

## 香蕉不同品種對於黃葉病之抗性評估

關政平<sup>1</sup> 林孟逸<sup>2</sup> 吳明哲<sup>3</sup> 陳涵葳<sup>1,\*</sup>

### 摘要

關政平、林孟逸、吳明哲、陳涵葳。2016。香蕉不同品種對於黃葉病之抗性評估。台灣農業研究 65(4):365–373。

本研究以人工接種方式，比較「北蕉」、「新北蕉」、「台蕉 5 號」、「Gros Miche」、「南華蕉」及「玫瑰蕉」等 6 種受試香蕉品種，對香蕉黃葉病之耐受程度。試驗以出瓶後 5 wk 大小一致之蕉苗進行接種，追蹤接種後黃葉率、罹病率；此外，針對接種黃葉病原之香蕉假莖褐化部位進行定量分析，並配合即時聚合酶鏈鎖反應技術檢測接種後香蕉假莖內病原菌之含量，作為耐病程度之量化評估。結果顯示「玫瑰蕉」為 6 種供試品種中相對最抗黃葉病的品種，而「Gros Michel」為相對最為感病之品種。

**關鍵詞：**香蕉、香蕉黃葉病、巴拿馬病、耐病性。

### 前言

香蕉黃葉病又稱巴拿馬病 (Panama disease)，係由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (簡稱 Foc) 侵染香蕉造成，屬土壤傳播病原菌，可透過灌溉水或是以感染之土壤等方式傳播 (O'Donnell *et al.* 1998)。Foc 又可分為 4 個生理小種 (race)，其中以第 4 型生理小種對「華蕉」(‘Cavendish’, AAA group) 之生長發育及產量上造成負面影響最嚴重 (Hwang & Ko 2004)。病原菌侵染香蕉的過程是透過根部微管束入侵植物體，造成木質部阻塞，進而使得香蕉葉片無法獲取水分而黃化萎凋 (Li *et al.* 2013b)。典型的黃葉病是從下位葉開始黃化，由葉片上的葉脈開始直至整片葉片萎凋 (Nelson *et al.* 1994; Ploetz 2006)。其病徵除了外觀上觀察到的黃葉現象外，假莖褐化也是常用於鑑定黃葉病病徵指標之一 (Ghag *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013)。目前，尚未有研究針對此病害提出完全有效的防治方法，因此，為了降

低黃葉病害對香蕉產量的負面影響，篩選出抗病或耐病之香蕉品種為解決方法之一 (Budenhagen 2009)。

台灣高屏地區自 1967 年開始發生黃葉病，財團法人香蕉研究所 (以下簡稱「蕉研所」) 除推廣組織培養健康蕉苗外，亦推動病園水稻輪作，有效降低當時蕉園廢耕問題，並且利用病區選種、國外引種與組織培養蕉苗抗病篩選等方式，培育抗病植株，「新北蕉」(*Musa* spp. ‘Fromosana’, AAA genome) 據此成功自「北蕉」(*Musa* spp. ‘Pei-Chiao’, AAA genome) 變異苗中篩選出來。根據蕉研所於 1990 年春季，在中南部試種 40 ha，「新北蕉」黃葉病發病率為 4.3%，顯著低於「北蕉」之黃葉病發病率 25.5% (Taiwan Banana Research Institute 2002)。「Gros Michel」(AAA genome) 曾經是全球最主要的外銷品種，但 1950 年代卻遭香蕉黃葉病病原菌大肆摧毀，尤以中美洲受害最深。「玫瑰蕉」(Rose, AA genome)，於 1995 年自比利時國際香蕉種原中心引進，研究報

投稿日期：2015 年 11 月 9 日；接受日期：2016 年 1 月 19 日。

\* 通訊作者：swaychen@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 財團法人農業科技研究院植物科學研究所所長。台灣 新竹市。

告指出「玫瑰蕉」為抗黃葉病品種 (Chao *et al.* 2009)。「台蕉 5 號」(*Musa* spp. 'Tai Chaio No. 5', AAA genome)，中文俗稱為「玉山」，親本為「台蕉 3 號」，來源株系亦為「北蕉」。「台蕉 5 號」新植與宿根栽培抗病性試驗中指出，相較「北蕉」宿根栽培發病率 78.6%，「台蕉 5 號」僅有 16.5% 之發病率，顯示「台蕉 5 號」對香蕉黃葉病俱有中抗性 (Taiwan Banana Research Institute 2002)。「華南蕉」('Kluai Namwa' 或稱 'Pisang Awak', ABB genome)，與 AAB 型的「呂宋蕉」('Latundan')、「假呂宋蕉」('Mysore')、AAA 型的「紅皮蕉」('Morado') 在台灣山區栽培較多，通稱為「芭蕉」，植株粗壯適應性強，耐旱抗病，「華南蕉」對 Foc race 1 抗病，但對 Foc race 4 則感病 (Li *et al.* 2013a)。

