

由*Botrytis squamosa*引起之韭菜白斑病初報

呂柏寬^{1*}、歐玢晴^{2*}、林瑞珍³

¹ 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局基隆分局花蓮站。花蓮縣花蓮市。

² 中興大學植物病理學系。台中市南區。

³ 行政院農業委員會花蓮區農業改良場。花蓮縣吉安鄉。

* 聯絡作者，E-mail: klpk1@mail.klbaphiq.gov.tw; allenstorm2005@gmail.com

摘 要

呂柏寬、歐玢晴、林瑞珍。2021。由*Botrytis squamosa*引起之韭菜白斑病初報。植物醫學64(1): 21-24。

2020年2月於花蓮縣吉安鄉韭菜田區發生大量葉部病害，病徵呈現紡錘型之白色病斑，經由病徵分離出病原菌，且觀察到新鮮葉片可誘導菌株產孢，依形態學與分子生物學特徵，最後再以離葉接種方式完成病原性檢測，確認 *Botrytis squamosa* 為造成韭菜白斑病病原，為臺灣首度報告之作物病害。

關鍵詞：韭菜 (*Allium tuberosum*)、白斑病、*Botrytis squamosa*

緒 言

韭菜 *Allium tuberosum* 屬於蔥科 (Alliaceae) 多年生小葉菜類，台灣栽培面積達1000公頃，為國內生產重要蔬菜種類，於花蓮縣吉安鄉栽培有70公頃，為當地栽培極具特色之作物⁽¹³⁾。根據2019年臺灣植物病害名彙，已知臺灣收錄之韭菜真菌病害名單僅2屬2種，相關病害資料甚少⁽²⁰⁾。

於2020年2月於花蓮縣吉安鄉韭菜試驗田區發現大量白色斑點葉部病害，於園內全面發病，致使韭菜完全失去商品價值，同期間亦接獲民眾問診及吉安鄉轄內農友栽培田區現場採樣均可發現相似病徵。

為釐清引起韭菜產生之白色病斑之病原為何，本研究蒐集罹病植株並進行病原菌分離、鑑定及接種等程序完成柯霍氏檢定，以確認引起該病害之因子，並以形態觀察及參考Staats等人對於 *Botrytis* 屬之親緣分析結果⁽¹⁷⁾，採用ITS及G3PDH區間進行序列比對鑑定種類。

材料與方法

田間病徵觀察及病原菌分離

2020年2月於花蓮縣吉安鄉韭菜圃採集罹病葉片進行觀察，將罹病葉片病斑之病健交接處組織 (約2*2 mm²)以解剖刀切取，放入含1%次氯酸鈉的漂白水消毒30 sec，再以無菌水潤洗2次，各30 sec後，置於滅菌的擦手紙上陰乾。移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA, potato starch 4 g, sucrose 20 g, agar 20 g, 1L dH₂O)，放置於室內常溫下培養，於3日後挑取菌絲塊純化培養於PDA用於後續試驗。

病原性檢定

菌株HL_ATr-5培養於20℃，每日12小時光照培養1週，以5 mm打孔器打取菌落邊緣菌絲塊作為接種源。本試驗以離葉接種法進行⁽²¹⁾，剪下刈後生長超過15公分的葉片，將葉片剪成約7 cm韭菜葉片段，以滅菌後無菌水進行擦拭，未製造傷口，僅將菌絲塊伏貼於葉片段中央，置於培養皿內並放置潮濕紙巾後封石臘膜保濕，以PDA塊作為對照組，每種處理均6葉片段重複，並將培養皿置於20℃，每日12小時光照培養3日後進行觀察。

形態觀察

選取菌株HL_ATr-5培養於PDA上，置於20℃，12小時光照培養進行菌落觀察。微觀形態觀察另培養於OA培養基(M397, Himedia Laboratories, India)上進行。菌株於OA培養基上，20℃，12小時光照培養2週後。將經1%次氯酸鈉水溶液表面消毒5分鐘之新鮮韭菜葉片覆蓋於培養基之菌落上，並於相同環境持續培養。5日後，挑取於韭菜葉片上之產孢構造進行觀察。

