

金線蓮莖腐病及其病原菌

謝式坤鈺 莊維仁 黃士峰

台中市 國立中興大學植物病理學研究所

接受日期：中華民國 83 年 8 月 30 日

摘 要

謝式坤鈺、莊維仁、黃士峰，1994。金線蓮莖腐病及其病原菌。植病會刊 3:140-146。

金線蓮莖腐病 (stem rot) 的病原菌經分離鑑定為 *Fusarium oxysporum* Schl.，普遍發生在金線蓮的栽培場，是本省新發現的一種重要病害。莖腐病菌之大孢子壁薄而纖細，具有足細胞，而頂細胞較細，有 1-4 隔膜，而其中以 3 個隔膜者最為普遍，大小為 $12.8-36.3 \times 3.3-4.9 \mu\text{m}$ 。小孢子 0-1 隔膜，大小為 $6.2-16.2 \times 2.5-5.0 \mu\text{m}$ ；分生孢子柄為單生瓶狀枝，長度為 5-15 μm (平均 9.55 μm)，厚膜孢子球形，表面平滑而壁厚，單一或成對著生於菌絲末端或菌絲間，直徑 5-16 μm ；本菌最適生長之溫度 24 C，最適生長之酸鹼度為 pH 5-6，最適生長之水份潛勢 -10 bar。測定本菌的寄主範圍，發現其無法感染其它蘭科植物，因此推測可能係一新的分化小種。

關鍵詞：金線蓮、莖腐病、鐮刀菌。

緒 言

金線蓮 (Taiwan *Anoectochilus*) 屬於蘭科，又名金線連、藥虎、烏參、或石松等。在本省天然生長處所主要分佈於海拔 800-1500 公尺之陰濕森林和竹林中，其莖為肉質、圓筒狀和常多分歧，葉互生、平滑、全緣、表面暗綠色，主脈五條，具細小之金黃色網狀側脈而得名。金線蓮屬 *Anoectochilus* 大約有 25 種，分佈於亞洲，自印度至日本，南至錫蘭，北至中國大陸。本省產的金線蓮有二種，即 *Anoectochilus formosanus* 與 *Anoectochilus koshunensis*。其植物體完全一樣，花器則頗不相同，主要差別在於前者唇瓣爪部 (中段) 為絲裂狀；後者之唇瓣爪部二側則各具一三角形附屬物 (2)。而在本省的人工栽培主要是以前者為多。

金線蓮為本省民間一種極珍貴之藥草之一，味甘性涼，有清涼、退火、解熱、解鬱，對高血壓、糖尿病、胸膈呼吸道及腹部疾病傳說均具有療效，經動物試驗更證明有鎮痛、降血壓、利尿、降血糖、消炎作用和保肝作用 (1)，賽鴿者更深信金線蓮能持續鴿子之飛行能力。由於這種原因導致價格昂貴，野生金線蓮已很難採到。近年來利用組織培養及無菌播種方式，能大量繁殖種苗，年栽培量估計在六百萬株以上，產值超過新臺幣一億元，栽培數量雖多，但仍常供不應求，且隨著專業化的栽培，病害亦日趨嚴重，其中以

莖腐病 (stem rot) 與 *Pythium ultimum* 引起的基腐病 (basal rot) 佔多數，尤其是前者，目前普遍發生於金線蓮栽培區，造成栽培者嚴重的損失，很多種植場所常因此病而導致全部死亡，根據調查莖腐病之發生約佔所有病害的百分之九十，可謂十分嚴重 (3)。金線蓮莖腐病主要病徵為造成莖基部之褐色，縮縮甚至折斷及全株死亡；有些栽培場患病率高達 100%，完全沒有收成，損失很大。金線蓮的栽培為新興事業，全世界也只有臺灣種植，可供參考文獻很少，本文報告金線蓮莖腐病病徵、探討其病原學，希望對此病害之防治有所助益。

材料與方法

供試菌株來源、培養及保存

自南投縣霧社鄉埔里鎮和魚池鄉、高雄縣烏松鄉、以及台中市中興大學溫室等地採得金線蓮莖腐病病株，由病株莖部切取病健組織分界處，經 1% NaOCl 或 75% 乙醇表面消毒之後，置於 Peptonc-PCNB agar (PCNB) (12)、Komada's medium (KM) (11)、或 2% Water agar (WA) 上進行分離，共得到 TF-001、WF-001、KF-001 等三十個 *Fusarium* sp. 分離株；經病原性測定後以病原性較強的 WF-001 以及 TF-003 為主要

