

萵苣褐斑病菌之半選擇性培養基

林秀儒¹ 黃振文^{2,3}

1 彰化縣 行政院農業委員會台中區農業改良場

2 台中市 國立中興大學植物病理學系

3 聯絡作者，電子郵件：jwhuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：+886-4-22851676

接受日期：中華民國91年7月31日

摘要

林秀儒、黃振文. 2002. 萵苣褐斑病菌之半選擇性培養基. 植病會刊 11:147-156.

評估十四種碳素源與十八種氮素源對萵苣褐斑病菌 *Acremonium lactucae* (AL-0818 和 AL-0724 菌株) 菌絲生長的影響，發現蔗糖及半乳糖兩種碳素源可顯著促進菌絲的生長；至於氮素源中，則以酪蛋白有助於菌絲的生長。在培養基中，當蔗糖和酪蛋白兩者的重量比在 10 與 13.3 時，分別有助於促進本菌 AL-0724 與 AL-0818 菌株發芽管的生長。比較十八種化學藥劑對本菌菌絲與發芽管生長的影響，發現貝芬替 150 ppm，福多寧 50 ppm，鏈黴素 200 ppm 及新黴素 50 ppm 等藥劑的劑量均不具抑制本菌的功效。進一步，將蔗糖 30 g、酪蛋白 3 g、磷酸氫二鉀 1 g、硫酸鎂 0.5 g、氯化鉀 0.5 g、硫酸鐵 0.01 g、洋菜粉 15 g 與蒸餾水 1 L 均勻混合，經高溫高壓(121°C, 15 lb, 30 min) 滅菌後，待溫度降至 50 °C 時，再逐一添加貝芬替 150 ppm、福多寧 50 ppm、鏈黴素 200 ppm 和新黴素 50 ppm 等藥劑配製成 SC (Sucrose-Casein) 半選擇性培養基。利用 SC 半選擇性培養基可以由一般栽培田或連作罹病田的土壤中偵測到本菌的存在，同時發現每克土中含有菌量數約 0 至 4.3×10^3 cfu 間。

關鍵詞：萵苣、萵苣褐斑病、半選擇性培養基、頭孢菌屬病害

緒言

近年來，雲林縣西螺鎮有機蔬菜栽培田，發現許多萵苣 (*Lactuca sativa L.*) 葉片出現黃褐色的病斑，影響萵苣的產量及品質⁽¹⁾。病斑大多發生在萵苣成株的下位葉，偶爾上位葉也遭受到感染。病葉有許多細小圓形或不規則形黃褐色斑點散佈，病勢嚴重時，下位葉會出現壞疽現象。本病於夏天的病勢蔓延較為快速，是萵苣的一種新記錄病害^(4,8,12)；其病原菌是 *Acremonium lactucae* sp. nov.⁽¹¹⁾，屬於不完全菌門，絲孢菌綱(Hyphomycetes)，具有瓶狀枝，可產生單一頂生、串生及聚集成假頭狀的孢子^(6,7,8)，並以厚膜孢子在土壤中存活^(1,11)。在台灣有關 *Acremonium* 引起的植物病害報導不多，僅有薑荷花赤斑病⁽⁵⁾ 及瓜葉菊萎凋病⁽²⁾ 等曾被報導，致使該菌類的生態特性及傳播途徑均不清楚。又本屬的菌類在培養基上生長緩慢，易被其他生長快速的真菌覆蓋，導致研究者不易分離及區別。因此本研究的主要目的在於研製萵苣褐斑病菌的半選擇性培養基，藉以偵測本菌在土壤中與罹病組織的存活。

材料與方法

供試菌株來源、培養與保存

自雲林縣西螺蔬菜栽培區採集萵苣褐斑病罹病株，切取病葉上之黃褐色病斑，經 1% (v/v) 次氯酸鈉水溶液進行表面消毒後，移置 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar, WA) 平板上，進行分離，再經單孢分離培養，共獲得 12 個菌株。經完成柯霍氏法則，確定各菌株之病原性後，取 AL-0818 與 AL-0724 兩菌株作為本研究的主要供試菌株。各分離株單孢分離培養於 PDA (Potato dextrose agar) 斜面培養基，為減少菌株產生變異與保持野生型，每隔一段時間(約 30 days) 進行單孢分離更新培養一次，每天並給予 12 hr 適當光照(間接日光或 2 支 40 W 日光燈；約 2000-3000 Lux，距培養試管 50 cm) 和適當溫度(保持在 22-25 °C 間) 環境，使菌株生長保持穩定。

碳素源對萵苣褐斑病菌生長的影響

將 Czapek's 培養基⁽¹⁰⁾ 的組成配方除去碳素源後，取硝酸鈉 3 g、磷酸氫二鉀 1 g、硫酸鎂 0.5 g、氯化鉀 0.5 g、

硫酸鐵 0.01 g、洋菜粉 15 g 與蒸餾水 1 L，調製成本試驗的基礎培養基，經高溫高壓 (121°C, 15 lb, 30 min) 滅菌後，每 100 ml 的基礎培養基分別加入經微孔過濾膜 (孔徑 0.22 μm, Millipore 公司出品) 過濾的 3% (w/v) 葡萄糖、果糖、麥芽糖 (Maltose)、乳糖 (Lactose)、半乳糖 (Galactose)、可溶性澱粉、蔗糖、甘露糖 (Mannose)、甘露糖醇 (Mannitol)、纖維二糖 (Celllobiose)、棉子糖 (Raffinose)，海藻糖 (Trehalose)、木糖 (Xylose)、半乳糖醛酸 (Galacturonic acid) 等十四種糖類作為碳素源，並以不加碳素源充作對照。待各培養基溫度降至 50°C 左右時，分別於每一培養皿 (內徑二吋) 內倒入培養基六毫升，製成平板。將在 PDA 斜面培養基上培養七天的萐蕓褐斑病菌 (AL-0818 與 AL-0724 菌株) 於 3% 水瓊脂培養基上單孢分離，待 12 hr 孢子發芽後，以消毒過的移植針將孢子移植到含有不同碳素源的培養基平板中央，每皿放置一個孢子，每一處理有四重複。所有平板置於 24°C，每天 12 hr 光照的定溫箱中培養七天，隨即記錄各處理的菌落大小。