由於 Foc 為土壤傳播真菌，若發生在香蕉栽培田區經常不易根除。為了分辨不同生理小種，利用分生方式使用序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified region; SCAR) 等技術找尋專一性引子並利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 方式進行核酸增幅，成功放大 race 4 專一性片段，可達到鑑定並區分 Foc 不同生理小種之目的 (Lin *et al.* 2009)。其他檢測 Foc 的技術亦被應用，包括 PCR、real-time PCR (Lin *et al.* 2013)、環型恆溫核酸增幅法 (loop-mediated isothermal amplification; LAMP) (Das *et al.* 2012)、real-time fluorescence LAMP (Lin *et al.* 2013) 等。此外，亦有使用盆苗篩選抗黃葉病之香蕉品種的系統 (Ghag *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013)。

本研究嘗試建立香蕉黃葉病快速篩選流程，並利用此篩選系統將 6 種不同香蕉品種依照耐黃葉病的程度分群，研究內容包含：確認病原菌之病原性、接種方法與條件、黃葉病發病指標、發病時間等。另外，本研究也建立 PCR、real-time PCR 等方式檢驗黃葉病原菌於菌土中之存在有無，或於香蕉品種中建立黃葉病菌的定量方式，以作為品種間發病程度的比較及應用於黃葉病害感染之檢測評估。

## 材料與方法

### 香蕉材料

本試驗所使用的「北蕉」、「新北蕉」、「Gros Michel」及「台蕉 5 號」小苗購自台灣香蕉研究所，「南華蕉」與「玫瑰蕉」吸芽則購自集優農場 (台灣南投市)；小苗或吸芽經無菌處理與組織培養繼代繁殖後，挑選苗齡約 1 mo 大小一致瓶苗，培養於 B3 固態培養基 (1/2 MS salts, 340 mg L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 160 mg L<sup>-1</sup> adenine sulfate, 3% sucrose, pH 5.5, 0.7% agar)，於 25°C ± 2°C、12 h 光照環境下培養，待小植株發根後出瓶，定植於 3 吋盆放置溫室馴化，5 wk 後選取株高一致且葉數接近的小苗進行接種試驗。

### 接種方法與條件

Foc 接種試驗參考 Tripathi *et al.* (2008) 及 Twizeyimana *et al.* (2007) 在實驗室內建立之平台。Foc 病原菌 (TBRI-3) 取自蕉研所。Foc 之繼代培養係是使用 Difco™ Potato Dextrose Agar (Difco, USA) 培養基。栽培介質培養方式為：Foc 菌塊於 Difco™ Potato Dextrose Broth (PDB, USA) 液態培養 1 wk (28°C, 150 rpm) 後於無菌操作台操作下使用 Cheese cloth 過濾去除菌絲，並搜集過濾後孢子液。利用離心法去除培養基。使用無菌水回溶孢子並利用血球計數器計算孢子濃度，調整孢子液至試驗濃度 10<sup>7</sup> spores mL<sup>-1</sup>。所有栽培介質皆經高溫高壓滅菌處理 (121°C, 20 min)，混合比例為根基旺：玉米粉：Foc 孢子濃度 107 spores mL<sup>-1</sup> = 2500 : 131 : 500 (mL) 後密封，於 28°C 培養 1 mo。將培養 1 mo 之菌土：無菌根基旺 = 1 : 3 混合過篩後使用。接種時，將蕉苗移植至栽培介質中，培養於溫室 (溫度 25–28°C)，每個處理之香蕉品種為 5 株，並含有未處理之負對照組，重複試驗至少 3 次。為避免 Foc 於土壤中的含量因澆水或環境因素逐漸減少，我們於香蕉接種黃葉病菌 7 d 後，開始每週於栽培介質中加入 1 次 20 mL pot<sup>-1</sup> 之 10<sup>7</sup> spores mL<sup>-1</sup> 之 Foc 懸浮液，並在 1 wk 內澆灌適量的 RO 水 2 次，1 次含量約為 30–40 mL pot<sup>-1</sup>。

## DNA 抽取 PCR 與 qPCR 檢測香蕉黃葉病菌

使用 MasterPure™ Complete DNA&RNA Purification Kit (EPICENTRE, Madison, WI, USA) 抽取 DNA。PCR 與 real-time PCR 反應使用之引子為 Foc-1：5'-CAGGGGATGTAT-GAGGAGGCTAGGCTA 以及 Foc-2：5'-GTGACAGCGTTCGTCTAGTTCCTTGAG (Lin *et al.* 2009)。進行 PCR 反應，每個反應之總體積為 25  $\mu$ L，分別加入 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer、2  $\mu$ L 2.5  $\mu$ M dNTP、2  $\mu$ L 10  $\mu$ M primer、0.5  $\mu$ L ProTaq DNA polymerase。PCR 反應使用之試劑：Pro Tag Plus (Protech，波士特，台灣)。PCR 條件為：95 $^{\circ}$ C 2 min，接著 95 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s，共 40 個循環後進行 72 $^{\circ}$ C 7 min。即時聚合酶連鎖反應使用試劑為 KAPA SYBR® FAST qPCR Kits (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA)，反應配方參考原廠建議濃度。混合反應試劑後使用 ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, USA) 進行反應，反應條件為 50 $^{\circ}$ C 2 min 後接著進行 40 次的循環反應，此循環反應條件為 95 $^{\circ}$ C 30 s 及 60 $^{\circ}$ C 40 s。40 個循環反應後接著進行 dissociation cycle：95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 1 min、95 $^{\circ}$ C 15 s 及 60 $^{\circ}$ C 15 s，確認放大片段專一性。反應後將所得的結果匯入 Excel 進行計算和資料處理。Foc 標準曲線是利用序列稀釋後的 Foc 基因組 DNA (genomic DNA; gDNA) 為模板，進行即時聚合酶連鎖反應，模板 DNA 的濃度取對數值後與相對應的 Ct 值作線性迴歸，即可得到濃度與 Ct 值之關係式。

