

研究簡報

Fusarium oxysporum f. sp. *koae*引起造林地 台灣相思樹之萎凋病

劉則言^{1,2)} 陳昭翰¹⁾ 張東柱^{1,3)}

摘要

相思樹(*Acacia confusa* Merr.)為臺灣重要的原生造林樹種。2019年間，在南投兩處相思樹造林地持續觀察到樹木萎凋之病徵。先前研究已發現，相思樹苗木維管束萎凋病的植株中，可分離到病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *koae*。本研究主要在探討，造林地內相思樹呈現萎凋病徵之原因，與相思樹苗期維管束萎凋病是否為相同病原菌所引起，並探討該病原菌經由莖部侵染的可能性。為此，本研究自造林地感病相思樹樣本進行潛在病原菌的分離培養，得到可能的病原菌菌株 *Fusarium* sp.。經由核醣體核酸的非轉錄基因間隔區序列(nuclear ribosomal DNA intergenic spacer, IGS)比對，本病原菌與 *F. oxysporum* f. sp. *koae* 有超過99%的相似度。進一步將此病原菌菌株對相思樹苗木進行接種試驗，結果顯示本研究分離之 *F. oxysporum* f. sp. *koae* 菌株，可成功經由莖部傷口感染相思樹苗木，造成萎凋之病徵；並可於感病組織上，成功回分接種之 *F. oxysporum* f. sp. *koae* 菌株，完成柯霍氏法則。經由兩重複病原菌接種試驗可發現，接種 *F. oxysporum* f. sp. *koae* 的相思樹苗木，其植株呈現缺水萎凋之葉片比率高於健康植株，顯示 *F. oxysporum* f. sp. *koae* 為造成相思樹造林地樹木萎凋之潛在病原菌，且可經由莖部傷口感染植株。

關鍵詞：*Fusarium oxysporum* f. sp. *koae*、相思樹、維管束萎凋病、接種實驗、造林地。

劉則言、陳昭翰、張東柱。2022。*Fusarium oxysporum* f. sp. *koae*引起造林地台灣相思樹之萎凋病。台灣林業科學37(1):77-84。

¹⁾ 林業試驗所森林保護組，10066臺北市南海路53號 Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

²⁾ 國立台灣大學植物病理與微生物學系，10617台北市羅斯福路四段1號 Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan Univ., 1 Roosevelt Rd., Sec. 4, Taipei 10617, Taiwan.

³⁾ 通訊作者 Corresponding author, e-mail:ttchang@tfri.gov.tw

2022年3月送審 2022年5月通過 Received March 2022, Accepted May 2022.

Research note

Decline of *Acacia confusa* in Plantations Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *koae* in Taiwan

Tse-Yen, Liu^{1,2)} Chao-Han Chen¹⁾ Tun-Tschu Chang^{1,3)}

[Summary]

Acacia confusa Merr. is one of the most important native trees used for afforestation in Taiwan. The wilt symptoms were observed in the two *Acacia*-plantations in Nantou in 2019. According to the previous study, the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *koae* was isolated from the *A. confusa* seedlings with vascular wilt symptoms. The purpose of this study was to investigate the agent causing wilt symptoms in the plantations and try to identify if the pathogen was the same as the vascular wilt of *A. confusa* seedlings. One potential *Fusarium* sp. was consistently isolated from the wilted *Acacia* trees in the plantations for further inoculation test. This fungus was identified by nuclear ribosomal DNA intergenic spacer (IGS) sequences as *F. oxysporum* f. sp. *koae* with more than 99% similarities. The *A. confusa* seedlings were inoculated and successfully infected by the isolate of *F. oxysporum* f. sp. *koae* through wounds of stems and exhibited wilt symptoms. Furthermore, the same fungus was further isolated from the inoculated seedlings to complete Koch's postulates. By two trails of inoculation tests, the percentage of wilted leaves of the inoculated *Acacia* seedlings was higher than the control ones. The results indicated that *F. oxysporum* f. sp. *koae* was a potential pathogen causing wilt symptoms in the *Acacia*-plantations and may infect through wounds of stems.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *koae*, *Acacia confusa*, vascular wilt, inoculation test.