氮素源對萐蕓褐斑病菌生長的影響

由碳素源試驗結果，以 3% (w/v) 蔗糖和乳糖作為修正 Czapek's 培養基的碳素源，將除去氮素源的培養基經高溫高壓滅菌後，分別加入經微孔過濾膜 (孔徑 0.22 μm, Millipore 公司出品) 過濾的 0.3% (w/v) 硝酸鈉、亞硝酸鈉、硝酸鉀、硝酸銨、氯化銨、硫酸銨、磷酸銨、硝酸鈣、尿素、酪蛋白 (Casein)、色氨酸 (Tryptophan)、甘氨酸 (Glycine)、甲硫氨酸 (Methionine)、苯丙氨酸 (Phenylalanine)、天冬醯氨酸 (Asparagine)、精氨酸 (Arginine)、天冬氨酸 (Aspartic acid)、酪氨酸 (Tyrosine) 等十八種氮素源，並以不加氮素源作對照，製成平板後，按上述的方法與重複數，將 AL-0818 與 AL-0724 的單一孢子移置於平板七天後，量取兩菌株在不同氮源培養基上的菌落大小。

蔗糖與酪蛋白間不等重量比對萐蕓褐斑病菌發芽管生長的影響

由氮素源試驗結果，修正 Czapek's 培養基，以 0.3% (w/v) 酪蛋白作為氮素源，分別加入 0、1、2、3、4 及 5% 等不同濃度的蔗糖作為碳素源，經高溫高壓滅菌處理後製成平板，再於在上述培養基內分別均勻塗佈 AL-0818 或 AL-0724 兩菌株的孢子懸浮液，於 28°C 培養 12 hr 後，在顯微鏡下量取兩菌株之發芽管長度，每皿逢機測量發芽孢子 25 個，其中各處理均有四重複。

化學藥劑對萐蕓褐斑病菌生長的影響

修正 Czapek's 培養基，以 3% (w/v) 蔗糖作為碳素源、0.3% (w/v) 酪蛋白作為氮素源，製成蔗糖-酪蛋白培養基

(Sucrose-Casein medium ; SC medium)，然後分別加入免賴得 (Benomyl) 500 ppm、貝芬替 (Carbendazim) 500 ppm、四氯異苯睛 (Daconil) 1000 ppm、撲滅寧 (Dicyclidine) 500 ppm、護矽得 (Flusilazol) 200 ppm、鋅錳乃浦 (Mancozeb) 2000 ppm、福多寧 (Flutolanil) 200 ppm、滅普寧 (Mepronil) 800 ppm、腐絕 (Mertect) 1000 ppm、五氯硝苯 (PCNB) 1000 ppm、撲克拉 (Prochloraz) 400 ppm、保粒黴素 (Polyoxin) 1250 ppm、快得寧 (Quinolate) 600 ppm、炭剋 (Score) 300 ppm、免克寧 (Vinclozolin) 1000 ppm、依普同 (Iprodione) 500 ppm 等 (表一)⁽³⁾，並以不加藥劑作對照，分別製成平板培養基。隨後將 AL-0818 或 AL-0724 的分生孢子移植到培養基平板中央，每皿移植一個孢子，每一處理有四重複，於 28°C，每天光照 12 hr，七天後記錄各處理的菌落大小。

化學藥劑濃度對萐蕓褐斑病菌發芽管生長的影響

修正 Czapek's 培養基，以 3% (w/v) 蔗糖作為碳素源、0.3% (w/v) 酪蛋白作為氮素源，製成蔗糖-酪蛋白培養基，經高溫高壓滅菌處理後，分別加入 0、50、100、150、200 和 250 ppm 貝芬替及 0、20、40、60、80 和 100 ppm 福多寧等，製成培養基平板，然後在上述培養基內分別均勻塗佈 AL-0818 或 AL-0724 兩菌株的孢子懸浮液，於 28°C 培養 12 hr 後，在顯微鏡下量取兩菌株之發芽管長度，每一皿逢機測量發芽孢子 25 個，其中各處理均有四重複。

抗生素濃度對萐蕓褐斑病菌發芽管生長的影響

修正 Czapek's 培養基，以 0.3% (w/v) 酪蛋白作為氮素源，3% (w/v) 蔗糖作為碳素源，經高溫高壓滅菌處理後，加入 150 ppm 貝芬替與 50 ppm 福多寧後，分別加入 0、100、200、300、400 及 500 ppm 鍾黴素 (Streptomycin sulfate, Sigma co.) 與新黴素 (Neomycin sulfate, Sigma co.) 後製成培養基平板，然後在上述培養基內分別均勻塗抹 AL-0818 和 AL-0724 兩菌株之孢子懸浮液，於 28°C 培養 12 hr 後，在顯微鏡下量取兩菌株之發芽管長度，每一皿逢機測量發芽孢子 25 個，其中各處理均有四重複。

半選擇性培養基回收土壤中萐蕓褐斑病菌的效率與雜菌污染率

綜合上述試驗結果，將蔗糖 30 g、酪蛋白 3 g、磷酸氫二鉀 1 g、硫酸鎂 0.5 g、氯化鉀 0.5 g、硫酸鐵 0.01 g、洋菜粉 5 g 與蒸餾水 1 L 均勻混合，高溫高壓滅菌後，待溫度降至 50°C 左右，再逐一添加貝芬替 150 ppm、福多寧 50 ppm、鍾黴素 200 ppm 和新黴素 50 ppm 等藥劑配製成蔗糖-酪蛋白半選擇性培養基 (SC semiselective medium)。取 AL-0818 和 A-0724 菌株的孢子懸浮液 (10^5 spores/ml) 10

表一、本研究所使用之農業藥劑普通名、中文名、化學名及製造廠商

Table 1. Common names, Chinese names, chemical names and manufacturers of pesticides tested in this study

