準菌株皆不會被增幅出條帶(圖二)。

檢討與建議

國外學者報告危害胡瓜的尖鏟胞菌有兩個生理分化型，分別是 Owen⁽¹³⁾描述引起萎凋病的 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*(*Foc*)和 Vakalounakis⁽¹⁸⁾描述引起根與莖腐病的 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*)。根據 1980 年 Lin 和 Chang 兩氏的報告指出⁽⁷⁾，*Foc* 未見有菌核出現，孢叢亦少；在 1955 及 1956 年 Owen 氏報告中亦指出同樣的結果^(12, 13)。而 1996 年希臘 Vakalounakis 學者研究報告 *Forc* 可產生許多藍綠色菌核，雖本研究部分供試菌株培養過程可觀察到藍綠色菌核的存在，然菌核之有無，無法作為區分 *Forc* 與 *Foc* 的依據⁽¹⁸⁾。長久以來，尖鏟胞菌病原菌的鑑定完全依賴病原性(pathogenicity)測試，而病原性測試要採用大量與不同的寄主植物鑑別品種(differential cultivars)，不但費時而且執行不易⁽¹⁰⁾，病原性測試也受溫度、播種方法等因子的影響⁽²⁾。本研究中，臺灣產供試菌株 Foc151 能感染胡瓜、洋香瓜、香瓜與西瓜；而 Foc100 與 ATCC16416 菌株僅能感染胡瓜、洋香瓜及香瓜，而對西瓜則不具病原性，而所有供試菌株對絲瓜皆不具病原性。在溫室利用胡瓜進行混菌土接種試驗顯示，除菌株 ATCC16416 外，其餘臺灣產供試菌株皆會造成根腐與莖腐的病徵，病原菌主要藉由植株下胚軸和根之交接處(peg)，或其附近的支根皮層侵入。此外 Appel 和 Gordon 兩氏⁽¹⁾亦證實，*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 可由皮層組織侵入感染寄主。即病原菌由胚軸基部和根部交接處侵入危害時，會使胚根無法發芽，或伸出後隨之腐爛，造成幼苗猝倒病徵；而僅從支根侵入感染時，蔓延至莖部維管束則需要較長時間。因此在田間或溫室以混菌土接種時，會先造成幼苗猝倒或植株矮化，至 40 天左右罹病株才大量發病(表四)；此時正值結果時期，植株對水分及養分之需求大增，因而加速其病勢發展。本研究中所有供試菌株之最適發病溫度，各菌株間略有差異。除接種 Foc100 與 Foc829 菌株之植株，在 17 與 28°C 均會發病，其餘菌株包括 ATCC16416，則較傾向於高溫 28°C 發病。而希臘學者 Vakalounakis 氏⁽¹⁸⁾指出 *Forc* 的最適發病溫度則為 17°C。筆者認為不同地區環境氣候不同，病原菌為適應當地氣候，或許會自然汰選出適應生存的菌株。臺灣周年皆可栽培胡瓜，或許因而篩選出不管在低溫或高溫季節皆可造成病害之病原菌。



圖二、利用 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* 專一性引子對(ForcF1&ForcR2)進行 PCR 來偵測胡瓜萎凋病菌。專一性引子對(ForcF1 & ForcR2)能針對 Forc 的菌株進行增幅，並產生一大小為 277 bp 的專一性條帶。圖中編號 1-4 為 Forc 之 VCG 標準菌株，分別為 ATCC 204369、ATCC 204370、ATCC 204371 與 ATCC 204372；編號 5-11 為 Foc 之 VCG 標準菌株，分別為 ATCC 204373、ATCC 204374、ATCC 204375、ATCC 204376、ATCC 204377、ATCC 204378 與 ATCC 204379；編號 12 為 ATCC 204369 作為正對照組，而編號 13-17 為臺灣產胡瓜萎凋病菌菌株，分別為 Foc100、Foc106、Foc151、Foc183 與 Foc829；編號 18 為 Foc 之標準菌株 ATCC16416 作為負對照組，而編號 19 則是利用去離子水作為空白對照組。

