

研製百合萎凋病菌的鑑別培養基

黃振文^{1,3} 許嘉蘋^{1,2} 陳志弘¹

¹台中市 國立中興大學植物病理學系

²台中市 新民高級中學

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 94 年 4 月 25 日

摘要

黃振文、許嘉蘋、陳志弘. 2005. 研製百合萎凋病菌的鑑別培養基. 植病會刊 14: 103-114.

本文主要的目的在於嘗試研發百合萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*) 的選擇性培養基，以利偵測百合萎凋病菌在種球與土壤中的存活。選擇適當的基礎培養基加入多種微生物抑制劑與調整酸鹼值後，測試它們對百合萎凋病菌生長的影響，結果顯示 Komada 培養基加入 50 ppm(ai) 免賴得可濕性粉劑，並以 10% (v/v) 磷酸調整酸鹼值為 pH4.0 後，所製成之 FLI 培養基，可以有效自百合種球與土壤中偵測出百合萎凋病菌。FLI 培養基可抑制 *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (高苣萎凋病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *niveum* (西瓜蔓割病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *momordicae* (苦瓜萎凋病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *raphani* (蘿蔔黃葉病)、*F. oxysporum* f. sp. *cubense* (香蕉黃葉病)、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (番茄萎凋病) 等病原菌。此外亦可抑制 *F. avenaceum*、*F. camptoceras*、*F. concolor*、*F. dimerum*、*F. graminearum*、*F. subglutinans*、*F. semitectum*、*F. graminum*、*F. reticulatum*、*F. proliferatum*、*F. moniliforme*、*F. merismoides*、*F. lateritium* 及 *F. heterosporum* 等；並可由菌落形態與顏色將 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* 與 *F. poae*、*F. solani*、*F. ventricosum* 區分開。進一步，利用 FLI 培養基自百合栽培田土與病株分離所得之 *F. oxysporum* 菌株接種於百合鱗片球後，證明在 FLI 培養基可生長之 *F. oxysporum* 菌株對百合植株均具有病原性。

關鍵詞：百合萎凋病菌、鏽胞菌、百合、偵測、選擇性培養基

緒言

西元 1942 年 Imle 氏⁽⁵⁾描述百合萎凋病的發生與病徵後，證實它的病原菌是 *Fusarium oxysporum* Schl.:Fr. f. sp. *lilii* Imle。本病原菌可由百合的根部、莖基部或鱗片直接侵入百合植株，感染百合的鱗莖（尤其是鱗莖基部與根相連處）；並可引起土壤中種球的壞疽與崩解，促使植株的下位葉提早黃化、落葉及生長不良，甚至引起全株萎凋死亡^(1, 2, 4, 5, 9, 12, 13)。此外，Bald 氏等⁽²⁾與 McRae 氏⁽¹³⁾指出百合萎凋病菌可在種球與土壤中的植株殘體上存活外，亦可經由種球、土壤、包裝物、栽培介質及機械工具等途徑傳播⁽¹⁶⁾。

往昔研究 *Fusarium* spp. 時，常採用 Nash PCNB 選擇性培養基⁽¹⁴⁾作為分離與偵測的工具，惟運用 Nash PCNB 培養基時，常有不易辨識 *Fusarium* spp. 菌落的

困擾，尤其是針對尖鏽胞菌 (*F. oxysporum*) 的分化種 (forma specialis) 與生理小種 (race)，尚須進行病原性檢定才能加以分辨。西元 1975 年 Komada 氏⁽¹⁰⁾研發 Komada 培養基可以有效分離土壤中尖鏽胞菌；且可由菌落色素與菌落形態，將尖鏽胞菌與其他 *Fusarium* spp. 加以區分開。然而由於 Nash PCNB 與 Komada 兩培養基不易區別百合萎凋病菌，導致偵測百合萎凋病菌在種球與土中的存活時發生困難，因此本研究的主要目的在於研發偵測百合萎凋病菌的選擇性培養基。

材料與方法

供試植株

百合 (*Lilium oriental* hybrid) 之鱗片球 (Acapulco 與 Casa Blanca 品種) 係由台中縣新社鄉行政院農委會種苗

改良繁殖場取得，置於 1 經 4 至 6 個月打破休眠後，供作病原性測試之用。

供試菌株

百合萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lilii* isolates F-16、G-16 及 F401) 係分離自田間百合罹病植株，並確定其對百合具有病原性⁽¹⁶⁾。此外萵苣萎凋病菌 (*F. oxysporum* Schl:Fr. f. sp. *lactucae* Matuo et Motohashi isolates LFO3214 與 FOL1112)、西瓜蔓割病菌 (*F. oxysporum* Schl:Fr. f. sp. *niveum* Snyder & Hansen isolates NCHU4581 與 FNH0103)、苦瓜萎凋病菌 *F. oxysporum* Schl:Fr. f. sp. *momordicae* Sun & Huang isolate MFO005)、蘿蔔黃葉病菌 (*F. oxysporum* Schl:Fr. f. sp. *raphani* Kendrick & Snyder isolate FOR4566)、香蕉黃葉病菌 (*F. oxysporum* Schl:Fr. f. sp. *cubense* Snyder & Hansen isolate BFO0310)、番茄萎凋病 (*F. oxysporum* Schl:Fr. f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen isolates FOL11B 與 FOL13B)、無病原性 *F. oxysporum* Schl:Fr. isolate F403 及 *F. avenaceum* (Corda ex Fr.) Sacc. (NCHU6362)、*F. camptoceras* Wollen. & Reinking (NCHU5151)、*F. concolor* Reinking (NCHU5681)、*F. culmorum* (Smith) Sacc. (NCHU6161)、*F. dimerum* Penzig (NCHU3434)、*F. graminearum* Schwabe (NCHU5913)、*F. graminum* Corda (NCHU5945)、*F. heterosporum* Nees ex Fr. (NCHU6161)、*F. lateritium* Nees (NCHU3051)、*F. merismoides* Corda (NCHU5331)、*F. moniliforme* Sheldon (NCHU0024)、*F. poae* (Peck) Wollenw. (NCHU3580)、*F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (NCHU0037)、*F. reticulatum* Mont. (NCHU6965)、*F. semitectum* Berk. & Rav. (NCHU5003)、*F. solani* (Mart.) Sacc. (NCHU3381)、*F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson (NCHU0052)、*F. ventricosum* Appel & Wollenw. (NCHU4073) 等 28 個鐮胞菌菌株均是本研究室保存的菌種。

