

airiti

番茄萎凋病菌厚膜孢子之逆境抗性分析

陳媛鈺¹、黃振文^{1,3}、王智立^{1,2,3*}

¹ 國立中興大學植物病理學系。臺中市。臺灣。

² 國立中興大學植物醫學暨安全農業碩士學位學程。臺中市。臺灣。

³ 國立中興大學永續農業創新發展中心。臺中市。臺灣。

* 聯絡作者，email: clwang@nchu.edu.tw

摘要

陳媛鈺、黃振文、王智立。2019。番茄萎凋病菌厚膜孢子之逆境抗性分析。植物醫學61(4): 21-30。

番茄萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 是番茄的重要真菌性病原菌，可長期存活於土壤中，也是造成連作障礙的重要因子之一，其厚膜孢子是存活於土壤中的重要構造，較分生孢子具有更強的耐受逆境能力，惟番茄萎凋病菌的厚膜孢子對逆境的耐受特性卻鮮有研究報導。本研究利用栽培介質萃取液誘導番茄萎凋病菌產生厚膜孢子後，在不同的環境因子下比較厚膜孢子與小分生孢子間的發芽能力和構造差異。研究結果顯示，厚膜孢子較小分生孢子對於危害番茄幼苗具有較高的接種潛勢。此外，在高溫、高pH值、高滲透壓、高含量過氧化物及高濃度剛果紅等逆境下，厚膜孢子的發芽率皆優於小分生孢子。60°C 以上的熱處理及超過50 ppm的鋅錳乃浦處理均可有效抑制厚膜孢子的發芽能力。進一步，以螢光染色觀察發現厚膜孢子比小分生孢子具有較厚的幾丁質細胞壁，且含較多的肝醣及脂質。本研究證實番茄萎凋病菌之厚膜孢子均比小分生孢子更具耐受多種逆境之特性。

關鍵詞：鏹孢菌、厚膜孢子、小分生孢子、逆境、孢子發芽、孢子構造

緒言

番茄萎凋病 (*Fusarium wilt of tomato*) 是由病原真菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 所引起的番茄病害，在臺灣各地普遍發生，亦是世界各番茄生產地區重要的病害之一；在連續種植番茄實生苗的田區發生情形更為顯著，成為連作的重要限制因子。番茄萎凋病主要發生於高溫的熱帶地區，或於溫帶地區的溫室中，酸性土壤較鹼性土壤易發生，病原菌會由

土壤、種子、機械工具等方式帶菌。土壤帶菌為田間病害發生的主要原因。幼苗期感染植株會快速死亡，或延遲於生長期至結果期出現病徵⁽¹⁷⁾。病原菌會以孢子殘存於土壤，受到寄主根部分泌的物質刺激開始發芽，由根部感染植株，引起維管束褐化，嚴重影響水分輸送而導致缺水。病徵初期於下位葉出現黃化，至後期全株呈萎凋、死亡⁽³³⁾。

許多研究人員認為 *Fusarium* 屬的厚膜孢子有較厚的細胞壁，具有耐受多種環境逆境因子的能力，能夠長期存活於土壤達數年，為主要的殘存構造⁽³⁰⁾。但多數文獻僅簡略描述，未有相關的研究數據證實，僅少數環境逆境因子確實被研究，如極端的溫度⁽¹²⁾及低水分潛勢的土壤⁽³¹⁾等。許多 *Fusarium* 屬病害報導的引言大多僅參照同屬之其他病害的病原菌特性，甚至引用其他種類真菌之厚膜孢子的特性⁽²⁵⁾。

在 *F. oxysporum* 厚膜孢子的相關研究中指出，相較於在高溫且乾燥條件下，棉花黃萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 的厚膜孢子於高溫高濕時，族群的殘存量會明顯地下降⁽³⁾；此外，西瓜蔓割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* 的分生孢子若以 38°C 或 40°C 熱處理 30 至 90 分鐘，其發芽會有延遲的現象，而厚膜孢子經過熱處理後雖然亦有延遲發芽，但其可耐受 40°C 120 分鐘或 42°C 60 分鐘的熱處理，顯示厚膜孢子較分生孢子更耐高溫⁽¹⁴⁾；比較亞麻萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lini* 之厚膜孢子與分生孢子，發現兩種孢子皆可穩定殘存於土壤達 100 天以上，但厚膜孢子的存活率略佳於分生孢子⁽¹⁰⁾。在接種試驗中，低濃度的厚膜孢子卻可以造成比高濃度的分生孢子更為嚴重的罹病率，顯示厚膜孢子具有較強的接種潛勢 (inoculum potential)。此外，類似的研究指出，以番茄萎凋病菌之厚膜孢子作為接種源時，其接種潛勢顯著高於分生孢子⁽⁶⁾。

至今，雖然已有多數研究提及 *F. oxysporum* 分化型 (formae speciales) 厚膜孢子的特性，但針對番茄萎凋病菌並未有詳盡的研究。本篇研究利用已開發的研究方法製備出無雜菌且高純度的厚膜孢子懸浮液⁽⁸⁾，可避免受到土壤、植物材料

等厚膜孢子誘導物質的干擾，測試在不同的環境逆境條件下，比較其與分生孢子之發芽生長情形，了解兩種孢子之特性上是否有所差異，並且能否與前人研究相互呼應，以利未來評估防治番茄萎凋病的合適方法。

材料與方法

供試菌株之厚膜孢子製備

菌株CT-Fo-5於2012年12月分離自雲林縣荊桐鄉之疑似感染萎凋病的大果番茄側根，經形態鑑定和接種確定為番茄萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*，且以分子鑑定確認其為生理小種2 (race 2)。厚膜孢子的製備，利用栽培介質BVB (BioFlora Singapore Pte Ltd.) 製作土壤萃取液，並添加0.03% 硫酸銨 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 以誘導產生厚膜孢子⁽⁸⁾。將製備好的厚膜孢子懸浮液置於離心管，保存在4°C 冰箱。

厚膜孢子與小分生孢子之接種潛勢比較

為確定以土壤萃取液製備的厚膜孢子是否仍具有致病力，並比較其與小分生孢子的接種潛勢。利用前述製備的厚膜孢子懸浮液及培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, 以下簡稱 PDA, 1 L 含 potato 200 g 之煎汁、glucose 20 g、agar 20 g) 的分生孢子液，混拌至BVB栽培介質中，分別配製成濃度為 10^4 spores/g之帶菌介質。將播種3週的番茄苗 (農友301) 移至上述帶菌介質中，置於28°C 生長箱 (12小時光照 / 12小時黑暗)，每週觀察各苗株的罹病情形，並參考前人研究方式計算罹病度⁽²⁸⁾。厚膜孢子與小分生孢子分別進行3重覆，每重覆5株苗株，共連續觀察5週。

