植物病理學會刊　13: 17-26, 2004

杏鮑菇褐斑病菌之鑑定

陳錦桐[1]　黃振文[2,3]

1 台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植物病理組
2 台中市國光路 國立中興大學植物病理學系
3 聯絡作者：電子郵件 jwhuang@dragon.nchu.edu.tw，傳眞：+886-4-22851676
接受日期：中華民國 93 年 1 月 3 日

摘　要

陳錦桐、黃振文. 2004. 杏鮑菇褐斑病菌之鑑定. 植病會刊 13: 17-26.

西元一九九八年，在台中縣霧峰鄉及行政院農業委員會農業試驗所之杏鮑菇栽培場，發現菇體出現褐斑、畸形、龜裂與停滯生長的病徵，嚴重危害時，菇體甚至出現黃萎枯死。由罹病菇體組織分離到 10 個菌株，重新回接於杏鮑菇體上，3-4 天後菇體均出現如同栽培場所見相似的病徵。進一步，將具有病原性的 GR-12 與 GR-28 兩菌株分別接種於洋菇、香菇、金針菇、夏季鮑魚菇、鴻喜菇、秀珍菇、雞腿菇、舞菇、黑木耳及紫丁香磨菇等不同的食用菇類，結果發現只有紫丁香磨菇、舞菇及黑木耳無病徵出現，其他全都出現大小不一之病徵。在 20℃於麥芽抽出物蛋白腖洋菜培養基平板，培養病原菌 GR-12 與 GR-28 菌株，生長 10 天，菌落呈現橘紅色，菌絲有隔膜；分生孢子柄直立，有兩種形態，一種爲類似 *Verticillium* 狀的分生孢子柄，另一種爲類似 *Penicillium* 狀的分生孢子柄；分生孢子卵圓形，由瓶狀枝產生，基部微凸、透明、單胞，大小爲 4.0-6.8 × 3.0-4.5 μm，有黏液泌出黏聚成球形。本菌適合分生孢子發芽與生長的溫度爲 20-32℃。進一步，採用核糖體轉錄外區間 (Internal transcribed spacer, ITS) 及 28S rDNA 等分子生物技術佐證病原菌的鑑定，結果證實本病原菌爲 *Gliocladium roseum* Bainier。

關鍵詞：杏鮑菇、*Gliocladium roseum*、核糖體轉錄外區間、28S 核糖體 DNA

緒　言

杏鮑菇 *Pleurotus eryngii* (Dc. : Fr.) Quěl. 爲側耳菌科 (Pleurotaceae)，蠔菇屬 (Pleurotus) 的亞熱帶及草原地帶之典型菇類，原分布於南歐、中亞及北美等地區[21]。自 1993年起台灣應用瓶栽技術，開始有杏鮑菇商業化生產[3]；由於此種菇體皎白、耐儲運、口感及風味特佳，頗受到鮮市消費者喜愛，是台灣加入世貿組織後具有市場競爭潛力之新興菇種[1]。日本有馬忍和陶山一雄兩氏[5] 曾報導有關 *Cladobotryum varium* Nees: Fr. 會引起杏鮑菇軟腐病。法國也有報告指出 *Pseudomonas tolassii* Paine可引起杏鮑菇的褐色條斑病[10]。一般菇類的褐斑病，除由上述 *P. tolassii* 引起外，*Vertcillium fungicola var. fungicola* Ware 也可引起菇體出現褐斑的病徵[9]。目前廣泛應用於生物防治上的拮抗微生物 *Gliocladium* 屬，也有感染菇類的記載，例如 *Gliocladium virens* Miller 會引發洋菇褐斑病[7]；而 *G. deliquescens* Sopp 亦可使洋菇產生褐色的病斑[18]。近年來，台灣中部杏鮑菇栽培的過程中，出現菇體黃褐斑、畸形、龜裂與生長停滯，甚至整個菇體出現壞疽枯萎等病徵。惟迄今病因不明，因此，本研究主要目的在於利用菌類的形態、產孢方式及分子分析技術，鑑定病原菌的學名及寄主範圍，祈有助於杏鮑菇產業的發展。

材料與方法

供試菌株來源

自農試所菇類栽培場，採集罹病杏鮑菇菇體，切取菇體黃褐化組織 (0.5 × 0.5 cm)，以 1% (v/v) 次氯酸鈉溶液進行表面消毒 20 秒後，以無菌水漂洗三次，隨即移置於 2% (w/v) 水瓊脂 (water agar, WA) 平板上，於 24℃ 分離可疑病原菌，然後進行單孢分離培養，共獲得 GR-06、GR-07、GR-12、GR-13、GR-16、GR-18、GR-23、GR-28、GR-31 及 GR-37 等 10 個菌株。將各菌株分別置於 28℃，在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA；Difco) 培

養基斜面上培養 14 天後，每一試管加入 10 毫升無菌水，隨即以移植針輕刮菌落，製成孢子懸浮液 (1.3×10^6 spores/ml)，作爲噴霧接種之用。並按柯霍氏法則，確定各菌株之病原性後，取 GR-12 與 GR-28 兩菌株作爲本研究的主要供試菌株。

供試杏鮑菇品系來源與菇體之栽培

本研究所使用之杏鮑菇菌系 PE-B011 爲農試所雜交選育的栽培種[13]，以 PDA 培養基定期作更新培養；在 24℃生長，待菌絲長滿後移至於 4℃ 保存，作爲供試之菌源。菇體之栽培參照彭氏等的方法[2,4]，以木屑添加 40 %(v/v) 之米糠作爲栽培基質，並將含水量調整爲 65 %，pH 值調整至 6.5 後，用自動裝填機裝填基質至 900 ml 之聚丙烯塑膠瓶中，每瓶重量約爲 700 公克；經高溫高壓 (121℃、15 1b/cm^2) 4 小時滅菌，待基質冷卻後，隔夜切取培養於 PDA 之杏鮑菇菌絲塊接種之，在 24℃ 培養 35 天後，以鐵製去皮棒打洞去皮 (在杏鮑菇菌絲培育期間，菌絲長滿栽培瓶後，於外表的菌絲會形成一層膜狀般的菌絲層，故需利用棒子以機械力破壞該菌絲層，以利整齊出菇，這種步驟稱曰去皮)，隨即移入出菇室；控制溫度在 15.5 - 17.5 ℃，相對溼度 85 - 95% 及二氧化碳控制濃度低於 1000 ppm，去皮後第 8-11 天，每天給予光照 250 至 300 lux 8 小時，約 10 至 12 天後即會長出小菇，作爲供試菇體之需。

