

# 洋香瓜果腐病菌之特性與其對藥劑之感受性<sup>1</sup>

黃于芳<sup>2</sup>、王照仁<sup>2</sup>、潘蕙如<sup>3</sup>

## 摘 要

自 2019 起，中部地區多處洋香瓜果園發現果實出現褐色水浸狀凹陷病斑，嚴重時造成裂果或果腐等情形，對農友收成產生極大損失，該病徵與 2022 年報導由 *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) 引起之洋香瓜果腐病相似。本文為釐清本病害病原與可能防治藥劑，自彰化縣(田尾與秀水)與臺中市(烏日與霧峰)分別蒐集罹病果體進行病原菌分離，並成功取得 4 株供試菌株(FE01-FE04)。病原性測試結果顯示，克霍式法則試驗指出供試菌株(FE01)的菌絲與孢子皆對洋香瓜果實具病原性，且所引起病徵與田間相似。供試菌株於馬鈴薯葡萄糖瓊脂(Potato Dextrose Agar, PDA)培養基上之菌落形態，出現明顯氣生菌絲，且顏色為白色、淡橘至粉紅色，有明顯黃色色素沉積。孢子形態僅觀察到鐮刀型大孢子(macroconidia) 及厚膜孢子(chlamydo-spore)，無觀察到小孢子(microconidia)生成。進一步透過利用 internal transcribed spacer region (ITS)、 $\beta$ -tubulin2 ( $\beta$ -*tub2*)及 translation elongation factor 1 alpha (EF-1 $\alpha$ )等三個基因片段進行多重序列比對，確認供試菌株可歸屬至 FIESC 內之 *F. sulawesiense* (FIESC 16)與 *F. pernam-bucanum* (FIESC 17)二個分類群，又以 *F. pernam-bucanum* 為此病害的優勢菌株，且已完成病原性測定。後續挑選三氟敏、四氯異苯腈、貝芬替、氟克殺及氟派瑞，共 5 種藥劑進行供試菌株藥劑感受性測試。結果發現田尾地區菌株在貝芬替與三氟敏有明顯抗藥性現象出現，而氟克殺與氟派瑞普遍抑制效果不佳，四氯異苯腈對 *F. pernam-bucanum* 抑制效果顯著，對 *F. sulawesiense* 則無抑制性。

**關鍵字：**洋香瓜果腐病、*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex、藥劑感受性分析、

*Fusarium sulawesiense*、*Fusarium pernam-bucanum*

## 前 言

洋香瓜(*Cucumis melo* L.)，又名甜瓜，依據外觀大致分類為網紋洋香瓜與光皮洋香瓜。洋香瓜在臺灣栽培廣泛，主要產於臺南、嘉義及雲林等地；根據農糧署農情報告資源網 2021 年資料，本場轄區栽種面積近 88 公頃，約占全臺 6%的產量。早年以露天隧道式栽培為主，近年栽種方式改以設施內直立式介質栽培，使得果實品質得以提升。高品質的溫室洋香瓜曾在臺北果菜市場拍賣出每

<sup>1</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 1059 號。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究助理與助理研究員。

<sup>3</sup> 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所助理研究員。

公斤達 300 元的高價，吸引農民投入生產<sup>(5)</sup>，但其栽培過程技術門檻高，水分管理、溫度及病蟲害等方面，都是栽培期的重要議題。洋香瓜常見的病害，包括苗期的苗立枯病(由 *Pythium cucurbitacearum* Takimoto、*P. debaryanum* Hesse 或 *Rhizoctonia solani* Kühn 引起)、葉部的白粉病(由 *Podosphaera fuliginea* U. Braun & S. Takam.引起)與露菌病(由 *Peronosplasmopara cucumis* Rostovzev 引起)、枝條與地上部的蔓枯病(由 *Didymella bryoniae* Rehm 引起)、地下部的黑點根腐病(由 *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker 引起)、果實上的細菌性果斑病(由 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Willems 引起)等<sup>(3)</sup>。

自 2019 至 2022 年間，發現轄區內多處洋香瓜果園內之成熟果實出現褐色水浸狀凹陷病斑，嚴重者出現白色海綿狀菌絲、果裂及果腐等情形。因病徵多出現於果實成熟期，造成農民損失甚鉅。此次發現的病徵皆與過往常見病害不同，查詢國內外文獻發現，較接近 *Fusarium incarnatum-equiseti* 複合種群(FIESC)內 *F. sulawesiense* (FIESC 16)與 *F. pernambucanum* (FIESC 17)引起的洋香瓜果腐病害<sup>(17,20,32)</sup>。

FIESC 寄主廣泛，目前已被報導在人、獸、環境及果實上皆有發現<sup>(31)</sup>。目前最新研究是利用 internal transcribed spacer (ITS)、translation elongation factor 1-alpha (*EF1-α*)、calmodulin (*CAM*)、partial RNA polymerase largest subunit (*rpb1*) 及 partial RNA polymerase second largest subunit (*rpb2*) 等 5 個基因片段的多位點序列分型(multilocus sequence typing, MLST)結果，分為 33 個親緣關係種(phylogenetic species)<sup>(28,29)</sup>。這個複合種群造成的病害多元，如 *F. equiseti* (FIESC 14)、*F. incarnatum* (FIESC 23)造成香蕉根部病害<sup>(7)</sup>、*F. ipomoeae* (FIESC 1)造成大豆根腐病<sup>(11)</sup> 等。*F. clavum* (FIESC 5)、*F. equiseti* (FIESC 14)及 *F. hainanense* (FIESC 26)則被報導在稻米與小麥上會產生黴菌毒素(mycotoxin)<sup>(8,10)</sup>。近年於巴西、馬來西亞、泰國、中國及臺灣等地，都有紀錄由 FIESC 造成洋香瓜果實上的病害<sup>(9,14,19,20,22)</sup>。巴西當地發現，該病菌常在果實冷藏出口到進口國後才發病，約有 15% 的發病率，平均每季損失 2,200 萬美元<sup>(24)</sup>，被視為嚴重的儲藏期病害<sup>(17)</sup>，但目前未有明確的防治策略。因此，本研究利用形態及分子方法確認本病害之病因，同時評估病原菌對不同化學藥劑的防治效果，提供未來防治與研究之參考。

