

## 胡蘿蔔酸腐病之發病生態及防治

吳慧珍<sup>1</sup>、陳子偉<sup>1</sup>、吳文希<sup>1,2</sup>

1. 臺北市 國立臺灣大學植物病理系

2. 聯絡作者：電子郵件 hoganwu@ccms.ntu.edu.tw；傳真 23660148

接受日期：中華民國 88 年 3 月 1 日

### 摘 要

吳慧珍、陳子偉、吳文希. 1999. 胡蘿蔔酸腐病之發病生態及防治. 植病會刊 8:1-8.

胡蘿蔔酸腐病 (sour rot) 於 1996 年在傳統市場被發現，本省的胡蘿蔔在此之前尚無此病害之記載。病原經鑑定係 *Geotrichum candidum* Link ex Pres.。病徵最初為水浸狀，至發病後期在感染部位會形成一薄層白色菌體，似乳酪狀，被害組織迅速崩解腐爛，並流出強烈酸味汁液。本病最適致病溫度為 28 C，於 20 C 以下時發病程度減緩，於 4 C 以下時則無法發病。胡蘿蔔在相對濕度 (RH) 100% 與 RH 75.5% 之情況下，發病程度無顯著地 ( $P=0.05$ ) 差異；但胡蘿蔔在 15 C，RH 100% 時發病率低，而 RH 70.0% 的條件下，幾乎不發病。得知此病原可在低濕度環境下生存，而且溫度為發病的主因。10 ppm 之 fenpropimorph 和 flutriafol 即具有防治 *G. candidum* 之功效。從胡蘿蔔表皮上分離的拮抗菌，經對峙及共同培養篩選出 *Pseudomonas fluorescens* #52 及 *Bacillus amyloliquefaciens* #224 菌株，均可造成本病原之菌絲變形、分支膨大、孢子凹陷及減少等現象，彼等均具減緩發病速率之效果。

關鍵詞：胡蘿蔔酸腐病、*Geotrichum candidum*、發病生態、防治

### 緒 言

胡蘿蔔 (*Daucus carota* L. var. *sativa* DC) 為繖形科胡蘿蔔屬之一、二年生草本植物，原產於歐洲溫帶地區及北非、西亞等地。於 1895 年自日本引進台灣，主要栽培區有雲林縣、台南縣及彰化縣，佔全省栽培面積的 90% 以上。胡蘿蔔由於耐貯藏運輸，不但供應內銷市場，更為少數幾種具有鮮菜外銷的蔬菜之一，主要的輸出地包括日本與香港等地 (1)。胡蘿蔔的貯藏性病害，包括細菌性軟腐病、黑腐病、灰黴病及根腐病等，而酸腐病 (sour rot) 最早於 1962 年發生在美國加州地區 (29)，陸續於巴西、加拿大、英國、義大利、德國、澳洲 (7)、以色列、日本 (3) 及台灣 (2) 等地均有相關的報導。*Geotrichum candidum* Link ex Pres. 最適生長溫度為 28~32 C，於不同的酸鹼度 (pH) 環境下適應性廣，最適 pH 為 6~9 (3)。可危害的寄主範圍多為柑橘品種，如檸檬、酸橙、甜橙、葡萄柚及寬皮柑等，均造成強烈酸味的腐敗 (23)；而在蘋果上可形成褐斑；危害蕃茄則造成瘡痂；被害甜香瓜呈水浸狀 (23)；危害的作物尚有甜椒、豌豆及荔枝等，主要是感染成熟或落地的果實 (3)。胡蘿蔔酸腐病以往在本省並無報導，二年前於傳統市場發現此病時，曾作過田間調查，得知此病多在貯藏期間發生 (2)，於田間甚少發生。為減少此病之發生數量及速率，因而相關防治之道為本研究之當務之急；

此病因係貯藏性病害，故胡蘿蔔之貯藏環境條件對病害發病的嚴重度極具重要，如溫度與濕度的控制，均會影響胡蘿蔔貯藏期間的品質與病害的蔓延，所以乃探討溫度與濕度對病害發展的影響；其次為增加防治成效，故殺菌劑與拮抗菌的篩選及應用，亦一併探討以期達到防治病害與降低病害發病速率之效果。

### 材料與方法

#### 病原之分離及鑑定

於傳統市場內取得發病的胡蘿蔔組織，從被感染的胡蘿蔔表皮或內部切取受害組織，培養於馬鈴薯瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA) 上分離，所得菌株以單孢分離，移殖至 PDA 斜面試管內，置放於 28 C 恆溫生長箱中，培養 7 天後，作為往後接種試驗之接種源。將分離培養之菌株以柯霍氏法則確認其對胡蘿蔔的病理性。

#### 溫度對胡蘿蔔酸腐病發病之影響

選擇胡蘿蔔直徑大小一致的根部，切成大約 3 cm 高的圓柱形，以 1% 次氯酸鈉浸泡 15~20 分鐘後，以無菌水沖洗三次，待乾燥後，以直徑 0.6 cm 的打孔器，在組織橫

