

# 由 *Fusarium oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病

黃巧雯<sup>1</sup> 黃晉興<sup>2\*</sup> 李怡靜<sup>3</sup> 陳純葳<sup>4</sup> 謝廷芳<sup>5</sup>

## 摘要

黃巧雯、黃晉興、李怡靜、陳純葳、謝廷芳。2020。由 *Fusarium oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病。台灣農業研究 69(1):65–76。

假球莖腐敗病 (pseudobulb rot) 為小花蕙蘭生產過程中重要病害之一。受害植株初期下位葉片失去光澤、失水，爾後呈現黃化、萎凋狀。當葉片整片褐化後易抽起與葉鞘分離，只遺留假球莖及殘留之葉基部，最後造成植株死亡，剖開罹病植株可見假球莖與連接根部組織呈黑褐色腐敗病徵。由罹病組織可穩定分離到一種鐮孢菌，該類鐮孢菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA)。於室溫 25–30°C、光照環境下，其培養菌落形態可區分為兩型 (type)，type-I 菌株之菌落為淡紫色，而 type-II 菌株之菌落為土黃色。依據病原菌形態特徵及分子序列鑑定結果，此兩型的鐮孢菌皆被鑑定為 *Fusarium oxysporum*。此兩型的病原菌，皆可造成蕙蘭屬中報歲蘭與四季蘭之假球莖與根部黑褐色腐敗。此兩型的病原菌菌絲生長溫度範圍為 16–32°C，最適溫度為 24–28°C；孢子發芽溫度範圍為 16–36°C，最適溫度為 24–36°C；最適本病害發生溫度為 25–30°C。此兩型的病原菌不僅危害報歲蘭與四季蘭外，亦可在虎頭蘭之假球莖上造成類似病徵，但在其他蘭花如文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭及石斛蘭植株上皆未見病徵產生。

**關鍵詞：**小花蕙蘭、假球莖腐敗病、鐮孢病菌。

## 前言

小花蕙蘭 (oriental cymbidium) 俗稱國蘭，是由蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 中的建蘭 (或稱四季蘭, *Cymbidium ensifolium*)、報歲蘭 (*Cymbidium sinense*)、春蘭 (*Cymbidium goeringii*)、寒蘭 (*Cymbidium kanran*) 及九華蘭 (*Cymbidium faberi*) 等植物所組成的統稱。蕙蘭屬的學名由希臘字 *kymbes* (船) 而來，指花器中唇瓣 (lip) 好像船的形狀，為 1799 年即已設立的屬，包含 52 個種，分布範圍遍及東北亞、東亞、東南亞至澳洲北部，屬內植物可適應溫帶及熱帶環境，亦有附生型與地生型等多種類。蕙蘭屬植株主要由葉片 (leaf)、假球莖 (pseudobulb)、鞘葉 (sheath leaf) 及肥大的根 (root) 組成，假球莖是儲藏水分與養分的器

官，在植株生育上及開花上扮演著重要的關鍵性角色 (Tsai 1998; Du Puy & Cribb 2007; Hsu 2010)。小花蕙蘭原生地分布在中國、台灣、韓國及日本等地區，這類植株株型、花型較小，花朵直徑通常不超過 6 cm，與大花型的虎頭蘭外觀上明顯不同，其繁殖以組織培養苗與分株為主 (Hung *et al.* 2017)。目前在台灣所栽培的小花蕙蘭內銷較少，多以外銷為主，九成以上銷往韓國，其他國家如日本、香港及北美都有零星出口，近年來中國逐漸成為另一個重要外銷市場。目前台灣小花蕙蘭栽種面積約 70–100 ha，栽種地區以台中市東勢區、南投縣埔里鎮與魚池鄉、嘉義縣、高雄市及屏東縣等中南部為主 (Hung *et al.* 2010)。

台灣迄今正式記載之小花蕙蘭主要病害有

投稿日期：2019 年 8 月 19 日；接受日期：2019 年 10 月 25 日。

\* 通訊作者：jhuang@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。

<sup>5</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

由 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) 引起的蕙蘭嵌紋病毒病、由 *Odontoglossum rigspot virus* (ORSV) 引起的齒舌蘭輪斑病毒病；由 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 引起的細菌性軟腐病、由 *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* 引起的細菌性褐斑病；由 *Phytophthora palmivora*、*Phytophthora parasitica* 引起的疫病、由 *Botrytis cinerea* 引起的灰黴病、由 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的炭疽病、由 *Phyllosticta cymbidii* 引起的葉斑病。另外，亦有葉芽線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*、*Aphelenchoides bicaudatus*)、南方根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*)、根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 引起的線蟲病害 (Hsu *et al.* 2002)。在台灣，小花蕙蘭園區常見植株發生葉片黃化萎凋現象，當整片葉片褐化後易抽起與葉鞘分離，只遺留假球莖及殘留之葉基部；剖開罹病植株可見假球莖與連接根部組織黑化腐敗現象，藉由研究報告比對後發現可能為由 *F. oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病害 (pseudobulb rot) (Jee *et al.* 2003)。已知國外報告中 *F. oxysporum* 亦會引起小花蕙蘭莖腐、根腐及乾腐病徵 (stem rot, root rot, and dry rot) (Benyon *et al.* 1996; Kim *et al.* 2002a; Yao *et al.* 2018)。然而，在台灣未見上述有關由 *F. oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病相關正式研究報告，因此本研究針對小花蕙蘭假球莖腐敗病病徵表現、病原菌形態特徵、分子鑑定及病原菌生理特性進行瞭解，以期能對本病害之診斷鑑定及防治有所助益。

## 材料與方法

### 病原菌分離與保存

將田間罹患假球莖腐敗病之小花蕙蘭植株攜回實驗室，直接將罹病植株之病健部組織，以 0.5% (v/v) 次氯酸鈉漂洗消毒 30 s，繼而以 75% (v/v) 酒精消毒 30 s，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病健部相鄰組織，置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上分離。將培養基置於室溫下 4–5 d，其分離所得之菌株置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 中

純化後，待其產孢後進行單孢分離，並將其保存於 PDA 斜面培養基及無菌水保存管中，置於 10°C 保存備用。本研究使用供試菌株來源，Fo-51 與 Fo-92 皆由南投縣魚池鄉之四季蘭罹病植株上所分離菌株。另外，Fo-50 與 Fo-72 則分別從台中市大甲區之四季蘭及台中市東勢區之報歲蘭罹病植株上所分離菌株。