## 材料與方法

### 一、病原菌分離及培養條件

自彰化縣秀水鄉、彰化縣田尾鄉、臺中市烏日區及臺中市霧峰區蒐集樣本，以組織分離法於病株果實腐爛交界處切下 5×5 mm 的組織塊，放入 1:1 的漂白水與 95%酒精混合液中消毒 30 secs，移至無菌水漂洗後，再放在 1.5%的蒸餾水瓊脂(water agar, WA)培養基中，並移置於 28°C、12hrs 光照的培養箱(Sanyo, MIR-154)中，3 天後於組織周邊切取單一菌絲，移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA)培養基中完成純化。後依據不同地點的樣本，為菌株編號 FE01-04(表一)，供後續試驗之用。

表一、供試菌株之名稱及採集資訊

Table 1. The identification code, collection date and location of each isolate used in this study.

| Isolate number | Date    | Location          |
|----------------|---------|-------------------|
| FE01           | 2020.12 | Xiushui, Changhua |
| FE02           | 2021.01 | Tianwei, Changhua |
| FE03           | 2021.01 | Wuri, Taichung    |
| FE04           | 2021.01 | Wufeng, Taichung  |

## 二、病原性測試

### (一) 成熟果接種

選取成熟可食用的網紋洋香瓜(品系：阿露斯) 1 顆，均分為 4 組進行菌絲塊接種測試，分別為供試菌株 FE01 接種處有/無傷口處理組、對照組有/無傷口處理組。果實先均勻噴灑 75%酒精後，再照 UV 燈進行 20 mins 表面消毒。各處理組由蒂頭處往底部均勻畫上 3 個標記，其中 2 組標記以針頭扎進果表約 5 mm 深，作為有傷口處理組，另外 2 組則為無傷口處理組，最後於各標記處平貼 5 mm 供試菌株 FE01 菌絲塊或空白 PDA 塊。完成後將果實放在密封保鮮盒中，並放入沾取無菌水的擦手紙作為保濕使用，24 hrs 後將蓋子稍微打開通風，置於室溫下連續觀察並記錄發病情形。

### (二) 幼果接種

選取未裂網紋的洋香瓜幼果 4 顆，同前述方式進行表面消毒後，並於果實表面上標示出 4 個位置，無製造傷口。其中 2 顆進行菌絲塊接種，以 5 mm 打孔器挖取菌絲塊，平貼於標記位置上，使用供試菌株 FE01 進行病原性測試，對照組則貼上同樣大小無菌絲的 PDA 塊。另 2 顆進行孢子懸浮液接種，先以無菌水洗下供試菌株 FE01 孢子並用雙層 Mira cloth (Merk Darmstadt, Germany) 過濾，配成  $10^6$  spores/ml 之孢子懸浮液，再將果實上平貼濾紙片，滴上 100 $\mu$ L 孢子懸浮液，對照組則滴上 100 $\mu$ L 無菌水。完成後將果實放在密封保鮮盒中，並放入沾取無菌水的擦手紙作為保濕使用，24 hrs 後將蓋子稍微打開通風，置於室溫下連續觀察並記錄發病情形。

## 三、病原菌鑑定

### (一) 形態觀察

各供試菌株皆以單孢子或單絲培養於 28 $^{\circ}$ C、12 hrs 光照的培養箱中，6 天後取出觀察菌落形態。並將供試菌株，挑單孢培養於 WA，14 日於顯微鏡下觀察孢子形態。

## (二)分子親緣關係分析

取長滿菌絲的培養基，以移植環刮取少量菌絲移入 1.5 ml 的微量離心管，放在-80°C環境中 10 mins。利用植物基因體 DNA 純化試劑組(Quick-DNA Miniprep Kit, Zymo Research) 抽取真菌基因體 DNA。而後以特定引子對進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，增幅的片段包括：ITS (ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'、ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>(30)</sup>、 $\beta$ -*tub2* (Btub2Fd: 5'-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-3'、Btub4Rd: 5'-CCRGAYTGRCRRAARACRAAGTTGTC)<sup>(12)</sup>、*EF1- $\alpha$*  (EF1: 5'-ATGGGTAAGGA R GACAAGA C-3'、EF2: 5'-GGAR GTACCAGTSATCAITGTT-3')<sup>(23)</sup>。PCR 反應條件為變性反應(denaturation) 94°C 5 mins，再 94°C 45 secs、黏合反應(annealing) 52°C ( $\beta$ -*tub2*、*EF1- $\alpha$* ) 或 55°C (ITS) 45 secs、延長反應(extension) 72°C 2 mins 共 35 個循環後，進行 72°C 7mins 的延長反應，最後保持於 4°C。定序交由源資生物科技公司進行。

親緣演化分析共使用 4 株供試菌株(表一)及 20 株參考菌株(表二)，參考序列由美國國家生物技術資訊中心資料庫(National Center for Biotechnology Information, NCBI)取得。序列整理使用 BioEditor<sup>(13)</sup>，以 clustalW 演算法<sup>(27)</sup> 進行排列分析(alignment)，再透過人工進行序列微調與確認，並合併三段基因序列。將合併好的序列透過 MEGA<sup>(26)</sup> 軟體採用鄰接法(Neighbor-joining)重建親緣關係樹，親緣關係樹的分支支持度以靴帶分析(Bootstrap)進行 1,000 次取樣檢驗。

## 四、藥劑感受性測試

參考農委會動植物防疫檢疫局農藥資訊服務網紀錄之炭疽病推薦用藥，選擇 5 種不同作用機制的殺真菌劑進行藥劑感受性測試。供試藥劑包括 50%三氟敏(Trifloxystrobin) 可分散性粒劑(臺灣拜耳股份有限公司)、75%四氫異苯腈(Chlorothalonil)可濕性粉劑(惠光股份有限公司)、50%貝芬替(Carbendazim)水懸劑(聯利農業科技股份有限公司)、30%氟克殺(Fluxapyroxad)水懸劑(臺灣巴斯夫股份有限公司)及 40%氟派瑞(Fluopyram)水懸劑(臺灣拜耳股份有限公司)。上述藥劑分別以有效濃度 0、1、10 及 100 ppm，測試 4 株供試菌株的菌絲生長速度及孢子發芽率，每個濃度進行 5 重複試驗。菌絲生長實驗利用打孔器取出直徑 0.5 mm 菌絲塊，平貼於含藥劑的 PDA 上，靜置於 28°C、光照 12 hrs 的培養箱中。3 日後，放射狀選取菌絲塊 3 個方位，記錄從菌絲塊邊緣至菌絲邊緣的長度，並計算其抑制率。孢子發芽率實驗則取 50 $\mu$ L 濃度為 10<sup>4</sup> 的孢子懸浮液，均勻塗布於含藥劑的 1.5% WA 上。靜置於室溫中 16 hrs 後，於解剖顯微鏡下觀察 200 顆孢子，記錄其發芽率並進一步計算其抑制率。

