

偵測荔枝酸腐病菌之選擇性培養基

蔡志濃¹ 謝文瑞^{2,3}

1. 臺中縣霧峰鄉 臺灣省農業試驗所植物病理系
 2. 臺中市 國立中興大學植物病理學研究所
 3. 聯絡作者：電子郵件 Tsaijn @ Wufeng.tari.gov.tw；傳真 04-3338162
- 接受日期：中華民國 88 年 2 月 1 日

摘要

蔡志濃、謝文瑞. 1999. 偵測荔枝酸腐病菌之選擇性培養基. 植病會刊 8:9-14.

Geotrichum candidum 及 *Geotrichum ludwigii* 是引起荔枝酸腐病之病原菌，在篩選藥劑防治本病時發現腐絕 (thiabendazole) 及依普同 (iprodione) 兩種藥劑，在防治果樹病害推薦濃度 (分別為 800 1000 ppm 及 160 ppm) 下對本病原菌並無抑制作用，而此兩種藥劑對於多種真菌皆有殺菌效果。以此兩種藥劑合成選擇性培養基，可有效偵測植物殘體及土壤中病原菌之存在。將病原菌拌入滅菌後及田間之自然土壤，再以選擇性培養基偵測，其回收率 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 分別為 98.7% 及 98.3%。選擇性培養基之配方以馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar) 為主、添加乳酸 (75% lactic acid) 1250 ppm、腐絕 8000 ppm、依普同 240 ppm 及玫瑰紅 (rose bengal) 50 ppm。

關鍵詞：荔枝酸腐病菌、選擇性培養基

緒言

荔枝酸腐病病原菌 *Geotrichum candidum* Lk. ex Pers. 及 *Geotrichum ludwigii* (Hansen) Sin-Fang Tzu & Cheng Jing-Chu，於 1995 年在臺灣南投水里地區引起嚴重之荔枝酸腐病。*G. candidum* 廣泛存在於土壤中、柑橘類果實及其他蔬果作物、牛乳、乳酪、人或動物的器官、皮膚及排泄物等 (5,7)，為害之作物包括柑橘類、李、番茄、哈密瓜、胡蘿蔔、桃、葡萄柚、胡瓜、豌豆及荔枝等 (3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20)；*G. ludwigii* 則是首次報導為害荔枝。此兩種病原菌除了為害成熟果實外，並不會為害枝、葉及花，大部份時間在土壤中、落果或有機質中行腐生生活；存在於土壤中、落果或有機質中之病原菌，即為造成病害之初次感染源。前人以番茄馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (tomato potato dextrose agar) (12) 及馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA) (14) 來分離組織上之病原菌，但是要利用這些培養基來偵測土壤中之病原菌，則因其他真菌及細菌之污染無法判別，因此選擇性培養基之合成實屬需要，已往之文獻並無記載分離 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 之選擇性培養基，本文描述以合成之選擇性培養基，從土壤及果實病組織分離此兩病原菌，並與 PDA 比較從土壤中回收病原菌之效率。

材料與方法

供試菌源及藥劑濃度試驗方法

自南投縣水里鄉採回之荔枝果實分離之 *G. candidum* (G1) 及 *G. ludwigii* (G5) 菌株單孢培養於 PDA 上，培養 10 天後供試。先將以濕熱 (autoclave) 消毒過之圓盤濾紙 (直徑 6 mm)，置於 PDA 平板 (直徑 9 cm) 培養基上，將供試菌株單孢移入平板中心，培養於 28 C 無光照之恆溫箱，待菌絲長滿於圓盤濾紙上時 (約 10-12 天)，再將含菌絲之一面貼在含不同濃度之腐絕 (thiabendazole) 及依普同 (iprodione) 藥劑之 PDA 平板培養基上，培養於 28 C 無光照之恆溫箱 10 天後，分別記錄各處理之菌落大小。