### 病原菌形態及分子鑑定

將所純化之病原菌培養於 PDA 培養基上，置於 24°C 黑暗培養 7 d 後觀察菌落形態。另外，再將本病原菌單孢後於 2% WA 上培養 5–7 d，以光學顯微鏡 (Leica DM 2500, Leica, Wetzlar, Germany) 進行孢子形態觀察，並以 NIS-Elements version 4.51 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 測量 50 個以上大小孢子、厚膜孢子之長度與寬度。再參考 Summerell *et al.* (2001) 及 Leslie *et al.* (2006) 所描述的鐮孢菌孢子著生方式與形態，鑑定所分離之鐮孢菌菌株。分子鑑定方式，則是刮取菌絲置於微量離心管中，加入 0.5 N NaOH 溶液，將菌絲磨碎後，以 28,500× g 離心 (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo, Waltham, MA, USA) 5 min 並吸取上清液。與 9× 體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 混合，直接吸取混合後之溶液。以 Taq DNA polymerase (protech) 聚合酶醱素進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，分別增幅 internal transcribed spacer (ITS) (White *et al.* 1990) 與 translation elongation factor 1 alpha (TEF-1 $\alpha$ ) 片段 (O'Donnell *et al.* 1998; Geiser *et al.* 2004)，增幅後產物委由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 進行定序。定序後之序列再與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上所登錄之資料庫進行菌株序列分析比對，並將該序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

### 小花蕙蘭假球莖腐敗病分離株之病原性測定

將由小花蕙蘭假球莖腐敗病組織分離 *F. oxysporum* type-I 之 Fo-51 與 type-II 之 Fo-92 分離株培養於 PDA 斜面，經 25°C、7 d 後，

以無菌水將 PDA 上所產生之孢子洗下，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Carlsbad, CA, USA) 計算孢子濃度。再以無菌水製成孢子懸浮液 ( $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ )，供接種試驗用。購買市售報歲蘭與四季蘭植株，選取植株葉片、假球莖及根部部位，先以沾有 75% 酒精的棉花擦拭接種組織表面進行消毒，再以無菌之針頭於接種處上製造傷口。於上述已針刺製造傷口之葉片、假球莖及根部進行接種，每個接種處滴 500  $\mu\text{L}$  之孢子懸浮液，緩緩滴於傷口上。再利用透氣膠帶 (Nexcare, 3M micropore™, St. Paul, MN, USA) 密封傷口保濕，將接種後植株再使用透明塑膠袋密封保濕置於 25–30°C 溫室中。接種後第 5 天，將透明膠袋移除，每個處理 4 重複，並以無菌水作為對照組，接種後每週觀察並記錄病徵發展情形。

### 小花蕙蘭假球莖腐敗病分離株對不同蘭花品種之病原性測定

供試蘭花品種計有報歲蘭 (*C. sinense*)、四季蘭 (*C. ensifolium*)、虎頭蘭 (*Cymbidium hookerianum*)、文心蘭 (*Oncidium flexuosum*)、仙履蘭 (*Paphiopedilum insigne*)、嘉德麗雅蘭 (*Cattleya*) 及石斛蘭 (*Dendrobium moniliforme*) 等 7 種不同蘭花品種。接種方式將 Fo-50、Fo-51、Fo-72 及 Fo-92 分離株以無菌水製成孢子懸浮液 ( $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) 供接種試驗用。將各品種蘭花植株以無菌針頭在球莖上製造傷口，並使用滅菌剪刀剪部分根系後，浸泡於上述以無菌水配製孢子懸浮液中。約 10 min 後，再種植回內盛碎石之栽培盆中。爾後每盆再加入 10 mL 孢子懸浮液，每種蘭花品種處理 12 株，以無菌水作為對照組，分別放置於 25–30°C 溫室內，每週觀察病徵進展情形，本試驗重複進行 2 次。

### 溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將 *F. oxysporum* type-I 之 Fo-51 與 type-II 之 Fo-92 分離株分別從保存管取出放置 PDA 平板，於室溫下培養約 5 d 後，待其產孢後進行單孢分離。於 PDA 平板上室溫培養 7 d 後，以滅菌過之打孔器 (直徑 0.6 cm) 切取菌絲邊緣，

置於 PDA 平板中央。分別置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40°C 之定溫箱中黑暗培養，培養後第 7 天測量其菌絲生長之直徑，每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。另外，取 *F. oxysporum* type-I 之 Fo-51 與 type-II 之 Fo-92 分離株於 PDA 平板上，培養約 7 d 待其產孢後，以無菌水配製約 10 spores  $\mu\text{L}^{-1}$  之孢子懸浮液，並取 20  $\mu\text{L}$  孢子懸浮液滴於八孔載玻片上。將玻片保濕於玻璃培養皿中，分別靜置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40°C 之定溫箱中。24 h 後取出於顯微鏡下觀察孢子發芽情形，每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。

### 溫度對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

供試植物來自市售之四季蘭與報歲蘭植株。將小花蕙蘭植株以無菌針頭在假球莖上製造傷口後，植株接種方式如上述，每個處理 4 盆。每盆放置於外圍頂端露空之塑膠套內，自頂端噴澆少許水以保濕，分別置於 15、20、25 及 30°C 之生長箱栽培，以無菌水為對照組，每週觀察並記錄發病情形。病害發展之嚴重程度，則以罹病度 (disease severity) 表示，罹病度等級區分為 0–3 級：0 級為健全；1 級植株葉片末端失水；2 級為植株全葉失水；3 級為植株出現葉片失水黃化、枯死、假球莖腐敗。依下列公式計算罹病度：Disease severity (%) =  $(n_0 \times 0 + n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3) / N \times 3 \times 100\%$ ， $n_i$  為  $i$  級之調查棵數， $N$  為調查總棵數，本試驗重複 2 次。

### 統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS Enterprise Guide 7.1 版統計分析軟體，先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

## 結果

### 小花蕙蘭假球莖腐敗病之病徵

本研究在台灣之小花蕙蘭園區陸續有假球

莖腐敗病的發生，假球莖腐敗病病徵為初期時植株下位葉片失去光澤且呈現輕微失水狀，爾後葉片基部會由下往上出現黑褐化現象。隨後葉片黃化或未黃化即從葉基部斷落，最後整株小花蕙蘭葉片完全斷落，只遺留假球莖及殘留之葉基部 (圖 1C–D)。病害發生整個過程在夏季約 1–3 個月，冬季則可達半年以上；若幼芽感染則會發現葉基部黑褐化並迅速往上蔓延，幼芽通常容易抽起與葉鞘分離。剖開罹病植株，可見假球莖與接連根部呈黑褐化腐敗現象 (圖 1)。另外，本研究於田間採樣及分離，結果顯示 type-I 型菌株其分離率高達 95%，而 type-II 型菌株其分離率則為 5%。

