

# 萵苣萎凋病菌的生理小種鑑定與抗病品種篩選

洪爭坊<sup>1,2</sup> 張碧芳<sup>1</sup> 黃久菱<sup>1,3</sup> 萬宥伶<sup>1</sup> 黃振文<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> 台中市 國立中興大學植物病理學系

<sup>2</sup> 行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所

<sup>3</sup> 行政院農委會動植物防疫檢疫局高雄分局

<sup>4</sup> 聯絡作者，電子郵件：jwhuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-1676

接受日期：中華民國 97 年 04 月 10 日

## 摘要

洪爭坊、張碧芳、黃久菱、萬宥伶、黃振文. 2008. 萵苣萎凋病菌的生理小種鑑定與抗病品種篩選. 植病會刊 17 : 233-242.

利用 Patriot、Costa Rica No. 4 及 Banchu Red Fire 等三種萵苣指標品種鑑別台灣採集之 11 個萵苣萎凋病菌菌株的生理小種，結果依照指標品種的抗感病性反應，可將 LFO 11-13 等 8 個菌株歸為生理小種一號 (race 1)；至於其餘三菌株 LFO 32-14、LFO 106-1 及 LFO 106-3 則歸為另一個新生理小種。然而，根據日本及義大利等學者所採用之萵苣萎凋病菌 race 1 的專一引子對進行分子檢測，卻無法將這 11 個台灣菌株區分開。此外，測試 30 個品種的萵苣對於萵苣萎凋病的抗感病性反應，結果發現嫩莖萵苣 (青竹筍及白竹筍品種)、包心妹萵苣及大陸妹萵苣屬於抗病品種 (罹病度為 0-20%)，而圓葉、劍葉、紅尖葉萵苣 (Indian lettuce) 等則屬於極感病品種 (罹病度為 80-100%)。

關鍵詞：萵苣、萵苣萎凋病、生理小種、抗病品種、分子鑑定、聚合酵素連鎖反應

## 緒言

萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 屬於菊科 (*Compositae*)，萵苣屬 (*Lactuca*) 之一或二年生蔬菜，在台灣的栽培面積約有二千六百多公頃，主要產地包括雲林縣西螺、二崙及土庫，彰化縣永靖，嘉義縣新港，台南市近郊，桃園縣八德鄉、桃園市近郊及台北市近郊等地<sup>(10)</sup>。由於利用網室栽植萵苣，不易與水稻輪作，因而常有土壤傳播性病害發生的問題，其中萵苣萎凋病是台灣夏季栽培萵苣的主要限制因子之一<sup>(7, 8, 18, 19)</sup>。

萵苣萎凋病最早於西元 1955 年在日本東京的萵苣田發現，並由 Motohashi 氏等學者<sup>(13)</sup> 報導此病害係由 *Fusarium* sp. 所引起。隨後 Matuo 與 Motohashi 兩氏<sup>(12)</sup> 將病原菌鑑定為 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*。近年來，在美國加州的萵苣栽培田也發現萵苣萎凋病的發生，Hubbard 與 Gerik 兩氏<sup>(9)</sup> 將該病的病原菌訂名為 *F. oxysporum* f. sp. *lactucum*；惟為尊重菌類命名優先權，筆者仍沿用日本學者 Matuo 與 Motohashi 所訂的

學名<sup>(12)</sup>。隨後西元 2002 年在義大利<sup>(5)</sup>，2003 年在美國亞利桑納等地<sup>(11)</sup> 也陸續發現本病害的發生。西元 1996 年台灣於雲林縣西螺鎮及桃園之設施蔬菜田，發現萵苣幼苗死亡，造成病田局部缺株；受害植株下位葉黃化，出現矮化、維管束褐變、萎凋及死亡等病徵，經鑑定後確認為萵苣萎凋病<sup>(7, 18, 19)</sup>。

許多研究報告指出本病原菌對不同品種萵苣的致病力有明顯差異，因此存在不同的生理小種<sup>(3, 4, 6, 8, 15, 18, 19, 21)</sup>。然而台灣萵苣萎凋病菌雖具有不同的菌落形態<sup>(7, 8, 18, 19)</sup>，卻不知是否有不同的生理小種存在。又台灣常栽培的萵苣品種對萵苣萎凋病的抗感病程度為何？這些問題迄今均無資料可考。因此，本研究的主要目的在於利用不同的萵苣指標品種鑑定台灣萵苣萎凋病菌的生理小種，並嘗試以日本 Shimazu 等氏<sup>(20)</sup> 及義大利 Pasquali 等氏<sup>(17)</sup> 所開發之分子檢測技術，進行輔助鑑定。另外，也測試不同品種萵苣對萎凋病的抗感病性反應，祈有助於提供台灣萵苣的栽培與育種工作的參考。

## 材料與方法

### 供試菌株來源

西元 2003 年間，由雲林縣西螺鎮、高雄縣梓官鄉、屏東縣新園鄉及彰化縣埤頭等地，採得罹病之高苣植株，以無菌水沖洗植株表面的土壤後，將多餘的水分吸乾，再以消毒過的小刀切取根莖內部褐變的維管束組織，以 1% (v/v) 次氯酸鈉溶液進行表面消毒 1 分鐘，再用無菌水漂洗三次。將消毒過的組織放於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar; WA, Difco™) 與五氯硝苯選擇性培養基平板 (PCNB)<sup>(4)</sup> 上，待長出菌絲後，在光學顯微鏡下，切取菌絲尖端，移植到馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA, Difco™) 之斜面培養基上，一星期後，刮取孢子進行單孢分離培養，經過三星期，隨即進行病原性檢測。各菌株的採集地點及時間如表一。此外，本試驗的主要供試菌株 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* LFO 11-13 及 LFO 32-14 菌株，係彭氏於雲林縣西螺鎮的高苣罹病植株分離獲得<sup>(18)</sup>，並保存於國立中興大學植物病理學系病害管理研究室。