試驗菌株。供試菌株培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 斜面，在室溫 (20–25 °C) 及光照 (間接日照或兩支 40 瓦日光燈距試管 18 吋處每日照光 12 hr)，即可正常的生長和產孢。為維持野生型每隔 20–30 天單孢更新培養一次。

帶病菌基質之製作

將芹菜桿洗淨，切成 1–2 cm 長，在三角燒瓶中，經高溫高壓滅菌後，接入供試菌株的孢子懸浮液，俟長滿菌絲後，倒出與經過高溫高壓滅菌的海沙均勻混合，加入適量的水拌勻，之後再與高溫高壓滅菌的蛇木屑、輕蛭石、泥炭土等基質以體積 1:1:1 均勻混合，陰乾之後，用 20 mesh 的網篩篩過，裝入大塑膠袋中，置於室溫下保存，即可維持極高濃度的帶病菌基質。

病原性的測定

以單孢分離的方法將病原菌培養於 PDA 斜面上，俟生長 20–30 天後，用無菌水將斜面上的分生孢子洗出，調成孢子懸浮液 (10^5 spores/ml)，均勻混入無菌基質中 (100 ml/Kg)，種下金線蓮，俟發病後，再由病株分離病原菌，並經鑑定是否與原先分離之病原菌相同。

厚膜孢子的形成

用芹菜莖部切成 1–1.5 cm 消毒後，培養本菌，在 24 °C 下每日照光 (1900 LUX) 12 hr，7 天後即可誘使大量厚膜孢子產生。另外將菌絲塊置入無菌水中，於一至二星期後亦可產生大量之厚膜孢子 (9)。

對其它蘭科植物之病原性

將培養於 PDA 上 7 天之供試菌株，以直徑 0.9 cm 的打孔器打下菌絲塊，用針束刺傷文心蘭 (*Oncidium lanceanum* Lindl.)、石斛蘭 (*Dendrobium* sp.)、狐狸尾蘭 (*Rhynchostylis gigantea* Lindl.)、蜘蛛蘭 (*Brassia gireoudiana* Rchb.)、萬代蘭 (*Vanda sanderiana* Rchb.)、四季蘭 (*Cymbidium* sp.)、朵麗蝶蘭 (*Doritis pulcherrima* Rchb.)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* sp.)、童子軍刀蘭 (*Oncidium* sp.) 葉片基部，加德利亞蘭 (*Cattleya* sp.) 的假莖造成傷口，貼上菌絲圓片，用棉花沾無菌水覆蓋在接種源上以保持濕度，置於室溫下約 24 °C，24 hr 後取下棉花，每天觀察是否出現病徵。

溫度對病菌菌絲生長的影響

將供試菌株培養於 PDA 平板 3–5 天，取菌落邊緣 0.5 cm 直徑菌絲塊，移入含 30 ml Czapek's 培養液的燒瓶 (100 ml) 中靜置培養，再分別置於 8 至 36 °C 每 4

度一個之定溫箱中，培養二週後測量菌絲的乾重量，每處理五重複。

溫度對病菌孢子發芽的影響

以無菌水將培養於 PDA 斜面上孢子洗下，製成孢子懸浮液 (10^6 spores/ml)，取 0.1 ml 之孢子懸浮液，平展於 PDA 平板中，再分別置於 8 至 36 °C 每 4 度一個之定溫箱中，經 12 hr 後，以棉藍染液 (cotton blue) 染色固定，再鏡檢孢子的發芽，每處理五重複，每一平板檢查 100 個孢子。

酸鹼度對病菌菌絲生長的影響

以檸檬酸磷酸氫鈉緩衝液 (Citrate-phosphate buffer) 調整 Czapek's 培養液 (NaNO_3 , 2g; KH_2PO_4 , 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g; KCl , 0.5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01g; Glucose, 30g in 1 liter DW) 的酸鹼度，配成酸鹼度為 2.5、3、4、5、6、7、7.8、8.5 等八種基礎培養液，接種後靜置於 25 °C 之定溫箱中培養二週，再測定菌絲乾重量。

水份潛勢對病菌菌絲生長和產孢的影響

以不同濃度的氯化鉀加入 Czapek's 培養基中，使成 -1、-5.573、-10.012、-23.183、-36.417、-54.221、-72.40、-91.06、-119.8、-149.79 Bar 等不同水份潛勢 (11)，經高壓滅菌後倒平板，接種後培養於 25 °C 下，每處理五重複，五天後測量菌落的直徑並用無菌水將平板上的孢子洗下，以血球計數器計算孢子量。