### 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌之培養形態與分子鑑定

經單孢培養於 PDA 平板之小花蕙蘭假球莖腐敗病菌，其培養菌落形態可區分為兩型 (type)。type-I 菌株之菌落為淡紫紅色略帶白色、

菌絲綿密生長，孢子叢 (sporodochia) 呈淡紫紅色 (圖 2A)。type-II 菌株之菌落，則為淡土黃色略帶白色、菌絲放射狀生長，孢子叢呈土黃色 (圖 2G)。type-I 與 type-II 分別以 Fo-51 與 Fo-92 分離株作為代表菌株。利用滅菌後之針頭沾取各菌落後，透過光學顯微鏡可觀察到孢子形態，如圖 2B–2F [type-I (Fo-51)]、2H–2K [type-II (Fo-92)] 所示。大孢子 (macroconidia) 為鐮刀形，無色，大多 3 個隔膜，著生於分生孢子梗 (conidiophores) 之瓶狀枝上，Fo-51 與 Fo-92 之大孢子大小分別為  $37.3\text{--}44.3 \times 2.9\text{--}4.2 \mu\text{m}$  與  $30.7\text{--}44.9 \times 2.6\text{--}3.8 \mu\text{m}$ 。小孢子 (microconidia) 為橢圓形或臘腸型，無色，著生於分生孢子梗之瓶狀枝上，呈假頭狀 (false heads) 排列，Fo-51 與 Fo-92 之小孢子大小分別為  $4.7\text{--}9.6 \times 1.7\text{--}3.0 \mu\text{m}$  與  $3.9\text{--}11.0 \times 2.1\text{--}3.6 \mu\text{m}$ 。厚膜孢子 (chlamydospores) 形狀近圓形或球形、無色，形成於菌絲上，Fo-51 與 Fo-92 之厚膜孢子直徑分別為約  $6.3\text{--}9.3 \mu\text{m}$  與  $5.2\text{--}6.9 \mu\text{m}$ 。

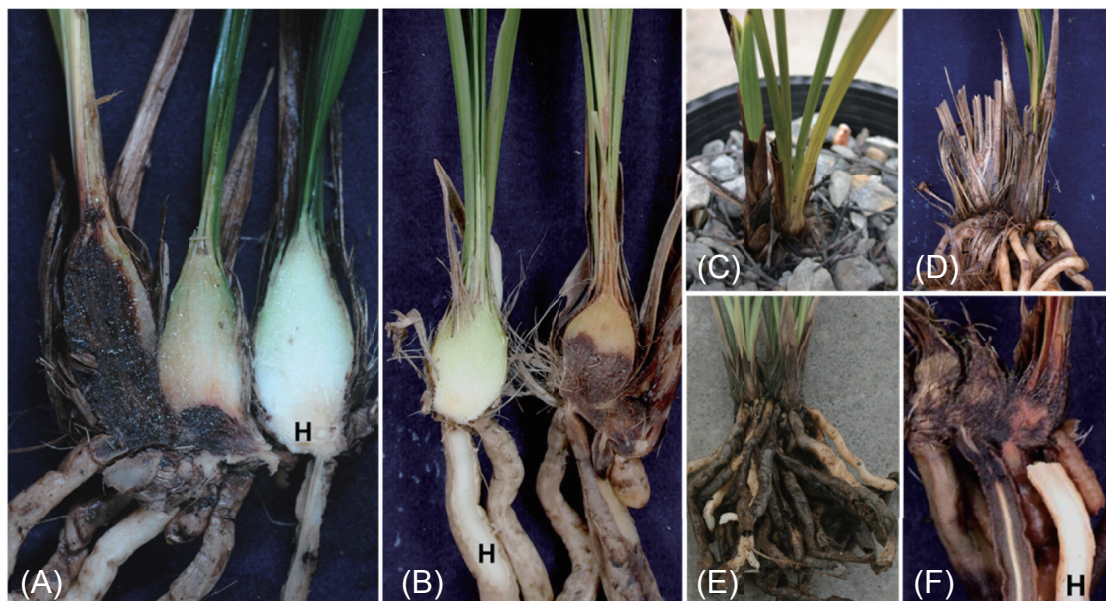


圖 1. 小花蕙蘭假球莖腐敗病之病徵 (A: 報歲蘭; B–F: 四季蘭)。(A–B) 罹病植株之假球莖縱剖後組織黑褐化腐敗、(C) 葉片呈現黃化褐化、(D) 落葉現象、(E) 根部黑褐化現象、(F) 罹病根縱剖後組織黑褐化腐敗。H: 健康植株。

Fig. 1. Symptoms of pseudobulb rot of *Cymbidium* spp. (A: *Cymbidium sinense*; B–E: *Cymbidium ensifolium*). Infected plant exhibiting cross section of pseudobulb revealing black-brown rot on (A) *C. sinense* and (B) *C. ensifolium*, (C) leaf yellowing, browning and (D) defoliation, (E) black browning and rot of the roots. (F) Cross section revealing root rot symptom. H: healthy plants.

