植物病理學會刊　12:27-32, 2003

偵測荔枝露疫病菌之半選擇性培養基

楊宏仁[1]　柯文琪[1]　安寶貞[2]　蔡志濃[2]　程永雄[1,3]

1 嘉義市　行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所　植物保護系
2 台中縣　行政院農業委員會農業試驗所　植物病理組
3 聯絡作者：電子郵件 cyh@dns.caes.gov.tw，傳眞：+886-5-2773630
接受日期：中華民國 92 年 1 月 15 日

摘　要

楊宏仁、柯文琪、安寶貞、蔡志濃、程永雄. 2003. 偵測荔枝露疫病菌之半選擇性培養基. 植病會刊 12:27-32.

在 10% V-8 juice agar 培養基中加入 25% 撲克拉 (Prochloraz) E.C 、23.7% 依普同 (Iprodione) F.P. 及 43% 嘉賜貝芬 (3% Kasugamycin + 40% Carbendazim) W.P. 等三種殺菌劑有效成分各 10 ppm 及 ampicilin 200 ppm 製成荔枝露疫病菌之半選擇性培養 (PIKA 培養基)，可有效抑制或延緩自荔枝殘果、葉片、根部及土壤分離荔枝露疫病菌時其他菌類如炭疽病菌、鐮胞菌、根黴菌及細菌等雜菌汙染，並可在兩天後獲得生長良好且產生豐富胞囊的荔枝露疫病菌菌落。此半選擇性培養基較 10% V-8 juice agar 及常用於分離疫病菌的 AMP medium (10% V-8 juice agar 中加入 ampicilin 、mycostatin 及PCNB) 更能減少雜菌的污染而增加荔枝露疫病菌檢出。使用此培養基可自人工接種 69 天後的荔枝葉片病斑或鄰近未顯示病斑之組織分離出荔枝露疫病菌菌落。

關鍵詞：荔枝露疫病菌、半選擇性培養基、荔枝露疫病

緒　言

荔枝是台灣夏季重要水果，根據農委會統計資料 2001 年之種植面積爲 11,859 公頃，產值約 14 億元新台幣，主要栽植於高屏地區、嘉南地區及中彰投地區等三大產區。荔枝主要供台灣本地生食外，尚有部分供加工用途，目前並積極拓銷日本、美加、東南亞等地，爲一有潛力的產業。

然而，荔枝果實成熟季節，嘉南及中彰投產區適值陰雨連綿的梅雨季節，經常發生嚴重的果實露疫病，造成果皮褐化影響果實品質，嚴重者甚至發生大量落果使果農損失慘重，是荔枝產業最嚴重的問題 (1,2,5,6)。而在病害診斷時，若遇天氣好轉，則果實上並無白色菌體可供判斷，只見褐化病斑而常與酸腐病及藥害斑混淆，無法明確判斷病因，也使得防治工作難以對症下藥影響效果；因此若能有一個對荔枝露疫病菌 (*Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al) 具選擇性的培養基，就能快速的自組織分離並判斷病原菌；在基礎培養基中加入抗菌物質限制非目標微生物生長，而使得目標微生物容易獲得，開始於 1960 年代，其中有關 *Phytophthora* 一屬選擇性培養基的開發，是最早開始的微生物之一，根據 Tsao 氏於 1983 年統計已有 35 種有關 *Phytophthora* 的選擇性培養基被開發使用 (10)。因爲露疫病菌與疫病菌生物特性相近 (6,8)，過去曾利用 Ko 氏等人常用於分離疫病菌的選擇性培養基 (AMP medium) 作爲荔枝露疫病菌的分離用 (7,9)，雖然可以從較新鮮的病組織中分離出露疫病菌，但是此培養基仍無法有效抑制 *Colletotrichum* 、*Fusarium* 、*Rhizopus* 等菌之生長 (3)，因此我們以 AMP 培養基爲基礎進行研發荔枝露疫病菌選擇性培養基。本文報告分離荔枝露疫病菌用半選擇性培養基之配方及其應用於荔枝葉片露疫病菌監測的效果，希望對於病原判斷及發病生態研究工作有所幫助。

