

# 由 *Fusarium proliferatum* 引起之孤挺花赤斑病

蘇俊峯<sup>1</sup> 陳郁欣<sup>2</sup> 簡蘭懿<sup>1</sup> 黃晉興<sup>1</sup> 謝廷芳<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

<sup>2</sup> 臺中市 中國醫藥大學生物科技系

<sup>3</sup> 雲林縣 行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心

<sup>4</sup> 聯絡作者, E-mail: tfhsieh@tari.gov.tw; 傳真: +886-5-5820834

接受日期: 中華民國 101 年 7 月 23 日

## 摘要

蘇俊峯、陳郁欣、簡蘭懿、黃晉興、謝廷芳. 2011. 由 *Fusarium proliferatum* 引起之孤挺花赤斑病. 植病會刊 20: 78-89.

西元 2011 年 4 月與 7 月於臺中市后里地區所栽植的孤挺花花梗上, 出現紅色條斑狀病徵, 嚴重影響切花商品價值。田間病害調查發現, 該病徵出現在花梗、葉、球莖鱗片內部與表皮及肉質根表層上, 植株發病率高達 62%, 傷口是主要的感染途徑。由罹病部位所分離得到之分離株在馬鈴薯瓊脂培養基 (potato dextrose agar) 上之菌落呈淡橘至粉白色, 在水瓊脂培養基 (water agar) 上之小孢子呈鏈狀或假頭狀排列, 分生孢子梗可為單或複瓶狀枝, 但是甚少產生大孢子。依科霍氏法則 (Koch's postulates) 完成病原性測定後, 挑選供試菌株 MB-013 與 MB-020, 輔以 ITS 序列比對鑑定引起孤挺花赤斑病 (red spot of amaryllis) 的病原真菌為 *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg。本病原菌菌絲最適生長溫度為 24-28°C, 生長速度介於 5.2-5.9 mm/day。最適發病溫度亦為 24-28°C, 低於 8°C 與高於 36°C 時則不發病。

關鍵詞: 孤挺花、*Fusarium proliferatum*、赤斑病、新紀錄病害

## 緒言

孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 之英名為 amaryllis、hippeastrum 或 Dutch amaryllis, 屬石蒜科球根花卉。球根係由葉基部肥大之鱗片 (leaf scales) 組成, 最外層包覆由養分耗盡之鱗片所形成之咖啡色皮膜, 具有保護及防止水分散失之功用, 屬於有皮鱗莖類 (tunicated bulb)。葉為線形或帶狀形, 花梗中空, 繖形花序 (umbel), 由 2-6 朵花所形成。孤挺花在台灣主要用於庭園景觀及盆花觀賞用, 市場上之品種主要來自於荷蘭及南非<sup>(22)</sup>。孤挺花原生於熱帶中南美洲, 較不耐寒, 最適生長之日/夜溫為 23/18°C, 低於 8°C 則停止生長。栽培前之開花球先置於 23-25°C 通風環境下 2 星期, 隨後貯藏於 13°C, 相對濕度 80% 的環境下 8-10 星期, 若貯藏於 5-9°C 環境下, 可貯藏較久時間。貯藏後之種球宜立刻定植, 定植時種球

頸部應高於介質表面, 以避免種球受病原菌感染而腐爛<sup>(22)</sup>。

根據臺灣植物病害名彙<sup>(14)</sup>記載, 孤挺花的病害包括灰黴病 (病原菌 *Botrytis cinerea*)、炭疽病 (病原菌 *Colletotrichum gloeosporioides*)、葉燒病 (病原菌 *Stagonospora curtisii*) 及根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*), 其中由 *S. curtisii* 所引起之葉燒病英名有稱之為 red-brown leaf spot、red leaf spot、red blotch 或 red fire, 是孤挺花的主要病害。葉燒病菌可危害孤挺花的葉片與花柄, 罹病初期可產生紅色病斑, 病斑擴大形成長條形或紡錘形, 病斑中央會凹陷, 罹病後期病斑中間會產生灰色菌絲與柄子殼 (pycnidium), 但病斑周圍仍保持紅色, 最後罹病部位扭曲變形<sup>(25)</sup>。本病亦曾發生於美國<sup>(6)</sup>、伊拉克<sup>(33)</sup>、荷蘭<sup>(20)</sup>及俄羅斯<sup>(34)</sup>等國家。然而, 孤挺花組織一旦受傷, 通常在受傷部位會有紅色色素產生, 因此紅色病斑不一定都是由 *S. curtisii* 感染所引起<sup>(25)</sup>。

西元 2011 年 4 月在臺中市后里地區農民所採收的孤挺花花梗上，發現一種有別於 *S. curtisii* 所引起的葉燒病病徵，其主要病徵乃於採收後 3 天之內，由花梗切除部位產生線條狀的紅色斑，而其罹病部位並無柄子殼產生。本文目的在於鑑定引起此孤挺花新病害的病原菌，期能提供農民研擬防治措施之參考。

## 材料與方法

### 田間調查、病原菌分離及鑑定

西元 2011 年 4 月與 7 月間前往臺中市后里地區孤挺花栽培田與包裝場，調查植株花梗、球莖、葉片及植株根部是否發生紅色條斑病徵，並計算發病率。調查時，若植株有一片葉片以上或其他部位已有明顯紅色條斑病徵，即視為發病，並計算發病百分率 (disease incidence, %)，又採回罹病植株於實驗室進行可疑病原菌分離。由田間採回之罹病株，首先以消毒過之解剖刀切取 1 cm<sup>2</sup> 的罹病組織片段，該組織片段經 5.25% 的次氯酸鈉 (sodium hypochloride) 表面消毒 10 sec 後，以無菌水漂洗一次，再用清潔之衛生紙吸乾組織片段表面的無菌水，最後將其置於 2% 的水瓊脂培養基 (2% water agar, WA) 上。隨後將培養基置於室溫下 4-5 天，待有菌絲自組織片段周圍長出時，切取菌絲尖端，培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA, Difco) 斜面試管中，於室溫下培養，初步鑑定為 *Fusarium* 屬真菌。進行形態學觀察時，以移植環沾取部分分生孢子，並於 2% WA 平板培養基上畫線培養，經 12 h 後，將該分離株單孢培養於 PDA 平板上 7-10 天觀察菌落型態。若單孢培養於 2% WA 上 3-5 天，則以光學顯微鏡 (CH40RF100, Olympus, Japan) 鏡檢、觀察該些分離株的孢子型態與大小及分生孢子梗構造，再參考 Summerell 等人<sup>(32)</sup>與 Leslie 與 Summerell<sup>(21)</sup>所描述的鐮孢菌孢子著生方式與型態，鑑定所分離之鐮孢菌菌株。

### 病原性測定

挑選由孤挺花赤斑病罹病組織分離得到的真菌 MB-001、MB-004、MB-008、MB-009、MB-011、MB-012、MB-013、MB-015、MB-018、MB-020、TJP-1267-14 與 TJP-1267-16 等 12 株分離株作為供試菌株。將各供試菌株單孢培養於 PDA 斜面試管培養基中，於室溫下培養兩星期。旋即於各菌株培養試管中加入 9 ml 的無菌水，利用移植環輕刮斜面培養基表面菌落，所得之懸浮液經兩層滅