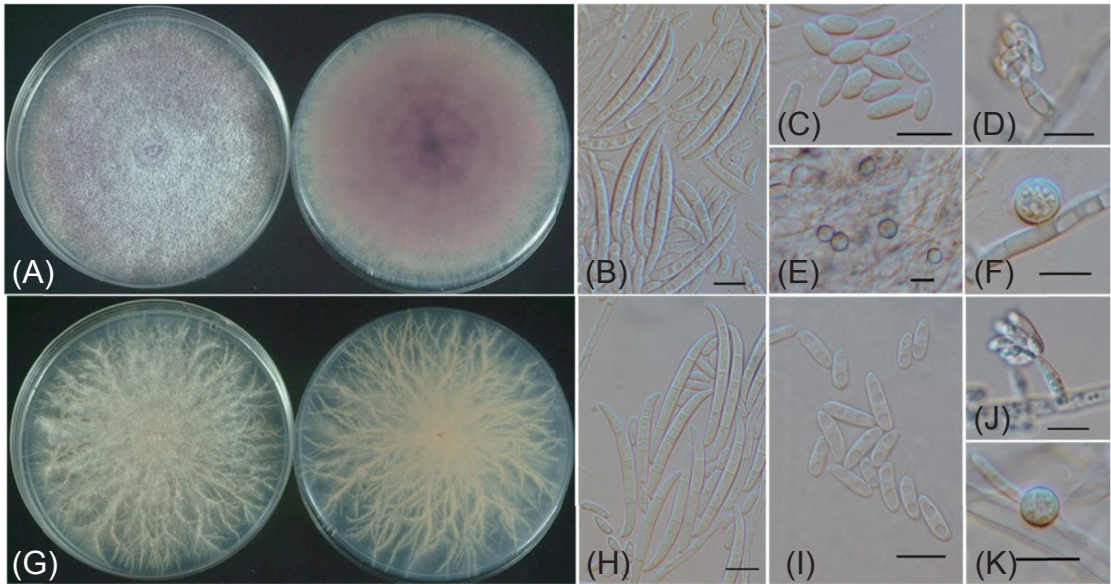


圖 2. 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌 [A–F: type-I (Fo-51); G–K: type-II (Fo-92)] 之菌落與孢子形態特徵。小花蕙蘭假球莖腐敗病菌於 PDA 培養基上於 24°C 培養 7 d 後的菌落形態 (A) Fo-51、(G) Fo-92。(B、H) 大孢子。(C、I) 小孢子。(D、J) 小孢子呈假頭狀排列。(E、F、K) 厚膜孢子。標尺 = 10 µm。

**Fig. 2.** Colony and conidia morphological characteristics of *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51, A to F) and type-II (Fo-92, G to K) isolates. Colony of *F. oxysporum* (A) Fo-51 and (G) Fo-92 grown on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 7 d, (B, H) macroconidia, (C, I) microconidia, (D, J) microconidia produced in false heads and (E, F, K) chlamydospores. Bar = 10 µm.

為進一步鑑定菌株，將 Fo-51 與 Fo-92 分離株之 ITS 序列 (accession No. 分別為 MK942633 與 MK942634) 和 TEF-1 $\alpha$  序列 (accession No. 分別為 MN162686 與 MN162687) 與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫進行分析比對。結果顯示，供試菌株與 LL-5、DHTG-7 strain 之 ITS 序列 (MK966308 與 MK692865) 與 MRC 1694 strain、STAT9 strain 之 TEF-1 $\alpha$  序列 (MH582350 與 KX822794) 之序列相似度高達 99.4% 以上。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果，證明由假球莖腐敗病罹病組織所分離之病原菌為 *F. oxysporum* (Kim *et al.* 2002a; Srivastava *et al.* 2018; Yao *et al.* 2018)。

#### 小花蕙蘭假球莖腐敗病之病原性測定

為了進一步測定其病原性，本研究將 Fo-51 與 Fo-92 分離株之孢子懸浮液分別接種於報歲蘭與四季蘭之葉片、假球莖及根部上。在葉片上，於接種 14 d 後，Fo-51 分離株造成報歲蘭

與四季蘭葉片上產生黑褐色近圓形或不規則病斑，而 Fo-92 分離株在報歲蘭葉片上則會造成黃褐色塊斑，但在四季蘭葉片上其病斑不明顯；在假球莖上，Fo-51 與 Fo-92 皆於接種 4 wk 後，報歲蘭與四季蘭植株即出現葉片失水之病徵，於 8 wk 後可見植株黃化、萎凋現象。接種部位褐化，將罹病假球莖縱剖，可見內部組織疏鬆、黑褐化。另外，在根部上，兩菌株於接種 6 wk 後，在報歲蘭與四季蘭之根系內部組織造成黑褐化腐敗現象 (圖 3、圖 4)。之後再從這些罹病組織進行分離，結果顯示所得菌株與原接種病原菌菌株，其形態特徵皆相同，完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)，證實 *F. oxysporum* Fo-51 與 Fo-92 兩分離株皆對報歲蘭與四季蘭具有病原性。