切面上造成約 1 cm 深的傷口。將分離純化後的菌株培養於 PDA 平板 (直徑 9 cm), 置於 28 C 恆溫生長箱中, 約七天後, 以無菌水洗出孢子, 濃度調整稀釋為  $1 \times 10^4$  spores/ml 之孢子懸浮液, 作為接種源, 在供試組織傷口內接種 0.5 ml 之孢子懸浮液, 而對照組則接種無菌水, 每處理有四重複。接種後之組織放入已滅菌之高腰培養皿 (100 × 80 mm), 以小培養皿 (直徑 5 cm) 將組織墊高, 倒入無菌水密封後使組織保持在相對濕度 100% 環境中, 分別置放在 28 C、25 C、16 C、12 C、及 4 C 的恆溫生長箱, 觀察發病情形。試驗重覆二次。病害嚴重度之記錄分為 6 級: 0 = 無病徵; 1 = 1~20% 面積之供試組織發病; 2 = 21~40% 面積之供試組織發病; 3 = 41~60% 面積之供試組織發病; 4 = 61~80% 面積之供試組織發病; 5 = 81~100% 面積之供試組織發病。結果以鄧肯氏新多變域測試 (Duncan's new multiple range test) 分析不同溫度對胡蘿蔔酸腐病發生之影響。

### 相對濕度對胡蘿蔔酸腐病發病影響

利用不同化合物之飽和溶液調配不同相對濕度之環境; 即在 25 C 貯藏條件中, 相對濕度 100%、96.0%、85.0%、80.0%、75.5% 及 62.5% 的環境, 依序分別以水、磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、氯化鉀 (KCl)、硫酸銨 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )、氯化鈉 (NaCl) 及硝酸銨 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 之飽和溶液調控; 而於 15 C 貯藏環境之相對濕度 100%、99.0%、95.5%、86.5%、76.0% 及 70% 的環境, 則依序分別以水、磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )、氯化鉀 (KCl)、氯化鈉 (NaCl) 及硝酸銨 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 之飽和溶液調控。以上述同樣的方法接種胡蘿蔔, 置於已盛有各種不同的相對濕度飽和溶液之高腰培養皿內, 以小培養皿墊高已接種的組織, 每處理四重複。接種完成後, 分別置放於 15 C 及 25 C 的恆溫生長箱中, 並觀察發病情形。試驗重覆二次。病害嚴重度之分級方法及結果分析均如前述。

### 化學藥劑在固體培養基中之篩選測試

選擇國外推廣用於酸腐病之二種化學藥劑 (9), 分別為 fenpropimorph (75% a.i., Corbel, Mistral) 及 flutriafol (12.5% a.i., Impact), 將其分別配成三種有效濃度 (active ingredient, a.i.) 即 10、50、100 ppm, 分別加入已高溫高壓滅菌過盛有 100 ml PDA 之 250 ml 三角瓶中, 並倒入培養皿 (直徑 9 cm) 中製成平板 (25 ml/皿), 不添加藥劑之 PDA 平板為對照組; *G. candidum* 在 PDA 平板上於 28 C 培養七天後, 以直徑 0.6 cm 之打孔器切取菌落邊緣, 將菌絲塊置放於供試平板中間, 每種有效濃度處理有四重複, 放置於 28 C 恆溫生長箱中, 10 天後, 測量菌落直徑, 試驗重覆二次。並以鄧肯氏新多變域測試, 分析化學藥劑對 *G. candidum* 生長速率之影響結果。

### 化學藥劑防治胡蘿蔔酸腐病之成效測定

先將二種供試之藥劑 fenpropimorph 及 flutriafol 配製成有效濃度為 10、50、及 100 ppm。在如前述處理之胡蘿蔔上接種病原後, 在傷口處分別加入 0.5 ml 不同有效濃度之藥劑溶液, 而發病對照組 (DCK) 僅接種病原無藥劑處理, 健康對照組 (HCK) 以無菌水接種, 每一處理四重複, 處理後之供試組織置放於高腰培養皿中, 以小培養皿將組織墊高, 並加入無菌水, 再將高腰培養皿密封, 以維持相對濕度為 100% 的培養條件, 置於 28 C 恆溫生長箱中, 10 天後, 觀察發病情形, 試驗重覆二次。結果以鄧肯氏新多變域測試, 分析化學藥劑防治酸腐病之效果。病害嚴重度之分級方法如前述。

### 拮抗菌之篩選

將胡蘿蔔根部表皮及根頭, 分別置放於裝有 100 ml 無菌水之三角瓶中, 經充份震盪後, 各取出 1 ml 懸浮液加入 9 ml 無菌水中, 連續稀釋至  $10^{-4}$ , 吸取 0.1 ml 稀釋液, 以三角玻璃棒均勻塗抹於 PDA 平板上之後, 置於 28 C 恆溫生長箱內培養 2~3 天, 挑取 PDA 平板上長出的微生物, 並移植於 PDA 斜面, 以供測試之用。 *G. candidum* 培養在 PDA 平板上在 28 C 於七天後, 以打孔器切取直徑 0.6 cm 之菌絲塊, 置放於 PDA 平板中央, 距中央 3 cm 處之四周分別接種所分離得到的微生物, 放置在 28 C 恆溫生長箱中, 對峙培養 5~7 天, 觀察是否有抑制區 (inhibition zone) 的產生。將具有抑制 *G. candidum* 生長能力之微生物, 再用同樣方法, 在 PDA、soil-extract agar (SA)、20% V-8、corn meal agar (CMA)、carrot agar (CA) 及半量 Czapek-Dox agar (1/2CZ) 等 6 種培養基上測試, 對照組只接種 *G. candidum*, 每一處理為四重複, 於 28 C 恆溫生長箱中培養 5~7 天後, 觀察拮抗情形。將之前對峙培養初步篩選出微生物分離株, 以無菌水調製濃度約為  $1 \times 10^9$  cfu/ml 之懸浮液; 而後將培養於 PDA 平板上 7 天之 *G. candidum*, 以直徑 0.6 cm 之打孔器切取菌落邊緣, 將菌絲塊浸於各待測微生物之懸浮液中, 20 分鐘後取出置放在前述 6 種供試培養基中央, 於 28 C 恆溫生長箱中培養並觀察拮抗情形。試驗重覆二次。