Common name	Chinese name	Chemical name	Manufacturer
Benomyl	免賴得	50.0% WP Methyl-1-1-(butylcarbamoyl)-2-benzoimide carbamate	Du pont
Carbendazim	貝芬替	50.0% WP 2-(methoxycarbonylamino)-benzimidazole	BASF
Daconil	達克靈	75.0% WP Tetrachloroisophthalonitrile	Ihara
Dicyclidine	撲滅寧	50.0% WP N-(3',5'-Dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide	Sumitomo
Flusilazol	護矽得	40.0% EC bis-(4-nuorophenyl)methyl(IH-1,2,4-triazole-1-ylmethyl) silane	Du pont
Flutolanil	福多寧	50% WP α, α, α-trifluoro-3'-isopropoxy-2-toluanilide	BASF
Iprodione	依普同	23.7% WP 3-(3,5-Dichlorophenyl)-1-isopropyl carbamoylhydantion	Rhone-Poulenc
PCNB	五氯硝苯	75.0% WP Pentachloronitrobenzene	Tocelo
Polyoxin	保粒黴素	10% WP 5-(2-amino-5-O-Carbamoyl-2-deoxy-L-xylonamido-1,5-dideoxy-1,2,3,4=ether)trahydro-5-hydroxymethyl-2,4-dioxopyrimidin-1-yl)-β-D-allofuranuronic Acid	Sinon
Mancozeb	鋅錳乃浦	80% WP Contains 16% manganese, 2% zinc and 62% ethylenebisdithiocarbamate ion	Du pont
Mertect	腐絕	40% WP 2-(4-thiazolyl)benzimidazole Sharp&Dome	Merck
Mepronil	滅普寧	75.0% WP 3-Isopropoxy-2-methylbenzanilide	Kumiai
Prochloraz	撲克拉	25% EC N-propyl-N-(2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl)-imidazole-1-carboxamide	Schering
Quinolate	快得寧	35.5% WG Copper-8-hydroxyquinolate	Quino
Score	炭剋	24.9% EC 1-(2-[4-(4-chlorophenoxy)-2-chlorophenyl]-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl-methyl)-1H-1,2,4-triazole	Ciba-Geigy
Vinclozolin	免克寧	50% WP 3-(3,5-dichlorophenyl)-5-ethenyl-5-methyl-2,4-oxazolidinedione	BASF

ml，分別均勻拌入 100 g 的大里-砂質壤土(SL-T)、溪湖-砂質壤土(SL-C) 和西屯-黏質壤土(CL-H) 中，陰乾後，逢機各取 10 g 的土壤，加入 90 ml 的無菌水中，以 150 rpm 振盪器振盪 10 min，將各土壤懸浮液作系列稀釋後，分別取每一稀釋倍液 0.5 ml，滴加於蔗糖-酪蛋白(SC) 半選擇性培養基、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)、添加新黴素 50 ppm 和鏈黴素 200 ppm 的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PNS) 和添加 1% 玫瑰紅(rose bengal) 的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDRA)⁽¹⁰⁾ 等平板中央，以塗抹玻棒均勻塗佈，隨即移置於 28°C，五天後，記錄每一平板出現萢苣褐斑病菌的菌落數，經換算成實際的菌量數後，再除以原先拌入土中的菌量數，即求得各培養基由土中回收本菌的百分率，其中每一處理有四重複。此外，也一併計算各培養基平板出現其他真菌與細菌等雜菌的數目。

應用 SC 半選擇性培養基檢測田土及植體內的萢苣褐斑病菌

自雲林縣西螺地區之萢苣褐斑病罹病田逢機採集五公分表土，每畦取 10 處土樣，均勻混拌，陰乾後揉碎，秤取 10 g 加於 90 ml 無菌水中，均勻振盪，經系列稀釋，取 10^{-2} 與 10^{-3} 稀釋液各 0.5 ml 滴加於蔗糖-酪蛋白(SC) 半選擇性培養基平板中央，塗抹均勻，五天後，由平板出現之菌落數推算每公克土壤樣品中的病原菌含量。

自萢苣褐斑病罹病田採回具有或不具有黃褐色斑點的萢苣植株及幼苗，經 1% (v/v) 次氯酸鈉水溶液進行表面消毒後，移置於 SC 半選擇性培養基及 2% (w/v) 水瓊脂培養基(WA) 上，五天後，觀察各植株組織長出萢苣褐斑病菌的情形。

結 果

碳素源對萢苣褐斑病菌生長的影響

在十四種不同碳素源中，蔗糖、半乳糖、乳糖、海藻糖和葡萄糖具有促進 AL-0724 菌株生長的效果；蔗糖和半乳糖則可促進 AL-0818 菌株生長，其中蔗糖和半乳糖同時具有促進兩菌株生長的效果；至於半乳糖醛酸可抑制 AL-0818 和 AL-0724 菌株生長。其他糖類對本菌的生長效應和對照組相比，則呈現無顯著差異或比對照組差的現象(表二)。

氮素源對萢苣褐斑病菌生長的影響

在含有蔗糖或半乳糖充當碳源的培養基中，分別加入 18 種不同的氮源，發現酪蛋白作為氮素源時，最有助於本菌的生長，尤其是酪蛋白和蔗糖的組合可顯著促進本菌 AL-0818 與 AL-0724 兩菌株的菌絲生長(表三)。蔗糖充當碳源時，加入硝酸鈉也可促進 AL-0818 和 AL-0724 菌株的菌絲生長；惟若以天冬氨酸、硝酸鈣、氯化銨、硫酸銨、

色氨酸、酪氨酸和尿素作為氮源時，則會抑制 AL-0818 和 AL-0724 的菌絲生長。半乳糖充當碳源時，若加入天冬醯氨酸和硝酸鈣亦有助於兩菌株的生長；然而加入甲硫氨酸、亞硝酸鈉、硝酸鈉和尿素卻會抑制 AL-0818 和 AL-0724 菌株生長(表三)。

蔗糖與酪蛋白間不等的重量比對萢苣褐斑病菌發芽管生長的影響

在培養基中分別加入六種不同重量比之蔗糖和酪蛋白，結果(圖一) 發現隨著蔗糖與酪蛋白兩者間重量比增至 10 時，AL-0724 菌株的發芽管亦伴隨增長，直到兩者重量比超過 10 至 16 時，則其發芽的生長漸受抑制；至於 AL-0818 菌株在蔗糖與酪蛋白兩者重量比 13.3 時，其發芽管長度遠較其他處理者長。