溫度處理對於厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

將厚膜孢子或小分生孢子配製成 5×10^4 spores/ml的孢子懸浮液，取100 μl 塗佈於2% 水瓊脂培養基 (water agar, 以下簡稱 WA, 1 L 含 agar 20 g) 平板上，將培養基分別置於4、8、12、16、20、24、28、32及36°C 之定溫箱，並以鋁箔紙密封避光。經過24小時後，以光學顯微鏡 (Olympus BX51) 觀察孢子的發芽情形，計算其發芽率，發芽管若未超過該孢子長度則視為沒有發芽，每皿培養基隨機挑選5 - 6個視野，每個視野約有20顆孢子，共計算100顆孢子，每個溫度處理進行5重覆。短暫熱處理對發芽率之影響，則利用乾浴槽分別將孢子懸浮液加熱至40、50、60、70及80°C，經過5分鐘熱處理後，塗佈於2% WA 平板上，放置於28°C 定溫箱培養，並以前述未經過熱處理的孢子懸浮液作為正對照組，經過24小時後調查發芽率，方法同上所述。

酸鹼值處理對於厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

將滅菌後的馬鈴薯葡萄糖液體培養基 (potato dextrose broth, 以下簡稱 PDB, 1 L 含 potato 200 g 之煎汁、glucose 20 g)，以1 M鹽酸 (HCl) 或1 M氫氧化鉀 (KOH) 分別調整pH 值至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10及11，取1 ml PDB置於2 ml的微量離心管內。將厚膜孢子或小分生孢子配製成 2×10^5 spores/ml的懸浮液，取100 μl 添加至1 ml PDB中，震盪混合均勻。經過24小時振盪培養 (28°C、100 rpm、黑暗處理) 後，觀察並計算孢子的發芽情形，方法如前述，每管共計算100顆孢子，每個pH值處理進行5重覆。

滲透壓逆境對於厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

本試驗參考Nikolaou等人⁽²⁴⁾之研究，分別以氯化鈉 (NaCl) 為離子型滲透壓逆境處理，以山梨糖醇 (D-sorbitol, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) 為非離子型滲透壓逆境處理。利用2% WA為基礎培養基，前者配置濃度分別為2.5、5、6、7、8、9、10、15及20% (w/v) 的氯化鈉培養基；後者則製備濃度分別為0.5、1、2及3 M的山梨糖醇培養基。將厚膜孢子或小分生孢子配製成 5×10^4 spores/ml的孢子懸浮液，取20 μl 滴加於同一皿培養基的左、右兩側，每側各滴入2滴懸浮液，並均勻塗佈。待孢子懸浮液陰乾後，以鋁箔紙密封避光，放置於28°C 定溫箱培養。以未添加氯化鈉或山梨糖醇的WA作為正對照組。經過24小時後，每皿培養基計算100顆孢子，每個處理及濃度進行5重覆。

氧化逆境對於厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

本試驗參考Nikolaou等人⁽²⁴⁾之研究，分別以過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 及甲萘醌 (menadione) 作為過氧化物之逆境處理。利用2% WA為基礎培養基，將3% 過氧化氫或93 mM甲萘醌溶液分別加入滅菌並降溫至40 - 50°C 的WA，製成濃度分別為0.25、0.5、0.75、1及1.5 mM的過氧化氫或甲萘醌培養基。試驗接種方法與培養條件如上述，並以前述未添加過氧化氫或甲萘醌的WA作為正對照組。經過24小時後，每皿培養基計算100顆孢子，每個處理及濃度進行5重覆。

剛果紅處理對於厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

本試驗參考Nikolaou等人⁽²⁴⁾之研究，將剛果紅 (Congo red) 以無菌水配製為1% 溶液，加入滅菌並降溫至約40 - 50°C 的2% WA，分別製成含有100、200、300、400及500 ppm剛果紅的培養基，試驗接種方法與培養條件如上述，並以前述未添加剛果紅的WA作為正對照組。經過24小時後，每皿培養基計算100顆孢子，每個處理及濃度進行5重覆。

不同殺菌劑處理對於厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

根據植物保護資訊系統 (<https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/>)

可使用防治 *Fusarium* spp. 萎凋病的推薦藥劑，分別測試目前台灣市售之四種殺菌劑：撲克拉 (prochloraz)、貝芬替 (carbendazim)、賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) 及鋅錳乃浦 (mancozeb)。將殺菌劑配置為水溶液，分別加入滅菌降溫至約40 - 50°C的2% WA，製成含有1、50、100、500、1,000、2,000及3,000 ppm殺菌劑的培養基，試驗接種方法與培養條件如上述，並以未添加殺菌劑的WA作為正對照組。經過24小時後，每皿培養基計算100顆孢子，每個處理及濃度進行5重覆。

厚膜孢子與小分生孢子於細胞構造之差異

參考Son等人⁽³⁰⁾的研究，將厚膜孢子或小分生孢子懸浮液，以碘液 (60 mg/ml KI + 10 mg/ml I₂ in dH₂O) 染色，觀察細胞中的肝醣 (glycogen) 於光學顯微鏡下之染色情形；以Calcofluor white (excitation 356、emission 445/50) 溶液 (Fluka®) 染色細胞壁及尼羅紅 (Nile red, 1 mg/l ml MeOH) 染色脂質，於螢光顯微鏡 (DE/Axio Imager A1 microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 下以濾片組 (Calcofluor white: excitation 356、emission 445/50; Nile red: excitation 546/12、emission 590) 篩選特定波長，觀察結合於細胞構造的螢光劑所激發出的螢光，並以影像處理軟體AxioVision (Ver 4.8, Carl Zeiss) 進行圖像之後製套色。

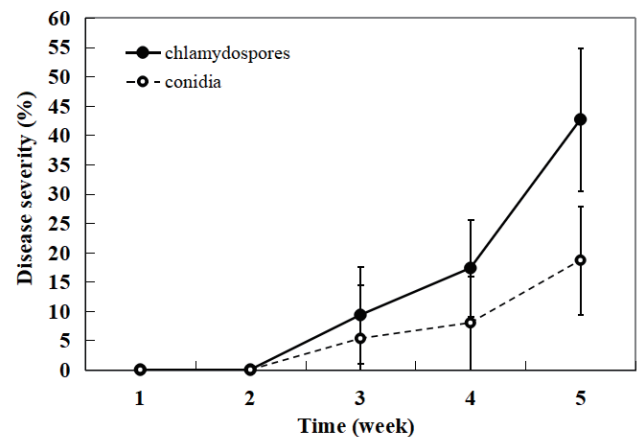
統計及分析方法

以SPSS 6.1.3 (Statistical Product and Service Solutions, SPSS Inc., Chicago, USA) 軟體進行統計分析。分別將各處理之厚膜孢子與小分生孢子發芽率，以比較平均數法之單因子ANOVA分析，選擇最小顯著差異法 (least significance difference, LSD) 進行檢定 ($p \leq 0.05$)，分析及比較各種處理之間是否有顯著差異。