### 生物檢定 (bioassay)

將供試的 *G. candidum* 菌株培養於 PDA 平板上, 置放 28 C 恆溫生長箱中, 待菌絲長滿平板 (約 7 天) 後, 以無菌水沖洗之, 將濃度調配成  $1 \times 10^4$  spores/ml 之孢子懸浮液, 作為接種來源; 將篩選出編號 26、34、52 及 224 號之拮抗菌株, 分別以無菌水調整濃度約為  $1 \times 10^9$  cfu/ml 之細菌懸浮液; 如同測試化學藥劑在胡蘿蔔上防治效果般, 即在傷口處先接種病原孢子懸浮液約 20 分鐘後, 再分別接種 26、34、52 及 224 號等拮抗菌液, 而發病對照

組 (DCK) 為無添加拮抗菌液處理者，健康對照組 (HCK) 係以無菌水接種，每一處理四重複；接種後之組織置於已滅菌之高腰培養皿 (100×80 mm) 內，以小培養皿 (直徑 5 cm) 將組織墊高，倒入無菌水並密封之，使組織保持在相對濕度 100% 環境中，分別置放在 28 C 的恆溫生長箱中，四天後觀察拮抗菌減緩或抑制酸腐病的發病程度。本試驗重覆二次。病害嚴重度之分級方法及防治效果之分析如同前述。

### 拮抗菌之鑑定

將經生物鑑定篩選出較具功效的菌株，編號為 52 及 224 號之拮抗菌株，進行革蘭氏染色法 (Gram stain)，分別將細菌懸浮液滴於載玻片上風乾固定後，以 Huckert's ammonium oxalate crystal violat 試劑作用 1 分鐘後，以蒸餾水洗滌，將多餘水份用濾紙吸乾，再滴 Gram's modification of Luqol's solution 反應 1 分鐘後，以蒸餾水沖洗數秒，濾紙吸乾多餘水份後，以 95% 酒精脫色 30 秒，至載玻片上之顏色褪去為止，最後用 safranin solution 進行複染約 20 秒，以蒸餾水沖洗、濾紙吸乾後，至光學顯微鏡下觀察其顏色，以辨識其為革蘭氏陽性菌或陰性菌。若供試拮抗菌株為革蘭氏陽性菌，則將之培養於 BUGM + 1% Glucose 培養基 (BUGM, Biolog Inc., 調整 pH 值至 7.3~7.4)，若為革蘭氏陰性菌則培養於 BUGM 培養基中，置於 28 C 恆溫生長箱中培養，18 小時後，以無菌棉花棒於培養基上沾取拮抗菌，於無菌食鹽水 (0.85%) 中稀釋，使用光度計 (波長為 590 nm) 調整細菌懸浮液為適當的濃度 (革蘭氏陽性菌及革蘭氏陰性菌波長為 590 nm 下之光線穿透百分率，分別為 35~42% 及 53~59%)。將調整好之細菌懸浮液濃度，分別加入於 Microplate (Biolog Inc.) 中每穴 150 μl 菌液，置於 28 C 恆溫生長箱，4 小時後以細菌自動鑑定儀 (Microstation, Biolog Inc.) 分析判讀之。

### 拮抗作用之顯微觀察

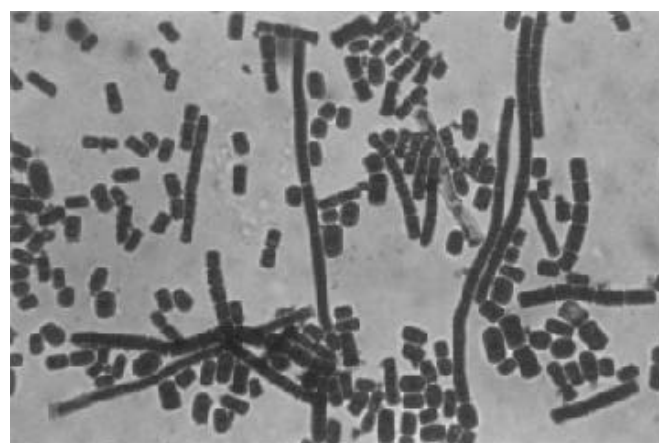
切取於 28 C 在 PDA 平板上培養七天之 *G. candidum* 菌絲塊，和拮抗菌 52 及 224 號分別於 PDA 平板上作定點共同培養，七天後將分別沾有拮抗菌 52 及 224 號之 *G. candidum* 菌絲塊取下，切成適當大小分別置於裝有 1% 鉬酸 ( $OsO_4$ ) 的玻璃瓶中，進行標本固定 2 小時後，以吸管吸出鉬酸；再分別以 50%、70%、85% 及 95% 的酒精進行脫水，每次 15 分鐘；後即用 100% 丙酮 (acetone) 脫水三次，每次 15 分鐘。將完成脫水後之標本，置入臨界點乾燥箱 (critical point dryer, Polaron E300) 以液態二氧化碳置換丙酮後，加熱成氣化二氧化碳後即完成乾燥的過程。將標本以雙面膠固定於試樣臺 (specimen stub) 上，於離子覆膜機 (ion coater JEC1500) 中，調整覆蓋之金箔厚度

