

由 *Phomopsis destruens* 引起之甘藷基腐病

黃巧雯¹、莊明富¹、曾顯雄²、楊宏仁^{1,3}、倪蕙芳^{1,3}

¹ 行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所

² 國立台灣大學植物病理與微生物學系

³ 聯絡作者、電子郵件：hfni@dns.caes.gov.tw；caes@dns.caes.gov.tw，傳真：+886-5-2773630

接受日期：中華民國 101 年 2 月 10 日

摘要

黃巧雯、莊明富、曾顯雄、楊宏仁、倪蕙芳. 2012. 由 *Phomopsis destruens* 引起之甘藷基腐病. 植病會刊. 21: 47-52.

甘藷基腐病於 2008 ~ 2011 年間於台灣之甘藷田陸續發現，受害植株地上部生長勢衰落、葉片黃化枯萎、藤蔓乾枯死亡，由於乾枯部位緊鄰塊根生長處，因此導致罹病植株幾乎完全無法生產塊根，且由本病害亦會感染塊根組織部位，造成水浸狀影響甘藷品質。本研究自罹病植株莖蔓分離得到菌株 (SPPD-1)，以 PDA 培養時，該菌菌絲生長緩慢，於 25°C 下培養 20 天後，培養基呈現淡褐色，菌落稍有皺摺、邊緣不整形。本菌會產生兩型分生孢子，其中一型為單胞、透明無色、圓筒狀或卵形、兩端具有圓形油滴之甲型分生孢子 (α -conidia)，於罹病組織或人工培養過程中皆會產生；另一型則為次紡錘型，具多細油滴、一端突尖或圓鈍，另端稍呈截頭狀，一邊略彎之丙型分生孢子 (γ -conidia)，僅偶爾於罹病組織上發現，以 PDA 培養時並未產生絲狀或一端彎曲之乙型分生孢子。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵、分子標記及文獻資料比對，將此菌鑑定為 *Phomopsis destruens* (Harter) Boerema。經人工接種孢子懸浮液於台農 57 號甘藷健康苗後，發現 *P. destruens* 對甘藷具有病原性，為引起甘藷基腐病之病原菌。本病害描述及病原記錄為台灣病害之首報。

關鍵詞：甘藷、基腐病、*Phomopsis destruens*

甘藷為旋花科 (Convolvulaceae) 甘藷屬 (*Ipomoea*) 之多年生蔓性草本植物，學名為 *Ipomoea batatas* (L.) Lam.，英名為 Sweet Potato。根據行政院農委會 2010 年農業年報 (<http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=207>) 統計顯示，全台灣目前的甘藷栽種面積約為 9,580 公頃，年產量約為 21 萬公噸，主要供塊根及加工使用。甘藷基腐病之發現，乃嘉義農業試驗分所於 2008 年自花蓮縣鳳林鎮及彰化縣大城鄉之甘藷藤蔓病害樣品上鏡檢時發現疑似 *Phomopsis* sp. 病原之分生孢子。由 2008 年實際田間調查結果顯示，台南市新化區甘藷發病田 (調查總面積約 4 公頃) 之發病率為 16.8% ~ 52.0%、彰化縣大城鄉發

病田 (調查面積約 0.6 公頃) 之發病率為 46.4%、嘉義地區嚴重發病田之發病率則可高達 64.6%；而 2009 年之調查結果則顯示，台南市新化區約 1.5 公頃甘藷田之發病率為 20.0 ~ 60.0%。本病害導致受害植株之地上部葉片變小、黃化枯萎、莖基部藤蔓黑褐色 (圖一、A)，並造成塊根前端產生水浸斑 (圖一、B)，嚴重時植株乾枯死亡。由於本病害影響植株地下部之甘藷生長處，因此罹病植株幾乎完全無法產生塊根，嚴重影響產量而造成損失，為近年來甘藷生產上重要限制因子。為進一步探討本病害之病原，做為未來防治之依據，本研究乃由病株上進行病原分離，並於純培養鑑定後，依柯霍氏法則 (Koch's postulates)