化學藥劑對萢苣褐斑病菌生長的影響

十六種化學藥劑在供試濃度下，皆會抑制 AL-0724 菌株的菌絲生長(表四)，其中僅貝芬替與福多寧對本菌的抑制效果較差；此外，500 ppm 貝芬替無法有效抑制 AL-0818 菌株的生長。研究顯示四氯異苯睛、撲滅寧、護矽得、鋅錳乃浦、福多寧、滅普寧、腐絕、五氯硝苯、撲克拉、保粒黴素、快得寧、炭剋、免克寧、依普同和免賴得等十五種化學藥劑的田間使用推薦劑量，亦均會抑制 AL-0818 菌株的生長(表四)。

化學藥劑濃度對萢苣褐斑病菌發芽管生長的影響

在蔗糖和酪蛋白的基礎培養基中，分別加入不同濃度的貝芬替和福多寧，發現 0 至 250 ppm 貝芬替均不影響 AL-0724 菌株發芽管的生長，其中貝芬替在 50-250 ppm 尚有促進 AL-0818 菌株之發芽管生長的效果(圖二)。福多寧在 0-100 ppm 時，對 AL-0818 與 AL-0724 兩菌株發芽管的生長影響，均呈現無顯著性($r^2=0.122$ 及 $r^2=0.11$) 的差異(圖三)。

抗生素濃度對萢苣褐斑病菌發芽管生長的影響

在含有 150 ppm 貝芬替和 50 ppm 福多寧的蔗糖-酪蛋白培養基中，分別加入不同濃度的鏈黴素和新黴素後，發現鏈黴素與新黴素在 0-500 ppm 的範圍內，隨濃度增加，抑制 AL-0818 和 AL-0724 菌株發芽管生長的效果愈強(圖四)；惟鏈黴素在 0-100 ppm 與新黴素 0-50 ppm 時，抑制本菌兩菌株生長的效果不顯著。

半選擇性培養基回收土壤中萢苣褐斑病菌的效率與雜菌污染率

將萢苣褐斑病菌的孢子懸浮液分別加入大里-砂質壤土(SL-T)、溪湖-砂質壤土(SL-C) 和西屯-黏質壤土(CL-H) 中，然後以四種不同培養基測定每克土壤中所含有的萢苣

表二、不同碳素源對萐苣褐斑病菌(AL-0724 和 AL-0818 菌株)菌絲生長的影響

Table 2. Effect of carbon sources on mycelial growth of *Acremonium lactucae* isolates AL-0724 and AL-0818 for 7 days at 24°C

Carbon source ¹	Colony size (mm/7days)	
	AL-0724	AL-0818
Cellobiose	7.0 g ²	7.1 cde
Fructose	9.5 de	6.4 ef
Galactose	13.5 b	9.0 b
Galacturonic acid	0.0 i	0.0 i
Glucose	11.2 c	7.6 c
Lactose	10.2 cd	7.7 c
Maltose	9.7 de	5.9 f
Mannitol	8.4 f	7.2 cd
Mannose	5.0 h	4.1 h
Raffinose	9.2 ef	7.8 c
Starch	4.9 h	5.2 g
Sucrose	18.8 a	13.0 a
Trehalose	10.8 c	6.6 de
Xylose	6.9 g	4.6 gh
None (CK)	9.5 de	7.1 cd

¹. Thirty grams of each carbon source was added into one liter of modified Czapek's medium with sodium nitrate as a reference nitrogen source.

². Means (n=4) in the same column for each isolate of the pathogen followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

表三、不同氮素源對萐苣褐斑病菌(AL-0724 和 AL-0818 菌株)菌絲生長的影響

Table 3. Effect of nitrogen sources on mycelial growth of *Acremonium lactucae* isolates AL-0724 and AL-0818 for 7 days at 24°C

Nitrogen source ¹	Colony size (mm/7days)			
	Sucrose		Galactose	
	AL-0724	AL-0818	AL-0724	AL-0818
Arginine	15.5 bc ²	11.0 edf	3.0 cd	3.6 ef
Asparagine	15.8 bc	12.1 bcd	11.3 b	8.8 b
Aspartic acid	1.9 i	1.7 j	1.9 efg	1.0 i
Ca(NO ₃) ₂	9.4 gh	8.1 hi	3.6 c	4.5 d
Casein	17.9 a	18.2 a	14.0 a	11.7 a
Glycine	16.0 b	12.2 bcd	2.8 d	5.4 c
KNO ₃	15.5 bc	10.1 fg	1.8efg	1.6 hi
Methionine	11.3 ef	12.0 cd	0.8 hi	1.6 hi
NaNO ₂	13.5 d	11.0 edf	0.5 ij	1.6 hi
NaNO ₃	17.3 ab	13.4 bc	1.5 fgh	1.9 h
NH ₄ Cl	11.2 ef	9.3 gh	1.2 ghi	3.8 edf
NH ₄ H ₂ PO ₄	13.6 d	13.6 b	2.4 de	3.3 f
NH ₄ NO ₃	15.5 bc	11.8 de	1.7 efg	2.2 h
(NH ₄) ₂ SO ₄	11.6 ef	10.2 efg	2.8 d	5.9 c
Phenylalanine	14.0 cd	11.5 edf	2.2 def	4.2 de
Tryptophan	10.3 fg	8.4 h	1.1 ghi	2.4 gh
Tyrosine	12.7 de	8.9 gh	2.3 de	3.0 gf
Urea	8.0 h	6.8 i	0.0 j	0.0 j
None (CK)	15.7 bc	11.4 edf	2.3 de	3.0 fg

¹. Three grams of each nitrogen source was added into one liter of modified Czapek's medium with sucrose or galactose as a reference carbon source.