### 供試菌株之保存方法

由台灣各地高苣萎凋病罹病株分離獲得的 11 個高苣萎凋病菌菌株 (表一)，經由柯霍氏法則確定其病原性後，保存於滅菌三次後的砂土培養基 (10% 砂土，1% 瓊脂，無菌水 1 L) 中。在試驗期間為避免 LFO11-13 與 LFO32-14 菌株發生突變及維持其野生型 (wild type)，每隔四至五週進行單孢更新培養於 PDA 斜面上，每日給予 12 小時光照 (間接日光或 2 支 40w 日光燈約 2000 ~ 3000 Lux)，溫度維持在 22-25°C。

表一、由台灣各地採集的高苣萎凋病菌供試菌株

Table 1. Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* collected from different locations of Taiwan in this study

Isolate	Location	Sampling time	Colony morphology
LFO 11-13	Shiluo township, Yunlin county	Jun., 1996	A <sup>1</sup>
LFO 32-14	Shiluo township, Yunlin county	Jun., 1996	B <sup>2</sup>
LFO 102-3	Tzguan shiang, Kaohsiung county	Sep., 2003	B
LFO 103-5	Shinyuan shiang, Pingtung county	Sep., 2003	B
LFO 103-6	Shinyuan shiang, Pingtung county	Sep., 2003	B
LFO 103-7	Shinyuan shiang, Pingtung county	Sep., 2003	B
LFO 104-1	Pitou shiang, Changhua county	Oct., 2003	B
LFO 105-1	Pitou shiang, Changhua county	Oct., 2003	A
LFO 106-1	Shiluo township, Yunlin county	Dec., 2003	A
LFO 106-2	Shiluo township, Yunlin county	Dec., 2003	A
LFO 106-3	Shiluo township, Yunlin county	Dec., 2003	B

<sup>1</sup> White to blue-purple colony with buff-yellow sporodochia on PDA.

<sup>2</sup> Peach-purple colony with orange sporodochia on PDA.

### 病菌土製作

將 LFO 11-13 等 11 個菌株的孢子懸浮液分別加入高溫高壓滅菌過的芹菜莖培養基中培養，二星期後，分別與消毒過的土壤 (壤土：河砂 = 3 : 1) 均勻拌合，保持適當濕度一個月後，以 128 目 (mesh) 的網篩篩過，置於陰涼處，作為供試病菌土<sup>(8, 18)</sup>，之後每個月以 PCNB 平板培養基檢測病菌土中的病原菌濃度<sup>(8, 18)</sup>，作為接種試驗的參考。

### 高苣萎凋病菌的生理小種鑑定

取 Patriot、Costa Rica No. 4 及 Banchu Red Fire 等三個高苣品種，作為鑑定生理小種之指標品種 (indicator cultivars)<sup>(4)</sup>。將催芽後的種子，分別播種於含有 LFO 11-13 等 11 菌株 (表一) 的病土 (10<sup>4</sup> cfu/g soil) 中，每處理有四重複，每重複有五棵植株。隨後移置於溫室中栽培四週後，依據 Fujinaga 氏等鑑別生理小種的方法<sup>(4)</sup>，調查植株發病情形，並將發病程度分為四個等級：0 級=無任何病徵 (no symptom)、1 級=維管束出現褐化 (vascular discoloration)、2 級=植株矮化及黃化 (plant stunting and yellowing)、3 級=植株死亡 (plant death)。然後依照下列公式換算各高苣品種的罹病指數 (Disease severity index)。Disease severity index =  $(n_0 \times 0 + n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3) / N$ 。其中， $n_0$ - $n_3$  = 各級罹病的植株數； $N$  = 總植株數。

### 菌絲總量核酸之萃取

修飾 Dellaporta 氏等<sup>(2)</sup> 之植物小量核酸 (DNA) 製備法，逐一抽取本研究各供試菌株之菌絲總量 DNA<sup>(1)</sup>。首先秤取乾燥菌絲 1.0 g，置於研鉢內，利用液態氮研磨成細粉，在菌絲即將水化時，加入 TNE

buffer 15 mL (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0; 50 mM NaCl; and 8  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol) 和 2 mL 的 10% SDS 研磨至起泡為止。把粗萃取液倒入體積 50 mL 之 Oak Ridge tube 中，置於 65°C 水浴器中 10 分鐘，每隔 1-2 分鐘取出搖晃均勻。之後加入 5 mL 的 5 M Potassium acetate (KOAc) 溫和地混合，再移至碎冰中置放 20 分鐘。以 10,000 $\times$ g 在 4°C 下離心 20 分鐘，把上清液盛於新的 Oak Ridge tube 中。加入與上清液等體積(約 10 mL) 且預冷(-20°C) 過的異丙醇(isopropanol) 溫和搖晃均勻，在-20°C 放置 20 分鐘；接著以 10,000 $\times$ g 在 4°C 下離心 30 分鐘，倒掉上清液。以 1 mL 現配的 75% 酒精清洗後，將沉澱物移至 1.5 mL 離心管，進而以 10,000 $\times$ g 在 4°C 下離心 2 分鐘，再以 75% 酒精清洗，並將殘留酒精吹乾。加入 400  $\mu$ L 的無菌水溶解 DNA，隨後加入 1  $\mu$ L 的 10 mg/mL RNase，於 37°C 放置 30 分鐘。再加入等體積(約 400  $\mu$ L) 的 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v)，溫和混合搖晃至上層液呈乳狀混濁。以 10,000 $\times$ g 在 4°C 下離心 20 分鐘後，小心吸取含有 DNA 之上清液注入另一新的 1.5 mL 離心管；然後再加入等體積(約 400  $\mu$ L) 的 chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v/v)，溫和搖晃均勻 1 分鐘，以 10,000 $\times$ g 在 4°C 下離心 15 分鐘。進一步小心吸取上清液再注入另一新的 1.5 mL 離心管中，並加入 1/10 的體積(約 40  $\mu$ L) 之 3 M Sodium acetate trihydrate (NaOAc, pH 5.2)，輕輕搖晃均勻；隨後加入 2 倍體積的絕對酒精，均勻搖晃後；在 -20°C 放置 20 分鐘。以 10,000 $\times$ g 在 4°C 下離心 5 分鐘。倒掉上清液，以現配的 75% 酒精 1 mL 清洗沉澱物二次，風乾酒精，加入 400  $\mu$ L 的 0.1 $\times$ TE 緩衝液，待 DNA 全部溶解，測 O.D. 值及進行電泳分析，確定 DNA 完整未分解。再以分光光度計 (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) 測定總量 DNA 之吸光值予以定量。