結 果

病徵

本病的病徵一般出現在莖基部接近栽培基質表面處，大約在植株的中央部位 (圖一；1,2)，首先產生褐色水浸狀斑，此水浸狀斑逐漸擴大後轉變為軟腐，外觀不容易察覺，等到由病患部位折斷後倒伏才容易被發現，如栽培環境非常潮濕或澆水過多，則全株莖部會呈軟腐狀，但一般正常栽培環境則病患部位呈黑褐色乾腐脫水縮，而栽培基質內之根部和莖部外觀可能保持健全，但剖開感染莖部可發現維管束有明顯的褐化現象 (圖一；3)，莖內部褐變約 1–2 cm，而離折斷較遠處則保持不變，此種折斷而殘留在基質內的莖部，偶而會長出新芽。在溫室中接種，幼苗期之植株 (三至四個月)，病勢發展很快，從接種到出現病徵僅約 5–10 天；而株齡較長之金線蓮 (六至七個月) 約 7–14 天，病徵出現 2–5 天後莖部折斷。

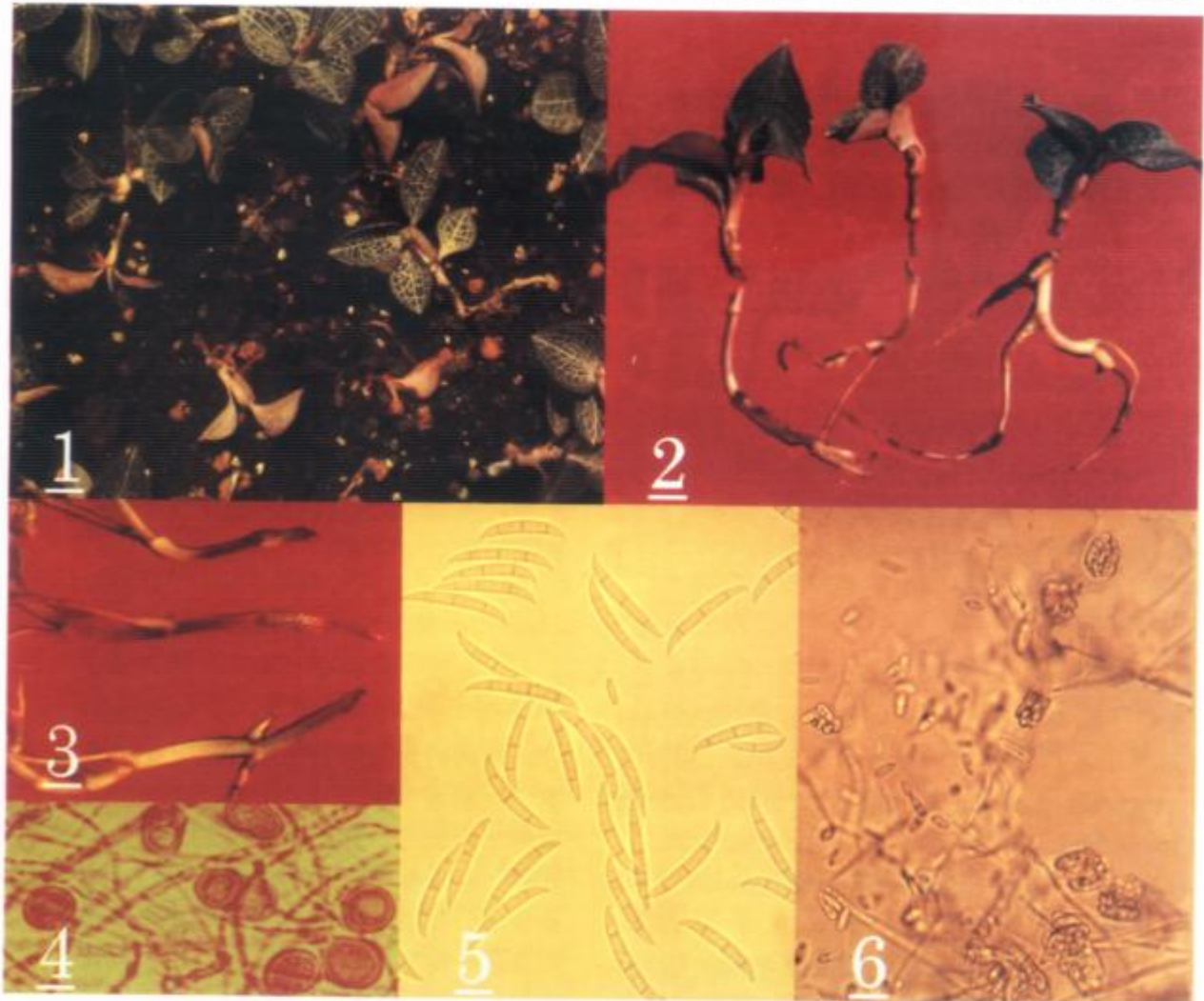
病原性的測定

將各地分離出的莖腐病菌菌株，以厚膜孢子接種金線蓮，一星期即可出現病徵；而用分生孢子約需十天才出現病徵，兩者病徵相同且維管束褐化。病徵的出現快慢和病勢的進展與接種源的濃度成正比，各菌株間以 TF-003 和 WF-001 的致病力較強，故下面的其它研究皆用此兩菌株。接種後重新分離所得的菌株經觀察形態與培養特性，與原先分離所得的病原菌相同。

病原菌之形態和培養特性

在 PDA 上由很短孢柄產生很多的小孢子 (microconidia)，小孢子透明無色，卵圓形 (oval) 到腎臟形 (kidney)，具有 0-1 隔膜，以無隔膜者為最多，

6.2-16.2 × 2.5-5.0 μm，其產生的形態為假頭狀 (false head) (圖一：6)。大孢子在 PDA 上產量很少，但在寄主組織上則產生許多，薄壁透明無色、纖細，具有足細胞 (foot-shaped basal cell)，而頂細胞 (apical cell) 較細，具 1-4 隔膜，而以 3 個隔膜最為普遍，12.8-36.3 × 3.3-4.9 μm (圖一：5)。分生孢子柄單生瓶狀枝 (monophialides)，很短，側生，長度為 5-15 μm (平均 9.55 μm)。厚膜孢子球形，表面平滑，單一或成對生於菌絲末端或菌絲間，透明無色至淡褐色，直徑 5-16 μm (圖一：4)。在光照下病菌於 PDA 平板上菌絲生長速率很快，培養十天後菌落的直徑超過 8.5 cm，氣生菌絲很旺盛，白色，其上著生小孢子，菌落背面產生紫色色素，且滲入培養基內，分生孢子叢 (sporodochia) 橙色到藍黑色。由以上的鑑定結果可以知道，本病原菌應為 *Fusarium oxysporum* (6)。



