

## 台灣芥菜黃葉病菌的鑑定及其致病性

許雅婷<sup>1</sup>、李思儀<sup>1</sup>、洪爭坊<sup>2</sup>、黃振文<sup>1\*</sup><sup>1</sup> 國立中興大學植物病理學系，402台中市南區興大路145號<sup>2</sup> 農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所，830 高雄市鳳山區文龍東路530號；目前連絡地址:美國喬治亞大學植物病理系

\* 聯絡作者，E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw

## 摘要

許雅婷、李思儀、洪爭坊、黃振文。2017。台灣芥菜黃葉病菌的鑑定及其致病性。植物醫學59(1\_2): 37-44。

西元2010至2016年間在雲林西螺、高雄梓官、桃園蘆竹及台中等地區之蔬菜栽培田，發現芥菜植株呈現下位葉黃化、單側偏上生長、矮化等現象，其莖基部的維管束則有褐化病徵。將芥菜罹病植株之褐變部位進行可疑病原菌的分離，共獲得8個菌株，經過柯霍氏法則系列驗證，結果顯示各菌株對芥菜皆具有不同程度之致病性。本病原菌FOCN05與FOCN38菌株生長於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基之菌落，初期為白色菌絲向四周延伸，在光照下逐漸轉變為淺紫色，後期於菌落表面出現散生的橘黃色孢子叢，生長最適溫度為28°C。本病菌有大、小分生孢子及厚膜孢子三種形態，大分生孢子呈鐮刀狀，無色，平均大小為34.4~36.8x3.9~4.5 μm；小分生孢子數量較大分生孢子多，橢圓形，單胞無色，平均大小為6.4~8.2x2.5~3.1 μm；厚膜孢子呈圓形，多以間生或頂生的方式形成於菌絲上，平均大小為9.6x8.7μm。將12種十字花科蔬菜及其他蔬菜種子，分別播種於FOCN05與FOCN38菌株之病菌土中，結果發現本病原菌對葫蘆科、菊科、豆科、茄科等作物不具致病性外，亦不感染甘藍與芥藍植株；惟對芥菜、白菜及蘿蔔皆有致病性。綜合本研究之菌株形態、致病特性及核糖體DNA基因間隔區間 (intergenic spacer)之親緣性分析結果，筆者建議將台灣的芥菜黃葉病菌學名鑑定為*Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae* (Enya, Togawa, Takeuchi & Arie)。

關鍵詞：甘藍、芥藍、尖鐮孢菌、黃葉病、芥菜、病原性、蘿蔔

## 緒言

芥菜 (*Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss) 為十字花科蕓薹屬蔬菜作物，分為莖用及葉用芥菜兩種栽培品種，主要供鮮食用以及製作成酸菜、福菜、梅乾菜等加工產品，性耐寒、較不

耐旱，栽培最適溫度為16~23°C，最適土壤pH值為5.5~6.8，多為冬季裡作栽培，主要栽培期間為10~12月的秋冬季節，亦可調節於8月初開始定植、9月中旬收穫<sup>(1)</sup>。根據農委會農糧署統計，2015年大芥菜總種植面積為1,265公頃，總產量達28,779公噸，種植範圍分布於新北、桃園、新竹、苗栗、彰化、雲林及嘉義等地，其中雲林與嘉義為大宗<sup>(1)</sup>。

尖鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum* Schl.) 在台灣為害十字花科蔬菜的報導，首次於西元1981年在台中新社發現*F. oxysporum* Schl. f. sp. *raphani* Kend. & Snyder引起蘿蔔黃葉病<sup>(12)</sup>，隨後莊氏等人 (2012) 針對甘藍黃葉病菌 [*F. oxysporum* Schl. f. sp. *conglutinans* (Wr.) Snyder & Hans] 進行鑑定，並探討其對於其他十字花科蔬菜之致病性反應<sup>(6)</sup>，然而有關芥菜黃葉病，除羅與孫氏 (1986) 曾有初步比較芥藍、芥菜及蘿蔔黃葉病菌株特性外，卻沒有進一步的研究報導<sup>(13)</sup>。近年來，從2010至2016年間筆者等陸續於雲林西螺、高雄梓官、桃園蘆竹及台中等地區之蔬菜栽培田發現芥菜植株出現下位葉黃化、單側偏上生長、矮化等病徵 (圖一A)，將其莖基部切開，可發現維管束呈現褐化的現象 (圖一B)；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所引起。本研究主要目的即在針對芥菜黃葉病組織分離到的尖鐮孢菌分析它們的形態與致病性，進而確定病原菌的分化種學名。

## 材料與方法

## 供試菌株來源

西元2010年及2012年於雲林縣西螺鎮、2014年於高雄市梓官區及桃園市蘆竹區、2016年於台中市南區，陸續在各蔬菜栽培區發現疑似罹患黃葉病的芥菜植株，採集罹病植株進行組織分離，切取罹病株之褐化維管束組織，以1% (v/v) 次氯酸鈉 (NaClO) 水溶液消毒30秒後，再以無菌水漂洗三次，並以拭紙巾吸乾多餘的水分，再移到2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar, WA, Difco, USA) 與五氯硝苯選擇性培養基 [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g、Agar 20 g、Water 1L、Peptone 15 g，經



圖一、罹患芥菜黃葉病之病徵：(A)下位葉黃化、葉片單側偏上生長；(B)莖基部維管束呈現褐化(箭頭)。

**Fig. 1.** The symptoms of mustard plant yellows caused by *Fusarium oxysporum*: (A) yellowing and epinasty on the lower leaves; (B) brown discoloration (arrowed) in the root and stem vascular system.