## 黃葉病之病徵判斷

本試驗所使用的香蕉黃葉病病徵判斷方法有三，包括黃葉率、罹病指數及假莖褐化率，判定方式分述如下：

$$\text{黃葉率 (chlorosis, \%)} = \frac{\text{葉片黃化數}}{\text{全株葉片數}} \times 100\%$$

罹病嚴重程度 (disease severity index; DSI)，

判定標準與分級如表 1 所列。

$$\begin{aligned} \text{假莖褐化率 (corm discoloration, \%)} \\ = \frac{\text{假莖切面褐化面積}}{\text{假莖切面總面積}} \times 100\% \end{aligned}$$

香蕉假莖褐化率材料取樣自試驗栽培 61 d 之蕉苗假莖基部，拍攝假莖縱剖面照片，並利用 Image J 軟體 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) 分析切面總面積與褐化面積。

## 結果

### 香蕉黃葉病原之定性與定量檢測

Foc 病原菌來自蕉研所，每隔 1 mo 利用單胞分離技術培養於 PDA 培養基，待 10–14 d 後以無菌水將菌株孢子洗出備用。Foc 病原菌定性檢測是以聚合酶連鎖反應增幅目標片段，Foc-1 與 Foc-2 引子對可專一性增幅台灣 Foc 第 4 生理小種 242 bp 片段，瓊脂膠體電泳分離結果顯示，此方法能快速鑑定培養基單孢培養或帶菌土壤中的 Foc (圖 1)。此外，為建立 Foc 病原定量檢測方法，本試驗利用即時聚合酶連鎖反應技術，分別偵測  $5 \times 10^0$ 、 $5 \times 10^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-2}$ 、 $5 \times 10^{-3}$  與  $5 \times 10^{-4}$  ng Foc 基因組 DNA，繪製檢量標準線 (圖 2)，Foc 濃度以對數方式表示 (log of Foc concentration) 與 Ct (threshold cycle) 呈現線性關係，透過直線迴歸分析，結果顯示斜率為 -3.8751，截距為 23.854，檢量線決定係數 ( $R^2$  value) 達 0.99 以上，可應用於 Foc 病原之定量分析。

表 1. 黃葉病之罹病嚴重程度。

**Table 1.** Disease severity index of Fusarium wilt disease.

Score	Appearance
0	No visible symptoms
1	0–1/4 leaves wilted or yellowed
2	1/4–1/3 leaves wilted or yellowed
3	1/3–1/2 leaves wilted or yellowed
4	1/2–3/4 leaves wilted or yellowed
5	All leaves wilted/plant dead

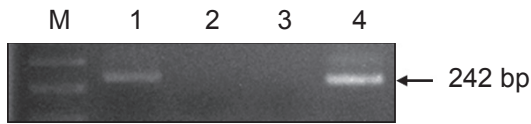


圖 1. 以核酸增幅方式鑑定 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 isolate (Foc) 利用專一性引子放大 Foc 片段用於鑑定實驗室培養之 FOC。從土壤中 (Lane 1)、無 Foc 接種之土壤 (Lane 2 and 3) 及 Foc 菌絲塊 (Lane 4)。接著，使用抽取之 100 ng DNA 當作模板進行 40 次循環之 PCR。PCR 結果顯示於 2% DNA 膠電泳圖。黑色箭頭指的是 Foc 放大後的片段大小位置。

**Fig. 1.** Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 isolate (Foc). Specific primer sets amplifying Foc fragments were used to identify cultured Foc. Total DNA was extracted from inoculated soil (lane 1), Foc-free soil (lanes 2 and 3), and one sliced of Foc cultured medium (lane 4). Following, 100 ng of extracted DNA were used as templates to perform 40 cycles of PCR. Results were shown after gel electrophoresis. Black arrow indicates the position of amplified Foc fragments (242 base pairs) on 2% of DNA gel.