不同藥劑濃度對 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 菌絲生長之影響

由 44 種藥劑中，以植物保護手冊 (1) 中推薦防治病害之濃度作藥劑篩選，結果發現腐絕及依普同對本病原菌並無抑制效果，因此進一步以不同濃度之腐絕及依普同測其對本病原菌生長之影響。以 250 ml 之血清瓶裝 100 ml 之 PDA 培養基，經高溫高壓滅菌後，於凝固前 (約 50 C) 分別加入腐絕各 0、800、1000、1300、2000、4000 及 8000 ppm 及依普同各 0、120、160、240、470 及 950

ppm，製成平板後，於每一平板中央各分別移入含有 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 之圓盤濾紙（直徑 6 mm），在 28 C 之恆溫箱中培養 10 天後，分別記錄各處理之菌落大小，每一處理四重複。

選擇性培養基之合成及利用其從果實及土壤中分離 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 之效率比較

將有病徵之果實表皮切取一小塊及採集之田間土壤顆粒，直接置入選擇性培養基，置於 28 C 之恆溫箱中培養三天後，觀察病原菌生長之情形。

將 *G. candidum* 與 *G. ludwigii* 之孢子懸浮液分別調成 2×10^7 spores / ml 及 1×10^5 spores / ml，各取 10 ml 及 15 ml 分別均勻拌入 100 公克的消毒過及田間未消毒之土壤中，經晾乾約 1 小時後，自二處理中隨機各取 10 公克的土壤，分別加入 90 ml 的無菌水中，於振盪器以 150 rpm 振盪 15 分鐘，再依序將此土壤懸浮液作序列稀釋後，分別取每一稀釋倍液 0.2 ml 滴加於選擇性培養基及 PDA 培養基均勻塗佈後，置於 28 C 之恆溫箱，三天後，記錄每一平板出現 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 之菌落數，然後將在培養基出現的菌落數除以原先拌入各土壤中的菌量數，即求得選擇性培養基及 PDA 培養基由土壤中偵測本菌的回收率，每一處理四重複。另外將上述 *G. candidum* 與 *G. ludwigii* 之孢子懸浮液混合拌入消毒過之土壤中，依上述方法作序列稀釋後，分別取每一稀釋倍液 0.2 ml 滴加於選擇性培養基均勻塗佈後，置於 28 C 之恆溫箱，三天後，觀察菌落出現情形。

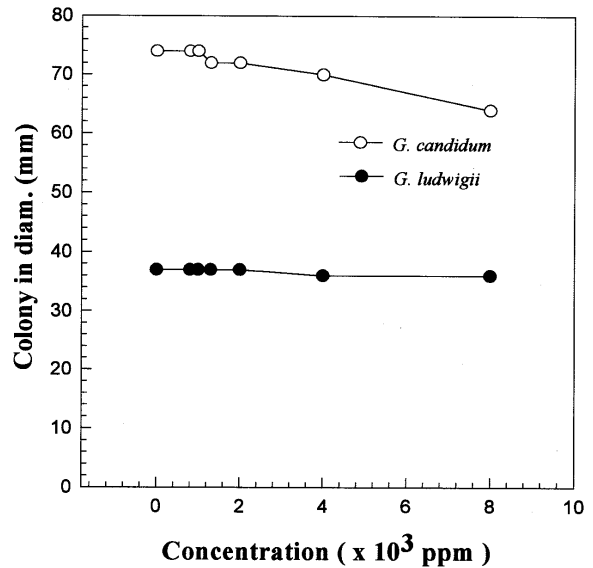
選擇性培養基對 *Geotrichum* spp. 菌絲生長之影響

從由美國菌種保存中心 (American type culture collection) 及荷蘭菌種保存中心 (Centraalbureau voor schimmelcultures) 購得之 20 株 *Geotrichum* spp. 培養於 PDA 平板，於 28 C 之恆溫箱中培養 7 天後，將菌絲移入試驗研製之選擇性培養基，培養於 28 C 之恆溫箱中，每一處理四重複，10 天後觀察菌絲生長情形。