圖一、金線蓮莖腐病之病徵及其病原菌。(1)金線蓮莖腐病嚴重發生情形；病株折斷倒伏在栽培床上；(2)金線蓮莖腐病典型病徵；莖部中央縮折斷，莖基部外觀保持完好；(3)剖開金線蓮莖腐病病株折斷的莖基部有褐化現象，而遠離折斷處保持正常顏色；(4)病原菌之厚膜孢子(800×)；(5)病原菌之大孢子(600×)；(6)病原菌之小孢子的假頭狀著生情形(600×)。

Fig. 1. Symptoms of stem rot of Taiwan Anoectochilus and its causal organism, *Fusarium oxysporum*. (1) Serious occurrence of stem rot of Taiwan Anoectochilus; diseased plants fallen on cultivation bed; (2) Typical symptoms of stem rot of Taiwan Anoectochilus; middle of stems shrunken and broken while basal portion of stems remained apparent healthy; (3) Dissection of broken end of the stem showing browning discoloration of the tissues, the tissues far away from broken end may remain normal color; (4) Chlamydospores (800×); (5) Macroconidia (600×); (6) Microconidia formed on false-heads (600×).

對其它蘭科植物之病原性

金線蓮莖腐病病原菌不管是傷口或無傷口接種，對供試文心蘭、石斛蘭、狐狸尾蘭、蜘蛛蘭、萬代蘭、四季蘭、朵麗蝶蘭、蝴蝶蘭、童子軍刀蘭、加德利亞蘭等十種蘭科植物全部沒有產生明顯病徵，僅在傷口部位產生褐化，可能只是機械傷害所造成之褐化反應。