². Means (n=4) in the same column for each isolate of the pathogen followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

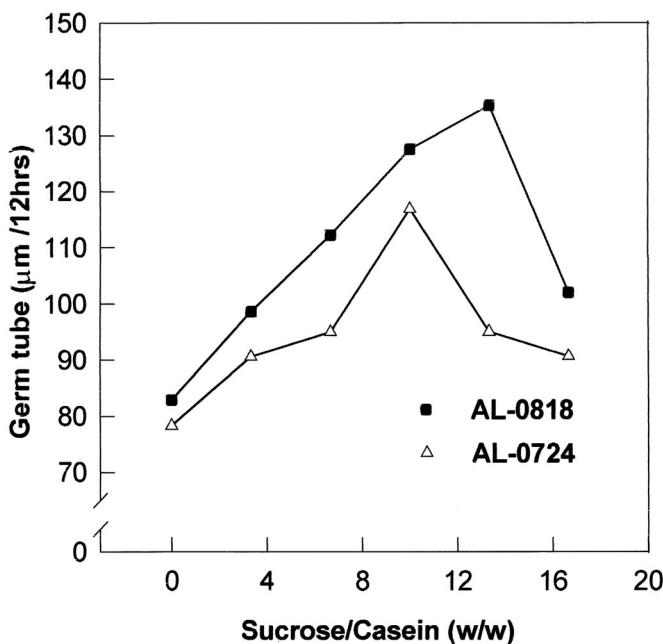
表四、不同化學藥劑對萐苣褐斑病菌(AL-0724 和 AL-0818 菌株)菌絲生長的影響

Table 4. Effect of different pesticides on mycelial growth of *Acremonium lactucae* isolates AL-0724 and AL-0818 for 7 days at 28°C

Pesticide ¹	Conc. (ppm)	Colony size(mm/7days)		Suppressive ratio(%)	
		AL-0724	AL-0818	AL-0724	AL-0818
Benomyl	500	10.6 c ²	4.6 e	41	72
Carbendazim	500	16.3 b	16.0 a	9	2
Daconil	1000	0.0 g	0.0 g	100	100
Dicyclidine	500	10.3 c	9.0 c	43	45
Flusilazol	200	0.0 g	0.0 g	100	100
Flutolanil	200	16.2 b	14.1 b	10	13
Iprodione	500	0.0g	0.0 g	100	100
Mancozeb	2000	0.0 g	0.0 g	100	100
Mepronil	800	7.0 d	7.0 d	61	57
Mertect	1000	0.4 g	0.2 g	98	99
PCNB	1000	3.0 f	2.0 f	83	88
Polyoxin	1250	0.1 g	0.4 g	99	98
Prochloraz	400	0.0 g	0.0 g	100	100
Quinolate	600	0.0 g	0.0 g	100	100
Score	300	0.0 g	0.0 g	100	100
Vinclozolin	1000	3.8 e	2.6 f	79	83
None(CK)	-	18.0 a	16.3 a	-	-

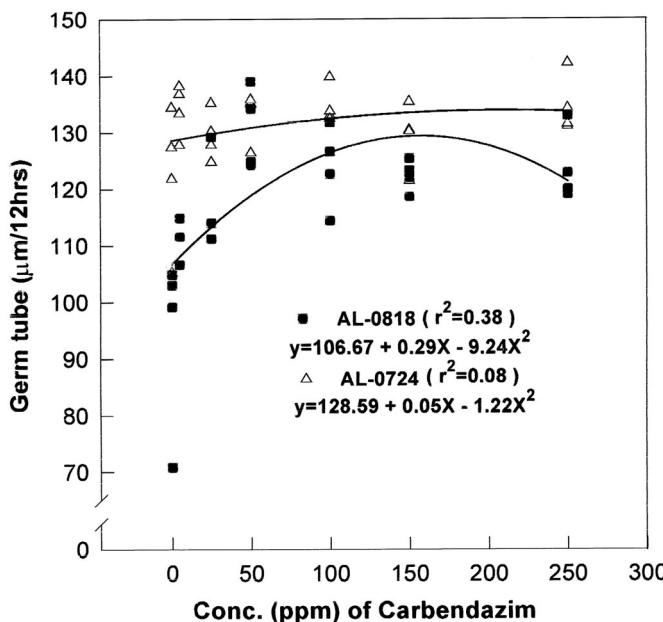
¹. Each of pesticides was respectively added into the basal medium (sucrose-casein medium consisted of 30g sucrose, 3g casein, 1g K₂HPO₄, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5g KCl, 0.01g FeSO₄ · 7H₂O, 15g agar, and 1L distilled water).

². Means (n=4) in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) according to Duncan's multiple range test.



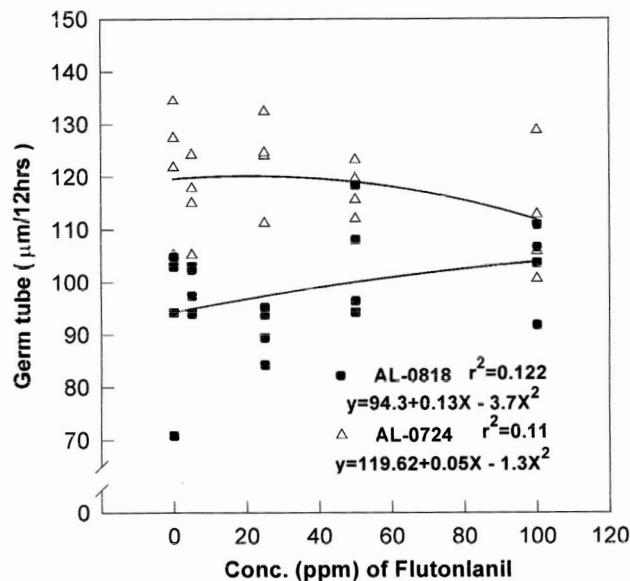
圖一、培養基含有不等蔗糖與酪蛋白重量比對萐蕓褐斑病菌發芽管生長的影響。

Fig. 1. Effect of different weight ratio of sucrose and casein on germ tube growth of *Acremonium lactucae* isolates AL-0818 and AL-0724 on the basal medium (a modified Czapek's medium) for 12hrs at 28°C.