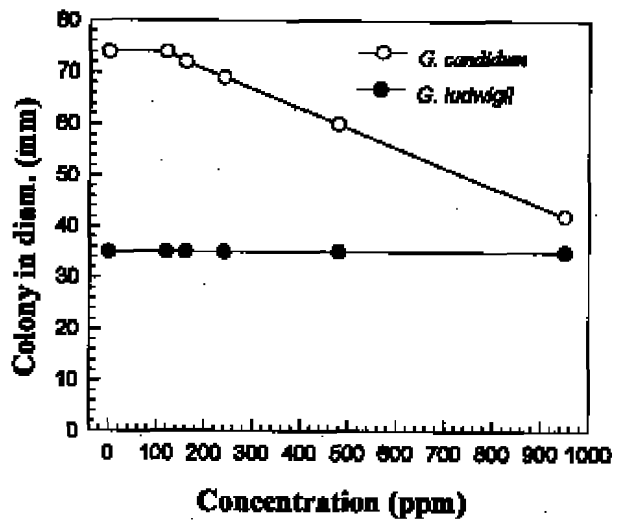
結 果

不同藥劑濃度對 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 菌絲生長之影響

腐絕濃度達到 8000 ppm 時對 *G. ludwigii* 菌絲生長幾乎無抑制效果，對於 *G. candidum* 菌絲生長之抑制亦相當小（圖一）。依普同之濃度達到 950 ppm 時對於 *G. ludwigii* 菌絲之生長無影響，而濃度達到 240 ppm 時，對於 *G. candidum* 菌絲生長已有抑制現象，濃度愈高抑制愈明顯（圖二）。



圖一、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 添加不同濃度之腐絕 (thiabendazole) 對 *Geotrichum candidum* 及 *G. ludwigii* 菌絲生長之影響 (28 C, 10天)。
 Fig. 1. Effect of thiabendazole concentration on mycelial growth of *Geotrichum candidum* & *G. ludwigii* on potato dextrose agar (PDA) at 28 C for 10 days.



圖二、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 添加不同濃度之依普同 (iprodione) 對 *Geotrichum candidum* 及 *G. ludwigii* 菌絲生長之影響 (28 C, 10天)。
 Fig. 2. Effect of iprodione concentration on mycelial growth of *Geotrichum candidum* & *G. ludwigii* on potato dextrose agar (PDA) at 28 C for 10 days.

選擇性培養基之合成及利用其從果實及土壤中分離 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 之效率比較

選擇性培養基的組成配方為：以 Difco 之 PDA 為基礎培養基，添加乳酸 (75% lactic acid) 1250 ppm、腐絕

8000 ppm、依普同 240 ppm 及玫瑰紅 (rose bengal) 50 ppm。

由切取果實表皮及土壤顆粒直接置入選擇性培養基，於 28 C 之恆溫箱中培養三天即可分離到病原菌。

將 *G. candidum* 之孢子懸浮液拌入消毒過及田間未消毒之土壤中，做稀釋平板成 10000 倍，結果在選擇性培養基上，拌入消毒過之土壤回收率達 98.7%，拌入田間未消毒之土壤回收率達 97.5% (表一)，而以 PDA 培養基分離土壤時則長滿雜菌 (圖三，A)。將 *G. ludwigii* 之孢子懸浮液拌入消毒過及田間未消毒之土壤中，做稀釋平板成 100 倍，結果在選擇性培養基上，拌入消毒過及田間未消毒之土壤回收率皆高達 98.3% (表二)。在選擇性培養基上僅出現 *G. ludwigii* 菌落而在 PDA 培養基上則長滿雜菌 (圖三，B)。*G. candidum* 及 *G. ludwigii* 在選擇性培養基上之菌落形態差異：*G. candidum* 之菌落形態為白色粉末狀 (圖四，A,L, B)，而 *G. ludwigii* 則為乳酪狀軟化之菌落 (圖四，A,R, B)。

選擇性培養基對 *Geotrichum* spp. 菌絲生長之影響

由美國菌種保存中心及荷蘭菌種保存中心購得之 20 種 *Geotrichum* spp.，培養於選擇性培養基，結果有六個種在選擇性培養基上不生長 (表三)，此六種菌 *G. klebahnii* (Stautz) Morenz、*G. clavatum* de Hoog et al、*G. capitatum* (Diddens & Lodder) von Arx、*G. amycelicum* Redaelli &

Ciferri、*G. microsporium* G. Smith 及 *G. bipunctatum* Rolland & Fautrey 來源分別為排放之廢水、人體、人之唾液、土壤及 mycophilic。其餘包含 *G. candidum* 之 14 種可生長。