人工病菌土的製作

將百合萎凋病菌 F16 和 G16 菌株培養於 PDA 斜面上 2 星期後，刮取孢子移入無菌水中製成孢子懸浮液，隨後注入高溫高壓滅菌過之芹菜 (除去芹菜葉後，以蒸餾水洗淨晾乾後，將莖部切成 3—4 cm 的片段，盛於三角燒瓶內) 培養基中，培養 4 星期後，拌入間歇消毒 (在蒸汽消毒釜，100 °C，15 min，間歇消毒三次) 過之土壤 [土壤：砂 = 3 : 1 (v/v)] 中，並加入無菌水使含水量達 10 到 15% (w/w)，混拌均勻後，置於陰涼處

4 星期即成為供試病菌土。土中菌量測定法：取陰乾揉碎過的人工病菌土，秤取 5 g 加入 50 ml 的無菌水中，均勻振盪並靜置至土壤等大顆粒沉澱後，取上層液進行 10 倍序列稀釋，並各取 0.1 ml 稀釋液均勻塗佈於 Nash PCNB 培養基平板上，在室溫下，5 天後計算平板上之菌落數，進而推算病菌土的菌量濃度。

基礎培養基的選擇

選取研究者用於培養或分離 *Fusarium* spp. 的培養基，如 Nash PCNB⁽¹⁴⁾、Papavizas PCNB⁽¹⁵⁾、Komada⁽¹⁰⁾、Tochinai solution⁽⁸⁾、Bilal⁽⁷⁾、Park^(8, 16)、DBG⁽¹⁸⁾及 PDA (potato dextrose agar) 等八種培養基，以它們的組成成分 (不含抗菌物質；其中 Nash PCNB 與 Papavizas PCNB 兩培養基之基本組成成分相同) 配置成七種培養基平板。然後利用 3 號打孔器 (內徑 0.65 公分) 切取百合萎凋病菌 F16 和 G16 菌株在 2% (w/v) 水瓊脂平板上培養 5 天後之菌落周圍菌絲塊，逐一移置於上述諸培養基平板上，在 24 °C 培養 5 天，觀察記錄兩菌株的菌落生長情形與大小。每處理四重複。

微生物抑菌劑的選擇

選取前項的 DBG、PDA、Nash PCNB、Komada 及 Tochinai 等基礎組成成分，分別調製成 250 毫升的培養基，經過高溫高壓 (121 °C，15lb) 滅菌後，逐一加入 Nash PCNB、Papavizas PCNB 或 Komada 培養基原有劑量的微生物抑菌劑 (表二) 後，製成培養基平板。然後在 24 °C 測定病菌土中的菌量濃度與雜菌出現率，各有四重複，5 天後記錄結果。

培養基的酸鹼值比較

將前項選出之 Komada 培養基、Nash PCNB 培養基、Tochinai-P (在 Tochinai 培養基添加 Nash PCNB medium 中之微生物抑菌劑) 和 Tochinai-K (在 Tochinai 培養基添加 Komada medium 中之微生物抑菌劑) 等 4 種組合，分別以 1N NaOH 調整培養基 pH 值為 8.0 或維持原培養基之酸鹼值不作調整或以 10% (v/v) H₃PO₄ 調 pH 值為 4.0 等三種處理，隨後製成培養基平板，用於測定病菌土中的菌量數與雜菌污染率。

殺菌劑的篩選

在 Komada 培養基加入 50ppm (有效成分濃度) 的撲克拉、撲克拉錳、免賴得、腐絕、貝芬替、鋅錳乃浦或依普同等七種殺菌劑 (表一) 後，製成平板，並一一接種百合萎凋病原菌 G16、F16 及 F401，比較各菌株在平板上的生長情形。進一步，將百合萎凋病原

表一、本研究所採用的七種殺菌劑

Table 1. Seven fungicides used in this study

Common name	Chinese name	Chemical name	Manufacturer
Prochloraz	撲克拉	25% EC N-propyl-N-(2,4,6-trichloro-phenoxy)ethyl -imidazole-1-carboxamide	Schering
Prochloraz + manganese	撲克拉錳	50% WP N-propyl-N-(2,4,6-trichloro-phenoxy)ethyl -imidazole-1-carboxamide manganese	Schering
Benomyl	免賴得	50% WP Methyl-1-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole carbamate	Du pont
Thiabendazole	腐絕	40% WP 2-(4-thiazolyl)benzimidazole	Merck Sharp & Dome
Carbendazim	貝芬替	50% WP 2-(methoxycarbonylamino)-benzimidazole	BASF
Mancozeb	鋅錳乃浦	80% WP Contains 16% manganese, 2% zinc and 62% ethylenebisdithiocarbamate ion	Du pont
Iprodione	依普同	50% WP 3-(3,5-Dichlorophenyl)-1-isopropyl carbamoylhydantion	Rhone-Poulenc

原菌 G16、F16 及 F401 等與不同寄主植物之鐮胞菌菌株，包括萵苣萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*)、西瓜蔓割病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)、苦瓜萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *momordicae*)、蘿蔔黃葉病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *raphani*)、香蕉黃葉病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*)、番茄萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 及無病原性 *F. oxysporum* F403 等，分別單孢培養在 2%(w/v) 水瓊脂平板，10 天後，以 3 號打孔器 (內徑 0.65 cm) 切取菌落邊緣之菌絲塊，接種於含有殺菌劑之培養基平板上，在 24 培養 10 天，觀察紀錄各菌株的生長情形。

殺菌劑濃度的決定

將 25、50、75 及 100ppm(ai) 免賴得可濕性粉劑，分別添加於 Komada 培養基後製成平板，隨即於其上平展百合萎凋病菌 G16 與 F16 菌株的孢子懸浮液 (10^5 spores/ml)，在 24 經過 36 小時後，檢查各處理之孢子發芽百分率。

不同鐮胞菌在 FLI 培養基平板的生長比較

將前述 29 種 *Fusarium* spp. 菌株 (表三) 移植於 PDA 培養基平板培養 5 天後，切下菌絲塊，分別移至 FLI (由 Komada 培養基添加 50 ppm 免賴得組合而成，酸鹼值為 pH 4.0) 和 Nash PCNB 培養基上，在 24 培養 5 天，觀察各菌種的生長情形。本試驗重複二次。

FLI 培養基分離百合萎凋病菌的效果

由溪湖與埔里採回之田土和人工病菌土，分別均勻混合後，以 0.1% 水瓊脂溶液進行序列稀釋後，平展於 FLI 與 Nash PCNB 培養基平板上，在 24 培養 5