#### 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌對不同品種蘭花之病原性

為進一步瞭解 *F. oxysporum* 對不同蘭花品種之病原性，本研究將 4 株分離株之孢子懸

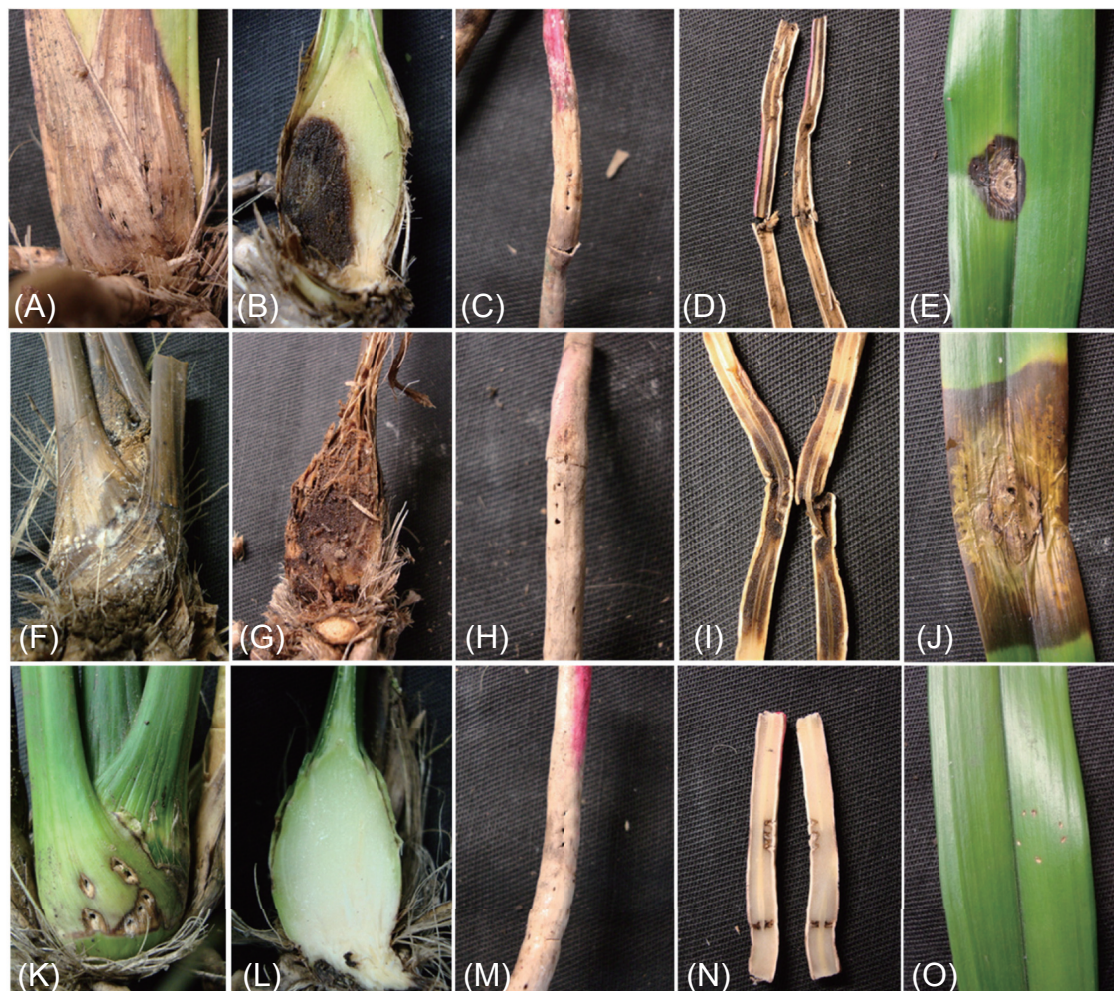


圖 3. 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* 對報歲蘭之病原性試驗。健康植株接種 (A-E) *F. oxysporum* Fo-51 與 (F-J) Fo-92 之假球莖、根系及葉片後病徵表現，以 (K-O) 接種無菌水為對照組。

**Fig. 3.** Pathogenicity tests of *Fusarium oxysporum* on *Cymbidium sinense*. Severe symptoms on pseudobulb, root and leaf of *C. sinense* plant inoculated with conidial suspension of (A-E) *F. oxysporum* Fo-51 and (F-J) Fo-92 after inoculation. (K-O) Treatments inoculated with water as control.

浮液分別接種於報歲蘭、四季蘭、虎頭蘭、文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭、石斛蘭等 7 種不同蘭花品種之假球莖上。於接種 4 wk 後，Fo-50、Fo-51、Fo-72 及 Fo-92 均可造成報歲蘭、四季蘭及虎頭蘭之地上部葉片開始出現失水、黃化現象，而後植株逐漸衰弱。於接種 8 wk 後，植株萎凋，縱剖假球莖可見內部組織褐化腐敗。而所有測試菌株接種於文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭、石斛蘭等假球莖亦未見病徵產生 (表 1)。

### 溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將小花蕙蘭假球莖腐敗病菌菌絲塊培養於不同溫度之培養箱中，其生長結果如圖 5 所示。Fo-51 與 Fo-92 於 12–28°C 培養時，其菌絲生長隨著溫度升高而增快，於 28°C 培養時，對菌絲生長最為有利。於培養後 7 d 時，其平均生長直徑分別為 8.1 cm 與 8.5 cm；於 28–36°C 下生長速率遞減，至 40°C 時完全不生長。另外，溫度對本菌孢子發芽之影響結果則如圖 6 所示，在 24°C 與 28°C 下，於無菌水中 24 h，



圖 4. 小花蕙蘭假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* 對四季蘭之病原性試驗。健康植株接種 (A-E) *F. oxysporum* Fo-51 與 (F-J) Fo-92 之假球莖、根系及葉片後病徵表現，以 (K-O) 接種無菌水為對照組。

Fig. 4. Pathogenicity tests of *Fusarium oxysporum* on *Cymbidium ensifolium*. Severe symptoms on pseudobulb, root and leaf of *C. ensifolium* plant inoculated with conidial suspension of (A-E) *F. oxysporum* Fo-51 and (F-J) Fo-92 after inoculation. (K-O) Treatments inoculated with water as control.

表 1. 假球莖腐敗病菌對不同蘭花寄主之病原性測定。

Table 1. Host specificity test of *Fusarium oxysporum* at 12 wk postinoculation based on pseudobulb assay.

Tested orchid variety	Pathogenicity <sup>z</sup>			
	Fo-50 (type-I)	Fo-51 (type-I)	Fo-72 (type-I)	Fo-92 (type-II)
<i>Cymbidium sinense</i>	+	+	+	+
<i>Cymbidium ensifolium</i>	+	+	+	+
<i>Cymbidium hookerianum</i>	+	+	+	+
<i>Oncidium flexuosum</i>	-	-	-	-
<i>Paphiopedilum insigne</i>	-	-	-	-
<i>Cattleya</i>	-	-	-	-
<i>Dendrobium moniliforme</i>	-	-	-	-

<sup>z</sup> Symptom of pseudobulb rot was recorded at 12 wk after inoculation.

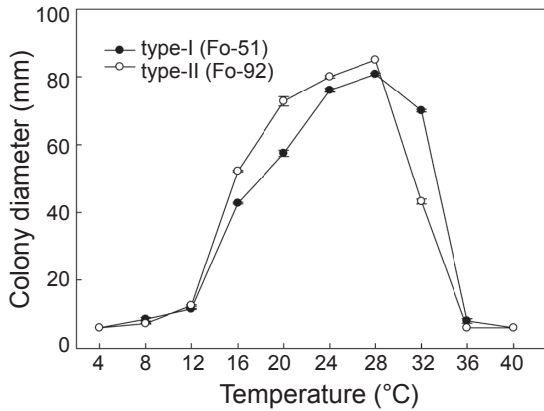


圖 5. 不同溫度對假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) 與 type-II (Fo-92) 分離株病原菌菌絲生長之影響 (在 PDA 平板培養 7 d)。

Fig. 5. Effect of temperature on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) and type-II (Fo-92) isolate cultured on potato dextrose agar plates for 7 d.

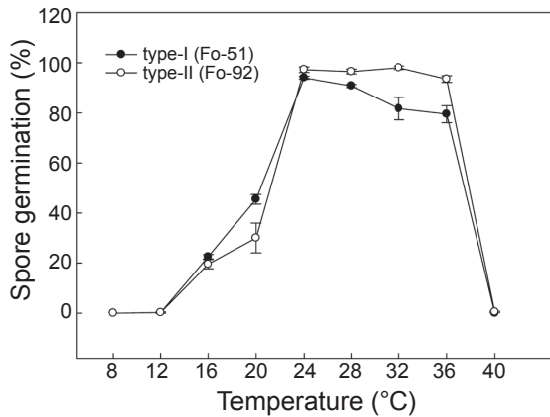


圖 6. 不同溫度對假球莖腐敗病菌 *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) 與 type-II (Fo-92) 分離株孢子發芽之影響。

Fig. 6. Effect of temperature on spore germination of *Fusarium oxysporum* type-I (Fo-51) and type-II (Fo-92) isolates.

