

台灣甘藍黃葉病菌的鑑定及其對 十字花科蔬菜的致病性

莊茗凱、李思儀、黃振文*

台中市南區國光路 250 號 國立中興大學植物病理學系

*通訊作者：E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw ， Fax: +886-4-22851676

接受日期：中華民國 101 年 2 月 8 日

摘要

莊茗凱、李思儀、黃振文. 2012. 台灣甘藍黃葉病菌的鑑定及其對十字花科蔬菜的致病性. 植病會刊 21: 29-38.

西元 2008 年在雲林縣東勢鄉及 2009 年在苗栗縣卓蘭鎮等地區的夏季甘藍栽培田，發現甘藍植株下位葉黃化，呈現半側萎凋與枯死的現象。將罹病的植株根部縱切後，維管束有褐化、壞疽等病徵。自罹病甘藍植株組織分離，共獲得 15 個菌株 (FOC-JR01~06 與 FOC-YL01~09)，經柯霍氏法則測定結果，顯示它們對甘藍均具致病性。將 FOC-JR01 與 FOC-YL08 兩菌株分別接種於 9 種不同作物，結果發現兩株菌除會感染甘藍外，尚可感染芥藍與蕪菁。本病原菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的最適生長溫度為 28°C，其生長初期菌絲為白色，隨後在光照下逐漸轉變成淡紫色，並可在試管內壁形成白色細小的菌絲結。本菌有三種孢子形態，包括大、小分生孢子及厚膜孢子；大分生孢子呈鐮刀形，無色，2~4 個隔膜 (大多 3 個隔膜)，大小 7.9 ~ 33.3 × 1.0 ~ 6.4 μm (平均 20.6 × 3.7 μm)；小分生孢子為橢圓或臘腸形，無色，大小 6.1 ~ 13.9 × 1.4 ~ 6.4 μm (平均 10.0 × 3.9 μm)；厚膜孢子近圓形，無色，大小 4.7 ~ 13.5 × 4.6 ~ 14.3 μm (平均 9.1 × 9.45 μm)。大小分生孢子皆著生於分生孢子梗的瓶狀枝上，小孢子呈假頭狀排列；厚膜孢子則於菌絲間生或頂生，或由大小孢子轉化而成。綜合上述菌株之形態特徵與病原性測定結果，配合它們的分子生物學分析佐證資料，本研究確定台灣中南部甘藍黃葉病的病原菌為 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wollenweb.) W. C. Snyder and H. N. Hansen。利用人工病菌土進行接種試驗，發現將甘藍種子直接播種在含有菌量 10³、10⁴ 及 10⁵ (cfu/ml medium) 的栽培介質中，28 天後甘藍植株的發病率分別為 33%、83% 及 86%；此外，將株齡 21 天的甘藍幼苗移植種於含有菌量 250、500 及 1000 (cfu/ml medium) 的栽培介質中，21 天後甘藍植株罹病率分別為 93%、100% 及 100%；至於罹病度則分別為 47%、71% 及 76%。

關鍵詞：甘藍黃葉病菌、芥藍、病原性、蕪菁

緒言

甘藍 (*Brassica oleracea* L. Capitata Group)，英文名為 cabbage，俗稱高麗菜，為台灣重要大宗蔬菜之一，屬

於十字花科蕪菁屬，為 1~2 年生草本植物，性喜冷涼，栽培最適溫度為 18~21°C，最適 pH 值為 5.0~6.5，在排水佳的砂壤土至黏質壤土最適宜栽培⁽⁷⁾。在台灣栽培的葉菜類中，以甘藍栽培面積最廣，產量亦最多，全台大約有

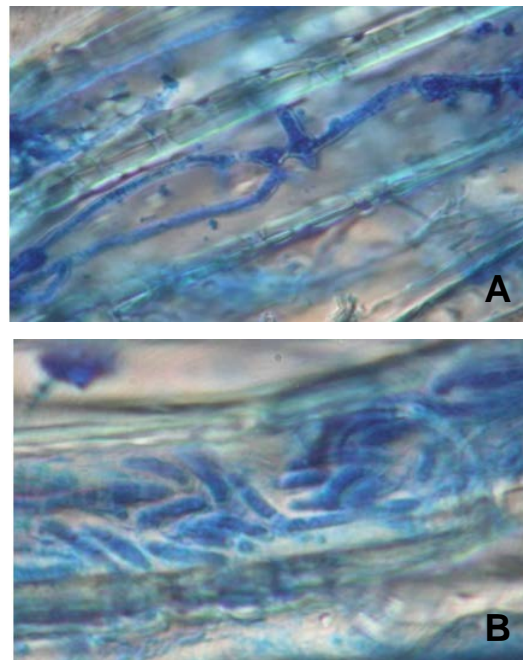
9000 公頃的種植面積，以彰化縣、雲林縣及南投縣為主要生產地，佔全台栽培面積 55%，每年產量約在二十三萬噸，除高溫季節產量較少外，全台周年皆有生產，主要盛產期為每年 11 月至翌年 4 月⁽⁶⁾。栽培甘藍的過程中，常見的真菌性病害有：菌核病、露菌病及黑斑病等。西元