結 果

厚膜孢子與小分生孢子之接種潛勢比較

無論以厚膜孢子或小分生孢子製備之帶菌介質接種，皆於第3週時出現典型番茄萎凋病之病徵，下位葉開始輕微黃化；第4週起，部分以厚膜孢子接種者出現較為嚴重的病徵，葉片黃化轉多，且少數苗株已開始萎凋或明顯矮小，小分生孢子組則與第3週狀況相當；第5週時，厚膜孢子接種的處理組發病率已達86.7%，整體罹病度達42.7%，而小分生孢子接種的處理組發病率為66.7%，罹病度則為18.7% (圖一)。結果顯示，本研究誘導的厚膜孢子確實具病原性，且比小分生孢子具較高的接種潛勢。



圖一、利用番茄萎凋病菌的厚膜孢子與分生孢子分別接種番茄幼苗之罹病度比較。

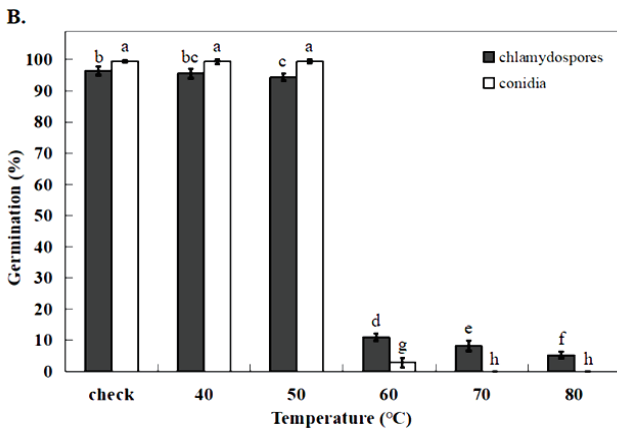
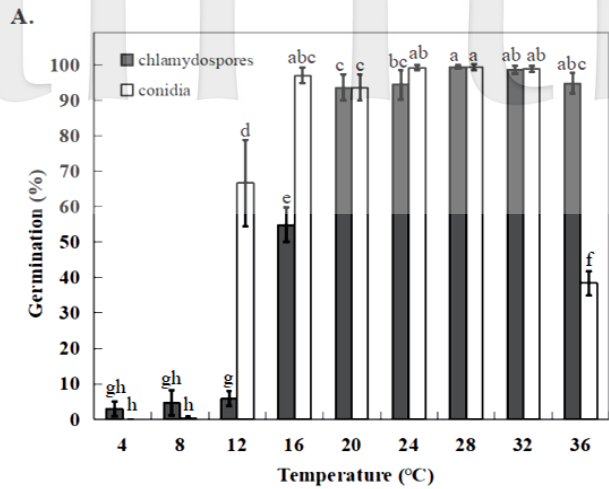
Fig. 1. The disease severity of tomato fusarial wilt of tomato seedlings inoculated respectively by chlamydo spores and microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate CT-Fo-5. Vertical lines represent standard deviation.

溫度處理對厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

厚膜孢子和小分生孢子在4 - 36°C的溫度下培養，發芽率於20 - 32°C時皆可超過90%，而在4°C及8°C發芽率均低於5%。當溫度為36°C時，厚膜孢子的發芽率 (94.8%) 顯著高於小分生孢子 (38.4%)。溫度為低溫12°C及16°C時，小分生孢子的發芽率 (66.6%及97.0%) 則顯著高於厚膜孢子 (5.8%及54.8%) (圖二A)。由此顯示當溫度提高時厚膜孢子較小分生孢子有較佳的發芽率，但於低溫時發芽率顯著低於小分生孢子。為了解短暫熱處理對兩種孢子發芽率的影響，進一步於高溫下處理5分鐘後，移回28°C培養。當熱處理溫度為50°C以下時，兩種孢子的發芽率均未有影響；當提升至60°C，厚膜孢子及小分生孢子的發芽率分別降低至11.1% 及2.8%；在超過70°C時，小分生孢子無法發芽，厚膜孢子則僅約5%發芽 (圖二B)，顯示短暫熱處理對兩種孢子發芽率的影響相當。

滲透壓逆境對厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

當氯化鈉濃度為2.5%以下時，厚膜孢子和小分生孢子的發芽率皆可達90%以上。濃度超過8%以上時，兩者幾乎都不會發芽。而濃度為5 - 7% 時，厚膜孢子的發芽率為64 - 90.2%，小分生孢子則低於35% (圖三A)，顯示厚膜孢子對氯化鈉之滲透壓耐受性較高；而山梨糖醇濃度為2 M以下時，厚膜孢子和小分生孢子的發芽率皆超過90%。當濃度為3M時，兩者的發芽率皆略為下降，小分生孢子的發芽率 (70.8%) 略低於厚膜孢子 (81.0%) (圖三B)，顯示厚膜孢子對山梨糖醇之滲透壓耐受性亦略高於小分生孢子。



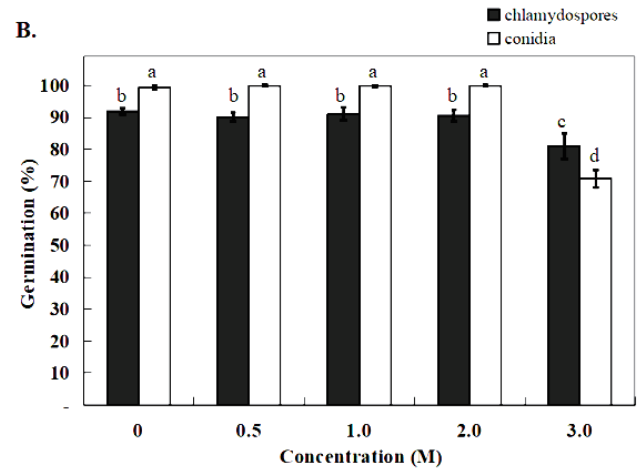
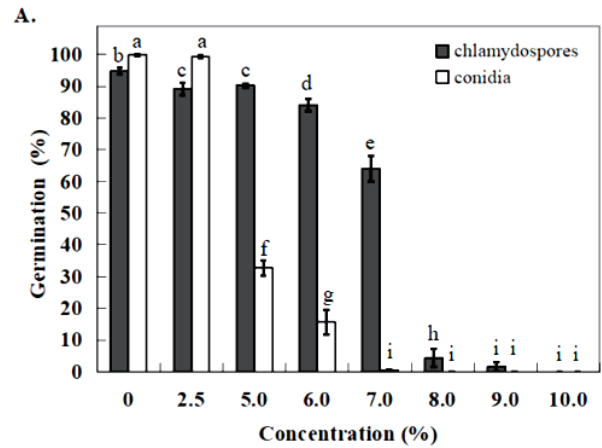
圖二、溫度處理對於番茄萎凋病菌厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較。(A) 不同溫度處理；(B) 不同溫度的短暫熱處理。

Fig. 2. The effect of temperatures on the germination of chlamydospores and microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate CT-Fo-5. (A) Fungal spores were cultured in consistent temperatures; (B) Fungal spores were treated with a 5-minute heating before cultured at 28°C. Check treatment was cultured at 28°C without heating. Bars with different letters are significantly different at $p = 0.05$ based on LSD. Vertical lines represent standard deviation.