高溫高壓 (121°C, 15 lb/in<sup>2</sup>) 滅菌後加入Pentachloronitrobenzene (PCNB, Sigma-Aldrich, USA) 1 g、Streptomycin sulfate 500 mg、Neomycin trisulfate salt hydrate 100 mg] (15, 24) 上，於28°C培養4天。待菌絲長出後，切取菌絲尖端移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA; Difco, USA) 斜面上，一週後，刮取孢子進行單孢分離培養。

#### 供試菌株之培養與保存

將各供試菌株每隔一個月以單孢分離技術更新培養於PDA斜面中，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50 cm，照射1700~2200 Lux) 下，以避免菌株變異；此外利用砂管 (10% loamy sand + 1% agar) 置於室溫下以保存菌種。

#### 病原性之測定

將由芥菜罹病株分離而得之供試菌株，分別培養於PDA斜面，2星期後加入無菌水配製成各菌株之孢子懸浮液 (10<sup>5</sup> conidia/ml)，將孢子懸浮液灌注在2星期大之芥菜幼苗莖基部根圈土壤的表面，每株植株施以5 ml之孢子懸浮液，對照未接種病原菌組之植株則施以5 ml之無菌水，並移置於溫室 (24°C~28°C) 中，21天後觀察並記錄各處理植株的罹病度<sup>(7)</sup>，每處理各3重複，每重複有3棵植株。並將罹病植株取回，重新進行分離與鑑定。本試驗以SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, N. C.) 軟體進行變異數分析 (analysis of variance, ANOVA)，並採用杜凱確實差異分析法 (Tukey's honestly significant difference test) 進行分析比較。

#### 病菌土製作與病原菌密度測定

##### (一) 病菌土製作

將90 g的砂土、10 g荷蘭泥炭土 (Bas Van Burren No. 4 peat

moss, Maasland, the Netherlands)及5 g的玉米粉混勻後，加入20~40 ml的去離子水，經高溫高壓 (121°C, 1.5 lb/in<sup>2</sup>) 滅菌後製成玉米砂培養基，分別接種20ml FOCN05與FOCN38菌株之孢子懸浮液 (10<sup>7</sup> spores/ml)，將水分控制在30%左右，之後放入28°C的無光照定溫箱中，每隔2~3天搖動一次，使白色菌絲與培養基質均勻混合，14天後，分別將其混入以18 mesh網篩過篩後之田土，以1:9 (v/v) 的比例均勻拌合，水分含量30% (w/w)，若有菌絲生長即翻動，待其風乾後過篩，置於陰涼處，作為接種用的病菌土。

##### (二) 病原菌密度測定

將製作完成的病菌土，分別秤取10 g加入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無菌水配製成10<sup>-3</sup>稀釋液，依序配得10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>及10<sup>-6</sup>之病土稀釋液。之後，將各濃度的稀釋液取1 ml均勻塗佈於PCNB選擇性培養基上，5天後計算平板上出現之菌落數，即可推估製作完成之病菌土中病原菌的密度<sup>(6, 15)</sup>。

#### 病原菌對不同科作物之致病性

將FOCN05與FOCN38菌株所製成的病菌土與不帶病原菌的荷蘭泥炭土 (BVB No. 4) 均勻混合，稀釋成1×10<sup>4</sup> cfu/g medium的病菌栽培介質，隨後播種青和種芥菜 (*Brassica juncea*, 農友)、甜美人種西瓜 (*Citrullus lanatus*, 農友)、秀絲種胡瓜 (*Cucumis sativus*, 農友)、三尺青皮豇豆 (*Vigna unguiculata*, 明豐)、農友162敏豆 (*Phaseolus vulgaris*, 農友)、大將種萵苣 (*Lactuca sativa*, 農友) 與農友301番茄 (*Lycopersicon esculentum*, 農友) 等不同科作物之種子，隨即移置於溫室 (24°C~28°C) 中，28天後觀察各作物的發病情形，並記錄其罹病情形。此外也以未混有*F. oxysporum*病菌土之荷蘭泥炭土種植前述7種作物充作對照組。每處理有5重複，每重複播種5粒種子。

#### 病原菌對十字花科蔬菜作物之致病性

將FOCN05與FOCN38菌株所製成的病菌土與不帶病原菌的荷蘭泥炭土均勻混合，稀釋成1×10<sup>4</sup> cfu/g medium的病菌栽培介質，隨後分別播種包心種芥菜 (*Brassica juncea*, 農友)、括菜青種芥菜 (*Brassica juncea*, 蔬菜之家)、青和種芥菜 (*Brassica juncea*, 農友)、雪裡紅種芥菜 (*Brassica juncea*, 農友)、高峰種甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*, 農友)、夏秋種甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*, 農友)、翠津種芥藍 (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*, 農友)、蕙津種芥藍 (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*, 農友)、鳳山白菜 (*Brassica rapa* var. *chinensis*, 農友)、純秀種小白菜 (*Brassica rapa* var. *chinensis*, 農友)、明和種蘿蔔 (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*, 農友) 及明利種蘿蔔 (*Raphanus sativus* var.