Fig. 2. The specific primers (ForcF1&ForcR2) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* were used to detect the isolates of fusarium wilt pathogen on cucumber by using polymerase chain reaction (PCR). PCR using primers ForcF1 and ForcR2 which amplifies a 277-bp product from genomic DNA of *Forc* isolates. Numbers on the both sides (lane M) are the 100 bp DNA ladder marker (GeneMark). Lane number is corresponded to the following isolates: lanes 1 to 4 were the VCG type strains of *Forc*: ATCC204369, ATCC 204370, ATCC 204371 and ATCC 204372, respectively; lanes 5 to 11 were the VCG type strains of *Foc*: ATCC204373, ATCC 204374, ATCC 204375, ATCC 204376, ATCC 204377, ATCC 204378 and ATCC 204379, respectively; lanes 12 was used ATCC204369 as a positive control; lane 13 to 17 were the isolates collected in Taiwan: Foc100, Foc106, Foc151, Foc183 and Foc 829, respectively; lane 18, ATCC 16416 was used as a negative control; lane 19, sterile dH₂O was used as a negative control.

Forc 與 *Foc* 以及其他 *F. oxysporum* 分化型之區別，可以從病徵學與適當的寄主之病原性測試⁽¹⁸⁾，然這些試驗通常是費時且有時結果不易明確判斷⁽²¹⁾。因此，需要利用其他的方式來區分 *F. oxysporum* 菌株，而進行營養體親和群(vegetative compatibility group, VCG)試驗剛好可以達到這個目的^(8,16)。本研究中探討的 *Forc* 與 *Foc* 剛好分屬於不同的 VCGs，*Forc* 包含三個 VCGs，分別為 0260、

0261 及 0260/261 (bridging group) ; *Foc* 則包含 0180、0181、0182 以及 0183 四個 VCGs⁽¹⁹⁾。目前本研究測試的臺灣產菌株有 *Foc*100、*Foc*151、*Foc*829、*Foc*917、*Foc*143 及 ATCC 16416。所有供試菌株之缺陷株除 100M16 屬於 *Foc* 之 VCG 0180 中的一群外，其餘缺陷株配對結果為 VCG 018-或 VCG-HSI(表五)。至於其他供試缺陷株為何無法與所有 *Foc* 的營養體配對群標準菌株配對出結果，筆者認為臺灣產菌株與國外菌株間有其差異性，因而造成無法配對。Vakalounakis 氏等人⁽²⁰⁾曾指出中國胡瓜萎凋病菌 34 株供試菌株中，只有 3 株菌株屬於原本的 VCG 分類群(VCG 0183)，有 18 株被歸類在四個新的 VCG 中，分別為 VCG 0184、0185、0186 及 0187。因此，未來希望可以從鄰近國家(如中國)，取得 *Foc* 新的 VCG 標準菌株進行配對，或許可以得到明確的結果。

Vakalounakis 與 Fragkiadakis 兩氏⁽¹⁹⁾的報告中指出，利用 RAPD 指紋型可以將 *Foc* 與 *Forc* 兩分化型區分，且屬於不同的親緣分枝；而此結果亦被 Punja 與 Parker 兩氏⁽¹⁵⁾證實。在本研究中，利用 UBC438、UBC489 及 UBC890 三個引子對 13 株 *Fusarium oxysporum* 菌株進行 RAPD 指紋分析。結果顯示臺灣產胡瓜萎凋病菌可分成兩群：*Foc*-143 與 *Foc*-917 為一群；*Foc*-151、*Foc*-183、*Foc*-829、*Foc*-100、*Foc*-106 及 *Foc*-105 為另一群(圖一)。其與 ATCC 204369、ATCC 204371(*Forc* 的營養體配對群標準菌株)及 ATCC 16416(*Foc* 標準菌株)之相似度僅為 56%，顯示臺灣產供試菌株與國外標準菌株間相似度不高，未來可再測試更多不同的引子，以利判讀臺灣產供試菌株與國外標準菌株的親緣關係。此外，本研究透過已發表之 *Forc* 的專一性引子對(*Forc*F1/*Forc*R2)進行 DNA 序列增幅，結果顯示僅有 *Forc* 的 VCG 標準菌株可被偵測得到，而臺灣的菌株皆不會被增幅出專一條帶；而筆者亦嘗試使用已發表之 *Foc* 專一性引子對進行測試，然該引子對的靈敏度與專一性皆不如預期，因此無法協助判斷臺灣產供試菌株的歸屬。