材料與方法

供試菌株及材料

本研究中所使用露疫病菌菌株大部分是分離自南投地區荔枝果實上之 LPL001，部份試驗亦使用 LPL002 及 LPL007，皆具有強病原性。露疫病菌培養於 5% CV-8 juice agar (5% centrifuged V-8 juice agar: 一公升水中加入離心後之 V-8 果菜汁濾液 50 cc 、$CaCO_3$ 2 克及洋菜粉 20 克)，25℃、12 小時照光下。接種用胞囊懸浮液則取前述四至七天後之培養，以無菌水製得約 10^6 sporangia/ml 濃度之懸浮液。雜菌抑制效果測試用之接種菌塊則取培養於

5% CV-8 juice agar 平板上距接種源1.5 公分之1 mm^3 正立方菌體小塊。供人工接種用之荔枝爲盆植之黑葉荔枝品種。

藥劑抑制菌體生長能力測試

以PDA (potato dextrose agar) 或AMP (ampicillin 0.1g, mycostatin 0.05g, PCNB 0.01 g 加入一公升的5% CV-8 juice agar中) [7,9] 自不同荔枝組織分離露疫病菌時，經常發生其他生長速度較快的微生物污染，以致無法分離出露疫病菌，最常見的是 *Fusarium*、*Rhizopus*、*Colletotrichum*、*Geotrichum* 及細菌，因此若能抑制前述污染微生物之生長，則較易獲得露疫病菌；污染雜菌中 *Geotrichum* sp. 菌落型態與露疫病菌差異懸殊容易判別，且不易找到有用的抑制藥劑 [4]；而細菌之污染只需調整 ampicillin 濃度即可加以抑制，因此不針對 *Geotrichum* 及細菌再去進行藥劑之篩選。其他眞菌之抑制藥劑篩選，則於滅菌後 55℃ 恆溫水槽保溫之 10% V-8 juice agar (一公升培養基中加入 100 cc 的V-8 juice 及3 克的$CaCO_3$，而爲增加硬度將洋菜粉量提高爲 30 克) 中加入不同濃度的藥劑，在每個培養皿中加入 20 ml 含藥劑的培養基；將前述接種菌塊移置於平板中央，每藥劑分別有 0、1、10、50 及 100 ppm a.i. 等濃度，每處理每菌皆有 3 個培養平板，接種後置於 25℃、全日照光的恆溫箱培養三天檢查生長與否；本實驗重複三次。供試藥劑有Prochloraz 等26 個(表一)。

半選擇性培養基調配

以前述生長抑制測試結果爲基準，選擇對露疫病菌生長無抑制作用但對各污染眞菌具抑制能力的藥劑組合，將其與ampicillin 混入前述10% V-8 juice agar 中，於96 孔的培養盤每個小孔加入0.12 ml 的含藥劑培養基，將LPL001 及個別雜菌菌塊移入，觀察這些組合對露疫病菌及污染眞菌生長抑制結果，再將較適合之1 ml 的藥劑組合培養基加入於24 孔培養盤之小孔中並移入菌種塊進行添加藥劑種類及濃度之修正，選出最適合的配方，簡稱爲PIKA 培養基。

表一、露疫病菌、炭疽病菌、鐮胞菌及麴菌在含 10 ppm 不同藥劑成分之10% V-8juice 培養基上菌絲生長之抑制情形。＋：藥劑完全抑制菌絲生長，－：藥劑無法完全抑制菌絲生長

Table 1. The mycelial growth inhibition of *Peronophythora litchii*, *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. and *Rhizopus* spp. on 10% V-8 juice agar ammended with test (10 ppm a.i.) chemical.