天，調查百合萎凋病菌在 FLI 與 Nash PCNB 培養基上出現的菌落數。此外利用 FLI 培養基調查消毒與未消毒之埔里、新社及溪湖栽培土中百合萎凋病菌的菌量密度，同時也在各土壤中種植百合鱗片球 (Acapulco 品種)，在溫室經過 50 天後，調查各種土壤中百合植株罹患萎凋病的百分率。本試驗重複二次。

FLI 培養基分離獲得之 *F. oxysporum* 菌株的病原性測定

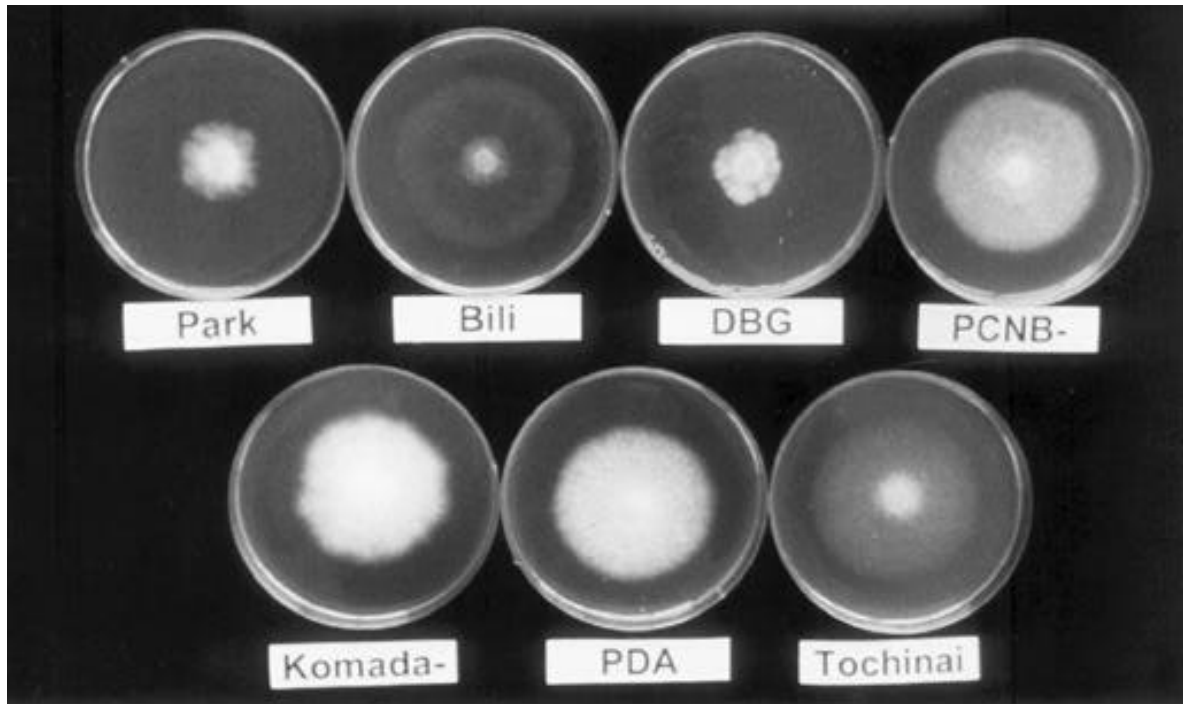
利用 FLI 培養基自罹病植株或土壤中分離類似百合萎凋病菌 G16 菌落之 *F. oxysporum* 菌株，經單孢分離後，培養於 PDA 斜面培養基上，2 星期後，製成 1×10^3 spores/ml 的孢子懸浮液。將表面消毒過之百合鱗片球 (Acapulco 品種) 浸泡於孢子懸浮液 30 min 後，取出陰乾，然後種植於間歇消毒過之 BVB No4 介質中，每盆 4 棵，各 4 盆，定時觀察植株發病情形外，並將發病植株取回，進行組織分離，確定各菌株之病原性及植株的發病率。此外，也將鱗片球浸泡於百合萎凋病菌 G16 之孢子懸浮液和無菌水中，作為對照組。

試驗過程中，同時也利用 Nash PCNB 培養基分離百合罹病植株或栽培過的土壤，並將分離所得之 *F. oxysporum* 菌株分別移植於 FLI 培養基平板外，也以百合鱗片球 (Casa Blanca 品種) 測定各菌株的病原性，藉以明瞭各菌株能否在 FLI 培養基平板生長與其對百合有無病原性。

結 果

百合萎凋病菌選擇性培養基的研發

在測試的 7 種基礎培養基中，百合萎凋病菌 F-16 和 G-16 兩菌株在 Bili、Tochinai、Komada、Nash



圖一、百合萎凋病菌 (G-16) 菌株在不同基礎培養基平板上生長的情形 (在24 培養5天)。
 Fig. 1. The growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lili* isolate G16 on different basal media at 24 °C for 5days.

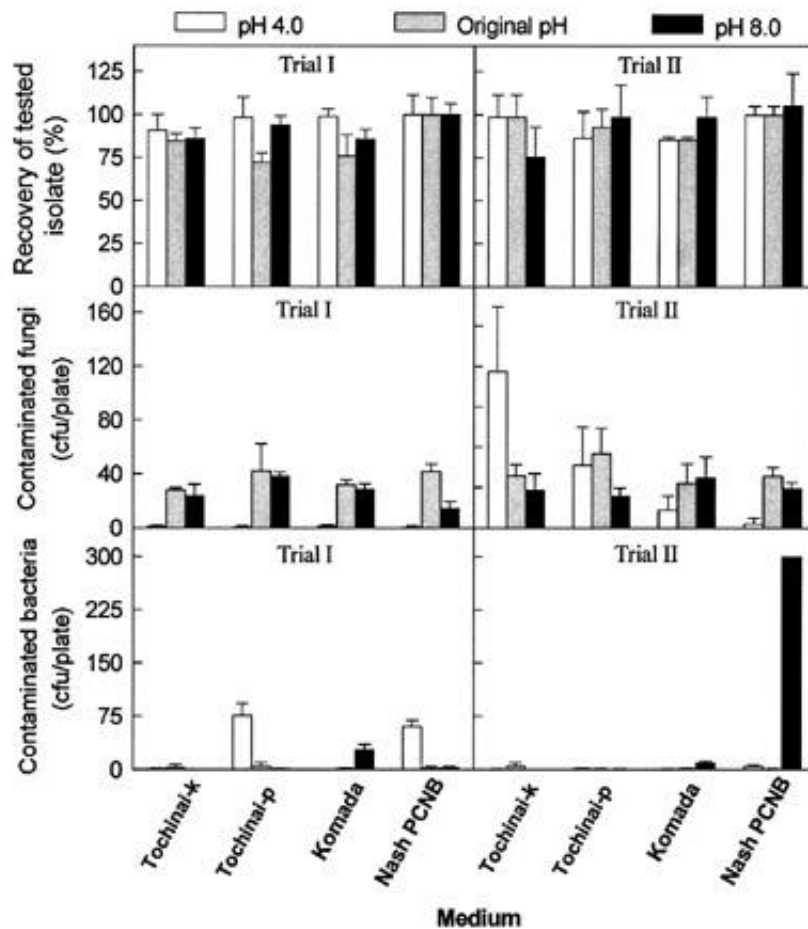
表二、DBG 、PDA、Tochinai 、PCNB 及 Komada 五種基礎培養基分別添加 Komada, Papavizas PCNB 及 Nash PCNB media 之微生物抑制成分後，從病菌土回收百合萎凋病菌 (G16菌株) 的效率與雜菌的出現率