進行病原性測定。

將罹病甘藷植株藤蔓以清水洗淨，再以 0.5% 次氯酸鈉漂洗消毒 30 秒，繼而以 75% 酒精消毒 30 秒，最後再以無菌水漂洗 2 次，自然風乾後，利用滅菌過之解剖刀切取藤蔓上病健部組織，置於以乳酸 (lactic acid) 酸化至 pH 值為 3.8 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, PDA, DIFCO, USA) 培養基平板上，待病原長出後將其單一菌絲尖端移至 PDA 培養基中純化；由於本病原生長極慢，組織分離時極易被其它生長較快的真菌覆蓋，因此為提高其病原分離之成功率，可將罹病甘藷藤蔓清洗消毒後，進行保濕，待柄子器 (pycnidia) 內孢子泌出後，直接以消毒後之解剖刀沾取分生孢子，移至 2% 水瓊脂培養基 (Water agar) 上，室溫下 (25-30°C) 培養約 5-7 天，待菌絲長出後，切取菌絲尖端於 PDA 進行純化培養，供爾後病原菌鑑定及病原性測定之用。

田間採集之罹病植株藤蔓，經解剖顯微鏡 (SMZ1500, Nikon, Japan) 觀察後，發現其表面佈滿大小不一、黑色、具頸狀之柄子器 (圖一、C)，柄子器半埋生於植物組織內，以 Instudio1.0.0 影像軟體 (Pixera, USA) 測量 50 個以上柄子器之大小，結果顯示其長寬約為 $71.24 \pm 12.2 \times$

$53.03 \pm 9.45 \mu\text{m}$ ，並將柄子器經冷凍切片機 (Electron freeze MA-101, Japan) 進行柄子器縱剖面切片，切片厚度調整為 10-20 μm ，於解剖顯微鏡下以挑針挑起切片之薄片，置於滴有無菌水之載玻片上，蓋上蓋玻片後，以光學顯微鏡 (Nikon Eclipse 80i, Japan) 下觀察，發現柄子器為多腔式 (covaluted) (圖一、D)。以滅菌之針頭挑取藤蔓上柄子器內之分生孢子，置於載玻片上，以干涉位相差 (differential interference contrast, DIC, Nikon, Japan) 顯微鏡觀察，發現有兩型分生孢子之存在，其中一型為單胞、透明無色、圓筒狀或卵形、兩端有明顯圓形油滴 (guttulate) (圖二、A) 之甲型分生孢子 (α -conidia)，以 NIS-Elements BR 3.0 軟體 (Nikon, Japan) 測量 50 個以上孢子大小，發現 α 孢子長寬為 $6.64 \pm 0.39 \times 3.23 \pm 0.22 \mu\text{m}$ ，長寬比平均為 2.06；另一型孢子則為次紡錘型、一邊略彎曲、一端凸尖或略圓鈍，而另一端則略呈截頭狀，有多個不明顯油滴 (圖二、B) 之丙型分生孢子 (γ -conidia)，其孢子長寬為 $8.22 \pm 0.73 \times 2.27 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ，長寬比平均為 3.66，唯病組織上之大部份柄子器內只具有甲型分生孢子，少數柄子器內方同時具有甲、丙兩型分生孢子，至於丙型孢子之功能及在其它人工培養基上是否可產生等問題則有待進一步釐清。

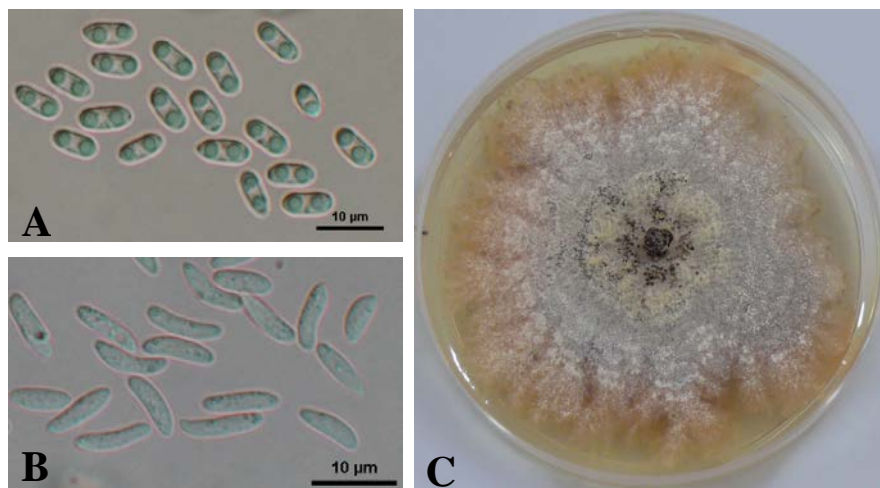


圖一、甘藷基腐病之病徵。A、莖基部藤蔓出現褐化乾枯現象。B、病原向下擴展導致塊根腐爛情形。C、甘藷病株藤蔓上產生黑色之子座式柄子器。D、柄子器縱剖面顯示癒合之兩腔狀室構造 (56X)。

Fig. 1. Symptoms of foot-rot on sweet potato. Infected stem foot exhibiting browning and dying symptoms (A) and rot extending to diseased tuber (B). (C) Black stromatic pycnidia erumpent on infected stem. (D) Cross section revealing the coalesce of two chambered pycnidia (56X).