*longipinnatus*, 農友)等共12種十字花科作物的種子, 並移置於溫室 (24°C~28°C)中, 28天後觀察各植株的罹病度與發病率。另同時以未混*F. oxysporum*病菌土之荷蘭泥炭土種植上述12種作物作為對照組。每處理有4重複, 每重複播種5粒種子。

### 病害調查方法

本研究之病害紀錄依據Enya氏等人 (2008)報導, 將罹病植株受害嚴重程度分成4等級, 其中0級為植株健康, 無任何病徵; 1級為植株出現矮化、葉片偏上生長, 但無黃化病徵; 2級為植株葉片黃化、植株半側萎凋; 3級為植株全株失水萎凋、植株死亡<sup>(7)</sup>, 並依照下列公式計算植株罹病度 [Disease severity (%)], 公式中n<sub>0</sub> ~ n<sub>3</sub>表示各罹病等級的植株數; N表示總植株數。

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

除觀察黃葉病外部病徵, 如植株矮化、葉片偏上生長或黃化、植株呈現半側萎凋等植株發病情形外, 亦同時記錄植株內部維管束病徵, 若植株莖基部內部組織呈現褐化, 即判定為發病植株, 並依照下列公式計算各植株的發病率 [Disease incidence (%)]。

$$\text{Disease incidence (\%)} = \frac{\text{發病植株數量}}{\text{種植植株總數}} \times 100$$

### 病原菌之形態

將FOCN05與FOCN38菌株分別培養於PDA平板與斜面培養基上, 置於室溫 (25~28°C), 每天12小時光照, 5-7天後觀察菌落、形態、色素及孢子叢 (sporodochium), 在光學顯微鏡下觀察孢子形態, 並以測微尺測量小孢子、大孢子及厚膜孢子的大小各100個, 換算各平均值。

### 溫度對於十字花科黃葉病菌菌絲生長的影響

將FOCN05與FOCN38菌株單孢培養在PDA平板上7天, 在菌落邊緣以4號打孔器切取直徑5 mm之菌絲塊, 分別移至新的PDA平板中央, 然後分別移置於8、12、16、20、24、28、32及36°C等8種不同溫度的定溫箱中培養, 7天後記錄各溫度處理之菌落直徑, 每處理各有3重複。

### 芥菜黃葉病菌之分子鑑定

#### (一) 芥菜黃葉病菌之DNA萃取

將FOCN05與FOCN38菌株單孢培養在PDA斜面上2週後, 以移植針分別刮取兩菌株之菌絲0.1-0.3 g到研鉢中, 加入液態氮將菌絲磨成粉狀後, 依照Plant Genomic DNA Purification Kit (Protech Technology Enterprise Co. Ltd., Taiwan)之步驟, 分別萃取兩菌株之基因組DNA。在微量離心管中加入360 μl的

Extraction Solution E1、40 μl的Extraction Solution E2與4 μl的RNase A solution, 劇烈震盪10秒, 接著將粗萃取液置於65°C乾浴槽中20分鐘, 不定時上下翻轉混合均勻, 再加入130 μl的Solution P1, 和緩地上下翻轉以使其充分混合, 放置碎冰中5分鐘後, 在室溫下以12,000-14,000 rpm離心5分鐘, 將上述樣品溶液移至裝有收集管 (Collection Tube)的離心篩 (Filter Column)中, 全速離心2分鐘, 然後吸取濾液至乾淨的1.5 ml微量離心管, 加入1.5倍體積的Binding Buffer (已預加入Ethanol), pipetting混和均勻。再取650 μl的樣品溶液至已套入收集管 (Collection Tube)的離心純化管柱 (Binding Column)中, 全速離心1分鐘, 丟棄離心管中的液體後再次重複上述加入樣品溶液、離心及丟棄的步驟, 之後以600 μl的Wash Buffer清洗純化管柱中的沉澱物兩次, 再將純化管柱連同收集管進行空管離心5分鐘後, 丟棄收集管, 將純化管柱套至另一個乾淨的微量離心管中, 並置於60°C乾浴槽中5-10分鐘, 使酒精揮發乾淨。在純化管柱中加入70 μl已預熱至60-70°C的Elution Solution後, 靜置2分鐘。全速離心2分鐘。離心後, 離心管中的液體即為純化完成的真菌基因組DNA。DNA濃度和純度是以超微量分光光度計 (JENWAY/Genova nano BY737501, Bibby Scientific Ltd., UK) 測量波長在260和280 nm的吸光值, 隨後將DNA樣本放置在-20°C長期保存。

#### (二) IGS區域DNA片段之增幅

將前述萃取所得之菌株總DNA作為模板, 以Prime Thermal Cycler熱循環儀 (Model: TC-96-G, Infinigen Biotechnology Inc., USA) 進行核糖體DNA基因間隔區間 (intergenic spacer region, IGS region)之聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR), 其增幅之引子對為CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3')、CNS1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3')<sup>(14)</sup>。反應液為2 μl模板DNA、10mM引子對各1 μl、25 μl PCR Fast-Run Master Mix (1.5 u of Taq DNA polymerase, reaction buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 μM dNTP and enzyme stabilizer; Protect Technology Co.), 總體積為50 μl。反應條件為: 起始為95°C下5分鐘, 接著以94°C變性 (Denaturing) 1分鐘、58°C黏合 (Annealing) 90秒、72°C延伸 (Extension) 3分鐘等3個步驟進行循環, 共38個循環, 最後再以72°C延伸10分鐘後保存於4°C中<sup>(7)</sup>。之後分別取5 μl之反應完成的產物於1.5% (w/v)瓊脂凝膠 (agarose)及適量之0.5X TAE buffer, 以100伏特電壓進行電泳分析30分鐘, 經溴化乙錠 (Ethidium Bromide, EtBr)染色5分鐘後, 置於UV照相系統 (S-2000, Alpha innotech CO.)中分析記錄結果。將有出現欲增幅之目標條帶的PCR產物送交源資國際生物科技股份有限公司 (臺中, 臺灣), 並配合Mbofung氏等人 (2007)所設計的中間引子進行定序<sup>(14)</sup>。