為 300 nm 進行覆膜，標本完成後以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, JEOL T330A) 觀察。

## 結 果

### 病原之分離及鑑定

*Geotrichum candidum* 培養於平板上形成白色毛絨狀菌絲，培養後期並散發出強烈的酸味。分生孢子為斷生孢子或節孢子 (arthrospore)，呈圓筒狀或短桿狀 (圖一)，孢子大小為  $5\sim 15 \times 4\sim 8 \mu m$ 。依 De Hoog 等人 (10) 的方法鑑定為 *G. candidum*。將分離得到的菌體接種於胡蘿蔔上，觀察發病情形，接種 1~2 天後，胡蘿蔔立即產生病徵，最初為水浸狀病斑，至發病後期在感染部位形成一層白色菌體，被害組織迅速崩解腐爛並流出強烈的酸味汁液。



圖一、*Geotrichum candidum* 培養在 PDA 上之孢子形態 (×400)。

Fig. 1. Morphology of arthrospores of *Geotrichum candidum* on PDA medium (×400).

### 溫度對胡蘿蔔酸腐病發病之影響

胡蘿蔔在溫度呈 25 C 及 28 C 的條件下，接種 *G. candidum* 一天後，在傷口處周圍首先出現水浸狀病斑，二天後即產生白色菌體，四天後組織橫切面已完全被菌體所佔滿，且內部組織腐爛崩解並流出強烈酸味汁液；而在 20 C 的環境中，*G. candidum* 造成胡蘿蔔發病速率減緩，在接種三天後才出現輕微的病徵；當貯藏環境為 12 C，則幾乎不發病；而在 4 C 時，病害即無法形成 (表一)。

### 相對濕度對胡蘿蔔酸腐病發病之影響

供試組織接種病原菌後，置於不同的相對濕度條件下，再分別置放在不同的貯藏溫度環境中；當貯藏溫度為 25 C，相對濕度 (RH) 為 100% 及 75.5% 的條件時，二者

表一、不同溫度對胡蘿蔔酸腐病發病之影響

TABLE 1. Effect of different temperatures on the development of carrot sour rot.

Temperature (C)	Disease severity <sup>1</sup>
28	4.67 a <sup>2</sup>
25	4.33 a
20	2.67 b
16	1.33 c
12	1.00 cd
4	0 d

<sup>1</sup>. Inoculated carrot root blocks were incubated; Disease severity: 0=no symptom; 1=1-20 % of tissues were infected; 2=21-40 % of tissues were infected; 3=41-60 % of tissues were infected; 4=61-80 % of tissues were infected; 5=81-100 % of tissues were infected.

<sup>2</sup>. Data, mean value of 4 replicates of 2 experiments, followed by the same letter were not significantly different by Duncan's new multiple range test ( $P=0.05$ ).

在發病嚴重度方面並無顯著地 ( $P=0.05$ ) 差異 (表二); 而溫度在 15 C, RH 100% 和 70% 所造成發病嚴重度均較 25 C 的貯藏條件下, 有明顯降低情形。

### 化學藥劑在固體培養基中之篩選測試

供試的二種化學藥劑 fenpropimorph 及 flutriafol, 對

表二、在 25 C 及 15 C 下不同相對濕度對胡蘿蔔酸腐病發病之影響<sup>1</sup>

TABLE 2. Effect of relative humidity on the development of carrot sour rot at 25 and 15 C.

RH (%)	Disease severity <sup>1</sup>	
	25 C	15 C
100.0	4.33 a	2.33 ab <sup>2</sup>
99.0	- <sup>3</sup>	3.33 a
96.0	4.33 a	-
95.5	-	3.33 a
86.5	-	1.67 ab
85.0	4.33 a	-
80.0	4.33 a	-
76.0	-	2.33 ab
75.5	4.00 a	-
70.0	-	1.00 c
62.5	3.00 a	-

<sup>1</sup>. Carrot tissues were incubated for 7 days. Disease severity: 0=no disease symptom; 1=1-20 % of tissues were infected; 2=21-40 % of tissues were infected; 3=41-60 % of tissues were infected; 4=61-80 % of tissues were infected; 5=81-100 % of tissues were infected.

<sup>2</sup>. Data, mean value of 4 replicates of 2 experiments, followed by the same letter were not significantly different by Duncan's new multiple range test ( $P=0.05$ ).

<sup>3</sup>. -: non- test.

*G. candidum* 菌絲的生長均有顯著地 ( $P=0.05$ ) 的抑制效果 (表三)。濃度 10 ppm 時即對菌絲生長有明顯的 ( $P=0.05$ ) 影響。濃度為 10、50、100 ppm 的 fenpropimorph 對抑制菌絲生長速率方面並無顯著的差異; 而 flutriafol 濃度為 50 ppm 時比 10 ppm 更可顯著 ( $P=0.05$ ) 有效地抑制菌絲之生長。比較二種藥劑, 相對地以 flutriafol 較具抑制 *G. candidum* 菌絲生長的效果。

表三、化學藥劑對 *Geotrichum candidum* 生長之影響TABLE 3. Effect of fungicides on the mycelial growth of *Geotrichum candidum* on potato dextrose agar.<sup>1</sup>

Fungicide <sup>2</sup>	Colony diameter (cm) at Conc. of fungicide (a. i., ppm)		
	10	50	100
Fenpropimorph	2.16 b <sup>3</sup>	2.69 b	2.20 b
Flutriafol	2.49 b	1.05 c	1.08 c
Control	8.23 a	8.23 a	8.23 a

<sup>1</sup>. Colony diameter was measured 14 days after incubation at 28 C.