菌紗布過濾後，震盪混合均勻，於光學顯微鏡下，利用血球計數器 (Hemocytometer, Marienfeld, Germany) 計算單位體積的孢子數，換算為孢子懸浮液的濃度，再利用無菌水調整孢子懸浮液濃度至 1-4x10<sup>5</sup> spores/ml 備用。取出貯存於 4°C 冷藏庫六個月的孤挺花種球，在溫室中以泥碳土為介質，將其種植於 5 吋塑膠盆中。種植一個月後，分別切取 3x5 cm<sup>2</sup> 的鱗片與葉片組織為供試組織，再以沾有 75% 酒精的棉花輕輕擦拭供試組織之表面，進行表面消毒。將供試組織放置於 9 cm 玻璃培養皿內，並以濕棉花保濕，再以消毒過的大頭針在供試組織表面製造 7 個人工傷口。將 50 μl 的供試菌株孢子懸浮液分別接種於鱗片與葉片的 7 個人工傷口上，每株分離株分別接種 3 片鱗片與葉片組織片段，並以無菌水作為對照組。接種後，每天觀察、記錄接種部位組織發病的情形，並調查發病度 (disease severity, 0-3)，再由接種部位重新分離病原菌。發病度分為 0-3 級：0 級表示健康無病徵；1 級表示接種部位出現紅色病斑；2 級表示紅色病斑擴大延長成紅色條斑；3 級表示接種部位腐敗。

### 孤挺花赤斑病菌之分子鑑定

根據病原性測定結果，選取具病原性之 MB-013 與 MB-020 供試菌株，單孢培養於 PDA 培養基平板上 7 天，將其送往明欣生物科技有限公司 (MB mission biotech, Taichung, Taiwan) 進行 DNA 萃取 (其參考 Qiagen DNeasy Plant Kit 進行) 與 PCR 增幅與定序 (其以 ITS5&ITS4 與 ITS1&ITS4 當引子)，定序後之序列再以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站上所登錄之資料庫進行菌株序列分析比對，並將該序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

### 不同寄主來源之 *Fusarium proliferatum* 分離株對孤挺花的致病力測定

挑選 11 株由不同寄主所分離得到的 *Fusarium proliferatum* 分離株，以上述人工製造傷口接種法測試不同分離株對孤挺花的致病性，接種 3 天後調查各接種處理之發病度。供試菌株包括分離自孤挺花的 TJP-1248-4、TJP-1267-14 及 TJP-1267-16；分離自蝴蝶蘭的 F2017-23；分離自嘉德利亞蘭的 TJP-1026-1 與 TJP-1026-3；分離自蕙蘭的 TJP-1155-1、TJP-1155-3、TJP-1155-5 及 TJP-1155-6；及分離自文心蘭的 TJP-1236-1。

### 傷口對孤挺花赤斑病發病度的影響

挑選由孤挺花所分離得到的 MB-013、MB-020、TJP-1267-14 與 TJP-1267-16 與由蕙蘭所分離得到的 TJP-1155-5 菌株，分兩次（2011 年 8 月與 2012 年 3 月）於溫室進行傷口對孤挺花赤斑病發病度影響的接種試驗。首先利用無菌水製備孢子懸浮液 ( $1-4 \times 10^5$  spores/ml)。取出貯藏於 4°C 冷藏庫六個月的孤挺花種球，在溫室中以泥碳土作為栽培介質，將其種植於 5 吋塑膠盆中。種植一個月後，先以沾有 75% 酒精的棉花輕輕擦拭植株葉片表面，分成以消毒過的大頭針於葉片表面製造 7 個人工傷口與不製造傷口兩組，每處理 6 重複。將供試菌株孢子懸浮液噴霧接種於葉片組織上，並以無菌水為對照組。接種後，每天觀察接種部位組織發病的情形，並記錄發病度。

### 葉片組織離葉與否接種病原菌對孤挺花赤斑病發病度的影響

選取孤挺花赤斑病菌 MB-013 與 MB-020 菌株，利用無菌水製備孢子懸浮液 ( $1-4 \times 10^5$  spores/ml)，同上述方法栽植孤挺花，並以植株葉片與切取  $3 \times 5 \text{ cm}^2$  的葉片組織片段為供試接種部位。所切取的  $3 \times 5 \text{ cm}^2$  供試組織需放置於 9-cm 玻璃培養皿內，並以濕棉花保濕。供試接種部位依前述方法以酒精進行接種部位表面消毒，再以消毒過的大頭針於葉片表面製造 7 個人工傷口。將 50  $\mu\text{l}$  的供試菌株孢子懸浮液分別接種於人工傷口部位上，每處理 6 重複，並以無菌水為對照組。接種後，每天觀察接種葉片與離葉組織片段發病的情形，並記錄發病度。

### 溫度對孤挺花赤斑病菌菌絲生長的影響

將供試菌株 MB-013 與 MB-020 以移植環沾取部分分生孢子，並於 2% WA 平板培養基上畫線培養，經 12 h 後，單孢培養於 PDA 平板培養基上 3-5 天，以 8-mm 打孔器切取菌落周圍菌絲，將菌絲塊置於新配置之 PDA 平板培養基之中央。隨即將 PDA 平板培養基分別放置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36°C 定溫箱中，每個溫度處理放置 5 個培養皿，每天觀察菌絲生長的情形，量取菌落直徑，並換算菌絲生長速度。

### 溫度對孤挺花赤斑病發病度的影響

將 50  $\mu\text{l}$  的供試菌株 MB-013 與 MB-020 孢子懸浮液 ( $1-4 \times 10^5$  spores/ml) 接種於經表面消毒，且已製造 7 個人工傷口的  $3 \times 5 \text{ cm}^2$  的鱗片組織上，接種後之鱗片組織放置

在 9-cm 玻璃培養皿內，並以濕棉花保濕，分別放置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36°C 定溫箱中，每個溫度處理 6 皿。隨後每天觀察接種組織部位發病的情形，並記錄發病度。

### 統計分析

接種後所得發病度資料之差異顯著性測驗，係利用 IBM SPSS Statistics (version 19) 統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 及最小顯著差異性 (least significant difference, LSD,  $P = 0.05$ ) 測驗。另部份結果進行相關係數 (Pearson correlation coefficient, c.c.) 與回歸分析 (regression analysis)。

## 結果

### 田間調查、病原菌分離及鑑定

西元 2011 年 4 月與 7 月於臺中市后里地區農民所採收的孤挺花花梗上，出現紅色條斑狀病徵 (圖一、A)，導致切花商品價值低落，降低農民收益。初步田間病害調查結果顯示，該病徵多出現在花梗、葉 (圖一、B)、球莖鱗片內部 (圖一、C) 與表皮 (圖一、D)，以及肉質根表層 (圖一、E)，植株發病率高達 62%。植株發病主要由傷口部位開始，罹病部位首先出現紅色細斑，繼之病斑擴大成紅色細條斑、粗條斑或塊斑。由罹病部位所分離得到的真菌分離株，根據 Summerell 等人<sup>(32)</sup> 與 Leslie 與 Summerell<sup>(21)</sup> 所描述的鐮孢菌構造與型態，初步鑑定該些分離株為 *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg。 *F. proliferatum* 分離株在 PDA 斜面培養基的菌落呈淡橘至粉白色 (圖二、A)，培養基上呈現紫色到紫黑色色素 (圖二、B)。在 2% WA 培養基上甚少有大孢子產生，而大孢子呈鐮刀狀，足細胞與頂細胞不明顯 (圖二、C)，大孢子長度介於 12.4-32.4  $\mu\text{m}$ ，平均 22.5  $\mu\text{m}$ 。小孢子在 2% WA 培養基上呈鏈狀 (圖二、D) 或假頭狀 (圖二、E) 著生於分生孢子梗上，小孢子長度介於 2.5-6.5  $\mu\text{m}$ ，平均 4.6  $\mu\text{m}$ 。分生孢子梗可為單瓶狀枝 (圖二、E) 或複瓶狀枝 (圖二、F)。本病害依其病徵及病原菌，為與葉燒病 (由 *S. curtisii* 所引起) 有所區別，另命名為孤挺花赤斑病，英名為 red spot of amaryllis。