分子鑑定

病原菌全DNA之抽取

測試菌株使用HL_ATr-5菌株，並參考Viogene 基因組 DNA

萃取套組 (Viogene BioTek Corp.)之方法，回溶於 20 μ L 之無菌二次蒸餾水中，保存於-20 $^{\circ}$ C 備用。

DNA以 White et al. (1990) 發表之引子對ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3')、ITS4(5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')進行聚合酶連鎖反應，以 PCR 增幅核糖體內轉錄間隔區 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 之序列。試驗之反應條件如下：95 $^{\circ}$ C 4 min，1個循環；95 $^{\circ}$ C 30 sec、55 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 30 sec，35個循環；72 $^{\circ}$ C 7 min，1個循環；4 $^{\circ}$ C 10 min，1個循環⁽²²⁾。除增幅 ITS外，亦增幅G3PDH序列，所使用之引子對為G3PDHfor (5'- ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA-3')、G3PDHrev(5'- ACCCCACTCGTTGTCGTACCA-3')，以 PCR 增幅甘油醛-3-磷酸脫氫酶(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, G3PDH)之序列。試驗之反應條件如下：95 $^{\circ}$ C 4 min，1個循環；94 $^{\circ}$ C 30 sec、64 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 90 sec，35個循環；72 $^{\circ}$ C 10 min，1個循環(17)。

反應後取5 μ L PCR產物進行膠體電泳分析，確認核酸產物條帶大小後，將核酸產物委請基龍米克斯生物科技有限公司進行定序，定序完成之序列於美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 資料庫進行比對。

結 果

田間病徵

該病害於田間發病情形嚴重，發病率達90%以上，病徵自直徑1-2 mm橢圓形小型病斑，可發展至直徑5-15 mm 紡錘型至橢圓形，部分病斑呈水浸狀，病斑特徵為白色壞疽病斑，而非褐色，有時類似害蟲取食痕跡 (圖一A-B)，罹病後期造成葉片腐爛。

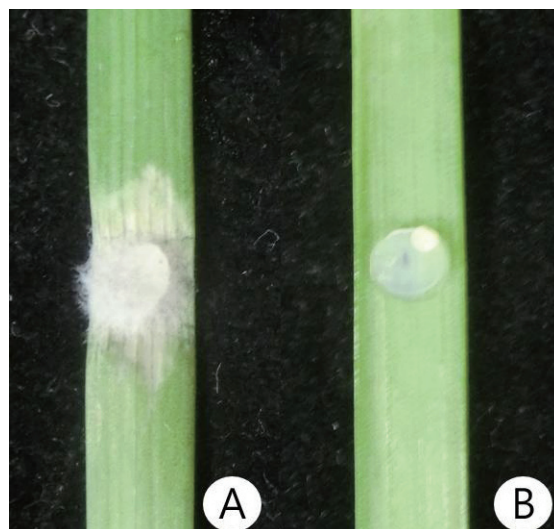
病原性檢定

於接種3日後，PDA塊對照組並未產生病徵，而菌絲塊處理組之各處理葉片段，均產生紡錘至橢圓形水浸狀灰白色斑，自病健處可分離出相同形態之病原菌，完成柯霍氏法則 (圖三A-B)，接種10日後已造成葉片腐爛並於病徵處觀察到著生頁表



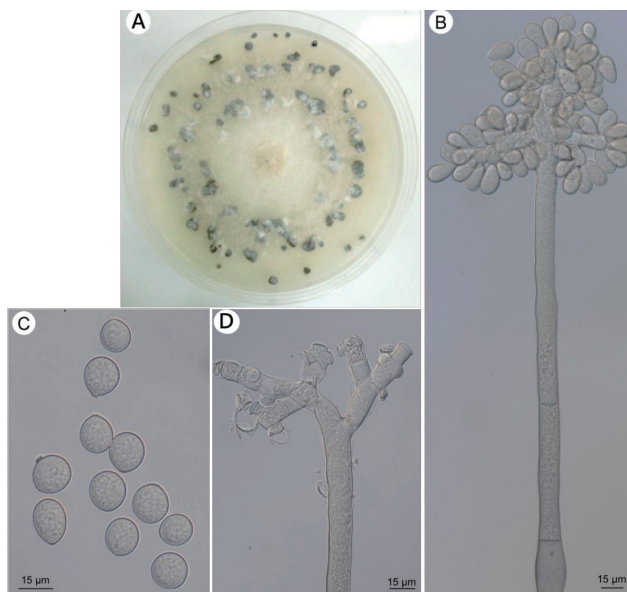
圖一、韭菜白斑病。(A)田間病徵；(B)病斑類似薊馬取食。

Fig. 1. White spot disease on Chinese chives. (A) Symptom in the field; (B) Lesions resemble thrips feeding injury.