Fo-51 與 Fo-92 分離株之孢子發芽率皆達 90% 以上；且在 32°C 與 36°C 下，Fo-51 分離株之發芽率為 80% 以上，Fo-92 分離株仍有 90% 以上發芽率。16°C 以下不利孢子發芽，Fo-51 分離株之發芽率為 22.5%，而 Fo-92 分離株則為 19.5%；而 8°C 及 40°C 下，孢子則完全不發芽。

### 溫度對小花蕙蘭假球莖腐敗病發生之影響

以 Fo-51 分離株之分生孢子懸浮液分別接種於四季蘭與報歲蘭，放置於不同溫度之定溫箱中，結果如圖 7 所示。25°C 及 30°C 為發病適溫，接種 30 d 後兩品種小花蕙蘭植株開始出現失水現象；於接種 45 d 後，兩品種小花蕙蘭之罹病度為 75.0% 以上；於接種 60 d 後，兩品種小花蕙蘭之罹病度高達 87.5–100.0%。於 20°C 下，四季蘭需 45 d 才出現葉片黃化、失水病徵，於接種 60 d 後，四季蘭之罹病度則為 81.6%。但報歲蘭於接種 90 d 後，植株仍僅呈現失水且部分植株輕微黃化的現象，其罹病度僅為 50.3%。於 15°C 下，四季蘭與報歲蘭分別需 60 d 和 75 d 時植株開始出現失水、黃化的病徵，其罹病度分別為 12.5% 與 18.9%。

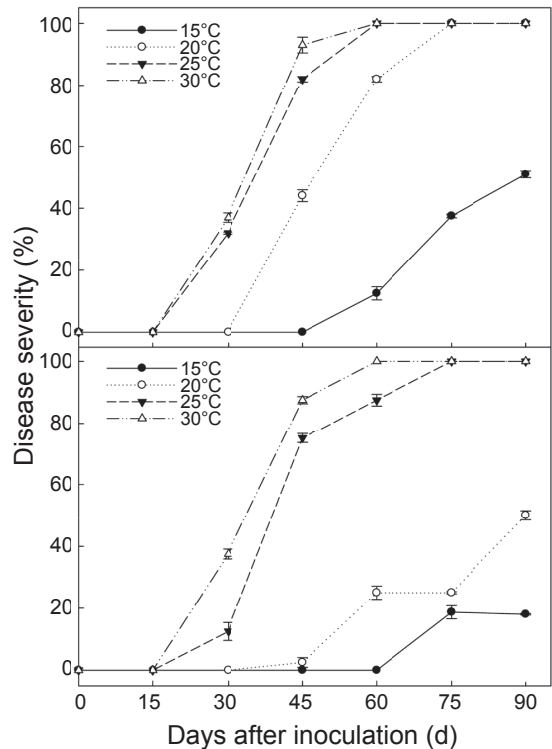


圖 7. 不同溫度對小花蕙蘭球莖腐敗病勢進展之影響。(A) 四季蘭；(B) 報歲蘭。

Fig. 7. Effect of temperature on disease severity of pseudobulb rot disease of *Cymbidium* [(A) *Cymbidium ensifolium*; (B) *Cymbidium sinense*] inoculated with *Fusarium oxysporum* Fo-51 isolate.

## 討論

小花蕙蘭為台灣主要外銷蘭花之一，而本研究於 2003–2005 年調查新竹縣、台中市東勢區、后里區、潭子區、霧峰區、大甲區、南投縣魚池鄉等 12 處小花蕙蘭栽培園，發現小花蕙蘭假球莖腐敗病在栽培區普遍發生。嚴重時發病率可達 50%，其罹病植株呈現葉片黃化、失水萎凋狀。當葉片整片褐化後，易抽起與假球莖分離，只存留假球莖與殘留之葉基部，嚴重時造成植株萎凋死亡。縱剖開罹病植株，可見假球莖及連接根部組織呈黑褐化腐敗現象，腐敗病徵亦蔓延至幼芽，常造成分芽移植後植株不久即出現相同病害，影響移植存活率甚鉅，造成農友莫大之損失。

本試驗由小花蕙蘭假球莖腐敗病罹病組織上進行組織分離、純化後，再經形態特徵、核酸序列比對及病原性測定，確定引起小花蕙蘭假球莖腐敗病之病原為 *F. oxysporum*。經由本研究在田間觀察與取樣檢驗的結果，除了 *F. oxysporum* 之外，*Fusarium proliferatum*、*Phytophthora* sp. 及軟腐細菌 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 有時也會引起小花蕙蘭葉片黃化、失水萎凋狀而易抽起與假球莖分離的病徵，但只有 *F. oxysporum* 會造成假球莖與根部褐化腐敗的病徵，故將此病害取名為假球莖腐敗病。國外的研究報告對於 *F. oxysporum* 造成小花蕙蘭假球莖與根部褐化腐敗的病害名稱尚有莖腐 (stem rot)、乾腐 (dry rot)、球莖及根腐 (bulb and root rot) (Benyon *et al.* 1996; Kim *et al.* 2002a; Jee *et al.* 2003; Yao *et al.* 2018)，由於病徵主要出現在假球莖且不限於乾腐，故本文仍以假球莖腐敗病為病名。

由文獻得知，鐮孢病菌屬中除了 *F. oxysporum* 外，其他病原菌如 *F. proliferatum*、*Fusarium solani*、*Fusarium subglutinans*、*Fusarium fraxiflexum*、*Fusarium circinatum* 會造成多種蘭花葉部、假球莖及根部病害，且常常在同一罹病組織上不只一種病原菌存在，其造成病徵也類似 (Latiffah *et al.* 2009; Srivastava *et al.* 2018)。除了 *F. oxysporum* 之外，造成小花蕙蘭根部腐爛之鐮孢菌還有 *F. proliferatum*、*F. solani*、*F. subglutinans* (Benyon *et al.* 1996; Kim *et al.*