### 聚合酵素連鎖反應之分析

將 50 ng 之菌絲總量 DNA 進行聚合酵素連鎖反應 (PCR)，再以 1.5% 之瓊脂膠體電泳分析其結果。利用 Shimazu 氏等學者<sup>(20)</sup> 所發表的三組專一性引子對：(1) FLA0001F (5'-GGCCG ACTTGGCACTTCC-3') / R (5'-TAGTATGGGACAACAACGATTG-3') (可檢測出所有的高莖萎凋病菌 DNA 之引子對)、(2) FLA0101F (5'-CTTATACCCCTGCTAGTTCC-3') / R (5'-ATCGAGAACCAATCCAGCTG-3') (可區分高莖萎凋病菌 race 1 菌株 DNA 之引子對) 及 (3) FLA0201F (5'-

TATCCACCGCTCCTAAGCAG-3') / R (5'-TATCCACCGCTCGTTGTGAC-3') (可區分高莖萎凋病菌 race 2 菌株 DNA 之引子對)；與 Pasquali 氏等<sup>(17)</sup> 所發表 Hani3' (5'-CCCTCCAACATTCAACAACCTG-3') / Hanilatt3rev (5'-ATTCAGTGTACACCAA CCTTTT-3') (可區分高莖萎凋病菌 race 1 的菌株 DNA 之引子對)，分別以此四組專一性引子，針對上述台灣高莖萎凋病菌之菌株 DNA 進行 PCR。各反應之溫度條件皆參照原文獻所載述，並以核酸增幅反應系統 (PTC-200, MJ research, Inc., Watertown, MA, USA) 進行 PCR。

### 不同高莖品種對高莖萎凋病菌之抗感病性測定

本研究所使用的 30 種不同品種的高莖種子係由明豐種子行 (台中縣豐原市) 或市面種子行購得，以及鳳山熱帶園藝試驗分所陳甘澍博士提供。將收集到的高莖種子，以 1% (v/v) 次氯酸鈉溶液表面消毒 1 分鐘，經無菌水漂洗 3 次，再將種子催芽一天後，隨即播種於含 LFO 11-13 及 LFO 32-14 之病菌土 (病原菌濃度 10<sup>4</sup> cfu/g soil) 中，每個處理有四重複，每重複有 5 株高莖，在溫室中栽培四個星期後，按照前述測定生理小種的方法區分罹病等級，並依下列公式計算不同品種高莖之罹病度 (Disease severity)<sup>(8)</sup>。Disease severity (%) = [(n<sub>0</sub> × 0 + n<sub>1</sub> × 1 + n<sub>2</sub> × 2 + n<sub>3</sub> × 3) / (N × 3)] × 100。其中，n<sub>0</sub>-n<sub>3</sub> = 各級罹病的植株數，N = 總植株數。將罹病度介於 0-20% 訂為抗病 (Resistant) 品種，21-49% 為中度感病 (Moderately susceptible) 品種，50-79% 屬於感病 (Susceptible) 品種，而 80-100% 屬於極感病 (Highly susceptible) 品種。

## 結 果

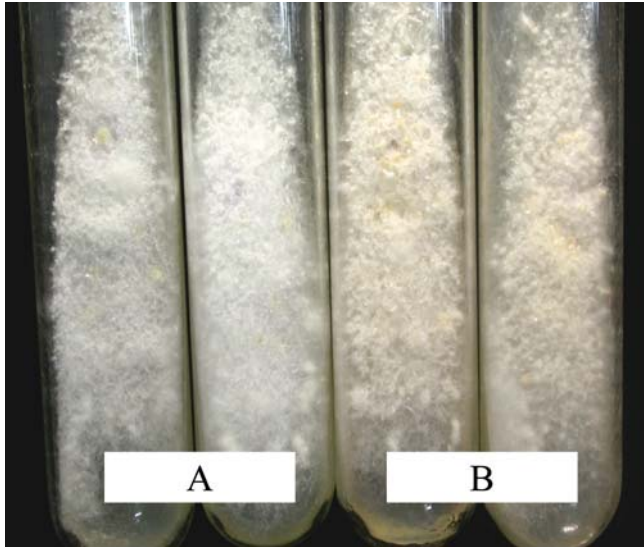
### 高莖萎凋病菌之菌落形態

台灣各地收集到的高莖萎凋病菌，經柯霍氏法則確定各菌株的病原性後，培養於 PDA 斜面上，依照病原菌的菌落形態，可區分為兩型。其中，LFO 11-13、LFO 105-1、LFO 106-1 及 LFO 106-2 等 4 個菌株為白色至藍紫色菌落，具有乳黃色孢子堆；而 LFO 32-14、LFO 102-3、LFO 103-5、LFO 103-6、LFO 103-7、LFO 104-1 及 LFO 106-3 等 7 個菌株，菌落則為橙色，且具有橘黃色孢子堆 (圖一)。

