台灣廣葉杉萎凋病相關長喙殼菌之鑑定

林宗俊1 黄振文1,2 谢文瑞1

1台中市 國立中興大學植物病理學系

2 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92 年1 月23 日

摘要

林宗俊、黄振文、謝文瑞.2003.台灣廣葉杉萎凋病相關長喙殼菌之鑑定.植病會刊12:33-42.

民國 91 年夏天,台灣中部多處林地,包括北埔、卓蘭、東勢、和平、仁愛、埔里、魚池、水里 及阿里山地區之廣葉杉相繼出現萎凋枯死的現象。由杉木罹病植株分離到五個代表性菌株,完成柯霍 氏法則試驗後,確定病原性。然後依照各菌株的無性世代種類與產孢方式及有性世代的形態等特性進 行系列鑑定工作,結果發現本菌有兩種無性世代,其一是*Pesotum* sp.,具孢柄束(synnemata),由分 生孢子柄群聚成帚狀 (penicillate),黑色直立,分生孢子柄之產孢點呈小鋸齒狀突起 (denticulate),以 全芽生方式(holoblastic) 產泡,分生孢子橢圓形、單泡、無色透明,大小1.7-2.1×3.5-6.1 μm,具黏 性,於孢柄束頂端聚集呈頭狀;其二是*Sporothrix* sp., 菌絲白色,分生孢子柄直立,單一或有分枝, 產孢點位於分生孢子柄之頂端或沿分生孢子柄呈螺旋狀分布(sympodial),有小鋸齒狀突起,以全芽 生方式產泡,分生孢子鏈生,分生孢子橢圓形或不規則形、單泡、無色透明,大小1.8-2.5×3.3-5.5 μm。 至於本菌的有性世代,主要特徵是子囊殼黑色,球形(110-130 μm),具有長喙(710-1625 μm)及孔口 菌絲(ostiolar hyphae),著生於植物組織表面;子囊孢子腎形或橢圓形,大小2.1-2.8×4.3-5.3 μm。本 菌屬於異絲型,多種植物材料可誘使其產生子囊殼。本菌對 Cycloheximide 反應不敏感、細胞壁含有 纖維素 (cellulose), 故將其歸類為 Ophiostoma piceae complex。利用 Nucleotide BLAST (NCBI) 比對 GenBank 登錄之長喙殼菌菌株核酸序列,結果發現本菌與 O. querci 具有 99% 的相似度,而與 O. piceae 亦有98%的相似度。進一步,研究各菌株在麥芽抽出物培養基生長時,發現菌落形態出現同心 輪紋,且均可在32℃的溫度生長。綜合上述諸特性,台灣廣葉杉萎凋病之病原菌建議歸於O. piceae complex 之 O. querci。

關鍵詞: 廣葉杉、廣葉杉萎凋病、長喙殼菌、Ophiostoma piceae complex、Ophiostoma querci、ITS 序列

緒 言

杉木 [*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. var. *lanceolata*] 俗稱福州杉、廣葉杉,屬於杉科(*Taxodiaceae*), 杉木屬 (*Cunninghamia* R. Br.)。原產於中國大陸,台灣普 遍栽植於海拔 500-1800 公尺地區。常綠喬木,幹通直, 葉長鐮刀形,質硬刺手,材質輕軟,以種子或萌芽更新方 式進行繁殖,其輪伐期為三十年。它的主要用途係作為建 築、傢具及裝潢之用⁽²⁾。民國91 年夏天,台灣中部多處 林地的廣葉杉相繼出現萎凋枯死的現象。在罹病的杉木樹 幹佈滿許多小蠹蟲科甲蟲(*Crypturgus* spp.)的孔洞。削開 樹皮後,可發現甲蟲取食的孔道,並有母甲蟲在孔道側的 小室產卵,孵化的幼蟲繼續向孔道兩側取食,形成魚骨狀 之孔道,該甲蟲取食的孔道形態頗似荷蘭榆樹立枯病之病 媒甲蟲的取食孔道。幼蟲在孔道末端蛹化後,蛻變成成 蟲,隨後由樹皮的羽化孔鑽出,在羽化孔處有大量樹脂流 出的痕跡(圖一)。罹病杉木最初在杉木枝條基部葉片出現 黃化的病徵,隨後葉片轉紅褐色,病勢逐漸向枝條末端擴 展。病徵可同時發生在單一或許多枝條上,最後整株杉木 呈現萎凋枯死的症狀。剝開罹病植株的樹皮,可以發現邊 材表面有不規則的黑色或褐色線紋。在樹幹的橫切面可以 觀察到維管束出現連續或不連續的變色塊斑,呈深褐色; 在心材部分亦出現不規則褐變的情形⁽¹⁾(圖一)。在甲蟲取 食孔道可發現少量類似長喙殼菌(Ophiostomatoid fungi)之 子囊殼及許多類似孢柄束之無性產孢構造,且由罹病植 株、甲蟲蟲體及糞便皆可分離到該菌的兩種無性世代。本 文主要目的在於探討本病害之病原菌形態、生理、菌株性 親和性及其DNA 之分析,祈有助於鑑定其歸屬。