討 論

一般分離及偵測土壤中之病原菌，主要是利用選擇性培養基配合稀釋平板法 (dilution-plate) 或土壤平板法 (soil-plate) (19)。已往酸腐病菌大都以 PDA 或番茄馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (TPDA) 分離 (12,14)，因無專一性，雜菌容易生長，不易分離到病原菌，若用水瓊脂培養基 (water agar) 分離則病原菌不易生長，因而合成選擇性培養基實屬必要。我們合成之選擇性培養基之成分：以 PDA 為基礎培養基，再添加乳酸 1250 ppm、腐絕 8000 ppm、依普同 240 ppm 及玫瑰紅 50 ppm。由實驗發現 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 在 PDA 培養基上生長最好 (3)，Martin (13) 及 Smith & Dawson (16) 報告添加玫瑰紅並將培養基酸化幾乎能抑制所有的細菌生長，因此本試驗中添加乳酸，主要目的是用來抑制細菌生長，而添加玫瑰紅除了可抑制一些細菌之生長外，另一目的是為了容易鑑別此兩種病原菌之菌落，因為此選擇性培養基不加玫瑰紅時為乳白色，而 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 在培養基上之菌落亦為乳白色，不易辨別。腐絕在固體狀態及水溶液中極安定，同時

表一、利用選擇性培養基偵測拌入土壤中之 *Geotrichum candidum* 之效率

Table 1. Recovery of *Geotrichum candidum* from soils after plating on the selective medium at 28 C for 3 days.

| Medium | Number of colonies of <i>G. candidum</i> per plate ¹ | | |
|------------------|---|--|--|
| | Sterilized soil, artificially infested | Unsterilized soil, artificially reinfested | Unsterilized soil, non-artificially infested |
| Selective medium | 39.5 (98.7 %) ² | 39.0 (97.5 %) | 0 |
| PDA | 40.0 (100 %) | ? | 0 |

¹. Each soil was artificialling infected with 2.0×10^6 spores/g dry soil of *G. candidum*. The soil was diluted 10^4 times, and 0.2 ml of soil suspension was plated on one plate.

². Numbers in parenthesis induct recovery rate (%).

³. ? : Colonies of *G. candidum* could not be differentiated.

表二、利用選擇性培養基偵測拌入土壤中之 *Geotrichum ludwigii* 之效率

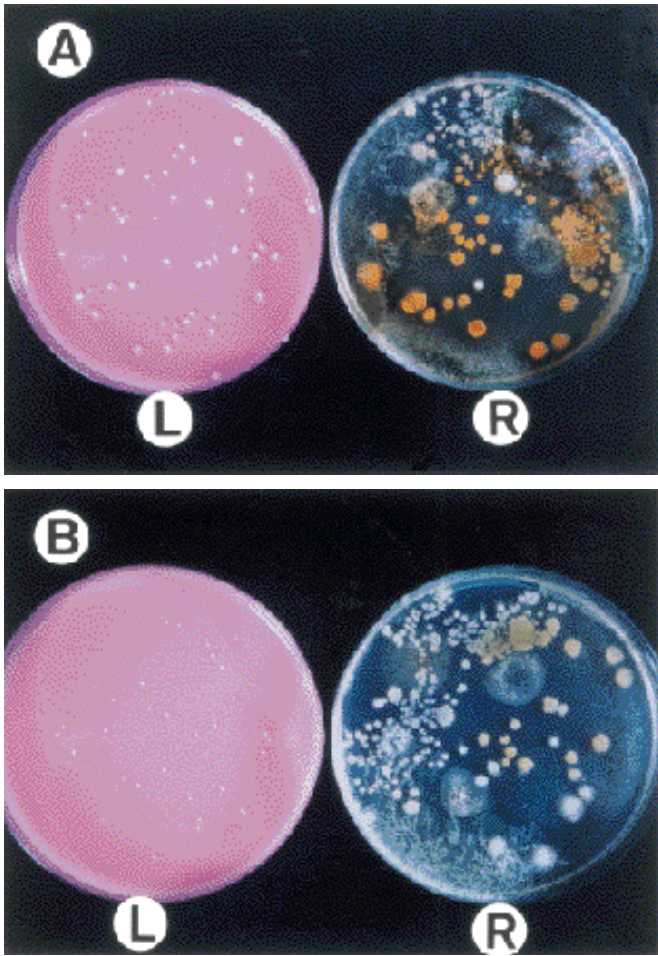
Table 2. Recovery of *Geotrichum ludwigii* from soils after plating on the selective medium at 28 C for 3 days.