Fungi / Chemicals	*Peronophythora litchii*	*Colletotrichum* spp.	*Fusarium* spp.	*Rhizopus* spp.
Prochloraz	－[1]	＋[2]	－	－
Iprodione	－	－	－	＋
43% (Kasugamycin + Carbendazim)	－	－	＋	－
Ampicillin	－	－	－	－
Bitertanil	－	＋	－	－
Bupirimate	－	－	－	－
Carbendazim	－	－	－	－
Chlorothalonil	－	＋	－	－
Ethirimol	－	－	－	－
Fenarimol	－	－	－	－
Flusilazol	－	－	－	－
81.3% Kasugamycin + Copper oxychloride)	－	－	－	－
Mycostatin	－	＋	－	－
Ofurace	－	－	－	－
PCNB	－	＋	－	－
Penconazole	－	－	－	－
Pimaricin	＋	＋	－	－
Polyoxins	－	＋	＋	－
Procymidone	－	－	－	－
Propiconazole	－	＋	－	－
Pyrifenox	－	－	－	－
Rifampicin	－	－	－	－
Thiabendazole	－	－	－	－
Thiophanate-methyl	－	－	－	－
Triadimefon	－	－	－	－
Vinclozolin	＋	－	－	－

1. －: mycelia growth not inhibited absolutely by test chemical
2. ＋: mycelia growth inhibited absolutely by test chemical

PIKA 培養基與其他培養基對雜菌抑制效果之比較

將前述荔枝露疫病菌及分離時常見雜菌菌塊同時移入荔枝露疫病菌半選擇性培養基 (PIKA 培養基)、10% V-8 juice agar 及 AMP 培養基中，置於 25℃、全日照光的恆溫箱培養三天檢查生長與否，每種培養基 10 個培養皿；重複三次。

PIKA 培養基與其他培養基分離效果比較

比較PIKA 培養基、10% V-8 juice agar 與AMP 培養基分別自荔枝葉片、根部及果實做組織分離能力；將已接種露疫病菌胞囊懸浮液的上述組織切約0.5 cm 長的組織塊，不經清洗及表面消毒即置放於培養基平板上，每皿放 10 塊組織塊；置放於 25℃、全日照光的恆溫箱中，於培養 2 天及 7 天後比較不同培養基分離露疫病菌效果及雜菌污染情形。

PIKA 培養基應用於葉片病原菌偵測

於濕室內黑葉荔枝嫩稍噴上前述胞囊懸浮液接種，約二天後可見嫩葉上出現褐色病斑，每三天採三片接種的葉片，任意於葉片病健部切取約 1 mm^3 的組織小塊放於 PIKA 培養基上，放於 25℃、全日照光的恆溫箱中，觀察紀錄露疫病菌之分離率。

結　果

半選擇性培養基調配

在前述10% V-8 juice agar 中加入不同藥劑測試對於露疫病菌等之生長完全抑制效果，分別列出各藥劑在 10 ppm a.i. 濃度下對 *P. litchii*、*Colletotrichum*、*Fusarium*、*Rhizopus* 等之結果如表一所見。在 100 ppm a.i. 下 26 個供試藥劑中僅有 Ofurance、PCNB 及 Vinclozolin 對 *P. litchii* 具有抑制效果。自表一所列供試藥劑中選擇在 100 ppm 下對 *P. litchii* 無生長抑制效果的藥劑，但在濃度 10 ppm 下分別對 *Colletotrichum* 、*Fusarium*、*Rhizopus* 等菌有生長抑制效果的藥劑加以組合，再次於 96 及 24 孔之培養盤中測試其對四種菌生長抑制情形，最後選出在培養基中加入下列之藥劑組合可以控制細菌及 *Collectotrichum*、*Fusarium*、*Rhizopus* 之增殖但不抑制露疫病菌生長作爲半選擇性培養基 (簡稱 PIKA 培養基)，其成分及配置方法爲：基本配方爲一公升培養基中含有 V-8 juice 100 ml 及 30 克的洋菜粉；培養基先經高溫滅菌，待溫度下降至約 55℃ 時，再將 25% 撲克拉 (Prochloraz) E.C. 10 ppm a.i.、23.7% 依普同 (Iprodione) F.P. 10 ppm a.i.、43% 嘉賜貝芬 (3% Kasugamycin + 40% Carbendazim) 10 ppm a.i. 及 ampicillin 200 ppm 之藥劑組合均勻混入後倒入培養皿中。將前述眞菌全部移入同一培養皿中，經 48 小時後只有露疫病菌可以生長並且已產生多量的胞囊，其巨觀型態已能清楚分辨。