表二、親緣演化分析所採用的參考序列詳細資訊

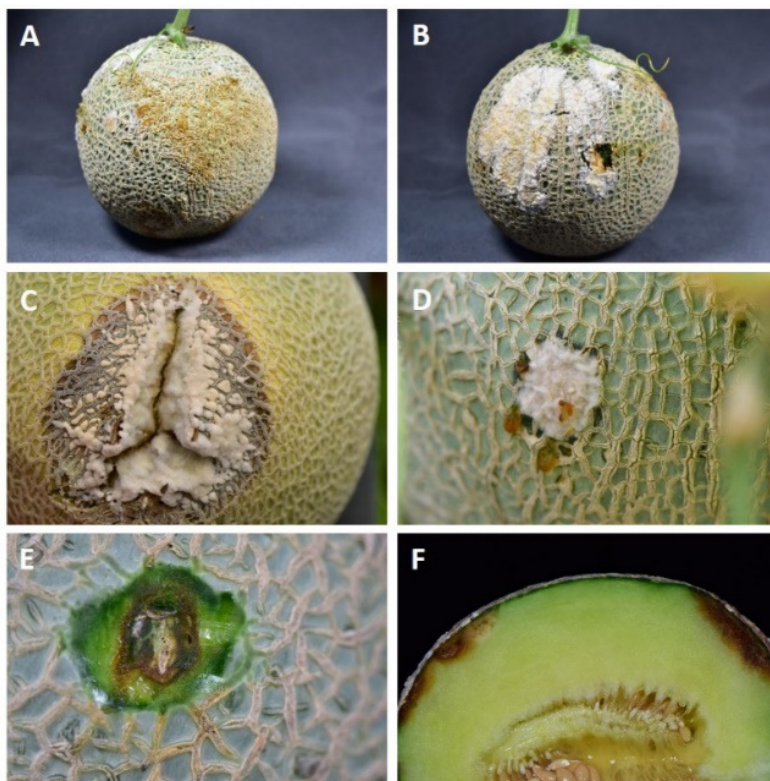
Table 2. The reference isolates used for phylogenetic analysis.

| Species                  | Strain number | ITS      | $\beta$ - <i>tub2</i> | EF1      | References |
|--------------------------|---------------|----------|-----------------------|----------|------------|
| <i>F. acuminatum</i>     | LC13791       | MW016644 | MW533990              | MW620105 | 23         |
| <i>F. acuminatum</i>     | LC13794       | MW016647 | MW533993              | MW620108 | 23         |
| <i>F. arcuatisporum</i>  | LC12147       | MK280802 | MW533837              | MK289584 | 22         |
| <i>F. arcuatisporum</i>  | LC11639       | MK280840 | MW533836              | MK289586 | 23         |
| <i>F. asiaticum</i>      | LC13773       | MW016607 | MW533962              | MW620068 | 23         |
| <i>F. asiaticum</i>      | LC7143        | MW016637 | MW533984              | MW620098 | 23         |
| <i>F. citri</i>          | LC13698       | MW016525 | MW533847              | MW594368 | 23         |
| <i>F. citri</i>          | LC7937        | MK280797 | MW533849              | MK289640 | 22         |
| <i>F. compactum</i>      | LC13700       | MW016527 | MW533850              | MW594370 | 23         |
| <i>F. guilinense</i>     | LC12160       | MK280837 | MW533851              | MK289594 | 22         |
| <i>F. hainanense</i>     | LC11638       | MK280836 | MW533852              | MK289581 | 22         |
| <i>F. humuli</i>         | CQ1039        | MK280845 | MW533857              | MK289570 | 22         |
| <i>F. incarnatum</i>     | LC13705       | MW016532 | MW533871              | MW594375 | 23         |
| <i>F. ipomoeae</i>       | LC12165       | MK280832 | MW533878              | MK289599 | 22         |
| <i>F. irregulare</i>     | LJM1544       | MW016538 | MW533886              | MW594381 | 23         |
| <i>F. kyushuense</i>     | LC0725        | MW016613 | MW533967              | MW620074 | 23         |
| <i>F. nanum</i>          | LC1384        | MK280842 | MW533890              | MK289611 | 22         |
| <i>F. pernambucanum</i>  | LC12148       | MK280778 | MW533893              | MK289587 | 22         |
| <i>F. sulawesiense</i>   | LC12170       | MK280841 | MW533908              | MK289604 | 22         |
| <i>F. tanahbumbuense</i> | LC13726       | MW016553 | MW533910              | MW594396 | 23         |

## 結 果

### 一、病徵觀察

洋香瓜果腐病徵於果實接近成熟時開始發生，取樣果實上出現褐斑、水浸狀凹陷，嚴重者有果裂、果腐的情形，由裂果處表面產生白色至粉色的棉花狀的氣生菌絲，切開果實後，內部組織有褐化、入侵情形(圖一)。