| Medium | Number of colonies of <i>G. ludwigii</i> per plate ¹ | | |
|------------------|---|--|--|
| | Sterilized soil, artificially infested | Unsterilized soil, artificially reinfested | Unsterilized soil, non-artificially infested |
| Selective medium | 29.5(98.3 %) ² | 29.5 (98.3 %) | 0 |
| PDA | 30.0 (100 %) | ? | 0 |

¹. Each soil was artificialling infected with 1.5×10^4 spores/g dry soil of *G. ludwigii*. The soil was diluted 10^2 times, and 0.2 ml of soil suspension was plated on one plate.

². Numbers in parenthesis induct recovery rate (%).

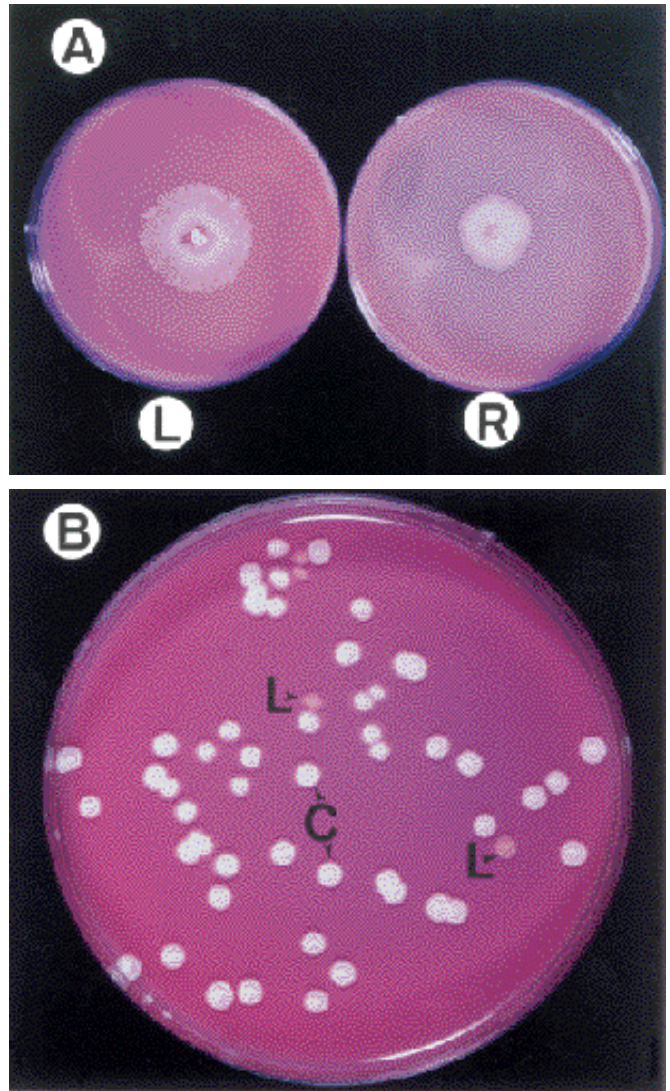
³. ? : Colonies of *G. ludwigii* could not be differentiated.



圖三、選擇性培養基偵測拌入土壤中之 *Geotrichum candidum* 及 *G. ludwigii* 情形 (28 C, 3天)。(A) 選擇性培養基 (L) 上 *G. candidum* 之菌落及 PDA (R) 上雜菌生長情形；(B) 選擇性培養基 (L) 上 *G. ludwigii* 之菌落及 PDA (R) 上雜菌生長情形。

Fig. 3. Recovery efficiency of *Geotrichum candidum* and *G. ludwigii* from sterilized soil and unsterilized soil artificially infested with those pathogens at 28 C for 3 days. (A) The colonies of *G. candidum* on selective medium (L) and contaminant fungi on PDA (R); (B) The colonies of *G. ludwigii* on selective medium (L) and contaminant fungi on PDA (R).