氧化逆境對厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

當過氧化氫濃度達1.5 mM，厚膜孢子的發芽率仍有85%以上，0 - 1.5 mM各濃度處理並無顯著差異。小分生孢子的發芽率則在1 mM以上時顯著下降，當濃度為1.5 mM其發芽率僅剩4.9%（圖四A）；在甲萘醌處理下，濃度低於0.75 mM時厚膜孢子發芽率皆有85%以上，濃度提升至1 mM時明顯受抑制，當濃度達1.5 mM時則幾乎不會發芽（1.6%）。而小分生孢子則在0.5 mM以上時發芽率即降至20%以下，濃度超過為1 mM時則完全無法發芽（圖四B）。兩種處理皆顯示厚膜孢子對氧化逆境較小分生孢子具有更高的耐受能力。

酸鹼值處理對厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較



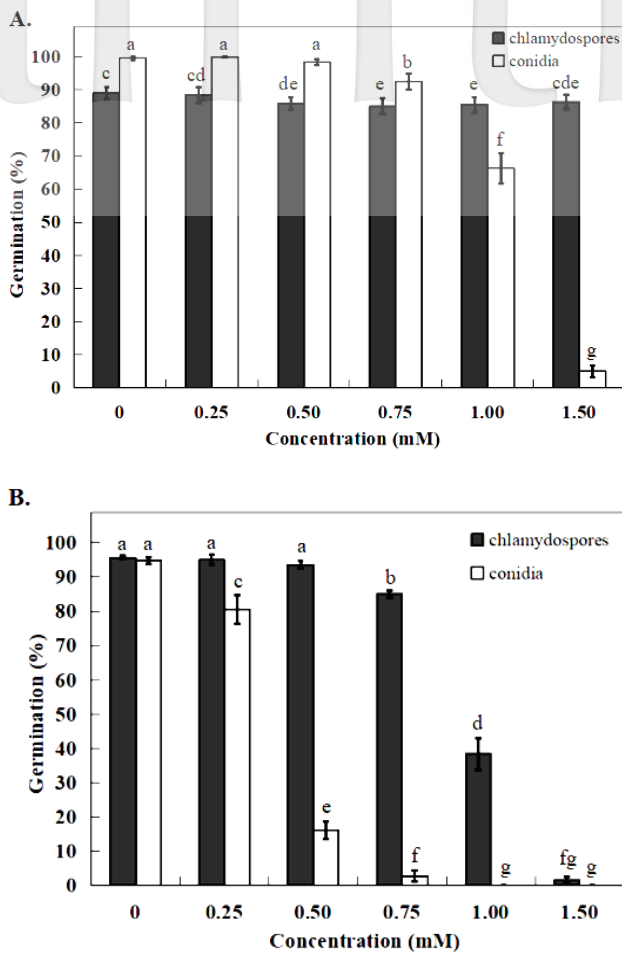
圖三、滲透壓對於番茄萎凋病菌厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較。(A) 不同濃度的氯化鈉處理；(B) 不同濃度的山梨糖醇處理。

Fig. 3. The effect of osmotic pressure on the germination of chlamydospores and microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate CT-Fo-5. (A) Fungal spores were cultured in media with different concentrations of NaCl.; (B) Fungal spores were cultured in media with different concentrations of sorbitol. Bars with different letters are significantly different at $p = 0.05$ based on LSD. Vertical lines represent standard deviation.

當pH值為4 - 7時，厚膜孢子和小分生孢子的發芽率皆接近100%。pH值為1時，兩者皆無法發芽。在pH值為8時，厚膜孢子的發芽率仍有86.4%，而小分生孢子的發芽率已降至55.2%，當pH為9 - 11時，厚膜孢子的發芽率（41.2 - 60.4%）顯著高於小分生孢子的發芽率（0 - 1.2%）（圖五A），顯示厚膜孢子對於pH值的耐受程度較廣，且在鹼性環境下明顯優於小分生孢子。

剛果紅處理對厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

當剛果紅濃度為100 ppm時，兩者的發芽率皆與未添加剛果紅之處理有顯著的下降，隨著剛果紅濃度增加，兩者發芽率



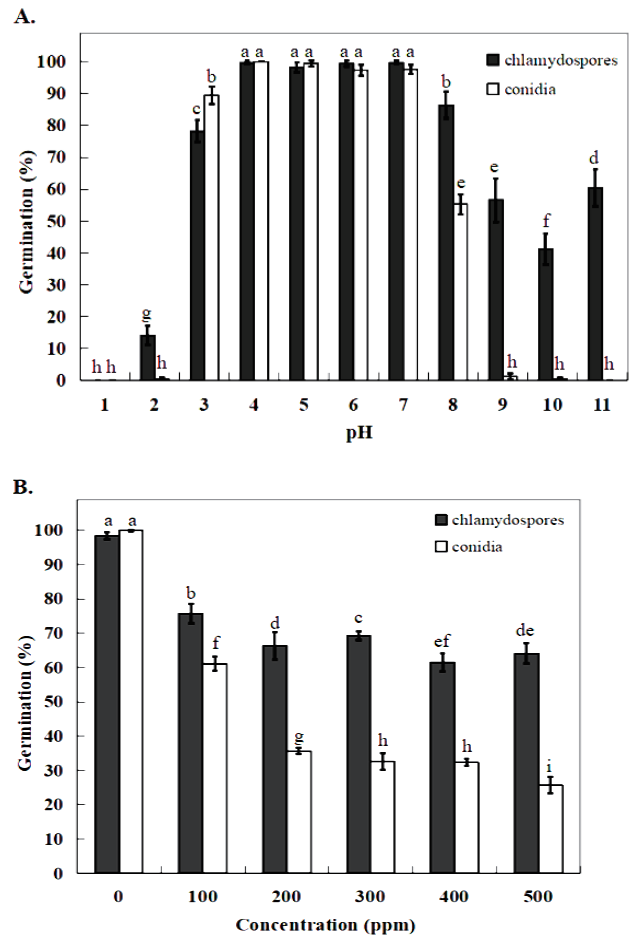
圖四、氧化逆境對於番茄萎凋病菌厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較。(A)不同濃度的過氧化氫處理；(B)不同濃度的甲萘醌處理。

Fig. 4. The effect of oxidative stresses on the germination of chlamydo spores and microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate CT-Fo-5. (A) Fungal spores were cultured in media with different concentrations of H₂O₂; (B) Fungal spores were cultured in media with different concentrations of menadione. Bars with different letters are significantly different at $p = 0.05$ based on LSD. Vertical lines represent standard deviation.