溫度對病菌菌絲生長的影響

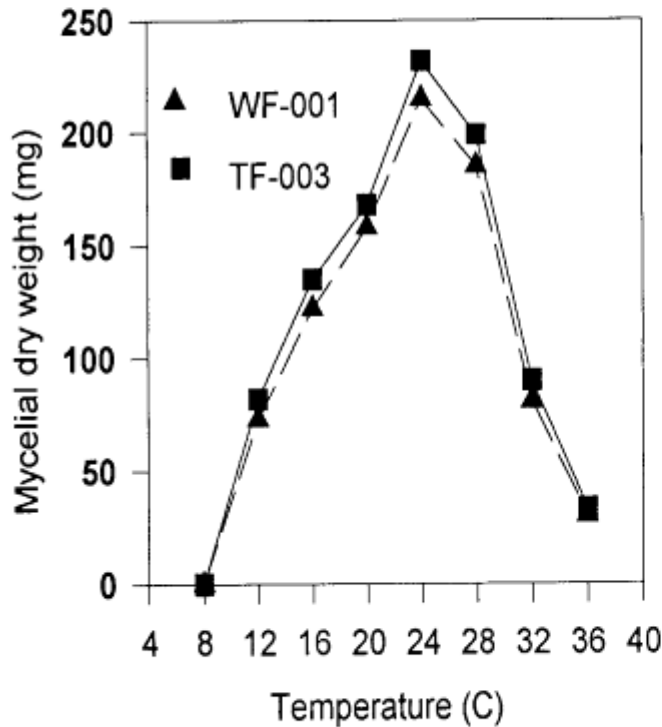
由測乾重量結果顯示病菌菌株之適合生長溫度範圍在12-36 C，若低於8 C則菌絲停止生長，最適生長溫度則在24-28 C之間，而以24 C生長最好(圖二)。

溫度對病菌孢子發芽及發芽管長度的影響

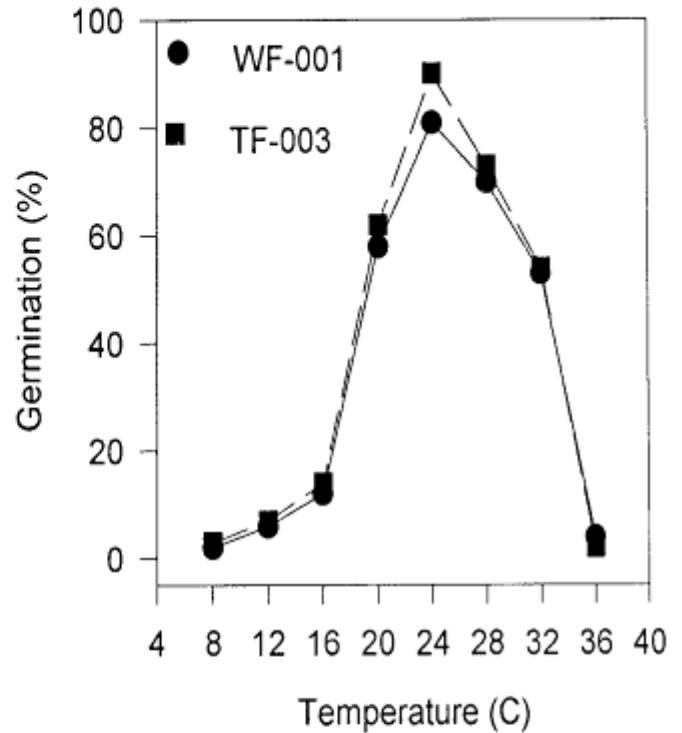
厚膜孢子在8-36 C時範圍皆可發芽，而在24 C時發芽率最高(圖三)。分生孢子之發芽溫度範圍比較狹窄，發芽率以24-28 C最好，但在低溫8 C及高溫36 C時則不會發芽(圖四)。