### 高莖萎凋病菌生理小種之鑑定

利用 Patriot、Banchu Red Fire 及 Costa Rica No.4 三個指標品種鑑定高莖萎凋病菌的生理小種，結果

Patriot 與 Banchu Red Fire 對 LFO 11-13、LFO 102-3、LFO 103-5、LFO 103-6、LFO 103-7、LFO 104-1、LFO 105-1 及 LFO 106-2 等 8 個菌株具有感病性 (罹病指數大於 1.0)；而 Costa Rica No.4 則對這 8 個菌株具有抗性 (罹病指數小於 1.0)，依文獻<sup>(4)</sup> 比對結果證實台灣採集的 8 個菌株歸屬於生理小種一號 (race 1)。至於接種



圖一、台灣各地獲得的高苣萎凋病菌菌株有兩種菌落形態。(A) 菌落白色至藍紫色，孢子堆乳黃色；(B) 菌落橙色，具有橘黃色孢子堆。

Fig.1. Two colonial morphologies were observed among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* collected from Taiwan. (A) White to blue-purple colony with buff-yellow sporodochia; (B) Peach-purple colony with orange sporodochia.

表二、利用指標品種鑑別高苣萎凋病菌的生理小種

Table 2. Physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* separated by differential indicator cultivars of lettuce, Patriot, Costa Rica No. 4, and Banchu Red Fire

Isolates	Disease severity index <sup>1</sup>			Race determination
	Patriot	Costa Rica No. 4	Banchu Red Fire	
LFO 11-13	2.3 (S <sup>2</sup> )	0.3 (R)	2.0 (S)	1
LFO 102-3	3 (S)	0.4 (R)	1.8 (S)	1
LFO 103-5	2.8 (S)	0.1 (R)	1.5 (S)	1
LFO 103-6	1.6 (S)	0.3 (R)	1.8 (S)	1
LFO 103-7	2.8 (S)	0.1 (R)	1.8 (S)	1
LFO 104-1	2.8 (S)	0 (R)	1.6 (S)	1
LFO 105-1	2.4 (S)	0.2 (R)	1.9 (S)	1
LFO 106-2	2.6 (S)	0.1 (R)	2.4 (S)	1
LFO 32-14	2.3 (S)	0.3 (R)	0.5 (R)	New
LFO 106-1	2.4 (S)	0.1 (R)	0.4 (R)	New
LFO 106-3	2.3 (S)	0.2 (R)	0.5 (R)	New

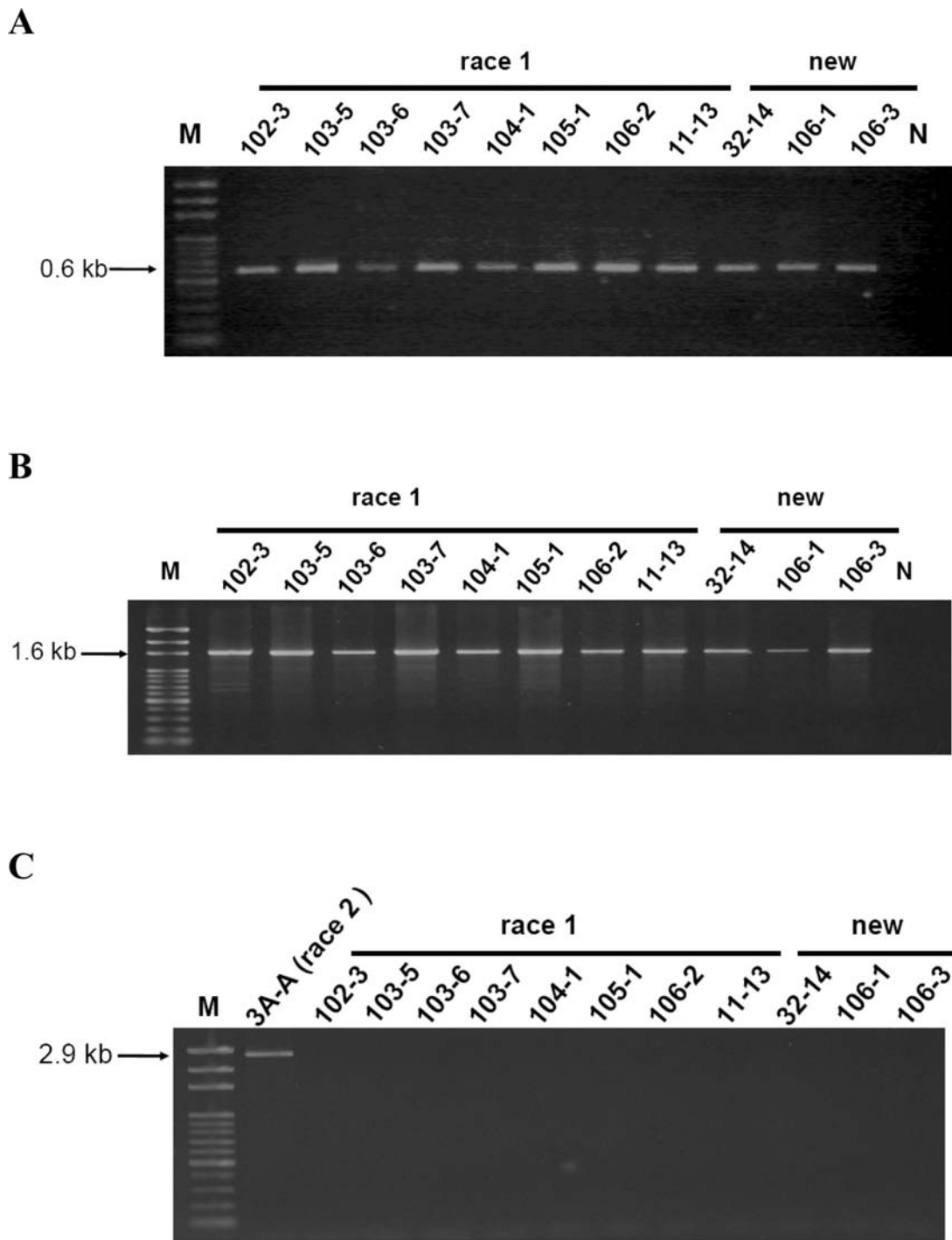
<sup>1</sup> Disease severity was determined four weeks after inoculation using scores of 0 (no symptom), 1 (vascular discoloration), 2 (leaf necrosis, plant stunting and wilt), 3 (plant death). Disease severity index=(n<sub>0</sub>×0+n<sub>1</sub>×1+n<sub>2</sub>×2+n<sub>3</sub>×3)/N, where n<sub>1</sub> is the number of plants with a score of 1, n<sub>2</sub> is the number of plants with a score of 2, n<sub>3</sub> is the number of plants with a score of 3, and N is the total number of plants examined.