### 病原性測定

挑選 12 株由孤挺花罹病部位所分離的供試菌株，將

其接種於鱗片或葉片組織片段。接種後第一天，接種部位即有紅色病斑產生，接種後第二天即產生與田間相同的紅色條斑。接種後第三天，於鱗片部位接種者發病度介於 2 至 2.7 之間，其中以接種供試菌株 MB-020 者最高，對照組（傷口接種無菌水）則不發病。接種於葉片部位者發病度介於 1.7 至 2.7 之間，其中亦以供試菌株 MB-020 接種者最高，處理無菌水之對照組則不發病（表一）。由接種後之罹病部位，皆可再分離得到該病原菌，完成科霍氏法則。

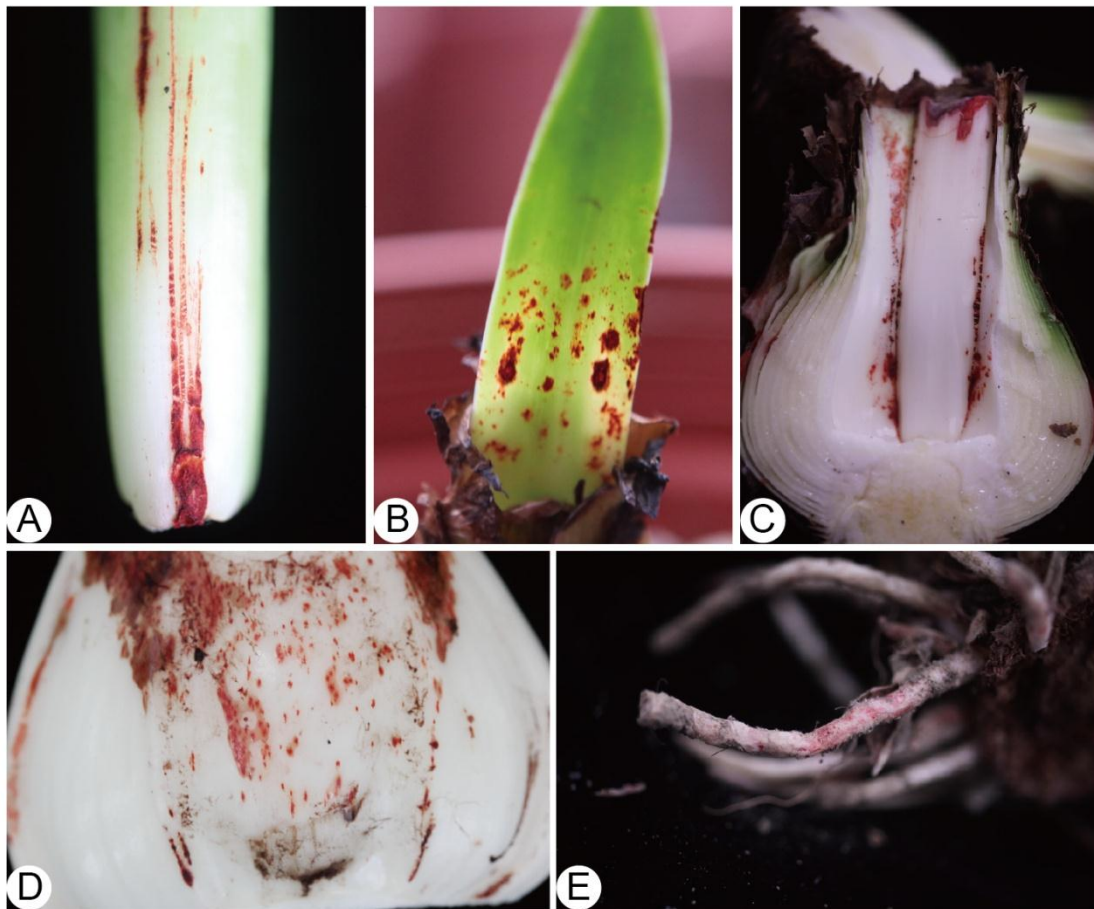
### 孤挺花赤斑病菌之分子鑑定

利用分子生物技術鑑定供試菌株 MB-013 與 MB-020，結果 MB-013 與 MB-020 菌株之 ITS 序列分別與 NCBI 資料庫之 *Fusarium proliferatum* FJ040179.1 與 HQ113948.1 (GenBank accession number) 達 100% 之相似度，佐證此兩供試菌株皆為 *F. proliferatum*。將 MB-013 與 MB-020 的序

列登錄於 NCBI 基因資料庫，MB-013 在 NCBI GenBank accession numbers 是 JQ612711，MB-020 則為 JQ612712。

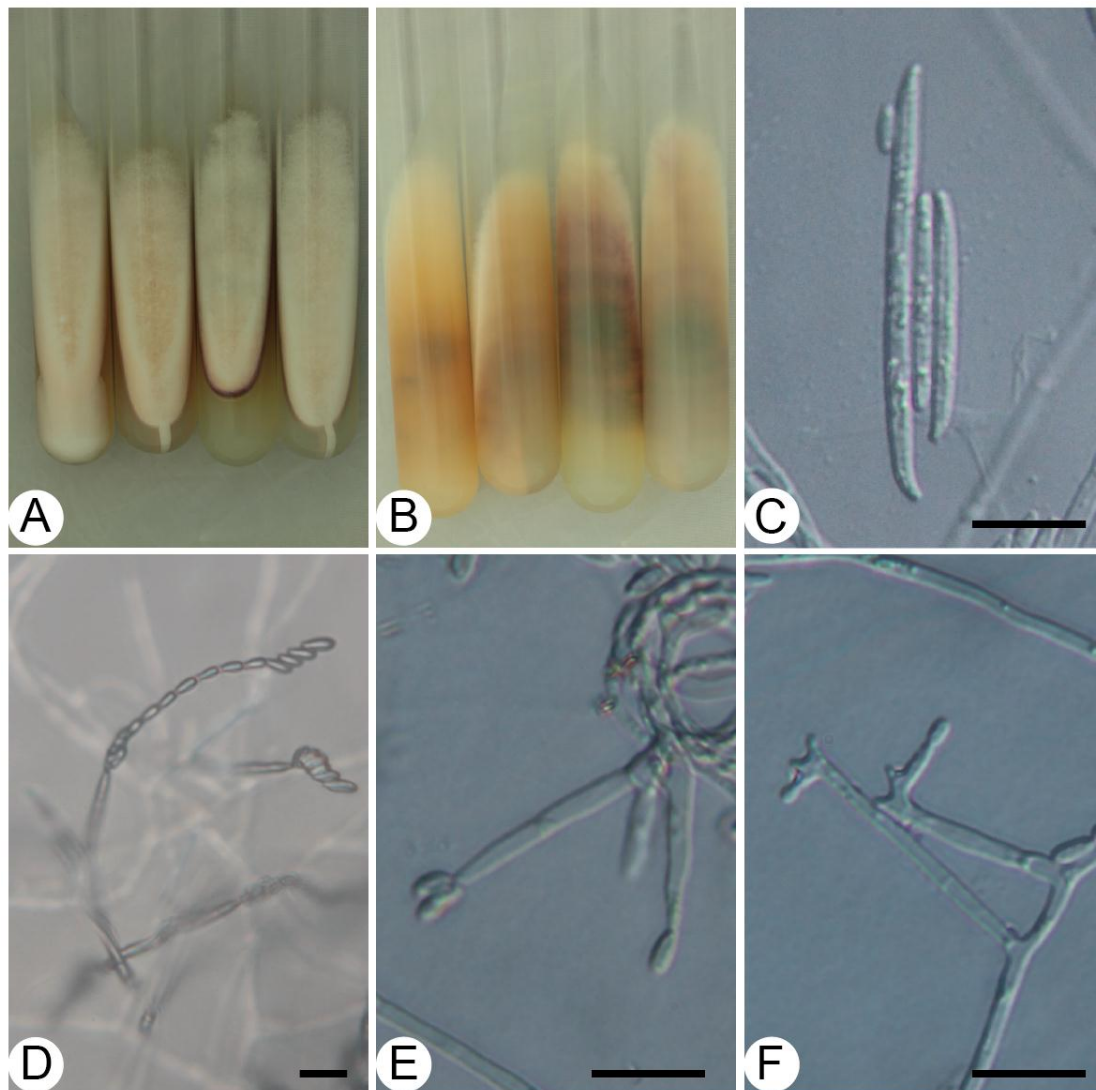
### 不同寄主來源之 *Fusarium proliferatum* 分離株對孤挺花的致病力測定