1895 年 Smith 在美國紐約發現甘藍黃葉病，係由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Sch. ex Fr.) Snyder & Hans. 所引起^(8,17)。在台灣於 1986 年羅與孫兩氏⁽¹²⁾曾報導本病原菌的發生，但卻無進一步之研究。近年來，台灣中南部彰化、雲林及嘉義三縣之蔬菜栽培區，每年 5-10 月間夏季栽培的甘藍常於中午炎熱時，植株出現全株失水萎凋、下位葉黃化、半側萎凋及枯死的現象（圖一 A）。將罹病株的莖部以刀片切開，可以發現維管束出現褐變的症狀（圖一 B）；利用褐變組織製作成切片置於顯微鏡下，尚可觀察到病原菌的菌絲與孢子存在維管束內（圖二）。筆者初步將罹病株進行組織分離與菌種鑑定，證明該病害係由尖鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 所引起，為了進一步瞭解該病原菌的形態特性，接種技術及病原性，因此進行本項研究工作。



圖一、甘藍黃葉病：(A)在田間罹病株呈現萎凋死亡的情形；(B)罹病植株的維管束褐化(箭頭)。

Fig. 1. Cabbage yellows : (A) *Fusarium* wilt of cabbage occurred in the field ; (B)Diseased cabbage showed vascular discoloration (arrowed).



圖二、光學顯微鏡下鏡檢甘藍黃葉病植株莖基部之維管束切片：(A)維管束內有病原菌的菌絲；(B)在維管束內有大量小分生孢子。

Fig. 2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in stem vascular section of infected cabbage plant under light microscopy : (A) Hyphae of the pathogen existed in vascular tissue ; (B) Microconidia in vascular tissue.

材料與方法

供試菌株來源

西元 2008 年 5 至 10 月間，雲林縣東勢鄉及 2009 年 5 至 10 月間苗栗縣卓蘭鎮之夏季甘藍栽培田出現疑似黃葉病病徵，將罹病植株取回後，切取褐化之維管束組織，經 1% (v/v) 次氯酸鈉 (NaClO, Sodium hypochlorite) 水溶液消毒 30 秒後，以無菌水漂洗三次，再以濾紙吸乾多餘的水分，並移置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar, WA, Difco, USA) 與五氯硝苯 (PCNB) 選擇性培養基^(13, 19)，在 28°C 進行分離培養 4 天，待菌絲長出後，切取菌絲尖端移置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 PDA (Potato Dextrose Agar, PDA, Difco, USA) 斜面上，一星期後，刮取孢子進行單孢分離培養，共獲得 FOC-JR01、FOC-JR02、FOC-JR03、FOC-JR04、FOC-JR05、FOC-JR06、FOC-YL01、FOC-YL02、FOC-YL03、FOC-YL04、FOC-YL05、FOC-YL06、FOC-YL07、FOC-YL08 及 FOC-YL09 等 15 個菌株。

供試菌株之培養與保存

取本研究分離獲得的鐮孢菌菌株，每隔一個月，利用單孢分離技術，將其培養於 PDA 斜面，並置於合適的溫度 (22~25°C 間) 與光照 (每日 12 小時以 30W 旭光白色日光燈管 2 支，距試管約 50cm，照射 1700~2200 Lux) 下，以避免菌株變異⁽²¹⁾；此外在常溫下利用砂管 (10% loamy sand + 1% agar) 保存菌種。

病原性之測定

由甘藍病株分離到的菌株，分別培養在 PDA 斜面培養基上，待 2-3 星期後，以無菌水洗出各菌株之孢子，配製成懸浮液 (10^4 cfu/ml)，隨即均勻拌入消毒過的泥碳苔栽培介質 (BVB. No.4) 內，製成含菌的栽培介質後，分裝於 9 cm 內徑的花盆中，並播種催芽過的甘藍 (農友高峰品種) 種子，直到甘藍植株發病時，取回罹病株，重新進行分離與鑑定。

病菌土製作與病原菌密度測定

病菌土製作：將 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株的孢子懸浮液接種於消毒過的芹菜莖培養基 (芹菜莖 150 g) 中，培養 3 星期後，分別與消毒過的土壤 (壤土：河砂 = 1：1) (v/v)，以 1:5 (w/w) 比例均勻拌合，一個月後，以 128 mesh 的網篩篩過，置於陰涼處，作為接種用的病菌土。

病原菌密度測定：將土樣陰乾磨碎，秤取 10 g 加於 90 ml 無菌水中，振盪均勻，取 1/10 稀釋液 5 ml 加於 45 ml 無菌水使成 1/100 稀釋液，再取 1/100 稀釋液 5 ml 加 45 ml 無菌水配成 10^{-3} 稀釋液，依序配得 10^{-4} 、 10^{-5} 及 10^{-6} 之稀釋液。之後，將各稀釋液 1 ml 均勻平展於 PCNB 培養基 (Nash and Snyder)⁽¹³⁾ 平板上，五天後由平板上出現之菌落數，推估土壤中病原菌的密度。PCNB 之配方及作法：將磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 1 g，硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g，洋菜粉 (Agar) 20g 及蒸餾水 1 L，先高壓滅菌 (121°C , 15 lb)，30 分鐘後，加入蛋白胨 (Peptone) 15 g，蛋白胨完全溶解後，待溫度降至 60°C ，立刻加入五氯硝苯 (PCNB) 1 g，使之充分混合均勻後，當溫度再降至 40°C 左右，迅速加入鏈黴素 (Streptomycin sulfate, SIGMA) 500 mg 及新黴素 (Neomycin trisulfate salt hydrate, SIGMA) 100 mg 後，隨即倒於培養皿製成平板備用。