PIKA 培養基與其他培養基效果比較

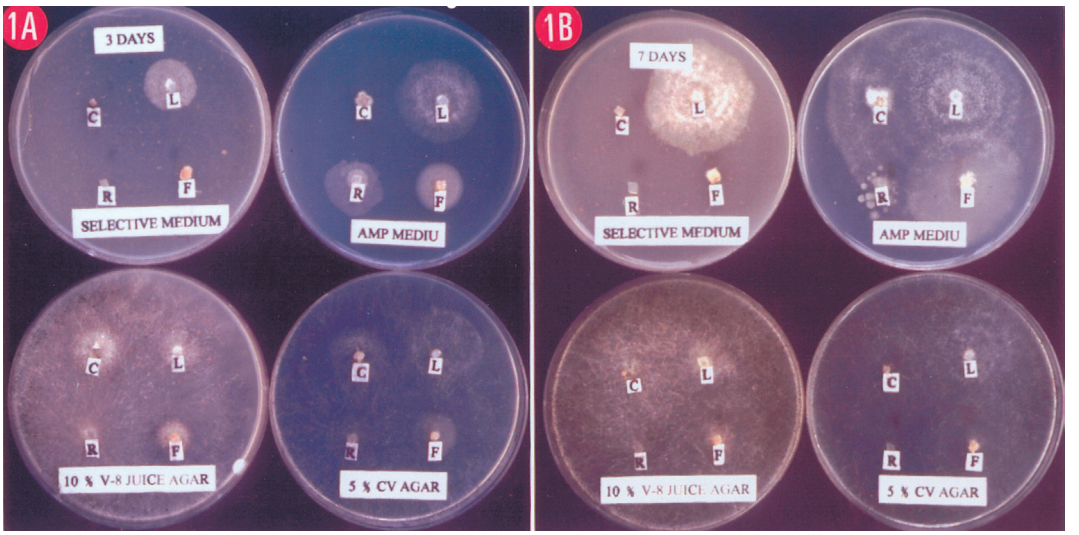
不論在培養三天後或是七天後觀察，在 PIKA 培養基中 *Colletotrichum* 、*Fusarium*、*Rhizopus* 都無法正常生長，*P. litchii* 雖然稍受抑制，但是胞囊產生容易有助於判斷；兩種含 V-8 juice 培養基對於四種眞菌皆無法抑制其生長，四種眞菌生長快速互相掩蓋。以PIKA 及 AMP 培養基可以自所有接種露疫病菌的葉片組織塊中再分離出病原，但是使用 10% V-8 juice agar 則僅有 64% 之葉片組織塊可見露疫病菌長出；AMP 培養基對於 *P. litchii* 幾乎無抑制效果，但是對於 *Fusarium* 之抑制能力不佳。使用 PIKA 培養基分離荔枝殘果、葉片及根部之組織，皆能於兩天後得到比 10% V-8 juice agar 與AMP 培養基乾淨的荔枝露疫病菌之菌落，生長七天後之的結果亦然；而土壤稀釋液平板分離二天後雖然無法見到明顯的露疫病菌菌落，但七天後則可與另二個培養基有明顯之區別(圖二)。