圖一、(A)廣葉杉萎凋病在台灣林地發生,(B、C)小蠹蟲科昆蟲之取食孔道及羽化孔,(D)邊材表面有不規則的黑色或褐 色線紋,(E)樹脂由甲蟲之羽化孔流出,(F)樹幹的橫切面:維管束及心材出現褐變的情形(G)樹幹的縱剖面:沿維管束褐 化,(H、I及J)小蠹蟲科甲蟲(*Crypturgus* spp.)成蟲及蛹。

Fig. 1. (A) Chinese fir wilt occurred in Taiwan, (B, C) the galleries and holes made by the bark beetles (*Crypturgus* spp.), (D) the sapwood of infected stem appeared discoloration or mottling, (E) resin extruded, (F, G) discoloration of the diseased wood, (H, I, and J) the adult bark beetle and pupae of *Crypturgus* spp. Scale bar = $250 \mu m$.

材料與方法

供試菌株來源

自苗栗縣桌蘭鎖、台中縣東勢鎖、南投縣埔里鎮之租 地造林地及國有林班地採取罹病之廣葉杉組織,經1% (v/v)次氯酸鈉(NaOCl)水溶液表面消毒30秒後取出,以 無菌水漂洗三次,隨即置於2%(w/v)水瓊脂培養基(water agar, WA)平板上進行組織分離,待其產孢後挑取單一孢 子移置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(potato dextrose agar, PDA)斜面培養,由各地選取5個代表性菌株,代號分別為OPH-102、-103、-106、-110與-210供本試驗各項研究用。

病原性測定

將 OPH-102、-103、-106、-110 與-210 等菌株分別培 養於 PDA 斜面,在室溫中(24-25℃)培養 14 天後,刮取分 生孢子,以無菌水製成孢子懸浮液(10⁵ conidia/ml)備用。 自台中縣八仙山苗圃取得廣葉杉苗(二年生),植株枝條先 經表面消毒後,以滅過菌之解剖刀割傷枝條,以微量分注 器吸取2ml孢子懸浮液滴加於傷口處,隨後以無菌之脫脂 棉花及石蠟膜包裹枝條傷口,並以滴加無菌水作為對照, 每處理有三重複。

病原菌之鑑定

由罹病枝幹上甲蟲取食孔道觀察到類似長喙殼菌之子 囊殼及孢柄束 (synnemata) 之無性產孢構造,懷疑病原菌 為 Ceratocystis sp.或 Ophiostoma sp.;由於兩者間的主要差 別在於無性世代之產孢構造、對 Cycloheximide 之敏感 性、細胞壁之組成分、子囊果內子囊形成的位置、寄主種 類及傳播途徑等;因此本文進行比較菌株對 Cycloheximide 之敏感性、分析細胞壁成分及檢查無性世代之產孢構造 等,藉以鑑定各菌株是否為 Ceratocystis 屬或是 Ophiostoma 屬。

對Cycloheximide 之敏感性

將分離到之菌株(OPH-102、-103、-106、-110與-210 菌株)先行培養在2%(w/v)麥芽抽出物培養基(malt extract agar, MEA)平板上,七天後沿菌絲邊緣以打孔器切取7 mm之菌絲塊,隨後移置於含有100ppm Cycloheximide之 MEA 培養基平板上⁽¹³⁾,在室溫(24-25°C)培養,七天後觀 察各菌株生長的情形。

細胞壁中纖維素的萃取與分析

將長喙殼菌 OPH-102、-103、-106、-110 與 -210 等菌 株,分別單孢培養於PDA 斜面,在室溫中(24-25℃)培養 14 天後,刮取分生孢子,以無菌水製成孢子懸浮液(10° conidia/ml)。取5ml 孢子懸浮液加入裝有200ml 馬鈴薯葡 萄糖瓊脂液態培養基 (potato dextrose both, PDB) 之 500 ml 三角燒瓶中,在室溫(24-25°C)中靜置培養14天後,收集 各菌株之菌絲,並以蒸餾水洗去殘留於菌體之培養基;然 後將菌絲保存在95% (w/v) 酒精 (ethanol) 中備用。依據 Michell 及 Scurfield 氏(1970)⁽¹⁰⁾ 分離菌絲細胞壁成分的方 法萃取纖維素:首先以沸水(100℃)處理菌絲,隨後再以 甲醇(置於100℃水浴槽中)除去菌絲上的脂質(lipid),接 者以3% (w/v) 氫氧化鈉處理菌絲6 小時(100°C),去除蛋 白質,隨後再以史懷哲試劑 10 ml (Schweitzer's reagent, 50 g Cu (OH)₂+300 ml strong ammonium hydroxide) 處理菌 絲 5-10 分鐘, 取其浸出液再以稀鹽酸 (1 N HCl) 滴定酸化 處理,將反應後的沉澱物包埋在溴化鉀圓盤中,並將圓盤 移置於遠紅外光分光儀 (Perkin-Elmer 457) 中測取讀値; 另外亦按上述方法處理棉花作為對照。