### 香蕉黃葉病原致病性檢測

為確保單孢分離培養之 Foc 病原具有致病性，香蕉黃葉病原致病性檢測以容易感病之 'Gros Michel' 品種為材料，接種之帶菌栽培介質製備時固定加入  $10^7$  spores mL<sup>-1</sup> 之孢子懸浮液，使接種效果一致。接種後 1 mo 即可見 'Gros Michel' 下位葉開始黃化，黃葉率隨接種天數增加而上升，接種後 70 d 除下位葉黃化、掉落外，新葉生長緩慢 (圖 3B)，假莖縱切後亦可見基部維管束褐化病癥。

### 不同香蕉品種對黃葉病之抗性評估

為釐清「南華蕉」、「玫瑰蕉」、「新北蕉」、「台蕉 5 號」、「北蕉」以及 'Gros Michel' 等 6 個品種蕉苗對黃葉病抗性評估，選取大小一致的組織培養苗種植於 Foc 帶菌栽培介質中，定期記錄植株接種後下位葉黃化之比例。依據黃葉率統計結果顯示，接種後 40 d，「南華蕉」和 'Gros Michel' 發病快，黃葉率顯著較其他品種高 ( $P < 0.05$ )；而接種後 53 d，「南華蕉」、「台蕉 5 號」、「北蕉」、「Gros Michel」等香蕉品種相繼發病，「玫瑰蕉」和「新北蕉」的黃葉率則低於其他 4 個品種，差異具有顯著性 ( $P <$

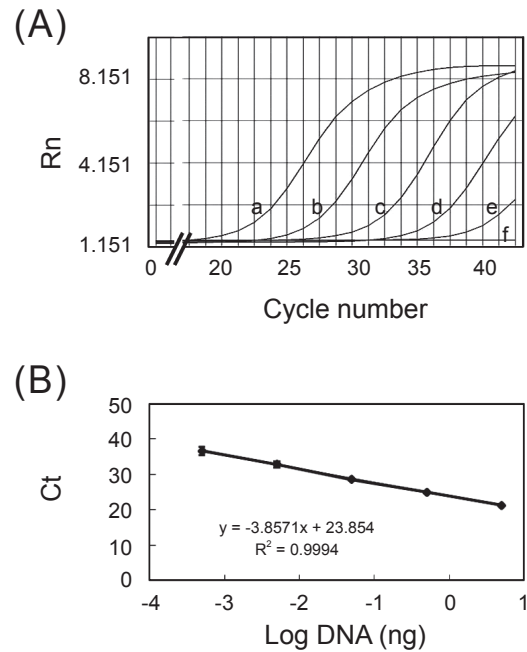


圖 2. 以 qPCR 增幅 Foc 全 DNA 進行靈敏度試驗。(A) 由 qPCR 增幅曲線評估 Foc DNA 濃度之靈敏度。a: 5 ng, b:  $5 \times 10^{-1}$  ng, c:  $5 \times 10^{-2}$  ng, d:  $5 \times 10^{-3}$  ng, e:  $5 \times 10^{-4}$  ng, f:  $5 \times 10^{-5}$  ng。Rn: 螢光訊號。(B) 由 Ct 值與 Foc 對應 log DNA 濃度得到之標準曲線。

**Fig. 2.** Amplification plot and stand curve of Foc detection by qPCR assay. (A) To estimate the sensitivity of qPCR assay for Foc detection. Amplification curves from "a" to "e" were generated by qPCR analysis after using 5 ng (curve a),  $5 \times 10^{-1}$  ng (curve b),  $5 \times 10^{-2}$  ng (curve c),  $5 \times 10^{-3}$  ng (curve d), and  $5 \times 10^{-4}$  ng (curve e), and  $5 \times 10^{-5}$  ng (curve f) of Foc gDNA as templates. Rn, fluorescence signal normalized with passive reference dye signal. (B) Standard curve was generated by plotting values of threshold cycles (Ct) versus logarithm of DNA concentration of Foc (ng).

0.05) (圖 4A)。此外，罹病指數由 disease severity index 調查計算結果與黃葉率的結果俱一致性的結果 (圖 4B)。除了黃葉率與罹病指標外，假莖褐化程度亦可作為黃葉病罹病評估指標之一。將試驗後 61 d 的蕉苗挖出，去除土壤與多餘根系後，進行假莖基部 (corm) 縱切觀察，結果顯示栽培於無病原土壤的 6 品種蕉苗，假莖均呈健康之乳白色，而栽培於帶菌土壤 61 d 後，只有「玫瑰蕉」的假莖基部仍為乳白色，其餘 5 個品系蕉苗則呈現不同程度之褐化現象 (圖 5)；為比較不同品種蕉苗間假莖

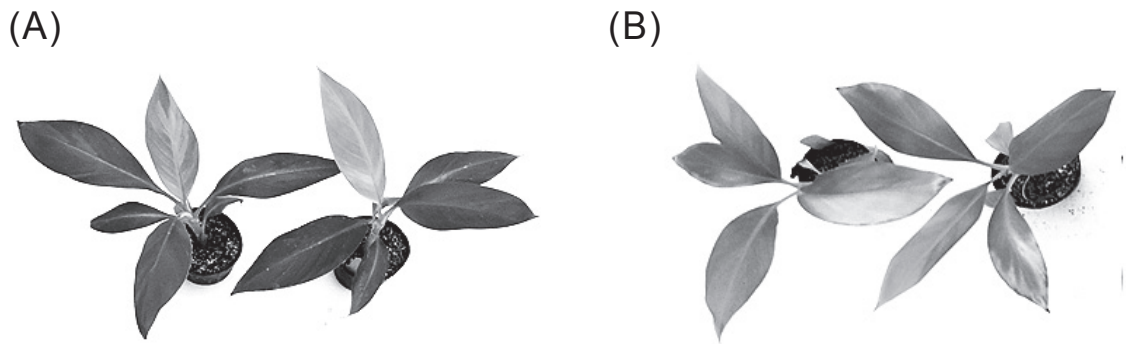


圖 3. Foc 致病性測試。種植於無帶菌土 (A) 和帶菌土後 70 d (B) 之 'Gros Michel' 植株鳥瞰圖，植株培養於溫室 (25–28°C)。

**Fig. 3.** Pathogenicity test of Foc on banana cultivar 'Gros Michel'. Bird view of phenotypes of 'Gros Michel' cultivated in Foc-free soil (A) and Foc infected soil (B) in greenhouse. Photos were taken at 70 days post Foc inoculation.