<sup>2</sup>. Each fungicide was added to PDA with the concentration of 10, 50, 100 ppm (a. i.), respectively; PDA did not amend with fungicides was used as controls.

<sup>3</sup>. Data, mean value of 4 replicates of 2 experiments, followed by the same letter were not significantly different by Duncan's new multiple range test ( $P=0.05$ ).

### 化學藥劑對防治胡蘿蔔酸腐病之成效測定

Fenpropimorph 及 flutriafol 對胡蘿蔔酸腐病均具有顯著地 ( $P=0.05$ ) 防治效果 (表四)。Flutriafol 濃度為 50 ppm 時, 此病的發病情形已顯著地 ( $P=0.05$ ) 比 Fenpropimorph 之防治效果減緩; 濃度若為 100 ppm 時, 則可完全達到防治效果 (圖二)。

### 拮抗菌之分離與篩選

從胡蘿蔔根表皮及根頭上所分離出的菌株, 經與 *G. candidum* 在 PDA 平板上對峙及定點共同培養後, 篩選出對 *G. candidum* 有拮抗作用, 能抑制菌絲正常生長的菌株共 10 株, 將此 10 株菌分別在 PDA、1/2 CZ、20% V-8、SA、CMA 及 CA 等 6 種培養基上, 作對峙及定點共同培養, 篩選出編號為 26、34、52、及 224 等四株拮抗力較強之菌株, 作為生物檢定之拮抗菌株。

### 生物檢定

將拮抗菌株 26、34、52 與 224 號, 接種於胡蘿蔔組織, 接種三天後, 於添加拮抗菌株之胡蘿蔔上, 發病嚴重度有明顯的 ( $P=0.05$ ) 趨緩現象, 尤以 52 及 224 號菌株最具有防治的效果 (圖三, 表五)。

表四、化學藥劑防治胡蘿蔔酸腐病之功效

TABLE 4. Effectiveness of fungicides to control carrot sour rot.<sup>1</sup>

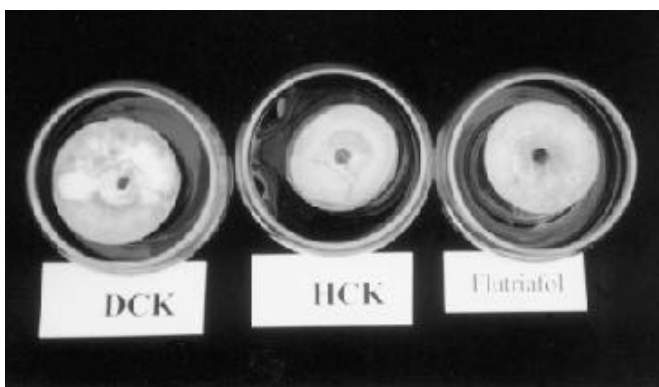
Fungicide <sup>2</sup>	Disease severity <sup>3</sup>		
	Conc. of fungicide (a. i., ppm)		
	10	50	100
Fenpropimorph	3.00 b <sup>4</sup>	2.33 b	0.67 c
Flutriafol	3.00 b	1.67 c	0 d
DCK	4.67 a	4.67 a	4.67 a
HCK	0 d	0 d	0 d

<sup>1</sup>. Disease severity was measured 14 days after incubation at 28 C.

<sup>2</sup>. Each fungicide was applied to carrot root blocks with the concentration of 10, 50, 100 ppm (a. i.), respectively; DCK: Each carrot root blocks was inoculated with 0.5ml *G. candidum* suspension ( $1 \times 10^4$  spores/ml); HCK: Each carrot root blocks was inoculated with 0.5 ml sterile distilled water.

<sup>3</sup>. Disease severity: 0= no disease symptom; 1=1-20 % of tissues were infected; 2=21-40 % of tissues were infected; 3=41-60 % of tissues were infected; 4=61-80 % of tissues were infected; 5=81-100 % of tissues were infected.

<sup>4</sup>. Data, mean value of 4 replicates of 2 experiments, followed by the same letter were not significantly different by Duncan's new multiple range test ( $P=0.05$ ).



圖二、Flutriafol (100 ppm) 防治胡蘿蔔酸腐病之效果。

Fig. 2. The effect of Flutriafol (100 ppm) to control carrot sour rot. DCK: disease control, HCK: health control.

### 拮抗菌之鑑定

經革蘭氏染色得知拮抗細菌 52 號為革蘭氏陰性菌，224 號為革蘭氏陽性菌。再以細菌自動鑑定儀分析，鑑定出細菌 52 號為 *Pseudomonas fluorescens*，224 號為 *Bacillus amyloliquefaciens*。

### 拮抗作用之微細觀察

*Pseudomonas fluorescens* # 52 及 *B. amyloliquefaciens* # 224 均可造成 *G. candidum* 菌絲的變形，使細胞壁破裂，