病害調查方式

植株受病原菌感染後，出現病徵即判定為發病植株，隨後以罹病株數除以總調查植株數乘以 100，即可換算成罹病率 [Disease incidence (%)]。植株罹病後，其受害嚴重程度分成 4 等級，其中 0 級 = 植株健康，無任何病徵；1 級 = 植株出現矮化、葉片偏上生長，但無黃化病徵；2 級 = 植株葉片黃化、植株半側萎凋；3 級 = 植株全株失水萎凋、植株死亡。然後按下列公式換算植株的罹病度 [Disease severity (%)]，公式中 $n_0 \sim n_3$ 表示各罹病等級的植株數；N 表示總植株數。

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3}{N \times 3} \times 100$$

病原菌之形態

將 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株分別單孢培養於 PDA 斜面二星期後，觀察各個菌株之菌落形態，隨後刮取病原菌的孢子，在光學顯微鏡下，觀察並記錄分生孢子及厚膜孢子的大小及形狀；另外也以載玻片培養法培養兩菌株 (slide culture) [將單孢培養於玻片上置有一塊含 0.5% (w/v) 葡萄糖之 2% (w/v) 水瓊脂培養基]，觀察病原菌產孢構造與分生孢子著生的方式。

甘藍黃葉病菌之 DNA 萃取

利用移植針切取適量 FOC-JR01 及 FOC-YL08 兩株菌株之菌絲至 1.5 ml 微量離心管中，將離心管置於 700W 微波爐加熱 2 分鐘⁽⁹⁾，加入 30 μl TE buffer 並均勻震盪 1 分鐘後，離心 ($13,800 \times g$) 2 min，取上清液至新的微量離心管中，作為聚合酵素鏈鎖反應之模板。

ITS 核酸定序

聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction)：將所萃取之甘藍黃葉病菌 DNA 萃取液，取 0.8 μl 作為聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 所需之模板 (Template)。PCR 反應每一樣本的總體積為 20 μl ，其中含有：2 μl 10X Taq buffer, 1 μl 2.5mM dntp, 0.1 μl Taq DNA polymerase, 0.4 μl ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')⁽²⁰⁾, 0.4 μl ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^(20,24), 0.8 μl Template, 0.4 μl 5 mg/ml BSA 及 14.9 μl

H₂O。將上述反應液於自動溫度循環控制反應儀(Block of Thermal cycler, TC-96-G, Infinigen Biotechnology Inc. U.S.A)中進行 35 個循環反應。反應條件為起始 95°C 變性 30 秒、55°C 黏合(Annealing)30 秒、72°C 延伸(Extension) 2 分鐘等 3 步驟進行循環，共 35 個循環，最後以 72°C 再延伸 5 分鐘後保存於 4°C 中。增幅片段之定序與比對：將 PCR 所得之 FOC-JR01 及 FOC-YL08 之 DNA 與染劑(6X loading dye, Gene Mark)以 1:3 (v/v)比例混合後，載入 1.5% (w/v) TAE (40 Mm Tris, 20mM Sodium Acetate, 1mM pH 7.5 EDTA)瓊脂凝膠 (Agarose, Bio Basic Inc. Canada) 膠片中，並置入含有 0.5X TAE 緩衝液 (20mM Tris-acetate, 0.5 mM pH 8.5 EDTA-Na-2, 10 M glacial acetic acid) 的電泳槽中，以電壓 100 伏特進行電泳分析。待分析後以溴化乙錠(Ethidium Bromide, EtBr, 0.5 ug/ ml)染色 10 分鐘，接著用去離子水退染 10 分鐘後，再以 UV 照相系統 (S-2000, Alpha innotech CO.)紀錄結果。將有出現條帶之 PCR 產物送交源資國際生物技術股份有限公司進行定序。隨後將成功定序之序列資訊與美國國家生物科技資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 資料庫(GenBank) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)進行序列比對。

病原菌對不同科蔬菜作物之致病性

將 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株所製成的病菌土與不帶病原菌的泥炭苔(BVB. No. 4)混合製成含有病原菌量 6×10^3 (cfu/ml medium)的病菌栽培介質，隨後種植甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*；農友高峰品種)、胡瓜 (*Cucumis sativus*；農友秀美品種)、萵苣(*Lactuca sativa*；農友)、蘿蔔(*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*；豐農晚生大梅花品種)、甜瓜(*Cucumis melo*；農友)、絲瓜(*Luffa sylestria*；農友東光品種)、長豇豆(*Vigna sesquipedalis*；農友)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*；農友 301 品種)及西瓜(*Citrullus lanatus*；農友)等不同科蔬菜作物，待植株在 28°C 定溫生長箱生長 4 星期後，觀察紀錄各作物之罹病情形。每處理有 3 重複，每重複 6 棵植株。

病原菌對十字花科蔬菜作物之致病性

將 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株所製成的病菌土與不帶病原菌的泥炭苔(BVB. No.4)混合製成含有病原菌量