基部褐化之差異，本試驗利用 Image J 軟體將圖像資料進行量化分析，結果顯示 'Gros Michel' 假莖基部褐化最為嚴重，而「玫瑰蕉」則無褐化現象，量化數值差異顯著 ( $P < 0.05$ ) (表 2)；利用即時聚合酶連鎖反應檢測 6 品種蕉苗，假莖基部 Foc 基因組 DNA 含量，除「玫瑰蕉」外，「北蕉」、「新北蕉」、「台蕉 5 號」、「Gros Michel」及「華南蕉」等均檢測出 Foc 存在 (表 2)。上述結果顯示在本試驗的條件下，「玫瑰蕉」為受試 6 品種蕉苗中最为抗病。

## 討論

本試驗參考蕉研所的黃葉病接種方法 (Tang *et al.* 2002) 後做了部分修改，包括：(1) 帶菌介質之製備：Tang *et al.* 將 Foc 菌絲接種於介質中進行 3 wk 的菌絲增殖；而本試驗為了固定每批帶菌介質的菌量，於製備時加入定量的 Foc 孢子懸浮液，培養 1 mo。(2) 接種方法：Tang *et al.* 將帶菌介質與砂土混合後取 10 mL 體積置於盆底，再將蕉苗連根帶介質移入盆中；本試驗則是將帶菌介質與固定比例之根基旺充分混合均勻後分裝於盆鉢，將除去母盆栽培介質的蕉苗根部洗淨後再植入帶菌介質盆中。(3) 受試蕉苗之苗齡：根據蕉研所黃葉病接種試驗結果顯示，北蕉 1 mo 苗齡蕉苗發病率較 3 mo 苗齡高；本試驗以出瓶後 5 wk 大小一致之蕉苗進行試驗。本試驗以修改後的黃葉

病接種條件，對 6 品種香蕉之黃葉病耐受性進行評估，結果顯示在為期 2 mo 的試驗中，「新北蕉」比「北蕉」更為抗病，此結果與過去蕉研所發表之文獻結果相仿 (Tang *et al.* 2002)。然而，種植於帶菌栽培介質 53 d 後，在本試驗的篩選條件下，「台蕉 5 號」的抗病性與「北蕉」則無顯著性差異；可能是因為修改後的接種方法較為嚴苛，試驗中所使用的帶菌介質孢子含量多且平均分散，接種時清洗根部所造成的表皮傷口，可增加受試蕉苗根部與 Foc 病原接觸機會。此外，本試驗使用 5 wk 之蕉苗，苗齡小發病較嚴重。Tang *et al.* 採用較溫和的接種方法，可避免早期篩選壓力過大而丟失耐病苗株，但本試驗擬藉由較強的篩選壓力，得到較為明確的病癥，有利於後續耐病評估方法的建立。本試驗結果亦顯示，'Gros Michel' 為感病品種，而玫瑰蕉在為受試品種中最为抗病，2009 年 Chao *et al.* (2009) 對 6 種二倍體芭蕉品種抗黃葉病能力評估研究中，亦指出「玫瑰蕉」對黃葉病具有抗性。

由本試驗不同檢測方法結果得知，香蕉黃葉病不能僅憑單一種檢測方式判定；例如「玫瑰蕉」的下位葉子容易因生理老化或水分變化而發生黃化現象，但這並非黃葉病的典型黃葉病徵，若只用黃葉率來進行罹病檢定，則容易出現偽陽性結果。因此，2 個以上的罹病評估指標可有效提升判定準確性。本試驗除了黃葉率外，還利用罹病嚴重程度指標、假莖褐化率