Table 2.Recovery efficacy of *F. oxysporum* f. sp. *lili* (isolate G16) and colony-forming units of contaminated fungi and bacteria from infested soils by DBG medium, Potato dextrose agar, Tochinai medium, PCNB basal medium and Komada basal medium added respectively with antimicrobial supplements of Komada, Papavizas PCNB or Nash PCNB media¹

Treatment	Recovery efficacy (%)	Contaminated fungi (cfu/plate)	Contaminated bacteria (cfu/plate)
Added with antimicrobial supplements of Komada medium			
DBG medium	54.24 e ²	17.88 f	0.75 c
Potato dextrose agar	90.67 ab	34.75 de	7.88 bc
Tochinai medium	96.43 a	33.38 de	4.00 bc
PCNB basal medium	63.29 cde	24.75 de	8.00 bc
Komada basal medium	85.51 b	29.50 def	0.75 c
Added with antimicrobial supplements of Papavizas PCNB medium			
DBG medium	58.57 de	37.13 cde	23.00 a
Potato dextrose agar	71.11 c	57.25 ab	12.75 b
Tochinai medium	67.83 cd	58.88 ab	8.255 c
PCNB basal medium	87.24 b	34.00 de	12.00 b
Komada basal medium	70.02 c	38.63 cd	5.00 bc
Added with antimicrobial supplements of Nash PCNB medium			
DBG medium	61.02 de	20.38 f	4.50 bc
Potato dextrose agar	57.99 e	63.75 a	4.13 bc
Tochinai medium	77.26 bc	41.00 cd	5.13 bc
PCNB basal medium	95.60 a	40.00 cd	1.25 c
Komada basal medium	67.17 cd	28.13 def	0.50 c

¹ Antimicrobial supplements of Komada medium are pentachloronitrobenzene (PCNB), oxgall, Na₂B₄O₇·10H₂O and streptomycin sultate ; those of Papavizas PCNB medium are PCNB, oxgall, chlorotetracycline and streptomycin sultate ; those of Nash PCNB medium are PCNB, neomycin and streptomycin sultate.

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



圖二、不同酸鹼值之 Tochinalai-k、Tochinalai-p、Nash PCNB 及 Komada 培養基，由病菌土中測定百合萎凋病菌的回收效率與污染雜菌率。其中 Trial-I 使用 G16 菌株之病菌土；Trial-II 使用 F16 菌株之病菌土。

Fig. 2. Recovery efficacy of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* and colony-forming units of contaminated fungi and bacteria from the infested soils by Tochinalai-k, Tochinalai-p, Nash PCNB and Komada media with different pH values.

Trial-I was conducted with isolate G16 infested soil, Trial-II was conducted with isolate F16 infested soil. Tochinalai-k and Tochinalai-p: represent that Tochinalai medium was amended with antimicrobial supplements of Komada (k) and Nash PCNB medium (p), respectively.

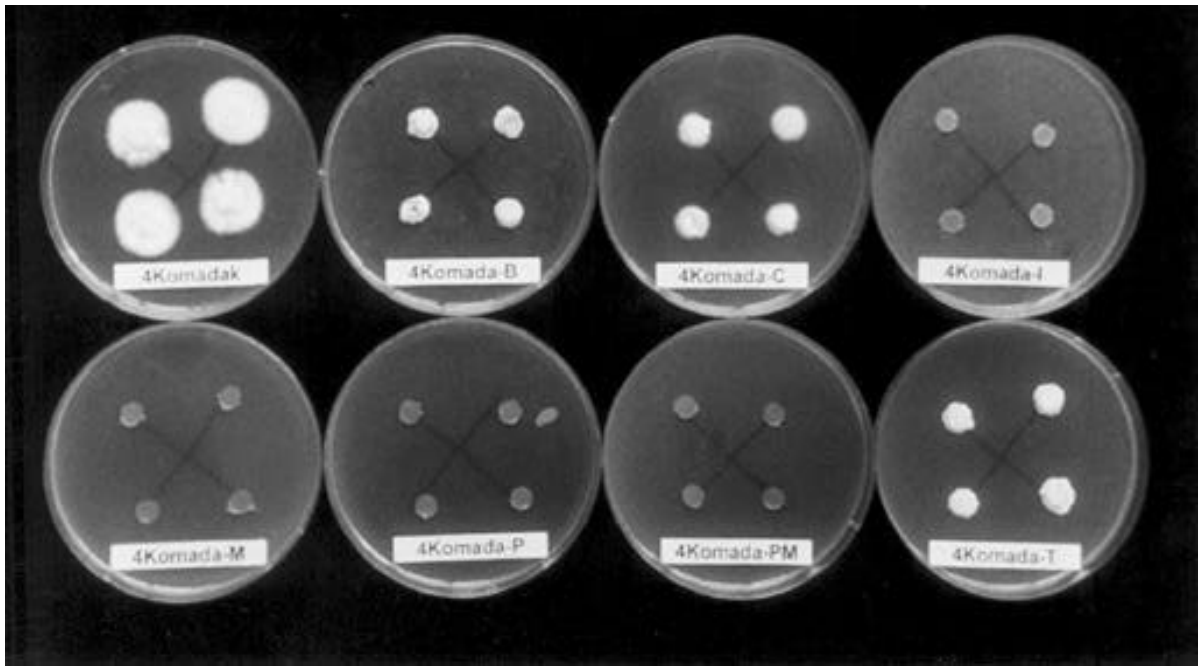
PCNB 及 PDA 等培養基生長 5 天的菌落大小均介於 6.1~6.5 cm，其中百合萎凋病菌在 Bili 培養基之菌絲生長稀疏，不易辨識。至於兩菌株在 DBG 與 Park 培養基則生長緩慢，菌落大小約 2.5 cm。以肉眼研判，本菌之菌絲塊可在 PDA、Tochinalai、Nash PCNB 及 Komada 等基礎培養基上生長較為良好；雖然其在 DBG 生長緩慢，惟菌落特殊如花瓣狀，易於辨別(圖一)。