6×10^3 (cfu/ml medium)的病菌栽培介質，隨後播種消毒過的白菜 (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*；農友鳳山品種)、蕪菁 (*Brassica rapa* subsp. *rapa*；Marutane, Japan；紅球品種)、甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*；農友高峰品種)、蘿蔔 (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*；農友明和品種)、蘿蔔 (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*；豐農晚生大梅花品種)、芥藍 (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*；農友蕪津品種)及芥菜 (*Brassica juncea* subsp. *intergrifolia*；鳳山熱帶園藝試驗分所竹北品種)等七種不同十字花科蔬菜作物種子，待植株在溫室中生長 4 星期後，觀察記錄各蔬菜作物之罹病情形。每處理有 3 重複，每重複有 5 棵植株。

溫度對 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌絲生長的影響

將 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株移植於 PDA 培養基上，待菌絲生長 5 天後，用 3 號打孔器(直徑 0.7 公分)於菌落邊緣切取菌絲塊，分別移植在 PDA 平板培養基中央，並分置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36°C 等不同溫度之定溫箱中，7 天後，紀錄各溫度處理的菌落大小。其中每一處理各有 4 重複。

不同接種方法對植株罹病的影響

直播接種法：將 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株之病菌土與不帶病原菌的栽培介質(壤土：BVB. No. 4= 1:1)均勻混合，分別稀釋成含有菌體密度為 10^3 、 10^4 及 10^5 cfu/ml medium 之栽培介質，隨後直接播種甘藍種子，每 7 天調查甘藍植株的罹病率，連續調查 5 次。每一處理有 3 重複，每重複調查 10 棵甘藍植株。

移植幼苗接種法：將 FOC-YL08 菌株之病菌土與泥炭苔(BVB. No.4)均勻混合，分別稀釋成 0、250、500 及 1000 cfu / ml medium 等不同菌體密度，並置入直徑 9 cm 塑膠軟盆中，然後種植株齡 21 天之甘藍幼苗，在溫室經過 21 天後調查植株罹病率(disease incidence)與罹病度(disease severity)。每一處理有 3 重複，每重複有 5 棵甘藍植株。

結 果

病原菌之形態特徵

甘藍黃葉病菌 FOC-JR01 與 FOC-YL08 菌株生長在馬

鈴薯葡萄糖瓊脂培養基平板，菌絲生長初期為白色，隨後在光照下逐漸地轉變成淡紫色 (表一；圖三)，菌落表面可產生散生的橘黃色孢子叢(sporodochia)。本菌有三種孢子形態(圖三)，包括大、小分生孢子及厚膜孢子；大分生孢子呈鐮刀形，無色，2 ~ 4 個隔膜(大多 3 個隔膜)，大小 $7.9 \sim 33.3 \times 1.0 \sim 6.4 \mu\text{m}$ (平均 $20.6 \times 3.7 \mu\text{m}$)；小分生孢子為橢圓或臘腸形，無色，大小 $6.1 \sim 13.9 \times 1.4 \sim 6.4 \mu\text{m}$ (平均 $10.0 \times 3.9 \mu\text{m}$)；厚膜孢子近圓形，無色，大小 $4.7 \sim 13.5 \times 4.6 \sim 14.3 \mu\text{m}$ (平均 $9.1 \times 9.45 \mu\text{m}$) (表一)。大小分生孢子皆著生於分生孢子梗的瓶狀枝上，小孢子呈假頭狀排列；厚膜孢子則於菌絲間生或頂生，或由大小孢子轉化而成。依上述菌體之特徵，參 Booth

氏⁽⁴⁾ 及 Nelson 等氏⁽¹⁴⁾之 *Fusarium* 分類系統，確定兩菌株歸屬於 *Fusarium oxysporum* Schl.。

病原菌之分子鑑定

以 ITS1 及 ITS4 區域之聚合鏈鎖反應進行序列增幅，得到 FOC-JR01 與 FOC-YL08 之核糖體去氧核糖核酸片段後，利用 BioEdit 序列分析軟體進行分析，隨後將所得之序列與 NCBI 資料庫進行比對，結果顯示 FOC-JR01 及 FOC-YL08 之序列皆和美國 NCBI 資料庫(Genbank)中之 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (NCBI accession no: GU205817.1)具有 100%的相似度。

表一、甘藍黃葉病菌 *Fusarium oxysporum* FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株之菌落形態與孢子大小

Table 1. Morphology of *Fusarium oxysporum* isolates FOC-JR-01 and FOC-YL08 obtained from diseased cabbage plants.