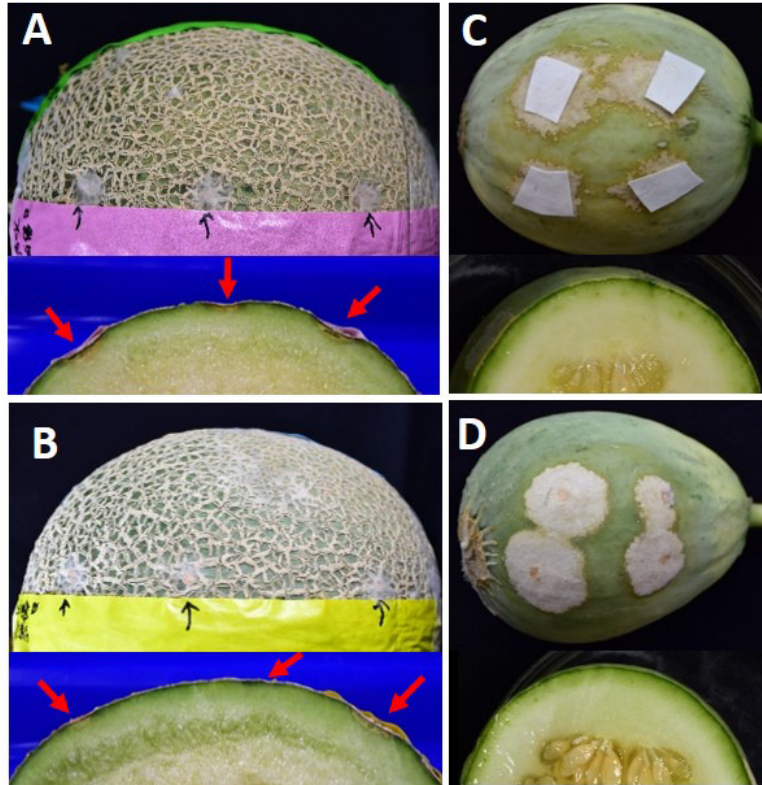


圖一、洋香瓜果腐病之病徵照。田間成熟果實出現褐斑(A、B)、凹陷病斑(C、E)，且可於果表觀察到褐色菌絲纏據於果表(A至D)；病原菌入侵果實的情形(F)。

Fig 1. The symptoms of *Fusarium* fruit rot disease on muskmelon. The brown spot (A and B) with sunken symptoms on matured muskmelon fruit in fields (C and E) and the brown color mycelium were observed and colonized on the fruit surface (A to D). Pathogen invasion of fruit (F).

## 二、病原性測試

成熟果接種 FE01 後，持續觀察到 4 天，果表出現水浸狀凹陷，產生明顯白色菌絲，切開果實發現有傷口處理組較容易入侵，無傷口處理組則集中於果表(圖二、A 與 B)。幼果接種 FE01 後，觀察 4 天發現無論是接種菌絲塊或孢子懸浮液者，果表皆有些微白色菌絲產生。持續觀察到第 10 天，果表菌絲生長範圍擴大，但觀察接種處切面，菌絲僅平鋪於果表未侵入果肉層，實驗結束後重新組織分離仍可分離到菌絲(圖二、C 與 D)。成熟果及幼果實驗的對照組，都無病徵產生。重新以相同方式組織分離，於實驗組上亦可分離到相同菌株，由此完成柯霍式法則(Koch' postulates)。

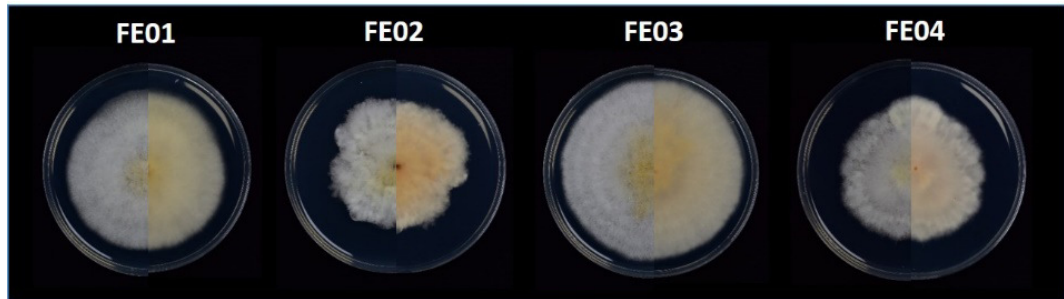


圖二、洋香瓜果腐病菌株 FE01 之病原性測試結果。成熟果實利用菌絲塊或孢子懸浮液在有傷口(A)或無傷口(B)處理皆可感染果實，並向下侵入果實組織內(箭號處)；幼果利用孢子懸浮液(C)或菌絲塊接種(D)後，雖可在果表產生病徵，但無法向下侵入組織中。

Fig 2. The pathogenicity test of FE01 isolate on muskmelon. The tested isolate could infect the mature fruit tissues (arrow) with wounds (A) or without wounds (B) by using mycelium and conidia as inoculum sources. The tested isolate could cause symptoms on the young fruit surface by using mycelium (C) and conidia (D) as inoculum sources, but the pathogen could not invade the under-surface tissues.