本病原培養於 PDA 培養基上，置於 25°C 黑暗培養 4-5 天後，菌落為淡桔色，培養至 12 天後，菌落直徑僅達 6.5 cm 左右，菌絲生長緩慢，培養至 20 天後，菌絲為灰白色、培養基呈現淡褐色、菌落稍有皺摺、邊緣不整形、中央附近產生些許的黑色柄子器，同時可觀察到透明白色之分生孢子自柄子器上泌出（圖二、C），利用滅菌後之針頭沾取乳白色分生孢子堆，透過光學顯微鏡可觀察到產生圓筒狀、兩端有圓形油滴之甲型分生孢子，但未見到 *Phomopsis* 最典型之絲狀或一端彎曲之乙型分生孢子。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及文獻資料比對，此菌鑑定為 *Phomopsis destruens* (Harter) Boerema^(1,3,4,5,7)。本研究並將分離得到的 *P. destruens* (SPPD-1) 菌株以真菌核糖體非轉錄區間序列 (internal transcribed spacer, ITS) 增幅用之通用性引子對 ITS1 及 ITS4⁽¹¹⁾ 進行 PCR 反應，繼而將其所增幅之 PCR 產物委由源資生物科技公司 (Taipei, Taiwan) 進行定序並將其序列登錄於 NCBI 基因庫，其編號 (Accession number) 為 JN848791。此外，也將序列上傳 NCBI 基因資料庫比對，所獲得最近似之物種為 *Phomopsis* sp.，此也再度驗證形態特徵鑑定之結果。

事實上，甘藷基腐病早已於百年前，於美國維吉尼亞州發生，初期採集、觀察也證實此真菌性病害主要藉風雨與扦插之藷苗傳播，嚴重時，罹病率可達 80%，影響經濟產值甚鉅⁽⁴⁾。Harter⁽³⁾經由分離鑑定病原為不完全菌 (anamorphic fungus) 可產生柄子器，其柄孢子兩端呈明顯油滴長橢圓型、卵形之甲型分生孢子 (α -conidia)，以及稍長、次紡錘型，現今定義為丙型之分生孢子 (γ -conidia)；但當時以該菌柄子器之殼壁層數，不具典型絲狀，末端彎曲之乙型分生孢子 (β -conidia)，以及未見明顯之子座 (stroma) 以及多腔狀構造，故雖類似擬莖點霉 (*Phomopsis*)，但卻認為較接近 *Plenodomus* 屬，但形態特徵卻又和屬內之成員不同，故設立一新種 *P. destruens*，種名 *destruens* 意指本病原應具有強致病力、破壞力^(3,4)。另於 1993、1994 年南美洲之巴西⁽⁷⁾，也報導於其北部及南部省份之甘藷產區發生基腐病，分離之病原經英國之 International Mycology Institute (IMI) 真菌學者協助鑑定，亦將其歸屬於擬莖點霉屬 (*Phomopsis*)，但未給予明確種名；故研究此病之巴西植物病理學者 Lopes 等^(6,7)仍延用以往較為人所知之病原名稱 *Plenodomus destruens* 來記載描寫其研究內容及成果。



圖二、甘藷基腐病菌之分生孢子與菌落形態。A、單胞、透明無色、圓筒狀或卵形、兩端有圓形油滴之甲型分生孢子 (α -conidia)。B、單胞次紡錘型，遠端凸尖或略為鈍圓，而基端略呈截頭狀，並且一邊略彎之丙型分生孢子 (γ -conidia)。標尺 = 10 μ m。C、甘藷基腐病菌於 PDA 培養基上於 25°C 培養 20 天後的菌落形態。

Fig. 2. Conidial shape and colony morphology of *Phomopsis destruens*. (A) α -conidia one-celled, hyaline, oblong or oval, with 2-guttulated. (B) γ -conidia clavate to subcylindrical, one end acute or obtuse, the base somewhat truncate, and one side slightly curved. Bar = 10 μ m. (C) Colony morphology of *P. destruens* cultured on PDA at 25°C for 20 days.