杏鮑菇之噴霧接種法

將培養於 28℃，PDA 斜面上生長 14 天之 GR-12 與 GR-28 菌株，每一試管以 10 毫升無菌水洗下孢子，經振盪器振盪均勻，用滅菌之雙重紗布過濾後，移除菌絲和雜質，以血球記數器記數並調整孢子懸浮液濃度爲 10^6 spores/ml 供接種用，隨即利用噴霧器 (Taiwan SC-202；崧柏) 在每瓶杏鮑菇去皮後 13 天之菇體 (高約 3-5 cm) 上噴霧接種 2 ml 菌量後，套袋保濕，置於 16℃ 生長箱，一天後除去塑膠袋。

杏鮑菇褐斑病菌形態之觀察與鑑定

將 GR-12 與 GR-28 菌株單孢培養在麥芽抽取物蛋白腖瓊脂培養基 (malt extract peptone agar, MEA) [8] 平板上，在 20 ℃ 生長箱培養 10 天後，調查菌落大小及形態，每一處理有四重複。將病原菌培養於 PDA 培養基平板中，於 28℃生長箱，每日光照 8 小時，培養 14 天後，以無菌水將分生孢子洗下，在光學顯微鏡下，量取分生孢子的大小，每菌株量取 50 個孢子，有四重複。將褐斑病菌培養在 WA 培養基平板中，在 28℃，每日光照 8 小時，培養 10 天後，先以三號打孔器 (內徑 0.7 cm) 切取菌絲塊後，再將該 WA 平板繼續培養一天後，以移植針切取原挖取部位新長出之菌絲體 (約 0.5 平方公分) ，置於冷凍低溫掃描式電子顯微鏡 (JSM-6330F, Field Emission Scanning Electron Microscope) 和光學顯微鏡下，觀察病原菌之形態及產孢構造。

溫度對分生孢子發芽之影響

利用無菌移植針刮取 PDA 培養基平板上生長14天的杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 兩菌株之孢子，以無菌水配製孢子懸浮液 (10^4 spores/ml) 後，各取 50 μl 菌液，塗佈於 PDA 培養基平板，分別置於 12、16、20、24、28、32 及 36℃ 生長箱培養，黑暗下置 24 小時後，在光學顯微鏡下記錄兩菌株之發芽百分率，每處理逢機觀察 100 個孢子，各有四重複。

溫度對菌絲生長之影響

杏鮑菇褐斑病菌 GR-12、GR-28 與杏鮑菇 PE-B011 三菌株於 2% WA 培養基上培養 14 天後，以三號打孔器切取直徑 0.7 公分的菌絲塊後，移植在 PDA 培養基平板中央，隨後分別置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36 ℃ 等不同溫度的定溫箱中，黑暗下生長 7 天後，量取不同溫度中各菌株的菌落大小，每一溫度處理有四重複。

病原菌之去氧核糖核酸 (DNA) 的萃取

將 10 個褐斑病菌菌株，培養在 PDA 培養基平板上，於 28℃ 定溫箱培養 14 天後，以三號打孔器，切取菌落邊緣菌絲，分別移入裝有 250 毫升的馬鈴薯葡萄糖煎汁培養基 (potato dextrose broth, PDB, Difico) 的 500 毫升三角瓶中，置於 28℃ 定溫箱，轉速爲 125 rpm 振盪培養 10 天後，經抽氣漏斗過濾，刮取病原菌菌絲團塊，並以無菌水洗去殘留的培養基，然後採用抽 DNA 試劑組 DNeasy Plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germary) 進行下列試驗。首先稱取 100 mg 病原菌菌絲體，置於滅過菌的研缽中，加入適量液態氮充分研磨菌絲塊成粉狀後，再加入 400 μl 萃取緩衝液 AP1 及 4 μl 100 mg/ml RNase A 混合均勻，於 65 ℃中作用 10 分鐘，再加入 130 μl 緩衝液 AP2 混合後置於冰上 5 分鐘，使不需要之蛋白、多醣體等析出，經 15 k rpm 轉速離心 5 分鐘沉澱去除；另外含 DNA 之上層液加入 QIAshredder spin column 以離心過濾細胞殘渣，剩下之濾液加入 675 μl 緩衝液 AP3/E 混合，分二次各取 650 μl 於 DNeasy mini spin column 以 10 k rpm 離心 1 分鐘，使 DNA 附著於 column 上，以 500 μl AW 緩衝液清洗 column 二次，最後加入 100 μl，65℃ 預熱之緩衝液 AE，靜置 5 分鐘，以 10 k rpm 離心收集 DNA，以分光比色計測定濃度，保存於 -20 ℃ 備用。

聚合酵素連鎖反應

將前一步驟純化 10 個病原菌所得之核酸，調整濃度爲 100 ng/ μl，每一反應瓶取 10 ng 之病原菌基因組 DNA，作爲 PCR 反應所需之模板 (template)。PCR 反應所需之引子對爲 Collopy 氏等 [6] 2001 年所發表，用於增幅核糖體轉錄外區間 (internal transcribed spacer, ITS) 的二個核酸引子 ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3')、ALRO (5'- CATATGCTTAAGTTCAGCGGG -3')。PCR反應混合液包含 10 ng 基因組 DNA、5 μl 10x PCR buffer、4 μl 2.5 mM dNTP、25 pmol 的引子及 0.5U Ex*Taq* polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)，總反應體積爲 50 μl。於溫度循環反應儀 (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Co., Norwalk, CT) 中進行 35 個PCR 循環反應。ITS 核酸增幅之反應條件爲 94℃ 變性 (denature) 2分鐘後，以 94℃ 變性 15 秒、57 ℃ 粘合 (annealing) 30 秒、72℃ 延伸 (extension) 45 秒，共 35 循環，之後以 72 ℃ 再延伸 4 分鐘。將病原菌 28S rDNA 核酸片段之 PCR 反應所需之引子對採用 Vilgalys 與 Hester 兩氏 [20] 1990 年所發表可增幅 *Gliocladium* spp.的 28S rDNA 核酸片段之二個引子，LROR (5'- GTACCCGCTGAACTTAAGC-3') 與 LR7 (5'- TACTACCACCAAGAT CT-3')。28S rDNA 核酸片段增幅之反應條件爲 94℃ 變性 2 分鐘後，以 94℃變性 1 分鐘、50℃ 粘合 1 分鐘、72℃ 延伸2 分鐘，共 35 循環，之後以72℃ 延伸4 分鐘完成反應。