#### (三) 分子親緣性分析

將定序後的FOCN05與FOCN38菌株之IGS核酸序列以CLC

Main Workbench Version 7.6.4軟體進行分析與組合，再以Clustal W作基因比對 (align)，將排序後的序列利用MEGA6軟體<sup>(26)</sup>進行系統親緣性分析，以近鄰結合法 (Neighbor-joining method, NJ)<sup>(19)</sup>及複合概似法 (Maximum Composite Likelihood method)<sup>(25)</sup>構築親緣樹，並進行1000次的引導式再取樣分析(bootstrap analysis)<sup>(8)</sup>以計算親緣樹狀圖各個分支的統計支持度。分析過程加入由NCBI GenBank資料庫中的其他十字花科黃葉病菌之分化種*F. oxysporum* f. sp. *raphani*、*F. o.* f. sp. *rapae*、*F. o.* f. sp. *conglutinans*、*F. o.* f. sp. *matthiolae*的IGS核酸序列一併分析，並以*F. fujikuroi* NRRL13566之IGS核酸序列充作外群 (表一)。

## 結果

### 供試菌株分離與病原性測定

將芥菜罹病株組織分離後分別獲得FOCN05、FOCN36、FOCN38、MA-1、MF-3、ML1-1、ML3-2及ML6-1等8個菌株，將此8個菌株以孢子懸浮液接種芥菜植株，結果發現本試驗所

分離之8個菌株對芥菜均具有不同程度的致病力 (圖二)，且可由接種過的病株重新分離到相同的病原菌。其中以FOCN05與FOCN38菌株的致病力最強 (圖二)，故選為本研究之供試菌株進行後續試驗。

### 病原菌對不同科作物之致病性

將芥菜以及葫蘆科 (西瓜、胡瓜)、豆科 (豇豆、敏豆)、菊科 (萵苣)、茄科 (番茄)等不同科作物種植於病菌土後，於溫室栽培28天，觀察各作物的罹病狀況，結果僅芥菜出現矮化、萎凋及死亡的病徵，其他科作物則均未有任何病徵出現 (表三)。

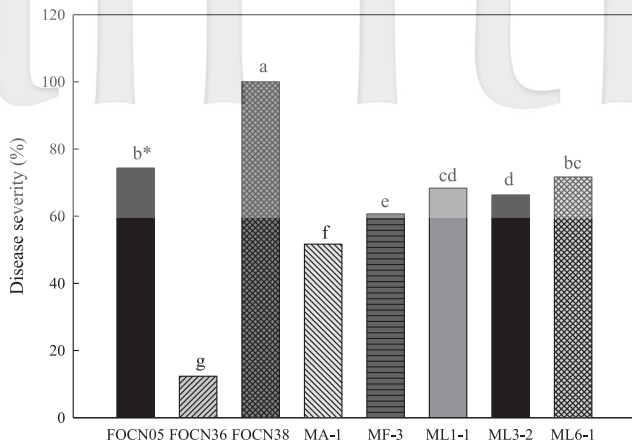
### 病原菌對不同十字花科蔬菜作物之致病性

將芥菜、甘藍、芥藍、白菜及蘿蔔等12種十字花科蔬菜種子，分別播入FOCN05與FOCN38菌株之病菌土 ( $10^4$  cfu/ g medium)中，於28天後觀察各處理之病徵，並計算其罹病度與發病率，結果發現兩供試菌株對於芥菜、白菜、蘿蔔皆有致病性，但對甘藍與芥藍植株則均無病徵出現 (圖四與表四)。其

表一、本研究進行親緣性分析所使用之參考菌株

TABLE 1. The reference isolates used for phylogenetic analysis in this study

Isolate designation	Host/substrate	Species/forma specialis	Geographic origin	Accession no	Reference
Ta-8	<i>Brassica rapa</i> var. <i>rosularis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Shizuoka, Japan	AB306834	Enya <i>et al.</i> , 2008
100005 (MAFF240321)	<i>B. rapa</i> var. <i>perviridis</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Tokyo, Japan	AB306825	Enya <i>et al.</i> , 2008
100006 (MAFF240322)	<i>B. rapa</i> var. <i>perviridis</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Tokyo, Japan	AB306826	Enya <i>et al.</i> , 2008
100053	<i>B. rapa</i> subsp. <i>rapa</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Chiba, Japan	AB306802	Enya <i>et al.</i> , 2008
100128	<i>B. rapa</i> subsp. <i>rapa</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Chiba, Japan	AB306808	Enya <i>et al.</i> , 2008
9324 - 1	<i>B. rapa</i> subsp. <i>rapa</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Chiba, Japan	AB306803	Enya <i>et al.</i> , 2008
9351-1	<i>B. rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Chiba, Japan	AB306829	Enya <i>et al.</i> , 2008
Ta-6	<i>B. rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	Shizuoka, Japan	AB306832	Enya <i>et al.</i> , 2008
100019	<i>B. oleracea</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	Tokyo, Japan	AB306796	Enya <i>et al.</i> , 2008
100020	<i>B. oleracea</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	Aichi, Japan	AB306797	Enya <i>et al.</i> , 2008
R269	<i>B. oleracea</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	The Netherlands	AB306800	Enya <i>et al.</i> , 2008
ATCC52557	<i>B. oleracea</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> race 1	Wisconsin, USA	GQ914767	Srinivasan <i>et al.</i> , 2010
ATCC16600	<i>B. oleracea</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	North Carolina, USA	GQ914766	Srinivasan <i>et al.</i> , 2010
ATCC58385	<i>B. oleracea</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> race 2	Unknown	GQ914770	Srinivasan <i>et al.</i> , 2010
ATCC16602	<i>Matthiola incana</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>matthiolae</i> race 1 (synonym: <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>matthioli</i> )	USA	GQ914764	Srinivasan <i>et al.</i> , 2010
ATCC16603	<i>M. incana</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>matthiolae</i> race 2	USA	GQ914769	Srinivasan <i>et al.</i> , 2010
851209g (MAFF240332)	<i>M. incana</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>matthiolae</i>	Tochigi, Japan	AB306842	Enya <i>et al.</i> , 2008
ATCC58110	<i>Raphanus sativus</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Unknown	GQ914763	Srinivasan <i>et al.</i> , 2010
ATCC16601	<i>R. sativus</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	USA	GQ914765	Srinivasan <i>et al.</i> , 2010
NRRL22553	<i>R. sativus</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Germany	FJ985463	O'Donnell <i>et al.</i> , 2009
NRRL53154	<i>R. sativus</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Korea	FJ985676	O'Donnell <i>et al.</i> , 2009
100013 (MAFF240328)	<i>R. sativus</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Tokyo, Japan	AB306835	Enya <i>et al.</i> , 2008
MAFF731043	<i>R. sativus</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Iwate, Japan	AB306840	Enya <i>et al.</i> , 2008
R238	<i>R. sativus</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	The Netherlands	AB306841	Enya <i>et al.</i> , 2008
NRRL13566	<i>Oryza sativa</i>	<i>F. fujikuroi</i> (outgroup)	Taiwan	AY249382	Schweigkofler <i>et al.</i> , 2004