將 Nash PCNB、Komada、Tochinalai、PDA 及 DBG 等 5 種基礎培養基分別加入 Nash PCNB、Papavizas PCNB 及 Komada 等原有組成之微生物抑制劑後，用於測試病菌土中本菌的菌量數，結果發現 Komada、Tochinalai-K (添加 Komada 之微生物抑制劑)、Nash PCNB 培養基及 PDA-K (添加 Komada 之微生物抑制劑) 等，偵測土中百合萎凋病菌的效率較佳 (表二)。然而在土壤稀釋平板測試過程，PDA-K、Tochinalai-K 及

Nash-PCNB 等培養基平板出現或污染其它真菌與細菌的比例卻多高於 Komada 培養基平板。

將 Komada、Tochinalai-K、Nash PCNB 和 Tochinalai-P (添加 Nash PCNB 之微生物抑制劑) 等 4 種培養基，分別調酸鹼值至 pH 4.0 或 8.0 時，逐一分離病菌土中本病原菌的菌量，結果發現 Komada 培養基酸鹼值在 4.0 時，可以顯著抑制雜菌之生長外 (圖二)；其偵測百合萎凋病菌的功效亦較為優異與穩定，且易於區別菌落形態。

在 Komada 培養基中添加 50ppm 撲克拉、撲克拉錳、免賴得、腐絕、貝芬替、鋅錳乃浦或依普同等 7 種殺菌劑後，分別接種百合萎凋病菌，結果顯示百合萎凋病菌 G-16、F-16、F-401 和無病原性 *F. oxysporum* F-403 等菌株皆可在含有免賴得、腐絕或貝芬替等殺菌劑的 Komada 培養基上生長 (圖三)。



圖三、在Komada培養基中添加不同殺菌劑對百合萎凋病菌G16菌株生長的影響(在24 培養5天的結果)。
Fig. 3. Effect of Komada medium amended with different fungicides on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lili* isolate G16 at 24 for 5 days. (B:benomyl, C:carbendazim, I:iprodione, M: mancozeb, P:prochloraz, PM:prochloraz-manganese, T:thiabendazole)

進一步，將自不同寄主植物之 *F. oxysporum* 分化種，包括 *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (高莖萎凋病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *niveum* (西瓜蔓割病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *momordicae* (苦瓜萎凋病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *raphani* (蘿蔔黃葉病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *cubense* (香蕉黃葉病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (番茄萎凋病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *lili* (百合萎凋病菌) G-16、F-16、F-401 和無病原性 *F. oxysporum* F-403 菌株等，分別接種於含有免賴得、腐絕或貝芬替的 Komada 培養基上，結果在含有 50ppm 免賴得的 Komada 培養基上，只有百合萎凋病菌 G-16、F-16、F-401 和無病原性 *F. oxysporum* F-403 等菌株可以生長，而其他之 *F. oxysporum* 分化種均不能生長(圖四)。雖然 *F. oxysporum* F-403 能在該培養基上生長，但菌落形態卻不同於百合萎凋病菌 G-16 和 F-16 菌株。

將百合萎凋病菌 G-16、F-16 菌株的孢子懸浮液，分別平展於含有不同濃度免賴得的 Komada 培養基上，結果發現 Komada 培養基中添加 50ppm 免賴得時，孢子發芽率可達 97% 以上；若添加 75ppm 或 100ppm 免賴得時，孢子發芽率會大幅下降至 10% 以下(圖五)。綜合上述成果，將 Komada 培養基(組成配方：1g K_2HPO_4 , 0.5g KCl, 0.05g $MgSO_4$, 0.01g, Fe-Na-EDTA, 2.0g Asparagine, 20g Galactose, 15g agar, 1.0L distilled water)，高溫高壓(121 , 15lb)滅菌後，再逐一加入 50ppm benomyl, 1.0g pentachloronitrobenzene,

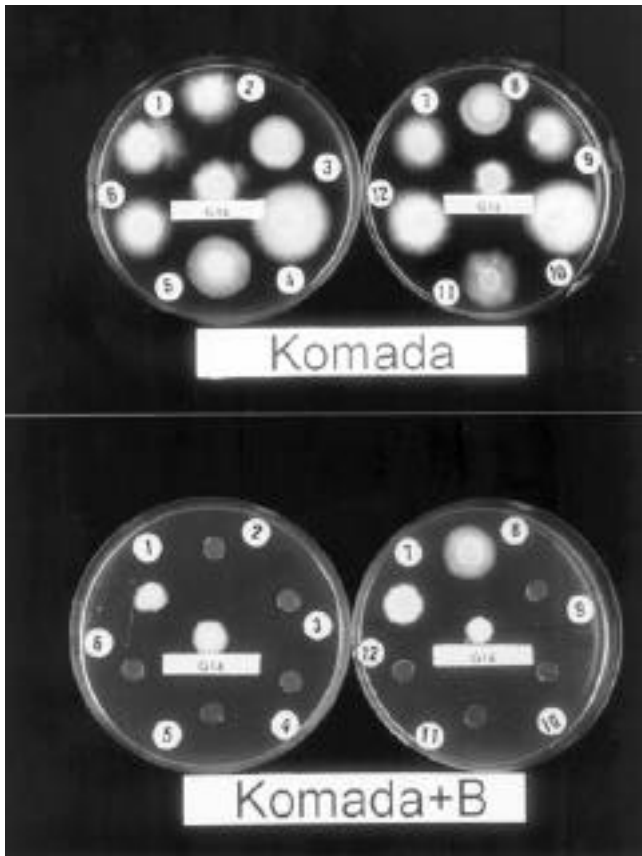
1.0g Oxgall, 1.0g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 及 0.3g streptomycin sulfate 後，以 10% 磷酸調為 pH4.0，即可製成鑑別百合萎凋病菌的 FLI 培養基。