從上述接種病徵、寄主範圍、最適發病溫度等結果顯示，多數臺灣產供試菌株與 *Foc* 標準菌株相近，然仍有部分菌株與 *Foc* 標準菌株有所不同。然而，病原菌在不同接種方式與環境條件，或對不同寄主品種均會造成病徵表現上的差異。臺灣產供試菌株之寄主範圍雖然比 ATCC16416 菌株廣，但在 Vakalounakis 氏⁽¹⁸⁾報告中，利用剪根法接種，*Forc* 除會感染胡瓜、洋香瓜及西瓜外，也會感染絲瓜，但臺灣產供試菌株與 ATCC16416 均不會感染絲瓜。另外，臺灣產供試菌株在 17 或 28°C 均可發病，與 *Forc* 只能於 17°C 引起病害不同⁽¹⁸⁾；而且在 VCG 的結果中，*Foc*100 是屬於 *Foc* 中 VCG 0180 的一群。此外，*Forc* 的專一性引子對之增幅結果，顯示臺灣產供試菌株皆不屬於 *Forc*。因此，綜合目前研究的結果顯示，將臺灣產胡瓜萎凋病菌歸屬於 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*。

表四、溫度對胡瓜萎凋病發病度的影響

Table 4. Effect of temperature on disease severity of Fusarium wilt of cucumber plants (variety Vantage) inoculated with *Fusarium oxysprum* f. sp. *cucumerinum*¹

Treatment	Disease severity ² (%)													
	Temperature(°C) / Days after inoculation													
	17°C							28°C						
	0	7	14	21	28	35	42	0	7	14	21	28	35	42
CK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Foc100	0	0	0	8.3	11.1	44.4	88.9	0	0	0	23.1	50	66.7	86.1
Foc143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.4	72.9
Foc151	0	0	0	0	6.3	12.5	16.7	0	0	0	0	6.3	35.4	89.6
Foc829	0	0	0	12.5	31.3	39.6	45.8	0	0	0	6.3	18.8	66.7	100
Foc917	0	0	0	0	0	0	8.3	0	0	0	0	5.6	13.9	38.9
ATCC16416	0	0	0	0	0	6.3	6.3	0	0	0	0	6.3	16.7	89.6

¹The experiment was conducted from 13 January to 24 February 2006 in growth chamber by soil infestation inoculation method ($1.0-5.0 \times 10^3$ propagules/g soil).

²Twelve plants of each assayed on a scale of 0-4; where 0=Health, 1 = < 1/2 cotyledon and first leaf with yellowing symptom, 2= stunting, or > 1/2 leaves with yellowing symptom, 3=stem yellowing, vascular discoloration, and <1/2 leaves with wilt symptom, and 4=Plant wilt and dead.

表五、胡瓜萎凋病菌之硝酸營養缺陷株與營養菌絲配對群標準菌株之異核現象

Table 5. Formation of complementary heterokaryons between *nit* mutants of isolates of the Fusarium wilt pathogen of cucumber and VCG tester

Isolate/ mutant	Phenotype	VCG tester														VCG ²
		204369	204370	204371	204372	204373	204374	204375	204376	204377	204378	204379	204380			
100P01	<i>nit</i> 1	- ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
100M16	<i>nit</i> 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0180
143P14	<i>nit</i> 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
143M11	Nit M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
151M13	<i>nit</i> 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
151P15	Nit M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
829M02	<i>nit</i> 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
829M07	<i>nit</i> 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
829P04	Nit M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-
917P12	<i>nit</i> 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-HSI
917M01	Nit M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-HSI
16416P04	<i>nit</i> 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-HSI
16416P06	<i>nit</i> 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-HSI
16416M05	Nit M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	018-HSI

¹ + = Dense aerial growth developed where mycelia of the two *nit* mutant colonies came in contact after 10-15 days; - = No dense aerial growth developed where mycelia of the two *nit* mutant colonies came in contact after 20 days.

² VCG 018- = An artificial group containing single-member VCGs of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*; 018-HSI = An artificial group containing heterokaryon self-incompatible isolates that did not form heterokaryons upon pairing with themselves or with any of the other isolates.