此外，早在 1960 年代荷蘭之真菌系統分類學者 Boerema 等，即已對可引起植物病害莖點病原 (*Phoma*) 之不同成員，進行非常透徹之分類學探討，發表為數眾多之論文，並集結成冊，於 2004 年發表此屬之鑑定手冊⁽²⁾。*Phoma* 屬以往被記載之物種至少有 2000 種，經整理合併同物異名之物種後，此手冊共描寫涵括 223 個物種，並將其分別歸併於屬下之九個分類群 (Section)：Phoma、Heterospora、Paraphorma、Peyronellaes、

Phyllostictoides、Sclerophomella、Plenodomus、Macrospora、Pilosa。此九個群之分群主要係依據其菌落之生長特性，對氫氧化鈉 (NaOH) 反應、柄子器、柄孢子、厚膜孢子、菌落以及其延生之無性世代集合型 (Synamorphs)，有性世代之關聯性等特徵作為標的 (parameters)。這九個分類群 (Section) 之群名，事實上即為 Boerema 等所認為與 *Phoma* 屬之同物異名屬之屬名，其中包括 *Plenodomus* 屬。



圖三、甘藷基腐病擬莖點病菌 (*Phomopsis destruens*) 對甘藷 (台農 57 號品種) 之病原性試驗。健康扦插苗接種 *P. destruens* 15 週後顯現明顯之病徵 (A)，以無菌水接種為對照組 (B)。

Fig. 3. Pathogenicity tests of *Phomopsis destruens* on sweet potato. Severe symptoms of sweet potato plant inoculated with conidial suspension of *P. destruens* (A) and water inoculation as control (B) 15 weeks after inoculation.

在分類命名上，*Plenodomus* Preuss. (1851) 之設立⁽⁹⁾，遠早於 *Phoma* Sacc. (1880) 以及 *Phomopsis* (Sacc.) Budak. (1905) 兩屬，但後二者以其為重要植物病原，其命名被保留 (nomination conservation, nom. cons.)，因而命名優先權優於前者。故 Boerema 等⁽¹⁾ 將已被廢棄之 *Plenodomus* 屬之 38 個物種移至 *Phoma* 屬內之 Sect.

Plenodomus，而將另外 9 個物種則移至 *Phomopsis* 屬內。換言之，甘藷基腐病病原之原先命名為 *Plenodomus destruens* Harter⁽³⁾，現已變更為合法有效之 *Phomopsis destruens* (Harter) Boerema et al.⁽¹⁾。Boerema 等亦檢視該物種之模式標本 (holotype)，以及其所衍生之外模式菌株 (extype)，皆可見到 α -以及 γ -conidia，雖然柄子器之殼壁

層數，或其多腔狀、子座等之典型特徵並不突顯，並未完全與 *Phomopsis* 屬吻合，但認為寄主或培養基等諸多條件，仍會影響此等特徵之顯現。反之，如 *Phomopsis allescheriana* (= *Plenodomus eucalypti*) 也只會產生 α -conidia，但可於寄主上產生次球型柄子器以及多腔狀扁平子座，此等特徵卻和 *Phomopsis* 屬之定義吻合⁽¹⁾。此外，由台灣所分離之基腐病病原經 PCR 增幅 ITS DNA，定序上傳美國 NCBI 之 GenBank 比對，也顯示其和資料庫之 *Phomopsis* 物種有較近之類緣關係，故由此也確認甘藷基腐病之病原之命名為 *Phomopsis destruens* 是頗為適切，符合 *Phomopsis* 屬種之定義⁽¹⁰⁾。