病原菌的 ITS 與 28S rDNA 部分之 DNA 電泳分析與回收

將上述病原菌經 PCR 之產物取 10 μl，加入2 μl blue dye (0.01% xylene cyanol, 0.01% bromophenol blue, 50% glycerol) 混合後，以 1.2% 洋菜膠片 (Seakem LE agarose, FMC) 於 0.5x TAE [20 mM Tris-acetate, 0.5 mM EDTA(pH8.0)] 緩衝液下，以 100V 電壓進行電泳分析，待 blue dye 跑至膠片 3/4 處，以溴化乙啶 (ethidium bromide, EtBr, 0.5 μg/ml) 染色 10 分鐘，以去離子水清洗，在UV 照相系統 (IS-2000, Alpha Innotech Co.) 紀錄結果。並將病原菌 PCR 產物經 PCR 純化試劑組 (QIAGEN, Hilden, Germary) 進行純化，取 200 μl 之 PCR 反應物，加入 1000 μl 的 PB buffer 混合均勻，將混合之液體移至 QIAquick spin column，以 13 k rpm (HITACHI, himac CF15DZ；RT15A3) 轉速離心 1 分鐘收集濾液至 2 ml 離心管，倒棄濾液，再加入 750 μl 的 PE buffer 至 QIAquick spin column，以 13 k rpm 離心 1 分鐘清洗 column，最後於 column 中加入 30 μl 的無菌水後靜置 1 分鐘，離心 1 分鐘以收集 DNA，保存於 -20℃ 供轉形 (transformation) 用。

病原菌 ITS 與 28S rDNA 之核酸片段選殖、純化及篩選

將上述病原菌 ITS 與 28S rDNA 核酸片段純化的 PCR 產物各取 1 μl 加入 1 μl 含連接酶 (ligase) 之 pCRII-TOPO TA 載體 (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA)，定量至 5 μl，於室溫下靜置 5 分鐘進行連接反應 (ligation)後，再與大腸桿菌之勝任細胞 (competent cell) 放在冰上共同培養 20 分鐘，接著以 42℃ 熱處理 1 分鐘，讓已連接之載體轉移至大腸桿菌細胞中，於 37℃ 培養 1 小時後，同時將 100 μl 菌液、50 μl 100 mM IPTG 及 50 μl 2% X-gal 於篩選性培養基 (50 ppm kanamycin) 表面塗勻，於 37℃ 培養 16 小時進行藍白菌落篩選。挑選白色菌落，培養於含有 50 ppm kanamycin 之液體培養基 (LB)，以微量質體純化試劑組 (GeneMark, Technology Co., Ltd., Taiwan) 抽取質體，將 1 ml 培養隔夜之菌液以 13 k rpm 離心 1 分鐘收集細菌，隨後依序加入 200 μl 之Solution I 混合均勻以打破細胞，200 μl Solution II 及 200 μl Solution III 將細菌基因組 DNA 析出，以最大轉速 (15 k rpm) 離心 5 分鐘將細菌殘渣去除，僅取上清液至 miniprep spin column 同樣於 13 k rpm 離心 1 分鐘，再以 700 μl washing solution 清洗 column 二次，倒棄濾液，然後以最大轉速離心 3 分鐘並於 60 ℃ 定溫箱放置 5 分鐘；最後加入 50 μl 無菌水，靜置 1 分鐘，以 13 k rpm 離心收集質體 DNA。取 3 μl 質體 DNA、2 μl 10x buffer 及 1 U *Eco*RI 限制酵素於 37℃ 進行切割反應 2 小時，篩選具有 PCR 產物之轉殖株。

DNA 序列解序與序列比對分析

將具有 PCR 產物之轉殖株送交明欣生物技術公司 (Mission-Biotech Co., Ltd., Taiwan)，以 ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀 (Perkin-Elmer, CA, USA) 進行定序，將所得序列以 DNAstar (DNASTAR, USA) 分析軟體和美國生物訊息中心 (NCBI) 資料庫 (GenBank) 登錄之核酸序列進行序列相似度之比對。

病原菌對其他食用菇類之病原性測定

供試的菇類係向菇農購買，及由農試所洋菇室提供，供試種類包括洋菇 [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach]、香菇 [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.]、金針菇 [*Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.]、秀珍菇 [*Pleurotus sajor* (Fr.) Sing.]、夏季鮑魚菇 [*Pleurotus cystidosus* Miller]、黑木耳 [*Auricularia mesenterica* (Dick. : Fr.) Pers.]、鴻喜菇 [*Hypsizigus marmoreus* Bunashimeji]、雞腿菇 [*Coprinus comatus* (Mull.: Fr.) Pers.]、紫丁香蘑菇 [*Lepista nuda* (Bull. :Fr.) Cooke]、舞菇 [*Griffola frondosa* (Dicks. : Fr.) S.F. Gray.] 與杏鮑菇。取 2 ml 杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株孢子懸浮液 (1.3×10^6 spores/ml)，分別噴佈於供試菇體上，並以噴無菌水者作爲對照組，各套塑膠袋保濕，移置於 16 ℃ 的生長箱中，一天後除去塑膠袋。每處

理各接種 3 瓶 (或太空包)，重複三次，經 2-3 天後調查各菇體的發病情形。

結 果

杏鮑菇褐斑病之發生與病徵

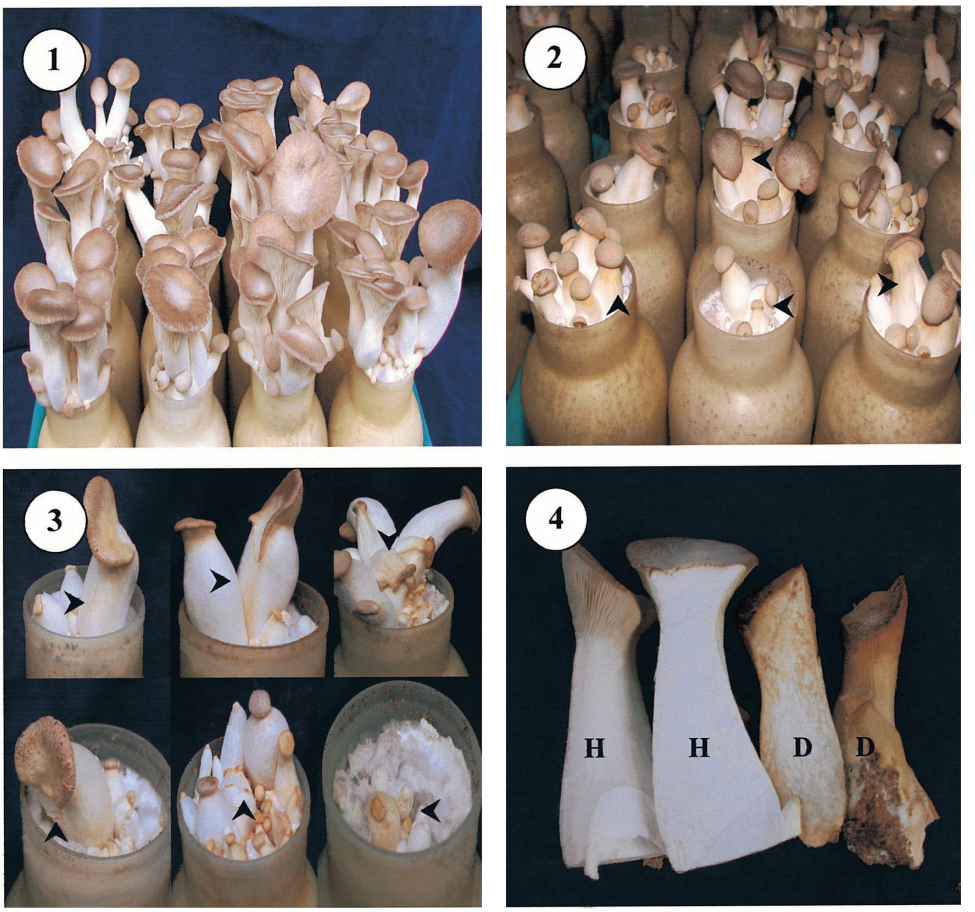
在台灣中部，杏鮑菇主要栽培區包括霧峰、農委會農業試驗所及四德等地區，發現許多杏鮑菇發生褐斑、畸形、龜裂與停滯生長的病徵，嚴重危害時，甚至出現黃萎死亡 (圖一)；由罹病菇體組織分離到 10 個菌株，重新回接於杏鮑菇體上，3-4 天後菇體均出現如同栽培場相似的病徵。由罹病之菇體組織再分離病原菌，確定與接種的菌株相同。