PIKA 培養基應用於葉片病原菌偵測

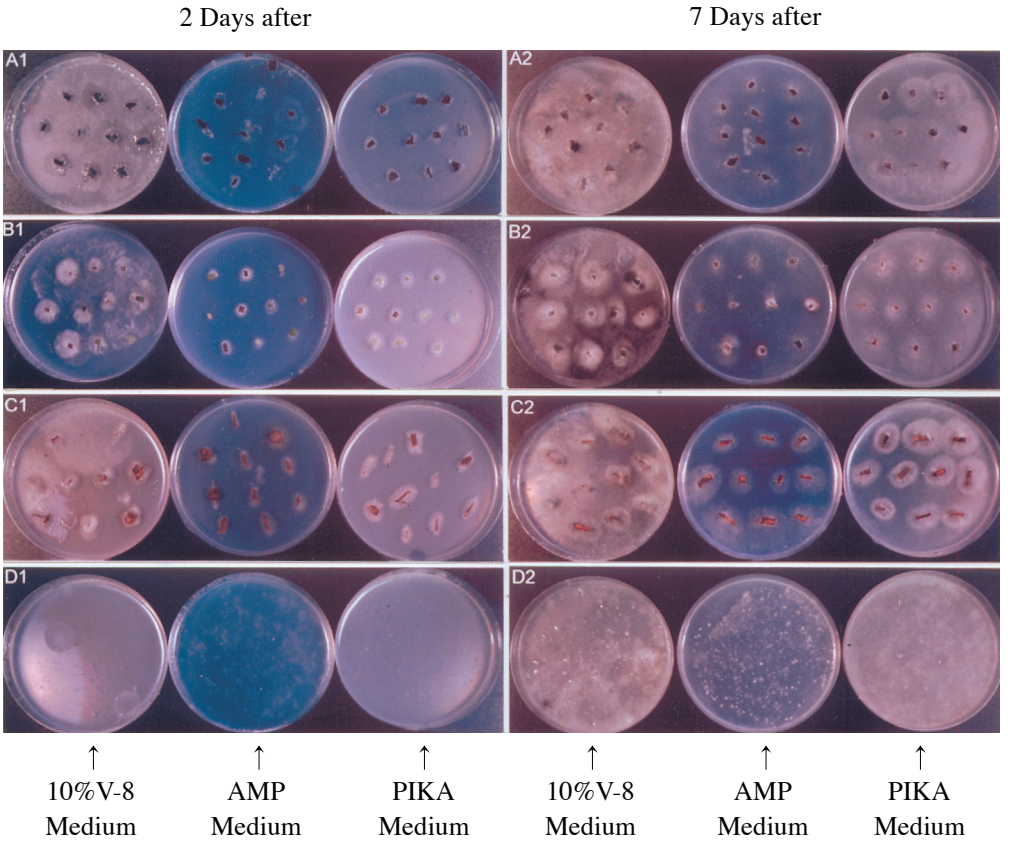
在濕室內的荔枝嫩葉接種，二天後即可見褐色病班，且有沿葉脈擴展並受限葉脈之現象 (圖三)。以 PIKA 培養基偵測，不論葉片組織是否有可視之褐化病斑，皆能自葉片小塊分離出露疫病菌之菌落 (圖四)，其分離率隨時間而遞減，接種後一個月內之分離結果在 10 片組織塊中有四至七片可以分離出露疫病菌，至接種後 69 天則僅有 2 片可分離出病原菌；尙未轉爲深綠色之嫩葉人工接種較易產生病斑，且較容易以PIKA 培養基分離出病原菌，至 69 天時其分離率仍爲 100%；較老之葉片不出現接種病斑且病原菌再分離率低，接種 3 天後之病原菌分離率 50%，但 21 天後即無法再分離到病原。至所有人工接種葉片使用完爲止，每三天取樣一次共取樣分離廿三次，即經接種後 69 天仍可自葉片分離出露疫病菌。