圖二、不同芥菜黃葉病菌菌株對芥菜植株之致病性比較。

**Fig. 2.** Comparison of pathogenic virulence of eight isolates of *Fusarium oxysporum* on mustard plants. \*Means (n = 3) in each column followed by the same letter do not differ significantly ( $P = 0.05$ ) according to Tukey's honestly significant difference test.

表三、芥菜黃葉病菌FOCN05與FOCN38菌株之寄主範圍測試

**TABLE 3.** Host range test of *Fusarium oxysporum* isolates FOCN05 and FOCN38.

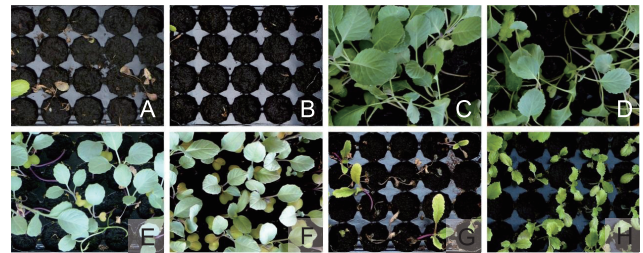
Bacterial strain	Pathogenicity reaction <sup>1</sup>	
	FOCN05	FOCN38
Mustard ( <i>Brassica juncea</i> )	+	+
Cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> )	-	-
Watermelon ( <i>Citrullus lanatus</i> )	-	-
Cowpea ( <i>Vigna unguiculata</i> )	-	-
Common bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	-	-
Lettuce ( <i>Lactuca sativa</i> )	-	-
Tomato ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	-	-

<sup>1</sup> +: Yes; -: No.

中FOCN38菌株較FOCN05菌株致病力強，接種FOCN38的白菜、蘿蔔植株之罹病度與發病率皆達70%以上，並且可感染芥菜植株達100%，即對菌株的原始寄主具有較高的致病力(表四)。

### 病原菌之形態與特徵

FOCN05與FOCN38菌株於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基平板上，菌落生長初期為白色菌絲向四周延伸，在光照下逐漸轉變成淺紫色，後期於菌落表面出現散生的橘黃色孢子叢(sporodochia)，並可在試管壁觀察到細小的菌絲結(表二與圖三)。兩供試菌株皆有三型孢子，包含大、小分生孢子及厚膜孢子(圖三)，菌株間之孢子大小彼此無太大差異，大分生孢子呈鐮刀狀，無色，平均大小為34.4~36.8×3.9~4.5 μm；小分生孢子為橢圓形，單胞無色，呈假頭狀排列，比大分生孢子有較多



圖四、芥菜黃葉病菌FOCN38菌株對不同十字花科作物之病原性測試。(A)青和品種之芥菜；(B)雪裡紅品種之芥菜；(C)高峰品種之甘藍；(D)夏秋品種之甘藍；(E)翠津品種之芥藍；(F)蕙津品種之芥藍；(G)純秀品種之小白菜；(H)明利品種之蘿蔔。

**Fig. 4.** Pathogenicity tests of *Fusarium oxysporum* isolate FOCN38 obtained from diseased mustard crops on different species of Brassicaceae. A: Mustard cv. Ching-He; B: Mustard cv. Sueh-Li-Hung; C: Cabbage cv. Summer Summit; D: Cabbage cv. Summer Autumn; E: Chinese kale cv. Tsuei-Jin; F: Chinese kale cv. Wai-chun; G: Pak choi cv. Chuen-Shiou; H: Radish cv. Mary.