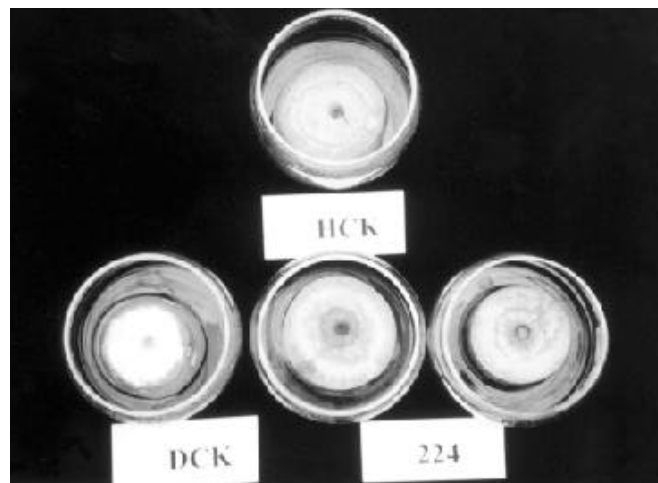
圖三、*Bacillus amyloliquefaciens* (#224) 防治胡蘿蔔酸腐病之效果。

Fig. 3. The effect of *Bacillus amyloliquefaciens* (#224) to control carrot sour rot. DCK: disease control, HCK: health control.

表五、拮抗微生物防治胡蘿蔔酸腐病之效果

TABLE 5. Effectiveness of microbial antagonists to control carrot sour rot<sup>1</sup>.

Antagonist <sup>2</sup>	Disease severity <sup>3</sup>
26	4.00 ab <sup>4</sup>
34	3.69 b
52	0.67 c
224	0.33 c
DCK (Disease control)	4.67 a
HCK (Health control)	0 c

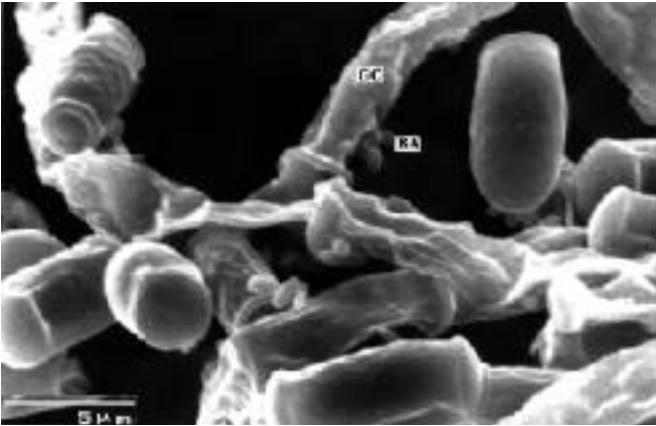
<sup>1</sup>. The concentration of *G. candidum* was  $1 \times 10^4$  spores / ml ; carrot roots were cut to produce a 1 cm deep cavity with a cork borer (0.6 cm in diameter at the center of the surface).

<sup>2</sup>. Carrot roots were inoculated with 0.5ml ( $1 \times 10^9$  cfu / ml suspension) of antagonists after the inoculation of pathogen ; DCK: carrot roots were only inoculated with 0.5 ml of *G. candidum* suspension ; HCK: carrot roots were inoculated with 0.5 ml of sterile distilled water.

<sup>3</sup>. Disease severity : 0 = no disease symptom ; 1=1-20 % of tissues were infected ; 2 = 21 -40 % of tissues were infected; 3 = 41-60 % of tissues were infected ; 4 = 61-80 % of tissues were infected; 5 = 81-100 % of tissues were infected.

<sup>4</sup>. Data , mean value of 4 replicates of 2 experiments, followed by the same letter were not significantly different by Duncan's new multiple range test ( $P=0.05$ ).

原生質流出，致使呈現中空狀，而令菌絲亦無法直接斷裂成孢子，造成孢子減少等現象；*P. fluorescens* # 52 及 *B. amyloliquefaciens* # 224 尚能附著並佔據 *G. candidum* 之菌絲表面，造成菌絲及孢子變形且凹陷，以及在分支處引起膨大的現象 (圖四)。



圖四、*Bacillus amyloliquefaciens* #224 佔據 *Geotrichum candidum* 菌絲表面，並造成菌絲凹陷變形的現象。

Fig. 4. *Bacillus amyloliquefaciens* #224 adhered to hyphal surface of *Geotrichum candidum*, and caused deformation of the fungal hyphae. GC=*Geotrichum candidum*, BA=*Bacillus amyloliquefaciens*.

## 討 論

作物貯藏性病害之嚴重度與重要性有日趨增加的現象，根據美國農業部 (U. S. Department of Agriculture survey, 1965) 的公佈，收穫後的作物包括蔬菜及果實在貯藏期間造成大約 23% 的損失，尤其在未開發的國家由於不良的貯藏環境條件與食品處理技術，在非洲地區已造成大約 30% 的產量損失 (28)。酸腐病 (sour rot) 為胡蘿蔔在本省的新病害，其病原依 De Hoog 等人 (10) 的方法鑑定為 *Geotrichum candidum*。本研究證實本病在高溫高濕的環境下易發生，故貯藏的環境條件是影響產品本身價值與病害發生的重要因素，其中尤以溫度的調控為防治胡蘿蔔酸腐病的關鍵因子，降低溫度不僅對病原生長速率有負面影響，且貯藏性作物對低溫之忍受性較高，因由於減緩其生理活動，而能保存較長久 (22)。本實驗將貯藏溫度控制在 4 C，相對濕度 100% 的條件中，*G. candidum* 無法造成胡蘿蔔酸腐病的發生，且供試胡蘿蔔組織仍呈飽滿結實狀態。一般而言，雖然當溫度適合於病害發生時，在相對濕度高的環境下，有助於病勢的發展 (22)；但若將胡蘿蔔置於高溫 (25~28 C) 時，不論相對濕度 (RH) 為 100% 或 RH 62%，酸腐病的發病嚴重度並無顯著地差異 (表二)；但將貯藏的溫度降至 15 C，在各種的相對濕度條件下，發病嚴重度都呈明顯地降低的情形 (表二)，故由此結果得知，*G. candidum* 可耐相對濕度低的環境，並且在其環境中有能力造成病害的發生；但若降低貯藏環境中之相對濕度，反而影響胡蘿蔔的外觀與品質，如造成組織水份喪失而呈萎縮等現象，故溫度的調控相對地較相對濕度重要，是為影響胡蘿蔔酸腐病病勢發展的主因。防治貯藏性病害的主要方法，包括使用化學藥劑、熱及放射線，其中尤以