Isolates	FOC-JR01	FOC-YL08
Morphology of colonies on PDA	Purple Sporodochia over mycelia, light orange	Purple Sporodochia over mycelia, light orange
Size of macroconidia	$15.3 \times 4.2 \mu\text{m}$ (8.7- 24.6 \times 1.0- 6.5 μm)	$19.1 \times 4.2 \mu\text{m}$ (7.1- 41.9 \times 1.0- 6.2 μm)
Size of microconidia	$9.0. \times 3.3 \mu\text{m}$ (6.1- 13.9 \times 1.4- 6.2 μm)	$9.1 \times 3.9 \mu\text{m}$ (6.1- 13.9 \times 1.4- 6.5 μm)
Size of Chlamydospores	$9.1 \times 8.7 \mu\text{m}$ (5.1- 13.6 \times 6.1- 14.3 μm)	$8.0 \times 7.7 \mu\text{m}$ (4.2- 13.3 \times 3.1- 14.3 μm)

病原菌對不同科蔬菜作物之致病性

將不同科的蔬菜作物接種本病原菌 FOC-JR01 與 FOC-YL08 菌株後，於生長箱中栽培 4 星期後，觀察各作物的罹病率，結果僅有甘藍出現萎凋及死亡的病徵，至於其他科的供試蔬菜作物則不受本病菌的感染 (表二)。根據上述病原性測定、菌體形態特徵及其對寄主之致病反應等結果，筆者等將台灣發生的甘藍黃葉病病原菌鑑定為 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wollenweb.) W. C. Snyder and H. N. Hansen。

病原菌對不同十字花科蔬菜作物之致病性

將不同十字花科的蔬菜作物接種病原菌後，於溫室中栽培 4 星期後，觀察各蔬菜的罹病率，結果僅有甘藍、芥

藍及蕪菁出現萎凋及死亡的病徵；其中接種 FOC-JR01 菌株的甘藍、芥藍及蕪菁植株之罹病率皆為 100%；至於接種 FOC-YL08 菌株的甘藍、芥藍及蕪菁植株之罹病率分別為 47%、27%及 33%；其他接種的十字花科作物如蘿蔔、芥菜、及白菜等則均未出現病徵 (表三)。

不同接種方法對植株罹病的影響

直播接種法—甘藍種子播種在不同菌量濃度之栽培介質中，經過 35 天的觀察，甘藍植株的發病率隨著接種濃度及天數增加而逐漸提高。當接種濃度為 10^3 、 10^4 及 10^5 cfu/ml medium 時，植株在第 28 天的發病率分別為 33%、83%及 86% (圖五)。

溫度對 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌絲生長的影響

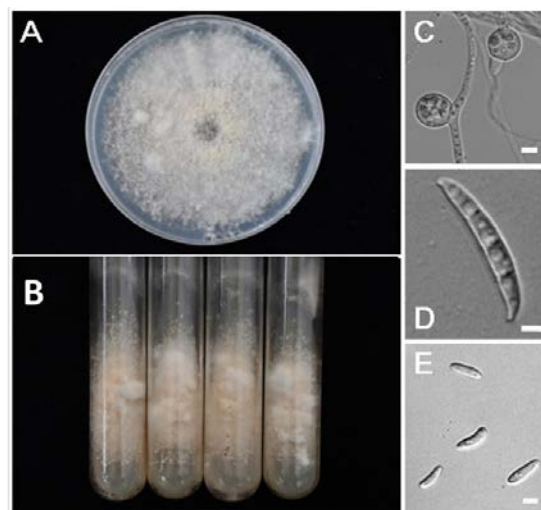
觀察 FOC-JR01 及 FOC-YL08 菌株生長於 8~36°C 等不同溫度下，發現在 8 與 28°C 間，兩菌株生長速度隨溫度升高而漸增；從 28 至 36°C，菌絲生長則隨溫度上升而菌株的寄主範圍測試下降(圖四)，兩菌株最適的菌絲生長溫度皆為 28°C。

移植幼苗接種法—將株齡 21 天之甘藍幼苗移植於含菌介質中 21 天後，統計植株的罹病率及罹病度，結果發現隨著接種源濃度增加，植株的罹病率及罹病度均有相仿的增加趨勢(圖六、七)；其中栽培介質中菌量只要超過 250 cfu/ml medium 的濃度，於甘藍幼苗定植 21 天後的罹病率可達 93%，至於罹病度亦可達 47% (圖六)；此外接種源濃度達 500 與 1000 cfu/ml medium 時，移植的甘藍植株經過 21 天後罹病率皆為 100%，罹病度則分別為 71% 及 76%(圖六)。此外，接種第 42 天後所有接种植株皆已出現完全枯死的現象 (資料未呈現)。

表二、*Fusarium oxysporum* 之 FOC-JR01 與 FOC-YL08 菌
Table 2. Host range test of *Fusarium oxysporum* isolates FOC-JR01 and FOC-YL08 in plant growth chamber at 28°C for 28 days.

Name of crops	Pathogenicity reaction ¹	
	FOC-JR01	FOC-YL08
Cabbage (<i>Brassica oleracea</i>)	+	+
Cucumber (<i>Cucumis sativus</i>)	-	-
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i>)	-	-
Radish (<i>Raphanus sativus</i>)	-	-
Sweet melon (<i>Cucumis melo</i>)	-	-
Sponge cucumber (<i>Luffa aegyptiaca</i>)	-	-
Asparagus-bean (<i>Vigna sesquipedalis</i>)	-	-
Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	-	-
Watermelon (<i>Citrullus lanatus</i>)	-	-

¹ + :Yes ; - : No



圖三、甘藍黃葉病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*)之形態：(A)培養在 PDA 平板上之菌落；(B)培養在 PDA 斜面之菌落；(C)厚膜孢子；(D)大分生孢子；(E)小分生孢子。

Fig. 3. Morphologies of the pathogen of cabbage yellows, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* : (A) Colony on PDA plate ; (B) Colonies on PDA slants ; (C) Chlamydospores ; (D) Macroconidium ; (E) Microconidia. (Bar = 5 µm)