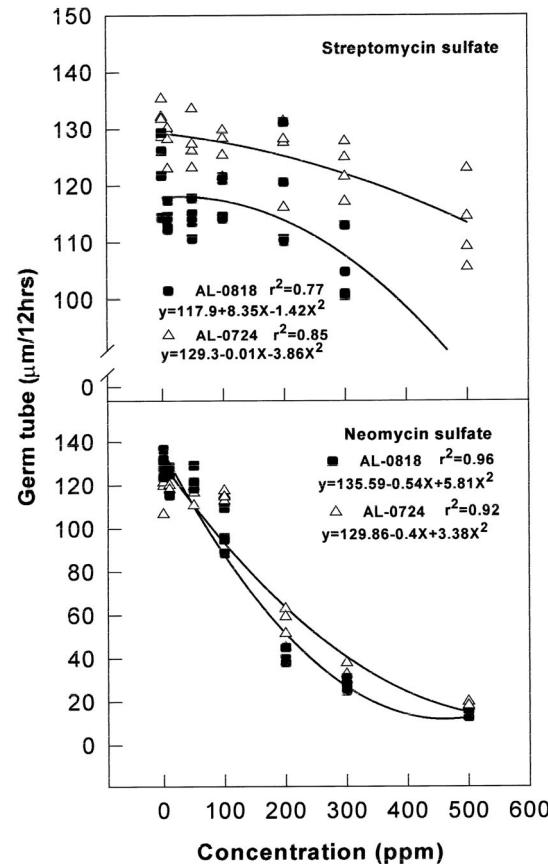


圖二、不同濃度貝芬替對萐蕓褐斑病菌發芽管生長之影響。

Fig. 2. Effect of different concentrations of carbendazim on germ tube growth of *Acremonium lactucae* isolates AL-0818 and AL-0724 on the basal medium (a modified Czapek's medium) for 12hrs at 28°C.

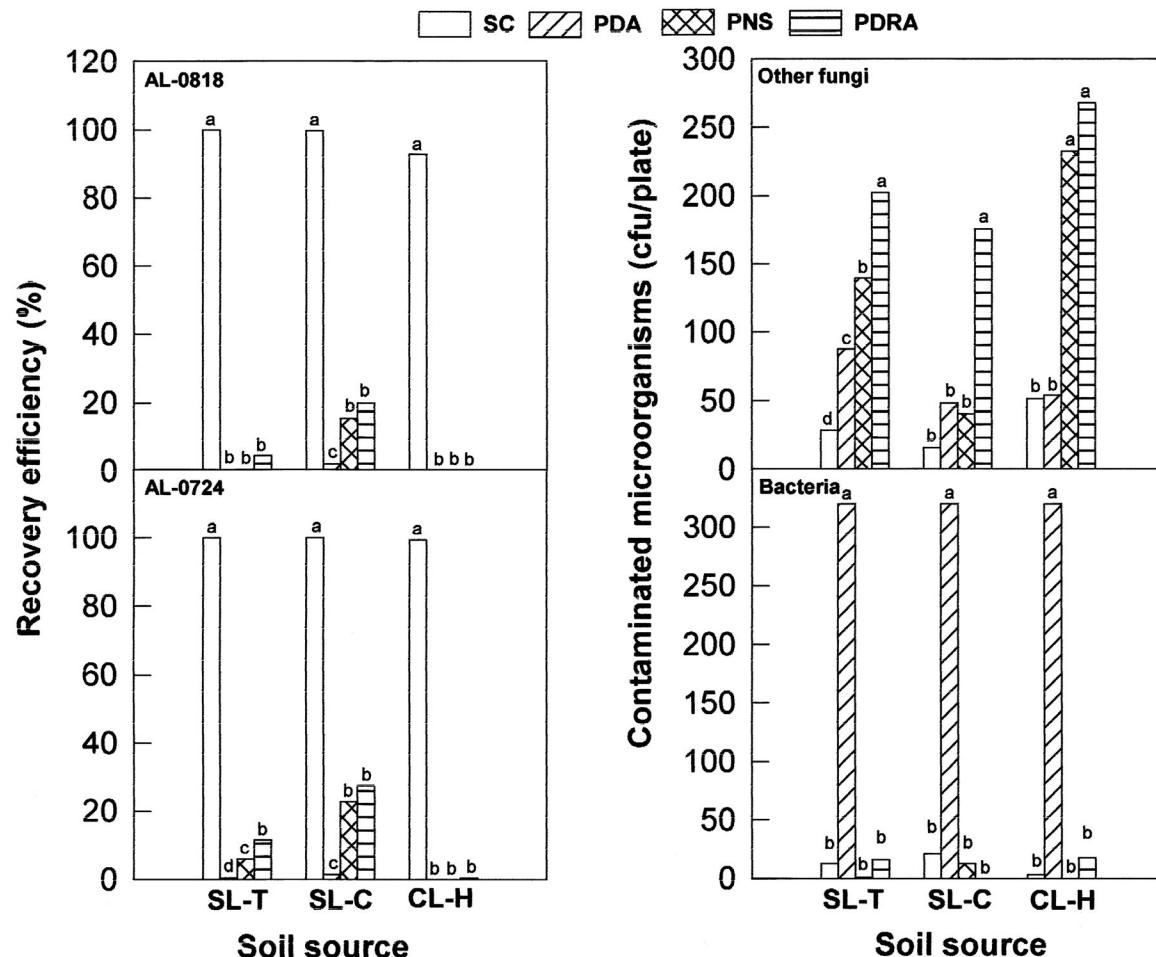


圖三、不同濃度的福多寧對萐蕓褐斑病菌發芽管生長之影響。
Fig. 3. Effect of different concentrations of flutolanil on germ tube growth of *Acremonium lactucae* isolates AL-0818 and AL-0724 on the basal medium (a modified Czapek's medium) for 12hrs at 28°C.



圖四、不同濃度鏈黴素及新黴素對萐蕓褐斑病菌發芽管生長的影響。

Fig. 4. Effect of different concentrations of streptomycin sulfate and neomycin sulfate on germ tube growth of *Acremonium lactucae* isolates AL-0818 and AL-0724 on the basal medium (a modified Czapek's medium) for 12hrs at 28°C.