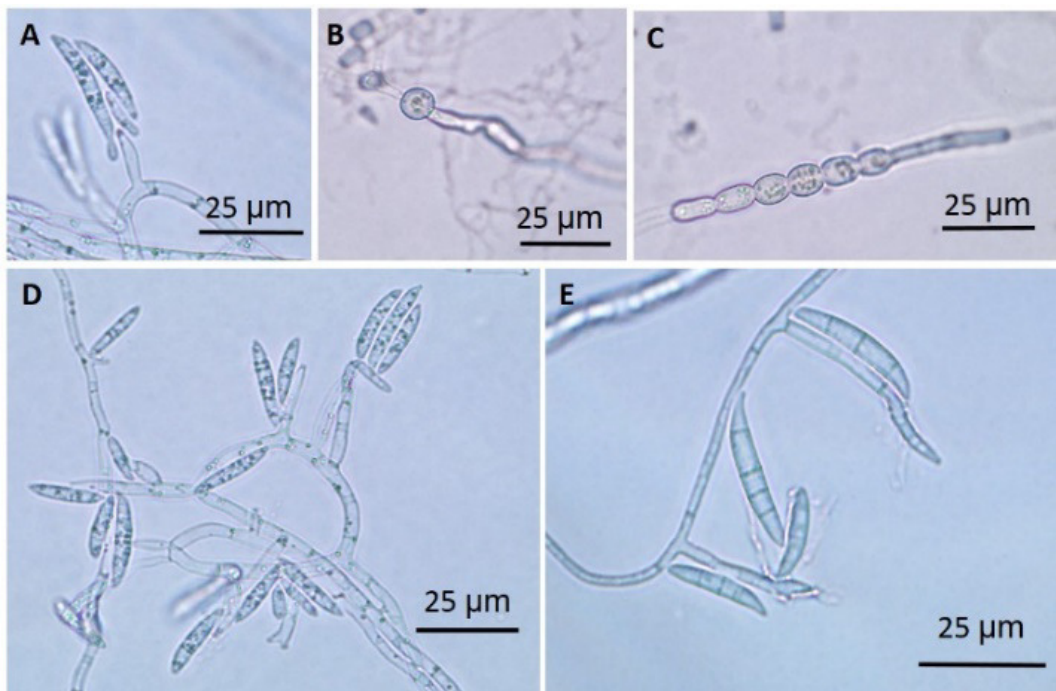
### 三、病原菌鑑定

由洋香瓜果腐處組織分離之供試菌株，於 PDA 上生長 6 天可長到 8 分滿，產生白色、淡橘至粉色的的氣生菌絲(圖三)。於 WA 上生長 14 天後，產生大孢子及厚膜孢子，無觀察到小孢子。大孢子具 4-5 個隔膜(圖四)。依其形態特徵，初步確認為 *Fusarium semitectum* (*Fusarium incarnatum*)<sup>(16)</sup>。進一步利用 ITS、*EF1- $\alpha$* 、 *$\beta$ -tub2* 多基因分析，確認 4 隻供試菌株屬於 *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC)，其中 FE01-FE03 為 *F. pernambutanum* (FIESC 17)，FE04 則為 *F. sulawesiense* (FIESC 16) (圖五)。



圖三、洋香瓜果腐病菌之菌落形態。培養皿左側為正面，培養皿圖右為背面。

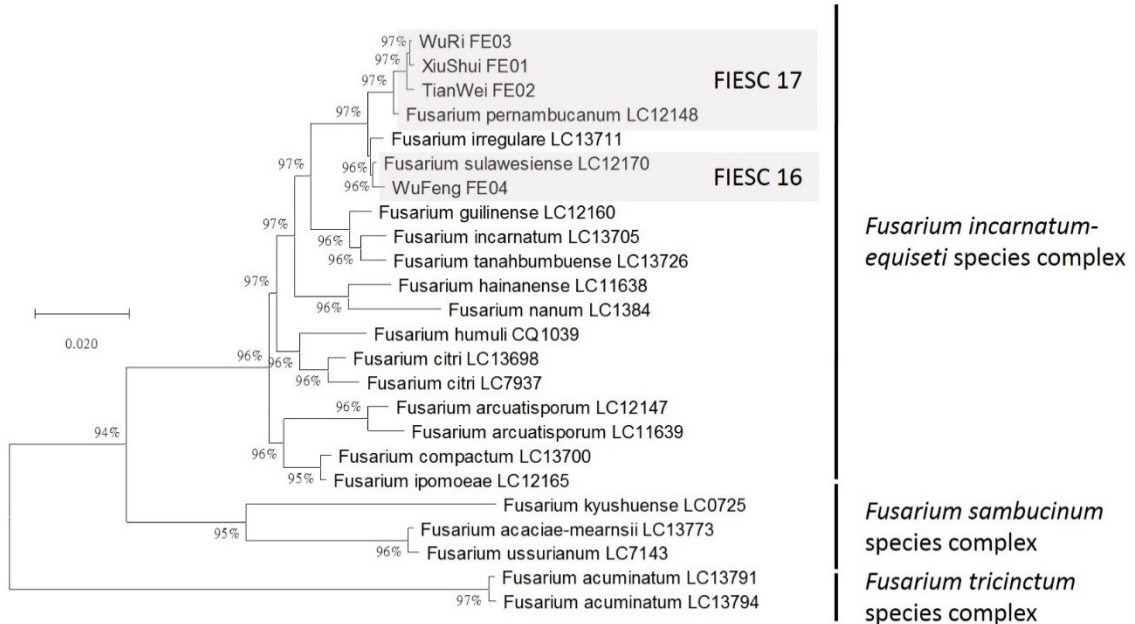
Fig 3. The colony type of the tested isolates on PDA in this study. The left part was the surface view, and the right part was the reverse view of the isolates on PDA.



圖四、洋香瓜果腐病菌 FE01 之孢子形態。供試菌株分生孢子之產孢梗為單一瓶狀枝(A) (monophialide)，該菌株可生成單生及串生厚膜孢子(B 與 C)，鐮刀狀大孢子，內有 4-5 個隔膜(D 與 E)。

Fig 4. The morphology characteristics of the *Fusarium* fruit rot disease on muskmelon. The isolates formed macroconidia on monophialades conidiophore (A), and the tested isolate could produced single or chain chlamydospores on Water Agar (B to C). The macroconidia were observed with 4-5 cells (D to E).





圖五、本研究果腐病菌供試菌株與國外三個鐮胞菌複合群參考菌株以三區基因組合片段(ITS,  $\beta$ -*tub2* and EF-1 $\alpha$ )分析之親緣演化分析結果。

Fig 5. Three-locus combined dataset (ITS,  $\beta$ -*tub2* and EF-1 $\alpha$ ) showing the phylogenetic relationships of the *Fusarium* fruit rot isolates in this study and the reference species within the three *Fusarium* phylogeny species complex.

#### 四、藥劑感受性測試

將 FE01-FE04 共 4 隻供試菌株培養於含有藥劑的培養基上，各藥劑對同一菌株的菌絲生長及孢子發芽的抑制效果趨勢大致相同(表二、表三)。四氯異苯腈對 FE01-03 菌株的抑制效果最佳，10 ppm 即有 100% 的抑制率(圖六)，然 100 ppm 對 FE04 僅有 15.2%。貝芬替 10 ppm 對 FE01、FE03 抑制率皆 >70%，100 ppm 對 FE02、FE04 抑制率低於 15%。三氟敏 100 ppm 對 FE01-03 抑制率 >55%，對 FE04 抑制率皆 <20%。氟克殺及氟派瑞的 100 ppm 對 FE01-03 的抑制效果皆低於 70%，對 FE04 的菌絲生長抑制率也 <50%，然孢子發芽抑制率則有 100%。

表三、不同藥劑於 1、10、100 ppm 濃度下對供試菌株之孢子發芽的影響

Table 3. Effect of different fungicides on spore germination rate of the FIESC tested isolates at concentrations of 1, 10, and 100 ppm.