2002a; Kim *et al.* 2002b)，所以在診斷小花蕙蘭的根部病原菌應注意鐮孢菌種的鑑定，以免誤判。*F. oxysporum* 為鐮孢菌屬 (*Fusarium species*) 中於蘭園廣泛存在又兼具破壞性的植物病原菌之一，此病原菌已被報導普遍存在於美國、澳洲、台灣、韓國、印度、馬來西亞、日本、中國大陸等國家的蘭園中 (Burnett 1985; Kim *et al.* 2002b; Latiffah *et al.* 2009; Vijayan *et al.* 2012; Huang *et al.* 2014; Swett & Uchida 2015; Srivastava *et al.* 2018; Yao *et al.* 2018)。其中，嘉德麗雅蘭 (*Cattleya*)、小花蕙蘭 (*Cymbidium*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、堇花蘭 (*Miltonia*)、文心蘭 (*Oncidium*) 及蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 等均受到 *F. oxysporum* 危害的紀錄 (Burnett 1985; Kim *et al.* 2002b; Pedroso-de-Moraes *et al.* 2011; Swett & Uchida 2015; Srivastava *et al.* 2018; Yao *et al.* 2018)。

*F. oxysporum* 是一種複合種 (complex species)，具有腐生性 (saprophytic) 與病原性 (phytopathogenic)，具病原性之菌株其感染的作物範圍廣泛，至少有 150 種寄主植物，常造成許多經濟作物的嚴重損失 (Lecomte *et al.* 2016; Srivastava *et al.* 2018)。其可以厚膜孢子形態殘存於土壤或植物殘體中達數年之久 (Notz *et al.* 2002)，當植株根部被 *F. oxysporum* 病原感染後造成根腐、植株萎凋狀，有時造成莖腐現象，一旦病原菌侵入感染植物維管束系統，植物吸收養分、水分受阻而導致植株死亡 (Burnett 1985; Latiffah *et al.* 2009; Srivastava *et al.* 2018)。本研究從小花蕙蘭假球莖腐敗病之罹病植株分離獲得的菌株，依培養菌落形態可區分為兩型，type-I 與 type-II 菌株均可在報歲蘭與四季蘭之葉片、假球莖及根部上造成病徵，顯示兩型菌株皆對報歲蘭與四季蘭具有病原性。但 type-II 菌株分離率很低，僅在南投縣魚池鄉某一蘭園分離得到。

另外，為了進一步瞭解不同寄主間其病原性差異，本試驗將分離得到的菌株再進行寄主範圍之病原性測定。由試驗結果發現，type-I 型

之 Fo-50、Fo-51 及 Fo-72 分離株與 type-II 型之 Fo-92 分離株，不僅可危害報歲蘭與四季蘭外，亦造成大花蕙蘭-虎頭蘭之假球莖腐敗病病徵；但 type-I 與 type-II 型之分離株皆未在文心蘭、仙履蘭、嘉德麗雅蘭及石斛蘭植株產生病徵。由試驗結果得知，type-I 與 type-II 型之分離菌株具有相似的寄主範圍。根據文獻得知，*F. oxysporum* 菌株常依據其寄主專一性，可再細分為分化型 (*forma specialis*)，目前有超過至少 70 種 *formae speciales* (Armstrong & Armstrong 1981)，例如 *F. oxysporum* f. sp. *cattleyae*、*F. oxysporum* f. sp. *vanilla*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 等 (Pinaría *et al.* 2010; Pedrosa-de-Moraes *et al.* 2011; Srivastava *et al.* 2018)。因此，小花蕙蘭的病原性鐮孢菌是否可區分為不同的分化型，未來仍需收集更多菌株進行驗證，進而探討是否有分化型存在。

本研究另測試溫度對 *F. oxysporum* 分離株菌絲生長與孢子發芽之影響，結果發現 16–32°C 為本菌菌絲可生長之溫度。其中，又以 28°C 培養之菌絲生長較為快速，而 8°C 以下與 36°C 以上之溫度，菌絲幾乎停止生長；本研究亦發現在 24–36°C 溫度下，測試的兩分離株之孢子發芽率均可達約 80% 以上，顯示台灣的溫暖氣候下有利於本病原菌侵入感染。另外，在溫度對病害發生之影響結果發現在 25–30°C 下，於接種 30 d 後，報歲蘭與四季蘭之罹病度約 25–30%。當接種後至 45 d，兩品種小花蕙蘭之罹病度提升至 75% 以上，當接種後至 60 d，則高達 100% 罹病度；而接種 45 d 後，20°C 下僅有四季蘭植株之罹病度為 44%，報歲蘭植株則未發病；15°C 下兩品種小花蕙蘭亦未發病。此結果與 Elmer & Daughtrey (2012) 指出康乃馨萎凋病在 18°C 下，根部雖有病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* 存在，但在康乃馨植株上則未有病徵表現結果具相似性。顯示低溫的環境下，不僅可抑制病害發生，亦可減緩病徵進展 (Gullino *et al.* 2015)。

本研究結果釐清台灣小花蕙蘭假球莖腐敗病係由 *F. oxysporum* 病原菌所引起，台灣的氣候條件適合本病原菌之侵入感染，更有利於病害之進展。另外，低溫環境下可抑制病害發

生，可利用遮陽黑布方式來降低溫室內溫度，進而減緩病害發生。但未來仍須釐清田間病害之感染源，並持續進行如物理防治、化學防治或生物防治等防治策略的評估，以供防治本病害之參考。

## 引用文獻

- Armstrong, G. M. and J. K. Armstrong. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. p.391–399. in: *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. (Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and R. J. Cook, eds.) Pennsylvania State University Press. University Park, PA. 457 pp.
- Benyon, F., B. A. Summerell, and L. W. Burgess. 1996. Association of *Fusarium* species with root rot of *Cymbidium* orchids. *Australas. Plant Pathol.* 25:226–228.
- Burnett, H. C. 1985. Orchids. p.283–351. in: *Disease of Floral Crops*. Vol. II. (Strider, D. L., ed.) Prager Pub. New York, NY.
- Du Puy, D. and P. Cribb. 2007. Genus *Cymbidium* (Botanical Magazine Monograph). Royal Botanic Gardens, Kew. Richmond, UK. 369 pp.
- Elmer, W. H. and M. Daughtrey. 2012. *Fusarium* wilt of cyclamen. p.213–219. in: *Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops*. (Gullino, M. L., J. Katan, and A. Garibaldi, eds.) APS. St. Paul, MN. 256 pp.
- Geiser, D. M., M. del Mar Jiménez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau, and K. O'Donnell. 2004. *FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:473–479.
- Gullino, M. L., M. L. Daughtrey, A. Garibaldi, and W. H. Elmer. 2015. *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management. *Crop Prot.* 73:50–59.
- Hsu, J. H. 2010. The role of pseudobulb in the birth of orchids. p.154–162. in: *Taichung District Agricultural Research and Extension Station. Special issue, No. 105*. (Tsai, Y. F., ed.) Taichung District Agricultural Research and Extension Station. COA. Taichung, Taiwan. 248 pp. (in Chinese with English abstract)
- Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. *List of Plant Diseases in Taiwan*. 4th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
- Huang, L.W., C. J. Wang, Y. S. Lin, W. C. Chung, and W. H. Chung. 2014. Stem rot of jewel orchids caused by a new *forma specialis*, *Fusarium oxysporum* f.