<sup>2</sup> Plants rated higher than 1.0 were regarded as susceptibility (S) and those rated lower than 1.0 as resistance (R).

LFO 32-14、LFO 106-1 及 LFO 106-3 等 3 菌株的結果，僅使 Patriot 品種感病，而 Banchu Red Fire 與 Costa Rica No. 4 兩品種則具有抗病性 (表二)，三個菌株均無法歸併在 Fujinaga 氏等<sup>(4)</sup> 發表的三個生理小種之內。

### 高苣萎凋病菌核酸之 PCR 分析

利用 Shimazu 氏等<sup>(20)</sup> 發表的 FLA0001F/R 及 FLA0101F/R 兩種專一性引子對進行 PCR 發現：FLA0001F/R 引子對所增幅的 0.6 kb 核酸片段 (FLA0001<sub>600</sub>) 確實出現在供試的 11 株高苣萎凋病菌核酸樣品中 (圖二A)。至於利用日本可以專一性區分高苣萎凋病菌 race 1 菌株的 FLA0101F/R 引子對進行 PCR 分析，結果在供試的 11 株台灣高苣萎凋病菌核酸樣品中，皆可增幅出特定的 1.6 kb 核酸片段 (FLA0101<sub>1600</sub>) (圖二B)；即使按照病原性接種測試判定為新生理小種的菌株樣品，也可在其 PCR 產物中出現 FLA0101<sub>1600</sub> 核酸片段。另由 FLA0201F/R 引子對所增幅的 2.9 kb 核酸片段 (FLA0201<sub>2900</sub>)，僅會在來自日本 (Dr. Masashi Fujinaga 提供) 的 race 2 菌株核酸樣品出現 (編號 3A-A，日本 Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, Omuro, Nagano 381-1211, Japan 贈送) (圖二 C)。此外，利用義大利 Pasquali 氏等學者<sup>(17)</sup> 發表可專一性偵測高苣萎凋病菌 race 1 菌株的引子組 Hani3' / Hanilatt3rev 針對台灣的 11 株高苣萎凋病菌核酸進行 PCR 分析，結果顯示供試的 11 個台灣菌株樣品中均會增幅出 200 bp 之專一性片段 (圖三)。



圖二、利用針對高苜蓿凋病菌(*Fola*)、*Fola* race 1 及 *Fola* race 2 分別具專一性之「FLA0001F/R」、「FLA0101F/R」及「FLA0201F/R」等三種引子組對本研究供試 11 菌株 DNA 進行 PCR 分析之結果。  
 Fig. 2. PCR patterns of 11 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from Taiwan using *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (*Fola*)-specific primer pair FLA0001F/R (A), *Fola* race 1-specific primer pair FLA0101F/R (B), and *Fola* race 2-specific primer pair FLA0201F/R (C). The PCR products were separated on 1.5% agarose gel that stained with ethidium bromide and observed under UV light. Locations of the 0.6-kb *Fola*-specific marker (FLA0001<sub>600</sub>), the 1.6-kb *Fola* race 1-specific marker (FLA0101<sub>1600</sub>), and the 2.9-kb *Fola* race 2-specific marker (FLA0201<sub>2900</sub>) were indicated. The fungal isolates tested were listed in Table 1. N was the negative control of PCR solution without any DNA template; M, Gen-100 DNA ladder (GeneMark Technology Co., Ltd., Tainan, Taiwan).