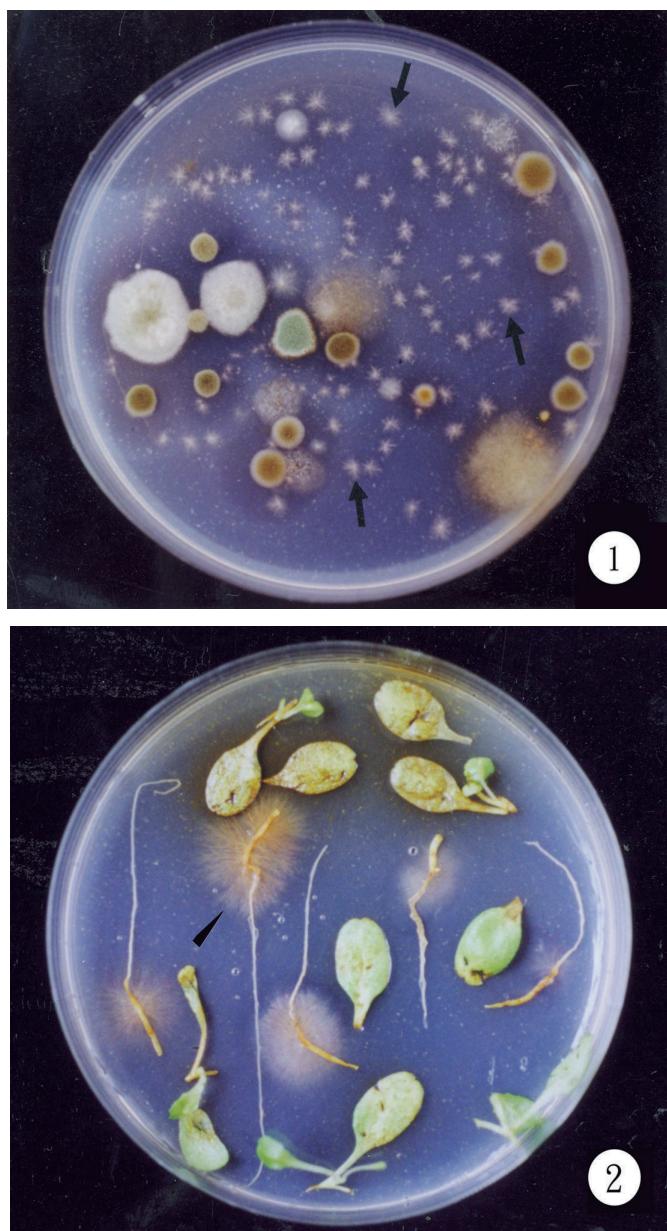
圖五、利用蔗糖-酪蛋白半選擇性培養基(SC)、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)、添加新黴素50 ppm 和鏈黴素200 ppm 的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PNS) 及添加1% (w/v) 玫瑰紅的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDRA) 來偵測土壤中萐苣褐斑病菌的效果與雜菌的出現率。(SL-T：砂質壤土-大里，SL-C：砂質壤土-溪湖，CL-H：黏質壤土-西屯)

Fig. 5. Recovery efficiency of *Acremonium lactucae* isolates AL-0818 and AL-0724 and contaminant fungi and bacteria from SL-T, SL-C and CL-H soils infested with 10^4 spores/g dry soil of the pathogen on the Sucrose-Casein medium (SC), Potato-Dextrose-Agar (PDA), PDA + 50 ppm neomycin sulfate + 200 ppm streptomycin sulfate (PNS) and Potato-Dextrose-Rose Bengal-Agar (PDRA). (SL-T : Sandy loam-Tali, SL-C : Sandy loam-Chihu, CL-H : Clay loam-Hsitun)

褐斑病菌，結果發現利用蔗糖-酪蛋白半選擇性培養基(SC半選擇性培養基)回收本菌的效果較其他三種培養基優異，尤其在不同的土壤中回收AL-0818和AL-0724菌株的效果幾近100%。PDA、PNS和PDRA培養基回收本菌的效果皆低於30%，尤其更無法由西屯-黏質壤土測得本菌(圖五)，此外，SC半選擇性培養基出現雜菌的比例明顯較PDA、PNS和PDRA的污染率少得很多。SC半選擇性培養基檢測田土及植體內的萐苣褐斑病菌利用蔗糖-酪蛋白(SC)半選擇性培養基檢測西螺地區罹病田中的土壤，發現每克土壤約含有0至 4.3×10^3 cfu (colony-forming units)的萐苣褐斑病菌(圖六-1)。此外，SC半選擇性培養基可有效檢測與區別萐苣罹病葉片存在有萐苣褐斑病菌(圖六-2)。

討 論

萐苣感染褐斑病後，植株葉背會出現細小圓形或不規則形的黃褐色斑點，嚴重時近地面的下位葉呈現壞疽與枯死的病徵，致喪失商品價值。田間觀察本病病勢的發展，初期病斑大多分布於萐苣下位葉的葉背，推測病害的主要初次感染源可能存活於土壤⁽¹⁾，但由於缺乏檢測的工具與方法，因此本菌在田間的分佈資料尚闕如。一般學者為了有效偵測植物病原菌的初次感染源及研究它們的生態行為，大多設法研發該菌類的選擇性或半選擇性培養基^(9,16)，藉以作為調查菌類的工具。由於萐苣褐斑病菌的生長速度緩慢(培養10天，菌落直徑1.6-2 cm)，因此利用一般培養基自土壤分離本菌的過程，極易遭其他真菌與細菌的污染與覆蓋，所以選用Czapek's培養基作為基礎成份^(13,15)，調製本病原菌的半選擇性培養基配方，藉以作為偵



圖六、(1) SC 半選擇性培養基偵測土壤中的萵苣褐斑病菌(箭頭處)；(2) 利用 SC 半選擇性培養基組織分離萵苣褐斑病菌(箭頭處)。

Fig. 6. (1) Recovery of *Acremonium lactucae* (arrowed) from soils infested with the pathogen on the Sucrose-Casein (SC) semiselective medium ; (2) Isolation of *Acremonium lactucae* from naturally infected leaves of lettuce on SC semiselective medium.