杏鮑菇褐斑病菌的形態觀察與鑑定

杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株在 MEA 培養基上，20℃ 生長 10 天，菌落呈橙紅色，大小爲3.5-4.2 公分，有絮狀氣生菌絲 (圖二)。本菌在顯微鏡與冷凍低溫掃描式電子顯微鏡下觀察，分生孢子係由分生孢子柄上的瓶狀枝產生，卵圓形，基部略爲凸起，透明、單胞，大小爲 4.0-6.8 x 3.0-4.5 μm，有黏液泌出黏聚成球狀。分生孢子柄直立，有兩種形態，一種爲類似輪枝孢屬 (*Verticillium*-like) 的分生孢子柄，長爲 110-170 μm，具有 2-6 瓶狀枝，瓶狀枝長爲 12-20 μm；另一種爲類似 *Penicillium* 狀之分生孢子柄，分生孢子柄密緻，長爲 40-70 μm，有瓶狀枝 5-8 枝，瓶狀枝長爲 12-16 μm。菌絲具有隔膜，寬爲 2.0-3.5 μm。依上述病原菌的形態特徵，參照 Domsch 等氏[7]、Schroers 等氏[16] 及 Smalley 與 Hansen 兩氏[17] 等分類系統，確定引起杏鮑菇褐斑病的病原菌爲 *Gliocladium roseum* Bainier.。

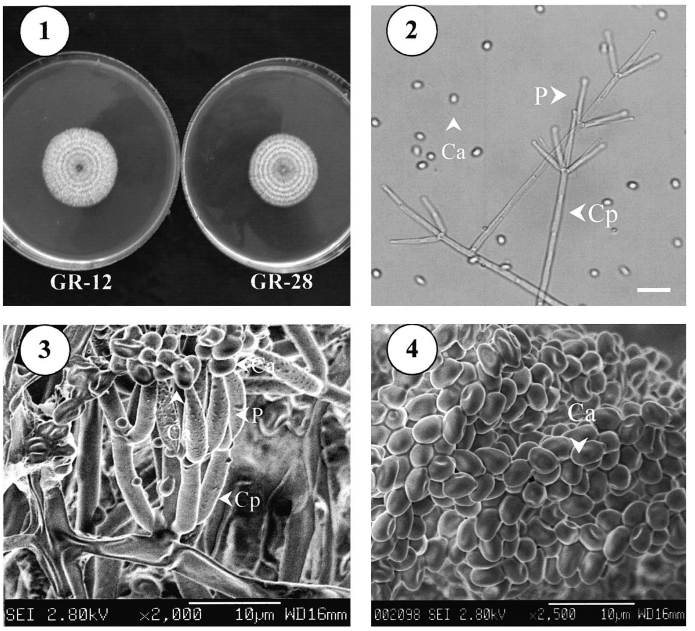
溫度對分生孢子發芽的影響

觀察不同溫度對本菌分生孢子發芽的影響，發現 GR-12 和GR-28 兩菌株間孢子的發芽率差異不大。在 12 ℃，24 小時二菌株均未有孢子發芽；在 16 ℃ 時，二者發芽率



圖一、杏鮑菇褐斑病的病徵。(1)：健康之菇體；(2) 與 (3)：小菇與成菇罹病病徵；(4)：健康菇體（H）與罹病菇體（D）之縱剖圖。

Fig. 1. Brown spot disease of king oyster mushroom *Pleurotus eryngii*, caused by *Gliocladium roseum*. Symptoms consisted of brown spots, curling of the tissues, and shrinking and cracking of fruit bodies. (1) healthy mushrooms, (2 & 3) diseased mushrooms, and (4) diseased mushrooms (D) with brownish discoloration.



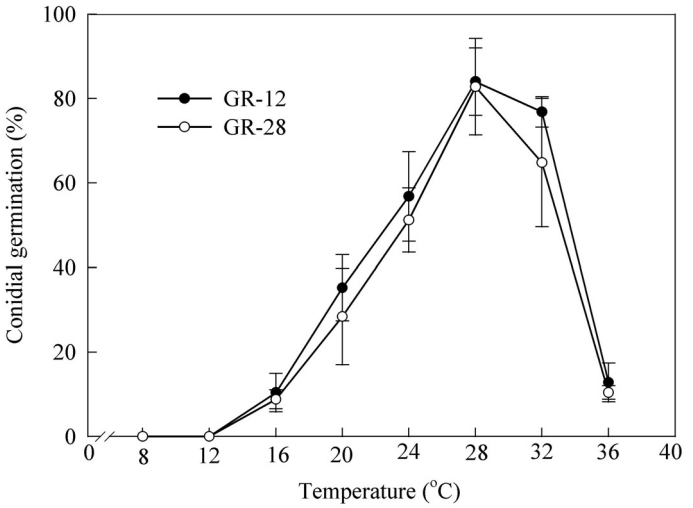
圖二、杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株在麥芽抽取物蛋白胨瓊脂培養基 (1) 培養10 天之菌落形態。(2) *Gliocladium roseum* 如 Verticillium 狀分生孢子柄 (Cp) (箭頭處) 與瓶狀枝 (P)，(3)在掃描式電子顯微鏡下*G. roseum* 黏帚狀分生孢子柄 (Cp) (箭頭處)；(4) *G. roseum*的分生孢子 (Ca)。比例尺大小爲 10 μm。