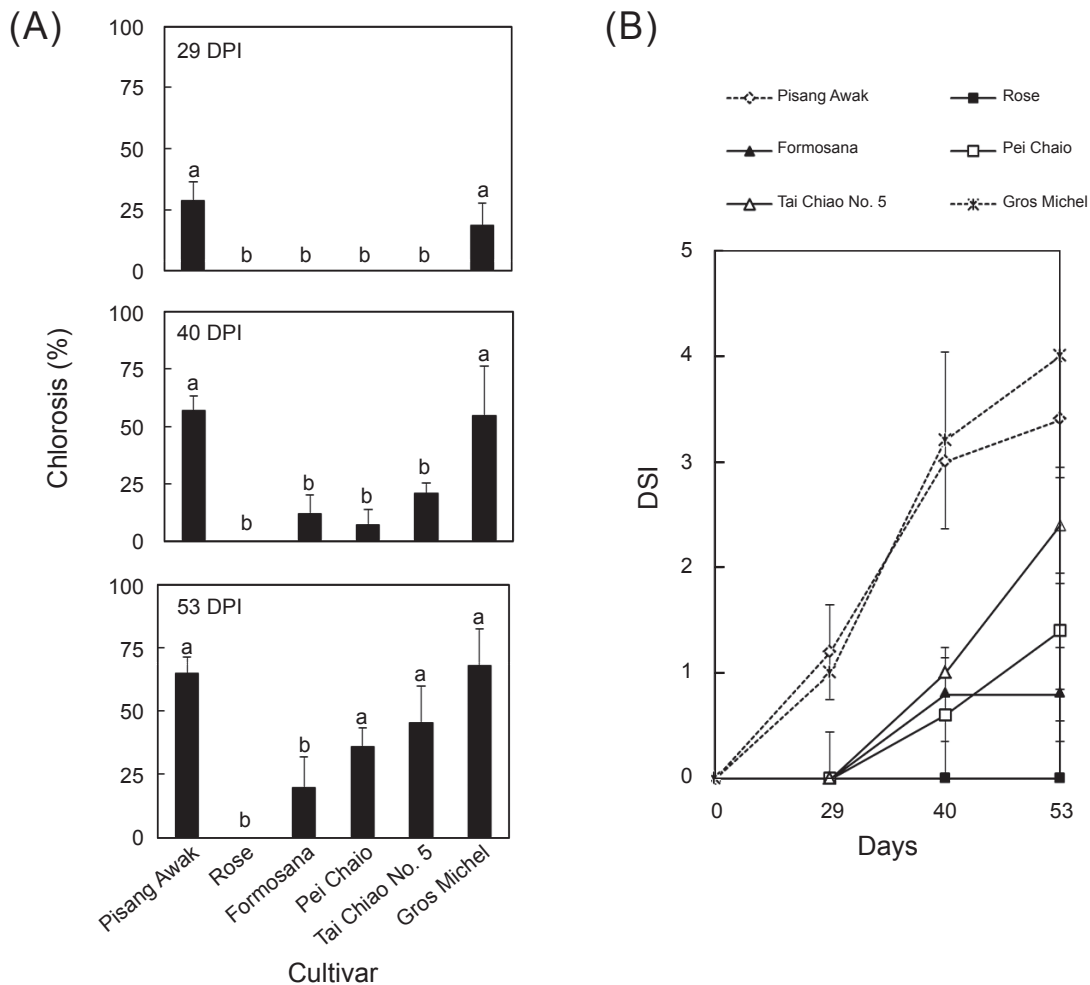


圖 4. 不同香蕉品種之黃葉率與罹病嚴重程度。(A) 種植後 29、40 與 53 d 之蕉苗黃葉率，資料經由 ANOVA 和 Tukey's test 計算後資料間俱有顯著性差異則標示 a、b ( $\alpha = 0.05$ )，試驗進行 5 重複。(B) 6 個品種於不同時間點之罹病嚴重程度，調查的方式依照表 1。

Fig. 4. Percentage of chlorosis leaves and disease severity index of 6 cultivars after cultured at Foc infected soil. (A) Percentage of yellowing leaves per seedlings was estimated at 40, 29 and 53 dpi. Error bar represents standard deviation of 5 replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test. Groups with different alphabets represents a statistically significant difference among them ( $\alpha = 0.05$ ). (B) Disease severity index (DSI) of 6 cultivars. Values of DSI obtained from Foc infected bananas were estimated according to the criterion addressed in Table 1.

以及 qPCR 等方式進行罹病檢定，希望可藉由不同檢定方法量化罹病程度。在本試驗條件下，假莖褐化率與 qPCR 的判斷結果較外觀鑑別準確，且結果可進行量化評估。應用 qPCR 方式進行病害檢測，具有簡便、準確、再現性高等特點，目前已廣泛應用於真菌性病害的檢測 (McCartney *et al.* 2003)。以 qPCR 檢測接種灰黴病 (*Botrytis cinerea*) 之天竺葵葉圓

片，接種後 0–96 h 雖尚未出現病徵，但已可測得病原菌 IGS 序列，配合天竺葵內生基因片段作為內控制組 (internal control) 即可進行定量 (Suarez *et al.* 2005)；感染十字花科黑斑病 (*Alternaria brassicicola*) 的阿拉伯芥，亦可利用 qPCR 方式偵測病葉中病原菌 Cutinase A 基因進行定量，但感染後期植物細胞開始死亡後，病原菌生物量便不與植物內生基因含量相