討論

Wollenweber 與 Reinking 兩氏 (1935)⁽²³⁾ 依據本菌之顯微形態特徵及菌落產生黏性的分生孢子叢 (Sporodochia)，將甘藍黃葉病菌命名為 *F. conglutinans*。Snyder 與 Hansen 兩氏 (1940)⁽¹⁸⁾ 根據形態學將該菌株改命名為 *Fusarium oxysporum*，並以 *conglutinans* 作為該菌的分化種名。隨後 Walker 與 Wellman 兩氏(1928)⁽²²⁾、Kendrick 氏(1930)⁽¹⁰⁾及 Pound 與 Fowler 兩氏(1951)⁽¹⁵⁾ 等發現該病原菌可感染大部分甘藍的栽培變異種，如花椰菜(Cauliflower ; *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)、青花菜(Broccoli ; *Brassica oleracea* var. *italica*)、球芽甘藍 (Brussel sprouts ; *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*)、結頭菜 (Kohlrabi ; *Brassica oleracea* L. var. *caulorapa* DC.) 及芥藍(Kale ; *Brassica oleracea* (Acephala Group)等。

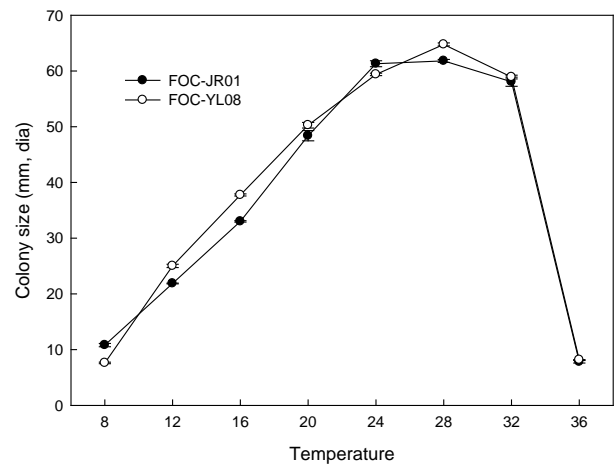
表三、甘藍黃葉病菌 FOC-JR01 與 FOC-YL08 菌株對不同十字花科蔬菜之病原性

Table 3. Pathogenicity test of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* isolates FOC-JR01 and FOC-YL08 on seven cruciferous vegetables in the greenhouse.

Crop name	Scientific name (Cultivar)	Disease incidence (%)	
		FOC-JR01	FOC-YL08
Cabbage	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>		
	(Summer Summit 高峰)	100	47
Chinese kale	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>		
	(Wai-Chun 蕙津)	100	27
Mustard	<i>Brassica juncea</i> subsp. <i>intergrifolia</i>		
	(Ju-Pei 竹北)	0	0
Turnip	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>rapa</i>		
	(Tsugaru-Beni 紅球)	100	33
Radish	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>		
	(Ming-Ho 明和)	0	0
	(WSTMH ¹ 晚生大梅花)	0	0
Chinese cabbage	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>		
	(Feng-Shan 鳳山)	0	0

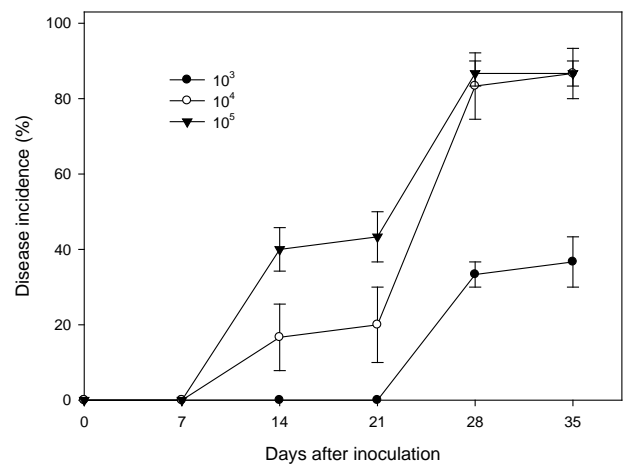
¹ WSTMH= Wan-Sheng-Ta-Mei-Hua

Kendrick 及 Snyder 兩氏(1942)⁽¹¹⁾報導由蘿蔔植株分離獲得一株尖鏢孢菌，經過接種試驗證明只能感染蘿蔔，因此命名為 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*。此外，Baker 氏(1948)⁽³⁾將紫羅蘭分離到的尖鏢孢菌，依其寄主植物，命名為 *F. oxysporum* f. sp. *mathioli*。Armstrong 氏等人(1952)⁽¹⁾根據接種試驗結果，將這些來自十字花科的三種分化種重新整合後，以原先依菌落形態命名之 *conglutinans* 作為分化種的名稱，並分別以 race 1、2 及 3 置於分化種之後，區隔彼此間為不同的生理小種；其中 race 1 對甘藍具有致病性，race 2 對蘿蔔有致病性，而 race 3 則是對紫羅蘭有致病性。西元 1966 年，Armstrong 與 Armstrong 兩氏⁽²⁾發現可以感染耐高溫且抗病之紫羅蘭栽培種的菌株，因此將菌株鑑定為 race 4。西元 1985 年，Ramirez-Villupadua 氏



圖四、溫度對甘藍黃葉病菌菌絲生長的影響 (在 PDA 平板培養 7 天)。

Fig. 4. Effect of temperatures on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* isolates FOC-JR01 and FOC-YL08 on potato dextrose agar plates for 7 days.