不同鐮胞菌在FLI培養基平板的生長比較

將本研究室保存的 *Fusarium spp.* 菌株分別接種於 FLI 與 Nash PCNB 培養基平板培養 5 天，結果所有的 *Fusarium spp.* 菌株在 Nash PCNB 培養基平板皆可生長；而在 FLI 培養基平板上，只有來自百合之 G-16、F-16 及 F-401 菌株與 *F. poae*、*F. solani* 及 *F. ventricosum* 等可以生長(表三)，惟 *F. poae*、*F. solani* 及 *F. ventricosum* 三者與 G-16、F-16 及 F-401 菌株在菌落形態與顏色間有很明顯的差異，其中 *F. ventricosum* 和 *F. solani* 在 FLI 培養基上菌落顏色呈黑色，*F. poae* 呈純白色，而 G-16、F-16 及 F-401 菌株則為淡紅色。此外無病原性之 *F. oxysporum* F-403 菌株經測試後，亦可在 FLI 培養基平板上生長成橘色菌落。

FLI 培養基分離百合萎凋菌的效果

將田間自然病菌土和人工病菌土單獨或混合在一起後，取土樣以無菌水進行序列稀釋後，塗佈於 FLI 培養基與 Nash PCNB 培養基上，5 天後，發現 FLI 培養基與 Nash PCNB 培養基兩者回收百合萎凋病菌的百分率相近，惟 Nash PCNB 培養基平板出現的菌相較由

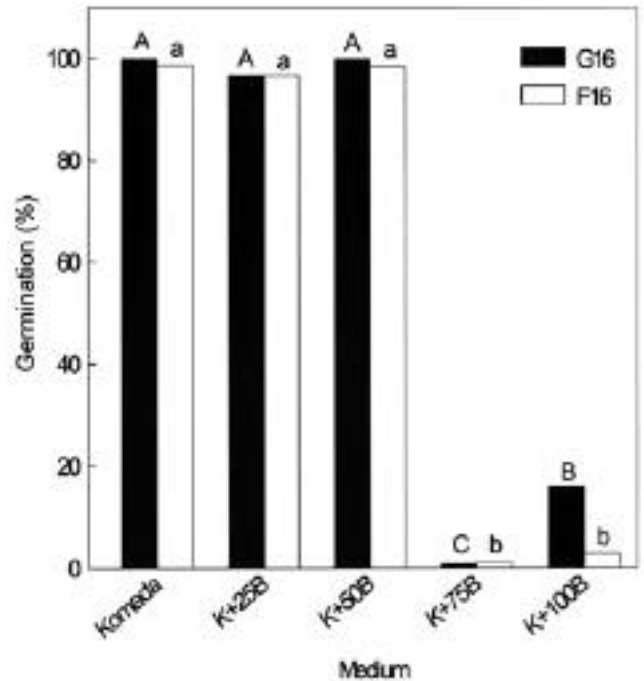


圖四、在 Komada 培養基中添加 50ppm 免賴得 (Benomyl) 對不同尖鐮胞菌分化種的生長影響。
 Fig. 4. Effect of Komada medium amended with 50ppm benomyl (Komada+B) on the growth of different formae speciales of *Fusarium oxysporum* at 24 for 5 days.
 Note: 1: *F. oxysporum* f. sp. *lilii* G16, 2: *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, 3: *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, 4: *F. oxysporum* f. sp. *momordicae*, 5: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 6: *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, 7: *F. oxysporum* f. sp. *lilii* F401, 8: *F. oxysporum* F403, 9: *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, 10: *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, 11: *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, 12: *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

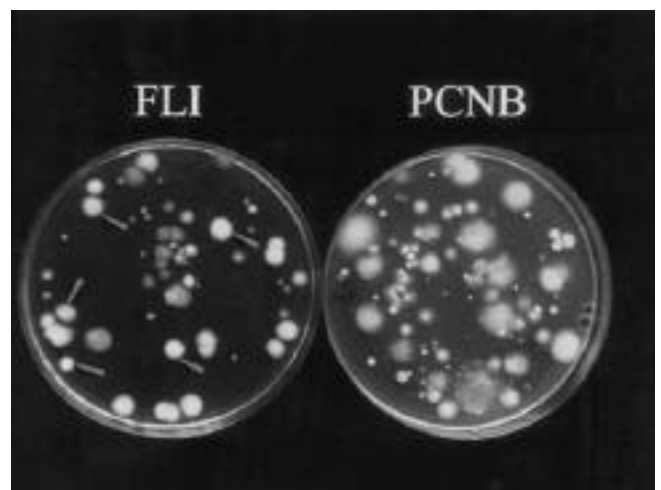
FLI 培養基分離者複雜；此外，FLI 培養基容易由菌落形態將百合萎凋病菌與其他 *Fusarium* spp. 區分開 (圖六)。調查栽培土中百合萎凋病菌菌量密度與百合萎凋病罹病率間的關係，結果發現 FLI 培養基測得土壤中菌量密度愈高時，百合植株發生萎凋病之百分率也就愈高 (表四)。

由 FLI 培養基分離之 *Fusarium* 菌株的病原性測定

利用 FLI 培養基自土壤、介質或罹病植株中分離類似百合萎凋病菌 G-16 菌株菌落形態之 *F. oxysporum* 共有 23 株，其中 21 株經病原性測定後，確定對百合皆具有病原性 (表五)；至於 FLI 培養基由百合分離到



圖五、在 Komada 培養基中添加不同濃度之免賴得對百合萎凋病菌 F-16 與 G-16 菌株之孢子發芽率的影響 (在 24, 36 小時)。其中 K+25B、K+50B、K+75B 及 K+100B 等分別表示在 Komada 培養基中添加 25、50、75 及 100ppm 免賴得。
 Fig. 5. Effect of Komada medium amended respectively with 25, 50, 75 and 100ppm of benomyl on spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* isolates F-16 and G-16 at 24 for 36 hours.



圖六、利用 FLI 和 Nash PCNB 培養基偵測病菌土中的百合萎凋病菌。
 Fig. 6. Application of the FLI and Nash PCNB media for recovery of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* (►) from the infested soil.