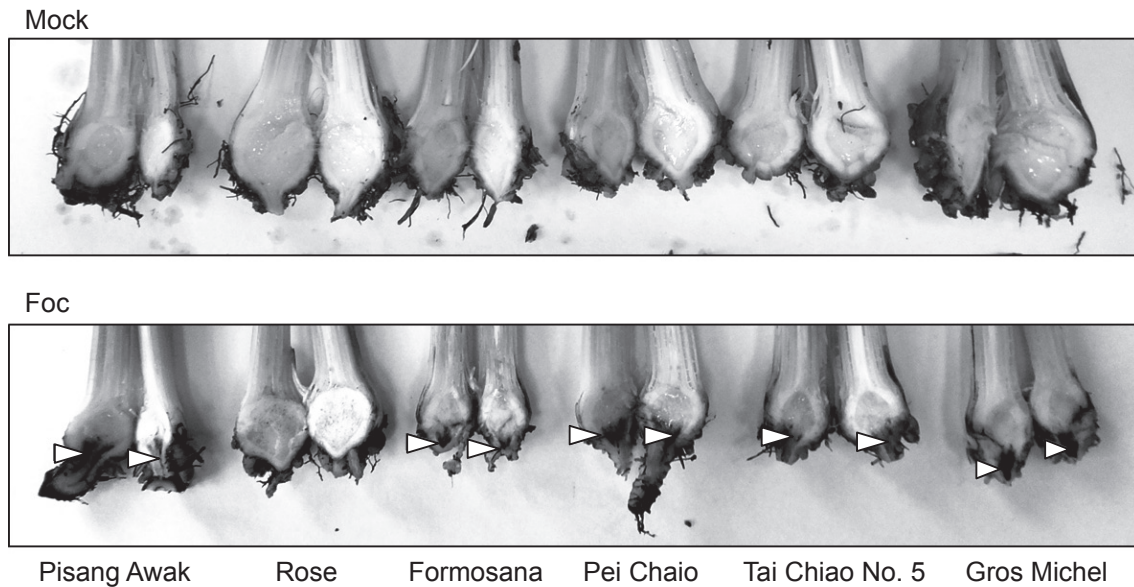


圖 5. 不同香蕉品種假莖縱切之檢測。檢測在 6 個品種於無 Foc 和有 Foc 之土壤種植 61 d 後之內部病徵。箭頭指出假莖褐化的部位。

Fig. 5. Cross section through the base of 6 banana cultivars. Internal symptoms of 6 cultivars were examined after inoculated by ddH<sub>2</sub>O (mock) or Foc for 61 days. Arrow indicates discolored region.

表 2. 6 種不同香蕉品種中 Foc 之含量與假莖基部褐化程度。

Table 2. Detection and quantification of Foc in corms for 6 cultivars of banana.

Cultivar	Discoloration <sup>z</sup> (%)	Foc concentration <sup>y</sup> (10 <sup>-2</sup> ng)
Pisang Awak	26.3 ± 4.6 ab	1.3 ± 0.5 a
Rose	0 c	ND
New Pei Chiao	13.5 ± 5.5 bc	1.2 ± 0.5 a
Pei Chiao	17.8 ± 7.5 ab	2.5 ± 1.0 a
Tai Chiao No. 5	23.4 ± 4.9 ab	3.3 ± 1.8 a
Gros Michel	33.7 ± 7.4 a	4.5 ± 2.2 a

<sup>z</sup> Discolored region and total area of corm was determined by Image J. Percentage of discolored area = (discolored region/total corm area) × 100%. Mean ± standard error (*n* = 3). Means followed by the same letter(s) within each column are not significantly different at 5% level by LSD test.

<sup>y</sup> Concentration of Foc in corm (50 mg) was estimated by qPCR and Ct values of each reaction was calculated by using equation shown in Fig. 2B. Mean ± standard error (*n* = 3), ND represents the Foc concentration is lower than the detection limit. Means followed by the same letter(s) within each column are not significantly different at 5% level by LSD test.

關 (Gachon & Saindrenan 2004)。由於 Foc 在感染初期仍屬於半活體寄生 (hemibiotrophic) 型，由植物根部進入維管組織系統後，Foc 轉變為腐生 (necrotrophic) 型真菌，可能造成維管束細胞死亡。故本試驗 qPCR 定量檢測並未加入內控制組作為對照，而是固定採樣 50 mg 之假莖基部材料，受試蕉苗除「玫瑰蕉」測不到 Foc 外，其他受試品種均可測得 Foc，「新

北蕉」與「南華蕉」分別測得  $1.2 \times 10^{-2}$  及  $1.3 \times 10^{-2}$  ng，較「北蕉」、「台蕉 5 號」及「Gros Michel」為低，但差異不顯著。原因是「北蕉」、「台蕉 5 號」及「Gros Michel」的偵測誤差較大，推斷 qPCR 的檢測方法靈敏度高，更適合感染初期偵測，配合植物內生基因作為內控制對照才能有效定量。本試驗利用 6 品種香蕉苗進行黃葉病耐病試驗，並由 3 種不同的檢測方式，