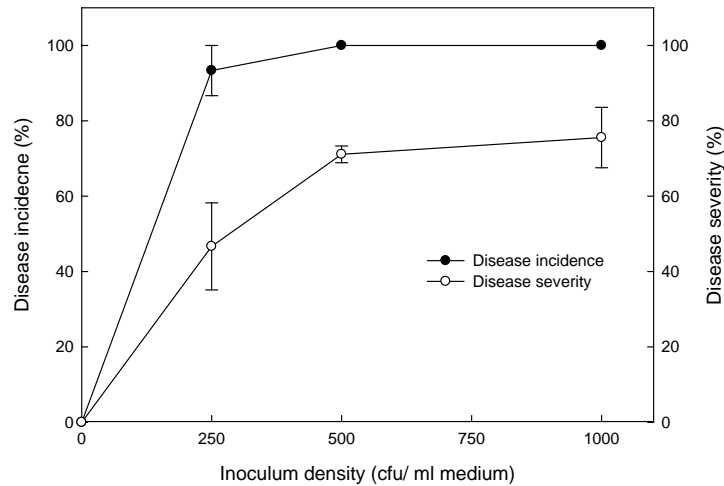
圖五、病原菌不同接種源濃度對於甘藍植株罹患黃葉病百分率的影響(28 天內植株發病的進展情形)。

Fig. 5. Effect of inoculum densities in infested media on disease incidence of cabbage plants caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* FOC-YL08 for 28 days.

等人⁽¹⁶⁾發現可感染耐高溫且抗病之甘藍栽培種的菌株時，又另訂 race 5 為新的生理小種。由於生理小種與分化種過於複雜，因此 Bosland 與 Williams 兩氏(1986)⁽⁵⁾根據病原性、營養體親和性、地理分布之寄主來源、生化特性及基因序列等多面向的關係進行比對，重新將十字花科黃

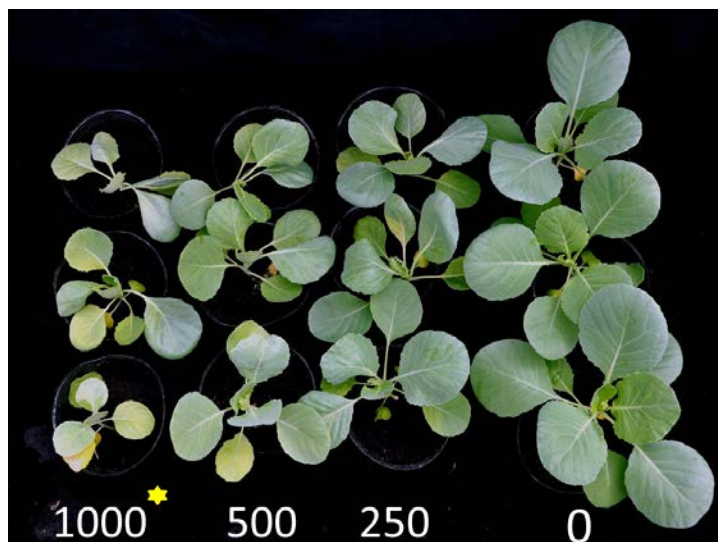
葉病菌分化種及生理小種整理成 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1 及 2, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *mathioli* race 1 及 2。根據 Bosland 與 Williams 兩氏⁽⁵⁾的研究結果，台灣發生的甘藍黃葉病菌株被歸屬於 race 1。惟本研究發現甘藍黃葉

病之菌株除感染甘藍外，尚可感染芥藍與蕪菁，因此筆者認為台灣的甘藍黃葉病菌可否直接歸屬於 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1 或需要重新訂定新的分化種，確實有值得進一步探討的必要性。



圖六、甘藍黃葉病菌接種源濃度與甘藍植株發病率間的關係(移植後 21 天之結果)。

Fig. 6. Effect of inoculum densities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* FOC-YL08 on disease incidence and disease severity of cabbage plants grown in the infested media at 21 days after transplanting.



圖七、甘藍黃葉病菌不同接種源濃度對甘藍植株發病的影響 (接種第 21 天的結果)。

Fig. 7. Effect of inoculum densities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* FOC-YL08 on disease severity of cabbage plants grown in the infested medium 21 days after transplanting.

* : inoculum densities (cfu/ml medium).