圖三、病原菌接種至韭菜葉片3日後之病徵。(A)處理組；(B)對照組。

Fig. 3. Symptom of the disease after inoculating leaf 3 days. (A) Treatment; (B) Control.



圖二、韭菜白斑病原菌型態。(A)菌落生長後期產生菌核；(B)分生孢子梗、產孢細胞及分生孢子；(C)分生孢子；(D)分生孢子梗與產孢細胞。

Fig. 2. Characteristics of the pathogen of white spot on Chinese chives. (A) Sclerotium on the colony; (B) Conidiophore, conidiogenous cells and conidia; (C) conidia; (D) conidiogenous cells.

之深色孢子梗級分生孢子。

形態觀察

HL_ATr-5於PDA上之菌落表面由緻密之白色氣生菌絲組成，反面灰白色至淺褐色。待培養至3周以上，可見許多不規

則狀黑色菌核，略呈同心圓排列，最大可達10 mm (圖二A)。菌株於PDA、OA培養基上培養兩周後皆無觀察到無性繁殖。在OA培養基上表面消毒之韭菜葉片後，約3日後可於葉片上觀察到無性繁殖構造。產孢梗橄欖綠色，頂端較淺，並常有1-3回重複短分支，寬13-16 μm ，最長可達700 μm 。分生孢子淺灰色至透明無色，倒卵形，基部常有截形，長(14-15.5-22 μm (平均 19.1 μm ；標準差 1.80 μm)，寬10-14.5 μm (平均 12.2 μm ；標準差 1.15 μm)，長寬比1.04-1.96 ($n = 35$) (圖二B-C)。經由菌落、孢子特徵可判斷符合 *Botrytis squamosa* 之特徵^(7, 10)。

分子鑑定

核醣體內轉錄間隔區之序列可增幅出510 bp之片段，核酸產物經定序後於NCBI資料庫BLAST比對，與菌株 *B. squamosa* (GenBank no. MH856176)⁽⁴⁾具有99.8%相似度。G3PDH功能性基因增幅出650 bp之片段與 *B. squamosa* 之模式菌株 MUCL 1107 (GenBank no. AJ705037)⁽¹⁷⁾具100 %的相似度。

討 論

B. squamosa 於韭菜上造成病害有紀錄地區僅中國⁽²¹⁾與日本⁽¹⁶⁾，於葉片上病徵呈現白色病斑，而其初期病斑呈現小形白色細點狀形似薊馬嘴咬造成之食痕，另嚴重時可造成葉片枯萎腐爛^(11, 19)，在日本該病害稱為白斑葉枯病，於國內田間觀察時亦可觀察到該小型初期病斑及下位葉腐爛之徵狀。雖然其病斑似蟲害食痕^(11, 19)，但可依據目前田間發生時期作簡易區分，該病害連兩年均於花蓮地區2-3月冬末春初時期發生，該時期當地氣候為低溫連續降雨時期，而薊馬的發生盛期則是集中於夏季乾燥時期⁽²³⁾。

國內目前可考慮屬由 *Botrytis* spp.的病害僅有 *B. cinerea* 造成之洋蔥灰黴病⁽²⁰⁾，然而依據Chilvers等人整理之報告，顯示可感染蔥屬的 *Botrytis* spp.共有6個種類，此6個種類可經由菌株菌落、孢子型態等方式進行鑑定⁽³⁾。本研究之病原菌 *B. squamosa* 具有 *Botrytis* 屬中極大型的分生孢子，可明顯辨別其種類，國內洋蔥、青蔥等重要作物上之灰黴病病斑是否有除 *B. cinerea* 以外之其他種類還需要待進一步調查。