雖然漸減，但各濃度處理間並無明顯變化之趨勢。厚膜孢子在剛果紅濃度為100 - 500 ppm時，發芽率約為61.5 - 75.7%。當剛果紅濃度為200 ppm以上時，小分生孢子的發芽率皆低於40% (圖五B)。

不同殺菌劑處理對厚膜孢子與小分生孢子發芽率之比較

在撲克拉處理下 (圖六A)，小分生孢子在濃度1 ppm時孢子發芽抑制率即達到90%以上，厚膜孢子則隨著藥劑濃度提升，抑制率隨之提升，在3,000 ppm時抑制率達65.9%；貝芬替處理時，小分生孢子對此藥劑較不敏感，在貝芬替3,000 ppm以下時抑制率皆未超過10%，厚膜孢子則隨著貝芬替濃度提升而抑制率亦增加，在3,000 ppm時為39.7%；兩種孢子皆對賽普護



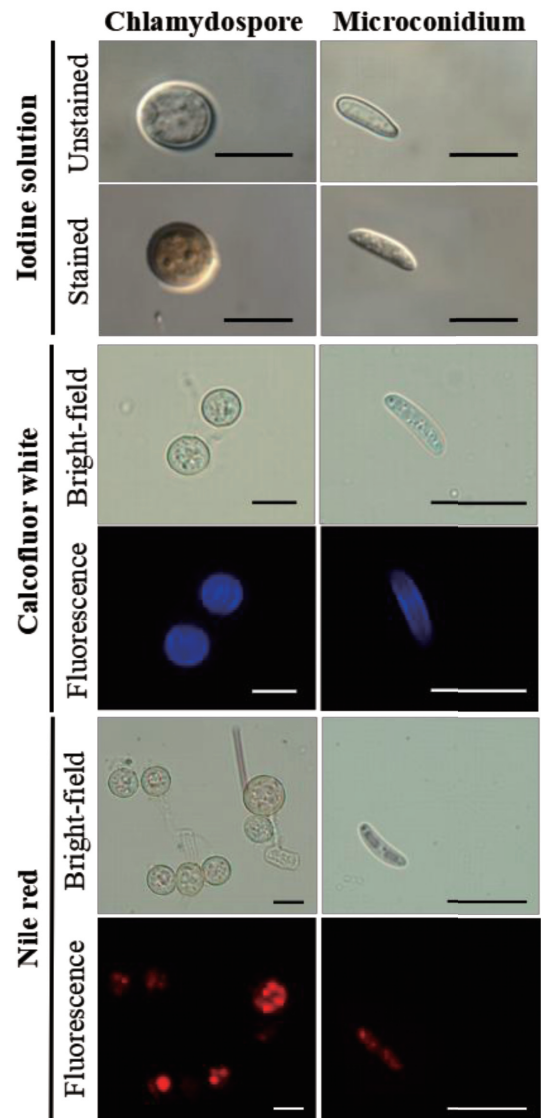
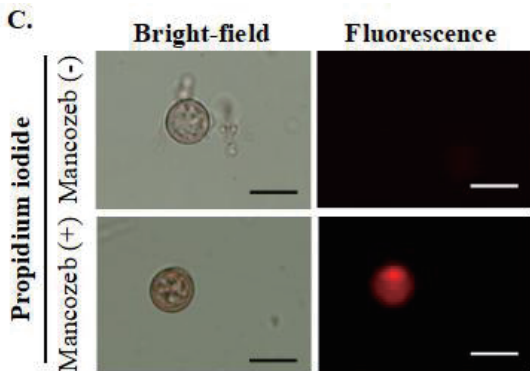
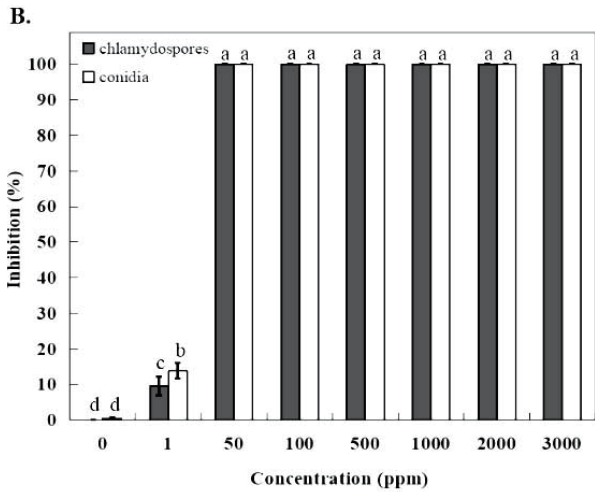
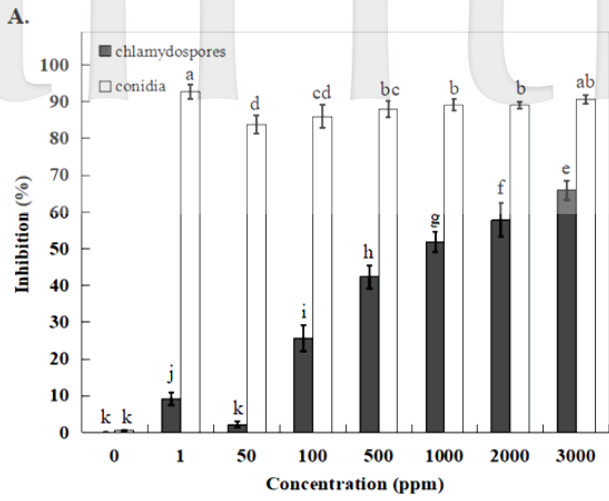
圖五、酸鹼值與剛果紅處理對於番茄萎凋病菌厚膜孢子與小分生孢子發芽率之影響。(A)不同pH值處理；(B)不同濃度的剛果紅處理。

Fig. 5. The effect of pH values, and Congo red on the germination of chlamydo spores and microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate CT-Fo-5. (A) Fungal spores were cultured in potato dextrose broth with different pH values; (B) Fungal spores were cultured in media with different concentrations of Congo red. Bars with different letters are significantly different at $p = 0.05$ based on LSD. Vertical lines represent standard deviation.