| Isolate number | Inhibition rate (%)   |      |      |                      |     |      |                   |      |      |                    |      |      |                 |      |      |
|----------------|-----------------------|------|------|----------------------|-----|------|-------------------|------|------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|
|                | Trifloxystrobin (ppm) |      |      | Chlorothalonil (ppm) |     |      | Carbendazim (ppm) |      |      | Fluxapyroxad (ppm) |      |      | Fluopyram (ppm) |      |      |
|                | 1                     | 10   | 100  | 1                    | 10  | 100  | 1                 | 10   | 100  | 1                  | 10   | 100  | 1               | 10   | 100  |
| FE01*          | 23.8                  | 45.3 | 100  | 81.6                 | 100 | 100  | 2.7               | 96.1 | 98.5 | 26.4               | 25.7 | 48.5 | 10.3            | 60.2 | 61.9 |
| FE02*          | 14.6                  | 18.0 | 72.4 | 28                   | 100 | 100  | 0.7               | 0.7  | 0.7  | 25.1               | 23.4 | 49.3 | 3.9             | 55.2 | 60.6 |
| FE03*          | 60.1                  | 74.2 | 92.1 | 94.7                 | 100 | 100  | 6.6               | 98.5 | 98.1 | 18.5               | 26.7 | 41.9 | 20.2            | 56.6 | 60.8 |
| FE04**         | 0                     | 0    | 0    | 0                    | 3.7 | 15.2 | 0                 | 11.6 | 11.4 | 1.2                | 0.8  | 0.4  | 0               | 0    | 100  |

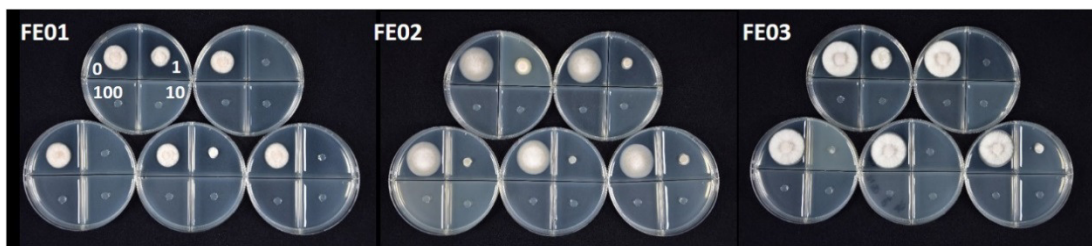
\* Fusarium permambucanum (FIESC17), \*\* Fusarium sulawesiense (FIESC16)

表四、不同藥劑於 1、10、100 ppm 濃度下對供試菌株之菌絲生長的影響

Table 4. Effect of different fungicides on mycelium growth rate of the FIESC tested isolates at concentrations of 1, 10, and 100 ppm.

| Isolate number | Inhibition rate (%)   |      |      |                      |      |      |                   |      |      |                    |      |      |                 |      |      |
|----------------|-----------------------|------|------|----------------------|------|------|-------------------|------|------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|
|                | Trifloxystrobin (ppm) |      |      | Chlorothalonil (ppm) |      |      | Carbendazim (ppm) |      |      | Fluxapyroxad (ppm) |      |      | Fluopyram (ppm) |      |      |
|                | 1                     | 10   | 100  | 1                    | 10   | 100  | 1                 | 10   | 100  | 1                  | 10   | 100  | 1               | 10   | 100  |
| FE01*          | 71.4                  | 73.7 | 75.7 | 78.3                 | 100  | 100  | 0                 | 70.6 | 69.4 | 17.2               | 22.8 | 30.6 | 19.3            | 33.6 | 47.1 |
| FE02*          | 5.7                   | 12.0 | 59.7 | 48.3                 | 100  | 100  | 0                 | 5.7  | 4.9  | 8.2                | 16.3 | 23.1 | 14.5            | 35.6 | 56.8 |
| FE03*          | 49.5                  | 55.7 | 59.7 | 65.7                 | 100  | 100  | 67.9              | 100  | 100  | 12.5               | 17.7 | 24.3 | 11.9            | 24.4 | 42.2 |
| FE04**         | 11.9                  | 16.4 | 13.4 | 8.68                 | 22.5 | 33.6 | 1.3               | 4.6  | 0.4  | 10.4               | 14.5 | 13.2 | 10.2            | 19.0 | 48.3 |

\* Fusarium permambucanum (FIESC17), \*\* Fusarium sulawesiense (FIESC16)



圖六、洋香瓜果腐病對藥劑之感受性測試，以四氯異苯腈為例。培養皿上數字表示藥劑的處理濃度 (ppm)。

Fig 6. The fungicide (chlorothalonil) sensitivity test of the isolates of Fusarium rot disease on muskmelon. The numbers mean the different concentration (ppm) treatments of chlorothalonil.

## 結論與建議

2019 年起發現本場轄區內有多起洋香瓜果腐的情形，依據農民經驗較常於果實成熟後期、出現傷口的裂果及甜度高的品系 (如：臺南 14 號) 上發現。由於洋香瓜係高收益農產品，使得農民多使用單株留單果的栽種方式提升果實的商品價值<sup>(2,6)</sup>，然而此病害常發生於採收期，此時農民已留果完成，將直接衝擊收益。本研究證實其病原菌為 *F. sulawesiense* (FIESC 16) 及 *F. pernambucanum* (FIESC 17)，造成果表出現褐斑、水浸狀凹陷、白色至粉色棉花狀的氣生菌絲等果實腐敗情形，切開內部組織有褐化現象。*F. sulawesiense* (FIESC 16) 原始發表自香蕉枯萎病樣本<sup>(18)</sup>，近年在巴西則有多起造成甜瓜果腐的紀錄<sup>(17,19,21)</sup>；*F. pernambucanum* (FIESC 17) 原始發表菌株寄主為柑黑刺粉蟲 (*Aleurocanthus woglumi*)<sup>(25)</sup>，分別在中國、泰國、巴西都有造成洋香瓜果腐的紀錄<sup>(15,19,32)</sup>。觀察國外案例及本研究樣本，發現 *F. pernambucanum* 是造成此病害的優勢菌株，然形成原因有待釐清。