化學藥劑的使用最為廣泛 (28)。Fenpropimorph 與 flutriafol 二種藥劑，在國外已被用於防治檸檬酸腐病、青黴病及綠黴病等病害 (9)，施用的濃度為 200 ppm 時，就可完全地抑制 *G. candidum* 菌絲的生長 (9)。本試驗將此二種化學藥劑，應用於防治胡蘿蔔酸腐病上，同樣地也展示出良好的防治效果。在未發現此二種藥劑用來防治酸腐病之前，guazatine 是唯一可有效防治酸腐病的藥劑 (9)，但此藥劑會造成輕微的植物毒性 (phytotoxicity)，且防治效果較 flutriafol 差，所以 fenpropimorph 與 flutriafol 應進一步被評估，是否可實際應用於防治胡蘿蔔酸腐病。關於蔬菜與果實等的貯藏性病害之生物防治，仍為相當新的研究領域 (27)，成功的實例如利用 *Trichoderma* sp. 防治柑橘綠黴病 (green mold)；而以 *Pseudomonas putida* 防治馬鈴薯軟腐病 (soft rot) (28)。本研究篩選獲得之 *P. fluorescens* # 52 與 *B. amyloliquefaciens* # 224，分別和 *G. candidum* 定點共同培養後，於掃描式電子顯微鏡下觀察，發現拮抗菌株具有佔據並附著於菌絲的表面，造成菌絲凹陷變形，引起分支膨大，菌絲無法直接斷裂成孢子，以至於孢子減少等拮抗能力。拮抗菌直接寄生於病原菌上為一重要的拮抗機制，如 *Pichia guilliermondii* 直接寄生於 *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. 的菌絲上，不但能與病原競爭營養份且能快速佔領組織傷口處，及具有強的附著病原菌絲的能力，並且能分泌細胞壁分解酵素 (27)。關於貯藏性病害之拮抗菌的篩選，也必須考慮到貯藏的條件是否適合拮抗菌之存活與繁殖，因此在篩選方面需找到能適應於低溫條件，且能有效地抑制病原生長的微生物 (28)。

關於胡蘿蔔貯藏性病害之防治應多方面考量及配合，以期更切實地防治相關之病害，如：(一) 收穫期間儘量避免傷口；(二) 實施貯藏前的保護措施，如化學藥劑的使用；(三) 注意胡蘿蔔的成熟度；如 *Mycocentrospora acerina* Deighton 感染胡蘿蔔幼嫩的組織時，所引起的病斑數目較老的組織為少，亦即老組織對 *M. acerina* 較為敏感 (8)；(四) 控制貯藏溫度及濕度；胡蘿蔔最佳的貯藏條件為 0 C 及 95~100% 相對濕度 (1)，低溫對組織的傷害較低，在高濕度的條件能維持組織的飽滿和充實性，否則在低濕環境中易造成組織重量減輕，反而增加胡蘿蔔發病的敏感度 (22)，故胡蘿蔔在貯藏環境合適下，對 *B. cinerea* 具有抗性；當相對濕度減少 8% 時，反而會增加對 *B. cinerea* 之敏感度 (13)。由於胡蘿蔔酸腐病在田間不易發生，所以收穫後的處理及貯藏期間的管理措施須相當的謹慎，如何提高貯藏作物之生理活性，以加強其對貯藏性病原的抵抗及傷口恢復的能力，達到防治或減緩病害的蔓延，為進一步尚須探討者。