- sp. *anoectochili* in Taiwan. *Plant Pathol.* 63:539–547.
- Hung, H. C., F. M. Wei, and C. S. Chang. 2010. *Cymbidium* Production Operations Manual. Taichung District Agricultural Research and Extension Station. COA. Taichung, Taiwan. 135 pp. (in Chinese)
- Hung, H. C., M. H. Wang, and F. H. Chang. 2017. Effects of tissue culture plantlet size on the seedling growth performance of *Cymbidium*. *Bulletin of TDARES* 135:39–45. (in Chinese with English abstract)
- Jee, H. J., S. M. Lee, and W. D. Cho. 2003. Effects of prochloraz and tebuconazole on control of fusarium bulb and root rot of oriental orchid, *Cymbidium goeringii*. *Res. Plant Dis.* 9:72–78.
- Kim, W. G., B. D. Lee, W. D. Cho, and J. M. Sung. 2002a. Occurrence of dry rot on *Cymbidium* orchids caused by *Fusarium* spp. in Korea. *Plant Pathol. J.* 18:156–160.
- Kim, W. G., B. D. Lee, W. S. Kim, and W. D. Cho. 2002b. Root rot of moth orchid caused by *Fusarium* spp. *Plant Pathol. J.* 18:225–227.
- Latiffah, Z., M. Z. Nur Hayati, S. Baharuddin, and Z. Maziah. 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium*. *Asian J. Plant Pathol.* 3:14–21.
- Lecomte, C., C. Alabouvette, V. Edel-Hermann, F. Robert, and C. Steinberg. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biol. Control* 101:17–30.
- Leslie, J. F., B. A. Summerell, and S. Bullock. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Wiley-Blackwell. Hoboken, NJ. 388 pp.
- Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach, D. Haas, and G. Défago. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2229–2235.
- 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.* 95:2044–2049.
- Pedroso-de-Moraes, C., M. C. de Souza, C. C. Ronconi, and M. A. Marteline. 2011. Response of *cattleya* hybrids for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae* Foster. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54:267–271.
- Pinaria, A. G., E. C. Y. Liew, and L. W. Burgess. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australas. Plant Pathol.* 39:176–183.
- Srivastava, S., C. Kadooka, and J. Y. Uchida. 2018. *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiol. Res.* 207:188–195.
- Summerell, B. A., J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press. St. Paul, MN. 392 pp.
- Swett, C. S. and J. Y. Uchida. 2015. Characterization of *Fusarium* diseases on commercially grown orchids in Hawaii. *Plant Pathol.* 64:648–654.
- Tsai, C. Y. 1998. Chinese cymbidium cultivation management. *Kaohsiung Dist. Agri. News* 27(3):8–10. (in Chinese with English abstract)
- Vijayan, A. K., L. Sithara, K. P. Sreelakshmi, J. Thomas, J. Thomas, R. S. Misra, and K. A. Saju. 2012. Molecular diversity of *Fusarium oxysporum* causing rot diseases of vanilla in south India. *Arch. Phytopathology Plant Protect.* 45:1319–1326.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. New York, NY. 482 pp.
- Yao, J. A., P. Huang, C. Z. Lan, and D. Y. Yu. 2018. Stem rot on *Cymbidium ensifolium* (Orchidaceae) caused by *Fusarium oxysporum* in China. *Can. J. Plant Pathol.* 40:105–108.

## Pseudobulb Rot of *Cymbidium* Caused by *Fusarium oxysporum*

Chiao-Wen Huang<sup>1</sup>, Jin-Hsing Huang<sup>2,\*</sup>, Yi-Ching Li<sup>3</sup>, Chun-Wei Chen<sup>4</sup>, and Ting-Fang Hsieh<sup>5</sup>

### Abstract

Huang, C. W., J. H. Huang, Y. C. Li, C. W. Chen, and T. F. Hsieh. 2020. Pseudobulb rot of *Cymbidium* caused by *Fusarium oxysporum*. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(1):65–76.

A kind of disease causing pseudobulb rot disease was commonly observed in *Cymbidium* cultivation area in Taiwan. The disease symptoms included yellowing or withering of leaves and finally plant death. All the infected plants showed brown rot of pseudobulb and root. Two strains of *Fusarium* sp. showing different colony types were consistently isolated from the infected pseudobulbs and roots. On potato dextrose agar at 25–30°C cultured under 12 h photoperiod for more than 2 weeks, type-I isolates presented light purple colony and type-II isolates presented terra yellow colony. In disease investigation, the isolation frequency of type-I *Fusarium* was much higher than type-II *Fusarium*. Both of these two types of *Fusarium* sp. were identified as *Fusarium oxysporum* based on morphological characteristics as well as sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) and translation elongation factor 1 alpha (TEF-1 $\alpha$ ) genes. Pathogenicity test of these two pathogens on *Cymbidium sinense* and *Cymbidium ensifolium* (by inoculation of spore suspension on root, pseudobulb and leaf) was confirmed for fulfilling the Koch's postulates. The temperature range for mycelial growth of these two types of pathogen was the same at 16–32°C (optimal at 24–28°C), and for spore germination was the same at 16–36°C (optimal at 24–36°C). The temperature range for disease development of type-I *F. oxysporum* was 15–30°C (optimal at 25–30°C). The host range test showed that these two types of pathogen could infect *C. sinense*, *C. ensifolium* and *Cymbidium hookerianum*, but not other tested orchids, such as *Oncidium flexuosum*, *Paphiopedilum insigne*, *Cattleya* and *Dendrobium moniliforme*.

**Key words:** *Cymbidium*, Pseudobulb, Root rot, *Fusarium oxysporum*.

---

Received: August 19, 2019; Accepted: October 25, 2019.

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

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Contract Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>5</sup> Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.