溫度對菌絲生長的影響

將本菌 OPH-110 與 OPH-210 兩菌株先行單孢培養在 MEA 平板上,七天後沿菌絲邊緣以打孔器切取 7 mm 之菌 絲塊,移置於新的 MEA 培養基上,然後分別將接種菌絲 塊的培養基平板置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36℃ 之定溫箱中,培養 7 天後,量取菌絲生長直徑,其中每一 溫度處理有四重複。

無性世代之產生

將本菌分離之菌株單孢培養在 MEA 平板上,於室溫 (24-25℃)中培養,每天光照12 小時(間接日光或2 支40W 日光燈約2000-3000 Lux),培養 3-7 天後,利用光學顯微 鏡觀察本菌分生孢子之形態及產孢方式。

有性世代之產生與性親和試驗

將銀杏 (Ginkgo biloba L.)、 鳳仙花 (Impatiens walleriana Hook. f.)、金露華 (Duranta repens L.)、菩堤 (Ficus religiosa L.)、芒果 (Mangifera indica L.)、烏心石 [Michelia compressa (Maxim.) Sargent]、鳳尾蕨 (Pteris multifida Poir.)、羅漢松 [Podocarpus macrophyllus (Thunb.) D. Don]、朱槿 (Hibiscus rosa-sinensis Linn.)、八角楓 [Alangium platanifolium (Sieb. & Zucc.) Harms]、馬拉巴栗 (Pachira macrocarpa Schl.)、瑪瑙珠(Solanum capsicastrum Link.)、阿勃勒(Cassia fistula L.)、玉米(Zea mays L.)、茄 苳(Bischofia javanica Blume)、青剛櫟[Cyclobalanopsis glauca (Thunb.) Oerst]、血桐[Macaranga tanarius (L.) Muell.-Arg.]、柚子 (Citrus grandis Osbeck)、香椿 [Toona sinensis (Juss.) M. Roem.)、使君子 (Quisqualis indica L.)、 山蘇 (Asplenium antiquum Makino)、肉桂 (Cinnamomum cassia Blume)、香蕉 (Musa sapientum L.)、白飯樹 [Flueggea suffruticosa (Pallas) Baillon]、流疏樹 [Chionanthus retusus Lindl. & Paxton var. serrulatus (Hayata) Koidz.]、鐵刀木 (Cassia siamea Lam.)、構樹 [Broussonetia papyrifera (L.) L'Herit. Ex Vent.]、草莓 (Fragaria chiloensis Duch. var. ananassa Hort.) 等植物葉片 及杉木樹皮、杉木邊材、蟲糞、胡蘿蔔 (Daucus carota L. var. sativa DC.) 切片、稻桿 (Oryza sativa L.)、甘蔗 (Saccharum sinensis Roxb.) 切片與甘蔗渣經高溫高壓(121 ℃, 15 lb, 15 min) 滅菌後, 置於含有 100 ppm Cycloheximide 之 MEA 培養基平板上。隨後取 20 µ1 含有 不同菌株之分生孢子懸浮液滴在植物組織邊緣,於室溫 (24-25℃)培養,逐日觀察是否產生有性世代。

為鑑定本病原菌是否為同絲型或是異絲型,將香蕉葉 切成小片經高溫高壓滅菌後,置於含有100 ppm Cycloheximide之MEA 培養基平板上。隨後取10 µ1 不同 菌株之分生孢子懸浮液滴在香蕉葉片兩側,即將 OPH- 102、-103、-106、-110與-210等5菌株,雙雙相互配對。 在室溫培養3天後,於每一培養皿中加入5ml 無菌水搖 晃,隨即將液體倒掉,並於無菌操作台吹乾,以石蠟膜封 閉皿蓋,移置於8、12、16、20、24、28、32及36℃之 定溫箱中培養。每天取出供試皿置於解剖顯微鏡下,觀察 有無有性世代的產生,其中每一處理有三重複。

核酸序列之分析

由於核糖體轉錄外區間(internal transcribed spacer, ITS)的核酸序列具高度之保留性,可供菌類分類之依據, 因此本研究萃取病原菌之去氧核糖核酸,進行聚合酵素連 鎖反應及核酸序列解序,並將所得之 ITS 核酸序列利用 Nucleotide BLAST (NCBI)與GenBank 登錄之長喙殼菌核 酸序列進行比對,藉以佐証形態分類之正確性。