挑選 11 株由不同罹病寄主所分離得到的 *F. proliferatum* 分離株，將其接種於孤挺花鱗片或葉片組織片段。接種後第一天，接種部位即有紅色病斑產生；接種後第三天，於鱗片部位接種者發病度介於 1.8 至 2.5 之間，其中以供試菌株 TJP-1267-14 與 TJP-1267-16 接種後的發病度 2.5 最高，無菌水之對照組則不發病；於葉片部位接種者發病度介於 1.0 至 2.0 之間，其中以供試菌株 TJP-1155-1、TJP-1248-4、TJP-1267-14 及 TJP-1267-16 接種後的發病度 2.0 最高，無菌水對照組則不顯現病徵（表二）。



圖一、孤挺花赤斑病菌造成植株罹病部位產生紅色條斑病徵，感染部位在 (A) 採收後花梗基部，(B) 葉片，(C) 鱗片球內部，(D) 鱗片球表面，及 (E) 根部表面。

Fig. 1. The diseased amaryllis showed red spot with streak symptoms caused by *Fusarium proliferatum* on stalk after harvesting (A), leaf (B), inner bulb (C), surface of bulb (D), and root (E).



圖二、孤挺花赤斑病菌的培養特性與孢子型態。(A) 在 PDA 培養基的菌絲呈淡橘至粉白色，(B) 培養基上有紫色至黑色呈色。(C) 大孢子呈鐮刀狀，但足細胞與頂細胞不明顯，(D) 小孢子呈鏈狀排列，(E) 單瓶狀枝之分生孢子梗，(F) 複瓶狀枝之分生孢子梗。

Fig. 2. Colony characteristic and conidiospore morphology of *Fusarium proliferatum* caused red spot disease of amaryllis. Colony showed light orange to pink on PDA slants (A), and had purple to black pigment (B). Macroconidia were slender, almost straight (C), and microconidia form in chains (D) from monophialides (E) and polyphialides (F). (bar = 10  $\mu$ m)

### 傷口對孤挺花赤斑病發病度的影響

第一次試驗於 2011 年 8 月 9-23 日進行，比較挑選 *F. proliferatum* 供試菌株 TJP-1155-5、TJP-1267-14 及 TJP-1267-16，將其孢子懸浮液接種於製造人工傷口與否的孤挺花植株葉片上，並以無菌水為對照組。接種後兩星期，供試菌株 TJP-1155-5、TJP-1267-14 及 TJP-1267-16 接種於有傷口的葉片上，結果發病度分別為 2.2、3.0 及 3.0，對照組發病度則為 0，具顯著性差異 ( $P < 0.05$ )。然而供試菌株接種於無傷口的葉片上，則未見產生病徵 (表三)。第二次試驗於 2012 年 3 月 19 日至 4 月 2 日進行，

比較挑選 *F. proliferatum* 供試菌株 MB-013 及 MB-020，並以無菌水為對照組。接種後兩星期，供試菌株 MB-013 及 MB-020 接種於有傷口的葉片上，結果發病度分別為 2.0 及 1.7，對照組發病度則為 0.8，具顯著性差異 ( $P < 0.05$ )。然而供試菌株接種於無傷口的葉片上，則未見產生病徵 (表三)。

### 葉片組織離葉與否接種病原菌對孤挺花赤斑病發病度的影響

挑選孤挺花赤斑病菌 MB-013 與 MB-020 菌株，接種於孤挺花植株葉片與離葉組織片段 (3x5 cm<sup>2</sup>) 上。

表一、由罹病孤挺花分離得到之 *Fusarium proliferatum* 分離株的病原性測定

Table 1. The pathogenicity test of *Fusarium proliferatum* isolated from diseased amaryllis

Isolate <sup>1</sup>	Disease severity (0-3) <sup>2</sup>	
	Bulb	Leaf
CK (water)	0.0 b <sup>3</sup>	0.0 c
MB-001	2.0 a	2.5 ab
MB-004	2.2 a	1.7 b
MB-008	2.2 a	2.0 ab
MB-009	2.2 a	2.2 ab
MB-011	2.5 a	2.3 ab
MB-012	2.2 a	2.2 ab
MB-013	2.0 a	2.5 ab
MB-015	2.3 a	2.0 ab
MB-018	2.0 a	2.2 ab
MB-020	2.7 a	2.7 a
TJP-1267-14	2.0 a	2.0 ab
TJP-1267-16	2.3 a	2.5 ab

<sup>1</sup> Each isolate was inoculated on 6 bulbs or leaf tissues, and seven artificial wounds were made on each sample tissue. Data were recorder at 3<sup>rd</sup> day after inoculation.

<sup>2</sup> The disease severities were assayed on a scale of 0-3: 0 = healthy; 1 = red spot on inoculated tissue; 2 = red streak symptom around inoculated tissue; 3 = rot on inoculated tissue.

<sup>3</sup> Values followed by the same letter in each column are not significantly different at  $P > 0.05$  according to LSD test.