Fig. 2. Morphologies of *Gliocladium roseum* including (1) colonies of *G. roseum* isolates GR-12 and GR28 grown on malt extract peptone agar for 10 days at 20℃, (2) Verticillium-like conidiophores (Cp) (arrowhead), phiales (P) (arrowhead) and conidia (Ca) (arrowhead) under light microscope; (3) Penicillium-like conidiophores (Cp) (arrowhead) and (4) conidia (Ca) (arrowhead) under scanning electron microscope.
Bar＝10 μm

都低於 20%；而在 28 ℃ 時二者發芽率均已達 80% 以上；在 36 ℃，發芽率則明顯降低至 20% 以下，顯示本菌孢子之最適發芽溫度爲 28 ℃ (圖三)。

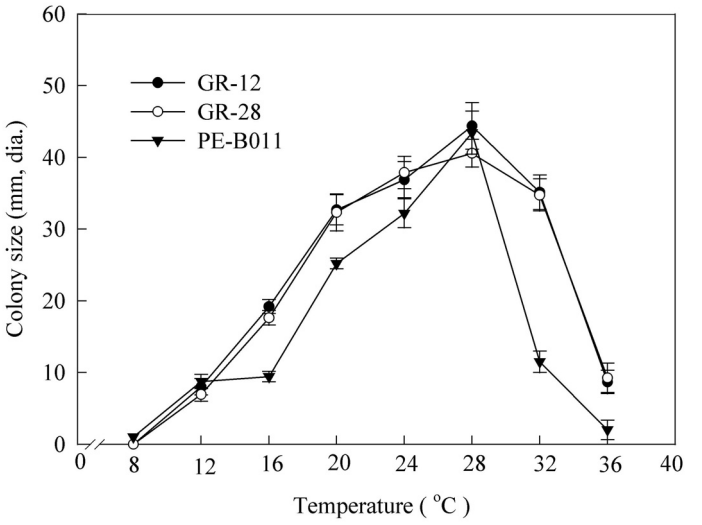
溫度對菌絲生長之影響

杏鮑菇褐斑病菌 GR-12、GR-28 菌株和杏鮑菇 PE-B011 菌株，在 8-36 ℃ 等不同溫度培養 7 天，發現三菌株在 8 ℃ 均無法生長，在 12 ℃ 至 28 ℃ 間，隨溫度升高，菌絲生長愈快。褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株在 32 ℃ 以上，隨溫度升高，菌絲生長下降。在8 ℃ 與 36 ℃ 不適於本菌與杏鮑菇菌絲之生長 (圖四)。此外，在 16 ℃ 下本病原菌菌絲生長比杏鮑菇快速 (圖四)，顯示本病原菌之適合生長溫度介於 20 ℃ 與 32 ℃ 間，而杏鮑菇菌絲適合生長溫度介於 24-28 ℃。



圖三、在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基平板上測定溫度對杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株之分生孢子發芽的影響 (24 小時觀察結果)。

Fig. 3. Effect of temperature on conidial germination of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 on potato dextrose agar plates for 24 hrs.
Bar = Standard error.

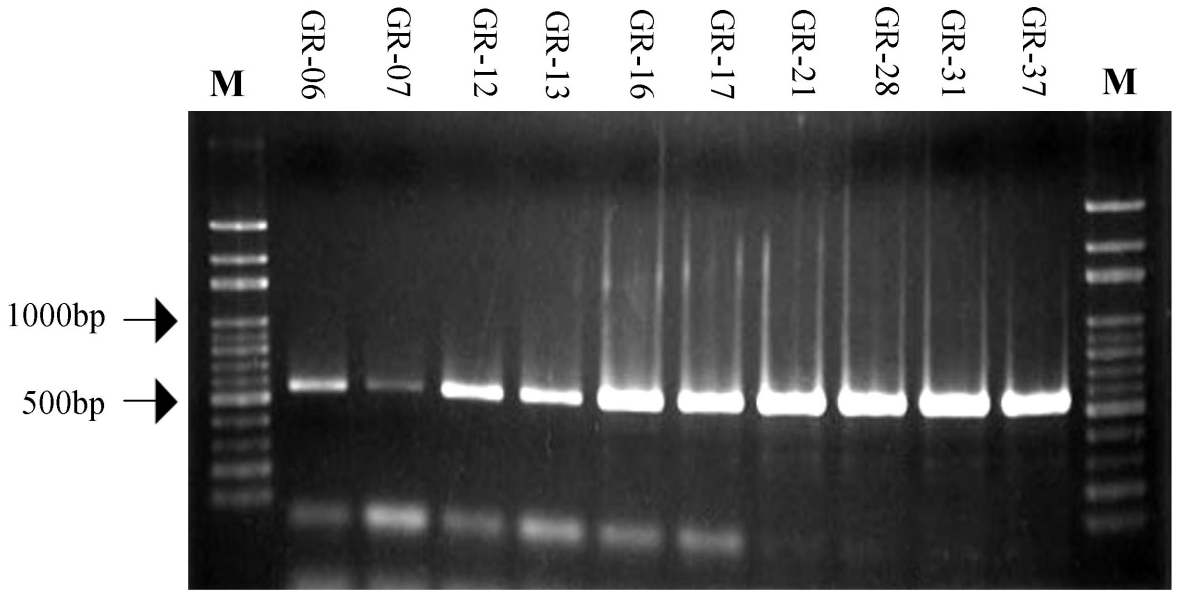


圖四、在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基平板上測定溫度對杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株和杏鮑菇 PE-B011 菌株菌絲生長之影響 (生長七天的結果)。

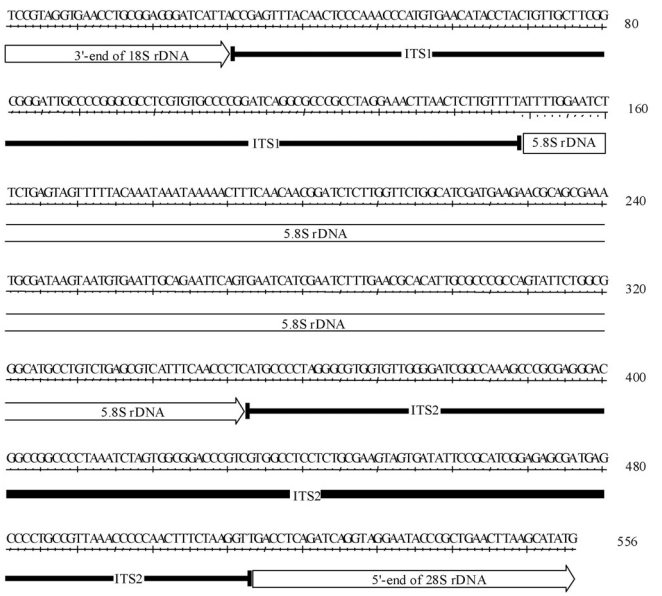
Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Gliocladium roseum* isolates GR-12、GR-28 and *Pleurotus eryngii* PE-B011 on potato dextrose agar plates for 7 days.
Bar = Standard error.