B. squamosa 在OA及PDA培養基上不易產孢的特性與前人記載相符^(3, 21)。因此於本研究中無法進行純培養產生足夠分生孢子進行病原性檢測，故採用菌絲塊進行接種^(19, 21)。過去有部分文獻指出可以透過15-18°C之低溫及近紫外光佐以高溫滅菌之洋蔥或韭菜葉片培養可獲得大量之分生孢子^(5, 14)。然而筆者應用此類方法於臺灣分離之 *B. squamosa* 菌株時，僅能觀察到鮮少產孢，顯示各地區菌株之產孢特性上仍有不同。於病原性檢測時，意外得知若以新鮮韭菜葉片取代高溫滅菌後的葉片誘

導，即可成功誘導 *B. squamosa* 產孢足夠進行形態鑑定，推測可能是新鮮植體內具有促進產孢之成分。本研究首次發現新鮮及滅菌處理之葉片對於 *B. squamosa* 產孢誘導能力有明顯差異。

韭菜白斑病經目前觀察，僅在2至3月期間發生，該期間吉安鄉當地區域為低溫高濕，於無使用農藥管理之田間發病嚴重，初步推測該病害生活史應與 *B. squamosa* 引起之洋蔥葉枯病(BLB)相同^(1, 8)，罹病植株於罹病地下球莖產生菌核，以菌核越冬且菌核上可產生子囊盤或分生孢子束作為初次感染源進行葉片感染^(1, 6)，且菌核可多次產生分生孢子^(5, 10)，而國內韭菜白斑病尚未於田間直接觀察到菌核，推測菌核可能如洋蔥葉枯病相同，產生在較靠地際部球莖部分^(1, 10)。另日本北海道之研究亦指出，該病害可造成韭菜之葉鞘腐敗病，引起下位葉鞘腐爛且可於葉鞘上產生小型黑色菌核⁽¹⁶⁾；Marcuzzo等人亦利用缺光環境誘導大量菌核產生⁽¹⁴⁾，因此防治上應視其為似土傳性病害研擬防治策略，在尚未有相關防治藥劑可使用前應以休耕或輪作非寄主作物為手段。本病原依據過往紀錄，主要感染蔥科作物，在歐美日等地區造成洋蔥、青蔥、蒜等作物重大危害^(2, 9, 16, 18, 19)。上開作物均為國內重要蔥科經濟作物，但國內尚未於這些作物觀察到該病害的發生，推測應與氣候條件相關，國內重要產區中部及南部地區之氣候低溫時期較乾燥，而花蓮地區於低溫時期經常伴隨降雨，容易誘發病害。病害發生地區仍應採取防治措施，輪作上應避免種植其他蔥科作物^(2, 8)。

依據本研究該病害證實由國內首度出現紀錄之 *B. squamosa* 造成的韭菜白斑病，為國內首次報導之病害，中國及日本均提及該病害為韭菜栽培主要且嚴重之病害^(15, 21)，未來建議須持續觀察國內發生狀況、寄主範圍及防治方法之探討，其重要性不可輕忽。

引用文獻

1. Carisse, O., Tremblay, D.M., McDonald, M. R., Brodeur, L. and McRoberts, N. 2011. Management of Botrytis leaf blight of onion: a story of continual improvement and historical success for disease forecasting. *Plant Dis* 95(5):504-514.
2. Carisse, O., Tremblay, D.M.. 2007. Incidence and Significance of Iprodione-Insensitive Isolates of *Botrytis squamosa*. *Plant Dis*. 91(1): 41-46.
3. Chilvers M. I. and du Toit L.J. 2006. Detection and identification of Botrytis species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. *Plant Health Progress*, p. 113.
4. D. Vu, M. Groenewald, M. de Vries, T. Gehrman, B. Stielow, U. Eberhardt, A. Al-Hatmi, J.Z. Groenewald, G. Cardinali, J. Houbaken, T. Boekhout, P.W. Crous, V. Robert and