對 *Fusarium* spp.、*Penicillium* spp. 及腐生真菌有殺菌效果 (2)，一般用於防治病害的濃度為 800 1000 ppm，而此選擇性培養基可配製至 8000 ppm 之濃度仍對 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 之生長無影響，亦可抑制更多其他種類的真菌；依普同為接觸性之殺菌劑，用於果樹病害如梨黑斑病防治，其推薦濃度為 160 ppm，在此濃度對於 *G. candidum* 及 *G. ludwigii* 之生長並無影響，當濃度提高至 240 ppm 時，對於 *G. ludwigii* 菌絲生長雖然無抑制，但對 *G. candidum* 菌絲生長已有抑制現象，濃度愈高抑制愈明顯，因此選用 240 ppm 為選擇性培養基之另一成份。由美



圖四、*Geotrichum candidum* 及 *G. ludwigii* 在選擇性培養基上之菌落形態 (28 C)。(A) L 為 *G. candidum* 之菌落，R 為 *G. ludwigii* 之菌落；(B) C 為 *G. candidum* 之菌落，L 為 *G. ludwigii* 之菌落。

Fig. 4. Colonies of *Geotrichum candidum* (A,L & B,C) and *G. ludwigii* (A,R & B,L) on selective medium at 28 C.

國菌種保存中心及荷蘭菌種保存中心購得之 20 株 *Geotrichum* spp. 發現其中六種菌 *G. klebahnii*、*G. clavatum*、*G. capitatum*、*G. amycelicum*、*G. microsporum* 及 *G. bipunctatum* 並不適於在選擇性培養基上生長，其它十四種皆可正常生長，而此六種菌原來於 PDA 上生長速度已相當慢，而且菌落亦有明顯之差異。本試驗合成之選擇性培養基，配製方法簡便，不但能直接由植體或土壤中分離 *G. candidum* 及 *G. ludwigii*，更能用於偵測此病原菌土壤中之存在及密度，偵測效率高達 98% 以上，有助於探討研究病原菌之生態及病害防治。至於本選擇性培養基對於其他 *Geotrichum* spp. 專一性有待進一步研究。

表三、不同 *Geotrichum* spp. 在選擇性培養基上之生長能力測定

TABLE 3. Ability of various *Geotrichum* spp. growing on the selective medium at 28 C for 10 days

| <i>Geotrichum species</i> | Mycelial growth | Source of isolates |
|---------------------------|-----------------|---|
| <i>G. candidum</i> | + ¹ | CBS 773.71 (soil) ² |
| <i>G. capitatum</i> | - | CBS 311.76 (sputum of man) |
| <i>G. citri-aurantii</i> | + | CBS 176.89 (soil of orange orchard) |
| <i>G. clavatum</i> | - | CBS 970.87 (condensation droplets in brewery) |
| <i>G. fermentans</i> | + | CBS 451.83 (sheep leather) |
| <i>G. fragrans</i> | + | CBS 127.76 (fruit of <i>Ficus</i> sp.) |
| <i>G. klebahnii</i> | - | CBS 511.83 (sewage filter) |
| <i>G. ludwigii</i> | + | CBS 234.85 - |
| <i>G. sericeum</i> | + | CBS 192.55 (tannin concentrate) |
| <i>G. terrestre</i> | + | CBS 278.86 (soil) |
| <i>G. amycelicum</i> | - | ATCC 24658 - |
| <i>G. bipunctatum</i> | - | ATCC 36813 (mycophilic) |
| <i>G. fici</i> | + | ATCC 34015 - |
| <i>G. gracile</i> | + | ATCC 24660 - |
| <i>G. hirtum</i> | + | ATCC 56047 - |
| <i>G. loubieri</i> | + | ATCC 56048 - |
| <i>G. marinum</i> | + | ATCC 20614 (marine soil) |
| <i>G. microsporium</i> | - | ATCC 42435 (Alpine soil) |
| <i>G. pseudocandidum</i> | + | ATCC 36214 (stomach contents of newborn) |
| <i>G. rectangulatum</i> | + | ATCC 34016 - |

¹ Mycelia could(+) or could not(-) grow on selective medium.