去氧核糖核酸之萃取

取 5 ml 孢子懸浮液(10^5 conidia/ml) 加入裝有 200 ml PDB 之 500 ml 三角燒瓶中,於室溫中靜置培養。14 天後 收集其菌絲,並以無菌水洗去殘留之培養基,利用紙巾將 菌絲中殘餘之水分吸乾。取乾燥之菌絲置於預冷之研缽 中,加入適量之液態氮磨碎,在樣品將液化之時,加入 15 ml TNE buffer (1 M Tris-HCl , pH8.0, 10 ml; 0.5M Na₂EDTA , pH8.0 , 10 ml ; NaCl , 2.92 g ; 10 mM β mercaptoethanol, 79 µ1;加去離子水至100 ml)及1 ml 20% (w/v) SDS 充分混合。將粗萃取液倒入離心管(Oak Ridge tube) 中,置於65℃水浴槽中反應,並不時搖晃均 匀。10分鐘後粗取液加入5ml 5M KOAc (potassium acetate) 溶液,溫和地充分混合,置於碎冰中20分鐘。以 15,000 rpm,在4℃,離心20分鐘,取上清液置於新的離 心管中,並加入 10 ml 已預冷之 isopropanol 溫和地均匀摇 晃,再離心(15,000 rpm,4℃)20分鐘使核酸沉澱後,並 以70% (w/v) 酒精清洗二次後吹乾。取1.2 ml 0.1×TE buffe 溶解核酸後,加入1 µl RNase (µg/µl),置於37℃水浴槽 中 30 分鐘。取 400 µ1 溶有核酸 0.1 ×TE buffer 置入 1.5 ml 之 eppendorff 並加入等體積之 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v), 溫和地搖晃至渾濁狀, 以14,000 rpm,在4℃,離心10分鐘。將上清液吸出移置新的 eppendorff 中, 並加入 chloroform-isoamyl alcohol (24:1 v/v) 再溫和地搖晃均匀,並再離心(14,000 rpm,4℃) 10 分 鐘。小心吸出上清液至另一新的 eppendorff 中,以0.1× TE buffer 將體積調整至400 µ1 並加入40 µ1 之3 M NaOAc (sodium acetate) 溶液,溫和地搖晃均匀,然後加入1ml 100% (w/v) 酒精混合均匀後,移置於-20℃冰箱20分鐘。 接著以14,000 rpm,在4℃,離心5分鐘,倒掉上清液,又 以70% (w/v) 酒精清洗二次後吹乾,並真空乾燥3分鐘; 最後加入 $0.1 \times TE$ buffer 400 μl ,待核酸完全溶解後,保 存在-20℃備用。

聚合酵素連鎖反應及核酸序列解序

將前一步驟純化之核酸,利用 GeneQuant Pro (Amersham pharmacia biotech, Hong Kong) 測量波長在260 nm 及 280 nm 的吸收值, 測得核酸的濃度, 並將其濃度調 整至100 ng/μl,即為PCR 反應所需的模板(template) DNA 濃度。PCR 反應所需之引子對為 Gardes 及 Bruns 氏 (1993)⁽⁶⁾利用來增幅核糖體轉錄外區間(ITS)之ITS1-F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 及 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反應混合液包含 100 ng 模板 DNA, 2.5 units Taq DNA polymerase (MDBio Inc., Taiwan) , 1X PCR reaction buffer (MDBio Inc., Taiwan) , 1.5 m M MgCl2 (MDBio Inc., Taiwan) , 200 µM DNTPs (GeneMark Technology Co., Ltd., Taiwan) , 5% (v/v) DMSO, 0.50 µM primer 及dH₂O,反應總體為100 µ1。 PCR反應的條件為:(1)95℃95秒,1回合(cycle);(2)95℃ 35秒,52℃40秒,72℃2分鐘,共35回合;(3)72℃10分 鐘,1回合。PCR 反應的產物利用膠體電泳分離後,以gel elution kits 純化之。最後送至國立中興大學生物科技發展 中心,利用ABI PRISM 377 DNA sequencer 進行定序。

結 果

病原性與屬之鑑定

本研究所收集之 OPH-102、-103、-106、-110 與 -210 菌株接種於二年生廣葉杉苗,3天後,接種周圍陸續出現 葉片黃化的病徵,直到第14天,整個枝條即呈現萎凋的 現象。將感染的枝條重新再進行分離鑑定工作,確定五個 代表性菌株均具有病原性。又利用史懷哲試劑 (Schweitzer's reagent)處理五菌株菌絲後,隨後取它們的浸 出液以稀鹽酸酸化產生沈澱物,再將其包埋在溴化鉀圓盤 中,以遠紅外光分光儀,測取讀値。結果各菌株所得之光 譜與棉花之 cellulose II 進行比對,發現兩者之光譜相符(圖 二),確定各菌株的細胞壁中含有 cellulose。此外觀察各菌 株的無性世代,發現以全芽生方式 (holoblastic) 產孢,且 均可在含有 Cycloheximide 之培養基中生長,因此確認本 菌的屬名為 Ophiostoma。