為進一步證明 *P. destruens* 於甘藷上之病原性，本研究將甘藷台農 57 號之健康苗，扦插於盛裝有無菌泥炭土的長型花槽 (13cm × 17cm × 58cm)，每槽各種植健康苗 10 株，共重複 3 盆，每天澆一次水，待種植 3 週後於每盆接種 *P. destruens* 分生孢子懸浮液 (1×10^4 conidia/ml) 20 ml，將接種後之植株置於溫室內，每天澆一次水，接種後每週觀察並記錄發病情形，另以接種無菌水接種作為對照組，試驗重複兩次。試驗結果顯示，甘藷接種病原 6 週後，由插入土壤部位莖蔓開始發病，莖基部出現淡褐色現象，繼而莖部及鬚根變黑乾枯，地上藤蔓則因為根系受害缺水，而使得葉片開始出現黃化枯萎、新葉變小、受害植株生長勢明顯衰落等病徵。本研究人工接種 30 株甘藷，其接種第 9 週後發病率為 13.8%，於接種第 15 週，發病率可高達 70.0%，嚴重罹病植株乾枯死亡 (圖三、A)。另外，以解剖顯微鏡觀察接種發病之甘藷莖部，發現表面會凸出許多黑色之柄子器，挑取柄子器內分生孢子鏡檢，發現其只具有甲型分生孢子；之後再進行罹病組織分離，結果顯示所得菌株與接種病原菌菌株，其形態特徵皆相同，而完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)，證實本研究所分離之 *P. destruens* 對甘藷具有病原性，此為台灣首次發現之甘藷新病害。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Boerema, G. H., Loerakker, W. M., and Hamers, M. E. C. 1996. Contributions towards a monograph of *Phoma* (*Coelomycetes*) - III 2. Misapplications of the type species name and the generic synonyms of section *Plenodomus* (excluded species). *Persoonia* 16: 141-190.
2. Boerema, G. H., De Gruyter, J., Noordeloos, M. E., and Hamers, M. E. C. 2004. *Phoma* Identification Manual. CAB Publishing, UK, 470 pp.
3. Harter, L. L. 1913a. Foot rot, a new disease of the sweet potato. *Phytopathology* 3: 243-245.
4. Harter, L. L. 1913b. The foot-rot of the sweet potato. *J. Agric. Res.* 1: 251-273.
5. Harter, L. L. 1915. Notes on the distribution and prevalence of three important sweet potato diseases. *Phytopathology* 5: 124-126.
6. Lopes, C. A., and Silva, J. B. C. 1993. Management measures to control foot rot of sweet potato caused by *Plenodomus destruens*. *Int. J. Pest Manage.* 39: 72-74.
7. Lopes, C. A., Boff, P., and Duarte, V. 1994. Foot rot of sweet potato in Brazil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 29: 1407-1410.
8. Martin, W. J. 1972. Further evaluation of thiabendazole as a sweetpotato seed treatment fungicide. *Plant Dis. Rep.* 56: 219-223.
9. Preuss, C. G. T. 1851. Uebersicht untersuchter Pilze, besonders aus der Umgegend von Hoyerswerda. *Linnaea* 24 [also titled *Beiträge der Pflanzenkunde* 8]: 99-153.
10. Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A., and Hyde, K. D. 2011. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Divers.* 50: 189-225.
11. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322. *In: Innis, M. A., Gelfand, J. J., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds.), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* Academic Press. San Diego. CA.

ABSTRACT

Huang, C. W.¹, Chuang, M. F.¹, Tzean, S. S.², Yang, H. R.^{1,3} and Ni, H. F.^{1,3} 2012. Occurrence of Foot Rot Disease of Sweet Potato Caused by *Phomopsis destruens* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21: 47-52.

(¹Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, COA, Taiwan ; ² Department of Plant Pathology & Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan ; ³Corresponding author, E-mail: hfni@dns.caes.gov.tw ; caes@dns.caes.gov.tw ; Fax: +886-5-2773630)

Foot rot disease of sweet potato (*Ipomoea batatas*) was found in major sweet potato production areas in Taiwan during 2008-2011. The symptoms include yellowing of leaves, necrotic lesions on vine, wilting of the sweet potato plants. The fungus isolated from diseased tissue grew slowly. The fungal colony could produce brown pigments and diffused into the agar medium cultured on PDA at 25°C for 20 days, and also displayed slightly zonate, sulcate and wavy edge. The fungus generated two types of conidia from stromatic pycnidia. One type conidia were one-celled, hyaline, oblong or oval, 2-guttulated α -conidia ; the other type conidia were clavate subcylindrical slightly curved γ -conidia only found on diseased host tissues. The causative fungus was identified as *Phomopsis destruens* (Harter) Boerema based on symptoms, morphological characteristics and ITS rDNA sequence blasting on NCBI GenBank database. The pathogenicity test of *P. destruens* toward sweet potato host was proved and fulfilled the Koch's postulates. To our knowledge, this is the first report on the occurrence of foot rot disease of sweet potato caused by *Phomopsis destruens* in Taiwan.

Key words: Sweet potato 、 *Ipomoea batatas* 、 Foot rot 、 *Phomopsis destruens*