酸鹼度對病菌菌絲生長的影響

*F. oxysporum*在酸鹼度2.5-8.2之間皆可生長，而在pH 5-6範圍之生長最好(圖五)。

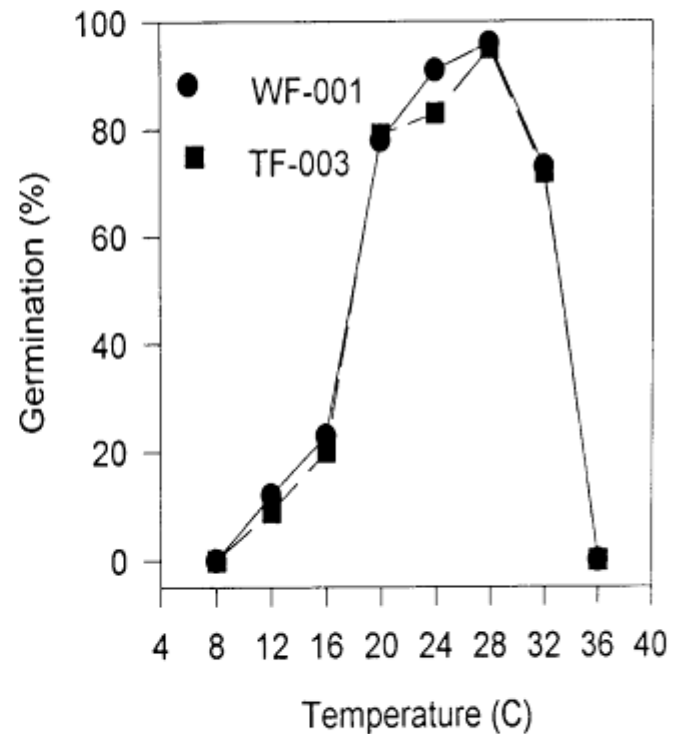


圖二、溫度對金線蓮莖腐病病原菌菌絲生長之影響。
Fig. 2. Effect of temperature on the mycelial growth of *F. oxysporum* (isolates WF-001 and TF-003).



圖三、溫度對金線蓮莖腐病病原菌分生孢子發芽之影響。

Fig. 3. Effect of temperature on the conidial germination of *F. oxysporum* (isolates WF-001 and TF-003).



圖四、溫度對金線蓮莖腐病病原菌厚膜孢子發芽之影響。

Fig. 4. Effect of temperature on the chlamyospore germination of *F. oxysporum* (isolates WF-001 and TF-003).

水份潛勢對病菌菌絲生長的影響

病菌在水份潛勢 -10 bar 時菌絲生長最好，而在 -149.8 bar 時菌絲生長就停止 (圖六)。

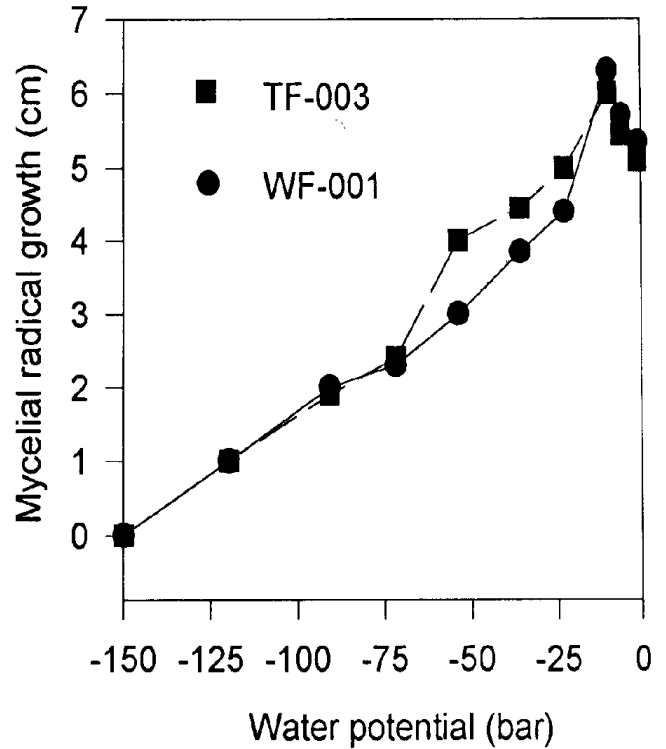
水份潛勢對病菌產孢的影響

病菌在 -10 至 -23 bar 時產孢子量最好，而在 -119 bar 時產孢子量降低很多，在 -149.8 bar 時則停止產孢子 (圖七)。

討 論

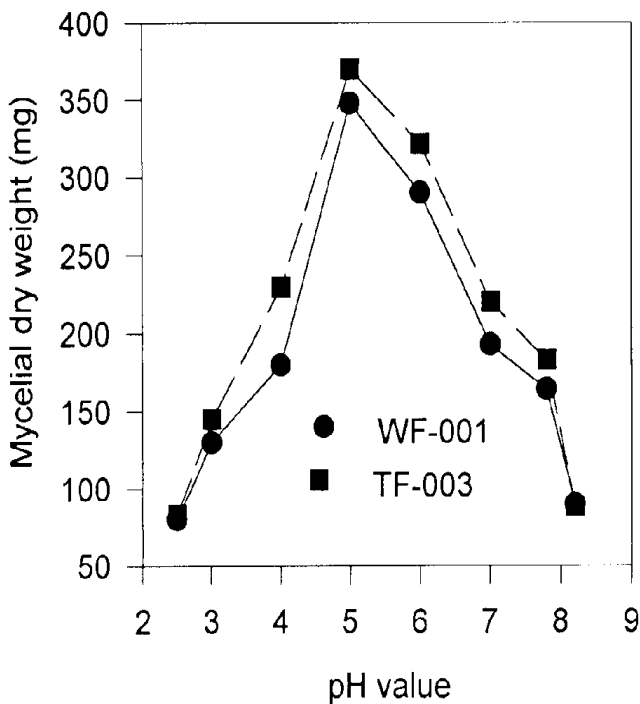
金線蓮莖腐病是本省新發現的病害之一，由於從金線蓮莖腐病病株和罹病栽培基質上所分離到的均係同一種 *Fusarium* sp.，經過病原性測定與重新分離工作證明此 *Fusarium* sp. 確為金線蓮莖腐病的病原菌。進一步按 Booth (6) 與 Snyder & Hansen (14) 的 *Fusarium* 分類系統，觀察比較金線蓮莖腐病病原菌的形態和培養特性，筆者等把莖腐病菌的學名鑑定為 *F. oxysporum*。