表三、測試多種 *Fusarium* spp. 在 FLI 與 Nash PCNB 培養基上的生長情形Table 3. Application of FLI and Nash PCNB media for culturing *Fusarium* species and *F. oxysporum* formae speciales

<i>Fusarium</i> species	Isolate designation	Isolated from	Growth	
			FLI	PCNB ¹
<i>F. avenaceum</i>	NCHU6362	Oat	- ²	+
<i>F. camptoceras</i>	NCHU5151	Many-Flowered bamboo	-	+
<i>F. concolor</i>	NCHU5681	Soil	-	+
<i>F. culmorum</i>	NCHU6161	Oat	-	+
<i>F. dimerum</i>	NCHU3434	Elephant apple	-	+
<i>F. graminearum</i>	NCHU5331	Pine	-	+
<i>F. graminum</i>	NCHU5945	Mangrove	-	+
<i>F. heterosporum</i>	NCHU5913	Junglerice	-	+
<i>F. lateritium</i>	NCHU3051	Litchi	-	+
<i>F. merismoides</i>	NCHU6965	Soil	-	+
<i>F. moniliforme</i>	NCHU0024	Rice	-	+
<i>F. poae</i>	NCHU3580	Oat	+	+
<i>F. proliferatum</i>	NCHU0037	Oat	-	+
<i>F. semitectum</i>	NCHU5003	Soil	-	+
<i>F. solani</i>	NCHU3381	Soil	+	+
<i>F. subglutinans</i>	NCHU0052	Bride lime tree	-	+
<i>F. ventricosum</i>	NCHU4073	Oat	+	+
<i>F. oxysporum</i>				
f. sp. <i>lilii</i>	G16	Lily	+	+
f. sp. <i>lilii</i>	F16	Lily	+	+
f. sp. <i>lilii</i>	F401	Lily	+	+
f. sp. <i>cubense</i>	BFO0310	Banana	-	+
f. sp. <i>lactucae</i>	LFO3214	Lettuce	-	+
f. sp. <i>lactucae</i>	LFO1112	Lettuce	-	+
f. sp. <i>lycopersici</i>	FOL11B	Tomato	-	+
f. sp. <i>lycopersici</i>	FOL13B	Tomato	-	+
f. sp. <i>momordicae</i>	MFO005	Balsam pear	-	+
f. sp. <i>niveum</i>	NCHU4581	Watermelon	-	+
f. sp. <i>niveum</i>	FNH0103	Watermelon	-	+
f. sp. <i>raphani</i>	FOR4566	Radish	-	+

¹ PCNB: Nash PCNB medium; FLI: Komada medium amended with 50 ppm benomyl.

² + = yes, - = no.

表四、應用 FLI 培養基偵測溪湖、新社及埔里百合栽培田土中百合萎凋病菌菌量密度與其栽植百合鱗片球 (Acapulco 品種) 50 天後發生百合萎凋病的罹病率

Fig. 4. Application of FLI medium for investigating population density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* in soils collected from Chihu, Puli and Hsinshe and disease incidence of *Fusarium* wilt of lily grown in those soils

Locality	Population density (cfu/ g.soil)		Disease incidence ² (%)	
	Natural soil	Sterilized soil	Natural soil	Sterilized soil
Chihu	225	0	41.7	0.0
Puli-A	750	0	52.2	0.0
Puli-B	0	0	0.0	0.0
Hsinshe	- ¹	0	16.7	0.0

¹ - : untested.

² Disease incidence was recorded 50 days after bulblets of lily (cv. Acapulco) were planted in soils.

表五、利用 FLI 培養基自百合罹病植株與栽培田土分離獲得的鐮胞菌菌株對百合 Acapulco 鱗片球之病原性測定
 Table 5. Pathogenicity of *Fusarium* isolates, obtained from diseased plants of lily and infested fields by FLI medium, on bulblets of lily (cv. Acapulco)

<i>Fusarium</i> species	Total isolate number	Pathogenicity test		Untested
		+ ¹	-	
<i>F. oxysporum</i>	23	21	0	2
<i>F. proliferatum</i>	35	20	0	15
<i>F. moniliforme</i>	8	0	6	2
<i>F. semitectum</i>	10	0	9	1
<i>F. equeti</i>	1	0	1	0
<i>F. sambucinum</i>	1	0	1	0

¹ + = yes, - = no.

表六、利用 FLI 培養基及 Nash PCNB 培養基分離到的 *F. oxysporum* 對百合鱗片球 (Casa Blanca 品種) 的病原性測定
 Table 6. Pathogenicity tests of isolates of *Fusarium oxysporum* obtained from FLI medium and Nash PCNB medium on lily scale bulblets (cv. Casa Blanca)

<i>Fusarium</i> isolate ¹	Nash PCNB medium	FLI medium	Pathogenicity
FLI-04	+ ²	+	Yes ³
FLI-18	+	+	Yes
FLI-26	+	+	Yes
FLI-37	+	+	Yes
FLI-39	+	+	Yes
FLI-40	+	+	Yes
FLI-43	+	+	Yes
FLI-57	+	+	Yes
FLI-62	+	+	Yes
FLI-63	+	+	Yes
FLI-66	+	+	Yes
FLI-69	+	+	Yes
FLI-82	+	+	Yes
FLI-86	+	+	Yes
FLI-90	+	+	Yes
FLI-91	+	+	Yes
FLI-92	+	+	Yes
FLI-93	+	+	Yes
FLI-94	+	+	Yes
FLI-95	+	+	Yes
FLI-96	+	+	Yes
P-02	+	-	No
P-04	+	-	No
P-07	+	-	No
P-12	+	-	No
P-13	+	-	No
P-15	+	-	No

¹ The isolates of *Fusarium oxysporum* obtained from bulblets of lily by FLI and Nash PCNB media were designated as FLI-04~FLI-96 and P-02~P-15, respectively.

² Mycelial growth of isolated fungi, + : positive; - : negative.

³ Yes : the fungi were pathogenic to lily, No : the fungi weren't pathogenic to lily.

之 *F. proliferatum* 對百合也多具有病原性。

利用 FLI 與 Nash PCNB 兩培養基，由病菌土與介質中分離出 27 個 *F. oxysporum* 菌株，其中 FLI-04 至 FLI-96 等 21 菌株係由 FLI 培養基分離獲得；而 P-02 至 P-15 等 6 菌株則由 Nash PCNB 培養基分離獲得。將這 27 菌株分別移植培養於 FLI 與 Nash PCNB，結果發現可在 FLI 培養基上生長，且菌落形態與百合萎凋病菌 G-16 菌株相似之 *F. oxysporum* 對百合皆具有病原性；惟可在 Nash PCNB 培養基上生長者對百合不一定具有病原性 (表六)。