FIESC 的鑑定特徵是大孢子的背腹曲率和厚膜孢子是單個或成鍊或團塊<sup>(28)</sup>，而部分類群缺乏小孢子 (如 *F. arcuatisporum*、*F. citri*、*F. compactum*、*F. guilinense*、*F. hainanense*、*F. humuli*、*F. incarnatum*、*F. ipomoeae*、*F. irregulare*、*F. luffae* 等)。*F. sulawesiense* 及 *F. pernambucanum* 兩菌株於 PDA 上的菌絲生長形態類似，生長速度種內變異大無法作為鑑定依據 (圖三)，孢子都屬鐮刀形大孢子、缺乏小孢子、孢子大小及隔數都有重疊<sup>(19)</sup> (圖四)，不易從形態準確鑑定兩種。兩者親緣關係上相近 (圖五)，在部分文獻中甚至會將兩者混為同一類群<sup>(28)</sup>，但本研究發現兩者在藥劑的感受性上差異極大 (表二、表三)，支持兩者為 2 個種，為明確分別兩者的防治策略，進行此類群研究時，應佐以分子親緣分析。

網紋洋香瓜幼果在開花授粉後 10-20 天生長最旺盛<sup>(2)</sup>，過程中約於開花後 7-10 天，因果實內部組織發育較表皮慢，表皮硬化後內部持續發育撐裂表皮，產生傷口，木栓化後形成網紋<sup>(4)</sup>。由於此病原菌較容易侵入有傷口的成熟果實造成腐敗，在幼果上不容易擴展的特性 (圖二)，加上 Nogueira 氏等人 (2022) 證實 FIESC 的致病性與果實硬度有關與果實糖度無關。推測潛伏於環境中的病原菌，

在洋香瓜裂網紋時入侵傷口感染，待果實接近成熟果體軟化時，病程開始迅速發展。然而，巴西栽種的甜瓜以光皮品系為主<sup>(17)</sup>，減少了自行產生傷口造成潛伏感染的風險，才會導致果實抵達進口國後(即儲藏後期)，因果實軟化後病害才發生。

由於此病害主要發生於採收期，發病後該果實即無商品價值，建議於果實裂網紋期就預防性施藥。四氫異苯腈為廣效性、多作用點型的保護性殺菌劑，較無抗藥性疑慮<sup>(1)</sup>，且對 *F. pernambutanum* 有顯著的殺菌效果(表二、表三)，適合預防性施藥。考量此藥物對 *F. sulawesiense* 效果不佳，目前尚未發現抑制效果較佳藥劑(表二、表三)，需輔以系統性用藥來預防發生。田區發生病害時，基於 *Fusarium* 的傳播特性，風雨可能造成田區內二次感染，病果務必即時移出田區，切勿隨地丟置。

綜合以上，臺灣的洋香瓜果腐病由 *F. sulawesiense* (FIESC 16)與 *F. pernambutanum* (FIESC 17) 引起。依目前研究結果建議於果實裂網紋期全株預防性輪用四氫異苯腈、系統性殺菌劑 2-3 次，每次間隔 1 週，應可有明顯的防治效果。結果期發現罹病果應及時移除，並確實移出田區避免二次感染。未來將繼續研究對 *F. sulawesiense* 有效的防治藥劑並完成該菌的病原性測定，探討病原菌在環境中的儲藏地及傳染途徑，同時測試孢子、菌絲生長條件，提供農民合理用藥建議及儲藏期防治策略。

## 參考文獻

1. 李敏郎 2009 植物殺菌劑之使用介紹 行政院農委會藥毒所農藥應用組  
<https://www.tactri.gov.tw/Uploads/Item/9a600671-7a30-4b8a-a496-1abee35a6565.pdf>。
2. 黃瑞彰 2019 洋香瓜土壤管理與施肥推薦參考資訊 p.61-80 作物土壤管理與施肥技術(蔬菜與雜糧篇) 湯雪溶編 農業試驗所 臺中市。
3. 鄭安秀、黃圓滿、黃瑞彰、陳昇寬、彭瑞菊 2009 洋香瓜安全生產管理 臺南區農業改良場技術專刊 137: 1-25。
4. 蔡竹固 2009 網紋不良 植物保護圖鑑系列 19-甜瓜保護 林正忠編 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 臺北市。
5. 戴振洋、蔡宜峰、陳俊位 2010 一種提昇瓜果品質養液添加劑 臺中區農業專訊 75: 11。
6. 戴振洋、陳令錫 2019 不同留蔓及留果數對設施東方甜瓜品種間生育之影響 臺中區農業改良場研究彙報 145: 53-63。
7. Abd Murad, N. B., Mohamed Nor, N. M. I., Shohaimi, S. and Mohd Zainudin, N. A. I. 2017. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fruit rot disease in banana across Peninsular Malaysia. *J Appl Microbiol.* 123: 1533-1546.
8. Avila, C. F., Moreira, G. M., Nicolli, C. P., Gomes, L. B., Abreu, L. M., Pfenning, L. H., ... and Del Ponte, E. M. 2019. *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with Brazilian rice: Phylogeny, morphology and toxigenic potential. *Int J Food Microbiol.* 306: 108267.