金線蓮莖腐病菌 *F. oxysporum* 以厚膜孢子接種一星期後即可出現病徵，至於接種分生孢子則約十天才會出現病徵。兩者接種所得病徵相同，且維管束呈現褐化的現象。病徵的出現快慢和病勢的進展與接種源的濃度成正相關，由分析接種源潛勢與病害發生之關

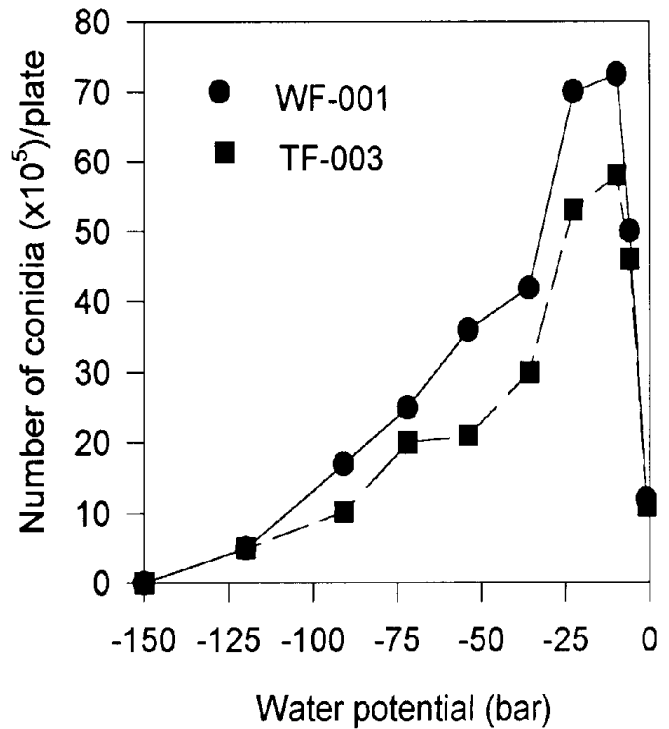


圖六、水份潛勢對金線蓮莖腐病病原菌菌絲生長之影響。

Fig. 6. Effect of water potential on the mycelial growth of *F. oxysporum* (isolates WF-001 and TF-003).



圖五、酸鹼度對金線蓮莖腐病病原菌菌絲生長之影響。
Fig. 5. Effect of pH on the mycelial growth of *F. oxysporum* (isolates WF-001 and TF-003).



圖七、水份潛勢對金線蓮莖腐病病原菌產生孢子之影響。

Fig. 7. Effect of water potential on the sporulation of *F. oxysporum* (isolates WF-001 and TF-003).

係，可以知道病原菌與寄主彼此之間的關係 (5)。莖腐病菌侵入部位主要在離栽培基質下方 2-4 cm 處之莖部，但病菌可進展至基質上部造成部份腐敗而從此處折斷。

F. oxysporum 一般都具有寄主專一性 (6)，Synder (13) 將感染甘藍和蘿蔔之菌株交互接種，發現在接種寄主中或多或少可以被感染，而對於本身之寄主皆表現出相當高之專一的致病力。本病菌於試驗中亦表現出高度的寄主專一性，只為害金線蓮，由田間和試驗中發現兩種臺灣和高雄金線蓮對莖腐病病菌之感病性並沒有差異，但此病菌不能感染其它蘭科植物如石斛蘭、狐狸尾蘭、蜘蛛蘭、四季蘭、朵麗蝶蘭、蝴蝶蘭、童子軍刀蘭、加德利亞蘭和萬代蘭，另一方面中國蕙蘭 (*Cymbidium* sp.) 所分離之 *F. oxysporum* 又不能感染金線蓮 (謝等未發表結果)，此外金線蓮莖腐病菌之形態與寄主範圍和已發表的 *F. oxysporum* (Schl.) f. sp. *cattleya* Foster 也不同 (8)，因此從金線蓮所分離之莖腐病菌可能是 *F. oxysporum* 的一個新分化種 (forma specialis)。但由於接種寄主植物數量有限，因此必需做進一步研究方能確定。