## 引用文獻

1. 林棟樑. 1995. 台灣農家要覽農作篇 (二)-園藝作物類

- (蔬菜)：胡蘿蔔. P211-214. 行政院農業委員會編印. 台北市。
2. 吳慧珍、陳子偉、吳文希. 1997. 胡蘿蔔酸腐病之發病生態及防治. 植病會刊 6:202 (摘要)。
  3. 蔡志濃、謝文瑞. 1998. 荔枝酸腐病之發生及病原菌特性. 植病會刊 7:10-18。
  4. Baudoin, A. B. A. M., and Eckert, J. W. 1985. Development of resistance against *Geotrichum candidum* in lemon peel injuries. *Phytopathology* 75:174-179.
  5. Brown, G. E. 1979. Biology and control of *Geotrichum candidum*, the cause of citrus sour rot. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 92:186-189.
  6. Brown, G. E. 1985. Effectiveness of postharvest fungicides for the control of citrus fruit decays. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 98:208-211.
  7. Carmichael, J. W. 1957. *Geotrichum candidum*. *Mycologia* 49:820-830.
  8. Chalutz, E., and Wilson, C. L. 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis.* 74:134-137.
  9. Cohen, E. 1989. Evaluation of fenpropimorph and flutriafol for control of sour rot, blue mold, and green mold in lemon fruit. *Plant Dis.* 72:807-809.
  10. De Hoog, G. S., Simith, M. T., and Gueho, E. 1986. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. *Stud. Mycol.* 29:1-131.
  11. Dennis, C. 1983. Post-harvest Pathology of Fruits and Vegetables. Academic Press, London. Vol. 2. 416pp.
  12. Gutter, Y. 1981. Investigation on new postharvest fungicides in Israel. *Proc. Int. Soc. Citric.* 2:810-811.
  13. Harding, V. K., and Heale, J. S. 1980. Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.* 17:227-289.
  14. Jamaluddin, M. P., and Tandon, R. N. 1975. Rot of fruits of litchi (*Litchi chinensis*) in marketing processes. *Indian Phytopathol.* 28:530-531.
  15. Kitagawa, H., and Kawada, K. 1984. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. *Pro. Fla. State Hort. Soc.* 97:133-135.
  16. Mall, S., and Mall, O. P. 1982. Morphology and pathogenicity of *Geotrichum candidum* causing sour rot. *Indian Phytopathol.* 35:562-565.
  17. Mercier, J., and Arul, J. 1993. Induction of systemic disease resistance in carrot roots by pre-inoculation with storage pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* 15:281-283.
  18. Moline, H. E. 1984. Comparative studies with two *Geotrichum* species inciting postharvest decays of tomato fruits. *Plant Dis.* 68:46-48.
  19. Schachnai, A., and Barash, I. 1982. Evaluation of the fungicides CGA 64251, guazatine, sodium *o*-phenylphenate, and imazalil for control of sour rot on lemon fruits. *Plant Dis.* 66:733-735.
  20. Sitterly, W. R. and Shay, J. R. 1960. Physiological factors affecting the onset of susceptibility of apple fruit to rotting by fungus pathogens. *Phytopathology* 50:91-93.
  21. Stevens, C., Wilson, C. L., Lu, J. Y., Khan, V. A., Chalutz, E., Droby, S., Kabwe, M. K., Haumg, Z., Adeyeye, O., Pusey, L. P., Wisniewsk, M. E., and West, M. 1996. Plant hormesis induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. *Crop Prot.* 15:129-134.
  22. Sommer, N. F. 1982. Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruit. *Plant Dis.* 65:357-364.
  23. Suprpta, D. N., Arai, K., and Lwai, H. 1995. Parasitic specialization of *Geotrichum candidum* citrus race. *Mycoscience* 37:105-107.
  24. Suprpta, D. N., Arai, K., Lwai, H., and Matsuo, T. 1996. Change in susceptibility of satsuma mandarin fruit to sour rot pathogen (*Geotrichum candidum* citrus race) with relation to biochemical changes during maturation and storage. *Mycoscience* 37:209-216.
  25. Pusey, P. L., and Wilson, C. L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 68:753-756.
  26. Pusey, P. L., Wilson, C. L., Hotchkiss, M. W., and Franklin, J. D. 1986. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. *Plant Dis.* 70:587-590.
  27. Wilson, C. L., and Wisniewsk, M. L. 1994. Biological Control of Postharvest Disease Theory and Practice. CRC Press. U.S.A. 182pp.
  28. Wilson, C. L., and Pusey, P. L. 1985. Potential for biological control of postharvest plant disease. *Plant Dis.* 69:375-378.
  29. Wright, W. R., Smith, M. A., and Beraha, L. 1964. Sour rot of carrots. *Plant Dis. Rep.* 48:837-838.

## ABSTRACT

Wu, H. C.<sup>1</sup>, Chen, T.W.<sup>1</sup>, and Wu, W. S.<sup>1,2</sup> 1999. The etiology and control of carrot sour rot. *Plant Pathol. Bull.* 8:1-8. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan R. O. C. ; <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: hoganwu@ccms.ntu.tw , Fax No: 23660148)

In 1996, carrot sour rot was first found in the traditional market in Taipei. This disease was identified to be caused by *Geotrichum candidum* Link ex Pers. Carrot sour rot occurred mostly at the tip of the tap root. The early symptom was a water-soaked appearance on the infected tissue. A thin, cheese-like layer of white mycelium formed on the infected areas during the late stages of disease development. These diseased tissues were crumbly and rotted rapidly, exuding juices that smelled strongly sour. The optimal temperature for the disease development was 28 C. Below 20 C, disease severity was reduced. Carrot sour rot did not occur below 4 C. This disease occurred readily on carrot tissues under 28 C, regardless the relative humidity (e.g. 100% vs. 75.5%). While the storage condition was at 15 C, disease did not happen when the relative humidity was 70%, and disease was mild when RH was 100%. This simply indicated that temperature was the critical factor to affect the development of carrot sour rot. 10 ppm of Fenpropimorph (75% a. i., Corbel, Mistral) and flutriafol (12.5% a. i., Impact) were able to inhibit significantly the growth of *G. candidum*. Antagonistic microorganism isolates # 52 and # 224 were isolated from the surfaces of carrots and selected by means of dual and concomitant cultures. Both of them were able to cause the hyphae of *G. candidum* to become deformed, besides this occurred clarifying and swelling on the affected hyphae. The amount of sporulation was also reduced significantly. The two antagonistic isolates (i.e. #52 and #224) were identified as *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus amyloliquefaciens*, respectively, by BIOLOG system. They had the capability to reduce the disease severity in this test.

Key words : biocontrol, carrot sour rot, chemical control, etiology, *Geotrichum candidum*