溫度對菌絲生長的影響

本菌 OPH-110 與 OPH-210 菌株在 8-32℃ 皆可以生 長。兩菌株在 8-20℃ 間,菌絲生長隨溫度上升而逐漸增 加,當溫度超過 24℃ 時,菌絲生長速度呈現下降的趨勢 (圖三)。顯示本菌最適生長溫度為20-24℃。

無性世代及有性世代之形態鑑定

由罹病植株可以分離到 Pesotum sp., 具孢柄束



圖二、Ophiostoma querci (OPH-110 菌株) 細胞壁成分的分析,其光譜與Cellulose II 相符。 Fig. 2. Spectrum of residue derived from the cell walls of Ophiostoma querci (isolate OPH-110) is identical with that of cellulose II from cotton.



圖三、溫度對 Ophiostoma querci (OPH-110 & OPH-210 菌株) 在2% (w/v) 麥芽抽出物培養基平板上生長的影響。 Fig. 3. Effect of temperatures on mycelial growth of Ophiostoma querci (isolates OPH-110 & OPH-210) on 2%(w/v) malt extract agar plates for 7 days.

(synnemata) 由分生孢子柄群聚成帚狀 (penicillate),黑色 直立,分生孢子柄之產孢點呈小鋸齒狀突起,以全芽生方 式 (holoblastic) 產孢,分生孢子橢圓形、單孢、無色透 明,大小1.7-2.1×3.5-6.1 µm,具黏性可於孢柄束頂端聚 集呈頭狀^(11,14);同時也可分離到 *Sporothrix* sp.,其菌絲白 色,分生孢子柄直立,單一或有分枝,產孢點位於分生孢 子柄之頂端或沿分生孢子柄呈螺旋狀分布,有小鋸齒狀突 起,以全芽生方式 (holoblastic) 產孢,分生孢子鏈生,橢 圓或不規則形、單孢、無色透明,大小1.8-2.5×3.3-5.5 μ m,形態頗似*Cladosporium* spp.^(3,4)。在甲蟲取食孔道可發 現長喙殼菌(Ophiostomatoid fungi)子囊殼的存在,其特 徵為子囊殼黑色,球形(110-130 μm),具有長喙(710-1625 μm)及孔口菌絲(ostiolar hyphae),著生於植物組織表面, 子囊孢子腎形或橢圓形,大小2.1-2.8×4.3-5.3 μm (圖 四)。此外,本菌在MEA 培養基上生長時,菌落具同心輪 紋特徵,並且產生特殊之氣味。



圖四、廣葉杉萎凋病之病原菌:有性世代(A)取食孔道中長喙殼菌之子囊殼,(B)子囊殼長喙之孔口菌絲,(C)子囊孢子;無性世代(D)Pesotum sp.之孢柄束,(E)分生孢子柄之產孢點呈小鋸齒狀突起,(F)Pesotum sp.之分生孢子(G、H)Sporothrix sp.之產孢情形,(I)Sporothrix sp.之分生孢子。

Fig. 4. The causal agent of Chinese fir wilt. (A) Perithecium, (B) Ostiolar hyphae, (C) Ascospores, (D) Synnemata, (E, F) Conidiophores and conidia of *Pesotum* synanamorph (G, H, and I) Conidiophores and conidia of *Sporothrix* synanamorph. Arrows in E, G and H indicate apex of conidiogenous cells, showing prominent denticles. Scale bars:A=140 μ m; B=15 μ m; C=5 μ m; D=50 μ m; E=10 μ m; F=10 μ m; G=10 μ m; H=5 μ m; I=10 μ m.

三十五種植物材料經高溫高壓滅菌後,置於含有100 ppm Cycloheximide之MEA 培養基平板上,隨後接種不同 菌株之分生孢子懸浮液,發現大多數的植物材料都可以誘 使 Ophiostoma sp.產生子囊殼,其中 Ophiostoma sp.在香 蕉、銀杏、芒果、阿勃勒、茄苳、鐵刀木等植物葉片可以 產生大量有性世代之子囊殼;在杉木樹皮、杉木邊材、菩 堤、馬拉巴栗、玉米、甘蔗渣、稻桿、草莓僅會產生少量 的子囊殼。至於在羅漢松、八角楓、甘蔗切片及瑪瑙珠則 未觀察到子囊殼之產生。

菌株之性親和性

將OPH-102、-103、-106、-110及-210等五菌株雙雙 配對於培養基上的香蕉葉片兩側,於室溫中培養。OPH-103及OPH-110菌株分別可與OPH-102、OPH-106及 OPH-210菌株配對產生有性世代;但OPH-103與OPH-110兩者無法配對產生有性世代,另外OPH-102、OPH-106及OPH-210菌株彼此間亦無法兩兩配對產生(表一)。 OPH-106及OPH-110菌株配對7天後,即可產生子囊殼, 其餘可相互配對之菌株,在14天後方可產生子囊殼。歸 納上述結果,顯示本病原菌係屬於異絲型(heterothallic)。