誌謝

本研究承 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局科技計劃 [101 農科-10.2.4-檢-B3(3)] 部分經費補助，始得順利進行，特誌謝忱。

引用文獻(LITERATURE CITED)

1. Armstrong, G. M. and Armstrong J. K. 1952. Physiologic races of *Fusaria* causing wilts of the Cruciferae. *Phytopathology* 42: 255-257.
2. Armstrong, G. M. and Armstrong, J. K. 1966. *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* : race4, new race ; and a new host for race1, *Lychnis chalconica*. *Phytopathology* 56: 525-530.
3. Baker, K. F. 1948. *Fusarium* wilt of garden stock (*Mathiola incana*). *Phytopathology* 38: 399-403.
4. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
5. Bosland, P. W., and Williams, P. H. 1986. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* 65: 2067-2073.
6. Council of Agriculture, Executive Yuan. 2010. Agricultural statistics yearbook. Taipei city: Council of Agriculture, Executive Yuan. 115 pp.
7. Huang, H. and Hong, L. 1988. Description and illustration in color of vegetables in Taiwan. Department of Horticulture, National Taiwan University. 210 pp.
8. Joseph, C. G. 1916. Cabbage yellows and the relation of temperature to its occurrence. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 3: 25-84.
9. Kim, S. H., Uzunovic, A. and Breuil, C. 1999. Rapid Detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in Stained Wood by PCR. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65: 287-290.
10. Kendrick, J. B. 1930. Kale yellows in California caused by *Fusarium conglutinans* Wollenw. *Hilgardia* 5: 1-15.
11. Kendrick, J. B., and Snyder, W. C. 1942. *Fusarium* wilt of radish. *Phytopathology* 32: 1031-1033.
12. Lo, C. T., and Sun, S. K. 1986. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolated from cruciferous vegetable in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 28: 213-223. (in Chinese with English abstract).
13. 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.
14. Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, USA.
15. Pound, G. S., and Fowler, D. L. 1951. A *Fusarium* wilt of radish in Wisconsin. *Phytopathology* 41: 30. (Abstract).
16. Ramirez-Villupadua, J., Endo, R. M. Bosland, P., and Williams, P. H. 1985. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that attacks cabbage with type A resistance. *Plant Dis.* 69: 612-613.
17. Smith, E. F. 1899. The fungus infestation of agricultural soils in the United States. *Scientif. American, Suppl.* 48: 19981.
18. Snyder, W. C., and Hansen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27: 64-67.
19. Sun, S. K. 1975. Ecology of pathogenic *Fusaria* in soil. *Plant Prot. Bull.* 17: 216-232. (in Chinese with English abstract).
20. Screenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A. E., and Mills, P. R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol.* 45: 650-655.
21. Toussoun, T. A., and Nelson, P. E. 1968. A Pictorial Guide to the Identification of *Fusarium* Species According to the Taxonomic System of Snyder and Hansen. Pennsylvania State University Press, University Park, USA. 51 pp.

22. Walker, J. C., and Wellman, F. L. 1928. A survey of the resistance of subspecies of *Brassica oleracea* to yellows (*Fusarium conglutinans*) Jour. Agr. Res.(USA) 37: 233-241.
23. Wollenweber, H. W., and Reinking, O. A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. P. Parey, Berlin.
24. White, T., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. PCR protocol. pages 315-322 in: Inns MA, Gelfand, D., Sninsky, J., and White, T. (eds) Academic press. New York. USA.

ABSTRACT

Chuang, M. K., Li, S.Y., and Huang, J. W.* 2012. Identification for the causal agent of cabbage yellows in Taiwan and its pathogenicity on cruciferous vegetable crops. Plant Pathol. Bull. 21: 29-38. (Department of Plant Pathology; *Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22851676)

Recently, cabbage yellows became severe in central Taiwan during summer season. The causal agent of cabbage yellows was isolated from diseased plants and infested soil. In this study, fifteen isolates FOC-JR01~06 and FOC-YL01~09 were obtained, and identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wollenweb.) W. C. Snyder and H. N. Hansen according to their pathogenicity test, morphological, and molecular characteristics. Pathogenicity test showed that isolates FOC-JR01 and FOC-YL08 had virulence on cabbage (cv. Summer Summit), Chinese kale (cv. Wai-Chun) and turnip (cv. Tsugaru-Beni). On potato dextrose agar, isolates FOC-JR01 and FOC-YL08 grew well at 24-32°C, but optimal at 28°C. Their colonies are white then turn to purple color under 12hr-light per day and produce orange sporodochia. The pathogen is able to produce microconidia, macroconidia and chlamydospores. Microconidia produced abundantly from monophialides only in false heads, one-celled, hyaline, elliptical to allantoid, $6.1 \sim 13.9 \times 1.4 \sim 6.4 \mu\text{m}$ (ave. $10.0 \times 3.9 \mu\text{m}$). Macroconidia produced from monophialides, hyaline, sickle-shaped, 2-4 septate (mostly 3-septate), $7.9 \sim 33.3 \times 1.0 \sim 6.4 \mu\text{m}$ (ave. $20.6 \times 3.7 \mu\text{m}$). Chlamydospores formed mostly in hyphae, terminal or intercalary, spherical to ovoid, $4.7 \sim 13.5 \times 4.6 \sim 14.3 \mu\text{m}$ (ave. $9.10 \times 9.45 \mu\text{m}$). The disease incidences of cabbage plants in the infested media at population densities of 10^3 , 10^4 , and 10^5 (cfu/ml medium) were 33%, 83%, and 86%, respectively at 28 days after sowing seeds. However, the disease incidences of cabbage plants grown in the infested media at population densities of 250, 500, and 1000 (cfu/ml medium) were 93%, 100%, and 100%, respectively; and the disease severities were 47%, 71%, and 76%, respectively at 21 days after transplanting 21-day-old seedlings in the greenhouse.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, Chinese Kale, Pathogenicity, Turnip