### 不同品種高苣對高苣萎凋病的抗感性試驗

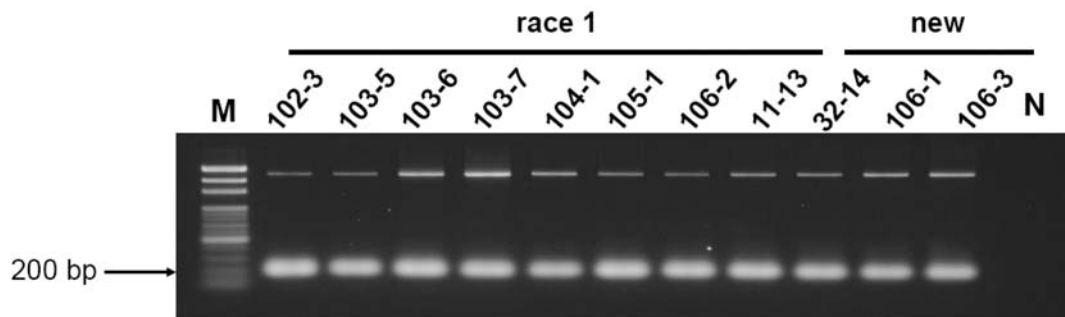
在溫室中測試 30 種不同品種高苣對高苣萎凋病菌 LFO 11-13 與 LFO 32-14 菌株的抗感病性，四週後，發現青竹筍嫩莖高苣 (*Asparagus lettuce* cv. Cing-Jhu-Sun)、白竹筍嫩莖高苣 (*Asparagus lettuce* cv. Bai-Jhu-Sun)、包心妹 (*Head lettuce* cv. Bao-Sin-Mei)、大陸妹高苣 (*Crisp head lettuce* cv. Da-Lu-Mei) 為抗病品種，罹病度介於 0-20%；皺葉高苣 (*Grand rapid lettuce* cv. Lolla Rossa)、一號包心高苣 (*Head lettuce* No.1)、三號剝葉型高苣 (*Loose-heading lettuce* No.3)、明豐三號高苣 (*Ming-Fung No.3 lettuce*)、紅橡葉高苣 (*Red oak-leaf lettuce*)、紅捲葉高苣 (*Red rapid lettuce* cv. Klausia) 屬於中等感病品種，罹病度介於 21-49%；波士頓高苣 (*Boston lettuce* cv. Aramir)、一號皺葉高苣 (*Grand rapid lettuce* No.1)、明豐大葉白尖高苣 (*Large white pointed lettuce*)、一號剝葉型高苣 (*Loose-heading lettuce* No.1)、二號剝葉型高苣 (*Loose-heading lettuce* No.2) 及紅尖葉高苣 (*Red pointed-leaf lettuce*) 為感病品種，罹病度介於 50-79%；而波士頓高苣 (*Boston lettuce* cv. Nanda, Palma, Panama, Pansoma, Pentra)、結球高苣 (*Head lettuce* cv. S1705, Calna)、二號包心高苣 (*Head lettuce* No.2)、紅尖葉高苣 (*Indian lettuce*)、劍葉高苣 (*Pointed-leaf lettuce*)、圓葉高苣 (*Round-leaf lettuce*)、立生高苣 (*Romaine lettuce* cv. Romance, Padox) 及白尖葉高苣 (*White pointed-leaf lettuce*) 等則為極感病品種，罹病度介於 80-100% (表三)。

### 討 論

西元 1998 年，台灣有許多研究者<sup>(7, 19)</sup> 指出高苣萎

凋病田分離純化獲得的病原菌株可歸為兩種菌落形態，唯未證實所獲得的菌株屬於不同的生理小種。Pasquali 氏等<sup>(16)</sup> 利用營養體親和群 (Vegetative compatibility group; VCG) 的不同，將義大利、美國、日本及台灣的高苣萎凋病菌進行分群，結果除日本的一個菌株為自體不親合之外，其餘義大利、美國及日本的高苣萎凋病菌均屬於 VCG0300 群；而具有不同菌落形態的台灣高苣萎凋病菌菌株，則分屬於 VCG0300 及 VCG0301 兩個營養親和群<sup>(16)</sup>，顯示台灣高苣萎凋病菌的族群確有不同。此外，日本的高苣萎凋病菌雖有三個生理小種，但並無菌落形態差異的報導。本研究結果顯示，由台灣各地分離獲得的高苣萎凋病菌可依菌落型態分為兩群，然而，菌落形態相同的菌株，如 LFO 106-1 與 LFO 106-2，在接種於三個指標品種後，植株對這兩個菌株的抗感病性卻有明顯的差異，似乎分屬於不同的生理小種。因此，菌落形態雖可將高苣萎凋病菌區分為不同族群，卻無法看出各菌株對不同品種高苣致病力的差異，而具有相同菌落形態的菌株，亦可能分屬於不同的生理小種。

Fujinaga 氏等<sup>(4)</sup> 依據三種指標植物對於高苣萎凋病菌之抗感病性區別其生理小種。若病原菌接種 Patriot、Banchu Red Fire 及 Costa Rica No.4 後，依次呈現感病、感病及抗病，即歸為生理小種一號；如果分別呈現感病、抗病及感病，即歸為生理小種二號；而可使三種指標植物皆呈感病則歸為生理小種三號。本研究中，由台灣各地分離獲得的 11 個高苣萎凋病菌株，分別接種於 Patriot、Banchu Red Fire 及 Costa Rica No. 4 等三個指標品種後，發現諸指標判別植物對於其中 8 個菌株均呈現感病、感病、抗病性反應，因此可將這 8 個菌株歸類為 Fujinaga<sup>(4)</sup> 氏等所報導的生理



圖三、利用針對高苣萎凋病菌 race 1 具專一性之引子組「Hani3' / Hanilatt3rev」對本研究供試 11 菌株 DNA 進行 PCR 分析之結果。

Fig. 3. PCR patterns of 11 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from Taiwan using *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (*Fola*) race 1-specific primer pair Hani3' / Hanilatt3rev. The PCR products were separated on 1.5% agarose gel that stained with ethidium bromide and observed under UV light. Location of the 200-bp *Fola* race 1-specific marker was indicated. The fungal isolates tested were listed in Table 1. N was the negative control of PCR solution without any DNA template; M, Gen-100 DNA ladder (GeneMark Technology Co., Ltd., Tainan, Taiwan).