溫度對有世性代產生的影響

將OPH-110與OPH-106 菌株配對後,置於不同溫度 之定溫箱中,發現培養在 8-24℃ 皆可產生子囊殼。成熟 子囊殼之數量隨溫度上升而逐漸增加,當溫度超過 20℃ 時,子囊殼之產生即逐漸減少。在 20 與 24℃ 培養兩菌株 7-10 天後,即可產生子囊殼,子囊殼產生的最適溫度為 20℃(圖五)。

聚合酵素連鎖反應及核酸序列解序

本菌純化後之PCR 產物,經過國立中興大學生物科

表一、由廣葉杉萎凋病株分離之*Ophiostoma querci*五個菌株歸併成兩配對型

Table. 1. Five isolates of *Ophiostoma querci* obtained from diseased plants of Chinese fir wilt were divided into two mating types

Isolates	Perithecium formation							
	OPH-102	OPH-103	OPH-106	OPH-110	OPH-210			
OPH-102	01	+	_	+	_			
OPH-103	+	0	+	—	+			
OPH-106	_	+	0	+	_			
OPH-110	+	_	+	0	+			
OPH-210	_	+	_	+	0			

^{1.} +, perithecia formed in a pairing; -, or 0, no perithecium formation.



圖五、溫度對 *Ophiostoma querci* (OPH-110 & OPH-106 菌 株) 有性世代產生的影響(配對28 天後)。 **Fig. 5.** Effect of temperatures on the production of perithecia

of *Ophiostoma querci* (isolates OPH-110 & OPH-106) on 2%(w/v) malt extract agar plates with banana leaf for 28 days.

技發展中心利用 ABI PRISM 377 DNA sequencer 進行定 序,証明台灣廣葉杉罹病株收集到的 OPH-102、-103、-106、及 -110 各菌株間之核糖體轉錄外區間之核酸序列 (ITS sequence) 具有 99% 的相似度(圖六);利用 Nucleotide BLAST (NCBI) 比對 GenBank 登錄之長喙殼菌核酸序列, 結果發現其與 O. querci (AF198238、AF198239、 AF211839 及 AF211841, GenBank) 具有 99% 的相似度, 而與 O. piceae (AF211843 及 AF211845, GenBank) 亦有 98% 的相似度。

討 論

由廣葉杉萎凋病罹病株分離到五個代表性菌株,依據 其以全芽生方式(holoblastic)產孢的無性世代、對 Cycloheximide 不敏感性、細胞壁組成分中含有纖維素 (cellulose),確有別於*Ceratocystis*屬,因此認定本病原菌 屬於*Ophiostoma*屬。再依據本菌有性世代子囊殼顏色、 具有口喙及孔口菌絲、子囊孢子腎形或橢圓形及有 *Pesotum* sp.與*Sporothirx* sp.兩種無性世代及寄主種類 ⁽¹³⁾,將本病原菌歸類為*Ophiostoma piceae* complex (表 二)。由於*O. piceae* complex 同時擁有*Pesotum* sp.與 *Sporothrix* sp.兩種無性世代,故有別於*Ophiostoma* 的其 他種如*O. ips、O. perfectum* 及*O. stenoceras*。利用 Nucleotide BLAST (NCBI)比對GenBank 登錄之其他菌株

- 1 AGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAG 50
- 51 TTTTTAACTCCCAACCCTTGCGAACCGTACCCCGTTCTGTTCTCGTTGCT 100
- 101 TCTGGCGGGAGGGGGGGGGGGCGCGTCCTTCGGGGGCGTGCCTCTCTCCCA 150
- 151 GGTCCCTTCGGGGCGCCCGCCAGCGGCCGCGAGCCGCCTGAACCTTTTAT 200
- 251 AACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 300
- 301 ATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGCGAGTCATCGAATCTTTGAACGC 350
- 351 ACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT 400
- 401 CCCCCCTCAGCATACCCTTTGGGTGCGCTGGCGTTGGGGGCTCCTCCGCCC 450
- 451 TCTGTGGCGGCAGGGCCCTCAAAACCAGTGGCGGGCCCGTCTGGTTGGCT 500
- 501 CCGAGCGCAGTACCGAACGCAAGTTCTCTCTCTCGCTCTGCAGCCCCGGT 550
- 551 CGGTGCCCAGCCGTCAAACCGCGCAGGAGGCTCTGCTTGCAGAACCGCCT 600
- 601 CACATTTTTGCAAGGTTGACCTCGGATCAAGTAGGATTACCCGCTGAACT 650
- 651 TAATCATATC