討 論

一般選擇性培養基皆具有促使標的微生物生長快速和抑制其他微生物生長或誘使標的菌產生特別性狀的組成成分，藉以達到篩選標的微生物之目的⁽¹⁷⁾。在發展百合萎凋病菌選擇性培養基的過程中，經由多個基礎培養基篩選出百合萎凋病菌可以生長良好者，進一步找到可以有效抑制細菌、放線菌和其他真菌生長的抑菌藥劑與適合本菌生長的酸鹼值後，發現 Komada 培養基⁽¹⁰⁾具有較其他培養基更能自土中分離到百合萎凋病菌，且擁有減少其他真菌與細菌污染的功效。然而 Komada 培養基卻仍有許多其他 *F. oxysporum* 可以生長，極不易分辨百合萎凋病菌，故嘗試於 Komada 培養基添加數種殺菌劑，藉以找出適於百合萎凋病菌生長良好，且不利其他 *F. oxysporum* 分化種如 *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (高莖萎凋病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *niveum* (西瓜蔓割病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *momordicae* (苦瓜萎凋病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *raphani* (蘿蔔黃葉病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *cubense* (香蕉黃葉病菌)、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (番茄萎凋病菌) 等生長的藥劑。試驗結果發現在 Komada 培養基中添加 50ppm 免賴得可濕性粉劑，製成的 FLI 培養基具有鑑別百合萎凋病菌的功效。將各種 *Fusarium* spp. 分別接種在 FLI 和 Nash PCNB 培養基⁽¹⁴⁾，結果所有的菌株皆可在 Nash PCNB 培養基上生長，但在 FLI 培養基平板上除自百合分離所得的菌株可以生長外，僅有 *F. poae*、*F. solani* 及 *F. ventricosum* 等可以生長，惟菌落顏色卻不同於百合萎凋病菌的菌落。運用 FLI 與 Nash PCNB 培養基分離土壤中的菌類，結果發現 FLI 培養基上的菌相較 Nash PCNB 培養基分離者單純，且易於區別百合萎凋病菌的菌落 (圖六)。將 FLI 培養基分離所得之 *F. oxysporum* 菌株 (呈淡粉紅色菌落) 進行病原性測定後，發現它們對百合皆具有病原性。然而無法在 FLI 培養基上生長的 *F. oxysporum* 菌株，對百合植株卻都不具病原性。歸納上述各項試驗，證明 FLI

培養基確可作為鑑別百合萎凋病菌的選擇性培養基。

百合萎凋病菌可在含有免賴得 (Benomyl)、貝芬替 (Carbendazim) 或腐絕 (Thiabendazole) 的 Komada 培養基上生長，惟此三種系統性殺菌劑大多用於種子或種球消毒^(3,11)或作為防治鐮胞菌引起之維管束病害之需⁽⁶⁾。本研究發現 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* 在免賴得濃度達 75ppm 時，菌絲生長良好，但孢子發芽率卻顯著出現下降的情形，顯示百合萎凋病菌之孢子對免賴得的感受性較菌絲敏感。至於百合萎凋病菌菌株對免賴得的忍受性，是否屬於菌種出現抗藥性抑或是此一分化種的病原性與抗免賴得基因間存在連鎖關係，則有待進一步的證實。

謝 辭

本研究承 行政院國科會 (NSC91-2317-B-005-004) 與行政院農委會動植物防檢局 [(91農科-7.3.2-檢B2(2))] 補助計畫經費，特此誌謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Bald, J. G., Paulus, A. O., and Lenz, J. V. 1983. Control of field root and bulb disease of Easter lily. *Plant Dis.* 67:1167-1172.
- Bald, J. G., Suzuki, T., and Doyle, A. 1971. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* to Easter lily, narcissus and gladiolus. *Ann. Appl. Biol.* 67:331-342.
- Bald, J. G., and Chandler, P. A. 1957. Reduction of the root rot complex on croft lilies by fungicidal treatment and propagation from bulb scales. *Phytopathology* 47:285-291.
- Imle, E. P. 1940. A bulb disease of lilies caused by *Fusarium* spp. *Phytopathology* 30:11. (Abstr.)
- Imle, E. P. 1942. Bulb rot disease of lilies. *The American lily society yearbook-AHS.* p.30-41.
- Janice, B. S., and Blair, H. M. 1971. A comparison of the modes of action of three benzimidazoles. *Phytopathology* 61:816-819.
- Joffe, A. Z. 1963. The mycoflora of a continuously cropped soil in Israel, with special reference to effects of manuring and fertilizing. *Mycologia* 55:271-282.
- John, T. 1971. *Plant Pathological Methods.* Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University Press.
- Kao, W. T. 1999. Biology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* and its pathogenicity. Master thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 58 pp. (In Chinese)
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium

- for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant Protect. Res. 8:114-125.
11. Liao, L. S. 1983. Practical Pesticide. Hua Cheng Press. Taichung. 850 pp. (In Chinese)
 12. Linderman, R. G. 1981. Fusarium disease of flowering bulb crops. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. pp.129-141.
 13. McRae, E. A. 1988. Lily Disease-Handbook. North American Lily Society Printed, Canada.
 14. Nash, S. M., and Synder, W. C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root for *Fusarium* in field soil. Phytopathology 52:567-572.
 15. Papavizas, G. C. 1967. Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of *Fusarium* from soil. Phytopathology 57:848-852.
 16. Shu, C. P. 2000. Detection, Survival and Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*, the causal agent of Fusarium wilt of lily. Master thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 87 pp. (In Chinese)
 17. Tsao, P. H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 8:157-186.
 18. Wong, W. C. 1988. A differential medium for the identification of races 1 and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Lett. in Appl. Microbiol. 6:51-54.

ABSTRACT

Huang, J. W.^{1,3}, Shu, C. P.^{1,2}, and Chen, C. H.¹ 2005. Development of a selective medium for detecting *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. Plant Pathol. Bull. 14:103-114. (¹Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ²Shin Min high school, Taichung, Taiwan; ³Corresponding author, E-mail:jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22851676)

The FLI selective medium was successfully developed for detection of *F. oxysporum* f. sp. *lilii* from infested soil and diseased lily plants. The FLI selective medium (pH 4) consisted of 1.0g K₂HPO₄, 0.5g KCl, 0.5g MgSO₄, 0.01g Fe-Na-EDTA, 2.0g L-asparagine, 20.0g Galactose, 1.0g pentachloronitrobenzene, 0.5g oxgall, 1.0g Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.3g streptomycin sulfate, 0.1g benomyl(50%), 15.0g agar and 1.0L distilled water was more sensitive than Nash-PCNB medium for distinguishing the pathogen from the other *Fusarium* species. In the study, it was proved that *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *momordicae*, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* were not able to grow on the FLI medium plate. Among 29 species of *Fusarium* tested, except for *F. poae*, *F. solani* and *F. ventricosum*, the others could not grow on the FLI medium. Although *F. poae*, *F. solani* and *F. ventricosum* were able to grow on the FLI medium, their colony morphologies and color were completely different from ones of *F. oxysporum* f. sp. *lilii*. Once the isolates of *F. oxysporum* obtained from diseased lily plant parts and the infested soils were able to grow onto the FLI medium, they were certainly to show the pathogenicity to lily plants.

Key words: detection, *Fusarium* spp., *F. oxysporum* f. sp. *lilii*., lily, selective medium.