病菌菌絲生長和孢子發芽最適溫度都在 24 C，顯示病原菌與寄主同在中海拔演化而比較適合中溫生長和發芽，病菌菌絲生長最適 pH 值在 5-6 間，此也與金線蓮生長最適酸鹼度類似。由病菌能在非常低水份潛勢下生長和產孢，所以本病原菌應該屬於耐乾燥菌 (xerotolerant) (8)，而實際栽培上如果栽培基質過乾燥，莖腐病就非常猖獗 (4)。

謝 辭

本研究報告承行政院農委會資助經費，特此誌謝。

引用文獻

1. 甘偉松. 1963. 臺灣植物藥材誌. Vol. 2, pp. 86. 中國醫藥出版社. 臺灣。

2. 林讚標. 1977. 臺灣蘭科植物. Vol. 2, pp. 45-50. 昌達印製廠. 臺灣、嘉義。
3. 莊維仁. 1990. 金線蓮莖腐病與基腐病病原學及其防治之研究. 國立中興大學植物病理研究所第二十屆畢業碩士論文. 104 pp。
4. 潘國祥. 1992. 金線蓮莖腐病之生態及其防治. 國立中興大學植物病理研究所第二十二屆畢業碩士論文. 77 pp。
5. Bielenin, A., Borecki, Z., and Millikan, D. F. 1976. Identification of *Pythium ultimum* in the collar rot complex of apple. *Phytopathology* 66:127-129.
6. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 pp.
7. Foster, V. 1955. *Fusarium* wilt of Cattleya. *Phytopathology* 45:599-602.
8. Harris, R. F. 1981. Effect of water potential on microbial growth and activity. p. 23-95. in: *Water Potential Relations in Soil Microbiology*. L. F. Elliott, R. I. Papendick, and L. F. Elliott eds. Soil Sci. Soc. America, Wisconsin.
9. Huang, J. W., Sun, S. K., and Ko, W. H. 1983. A medium for chlamydospore formation in *Fusarium*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49:704-708.
10. Jorge-silva, M. L., Rodrigues, M. L., Ferraz, J. F. P., and Ricarado, C. P. P. 1989. Effect of water availability on growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. and on host-parasite interactions. *Mycol. Res.* 92:157-161.
11. Komada, H. 1975. Development of a selective medium of quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8:114-125.
12. Nash, S. M., and Snyder, W. C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology* 52:567-572.
13. Snyder, W. C. 1949. Cross inoculations with vascular fusaria of stock, cabbage, and radish. *Phytopathology* 39:863. (Abstr.)
14. Snyder, W. C., and Hansen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27:64-67.

ABSTRACT

Hsieh, S. P. Y., Chuang, W. R., and Huang, S. F. 1994. Stem rot of Taiwan *Anoectochilus* and its causal organism. *Plant Pathol. Bull.* 3:140-146. (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Taiwan *Anoectochilus* (including *Anoectochilus formosanus* and *A. Koshunensis*), the native orchid species widely distributed among 800 to 1500 meters altitude mountains in Taiwan, is used as herb for medical purposes. Due to great extent of collections, it is nearly extincted from its native habitats. Recently, extensive cultivations are practiced using seedlings raised by tissue

culture techniques. Stem rot is a prevailing disease of this new crop which caused considerable yield loss during the artificial cultivation. The causal fungus was identified as *Fusarium oxysporum* with following characteristics: Macroconidia are abundant, sickle-like shaped, thin-walled, 1-4 septa, $12.8-36.3 \times 3.3-4.9 \mu\text{m}$, with an attenuated apical cell and a foot-shaped basal cell. Conidiophores are monophialidic, and very short 5-15 μm . Chlamydospores are present with diameter of 5-16 μm . The optimum temperature and pH for mycelial growth were 24 C and 5-6, respectively. The optimum water potential for mycelial growth and sporulation was -10 bars. The fungus was pathogenic only to *A. formosanus* and *A. koshunensis* but not to other members of orchidaceae. It is most likely that this fungus is a new forma specialis of *F. oxysporum*.

Key words: Taiwan Anoectochilus, stem rot, *Fusarium oxysporum*.