參考文獻

1. Appel, D. J. and T. R. Gordon. 1994. Local and regional variation in populations of *Fusarium* from agricultural field soils. *Phytopathology* 84: 786-791.
2. Armstrong, G. M. and J. K. Armstrong. 1981. *Fusarium*: Disease, Biology and Taxonomy. In Anonymous, *Formae Speciales and Races of Fusarium oxysporum* Causing Wilt Disease, Pages 391-399. The Pennsylvania University Press, University Park.
3. Correll, J. C., C. J. R. Klittich and J. F. Leslie. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
4. Fletcher, J. T. and H. G. Kingham. 1966. *Fusarium* wilt of cucumbers in England. *Plant Pathol.* 15: 85-89.
5. Garrett, R. H. and N. K. Amy. 1978. Nitrate assimilation in Fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 18: 1-65.
6. Katan, T. and P. D. Primo. 1999 Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*: supplement. *Phytoparasitica* 27: 273-277.
7. Lin, Y. C. and H. J. Chang. 1980. First report of *Fusarium* wilt of cucumber. *Plant Protec. Bull.* 22: 437 (Abstract).
8. Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127-150.
9. Lievens, B., L. Claes., D. J. Vakalounakis., A. C. R. C. Vanachter and B. P. H. J. Thomma. 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environ. Microbiol.* 9: 2145-2161.
10. Manicom, B. Q., M. Bar-Josph, J. M. Kotze and M. M. Becker. 1990. A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* 80: 336-339.
11. Marzluf, G. A. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* 45: 437-461.
12. Owen, J. H. 1955. *Fusarium* wilt of cucumber. *Phytopathology* 45: 435-439.
13. Owen, J. H. 1956. Cucumber wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum* n. f. *Phytopathology* 46: 153-157.
14. Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 36: 179-183.
15. Punja, Z. K. and M. Parker. 2000. Development of *Fusarium* root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Can. J. Plant Pathol.* 22: 349-363.

16. Rowe, R. C. 1995. Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica* 23: 31-38.
17. Saitoh, K., K. Togashi, T. Arie and T. Teraoka. 2006. A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 348-350.
18. Vakalounakis, D. J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov. *Plant Dis.* 80: 313-316.
19. Vakalounakis, D. J. and G. A. Fragkiadakis. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89: 161-168.
20. Vakalounakis, D. J., Z. Wang, G. A. Fragkiadakis, G. N. Skaracis and D. B. Li. 2004. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. *Plant Dis.* 88: 645-649.
21. Woo, S. L., A. Zoina, G. D. Sorbo, M. Lorito, B. Nanni, F. Scala and C. Noviello. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* 86: 966-973.
22. Yildiz, M. and N. Delen. 1977. Studies on the occurrence of *Fusarium* wilt of cucumber Ege region of Turkey. *J. Turk. Phytopathology* 6: 111-117.

Identification of the *Fusarium oxysporum* formae speciales of Cucumber in Taiwan

Chao-Jen Wang², Min-Jing Huang³, Jen-Fang Chen⁴,

Wen-Hsin Chung³ and Yi-Sheng Lin³

ABSTRACT

Two formae speciales (f. sp.) of *Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (*Foc*) and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*), were reported to trigger Fusarium wilt of cucumber that cause root and stem rot, respectively. However, the isolates of *F. oxysporum* caused Fusarium wilt of cucumber in Taiwan are not yet identified. The isolates of *F. oxysporum* were collected from diseased cucumber plants in Taiwan and compared with the type strain of *Foc* (ATCC16416), including symptoms, host range and optimum infection temperature. The results showed that all Taiwan isolates could cause root and stem rot of cucumber plants by using soil infestation inoculation method, except ATCC16416. Moreover, the Taiwan isolates *Foc*151 could infect cucumber, muskmelon, melon and watermelon, but isolate ATCC16416 could only infect cucumber, muskmelon and melon. Isolates *Foc*100 and *Foc*829 could infect cucumber at both 17°C and 28°C, the optimum infection temperature of other Taiwan isolates and isolate ATCC16416 were at 28°C. Twelve VCG testers of *Foc* and *Forc* were used to identify the VCG of Taiwan isolates by using the vegetative compatibility tests. The results indicated that 100M16, the *nit* mutant of isolate *Foc*100 was VCG 0180 of *Foc*. The specific primers of *Forc* (*Forc*F1&*Forc*R2) were used to detect the Taiwan isolates in this study. The results showed that only VCG testers of *Forc* were able to amplify a DNA fragment with 277-bp. On the contrary, the same primers were not able to amplify any PCR product from VCG testers of *Foc*, ATCC16416 and all of the Taiwan isolates. Based on the results of symptoms, host range, optimum infection temperature, VCG and PCR with specific primers of *Forc* indicated that the Fusarium wilt pathogen of cucumber obtained from Taiwan was still identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*.

Key words: Fusarium wilt of cucumber, identification, vegetative compatibility group, specific primers

¹ Contribution No.0964 from Taichung DARES, COA

² Assistant Researcher of Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA.

³ Assistant, Professor and Emeritus Professor of Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

⁴ Retiree of Hualien District Agricultural Research and Extension Station, COA.