表二、不同寄主來源之 *Fusarium proliferatum* 分離株對孤挺花的致病力測定

Table 2. The virulence of *Fusarium proliferatum* isolated from different hosts on amaryllis

Isolate <sup>1</sup>	Host source	Disease severity (0-3) <sup>2</sup>	
		Bulb	Leaf
CK (water)	-	0.0 b <sup>3</sup>	0.0 d
F2017-23	Phalaenopsis	2.0 a	1.8 ab
TJP-1026-1	Cattleya	2.2 a	1.8 ab
TJP-1026-3	Cattleya	1.8 a	1.0 c
TJP-1155-1	Cymbidium	1.8 a	2.0 a
TJP-1155-3	Cymbidium	2.0 a	1.5 b
TJP-1155-5	Cymbidium	2.3 a	1.8 ab
TJP-1155-6	Cymbidium	2.0 a	1.2 c
TJP-1236-1	Oncidium	2.0 a	1.0 c
TJP-1248-4	Amaryllis	2.2 a	2.0 a
TJP-1267-14	Amaryllis	2.5 a	2.0 a
TJP-1267-16	Amaryllis	2.5 a	2.0 a

<sup>1</sup> Each isolate was inoculated on 6 bulbs or leaf tissues, and seven artificial wounds were made on each sample tissue. Data were recorded at 3<sup>rd</sup> day after inoculation.

<sup>2</sup> The disease severities were assayed on a scale of 0-3: 0= healthy; 1 = red spot on inoculated tissue; 2 = red streak symptom around inoculated tissue; 3 = rot on inoculated tissue.

<sup>3</sup> Values followed by the same letter in each column are not significantly different at  $P > 0.05$  according to LSD test.

表三、傷口對孤挺花赤斑病發生的影響

Table 3. Effect of artificial wounds on disease severity of amaryllis red spot disease caused by *Fusarium proliferatum*

Experiment <sup>1</sup>	Isolate <sup>1</sup>	Host source	Disease severity (0-3) <sup>2</sup>	
			Artificial wounds	Non-wounds
A	CK (water)	-	0.0 c <sup>3</sup>	0.0
	TJP-1155-5	Cymbidium	2.2 b	0.0
	TJP-1267-14	Amaryllis	3.0 a	0.0
	TJP-1267-16	Amaryllis	3.0 a	0.0
B	CK (water)	-	0.8 b	0.0
	MB-013	Amaryllis	2.0 a	0.0
	MB-020	Amaryllis	1.7 a	0.0

<sup>1</sup> The experimental periods of Experiment A was from 9 August to 23 August, 2011, and Experiment B was from 19 March to 2 April, 2012. Each isolate was inoculated onto leaf tissues with or without artificial wounds. Data were recorded at 14<sup>th</sup> day after inoculation.

<sup>2</sup> The disease severities were assayed on a scale of 0-3: 0 = healthy; 1 = red spot on inoculated tissue; 2 = red streak symptom around inoculated tissue; 3 = rot on inoculated tissue.

<sup>3</sup> Values followed by the same letter in each column are not significantly different at  $P > 0.05$  according to LSD test.

MB-013 分離株接種於植株葉片後第一、二、三天的發病度分別為 0.7、2.0 及 3.0，接種於離葉組織片段者則分別為 1.3、2.3 及 2.5。比較 MB-013 分離株，接種於孤挺花植株葉片與離葉組織片段上的相關係數為 0.95，兩者呈高度相關性 (圖三)。MB-020 分離株接種於植株葉片後第一、二、三天的發病度分別為 1.0、1.8 及 1.8，接種於離葉組織片段者則分別為 0.3、2.0 與 2.7。比較 MB-020 分離株，接種於孤挺花植株葉片與離葉組織片段上的相關係數為 0.96，兩者亦呈高度相關性 (圖三)。

### 溫度對孤挺花赤斑病菌菌絲生長的影响

將供試菌株 MB-013 與 MB-020 培養於 PDA 培養基平板，並放置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36°C 定溫箱中。7 天後調查之結果顯示供試菌株 MB-013 與 MB-020 的菌絲最適生長溫度介於 24-28°C，菌絲生長速度介於 5.2-5.9 mm/day。隨著溫度的增加或降低，菌絲生長速度則隨之遞減，在 8 與 36°C 時菌絲生長速度介於 1.1-1.7 mm/day (圖四)。

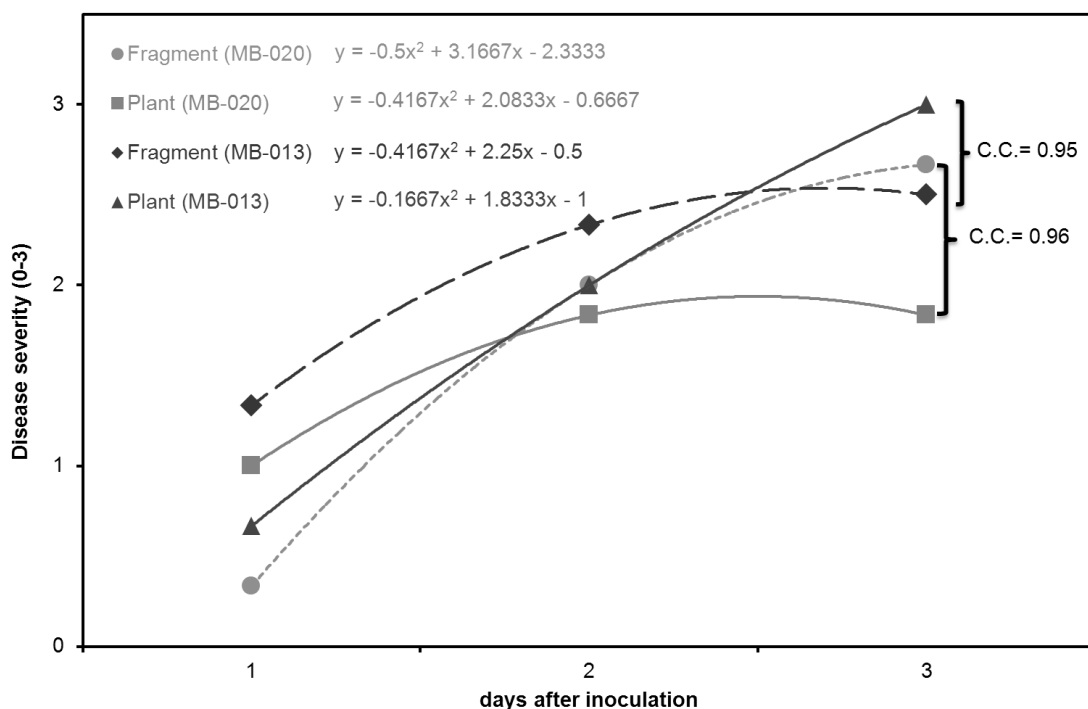
### 溫度對孤挺花赤斑病發病度的影响

將供試菌株 MB-013 與 MB-020 的孢子懸浮液接種於製造人工傷口的孤挺花鱗片組織片段上，並放置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36°C 定溫箱中。3 天後，顯示於 24-28°C 下接種 MB-013 與 MB-020 菌株的發病度最高，發病度為 3.0。隨著溫度的增加或降低，發病度則隨之遞減，在 8 與 36°C 時發病度介於 0-0.7 (圖五)。