圖六、Ophiostoma querci (OPH-106 菌株) 之核糖體轉錄外區間(ITS) 序列。

Fig. 6. ITS (internal transcribed spacer) sequence of *Ophiostoma querci* (isolate OPH-106). The primers used to amplify the ITS region were ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Scientific name	Telemorph			Anamorph					Host
	base dark	ascopores reniform	ascopore no sheath	two types	dematiaceous	penicillate	sympodial	solitary	Conifer wood
Ophiostoma canum	+	+	+	+	+		annellides	+	+
Ophiostoma clavigerum	+	+	sheath	+	+	+	+	+	+
Ophiostoma davidsonii	+	+	sheath	+	+	+	phialides	+	+
Ophiostoma ips	+		sheath	+	+	+	phialides annellides	+	+
Ophiostoma piceae	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ophiostoma querci	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ophiostoma ulmi	+	+	+	+	+	+	+	+	angiosperm
Ophiostoma novo-ulmi	+	+	+	+	+	+	+		angiosperm

表二、Ophiostoma querci 與相似種之差異簡索

Table 2. Synop	otic key to	similar	species of C	phiostoma (querci
----------------	-------------	---------	--------------	-------------	--------

核酸序列,結果發現本菌與 O. querci 具有99% 的相似 度,而與 O. piceae 亦有98% 的相似度,由於 O. piceae complex (O. piceae、O. canum、O. floccosum、O. setosum、O. querci、O. catonianum、O. ulmi、O. novoulmi 及 O. himal-ulmi) 種間之ITS 序列具有很高的相似度, 因此仍需參考其他生理特性作為鑑定依據。本研究的菌株 可在 32° 、且在 MEA 培養基生長時,菌落形態會出現同 心輪紋⁽⁵⁾,惟O. piceae 並無此兩種特徵。顯然台灣廣葉杉 萎凋病之病原菌比較接近 O. piceae complex 之 O. querci。

660

依據 *O. piceae* complex 的原始寄主,可分為 OPC (coniferous group)與 OPH (hardwood group)兩群。Pipe 氏 等人(1995)⁽¹²⁾利用隨機增幅多型性 DNA (RAPD)分析, 甚至建議將 *O. piceae* complex 之 OPC 與 OPH 兩群分為不 同的種。其中 *O. querci*是歸屬於原始寄主為被子植物 (angiosperm)的 OPH 群。Harrington 等人(2001)⁽⁸⁾認為大 多數的 *O. piceae* complex 原生於北半球,然而 *O. piceae* complex 中之 O. querci 卻在南半球及北美洲的松科 (Pinaceae) 植物上普遍發生,因此推測人類的活動會促使 這些病原菌的分布變得更為廣泛。研究報告指出 O. querci 與 O. himal-ulmi、O. ulmi 及 O. novo-ulmi 的親緣頗爲相 近,是故當它一旦被引進新的生態環境,極有可能引發林 木的新維管束病害,顯然台灣廣葉杉萎凋病的發生,是 O. querci 首次危及杉科(Taxodiaceae) 植物的實証。近年來科 學家常用 PCR 來偵測及鑑定病原菌⁽⁷⁾,惟傳統萃取核酸 的方法過於耗時。直到 1999年,Kim 氏等人⁽⁹⁾利用微波 (700W,5分鐘) 粗萃取菌絲或孢柄束上的孢子之核酸,有 效縮短萃取核酸的時間,若配合應用專一性的引子對與限 制酵素⁽⁸⁾,確可快速偵測木材上的病原菌。筆者等亦嘗試 傳統與微波萃取核酸方法,發現採用前兩者分析廣葉杉萎 凋病病菌,所獲得的 PCR 結果相吻合,顯示此一微波萃 取核酸技術似乎可作爲快速檢測本病害之用。

本研究配對試驗結果,顯示筆者等收集的菌株為異絲型(heterothallic,表一)。目前田間正負配對型分布的實際 情形為何?由於筆者所收集的菌株數量不足,故尙無法下 定論。若將正負配對型菌株培養在植物材料上,發現多種 植物材料均可產生子囊殼,但如將植物材料抽出液(如香 蕉葉)混於培養基中,它們卻幾乎不產生子囊殼(未發表資 料),顯示本菌有性世代之產生與養分,亦或是植材揮發 性氣體是否有關,亦尙待進一步試驗。

謝 辭

本研究承蒙 日本理化學研究所岡田元博士及國立中 興大學昆蟲學系楊正澤博士協助,特誌謝忱。

引用文獻

- 林宗俊、黃振文、謝文瑞. 2002. 台灣長喙殼眞菌類引 起之廣葉杉萎凋病. 植病會刊11:233. (摘要)
- 劉業經、呂福原、歐辰雄. 1988. 臺灣樹木誌. 國立中興 大學農學院出版委員. 台中市. 1019 頁.
- 3. Benade, E., Wingfield, M. J., and Van Wyk, P. S. 1997.

Conidium development in *Sporothrix* anamorphs of *Ophiostoma*. Mycol. Res. 101: 1108-1112.