表四、芥菜黃葉病菌FOCN05與FOCN38菌株對不同十字花科蔬菜之病原性

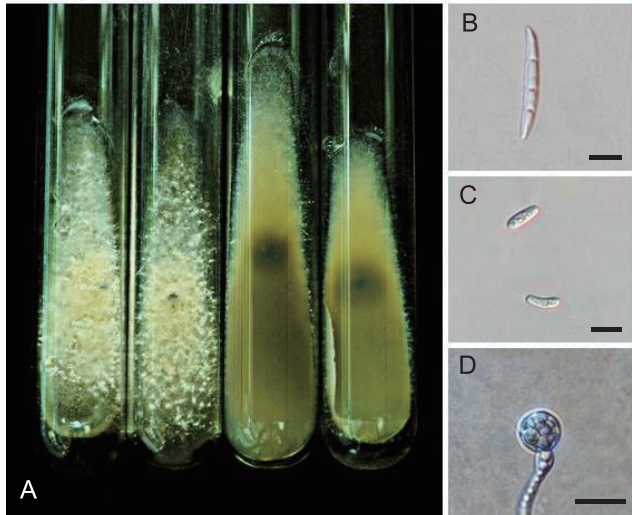
**TABLE 4.** Pathogenicity test of *Fusarium oxysporum* isolates FOCN05 and FOCN38 on twelve cruciferous vegetables.

Crop name	Scientific name (Cultivar)	Disease severity(%)		Disease incidence(%)	
		FOCN05	FOCN38	FOCN05	FOCN38
Mustard	<i>Brassica juncea</i> subsp. <i>integrifolia</i>				
	(Beu-Sin)	60	93	60	90
	(Gua-Tsai-Ching)	46	98	46	100
	(Ching-He)	72	100	65	100
	(Sueh-Li-Hung)	75	100	75	100
Cabbage	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>				
	(Summer Summit)	0	0	0	0
	(Summer Autumn)	0	0	0	15
Chinese kale	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>				
	(Tsuei-Jin)	0	0	0	0
	(Wai-Chun)	0	0	0	15
Pak choi	<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i>				
	(Feng-Shan)	0	82	0	70
	(Chuen-Shiou)	33	74	35	83
Radish	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>				
	(Ming-Ho)	0	90	0	81
	(Mary)	77	98	70	95

的數量，平均大小為6.4~8.2×2.5~3.1 μm；厚膜孢子呈圓形，多以間生或頂生的方式於菌絲上形成，平均大小為9.6×8.7 μm(表二)。依上述形態特徵，參考Snyder與Hansen氏的分類系統<sup>(16, 22)</sup>，確定兩菌株歸屬於*Fusarium oxysporum* Schl.。

表二、芥菜黃葉病菌FOCN05及FOCN38菌株之菌落形態與孢子大小  
**TABLE 2.** Morphology of *Fusarium oxysporum* isolates FOCN05 and FOCN38 obtained from diseased mustard plants.

Items	FOCN05	FOCN38
Morphology of colonies on PDA	Purple Sporodochia over mycelia, light orange	Purple Sporodochia over mycelia, light orange
Size of macroconidia	36.8×4.5 μm (25.0~52.7×2.7~6.9 μm)	34.4×3.9 μm (19.0~65.1×2.2~5.5 μm)
Size of microconidia	6.4×2.5 μm (3.3~12.7×1.2~4.2 μm)	8.2×3.1 μm (4.8~14.8×1.9~4.4 μm)
Size of chlamydo spores	9.6×8.7 μm (4.1~15.3×2.0~14.1 μm)	9.6×8.7 μm (6.0~14.2×5.8~13.5 μm)



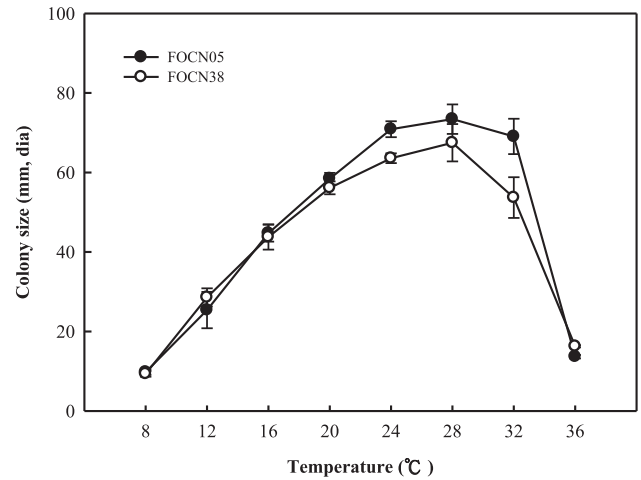
圖三、芥菜黃葉病菌之形態。A：在PDA培養基斜面上之菌落形態；B：大孢子；C：小孢子；D：厚膜孢子。  
**Fig. 3.** Colonies and spore morphologies of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from diseased mustard plants. A: Colonies on PDA slants; B: Macroconidium; C: Microconidium; D: Chlamydo spore. (Bar = 10 μm)

### 溫度對芥菜黃葉病菌菌絲生長的影響

在不同溫度下將FOCN05與FOCN38菌株培養7天，病原菌之菌落大小呈現常態生長曲線，在8~36°C間，菌落生長直徑隨溫度上升而愈大，直到溫度高於28°C後，菌絲生長則隨溫度上升而下降，其中溫度低於16°C及高於32°C時，菌絲生長會受到抑制，兩菌株皆以28°C為最佳生長溫度(圖五)。

### 病原菌之分子親緣性分析

利用CNL12、CNS1引子對進行聚合酶連鎖反應，增幅FOCN05及FOCN38兩菌株之IGS序列，電泳分析後可知增幅出的專一性條帶長度約為2.6 kb。進一步，將所得之產物定序



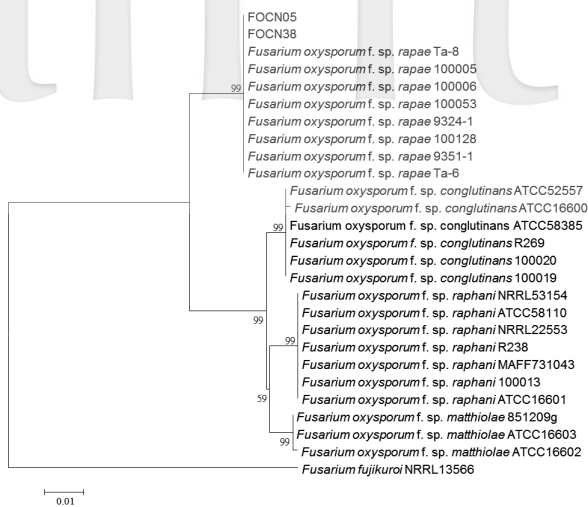
圖五、溫度對芥菜黃葉病菌菌絲生長之影響。

**Fig. 5.** Effect of temperatures on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* isolates FOCN05 and FOCN38 obtained from diseased mustard plants on potato dextrose agar plate.