## 討 論

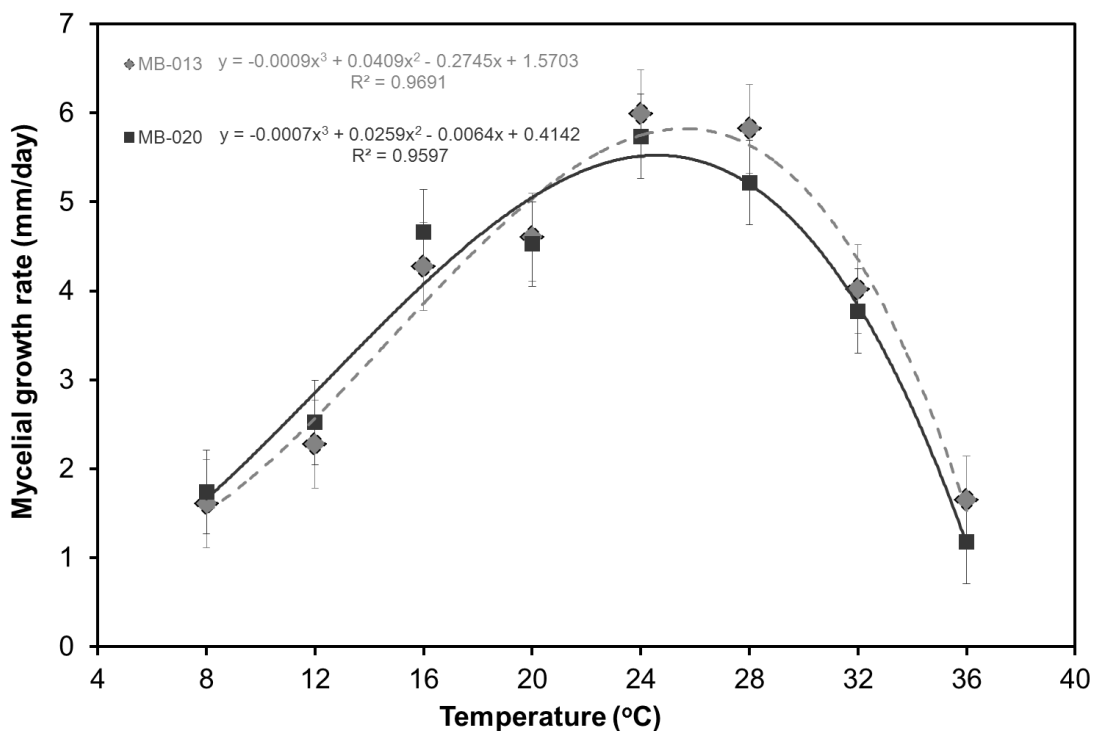
文獻報導孤挺花主要病害有葉燒病 (由 *Stagonospora curtisii* 所引起)<sup>(6, 14, 33, 34)</sup>，除此之外，台灣所栽種的孤挺花上亦曾記載罹患灰黴病 (病原菌 *Botrytis cinerea*)、炭疽病 (病原菌 *Colletotrichum gloeosporioides*) 與根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 等之紀錄<sup>(14)</sup>。國外報導則指出孤挺花會罹患細菌性軟腐病 (soft rot, 病原菌 *Erwinia chrysanthemi*; *E. carotovora* subsp. *carotovora*)<sup>(2, 3)</sup>、鱗片腐敗病 (grey bulb rot, 病原菌 *Rhizoctonia tuliparum*)<sup>(27)</sup>、紫斑病 (purple leaf spot, 病原菌 *Phoma glomerata*)<sup>(24)</sup>、根瘤線蟲 (root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*)<sup>(18)</sup>、根腐線蟲 (root-lesion nematode, *Pratylenchus hippeastri*)<sup>(17, 23)</sup> 及炭疽病 (anthracnose, 病原菌 *Colletotrichum gloeosporioides*)<sup>(18)</sup>，而鐮孢菌 (*Fusarium* spp.) 則會造成根腐 (root rot)<sup>(20)</sup>。另外，孤挺花亦會遭受病毒感染，包括有 *Hippeastrum mosaic virus*<sup>(28)</sup>、*Capsicum chlorosis virus*<sup>(7)</sup>、*Cucumber mosaic cucumovirus*<sup>(1, 31)</sup> 及 *Tomato spotted wilt tospovirus*<sup>(8)</sup>。又有報導指出孤挺花是 *Setosphaeria rostrata*<sup>(4)</sup>、*Cercospora* spp.、*Cladosporium* spp. 與 *Nigrospora* spp.<sup>(5)</sup> 的寄主。

臺灣過去曾記錄 *F. proliferatum* 為引起百合苗枯病的主要病原菌<sup>(35)</sup>，另臺灣農家要覽曾指出 *F. proliferatum* 會造成蕙蘭細斑病 (*Fusarium leaf spot*)<sup>(13)</sup> 之外，未有本菌可



圖三、植株葉片與離葉組織片段接種對孤挺花赤斑病發病度的影響。

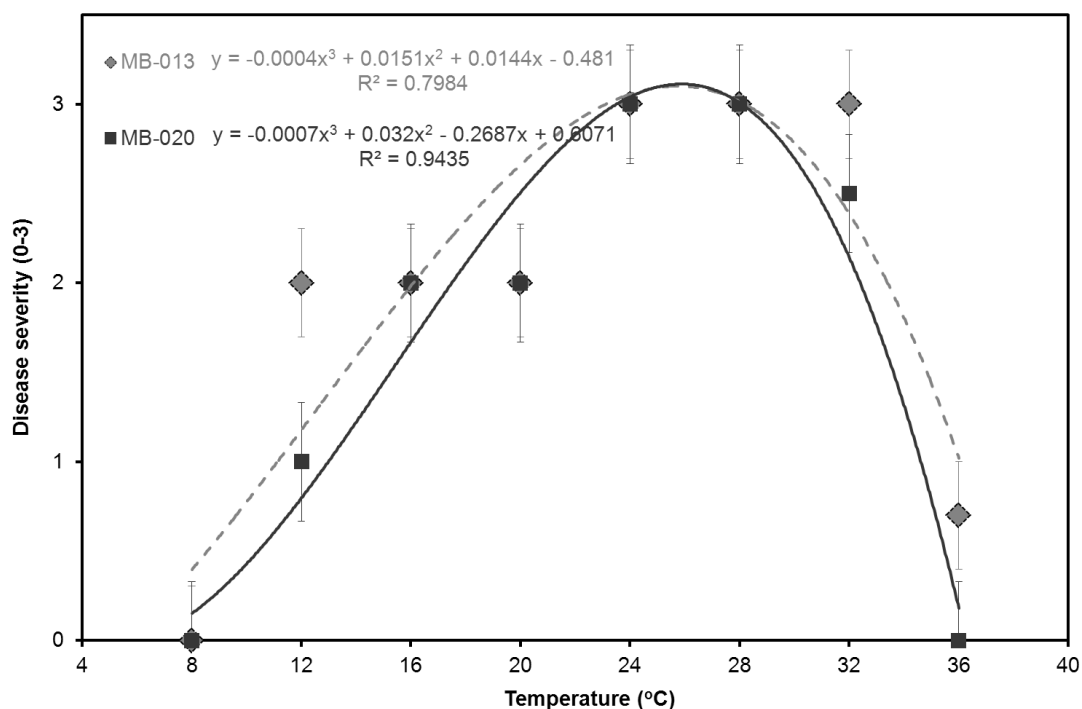
Fig. 3. Effect of pathogen inoculation of plant leaf and detached leaf fragment on disease severity of amaryllis red spot caused by *Fusarium proliferatum* MB-013 and MB-020. "c.c." meant Pearson correlation coefficient of disease severities between inoculation of plant leaves and detached leaf fragments.



圖四、溫度對孤挺花赤斑病菌菌絲生長的影響。

Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Fusarium proliferatum* MB-013 and MB-020 causing red spot disease of amaryllis (error bar= 95% confidence interval among temperatures).