以分子生物技術佐證病原菌的鑑定

以 ITS1 與 ALRO 二個核酸引子進行杏鮑菇褐斑病菌的核糖體轉錄外區間的 DNA 片段聚合連鎖反應，本試驗共測試 10 個菌株，電泳後發現各菌株，均只產生一個相同大小約 556 bp 的條帶 (圖五)。將這 10 個經 PCR，電泳



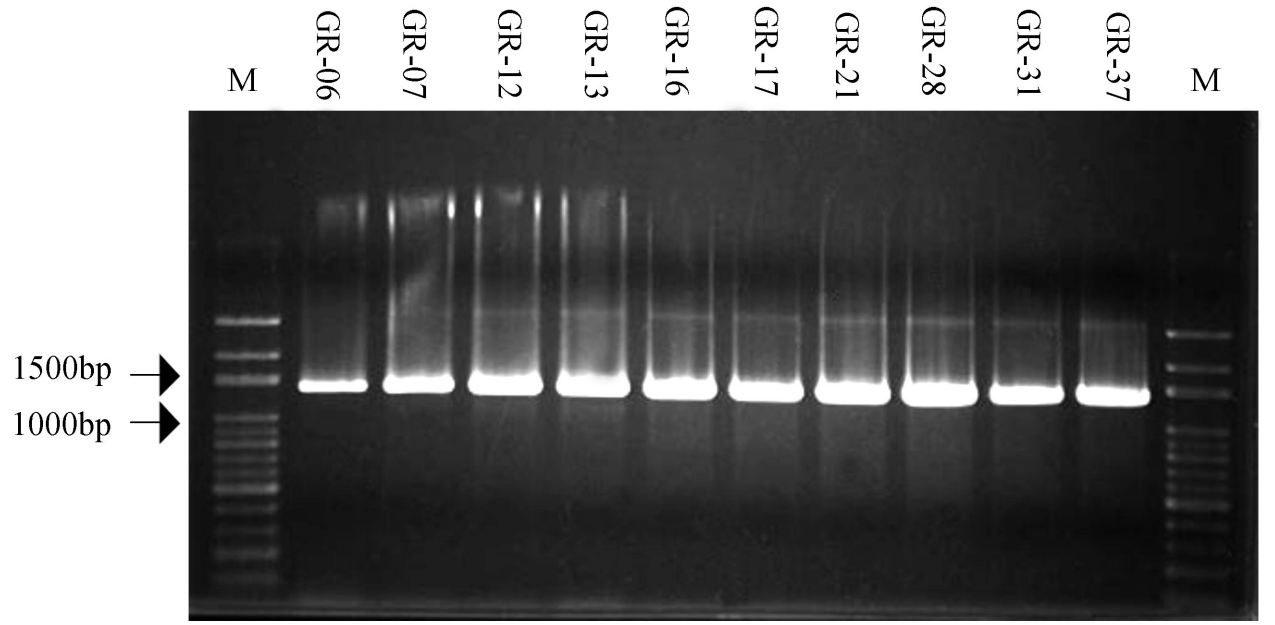
圖五、聚合酵素連鎖反應增幅杏鮑菇褐斑病菌 10 個菌株之 ITS1、ITS2 區域與 5.8S rDNA。
Fig. 5. Agarose gel electrophoresis showing amplification product of PCR in the ITS1、ITS2 regions and 5.8S rDNA of ten isolates of *Gliocladium roseum*, the causal agent of brown spot disease of king oyster mushroom *Pleurotus eryngii*. Lane M: 100 bp marker (GeneMark).



圖六、杏鮑菇褐斑病菌核糖體轉錄外區間 (internal transcribed spacer, ITS) 之核酸序列。
Fig. 6. Nucleotide sequence of internal transcribed spacer regions (ITS1、ITS2 regions and 5.8S rDNA) of *Gliocladium roseum*, the causal agent of brown spot of king oyster mushroom *Pleurotus eryngii*.

圖外觀一致的菌株，利用 PCR 純化試劑組回收 DNA 後，再將核酸片段以 pCRII-TOPO TA 載體選殖至大腸桿菌，藍白篩選後，挑取白色的轉形成功之菌株 (經限制酵素切割具有插入 DNA 片段者)，委託明欣生物科技公司，進行核酸解序。結果全部 10 個菌株之 ITS 序列完全相同，同時整個 ITS DNA 序列大小爲 556 bp (圖六)。將 ITS 核酸序列利用 DNAstar 軟體，與美國生物技術信息中心資料庫 (NCBI) 的核酸基因庫序列群組分析，結果發現本病原菌之 ITS 核酸序列與 13 個 *Gliocladium* sp.(Acc. No. AF139858 與 AF048733 等) 相似度較高，達 98.2-99.6%，與 *Verticillium* 菌屬的相似度僅 50.6 - 55.10% (Acc. No. AF048740、AF048741 及 AF048742)，因此確定本病原菌爲 *Gliocladium* 屬的菌類。

利用專一性核酸引子 LROR 與 LR7 針對 28S rDNA 核酸序列作聚合酵素鏈反應與電泳分析；將杏鮑菇褐斑病菌 10 個菌株，萃取 DNA，以專一性核酸引子 LROR 與 LR7 進行聚合酵素鏈反應後，以電泳分析 PCR 產物，結果 10 個菌株均只產生一個約 1355 bp 的條帶 (圖七)。利用試劑組將 PCR 產物回收後，同上述 ITS 轉型株方式將具有插入片段之菌株，請明欣生物科技有限公司解序，完成的序列再與 NCBI 的 GenBank 比對，結果發現本病原菌之28S rDNA 核酸序列與 *G. roseum* (Acc. No. U00736)、*Nectria ochroleuca* (Acc. No. U00746、U00751、U00752 及U00750) 的相似度最高，達 97.3-98.6%，依此相似度完成遺傳距離之樹狀圖 (圖八)，將本病原菌鑑定爲*G. roseum* Bainer。



圖七、聚合酵素連鎖反應增幅杏鮑菇褐斑病菌 10 個菌株之 28S rDNA 。
Fig. 7. Agarose gel electrophoresis showing amplification product of PCR in the 28S rDNA of ten isolates of *Gliocladium roseum*, the causal agent of brown spot of king oyster mushroom *Pleurotus eryngii*. Lane M: 100 bp marker (GeneMark).