討　論

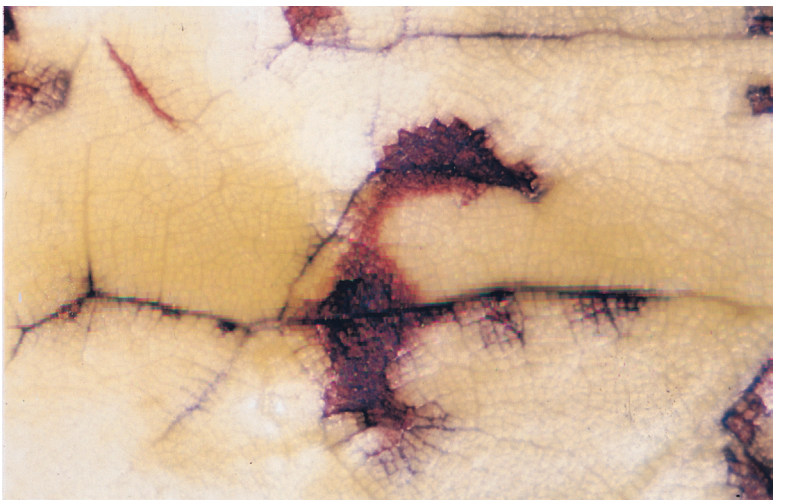
試驗結果顯示 PIKA 培養基雖然對於 *P. litchii* 之菌落生長稍有抑制現象，但第三天已可見到許多胞囊產生，而其他微生物如 *Colletotrichum* 、*Fusarium*、*Rhizopus* 則無生長現象，第七天之結果亦同，只有*P. litchii* 能正常生長；相對於PIKA 培養基之結果，10% V-8 juice agar 及 5% CV agar 雖然後者因 V-8 juice 減半使得微生物之生長受限，但顯然都無法抑制任何微生物之生長，尤其是 *Rhizopus* 之菌落已覆蓋其他菌落，而 AMP 培養基除了對炭疽病菌稍有抑制能力外，*Fusarium* 及 *Rhizopus* 仍可生長



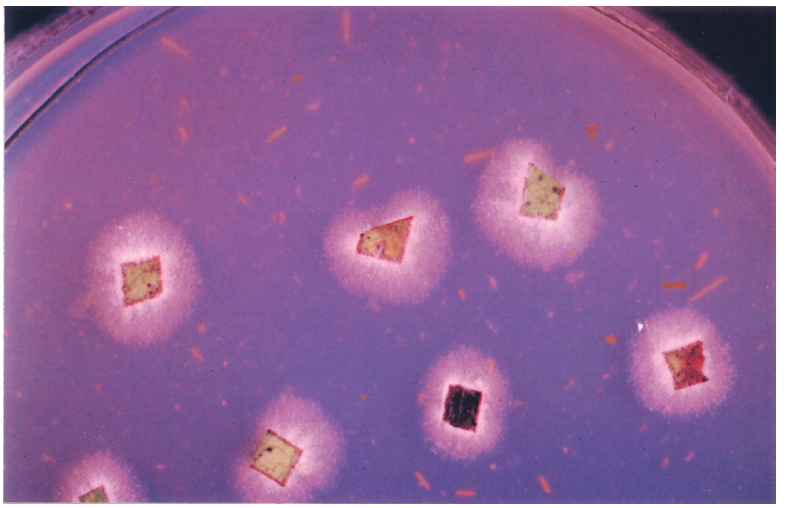
圖一、PIKA 培養基與其他培養基對雜菌抑制效果之比較
1A：培養三天後　1B：培養七天後　L：荔枝露疫病菌　F：鐮胞菌　R：根黴菌　C：炭疽病菌
Fig. 1. Comparison of inhibitory effect on contaminant fungi during isolating *Peronophythora litchii* between PIKA medium and 3 other kinds of media.
1A：inoculation for 3 days　1B：inoculation for 7 days　L：*Peronophythora litchii*
F：*Fusarium* spp.　R：*Rhizopus* sp.　C：*Colletotrichum* sp.