圖五、溫度對孤挺花赤斑病發病度的影響。

Fig. 5. Effect of temperature on disease severity of red spot disease of amaryllis caused by *Fusarium proliferatum* MB-013 and MB-020. (error bar= 95% confidence interval among temperatures).

單獨引起作物病害的報導<sup>(14)</sup>。國外則曾報導 *F. proliferatum* 可單獨引起蔥花腐病 (flower pink rot of *allium*)<sup>(30)</sup>、洋蔥猝倒病 (damping-off of onion)<sup>(11)</sup>、玉米基腐病 (foot-rot of corn)<sup>(11)</sup>、蘆筍葉斑病 (leaf spot of asparagus)<sup>(10)</sup>及海棗花序腐敗病 (inflorescence rot disease of date palm)<sup>(12)</sup>等。Ichikawa 與 Aoki (2000) 則報導 *F. proliferatum* 可在蕙蘭葉片上分別引起黃斑 (yellow spot) 與黑斑 (black spot) 等二型病徵，並將引起黃斑病徵的 *F. proliferatum* 定義為 race Y，而引起黑斑病徵的 *F. proliferatum* 定義為 race B，然而卻未證實該二類菌株是否具有寄主專一性？此外，*F. proliferatum* 會危害儲藏期的玉米，並產生 fumonisins 與 deoxynivalenol 毒質，倘若人、畜不小心食用，會造成健康危害之問題<sup>(9)</sup>。

許多文獻報導 *F. proliferatum* 可與其他病原微生物一起危害作物，如 *F. proliferatum* 可與 *F. oxysporum* 及 *F. solani* 引起蕙蘭乾腐病 (dry rot of *Cymbidium* orchids)<sup>(19)</sup> 與蝴蝶蘭黃葉病 (*Fusarium* wilt)<sup>(13)</sup>。本菌又可與 *Bipolaris australiensis*、*Curvularia lunata* 及 *Alternaria tenuis* 造成水稻穗腐病 (rice spikelet rot disease)<sup>(15)</sup>。然而，*F. proliferatum* 普遍存在於自然界中，很多情況本菌與其他

病原微生物可同時由罹病株的罹病部位被分離得到。但是在接種的過程中，*F. proliferatum* 分離株的致病力往往不是最強，甚至需要藉助人工傷口處理才會形成明顯病徵。Shahnazi 等人 (2012) 即指出，由黑胡椒 (*Piper nigrum*) 黃化病 (yellowing disease) 罹病株可經常地同時分離得到 *F. proliferatum* 與 *F. solani* 分離株，但是經接種試驗證實僅 *F. solani* 才是黑胡椒黃化病的病原菌。因此，*F. proliferatum* 是否會與其他病原微生物一起複合感染造成作物病害？則有待進一步確認。

本研究經田間病害調查 (圖一)、病原菌分離、接種 (表一)、病原菌型態觀察 (圖二)、輔以分子生物技術，鑑定孤挺花新發生的赤斑病 (red spot of amaryllis) 係由病原真菌 *F. proliferatum* 所引起，而分離株中並無 McRitchie<sup>(25)</sup>、Chandel<sup>(6)</sup>與 Tarabeih<sup>(33)</sup>等人所描述引起類似病徵的 *Stagonospora curtisii*。傷口是本病原菌最主要的感染途徑，無論是植株葉片或是葉片與鱗片組織片段，經人工製造傷口接種後三天即可出現病徵 (表三、圖三)。而農民在田間經切花採收後，花梗並未呈現可見病徵，但是產品銷售上架 2-3 天後，花梗切口處即出現紅色條斑狀病徵，發病過程與本研究之接種情況吻合。此外，孤挺花多於春天開

花，在開花與採收的過程中會有自然或人工傷口的產生。另外，由赤斑病菌供試菌株 MB-013 與 MB-020 的菌絲最適生長溫度介於 24-28°C (圖四)，且赤斑病的最適發病溫度亦介於 24-28°C (圖五) 觀之，孤挺花赤斑病的發生乃在於環境最適合病原菌生長的情況下，配合寄主植物因生長或採收後造成的傷口，使病害特別容易發生，而在其他期間則不容易發生。

本研究選用多種由田間不同作物罹病株分離得到的 *F. proliferatum* 菌株，包括有分離自蝴蝶蘭黑斑病 (尚未發表) 的 F2017-23，主要引起蝴蝶蘭葉片出現黑色病斑；分離自蕙蘭細斑病的 TJP-1155-1、TJP-1155-3、TJP-1155-5 及 TJP-1155-6，該些菌株除了會在蕙蘭葉片形成黑色細小斑點之外，亦會造成蕙蘭新芽褐化與死亡 (尚未發表)；而分離自嘉德利亞蘭的 TJP-1026-1 和 TJP-1026-3 分離株與分離自文心蘭的 TJP-1236-1 分離株，則是於炭疽病罹病部位同時與炭疽病菌一起被分離得到。將這些由不同寄主來源的 *F. proliferatum* 分離株接種於人工製造傷口的孤挺花植株上，結果所有供試菌株均可引起赤斑病病徵 (表二)。此結果顯示由其他作物所分離得到的 *F. proliferatum* 分離株，不論是病原菌或非病原菌，在有傷口的情況下皆可引起孤挺花赤斑病。本研究將持續探討 *F. proliferatum* 危害其他作物的情形，並進一步研究孤挺花赤斑病的發病生態與防治技術，以作為農民防治本病的參考依據。

### 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Adhab, M. A., and Al-Ani, R. A. 2011. Amaryllis and shrimp plant are secondary hosts of Cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in Iraq. *J. North Am.* 2: 872-875.
2. Almeida, I. M. G., Malavoita, V. A. Jr., and Rodrigues Neto, J. 1997. New records of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. chrysanthemi* on ornamental plants in Brazil. *Rev. Bras. Hortic. Orn.* 3: 89-90. (in Portuguese with English abstract)
3. Almeida, I. M. G., Malavolta, V. A. Jr., and Rodrigues Neto, J. 1996. Characterization of bacteria of the genus *Erwinia* causing soft rot on ornamental plants in Brazil. *Rev. Bras. Hortic. Orn.* 2: 52-60. (in Portuguese with English abstract)
4. Anahosur, K. H., and Sivanesan, A. 1978. *Setosphaeria rostrata*. IMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 587.
5. Bonilla Bernal, T., Sandoval Ramirez, I., Estrada Villardel, G., and Lopez, M. O. 2003. Species of fungi found on amaryllidaceae. *Fitosanidad* 7: 13-16. (in Spanish with English abstract)
6. Chandel, S. S. 1999. Fungal and bacterial diseases of bulbous ornamentals. Pages 501-531 *in*: Diseases of Horticultural Crops: vegetables, ornamentals and mushrooms. L. R., Verma, and R. C., Sharma eds. Indus Publishing Company, New Delhi. 731 pp.
7. Chen, C. C., Huang, Y. H., Chen, T. C., Yeh, S. D., and Chang, C. A. 2009. First report of capsicum chlorosis virus infecting amaryllis and blood lily in Taiwan. *Plant Dis.* 93: 12.
8. Derks, A. F. L. M., Lemmers, M. E. C., Loebenstein, G., Hammond, J., Gera, A., Derks, A. F. L. M., and van Zaayen, A. 1996. Detection of tospoviruses in bulbous crops and transmissibility by vegetative propagation. *Acta Hortic.* 432: 132-139.
9. El-Imam, A. M. A., Ameh, J. B., and Abdullahi, I. O. 2012. Occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in stored maize used in industrial productions in Zaria Nigeria. *Afr. J. Food Sci.* 6: 249-252.
10. Elmer, W. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., and Nigh, E. L. 1999. Vegetative compatibility groups in *Fusarium proliferatum* from asparagus in Australia. *Mycologia* 91: 650-654.
11. Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P., and Rossman, A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, Minnesota. 1252 pp.
12. Hameed, M. A. 2012. Inflorescence rot disease of date palm caused by *Fusarium proliferatum* in Southern Iraq. *Afr. J. Biotechnol.* 11: 8616-8612.
13. Hsieh, T. F. 2005. *Phalaenopsis* diseases. Pages 241-246 *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia: Crop edition-3. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei.
14. Hsu, S. T., Chang, T. T., Chang, C. C., Tsai, J. L., and Tsay, T. T. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan 4<sup>th</sup> ed. Taiwan Phytopathological Society, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