後，將兩供試菌株序列與NCBI Genbank資料庫的其他十字花科分化種IGS序列以Clustal W軟體進行比對，並採用MEGA6軟體以近鄰結合法構築出核酸序列總長度為642 bp之親緣樹，結果顯示FOCN05及FOCN38兩菌株序列與*Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae*歸屬於同一個支序群 (clade)，其他十字花科分化種則被歸屬至另一支序群，兩主要支序群的支持度 (bootstrap value) 皆為99，顯示親緣樹之可信度高(圖六)。FOCN05及FOCN38之IGS序列已上傳登錄於 GenBank中，其accession number分別為LC311340及LC311342。

## 討論

西元1895年，Smith氏於美國首次報導甘藍黃葉病的發生<sup>(9, 21)</sup>，直到1913年Wollenweber氏將其鑑定，並依據其菌落常產生黏性的分生孢子叢 (sporodochia) 命名為*F. conglutinans*<sup>(27)</sup>。Snyder與Hansen兩氏 (1940) 根據形態學，認為菌株間變異甚大，種間特性重疊，故將屬於Section Elegans群之各亞群，合併成一群，命名為*F. oxysporum*，並於其下再區分為分化種及生理小種，隨後就以*conglutinans*作為該菌的分化種名<sup>(22)</sup>。在這期間，國外亦有多位學者陸續在蘿蔔及紫羅蘭等十字花科植物分離到類似由甘藍病株分離到的*F. conglutinans*，並依寄主與病原特性命名，將感染蘿蔔的學名訂為*F. oxysporum* f. sp. *raphani*<sup>(10)</sup>，感染紫羅蘭則訂為*F. oxysporum* f. sp. *matthioli*<sup>(4)</sup>。1952年Armstrong兩氏根據接種試驗結果，將來自十字花科的三種分化種重新整合，以生理小種作為區隔，歸納成*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1、race 2及race 3；其中race 1對甘藍具有致病性，race 2則對蘿蔔有致病性，而race 3則是對紫羅蘭有致病性<sup>(2)</sup>。隨後陸續有可感染耐高溫且抗病



圖六、芥菜黃葉病菌FOCN05、FOCN38之IGS片段與其他十字花科黃葉病菌利用近鄰結合法 (Neighbor-joining method) 所建構之親緣樹。

**Fig. 6.** Phylogenetic tree of the pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates FOCN05, FOCN38 obtained from mustard crops based on sequences of about 642 bp of the rDNA intergenic spacer region generated using the neighbor-joining method. The numbers at the nodes represent bootstrap values estimated from 1,000 replications of the data set with bootstrap values greater than 50%. *Fusarium fujikuroi* was used as an outgroup. The scale bar indicates 1% sequence divergence.

之紫羅蘭栽培種為race 4<sup>(3)</sup>與可感染耐高溫且抗病之甘藍栽培種為race 5<sup>(18)</sup>的相關報導。基於生理小種與分化種過於複雜，Bosland與Williams兩氏 (1987) 根據病原菌的病原性、菌絲營養體親和性、地理分布、生化特性及基因序列等多面向重新進行分析比對，又將十字花科黃葉病菌分化種及生理小種整理成*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1及 race 2，*F. o. f. sp. raphani*，*F. o. f. sp. matthioli* race 1及2<sup>(5)</sup>，且被許多學者採用至今。

本次試驗將台灣採集之芥菜罹病株進行組織分離後，經形態特徵及IGS序列比較結果，可鑑定本病原菌為*Fusarium oxysporum*。此外，本菌引起芥菜的病徵呈現下位葉黃化、單側偏上生長、矮化、維管束褐化及枯死等，且對其他科作物無病原性；惟本病原菌除可為害芥菜外，尚可危害蘿蔔與白菜，但不能危害甘藍、芥藍，確定有異於國外前人的研究結果。Enya氏等人 (2008) 根據病原性寄主範圍測試、菌絲營養體親和性及IGS序列等分子生物學特性，認為源自白菜植株 (*Brassica rapa*) 之黃葉病菌不同於現有之三個分化種，並將其獨立出來，另立一個分化種*F. oxysporum* f. sp. *rapae*<sup>(7)</sup>。本研究IGS序列分析結果顯示芥菜黃葉病菌FOCN05、FOCN38與*F. oxysporum* f. sp. *rapae*同屬一個獨立於其他十字花科黃葉病菌之支序群，並且與*F. oxysporum* f. sp. *rapae*對*Brassica oleracea* 群作物無病原性之結果<sup>(7)</sup>相似，因此筆者建議將台灣的芥菜

黃葉病菌學名鑑定為*F. oxysporum* f. sp. *rapae* (Enya, Togawa, Takeuchi & Arie)。至於台灣芥菜黃葉病菌是否為*F. oxysporum* f. sp. *rapae*之新生理小種？由於筆者等無法取得*F. oxysporum* f. sp. *rapae*原始命名之菌株及其相關指標作物，進行更多比較試驗，故目前尚無法判定。