小種一號 (race 1)。至於指標判別植物對於 LFO 32-14、LFO 106-1 及 LFO 106-3 等三個菌株的抗感病性反應，則完全異於 Fujinaga 氏等所發表的三個生理小種，顯示此三個高苣萎凋病菌株應該屬於新的生理小種。其中，西螺地區採集到的菌株有 race 1 與新生理小種，至於本研究由台灣其他地區採集的高苣萎凋病菌菌株，則均為 race 1。為何不同地域有不同生理小種的分布，由於本次蒐集菌株不多，仍有待進一步的研析。此外，直到目前為止，筆者在台灣仍未發現 race 2 與 race 3 的高苣萎凋病菌。

利用 Shimazu 氏等<sup>(20)</sup> 及 Pasquali 氏等<sup>(17)</sup> 所發表的

四組引子組，以 PCR 測試供試的台灣高苣萎凋病菌核酸樣品後，發現 FLA0001<sub>600</sub> 可作為檢測台灣高苣萎凋病菌之分子標誌。惟用來區分高苣萎凋病菌 race 1 菌株的 FLA0101<sub>1600</sub> 及以 Hani3' / Hanilatt3rev 引子組所增幅出之 200 bp 核酸片段，卻在台灣所分離的 race 1 及由接種測試結果判定為新生理小種的高苣萎凋病菌核酸樣品中均可測得，顯示目前國際發表的四組引子對尚無法將台灣的高苣萎凋病菌區分為 race 1 或新生理小種。因此如何結合病原性測試與開發偵測高苣萎凋病菌生理小種的探針，實為今後吾輩努力的方向。

高苣萎凋病普遍發生於日本、美國加州、亞利桑

表三、三十個不同品種高苣對高苣萎凋病菌之抗感病性反應

Table 3. Response of 30 lettuce cultivars to *Fusarium oxysporum* f.sp *lactucae* isolates LFO11-13 and LFO32-14 after inoculation for four weeks in the greenhouse

Susceptibility (%) <sup>1</sup>	Cultivar	Disease severity (%) <sup>2</sup>	
		LFO 11-13	LFO 32-14
R (0 - 20)	Asparagus lettuce (Bai-Jhu-Sun)	20.0	20.0
	Asparagus lettuce (Cing-Jhu-Sun)	20.0	18.3
	Crisp head lettuce (Da-Lu-Mei)	20.0	11.7
	Head lettuce (Bao-Sin-Mei)	20.0	20.0
MS (21 - 49)	Grand rapid lettuce (Lolla Rossa)	26.7	26.7
	Head lettuce (No.1)	40.0	31.7
	Loose-heading lettuce (No.3)	35.0	41.7
	Ming-Fung No.3 lettuce	40.0	28.3
	Red oak-leaf lettuce	26.7	26.7
	Red rapid lettuce (Klausia)	33.3	46.7
	S (50 - 79)	Boston lettuce (Aramir)	60.0
Grand rapid lettuce (No.1)		50.0	33.3
Large white pointed lettuce		70.0	55.0
Loose-heading lettuce (No.1)		75.0	58.3
Loose-heading lettuce (No.2)		56.7	70.0
Red pointed leaf lettuce		66.7	50.0
HS (80 - 100)		Boston lettuce (Nanda)	100.0
	Boston lettuce (Palma)	100.0	93.3
	Boston lettuce (Panama)	80.0	100.0
	Boston lettuce (Pansoma)	100.0	100.0
	Boston lettuce (Pentra)	80.0	100.0
	Head lettuce (Calna)	80.0	80.0
	Head lettuce (No.2)	81.7	60.0
	Head lettuce (S1705)	73.3	80.0
	Indian lettuce	93.3	86.7
	Pointed leaf lettuce	93.3	70.0
	Round leaf lettuce	100.0	93.3
	Romaine lettuce (Padox)	80.0	86.7
	Romaine lettuce (Romance)	100.0	100.0
White pointed leaf lettuce	93.3	86.7	

<sup>1</sup> R: resistant; MS: moderately susceptible; S: Susceptible; HS: Highly susceptible.

<sup>2</sup> Lettuce plants were grown in infested soil (10<sup>4</sup> cfu/g soil) for four weeks and rated for disease severity using scores of 0 (n<sub>0</sub> symptom), 1 (vascular discoloration), 2 (leaf necrosis, stunting, and wilt), 3 (plant death). Disease severity (%)=[(n<sub>0</sub> × 0 + n<sub>1</sub> × 1 + n<sub>2</sub> × 2 + n<sub>3</sub> × 3) / (N × 3)] × 100, where n<sub>1</sub> is the number of plants with an index of 1; n<sub>2</sub> is the number of plants with an index of 2; n<sub>3</sub> is the number of plants with an index of 3; and N is total number of plants examined.

那州、義大利及台灣的高苣栽培田，尤其在連作的農田發生更為嚴重，常導致農友束手無策，因此栽培抗病品種便成為病害防治的策略之一。許多研究指出，具有不同園藝性狀的高苣，對於相同生理小種的高苣萎凋病菌有不同的抗感病性<sup>(3, 4, 6, 8, 19, 21)</sup>。美國亞利桑那州發現結球高苣 Salinas 品種具有較佳的耐病性<sup>(9)</sup>；Garibaldi 氏等<sup>(6)</sup>則指出部份義大利的高苣品種，對於高苣萎凋病具有完全的抗性，其中多為葉用高苣 (leaf lettuce) 以及蘿蔓型高苣 (romaine type)。本研究以台灣現有的兩個不同生理小種的高苣萎凋病菌，LFO11-13 與 LFO32-14 菌株，接種 30 個不同品種的高苣，發現不同品種的高苣確實具有不同的抗感病性。其中大陸妹高苣、青竹筍嫩莖高苣、白竹筍嫩莖高苣、包心妹高苣等品種對 LFO11-13 與 LFO32-14 菌株均較具抗病性。這些資料值得提供給農民作為栽培的參考，亦可供育種專家作為抗病育種之用。