15. Huang, S. W., Wang, L., Liu, L. M., Liu, E. Y., Hou, E. Q., Xiao, D. F., and Fan, Z. L. 2012. Isolation, identification and biological characters of pathogens of rice spikelet rot disease. *Chinese J. Rice Sci.* 26: 341-350.
16. Ichikawa, K., and Aoki, T. 2000. New leaf spot disease of *Cymbidium* species caused by *Fusarium subglutinans* and *Fusarium proliferatum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 66: 213-218.
17. Inserra, R. N., Troccoli, A., Gozel, U., Bernard, E. C., Dunn, D., and Duncan, L. W. 2007. *Pratylenchus hippeastri* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from amaryllis in florida with notes on *P. scribneri* and *P. Hexincisus*. *Nematology* 9: 25-42.
18. Korade, B. B., Pawar, D. R., and Joshi, M. S. 2001. Anthracnose disease of spider lily. *J. Maharashtra Agric. Univ.* 26: 70-71.
19. Lee, B. D., Kim, W. G., Cho, W. D., and Sung, J. M. 2002. Occurrence of dry rot on *Cymbidium* orchids caused by *Fusarium* spp. in Korea. *Plant Pathol. J.* 18: 156-160.
20. Leeuwen, A. J. van. 1974. Bulb disinfection for hippeastrum ("amaryllis")- good alternatives to mercury compounds. *Vakbl. Voor de Bloemist.* 29: 4. (in Dutch with English abstract)
21. Leslie, J. F., and Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. 388 pp.
22. Liu, M. C. 2005. Amaryllis. Pages 761-764 in: *Taiwan Agriculture Encyclopedia- Crop Edition 2*. Council of Agriculture, Taipei, Taiwan. 926 pp. (in Chinese)
23. Luca, F. de., Troccoli, A., Duncan, L. W., Subbotin, S. A., Waeyenberge, L., Moens, M., and Inserra, R. N. 2010. Characterization of a population of *Pratylenchus hippeastri* from bromeliads and description of two related new species, *P. floridensis* n. sp. and *P. parafloridensis* n. sp., from grasses in Florida. *Nematology* 12: 847-868.
24. Maiti, S., Sahambi, H. S., and Jana, B. K. 1979. A new purple leaf spot of *Hippeastrum* from India. *Phytopathology* 32: 120-121.
25. McRitchie, J. J. 1976. Red leaf spot of amaryllis. *Plant Pathol. Circ.* 162.
26. Montasser, S. A. 1995. Reaction of certain flower bulb plants to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Pakistan J. Nematol.* 13: 99-102.
27. Mordue, J. E. M. 1974. *Rhizoctonia tuliparum*. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria* 407: 41.
28. Raj, S. K., Snehi, S. k., Kumar, S., and Khan, M. S. 2009. First molecular detection and identification of a potyvirus associated with severe mosaic disease of amaryllis (*Hippeastrum hybridum* Hort.) in India. *Aust. Plant Dis. Notes* 4: 50-53.
29. Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K., and Nejat, N. 2012. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *J. Gen. Plant Pathol.* 78: 160-169.
30. Shin, H. D., and Kim, J. W. 2001. Flower pink rot of *Allium* plants caused by *Fusarium proliferatum*. *Mycobiology* 29: 224-226.
31. Singh, G. S., Aminuddin, J. K., and Srivastava, S. 2009. First report of *Cucumber mosaic virus* in amaryllis *belladonna* in India. *J. Plant Pathol.* 91(S4): 107.
32. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., and Burgess, L. W. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, Minnesota. 392 pp.
33. Tarabeih, A. M., Al-Zarari, A. J., and Michail, S. H. 1980. Leaf scorch of amaryllis, new to Iraq. *Phytopathol. Mediter.* 19: 150-152.
34. Vasil'eva, L. I., Komendant, G. M., and Danilenko, V. F. 1972. Red-brown leaf spot or 'scorch' of narcissus-*Stagonospora curtisii* (Berk) Sacc. *Byull. Gos. Nikitsk. Bot. Sada.* 3: 64-66. (in Russian with English abstract)
35. Wu, R. S., and Huang, J. W. 1997. A major causal agent of lily seedling blight: *Fusarium proliferatum*. *Plant Pathol. Bull.* 6: 10-110. (in Chinese with English abstract)

## ABSTRACT

Su, J. F.<sup>1</sup>, Chen, Y. H.<sup>2</sup>, Chien, L. Y.<sup>1</sup>, Huang, J. H.<sup>1</sup>, and Hsieh, T. F.<sup>3,4</sup>. 2011. First report of Amaryllis red spot disease caused by *Fusarium proliferatum* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 20: 78-89. (<sup>1</sup> Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wefeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup> Department of Biological Science and Technology, China Medical University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; <sup>3</sup> Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, GuKeng, YunLin, Taiwan, R.O.C.; <sup>4</sup> Corresponding author, E-mail: tfhsieh@tari.gov.tw; Fax: +886-5-5820835)

The field survey was conducted at Houli, Taichung in April and July, 2011. The floral peduncle of amaryllis surveyed showed red spot with streak symptom appearing on cutting part one to three days after harvesting. The quality and market value of cut flower were obviously affected by disease infection significantly. Diseased symptom not only appeared on peduncle, but also on leaves, inner and surface of bulb and root surface. The disease incidence of amaryllis red spot was up to 62% in field surveys and the wound was recognized as the initial stage of disease development. The colony characteristics of isolates from diseased plants showed light orange to pink on potato dextrose agar (PDA). On water agar (WA), conidiophores of tested isolates are monophialides or polyphialides, and arrangements of micro-conidiospores are in chain or false head; however, macro-conidiospores were rarely produced in WA or PDA. According to Koch's postulates, the isolates of MB-013 and MB-020 were chosen and submitted for further molecular identification by using sequence comparison of internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA after pathogenicity test. The pathogen causing the new recorded amaryllis red spot disease was identified as *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg. Optimum temperatures for mycelial growth of pathogen were ranged from 24 to 28°C, and the growth rates were ranged from 5.2 to 5.9 mm/day. Optimum temperatures for disease development were ranged from 24 to 28°C, but no disease symptom was observed at 8 and 36°C.

Keywords: amaryllis, *Fusarium proliferatum*, red spot disease, new recorded disease