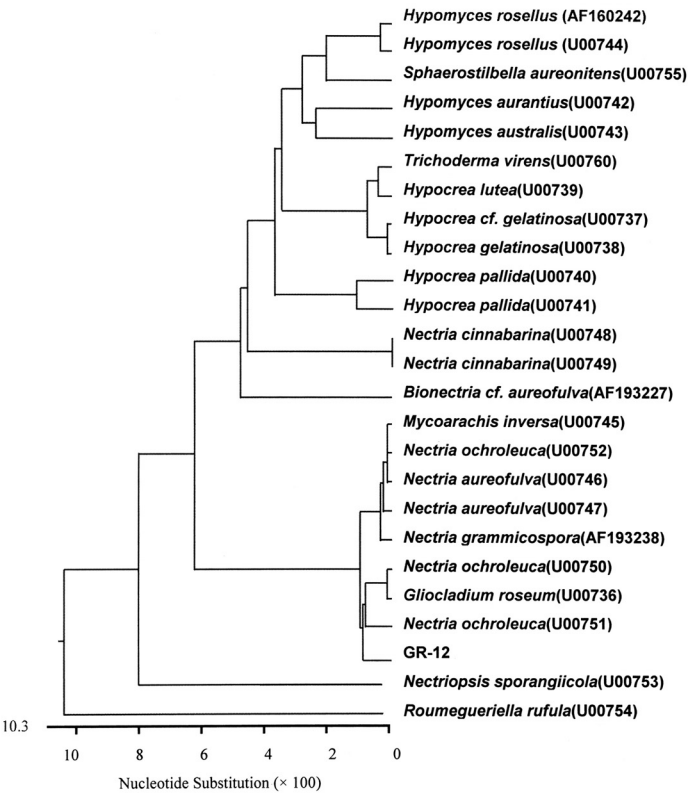
病原菌對其他食用菇類之病原性測定

以GR-12 與GR-28 孢子懸浮液接種 12 種食用菇類，在 16 ℃ 的定溫生長箱三天，結果僅黑木耳、紫丁香蘑及舞菇無病斑出現外，其餘供試菇類均出現病徵，其中夏季鮑魚菇出現黃褐色病斑，且會擴大融合成大病斑；至於在洋菇上則僅出現小的褐斑 (表一)。

討　論

Gliocladium Corda 爲 *Hyphomyces* 屬，Domsch 等氏[7] 提出 *G. roseum* 具有二種分生孢子柄，一種爲類似 *Verticillium* 狀，會產生液滴狀無色的分生孢子，另一種爲類似 *Penicillium* 狀，會產生鏈狀分生孢子。惟無性世代會產生類似 *Verticillium* 狀的分生孢子柄，並非僅 *G. roseum* 有之，其實 *Sphaerostilbella lutea* 亦會產生[15]。因此，在分類上不能只以具有類似 *Verticillium* 分生孢子柄，作爲 *G. roseum* 鑑定之依據。本文的杏鮑菇褐斑病菌，在鑑別培養基下呈橘紅色菌落，可產生二種形態的分生孢子柄，分生孢子卵圓形，基部略爲凸起，透明、單胞，有黏液泌出黏聚成球狀，故將其鑑定爲 *G. roseum*。

核糖體轉錄外區間 (Internal transcribed spacer, ITS) 的核酸序列在眞菌界之演化上，具有高度的保留性，可以作爲物種親緣關係之參考。利用基因作種系間的分析，可將眞菌的有性世代與無性世代作結合，成爲一個有系統的分類方法[16]。Mckay 等氏[11] 指出以 ITS 方法也可鑑定洋菇蛛網病的病原菌爲 *Cladobotryum dendroides*。 Rehner 與



圖八、杏鮑菇褐斑病菌 GR-12菌株之 28S rDNA 核酸序列與美國生物技術中心 (NCBI) 資料庫 (GenBank) 比對之親緣關係樹狀圖。
Fig. 8. Phylogenetic tree illustrating the pairwise genetic distance of the sequence of 28S rDNA of *Gliocladium roseum* isolate GR-12 compared with sequences deposited in the GenBank database of National Center for Biotechnology Information (NCBI).

表一、*Gliocladium roseum* 在不同菇類子實體上的病原性測定

Table 1. Pathogenicity tests of *Gliocladium roseum* obtained from diseased king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* on fruiting bodies of various mushroom-producing fungi

Mushroom-producing fungus[1]	Pathogenicity test[2]		Symptom appearance (days after inoculation)	
	GR-12	GR-28	GR-12	GR-28
Agaricus bisporus	+	+	2	2
Auricularia polytrica	−	−	-	-
Coprinus comatus	+	+	3	3
Flammulina velutipes	+	+	2	2
Grifola frondosa	−	−	-	-
Hypsizigus marmoreus	+	+	2	2
Lentinus edodes	+	+	2	2
Lepista nuda	−	−	-	-
Pleurotus cystidosus	+	+	2	2
Pleurotus eryngii	+	+	3	3
Pleurotus sajor	+	+	2	2

[1.] Each fungus was inoculated with 2 ml spore suspension (1.5×10^6 spores/ml) of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 on its sporophores cultivated at 16℃.
[2.] +, with symptoms; −, without symptom.

Samuels 兩氏[15] 在 1994 年發表以28S r DNA 的序列將 *Gliocladium* spp. 區分至種名。本文以 PCR 技術，增幅病原菌核糖體 ITS 片段與 28S rDNA 片段，並將其二者序列與NCBI 之 GenBank 進行比對，發現 ITS 核酸序列與 NCBI GenBank 登錄之 13 個 *Gliocladium* sp. (Acc. No.AF139858、AF048733、AF358244、AF358243、AF358241、AF358234、AF358233、AF358231、AF132803、AF358228、AF358225、AJ309346及 AJ309334) 相似度高達 98.2-99.6%。在 28S rDNA 核酸序列與 GenBank 登錄之 *Gliocladium roseum* (Acc. No. U00736) 及 *Nectria ochroleuca* (Acc. No. U00746、U00751、U00752 及 U00750) 的相似度高達 97.3-98.6%，綜合 ITS 與28S rDNA 之分子生物分析，與本菌的形態生理特性，證實本菌係爲 *G. roseum*。