- G.J.M. Verkley. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.* 92: 135-154.
5. Ellerbrock, L.A. and Lorbeer, J.W. 1977a. Sources of primary inoculum of *Botrytis squamosa*. *Phytopathology*, 67: 363 – 372.
 6. Ellerbrock, L.A. and Lorbeer, J.W. 1977b. Survival of sclerotia and conidia of *Botrytis squamosa*. *Phytopathology*, 67: 219 – 225.
 7. Ellis, M. B. 1971. *Dematiaceae Hyphomycetes*. CAB Publishing. Wallingford. pp. 178-184.
 8. EPPO. 1994. EPPO Standard PP 2/1(1) Guideline on good plant protection practice: Allium crops. 2-12.
 9. Hannan R. M. and Sorensen E.J. 2001. Crop profile for garlic in Washington. Washington State University Cooperative Extension. pp.1-15.
 10. Hickman, C.J. and Ashworth D. 1943. The occurrence of *Botrytis* spp. on onion leaves with special reference to *B. squamosa*. *T. Brit. Mycol. Soc.* 26:153-157.
 11. Hokkaido Reaserch Organization. n.d. White Spot Leaf Blight Disease. Retrieved June 23, 2021. https://www.hro.or.jp/list/agricultural/research/dounan/byoutyu/nira/nira_hakuhan_byoucho_sindan.html (In Japanese).
 12. Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B. 2004. The ecology of Botrytis on plant surfaces. *Botrytis biology, pathology and control*. pp 29-52.
 13. Hu, C. J. 2014. Response Management for the Improvement of Summer Chinese Chive Production. *Hualien District Agricultural News* (87):6-8. (in Chinese).
 14. Marcuzzo, L., Nascimento, A. and Kotkoski, B. 2017. Technique for inducing *Botrytis squamosa* sclerotium formation in vitro. *Summa Phytopathol* 43: 251.
 15. Misawa, T. 2010. Control Effectiveness of Foliar Application of Several Chemical and Biological Control Agents against Leaf Blight of Chinese Chive Caused by *Botrytis squamosa* and Its Duration. *Ann. Rept. Plant Prot. North Japan* 61:85-89. (in Japanese)
 16. Misawa T. 2017. Leaf Sheath Rot of Chinese Chive Caused by *Botrytis squamosa*. *Ann. Rept. Plant Prot. North Japan* 68:81-84. (in Japanese)
 17. Staats, M., Baarlen, P. and Kan, J.A.L. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus Botrytis and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* 22: 333 – 346.
 18. Takeuchi, T., Minegishi, N., Sakai, K., Shiraishi, T. and Umemoto, S. 1998. Small Sclerotial Rot of Welsh Onion (*Allium fistulosum*) Caused by *Botrytis squamosa*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 129-132.
 19. Tanović, B., Koščica, M., Hrutić, J., Mihajlović, M., Trkulja, V. and Delibašić, G. 2019. *Botrytis squamosa* - the causal agent of onion leaf blight in Bosnia and Herzegovina. *Pesticides & Phytomedicine* 34(1):9-17.
 20. TPS. 2019. List of disease in Taiwan. BAPHIQ. pp. 10-12.
 21. Tsui, Y. G., Chung, H. M., Li, Y. L., Yin, S. H., Chung, M. and Ma, P. F. 2020. Identification and Biological Characteristics of the Pathogen of Chinese Chive Botrytis Leaf Blight. *Nor. Horti* 4:14-19.
 22. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp. 315 – 322.
 23. Yang, S. C and Yu, S. W. 2012. Occurrence and management of diseases and pests of Liliaceae crops. *TACTRI*. p. 36. (in Chinese)
 24. Zeng, X. X., Zeng, G. Q., Chang, C. A., Tsay, T. T. and Yan, X. F. 2018. List of Plant Diseases in Taiwan. *The Phytopathological Society of the Republic of China*. pp.50-51. (in Chinese)

ABSTRACT

Lu, P. K.^{*}, Ou, J. H.^{*} and Lin, R. J. 2021. Chinese chive White spot disease caused by *Botrytis squamosa*. *J. Plant Med.* 64(1): 21-24.

^{*}Corresponding author, Lu, P. K., klpkl@mail.klbaphiq.gov.tw; Ou, J. H. allenstorm2005@gmail.com

In February 2020, a serious leaf disease occurred in the Chinese chive field in Ji'an Township, Hualien County. The symptoms showed spindle-shaped white lesions. The pathogen was isolated from the symptoms, and the pathogen sporulated through the fresh leaf. Its morphology and molecular characteristics and the pathogenicity test confirmed that *Botrytis squamosa* caused white spot disease of Chinese chive, and it was the first crop disease caused by *B. squamosa* in Taiwan.

Keywords: *Allium tuberosum*, white spot, *Botrytis squamosa*