汰寧不敏感，即使賽普護汰寧濃度達3,000 ppm，抑制率均未超過4%；而鋅錳乃浦處理下 (圖六B)，濃度超過50 ppm皆對於兩種孢子之發芽抑制率達到100%。進一步以碘化丙啶染色檢測鋅錳乃浦處理後的厚膜孢子，紅色螢光顯示厚膜孢子已失去活性，碘化丙啶因此可進入細胞內與DNA結合 (圖六C)。

厚膜孢子與小分生孢子於細胞構造之差異

為了解厚膜孢子與小分生孢子於細胞構造上是否有差異，並可能導致逆境下的耐受性不同。以碘液染色觀察細胞的肝醣，厚膜孢子經過其染色後，由透明無色轉為呈現紅棕色，小分生孢子染色後之呈色則不明顯 (圖七)；而Calcofluor white 可以與真菌細胞壁之幾丁質 (chitin) 結合，經過染色後以螢



圖七、番茄萎凋病菌厚膜孢子與小分生孢子於細胞構造之差異。厚膜孢子及小分生孢子分別以碘液染色肝醣；Calcofluor white染色幾丁質細胞壁；尼羅紅染色孢子內脂質。

Fig. 7. Cellular structure differences between chlamydospores and microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate CT-Fo-5. Chlamydospores and microconidia were stained with iodine solution (KI + I₂) for glycogen, with Calcofluor white for chitin-containing cell wall, and with Nile red for cellular lipid. Calcofluor white staining and Nile red staining were examined by a fluorescent microscope. (bar: 10 μm)

圖六、殺菌劑處理對於番茄萎凋病菌厚膜孢子與小分生孢子發芽率之影響。(A) 撲克拉；(B) 鋅錳乃浦；(C) 碘化丙啶染色檢測鋅錳乃浦處理後之厚膜孢子。

Fig. 6. The effect of fungicides on the inhibition of germination of chlamydospores and microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate CT-Fo-5. (A) Prochloraz; (B) Mancozeb; (C) The propidium iodide staining of chlamydospores treated with mancozeb. Bars with different letters are significantly different at $p = 0.05$ based on LSD. Vertical lines represent standard deviation. (bar: 10 μm)

光顯微鏡觀察孢子之細胞壁，厚膜孢子的螢光較為明顯，其細胞壁具有較厚實明顯的螢光，小分生孢子的螢光呈色較厚膜孢子弱（圖七）；尼羅紅可以染色細胞之脂質（lipid），經過染色後發現厚膜孢子內有許多紅色大亮點散佈於其中，小分生孢子的細胞內亦含有多數小紅點，但其含量相較之下低於厚膜孢子（圖七）。

討論

利用栽培介質BVB萃取液所製備的厚膜孢子，不僅濃度及純度皆得以快速計算，且產量大、易保存⁽⁸⁾。從接種結果顯示，此方法製備之厚膜孢子仍具有病原性，且相同濃度下其造成的病害比分生孢子更顯著，適合作為日後接種試驗之接種源。在許多*F. oxysporum*的接種試驗中，會以分生孢子來取代厚膜孢子^(22, 26)，或以較強勢的剪根或浸根接種法⁽²⁷⁾，較不符合田間病害發生的感染模式。前人研究也指出，厚膜孢子在有寄主存在的根圈時，發芽速率會明顯比分生孢子來得快，即使厚膜孢子濃度較分生孢子低，卻能造成更為嚴重的病害⁽¹⁰⁾。本研究之結果亦可印證，厚膜孢子比分生孢子之接種潛勢來得更強。若在接種時以分生孢子取代厚膜孢子，可能會低估實際病害發生的嚴重度。

在溫度的試驗中，厚膜孢子可以耐受較高的培養溫度，高溫（36°C）下發芽率較分生孢子高、低溫（16°C以下）時發芽率下降，可印證夏季於植物生長逆境的高溫環境下該病害好發的特性，而在低溫時不適病原菌生長，厚膜孢子可能處於休眠狀態，待氣溫回升再發芽以利侵入感染。此外，厚膜孢子在偏酸性的條件下發芽率較高，與前人研究相符合⁽¹³⁾，亦可印證田間該病害於偏酸性土壤發生較為嚴重⁽⁷⁾；在鹼性環境下，厚膜孢子的發芽率雖然高於小分生孢子，但與偏酸性及中性pH值相較已有顯著降低，且其發芽管呈現多分支且粗短（約20 μm），與正常之發芽情形有所不同，為生長受到抑制的狀態。在防治此病害時，報導指出可利用添加土壤添加物提高土壤pH值，以減少病害發生⁽⁷⁾，此試驗可以證明，若提高土壤pH值能使孢子發芽率降低而達到減緩病害之效果。

在滲透壓逆境的測試結果中，氯化鈉濃度需高於7%以上，厚膜孢子發芽率才有顯著降低。根據前人的研究⁽³²⁾，*Fusarium roseum*的大孢子和厚膜孢子經過不同水份潛勢處理8 - 24小時後，在-1至-20 bars水份潛勢之發芽率都可以接近100%，若達-60至-80 bars則發芽率趨近於零。在本實驗中，氯化鈉濃度2.5、7及8%與水份潛勢之相對應值分別約為-21、-59及-68 bars，與前人試驗結果大致相當。惟厚膜孢子在氯化鈉濃度為8%時，發芽率已不足5%，而*F. roseum*仍約有40%的發芽率，顯示不同種的*Fusarium*對滲透壓逆境的耐受性有所差異；而在山梨糖醇的處理下，厚膜孢子與小分生孢子的發芽生長皆良好，僅濃度達3 M時，發芽率才略為降低。對此真菌而言，山梨糖醇為非離子型溶質且可能為可利用的醣類養分，更高的濃度是否對其為逆境，必須進行試驗才可加以定論。比較兩種滲透壓逆境，離子型物質不僅影響了溶液滲透壓，亦直接影響生物細胞膜離子通道的開閉。由細胞之泵漏模式（pump and leak model）可以得知，細胞內的鈉離子（Na⁺）、鉀離子（K⁺）與氯離子（Cl⁻）之進出會改變細胞對物質的通透性，進而改變細胞之活性⁽¹⁶⁾。此外，本試驗結果亦說明在一般鹽化的

栽培土壤中，厚膜孢子仍可有效的發芽。

在本試驗中，病原菌對於過氧化氫的耐受濃度比甲萘醌更高，當濃度達到1.5 mM時，厚膜孢子在前者環境下發芽率仍有85%，但在後者則幾乎不會發芽；小分生孢子之發芽率在1 mM過氧化氫即有顯著下降，於濃度超過0.75 mM的甲萘醌則幾乎無法發芽，可見厚膜孢子對於氧化逆境具有較高的耐受性。植物在遭受病原菌攻擊時會啟動防禦反應，過程中會釋放出活性氧化物質（reactive oxygen species, ROS），如過氧化氫、超氧化物（superoxide, O₂⁻）、羥基自由基（hydroxyl radicals, OH⁻）等，當植物細胞表面感受到病原菌時，此類物質可以作為初期的訊息傳遞分子，以誘導防禦相關基因的表現，如致病相關蛋白（pathogenesis-related proteins, PR proteins）的產生、phenylpropanoid物質累積及ROS去毒性酶（ROS detoxifying enzymes）的生成等⁽²⁾。前人研究指出⁽²⁹⁾，過氧化氫可抑制病原菌之活體營養階段（biotrophic phase），增加植物之抗性，但對於死體營養階段（necrotrophic phase）之病原菌則有促進病害發生的效果。亦有研究顯示⁽²³⁾，過氧化氫濃度達0.7 mM時對死體營養型之百合灰斑病菌（*Botrytis elliptica*）的孢子發芽沒有影響，且濃度提升會增加發病之嚴重度。*F. oxysporum*屬於半活體營養型真菌，推論其入侵寄主時對低濃度之過氧化氫具有一定之抗性。甲萘醌可以提供超氧化物陰離子（superoxide anion-donor），進而產生超氧化物自由基，再轉換為過氧化氫或其他誘導氧化逆境之物質。故相對於過氧化氫，甲萘醌可以促使更多的氧化反應⁽⁹⁾，只要相對低濃度即可顯著抑制孢子發芽。在前人研究^(4, 5)，甲萘醌亞硫酸氫鈉（menadione sodium bisulfite, MSB）可用以誘導植物產生抗性，達到降低病害的效果。但甲萘醌在真菌之生體外（in vitro）測試仍缺乏相關報導，需要進一步研究才能得知其抑制真菌生長的作用機制。