圖二、PIKA 培養基與10% V-8 juice agar 及AMP 培養基自荔枝殘果、葉片、根部及土壤分離露疫病菌之效果比較
A1、B1、C1、D1: 分別自荔枝殘果、葉片、根部及土壤分離露疫病菌培養二天後之結果
A2、B2、C2、D2: 分別自荔枝殘果、葉片、根部及土壤分離露疫病菌培養七天後之結果
Fig. 2. The selectivity of isolation *Peronophythora litchii* on PIKA medium compared with 10% V-8 juice agar and AMP medium.
A1, B1,C1 and D1: 2 days after isolation from litchi fruit debris, leaves, roots and soil in order.
A2, B2,C2 and D2: 7 days after isolation from litchi fruit debris, leaves, roots and soil in order.



圖三、荔枝嫩葉人工接種露疫病菌之發病病徵
Fig. 3. The symptom of litchi downy blight on the young leaf inoculated with *Peronophythora litchii*.



圖四、以PIKA培養基自人工接種後之荔枝嫩葉分離露疫病菌，培養兩天後之菌落
Fig. 4. The colonies of *Peronophythora litchii* grown from artificially inoculated litchi young leaf tissue on PIKA medium 2 days after incubation.

互相掩蓋干擾，因此除了 PIKA 外其他培養基都不適合使用於荔枝露疫病菌之分離 (圖一)。*Colletotrichum*、*Rhizopus* 及 *Fusarium* 分別受到Prochloraz、Iprodione 及 3% Kasugamycin + 40% Carbendazim 之抑制，細菌則以 ampicillin 加以控制，而這些藥劑在 10 ppm 下對露疫病菌生長並無太大之影響，所以可以使露疫病菌獲得選擇性的生長 (表一)。Tsao 氏 [10] 認爲與 mycostatin 同爲 polyene 類藥劑的 pimaricin 對於 *Phytophthora* 應爲無害，因此在 35 個選擇性培養基中就有 20 個培養基配方中選用，可是在本研究中發現其對 *P. litchii* 的生長卻有抑制現象 (表一)，此點與其運用於 *Phytophthora* 之結果完全不同，顯示二屬菌對於 polyene 類藥劑之感受性可能有所不同。

Tsao 氏 [10] 認爲一個好的培養基應當能夠從完全未經表面殺菌甚至清洗的組織中將目標微生物分離出，因爲有些微生物可能僅存在於組織之表面或是淺層組織中，若經洗滌或表面殺菌，都有可能將其清洗掉或是殺滅而使得分離失敗，但是如此則會增加污染掩蓋目標微生物之生長機會，PIKA 培養基完全符合本需求，不須對組織材料進行任何前處理，可以將材料直接分離。

曾以本培養基進行 *Phytophthora* 生長研究，發現多數的疫病菌可以正常生長，因此在針對荔枝殘體等進行 *P. litchii* 分離時，有可能分離出 *Phytophthora* 或是 *Pythium* 等菌，但是在研究過程中尚未發現有前述微生物之干擾，且其菌落型態亦可與 *P. litchii* 區分，因此並不會造成困擾而且可以用於分離疫病菌等。PIKA 培養基對於混入土壤中一天後的胞囊仍可以分離出，但是經兩天後其菌落仍無法

清晰判別，必須七天後方能鑑別(圖二)；且若將胞囊或游走子混入土中七天後，其分離將無法獲得，是爲本培養基缺點之一，其他培養基也無法自土壤樣品中獲得 *P. litchii* 菌落，因此究竟是本培養基之缺失或是本菌在土中存活力弱有關，則尚待進一步研究。