9. Cao, P., Li, C., Xiang, W., Wang, X. and Zhao, J. 2019. First report of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex causing fruit rot on muskmelon (*Cucumis melo*) in China. *Plant Dis.* 103: 1768.
10. Castellá, G. and Cabañes, F. J. 2014. Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolated from spanish wheat. *A Van Leeuw J Microb.* 106: 309-317.
11. Chang, X., Yan, L., Naeem, M., Khaskheli, M. I., Zhang, H., Gong, G., Zhang, M., Song C., Yang W., Liu T. and Chen, W. 2020. Maize/soybean relay strip intercropping reduces the occurrence of *Fusarium* root rot and changes the diversity of the pathogenic *Fusarium* species. *Pathogens.* 9: 211.
12. Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microb.* 61: 1323-1330.
13. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S.* 41: 95-98.
14. Ismail, S. I., Noor Asha, N. A. and Zulperi, D. 2021. First report of *Fusarium incarnatum-equiseti* Species complex causing leaf spot on rockmelon (*Cucumis melo*) in Malaysia. *Plant Dis.* 105: 1197.
15. Khuna, S., Kumla, J., Thitla, T., Nuangmek, W., Lumyong, S. and Suwannarach, N. 2022. Morphology, molecular identification and pathogenicity of two novel *Fusarium* species associated with postharvest fruit rot of cucurbits in northern Thailand. *J. Fungi.* 8: 1135.
16. Leslie, J. F., & Summerell, B. A. 2006. *Fusarium semitectum* Berkeley & Ravenel. p.248-249. In: *The Fusarium laboratory manual.* Blackwell Publishing Professional. USA.
17. Lima, E. N., Oster, A. H., Bordallo, P. N., Araújo, A. A., Silva, D. E. and Lima, C. S. 2021. A novel lineage in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex is one of the causal agents of *Fusarium* rot on melon fruits in northeast Brazil. *Plant Pathol.* 70: 133-143.
18. Maryani, N., Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Crous, P. W. and Kema, G. H. J. 2019. New endemic *Fusarium* species hitch-hiking with pathogenic *Fusarium* strains causing Panama disease in small-holder banana plots in Indonesia. *Persoonia.* 43: 48-69.
19. Medeiros Araujo, M. B., Moreira, G. M., Nascimento, L. V., Nogueira, G. D. A., Nascimento, S. R. D. C., Pfenning, L. H. and Ambrósio, M. M. D. Q. 2021. *Fusarium* rot of melon is caused by several *Fusarium* species. *Plant Pathol.* 70: 712-721.
20. Namisy, A., Rakha, M., Hsu, W. C. and Chung, W. H. 2022. First Report of *Fusarium incarnatum-equiseti* Species Complex Causing Fruit Rot on Muskmelon in Taiwan. *Plant Dis.* doi: 10.1094/PDIS-12-21-2624-PDN.
21. Nogueira, G., Conrado, V. S. C., Freires, A. L. D. A., de Souza, J. J. F., Figueiredo, F. R. A., Barroso, K. A., ... and Ambrosio, M. M. Q. 2022. Aggressivity of different *Fusarium* species causing fruit rot in melons in Brazil. *Plant Dis.* ja.

22. Nuangmek, W., Aiduang, W., Suwannarach, N., Kumla, J., Kiatsiroat, T. and Lumyong, S. 2019. First report of fruit rot on cantaloupe caused by *Fusarium equiseti* in Thailand. *J Gen Plant Pathol.* 85: 295-300.
23. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 2044-2049.
24. Oster, A. H., Silva, E. D. O., Bordallo, P. D. N., Zocolo, G. J., da Silveira, M. R. S., Oiram Filho, F. and de Araújo, A. A. C. 2018. Luz ultravioleta pulsada no controle de podridão pós-colheita e na qualidade de melão para exportação. *Embrapa Agroindústria Tropical - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.*
25. Santos, A. C. D. S., Trindade, J. V. C., Lima, C. S., Barbosa, R. D. N., da Costa, A. F., Tiago, P. V. and de Oliveira, N. T. 2019. Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil. *Mycologia.* 111: 244-259.
26. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725-2729.
27. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
28. Wang, M. M., Chen, Q., Diao, Y. Z., Duan, W. J. and Cai, L. 2019. *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. *Persoonia.* 43: 70-89.
29. Wang, M. M., Crous, P. W., Sandoval-Denis, M., Han, S. L., Liu, F., Liang, J. M., ... and Cai, L. 2022. *Fusarium* and allied genera from China: species diversity and distribution. *Persoonia.* 48: 1-53.
30. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J., Innis, M. A., Gelfand, D. H. and Sninsky, J. J. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications.
31. Xia, J. W., Sandoval-Denis, M., Crous, P. W., Zhang, X. G. and Lombard, L. 2019. Numbers to names-restyling the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Persoonia.* 43: 186-221.
32. Zhang, X. P., Xia, J. W., Liu, J. K., Zhao, D., Kong, L. G. and Zhu, X. P. 2022. First report of *Fusarium pernambucanum* causing fruit rot of muskmelon in China. *Plant Dis.* ja.

# Characteristics and Fungicides Sensitivity of *Fusarium incanatum-equiseti* Species Complex which Causing Muskmelon Fruit Rot Disease in Taiwan<sup>1</sup>

Yu-Fang Huang<sup>2</sup>, Chao-Jen Wang<sup>2</sup> and Hui-Ru Pan<sup>3</sup>

## ABSTRACT

A newly emerging disease with brown spots and water-soaked symptoms on muskmelon has been reported in the central region of Taiwan since 2019. The fruits showed crack and rot symptoms and made severe losses to the yield. The symptoms are similar to the *Fusarium incanatum-equiseti* species complex (FIESC) which has been published to cause the fruit rot disease in Taiwan in 2022. To clarify the characteristics and controlling methods of this pathogen, four isolates were collected from the diseased fruit samples in Changhua County (Tianwei and Xiushui Township) and Taichung City (Wuri and Wufeng Dist.), respectively. The pathogenicity test results indicated that the FE01 isolate, using spores or mycelium as an inoculum source, could infect the muskmelon fruits without wounds and causing the same fruit rot symptoms in the field. These isolates could produce abounded aerial hyphae with white, light orange to pink color on Potato Dextrose Agar medium and accumulated yellow pigment on the back side of the medium. The macroconidia and chlamydo-spore were found in all tested isolates, and no microconidia were observed. The multiple sequence alignment method was used in this study with internal transcribed spacer region (ITS),  $\beta$ -tubulin2 (TUB2), and translation elongation factor 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ) gene sequences. The phylogeny results indicated that the four isolates could be attributed to *Fusarium sulawesiense* (FIESC 16) and *F. pernam-bucanum* (FIESC 17) in *Fusarium incanatum-equiseti* species complex (FIESC). Moreover, the sensitivity of FIESC isolates on five fungicides (trifloxystrobin, chlorothalonil, carbendazim, fluxapyroxad and fluopyram) were evaluated with the inhibition efficacy on mycelial growth rate and spore germination rate. The results indicated that the Tianwei isolate strongly resisted trifloxystrobin and carbendazim. Furthermore, the inhibition ability of fluxapyroxad and fluopyram was not practical for the tested isolates. The chlorothalonil had a significant inhibition efficiency on *F. pernam-bucanum*, but not on *F. sulawesiense*.

**Keywords:** Muskmelon fruit rot disease, *Fusarium incanatum-equiseti* species complex, fungicides sensitivity, *Fusarium sulawesiense* · *Fusarium pernam-bucanum*

---

<sup>1</sup>Contribution No.1059 from Taichung DARES, COA °

<sup>2</sup>Research assistant and Assistant Researcher of Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA.

<sup>3</sup>Assistant Researcher of Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, COA.