## 謝 辭

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 (計畫編號: 95 農科 - 13.3.1- 檢 - B1 (6), 96 農科 - 14.3.1- 檢 - B1)、教育部「邁向頂尖大學計畫」及國立中興大學等單位經費補助，使試驗得以順利進行，特誌謝忱。此外，我們也感謝日本 Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station 的 Dr. Masashi Fujinaga 研究員提供高苣萎凋病菌 race 2 菌株 (編號 3A-A) 之核酸樣品，以利分子鑑定分析。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Chang, J. -Y. 2005. Molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and its detection in infected banana seedlings. Master thesis. National Chung-Hsing University, Taichung. 102 pp.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:19-21.
- Fujinaga, M., Ogiso, H., Tsuchiya, N., and Saito, H. 2001. Physiological specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of Fusarium root rot of crisp head lettuce in Japan. *J. Gen. Plant. Pathol.* 67:205-206.
- Fujinaga, M., Ogiso, H., Tsuchiya, N., Saito, H., Shigeru, Y., Nozue, M., and Kojima, M. 2003. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *J. Gen. Plant. Pathol.* 69:23-28.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., and Gullino, M. L. 2002. First report of *Fusarium oxysporum* on lettuce in Europe. *Plant Dis.* 86:1052 (Abstract).
- Garibaldi, A., Gilardi, G., and Gullino, M. L. 2004. Varietal resistance of lettuce to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Crop Prot.* 23: 845-851.
- Huang, J. H., and Lo, C. T. 1998. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 7:150-153. (in Chinese with English abstract)
- Huang, J. L. 2005. Identification for physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* and control experiments of lettuce Fusarium wilt. Master thesis. National Chung-Hsing University, Taichung. 57 pp. (in Chinese with English abstract)
- Hubbard, J. C., and Gerik, J. S. 1993. A new wilt disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum* forma specialis nov. *Plant Dis.* 77:750-754.
- Kao, T. C. 1996. How much do you know about lettuce. *Taichung Agricultural Monograph.* 15:25-27. (in Chinese with English abstract)
- Matheron, M. E. 2003. First report of Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Arizona. *Plant Dis.* 87:1265 (Abstract).
- Matuo, T., and Motohashi, S. 1967. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n. f. causing root rot of lettuce. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 32:13-15.
- Motohashi, S., Abe, Z., and Ogawa, T. 1960. Root rot of lettuce caused by *Fusarium* sp. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 25:47. (Abstract in Japanese)
- Nash, S. N., and Snyder, W. C. 1962. Quantitative estimation by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology* 52:567-572.
- Ogiso, H., Fujinaga, M., Saito, H., Takehara, T., and Yamanaka, S. 2002. Physiological races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* isolated from crisphead lettuce in Japan. *J. Gen. Plant. Pathol.* 68:292-299.
- Pasquali, M., Dematheis, F., Gilardi, G., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2005. Vegetative compatibility groups of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. *Plant Dis.* 89:237-240.
- Pasquali, M., Dematheis, F., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology* 97:987-996.
- Peng, Y. H. 1998. Identification and control of lettuce Fusarium wilt. Master thesis. National Chung-Hsing University, Taichung. 64 pp. (in Chinese with English abstract)
- Peng, Y. H., and Huang, J. W. 1998. Pathogenicity



- tests of lettuce *Fusarium* wilt fungus. *Plant Pathol. Bull.* 7(3):121-127. (in Chinese with English abstract)
20. Shimazu, J., Yamauchi, N., Hibi, T., Satou, M., Horiuchi, S., and Shirakawa, T. 2005. Development of sequence tagged site markers to identify races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:183-189.
21. Yamauchi, N., Horiuchi, S., and Satou, M. 2001. Pathogenicity groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on horticultural types of lettuce cultivars. *J. Gen. Plant Pathol.* 67:288-290.

## ABSTRACT

Hong, C. F.<sup>1,2</sup>, Chang P. F. L.<sup>1</sup>, Huang, J. L.<sup>1,3</sup>, Wan Y. L.<sup>1</sup>, and Huang, J. W.<sup>1,4</sup>. 2008. Identification for Physiological Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* and Screening of Lettuce Cultivars Resistant to Fusarium Wilt. Plant Pathol. Bull. 17: 233-242. (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup>Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C.; <sup>3</sup>Kaohsiung Branch of Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C. ; <sup>4</sup>Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; Fax : +886-4-2285-1676)

Fusarium wilt of lettuce, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, is a serious soil-borne disease, especially when the crop is grown under monoculture. It is one of the limiting factors for commercial production of lettuce during summer season in Taiwan. Diseased plants showed symptoms of leaf yellowing and wilting, plant stunting and death. In this study, three indicator cultivars of lettuce, Costa Rica No. 4, Banchu Red Fire, and Patriot, were used to identify 11 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* collected from various locations in Taiwan for physiological races. Results showed that eight of the 11 isolates were categorized as race 1, and the other three isolates, LFO 32-14, LFO 106-1, LFO 106-3, were designated as a new race. However, it was unable to differentiate the 11 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* from Taiwan using the previously reported molecular markers. Susceptibility of thirty lettuce cultivars to Fusarium wilt was determined. Among the 30 cultivars of lettuce tested for resistance to *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* isolates LFO 11-13 and LFO 32-14, two asparagus lettuce cv. Cing-Jhu-Sun and cv. Bai-Jhu-Sun, one head lettuce cv. Bao-Sin-Mei, and one crisp head lettuce cv. Da-Lu-Mei were resistant with the disease severity between 0-20%. However, round-leaf lettuce, pointed-leaf lettuce and Indian lettuce, etc., were highly susceptible with the disease severity between 80-100%.

Key words: lettuce, *Lactuca sativa*, Fusarium wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, physiological race, resistant cultivar, molecular identification, polymerase chain reaction