包含黃葉率、假莖褐化程度、qPCR 之技術證明「玫瑰蕉」為 6 品種中最抗病之品種，而「Gros Michel」為 6 品種中最感病之品種。

## 誌謝

本研究計畫經費來自行政院農業委員會科技計畫 (103-104 農科-6.3.2-農-C1) 補助試驗經費，謹此致謝。

## 引用文獻

- Buddenhagen, I. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium Oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'Tropical Race 4' to better manage banana production. *Acta Hort.* (ISHS) 828:193–204.
- Chao, C. P., S. Y. Lee, Y. Y. Su, and C. S. Chiou. 2009. Study on six kinds of banana AA varieties of horticultural traits in Taiwan. p.21–26. *in*: Proceedings of the Fourth Symposium on Horticulture in Both Sides of the Taiwan Straits. November 11, 2009. Pingtung, Taiwan. National Pingtung University of Science and Technology Publ., Pingtung, Taiwan. (in Chinese)
- Chen, Y. F., W. Chen, X. Huang, X. Hu, J. T. Zhao, Q. Gong, X. J. Li, and X. L. Huang. 2013. *Fusarium* wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. *Plant Pathol.* 62:112–119.
- Das, A., B. Shawn, and M. T. Mcintosh. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *J. Clin. Microbiol.* 50:1613–1620.
- Gachon, C. and P. Saindrenan. 2004. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol. Biochem.* 42:367–371.
- Ghag, S. B., U. K. S. Shekhawat, and T. R. Ganapathi. 2012. *Petunia* floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of *Fusarium* wilt resistance in transgenic banana plants. *PLoS One* 7:1–11.
- Hwang, S. C. and W. H. Ko. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Dis.* 88:580–588.
- Li, C., J. Shao, Y. Wang, W. Li, D. Guo, B. Yan, Y. Xia, and M. Peng. 2013a. Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *BMC Genomics* 14:851.
- Li, C. Y., G. Mostert, C. W. Zuo, I. Beukes, Q. S. Yang, O. Sheng, R. B. Kuang, Y. R. Wei, C. H. Hu, L. Rose, P. Karangwa, J. Yang, G. M. Deng, S. W. Liu, J. Gao, A. Viljoen, and G. J. Yi. 2013b. Diversity and distribution of the banana wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in China. *Fungal Genom. Biol.* 3:1–6.
- Lin, Y. H., C. C. Su, and C. P. Chao. 2013. A molecular diagnosis method using real-time PCR for quantification and detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 135:395–405.
- Lin, Y. H., J. Y. Chang, E. T. Liu, C. P. Chao, J. W. Huang, and P. F. Chang. 2009. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:353–365.
- McCartney, H. A., S. J. Foster, B. A. Fraaije, and E. Ward. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 59:129–142.
- Nelson, P. E., M. C. Dignani, and E. J. Anaissie. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:479–504.
- O'Donnell, K., H. C. Kistler, E. Cigelnik, and R. C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2044–2049.
- Ploetz, R. C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96:653–656.
- Suarez, M. B., K. Walsh, N. Boonham, T. O'Neill, S. Person, and I. Barker. 2005. Development of real-time PCR (TaqMan<sup>®</sup>) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol. Biochem.* 43:890–899.
- Taiwan Banana Research Institute. 2002. 2001 Annual Report. Taiwan Banana Research Institute. Pingtung, Taiwan. 79 pp. (in Chinese)
- Tang, C. Y., S. Y. Lee, and C. H. Tai. 2002. A net-house method for the mass screening of resistance to *Fusarium* wilt in banana and its efficiency in clonal selection. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 48:309–318 (in Chinese)
- Tripathi, L., J. Odipio, J. Tripathi, and G. Tusiime. 2008. A rapid technique for screening banana cultivars for resistance to *Xanthomonas* wilt. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:9–19.
- Twizeyimana, M., P. S. Ojiambo, A. Tenkouano, T. Ikotun, and R. Bandyopadhyay. 2007. Rapid screening of *Musa* species for resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets in tubes and detached leaves. *Plant Dis.* 91:308–314.

## Evaluation of Banana Cultivars Resistance to *Fusarium* Wilt Disease

Cheng-Ping Kuan<sup>1</sup>, Meng-Yi Lin<sup>2</sup>, Min-Tze Wu<sup>3</sup>, and Han-Wei Chen<sup>1,\*</sup>

### Abstract

Kuan, C. P., M. Y. Lin, M. T. Wu, and H. W. Chen. 2016. Evaluation of banana cultivars resistance to *Fusarium* wilt disease. *J. Taiwan Agric. Res.* 65(4):365–373.

In this study, for comparing different levels of tolerance in banana species to *Fusarium* wilt disease, several cultivars, i.e., 'Pei Chiao', 'Formosana', 'Tai Chiao No. 5', 'Gros Michel', 'Pisang Awak', and 'Rose', which were commonly cultivated in Taiwan, were inoculated artificially with *Fusarium* pathogen. Percentages of chlorosis were estimated after culturing two-month-old seedlings of bananas in *Fusarium*-inoculated soil in greenhouse. Besides, we examined browning region of corm sections of Foc-inoculated plants quantitatively and qualitatively and estimated the amounts of Foc in each corm section by real-time PCR method. Results showed that cultivar 'Rose' was the more resistant cultivar among six cultivars while 'Gros Michel' was the more susceptible cultivar.

**Key words:** Banana, *Fusarium* wilt, Panama disease, Tolerance.

---

Received: November 9, 2015; Accepted: January 19, 2016.

\* Corresponding author, e-mail: swaychen@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Director, Plant Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.