1998 年 10 月份於南投水里荔枝園發現距地面約 1 公尺以上主幹新長出新稍嫩葉出現沿葉脈擴展之褐化病斑，經組織分離後確定爲荔枝露疫病病斑，於溫室內進行人工接種亦獲得相似病徵(圖三)，其病徵有由維管束擴張之情形；在數年之觀察發現多數荔枝園初次發病都由近接地面之荔枝果實開始發病，經研究發現本病菌可以殘存於土壤及根部(未發表資料)，但是仍可發現初次發病開始於樹梢果實者，且水里新稍葉片發病之時期已非露疫病發生適期，因此懷疑本病原菌是否能於地上部位存活，經以PIKA培養基作病原分離，確定在荔枝嫩葉接種 69 天後，露疫病菌仍可於葉片組織中存活，且其分離未限定於有肉眼可見病斑位置上，其所代表的意義似乎表示露疫病菌的確能在地上部位活的組織中存活一段時間，此點對於露疫病防治工作具有重大的意義，值得進行進一步的研究工作。

致 謝

本研究承行政院農業委員會87科技-1.3-2(3-12)、88科技-1.3-檢-04及89科技-6.2-檢-3(6)經費補助，謹此致謝。

引用文獻

1. 孫守恭. 1992. 臺灣果樹病害. 世維出版社. 550 頁。
2. 張國輝. 1982. 荔枝病蟲害防治. 台灣農業18:51-54。
3. 楊宏仁、柯文琪、林杏穗. 1998. 荔枝露疫病菌選擇性培養基開發之初步成果. 植物病理學會刊7:212 (摘要)。
4. 蔡志濃、謝文瑞. 1999. 偵測荔枝酸腐病菌之選擇性培養基. 植保會刊 8：9-14。
5. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1984. Blossom blight of litchi in Taiwan caused by *Peronophythora litchii*. Plant Dis. 68:826.
6. Chen, C. C. 1961. A species of *Peronophythora gen. nov. parasitic* on litchi fruit in Taiwan. Special Publ. Coll. Agric., Natl. Taiwan Univ. 10:1-37.
7. Ho, H. H., Ann, P. J. and Chang, H. S. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 15. Taipei, 86 pp.
8. Ko, W. H., Chang, H. S., Su, H. J., Chen, C.C. and Leu, L. S. 1978. Peronophythoraceae, a new family of Peronosporales. Mycologia 70: 380-384.
9. Ko, W. H., Chang, H. S. and Su, H. J. 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71：496-497.
10. Tsao, P. H. 1983. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. Page 219-236. in：Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. D. C. Erwin, S. Bartmicki-Garcia and P. H. Tsao, eds. APS Press USA, 392 pp.

ABSTRACT

Yang, H. R. [1], Ko, W. C. [1], Ann, P. J. [2], Tsai, J. R. [2] and Cheng, Y. H. [1,3] 2003. A semi-selective medium for the isolation of litchi downy blight pathogen. Plant Pathol. Bull. 12:27-32. ([1.] Department of Plant Protection, Chiayi Agricultral Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, 60014, Taiwan; [2.] Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, 413, Taichung, Taiwan; [3.] Corresponding author, E-mail:cyh@dns.caes.gov.tw, Fax: +886-5-2773630)

Semi-selective medium (PIKA medium) was developed for isolation of *Peronophythora litchii* which consists of 10 ppm a.i. each of 25% Prochloraz E.C., 23.7% Iprodione F.P., 3% Kasugamycin + 40% Carbendazim W.P and 200 ppm ampicilin in 10% V-8 juice agar. The medium was able to inhibit or delay the growth of various kinds of contaminants including of bacteria, *Colletotrichum*, *Fusarium* and *Rhizopus* commonly found on medium during isolation of *P. litchii* from litchi fruits debris, leaves, roots and soils. On PIKA medium, *P. litchii* developed discernible colonies with abundant sporangial production in 2 days. It was more selective than 10% V-8 juice agar or AMP medium (10% V-8 juice agar amended with ampicilin, mycostatin and PCNB) used for isolating *Phytophthora*. By using this medium, *P. litchii* was isolated from both diseased and symptomless leaf tissue within 69days after artificial inoculation.

Key words: *Peronophythora litchii*, semi-selective medium, litchi downy blight