目前 *Gliocladium* 屬的眞菌有 *G. roseum* 與 *G. virens*，已被廣泛用於研發拮抗微生物製劑，並被推薦應用於防治作物眞菌性病原菌如 *Fusarium* spp.[19]、*Verticillium* spp.[11] 及 *Rhizoctonia solani* [14] 等等。本文發現 *G. roseum* 可危害多種菇類如洋菇、金針菇、秀珍菇與夏季鮑魚菇等；此外，文獻記載 [7,18] *Gliocladium* 屬的部分菌種，尙會侵染多種菇類。顯示，現今世界各地推動微生物製劑防治作物病害的過程，尤應預先完成本菌對菇類產業的風險評估，往後才可避免新事端的發生。

引用文獻

1. 彭金騰. 1996. 杏鮑菇自動化生產之研究 中華民國農業科技研究成果 p.135-137. 行政院農業委員編印. 臺北.
2. 彭金騰. 1997. 不同數種來源單獨與混合木屑對杏鮑菇瓶栽生產影響之研究. 中華農業研究 46: 51-59。
3. 彭金騰. 1998. 杏鮑菇自動化生產之研究. 中華民國農業科技研究成果. p.44-46. 行政院農業委員編印. 臺北.
4. 彭金騰、李建民、蔡英芳. 2000. 不同有機添加物對杏鮑菇瓶栽自動化生產影響之研究. 中華農業研究 49: 56-64。
5. 有馬忍、陶山一雄. 2000 *Cladobotryium varium.*によるエリンギわたかび病 (新稱) 日本應用きのこ學會誌 8: 1-20.
6. Collopy, P. D., Largeteau-Mamoun, M. L., Romaine, C. P., and Royse, D, J. 2001. Molecular phylogenetic analysis of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. Phytopathology 91: 905-912.
7. Dadwal, V. S., and Jamaluddin. 1984. A new disease of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). Current Science 53: 532-533.
8. Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. 1980. *Gliocladium* Corda 1840. Pages 368-377 *in*:Compendium of Soil Fungi. K. H. Domsch, and W. Gams, eds. Academic Press. London.
9. Dragt, J. W., Geels, F. P., De Bruijn, W. C., and Van Griensven, L. J. L. D. 1996. Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. Mycol. Res. 100: 1082-1086.
10. Ferri, D. F. 1985. Batteriosi in funghi del gen. Pleurotus. Mushroom Information. pp. 47-54.

11. Gourley, C. O., and Macnab, A. A. 1964. *Verticillium dahliae* and *Gliocladium roseum* isolation from strawberries in nova scotia. Can. J. Pl. Sci. 44:544-549.
12. Mckay, G. J., Egan, D., Morris, E., Scott, C., and Brown, A. E. 1999. Genetic and morphological characterization of *Cladobotryum* species causing cobweb disease of mushrooms. Appl. Environ. Microbiol. 65: 606-610.
13. Peng, J. T., Dai, M. C., Tsai, Y. F., Chen, M. H., and Chen, J. T. 2001. Selection and breeding of king oyster mushroom. J. Agric. China. 50: 43-58.
14. Pugh, G. J. F., and Emden, J. H. V. 1969. Cellulose decomposing fungi in polder soils and their possible influence on pathogenic fungi. Neth. J. Pl. Pathol. 75: 287-295.
15. Rehner, S. A., and Samuels, G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Mycol. Res. 98: 625-634.
16. Schroers, H. J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., and Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. Mycologia 91: 365-385.
17. Smalley, E. B., and Hansen, H. N. 1957. The perfect stage of *Gliocladium roseum*. Mycologia 49: 529-533.
18. Thapa, C. D., and Seth, P. K. 1989. Brown spot disease of white button mushroom [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] due to *Gliocladium deliquescens* Sopp. Mushroom Science XII: 781-787.
19. Vaartaja, O., and Salisbury, P. J. 1965. Mutual effects in vitro of microorganisms isolated from tree seedlings, nursery soil, and forests. Est Sci. 11: 160-168.
20. Vilgalys, R., and Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several Cryptococcus species. Bacteriol. 172: 4238-4246.
21. Zadrazˇil, F. 1978. Cultivation of Pleurotus. Pages 521-557 *in*: The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. S. T. Chang and W. A. Hayes, eds. Academic Press. New York.

ABSTRACT

Chen, J. T.[1] and Huang, J. W.[2,3] 2004. Identification of *Gliocladium roseum*, the causal agent of brown spot of the king oyster mushroom *Pleurotus eryngii*. Plant Pathol. Bull. 13: 17-26. ([1]Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, COA, Wufeng, Taichung, Taiwan; [2]Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan; [3]Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw, Fax: +886-4-22851676)

In 1998, commercial cultivation of *Pleurotus eryngii* (Dc. : Fr.) Quēl. in Wufeng area including the Agricultural Research Institute (ARI), COA, in central Taiwan was severely affected by an unknown disease. Symptoms consisted of brown spot, curling of the tissues, sometimes even shrinking and cracking of the infected fruit bodies. Ten isolates, GR-6、GR-7、GR-12、GR-13、GR-16、GR-18、GR-23、GR-28、GR-31 and GR-37 were obtained from diseased fruiting bodies. Pathogenicity was confirmed by inoculating the fungus onto fruiting bodies of king oyster *P. eryngii* and incubating the inoculated fruiting bodies under high humidity (RH＞93%) at 16℃. Discoloration of brown spot similar to the original symptoms developed only on inoculated king oyster mushrooms. The same fungus was reisolated from the artificially infected king oyster mushrooms. Noninoculated king oyster mushrooms remained symptomless. On malt extract peptone agar, the colony diameter reached 32.5-35.0 mm 10 days after inoculation at 20℃, the colony appeared orange to salmon red. Mycelium with septa produced verticillate conidiophores 110-170 μm, bearing 2-6 whorls of phialides 13-28 μm and conidiophores bearing the "densely penicillate" phialides 10-16 μm . Conidia were hyaline, one-celled, ovoid , accumulating in a single, slimy and protruding base, smooth-walled, 4.0-6.8 x 3.0-4.5 μm. The fungus was identified as *Gliocladium roseum* Bainier according to the descriptions of Domsch, *et al* (1980)、Schroer, *et al* (1999) and Smalley & Hansen (1957). The causal agent was further confirmed by comparing the ITS and 28S rDNA sequences of ten isolates of the pathogen with NCBI database. The optimum temperature for conidial germination and mycelial growth of *G. roseum* isolates GR-12 and GR-28 was 20-32℃. *G. roseum* isolates GR-12 and GR-28 was also pathogenic to *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach、*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.、*Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.、*Pleurotus sajor* (Fr.) Sing.、*Pleurotus cystidosus* Miller、*Hypsizigus marmoreus* Bunashimeji and *Coprinus comatus* (Mull.: Fr.) Pers.

Key words : *Pleurotus eryngii*, *Gliocladium roseum*, ITS (internal transcribed spacer), 28S rDNA