## 誌謝

本研究工作承 科技部計畫 (103-2313-B-005-017-MY3) 補助經費，特誌謝忱。

## 引用文獻

- Anonymous. 2016. Agricultural statistics yearbook 2015. Council of Agriculture, Executive Yuan (COA), Taipei. (in Chinese).
- Armstrong, G. M., and Armstrong, J. K. 1952. Physiologic races of the Fusaria causing wilts of the Cruciferae. *Phytopathology* 42: 255-257.
- Armstrong, G. M., and Armstrong, J. K. 1966. *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*: race 4, new race; and a new host for race 1, *Lychnis chalcidonica*. *Phytopathology* 56: 525-530.
- Baker, K. F. 1948. Fusarium wilt of garden stock (*Mathiola incana*). *Phytopathology* 38: 399-403.
- Bosland, P. W., and Williams, P. H. 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* 65: 2067-2073.
- 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. (in Chinese).
- Enya, J., Togawa, M., Takeuchi, T., Yoshida, S., Tsushima, S., Arie, T., and Sakai, T. 2008. Biological and phylogenetic characterization of *Fusarium oxysporum* complex, which causes yellows on *Brassica* spp., and proposal of *F. oxysporum* f. sp. *rapae*, a novel forma specialis pathogenic on *B. rapa* Japan. *Am. Phytopathol. Soc.* 98: 475-483.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Joseph, C. G. 1916. Cabbage yellows and the relation of temperature to its occurrence. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 3: 25-84.
- Kendrick, J. B., and Snyder, W. C. 1942. Fusarium wilt of radish. *Phytopathology* 32: 1031-1033.
- Lai, S. Z. 2007. The cultivation management of mustard. *Harvest Semi-monthly* 57: 35-37. (in Chinese).
- Lo, C. T., Sun, S. K., and Huang, J. W. 1981. Preliminary report

- of radish yellows. Plant Prot. Bull. 23: 279. (Abstract).
13. 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).
  14. Mbofung, G. Y., Hong, S. G., and Pryor, B. M. 2007. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- $\alpha$  and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. Phytopathology 97: 87 - 98.
  15. 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.
  16. 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. 193 pp.
  17. O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N. C., Colyer, P., Waalwijk, C., van der Lee, T., Moretti, A., Kang, S., Kim, H. S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Baayen, R. P., Cromey, M. G., Bithell, S., Sutton, D. A., Skovgaard, K., Ploetz, R., Kistler, H. C., Elliott, M., Davis, M., and Sarver, B. A. J. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genet. Biol. 46: 936-948.
  18. 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.
  19. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
  20. Schweigkofler, W., O'Donnell, K., Garbelotto, M. 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3512 - 3520.
  21. Smith, E. F. 1899. The fungus infestation of agricultural soils in the United States. Sci. Am. Suppl. 48: 19981-19982.
  22. Snyder, W. C., and Hansen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. Am. J. Bot. 27:64-67.
  23. Srinivasan, K., Gilardi, G., Spadaro, D., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2010. Molecular characterization through IGS sequencing of formae speciales of *Fusarium oxysporum* pathogenic on lamb's lettuce. Phytopathol. Mediterr. 49: 309-320.
  24. Sun, S. K. 1975. Ecology of pathogenic Fusaria in soil. Plant Prot. Bull. 17: 216-232. (in Chinese with English abstract).
  25. Tamura K., Nei, M., and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.101: 11030-11035.
  26. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
  27. Wollenweber, H. W. 1913. Studies on the Fusarium problem. Phytopathology 3: 24-50.

### ABSTRACT

Hsu, Y.-T., Li, S.-Y., Hong, C.-F., and Huang, J.-W. 2017. Identification for the causal agent of mustard yellows in Taiwan and its pathogenicity. J. Plant Med. 59(1\_2): 37-44.

The causal agent of mustard yellows was isolated from diseased plants collected from vegetable fields at Yunlin, Kaohsiung, Taoyuan, and Taichung in Taiwan. The disease is characterized by yellowing on the lower leaves, epinasty, stunted and appeared brown in the vascular tissue. In this study, eight isolates were obtained, and their pathogenicity was confirmed via the steps of Koch's postulates. On potato dextrose agar plate, the mycelia of isolates FOCN05 and FOCN38 are colorless at first, but with age they become purplish under 12hr-light per day and produce orange sporodochia. The optimum temperature for mycelial growth of FOCN05 and FOCN38 was at 28°C. The pathogen produces three kinds of asexual spores. Macroconidia were slightly sickle-shaped, hyaline, 34.4~36.8 × 3.9~4.5 μm. Microconidia were elliptical to allantoid, one-celled, hyaline, 6.4~8.2 × 2.5~3.1 μm. Chlamydospores form mostly in hyphae, terminal or intercalary, round, thick-walled, about 9.6 × 8.7 μm. In addition, pathogenicity tests indicated that isolates FOCN05 and FOCN38 were able to infect mustard, radish, and pak choi. However, no symptom showed in other family crops and cabbage and Chinese kale. According to the results of pathogenicity tests, morphological characteristics, and ribosomal DNA intergenic spacer (IGS) sequence, it was suggested that the scientific name of the causal agent of mustard yellows from Taiwan could be identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae* (Enya, Togawa, Takeuchi & Arie).

**Keywords:** Cabbage, Chinese kale, *Fusarium oxysporum*, Fusarium wilt, Mustard (*Brassica juncea*), Pathogenicity, Radish