本研究利用臺灣地區使用於防治病原菌*F. oxysporum*的殺菌劑進行生體外之測試，並選擇四種不同作用機制的藥劑，撲克拉作用機制為抑制固醇類合成（FRAC G1），推薦防治於唐菖蒲萎凋病（*F. oxysporum* f. sp. *gladioli*）；貝芬錳為貝芬替與錳乃浦之混合藥劑，推薦用於西瓜蔓割病（*F. oxysporum* f. sp. *niveum*），貝芬替作用機制為有絲分裂期β-tubulin之抑制劑（FRAC B1），錳乃浦與鋅錳乃浦則皆為多點作用作用機制（FRAC M3）；賽普護汰寧為賽普洛及護汰寧之混合藥劑，推薦用於洋蔥黃萎病（*F. oxysporum* f. sp. *cepa*），賽普洛可抑制甲硫胺酸（methionine）生合成（FRAC D1），護汰寧則影響滲透調節作用之訊息傳遞（FRAC E2）（Fungicide Resistance Action Committee, FRAC, <http://www.frac.info/>）。在結果顯示，即使濃度達到3,000 ppm之賽普護汰寧，無論對厚膜孢子或小分生孢子之發芽抑制率皆未達4%，但發芽管長度較對照組短，且產生多分支，此類單點作用機制的殺菌劑易產生抗藥性，故可能試驗用菌株對該藥劑已有抗藥性產生；在貝芬替及撲克拉處理下，雖然發芽率沒有顯著地被抑制，但生長情形與對照組

有所差異，如：發芽管短小、畸形、菌絲生長緩慢扭曲及原生質滲漏等，此二藥劑之作用機制為抑制菌絲生長，故無法有效阻止孢子的發芽階段。為確認各藥劑對於厚膜孢子為靜菌或殺菌作用，故將孢子懸浮液與藥劑溶液共同培養1天後，以碘化丙啶染色判斷細胞是否仍存活。經過染色後，僅有鉍錳乃浦處理之厚膜孢子可以被染色至細胞內部，代表細胞已經死亡；其他藥劑處理之厚膜孢子則與未處理之對照組皆未能被染色，表示其仍為活細胞。由此得知，鉍錳乃浦對於厚膜孢子為殺菌作用，而撲克拉及貝芬替對厚膜孢子的發芽抑制則屬於抑菌作用。

土壤消毒是常使用於土傳性病害的防治方式之一，其中又常以土壤覆蓋塑膠布搭配太陽能加熱，處理期間至少需要2 - 4週，日夜溫差可打破病原菌的靜菌作用，進而影響病原菌的生長⁽¹⁸⁾。在前人研究中，0 - 5公分的表土溫度可達45 - 50°C，與未覆蓋塑膠布者相比，溫差至少可達10°C以上，病害發生程度可減少40 - 75%⁽²¹⁾。另篇研究亦指出，土壤溫度達52 - 60°C時，病原菌族群密度顯著降低75 - 100%⁽¹⁸⁾。本試驗中，50°C的短暫熱處理後，厚膜孢子和小分生孢子的發芽率與對照組幾乎沒有差異，需達60°C以上時發芽率才有顯著降低；在前人對*F. oxysporum* f. sp. *niveum*的厚膜孢子進行生體外的加熱測試中⁽¹⁴⁾，雖然高溫僅有38 - 40°C，但處理時間為30 - 120分鐘即能使其發芽率最多降低33%；亦有研究⁽³⁾測試*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*厚膜孢子在高溫下的殘存，於39 - 41°C下培養10天後，厚膜孢子幾乎完全無法存活。故在防治此病害上，除了處理溫度是主要因子之一，處理時間也必須加以斟酌，時間太短會讓接種源無法有效降低，但過長又會影響作物的種植期。

在細胞染色的結果中，厚膜孢子體內所具有的肝醣及脂質含量皆較小分生孢子高，幾丁質亦聚集於厚膜孢子之細胞壁周圍。當真菌遭遇逆境時，通常會需要多種代謝反應來抵禦外界環境，細胞內的脂質及肝醣是真菌儲存能量的主要來源⁽¹⁵⁾，稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*)可將脂質及肝醣轉換為甘油(glycerol)而改變附著器(appressoria)之膨壓(turgor)⁽³⁴⁾，甘油亦可幫助真菌耐受高濃度鹽類的環境⁽¹⁾，故如果孢子體內脂質及肝醣含量較高，對於環境之滲透壓耐受性可能會有所提升。此外，幾丁質為高等真菌的細胞壁主要成分，提供保護細胞之功能以降低滲透壓逆境、物理性傷害及外來物質之影響^(11, 19, 20)，厚膜孢子顧名思義具有較厚的細胞壁，亦藉由孢子染色得知，其具有較厚的幾丁質細胞壁。本研究實驗證明，番茄萎凋病菌厚膜孢子較小分生孢子於各項物理及化學的逆境中更具有耐受性，並詳細提供番茄萎凋病菌厚膜孢子於各逆境成分濃度之耐受情形，而厚膜孢子的細胞壁及內部成分檢測也進一步提供其耐逆境的相關線索，相信對番茄萎凋病菌的殘存研究提供更明確的依據。

謝 辭

本研究感謝亞洲蔬菜中心王肇芬博士提供番茄萎凋病菌生理小種1及2之菌株，作為供試菌株生理小種鑑定之參考菌株。承蒙教育部高教深耕計畫特色領域研究中心計畫永續農業創新發展中心及科技部(MOST 108-2313-B-005-033)經費補助得以順利完成，謹此致謝。作者之ORCID numbers: CLW (0000-0001-6262-9945); JWH (0000-0003-0798-4332)。