- 4. Benade, E., Wingfield, M.J., and Van Wyk, P. S. 1998. Conidium development in the *Hyalodendron* and *Allescheriella* anamorphs of *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis*. Mycotaxon 118: 251-263.
- Brasier, C. M., and Stephens, T. M. 1993. Temperaturegrowth responses distinguish the OPC and OPH sibling species within '*Ophiostoma piceae*'. Mycol. Res. 97:1416-14-18.
- Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:113-118.
- Harrington, T. C., and Wingfiled, B. D. 1995. A PCRbased identification method for species of *Armillaria*. Mycologia 87:280-288.
- Harrington, T. C., McNew, D., and Steimel, J. 2001. Phylogeny and taxonomy of *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. Mycologia 93:111-136.
- Kim, S. H., Uzunovic, A., and Brueil C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65:287-290.
- Michell, A. J., and Scurfield, G. 1970. Chitin and cellulose in Ceratocystis cell walls. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:488-491.
- Okada, G., Seifert, K. A., Takematsu, A., Yamaoka, Y., Miyazaki, S., and Tubaki, K. 1998. A molecular phylogenetic reappraisal of the *Graphium* complex based on 18S rDNA sequences. Can. J. Bot. 76: 1495-1506.
- Pipe, N. D., Buck, K. W., and Brasier. C. M. 1995. Genomic fingerprinting supports the separation of *Ophiostoma piceae* into two species. Mycol. Res. 99:1182-1186.
- Wingfield, M. J., Seifert, K. A., and Webber, J. F. 1993. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* : Taxonomy, Ecology and Pathology. APS PRESS, USA. 293pp.
- Wingfield, M.J., Kendrick, B., and Van Wyk, P. S. 1991. Analysis of conidium ontogeny in the *Ophiostoma*: *Pesotum* and *Phialographium* are synonyms of *Graphium*. Mycol. Res. 95: 1328-1333.

ABSTRACT

Lin, T. C.¹, Huang, J. W.^{1,2}, and Hsieh, W. H.¹ 2003. Identification of Ophiostomatoid fungi associated with Chinese fir wilt in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 12:33-42. (^{1.} Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ^{2.} Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon. nchu.edu.tw, Fax: +886-4-22851676)

In the summer of 2002, a large area of the Chinese fir [Cunninghamia lanceolata (Lamb.) Hook. var. lanceolata] in central Taiwan appeared permanent wilting on the leaves of individual branches or of the entire tree. Many holes made by bark beetles (Crypturgus spp.) were observed in diseased tree trunks. Galleries existed in the dead Chinese fir trunk were similar to those made by the European elm bark beetles. The symptoms of Chinese fir wilt initially began with the leaves yellowing from the base of the branches then turned brown, and finally the entire tree died. Upon removal of the bark the sapwood of infected stem appeared discoloration or mottling. In cross section of the stem especially beneath the breeding galleries, the browning appeared as a broken or continuous circle in outer ring of the sapwood and irregular discolored zone in heartwood. Pesotum and Sporothrix species were consistently isolated from diseased tissues and bark beetles and in pathogenicity test they caused leaf yellowing and death of branches on 2-year-old Chinese fir. Perithecia of *Ophiostoma* sp. were also observed in the breeding galleries and sapwood adjacent to the galleries. Perithecia superficial, black, base globose, 110-130 μ m in diameter. Neck straight, cylindrical, 710-1625 µm long, ostiolar hyphae present. Ascospore 1-celled, hyaline, orange section shaped, without sheath, 2.1-2.8 x 4.3-5.3 µm. Pesotum and Sporothrix anamorphs were produced. Pesotum sp., synnemata mostly erect, simple or branched near base, dark brown to black, conidia 1-celled, hyaline, elliptical, 1.7-2.1 x 3.5-6.1 µm, borne on blunt denticles; Sporothrix, conidiophores erect, simple or branched, conidia borne on short, prominent denticles at the tips, or in whorls along the sides of conidiophores, conidia frequently in small clusters, becoming catenulate by acropetal formation of new conidia, chains often branched, 1-celled, hyaline, variable in shape, ovoid to oblong, 1.8-2.5 x 3.3-5.5 μ m. The fungus was insensitive to cycloheximide and contained cellulose. According to the characters described above and its host, the pathogen was identified as a member of *Ophiostoma piceae* complex. Analysis of the ITS sequences revealed that the isolates showed 99% identity to O. querci (AF198238, AF198239, AF211839, and AF211841, GenBank) and showed 98% identity to O. piceae (AF211843 and AF211845, GenBank). The isolates were able to grow at a maximal temperature up to 32°C. The colonies growing on malt extract agar plates not only developed concentric rings, but also produced fancy aroma. Based on the results, it was suggested that the pathogen is named as O. querci in Ophiostoma piceae complex.

Keywords: Chinese fir, Ophiostoma querci, Pesotum, Sporothrix, Bark beetles, ITS sequence.