² CBS :Centraalbureau voor schimmelcultures ; ATCC : American type culture collection ; - : Not-record

謝 辭

本研究承 行政院農業委員會 88 科技-1.3-檢-04(58) 計畫經費補助，酸腐病原菌承荷蘭菌種保存中心 (Centraalbureau voor schimmelcultures) 鑑定，特誌謝忱。

引用文獻

- 張國輝、陳清倫、潘建銘、費雯綺、李季桃。1997. 植物保護手冊。臺灣省政府農林廳編印。臺灣南投。625 頁。
- 廖龍盛。1983. 實用農藥。華成印刷廠。臺灣南投。850 頁。
- 蔡志濃、謝文瑞。1998. 荔枝酸腐病之發生及病原菌特性。植物病理學會刊 7(1):10-18。
- Alka, S., Joshi, I. J., and Saksena, S. B. 1983. A new rot of bean caused by *Geotrichum candidum*. Indian Phytopath. 36:581-582.

- Butler, E. E. 1960. Pathogenicity and taxonomy of *Geotrichum candidum*. Phytopathology 50:665-672.
- Carmichael, J. W. 1957. *Geotrichum candidum*. Mycologia 49:820- 830.
- Ceponis, M. J. 1966. Occurrence of *Geotrichum candidum* in western melons on the New York market. Plant Dis. Rep. 50 (4):222-224.
- De Hoog, G. S., Smith, M. T., and Gueho, E. 1986. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. Stud. Mycol. 29:1-131.
- El-Tobshy, Z. M., and Sinclair, J. B. 1965. *Geotrichum candidum*: Plant and animal isolates pathogenic to certain plant tissues. Phytopathology 55:1210-1212.
- Jamaluddin, M. P. T., and Tandon, R. N. 1975. Rot of fruits of litchi (*Litchi chinensis*) in marketing processes. Indian Phytopath. 28:530-531.
- Mahmood, T. 1970. *Geotrichum candidum*, causing sour rot of lemon in Turkey. Plant Dis. Rep. 54:881-882.
- Mall, S., and Mall, O. P. 1982. Morphology and pathogenicity of *Geotrichum candidum* causing sour rot. Indian Phytopath. 35 :562- 565.
- Martin, J. P. 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci. 69 :215-232.
- Saikia, U. N., and Puzari, K. C. 1982. Fruit rot of plum-a new post- harvest disease. Indian Phytopathology 35:334.
- Sharma, R. L., and Kaul, J. L. 1976. Incidence of sour rot of citrus in Himachal Pradesh. Indian Phytopath. 29:214-215.
- Smith, N. R., and Dawson, V. T. 1944. The bacteriostatic action of rose bengal in media used for the plate counts of soil fungi. Soil Sci. 58 :467-471.
- Suprata, D. N., Arai, K., and Iwai, H. 1996. Parasitic specialization of *Geotrichum candidum* citrus race. Mycoscience 37:105-107.
- Wells, J. M. 1977. Sour rot of peaches caused by *Monilia implicata* and *Geotrichum candidum*. Phytopathology 67:404-408.
- Warcup, J. H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature 166 :117-118.
- Wright, W. R., Smith, M. A., and Beraha, L. 1964. Sour rot of carrots. Plant Dis. Rep. 48:837-838.

ABSTRACT

Tsai, J. N.¹, and Hsieh, W. H.² 1999. A selective medium for the isolation of *Geotrichum candidum* and *Geotrichum ludwigii* from litchi and soil. Plant Pathol. Bull. 8:9-14. (¹ Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute. ; ² Corresponding author, E-mail: Tsaijn@Wufeng.tari.gov.tw , Fax No: 04-3338162 ; ³ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan R. O. C.)

A selective medium was developed for isolation of *Geotrichum candidum* and *Geotrichum ludwigii*, the cause of sour rot of litchi, from naturally infested soil and fruits. The recovery rates of *G. candidum* and *G. ludwigii* from the artificially infested soil were 98.7 % and 98.3 %, respectively. The medium consists of potato dextrose agar (200 g potato, 20 g dextrose and 15 g of Bacto agar in 1000 ml distilled water), 1250 ppm of lactic acid, 8000 ppm of thiabendazole, 240 ppm of iprodione and 50 ppm of rose bengal.

Key words: sour rot of litchi, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum ludwigii*, selective medium.