引用文獻

1. André, L., Nilsson, A., and Adler, L. 1988. The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Gen. Microbiol. 134:669-677.
2. Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55:373-399.
3. Bennett, R. 2012. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* chlamydospores under solarization temperatures. Plant Dis. 96:1564-1568.
4. Borges, A. A., Borges-Pérez, A., and Fernández-Falcón, M. 2004. Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. Crop Prot. 23:1245-1247.
5. Borges, A. A., Cools, H. J., and Lucas, J. A. 2003. Menadione sodium bisulphite: a novel plant defense activator which enhances local and systemic resistance to infection by *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. Plant Pathol. 52:429-436.
6. Cal, A. D., Pascual, S., and Melgarejo, P. 1997. Infectivity of chlamydospores vs. microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. J. Phytopathol. 145:231-233.
7. Chen, C. W. 2006. Effect of Amendment of Soil with Shrimp and Crab Shell Powder on Control of Tomato Fusarium Wilt. Taichung, Taiwan: National Chung Hsing University. Master thesis. (in Chinese).
8. Chen, Y. Y., Lin, T. C., Chung, W. H., and Wang, C. L. 2015. Screening antagonistic microorganisms that inhibit chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant Pathol. Bull. 24: 251-266. (in Chinese).
9. Conde De La Rosa, L., Schoemaker, M. H., Vrenken, T. E., Buist-Homan, M., Havinga, R., Jansen, P. L. M., and Moshage, H. 2006. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. J. of Hepatol. 44:918-929.
10. Cousteaudier, Y., and Alabouvette, C. 1990. Survival and inoculum potential of conidia and chlamydospores of *Fusarium*

- oxysporum* f. sp. *lini* in soil. Can. J. Microbiol. 36:551-556.
11. Cowen, L. E., and Steinbach, W. J. 2008. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. Eukaryot. Cell 7:747-764.
 12. Doohan, F. M., Brennan, J., and Cooke, B. M. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. Eur. J. Plant Pathol. 109:755-768.
 13. Elad, Y., and Baker, R. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 75:1047-1052.
 14. Freeman, S., and Katan, J. 1988. Weakening effect on propagules of *Fusarium* by sublethal heating. Phytopathology 78:1656-1661.
 15. Guenther, J. C., Hallen-Adams, H. E., Bücking, H., Shachar-Hill, Y., and Trail, F. 2009. Triacylglyceride metabolism by *Fusarium graminearum* during colonization and sexual development on wheat. Mol. Plant-Microb. Interact. 22:1492-1503.
 16. Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., and Pedersen, S. F. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol. Rev. 89:193-277.
 17. Huang, J. W., Sun, S. K., and Ko, W. H. 1983. A medium for chlamydospore formation in *Fusarium*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 49: 704-708.
 18. Katan, J. 1980. Solar pasteurization of soils for disease. Plant Dis. 64:450-454.
 19. Kim, J. E., Lee, H. J., Lee, J., Kim, K., Yun, S. H., Shim, W. B., and Lee, Y. W. 2009. *Gibberella zeae* chitin synthase genes, *GzCHS5* and *GzCHS7*, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. Curr. Genet. 55:449-459.
 20. Klis, F. M., Ram, A. F. J., and De Groot, P. W. J. 2007. A Molecular and Genomic View of the Fungal Cell Wall. In: Howard, R., and Gow, N. R. eds. The Mycota vol. 8. Biology of the Fungal Cell. New York, the U.S.A: Springer Berlin Heidelberg. p 97-120.
 21. Lin, C. Y., and Huang, S. H. 1995. Mechanism of solarization for controlling soilborne disease. Bulletin of Taichung District Agricultural Research and Extension Station 49:19-31. (in Chinese).
 22. Ling, N., Huang, Q., Guo, S., and Shen, Q. 2011. *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 systemically affects root exudates of watermelon to decrease the conidial germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Plant Soil 341:485-493.
 23. Liu, Y. H., Huang, C. J., Yang, K. H., and Chen, C. Y. 2008. Effect of hydrogen peroxide on infection of lily by *Botrytis elliptica*. Plant Pathol. Bull. 17:307-314.
 24. Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I., and Brown, A. J. 2009. Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. BMC Evol. Biol. 9:44-61.
 25. Odds, F. C., and Kerridge, D. 1985. Morphogenesis in *Candida albicans*. Crit. Rev. Microbiol. 12:45-93.
 26. Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'haridon, F., and Alabouvette, C. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. Appl. Environ. Microbiol. 72:1523-1531.
 27. Rekah, Y., Shtienberg, D., and Katan, J. 2000. Disease development following infection of tomato and basil foliage by airborne conidia of the soilborne pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *basilici*. Phytopathology 90:1322-1329.
 28. Shanmugam, V., and Kanoujia, N. 2011. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. Biol. Control 57:85-93.
 29. Shetty, N. P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G. H. J., Collinge, D. B., and Jørgensen, H. J. L. 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. New Phytol. 174:637-647.
 30. Son, H., Lee, J., and Lee, Y. W. 2012. Mannitol induces the conversion of conidia to chlamydospore-like structures that confer enhanced tolerance to heat, drought, and UV in *Gibberella zeae*. Microbiol. Res. 167:608-615.
 31. Stevenson, I. L., and Becker, S. A. W. E. 1972. The fine structure and development of chlamydospores of *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol 18:997-1002.
 32. Sung, J. M., and Cook, R. J. 1981. Effect of water potential on reproduction and spore germination by *Fusarium roseum* 'Graminearum', 'Culmorum', and 'Avenaceum'. Phytopathology 71:499-504.
 33. Walker, J. C. 1971. Fusarium Wilt of Tomato. Monograph No. 6. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. p 56.
 34. Wang, Z. Y., Jenkinson, J. M., Holcombe, L. J., Soanes, D. M., Veneault-Fourrey, C., Bhambra, G. K., and Talbot, N. J. 2005. The molecular biology of appressorium turgor generation by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Biochem. Soc. Trans. 33:384-388.

ABSTRACT

Chen, Yuan-Yu¹, Huang, Jenn-Wen^{1,3}, Wang, Chih-Li^{1,2,3*} 2019.
Analysis of stress resistances of chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. J. Plant Med. 61(4): 21-30.

*Corresponding author, C. L. Wang, E-mail:clwang@nchu.edu.tw

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* is an important fungal pathogen of tomato. It is able to survive in soil for several years, and is one of the important factors resulting in continuous cropping obstacle of tomato. It is considered that chlamydospores are the important survival structure of the pathogen and are more tolerant to environmental stresses than conidia. However, the scientific reports of chlamydospore resistant abilities to environmental stresses are still lacking in studies of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Here, chlamydospores of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 isolate CT-Fo-5 induced from sterilized potting soil broth were used to compare with microconidia on germination under stress conditions and on biological structures. Results indicated that chlamydospores displayed higher inoculum potential of causing tomato seedling wilt than microconidia. Chlamydospores showed higher germination than microconidia under high temperatures, high pH values, high osmotic pressures, high oxidative stresses and high concentrations of Congo red. Germination of chlamydospores was effectively inhibited by high temperature (>60°C) and mancozeb (>50 ppm). In addition, it was observed under fluorescent staining that chlamydospores contain thicker chitin cell wall and more abundant glycogen and lipid than microconidia. The study provides evidences that chlamydospores of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* are more resistant to environmental stresses than microconidia.

Keywords: *Fusarium*, chlamydospore, microconidium, stress, spore germination, spore structure