測本菌在土壤中存活的工具。

研發選擇性培養基的基本原則，就是(1)篩選出具有促進標的菌類生長的基礎營養基質；(2)添加具有廣效性抑制其他菌類，惟不會影響標的菌生長的成分；(3)調整培養基的化學組成或改變基質物理條件，有助於鑑別標的菌之菌落形態與顏色。由於目前並無有關 *Acremonium* 選擇性培養基之報導，而自土壤分離該菌易受雜菌污染，故本研究著手於研發萵苣褐斑病菌之半選擇性培養基。首先以除去碳源或氮源的 Czapek's 配方作為基礎培養基，評估各種碳、氮素源對萵苣褐斑病菌生長的影響，結果發現蔗

糖和半乳糖可顯著促進本菌菌絲的生長。此外，以蔗糖配合酪蛋白可顯著促進本菌的發芽與生長。進一步利用含有蔗糖與酪蛋白的培養基，評估不同化學藥劑對於本菌生長的影響，結果發現貝芬替 \leq 150 ppm、福多寧 \leq 50 ppm、鏈黴素 \leq 200 ppm 及新黴素 \leq 50 ppm 等藥劑劑量不具有抑制本菌生長的功效；惟貝芬替與福多寧卻具有抑制多種其他真菌的效果⁽¹⁴⁾。因此將上述有助於本菌生長的氮素源、碳素源及化學藥劑調配成 SC (Sucrose-casein) 半選擇性培養基。本研究證實 SC 半選擇性培養基可有效偵測土壤中存活之萵苣褐斑病菌。在 SC 半選擇性培養基上，病

原菌菌落呈橘色黏膜型、放射狀平貼，雖然其它菌類如 *Alteranaria*、*Cladosporium*、*Pencillium*、*Trichoderma*、*Curvularia* 及 *Aspergillus* 等黑色(褐色)孢子群真菌，亦可在 SC 半選擇性培養基上生長，但仍可以由菌落的形態、顏色及生長速度鑑別本菌。本研究獲得的 SC 半選擇性培養基，雖然可以有效鑑別萐苣褐斑病菌，但由於土壤中分離到的病原菌菌落遠較其他雜菌的菌落小，若能針對 SC 半選擇性培養基的酸鹼值加以改良或增補具有抑制黑色(褐色)孢子群之藥劑等，或許更能提昇它的選擇與鑑別效率。

謝 辭

本文係第一作者碩士論文的一部份。研究期間承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢局經費補助，特誌謝意。

引用文獻

1. 林秀儒. 1999. 萐苣褐斑病菌的形態、病原性及存活. 國立中興大學植物病理學系第二十九屆碩士論文. 74頁.
2. 黃振文、趙憶維、林玉珠. 1996. 瓜葉菊萎凋病的風險評估. 植病會刊5:203-204. (摘要).
3. 廖龍盛. 1982. 實用農藥. 華成印刷. 台中. 850頁.
4. 蔡雲鵬. 1991. 台灣植物病害名彙. 中華植物保護學會、中華民國植物病理學會出版. 台中.
5. 謝廷芳、楊秀珠、陳明昭、杜金池. 1994. 薑荷花赤斑病及炭疽病初報. 植病會刊3:254. (摘要).
6. Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS press, St. Paul, Minnesota. 218pp.
7. Buchanan, R. E. 1911. Morphology of the genus *Cephalosporium*, with description of a new species and a variety. Mycologia 3: 170-174.
8. Gams, W. 1971. Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Germany. 262pp.
9. Gutierrez, W.A. and Shew, H.D. 1998. Identification and quantification of ascospores as the primary inoculum for collar rot of greenhouse-produced tobacco seedlings. Plant Dis. 82: 485-490.
10. Johnson, L. F., and Curl, E. A. 1972. Methods for Research on the Ecology of Soilborne Plant Pathogens. Burgess publishing Co., St. Paul, NN, 247 pp.
11. Lin, H. J., Chien, C. Y., and Huang, J. W. 2002. *Acremonium lactucae* sp. nov., the causal agent of leaf spot of lettuce. Bot. Bull. Acad. Sin.(submitted).
12. Lin, H. J., Huang, J. W. and Chien, C. Y. 1997. First report of *Acremonium* brown spot of lettuce in Taiwan. Plant Prot. Bull. 39: 399-400 (Abstract).
13. 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: 507-572.
14. Thomson, W. T. 1991. Agricultural Chemicals Book IV. Thomson Press, America. 198pp.
15. Tsao, P. H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 8: 157-186.
16. Urena-Padilla, A.R. Mitchell, D.J., and Legard, D.E. 2001. Oversummer survival of inoculum for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue. Plant Dis. 85: 750-754.

ABSTRACT

Lin, H. J.¹, and Huang, J. W.² 2002. A Semiselective Medium for Detecting *Acremonium lactucae*, the Causal Agent of Lettuce Brown Spot. Plant Prot. Bull. 11:147-156. (¹Taichung district agricultural improvement station, Taiwan, R.O.C.; ²Department of plant pathology, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C. ; ³Corresponding author: E-mail: jwhuang@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22851676)

Fourteen carbohydrates and eighteen nitrogenous compounds were evaluated for their effects on mycelial growth of two isolates, AL-0818 and AL-0724 of *Acremonium lactucae*, the causal agent of brown spot of lettuce. Among carbon sources, sucrose and galactose were more effective than other carbohydrates to enhance the growth of *A. lactucae*. As to nitrogenous compounds, casein was the most effective in stimulating growth of the pathogen isolates. The optimum ratio of sucrose and casein by weight was at 10 for AL-0724 or at 13.3 for AL-0818. Eighteen pesticides were respectively added into the basal medium (a modified Czapek's medium containing sucrose and casein, SC-medium) for indexing their suppressive effectiveness. Carbendazim at 150 ppm and flutonlanil at 50ppm were not obvious to inhibit the pathogen. In advance, carbendazim, flutonlanil, streptomycin sulfate, and neomycin sulfate were selected to make up a formulation of the semiselective medium. The relationship between concentrations of the four pesticides and the germ-tube growth length of the pathogen was analyzed for determining the optimal formulation that favored the growth of *A. lactucae* and suppressed the contamination of undesired microorganisms. Finally, sucrose-casein semiselective medium (SC-semiselective medium) was composed of 30g sucrose, 3g casein, 1g K₂HPO₄, 0.5g KCl, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01g FeSO₄ · 7H₂O, 15g agar, 150ppm carbendazim, 50ppm flutonlanil, 200ppm streptomycin sulfate, 50ppm neomycin sulfate and 1L distilled water. The results showed that SC semiselective medium was able to accurately detect the pathogen from artificially and naturally infested soils. Generally, population density of the pathogen in naturally infested field soil was 0-4.3 × 10³ cfu/g soil by detection with SC semiselective medium.

Keywords : Lettuce, brown spot of lettuce, semiselective medium, *Acremonium* disease.