Liu TY, Chen CH, Chang TT. 2022. Decline of *Acacia confusa* in plantations caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *koae* in Taiwan. *Taiwan J For Sci* 37(1):77-84.

相思樹(*Acacia confusa* Merr.)為常綠喬木，是臺灣重要的原生樹種之一，廣泛分布於低海拔至海拔約1,200公尺左右地區。因為其生長速度快，可生長於烈日、強風、乾旱、土壤貧瘠等不良環境，加上木材質地堅硬，可用於製作高級家具及地板，是國內相當重要的造林樹種(Kan 1978和Lin et al. 2018)。依據2014年林務局第4次全國森林資源調查結果，發現相思樹人工造林面積達10,748公頃，為闊葉樹人工造林面積最大的樹種(Qiu et al. 2015)。有鑑於相思樹在臺灣林業之重要性，相思樹種植與生長過程中所面臨的病蟲害威脅，也同樣受

到關注。依據「臺灣植物病害名彙」，相思樹發生過較為嚴重的病害，包含葉部病害如煤煙病、炭疽病、白粉病、銹病等，以及根基部病害如靈芝根腐病、幼苗猝倒病、褐根病等(TPS. 2019)。2018年在高雄六龜地區相思樹之實生苗培育的過程中，也發現苗木會發生黃化、缺水狀萎凋病徵，最終造成苗木的死亡。該研究經由病原菌分離培養，以及相思樹苗圃之植株發病率及病徵紀錄，發現萎凋苗木之主根維管束有褐色變色情形，並從中分離出過去被報導會危害相思樹苗木之病原菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *koae*，為該病原菌在臺灣危害相思樹苗木的

首次報導(Shih et al. 2020)。

*F. oxysporum*為相當重要的土壤傳播性病原菌，可以腐生的方式在土壤中存活，並經由產生厚膜孢子存活於土壤中。先前研究指出*F. oxysporum*寄主植物的範圍相當廣泛，可危害茄科、豆科、瓜類、香蕉等作物，造成嚴重的經濟損失。植物病原性*F. oxysporum*具有寄主專一性，故依其寄主專一性將*F. oxysporum*區分為不同分化型(forma specialis)。1980年，*F. oxysporum* f. sp. *koae*在夏威夷相思樹苗木上被發現，可持續自莖及根部被分離出來，並經由根部接種實驗與病原性測試，證實其為造成相思樹苗木萎凋病的主因，並提出可能與相思樹成樹的永久性萎凋死亡相關(Gardner 1980)。2018年，*F. oxysporum* f. sp. *koae*亦在台灣相思樹苗圃被發現，並發現會經由植物根部感染造成相思樹苗木的萎凋死亡(Shih et al. 2020)。本研究在兩處南投相思樹造林地，發現相思樹成樹出現萎凋之病徵，並持續自萎凋病病徵之相思樹枝條和樹幹，分離出*Fusarium*屬的真菌。為了解分離到的*Fusarium* sp.與先前研究報告中發現造成相思樹苗木萎凋病之病原菌株是否相同，並釐清其是否為造成造林地相思樹萎凋之主因。本研究經由柯霍式法則，驗證該病原菌對相思樹苗木的病原性，同時評估該病原菌經由莖部傷口危害相思樹之可能性。

於2019年間，南投國姓鄉勞水坑段及竹山鎮桶頭段之濫墾回收4~5年相思樹造林地，現場管理人員發現相思樹有疑似感病死亡的情形，並於2019年5月通報林木疫情鑑定與資訊中心；據現場人員描述，當時現地已有死亡多時及正在發病的相思樹成樹，雖確切的發病時程無法推斷，但發病嚴重區域的相思樹成樹受害率近30%。經採集造林地內相思樹出現萎凋病徵之枝條與莖幹部組織樣本，可於主幹剖面觀察到維管束組織黑褐色變的病徵(Fig. 1和2)。將疑似感病樹木樣本攜帶回實驗室，以解剖刀切取病健部組織進行表面消毒。先以0.5%次氯酸鈉清洗30秒，再以無菌水清洗30秒重複3次。將消毒好的組織塊靜置於無菌的濾紙上吸取多餘的水分，再將陰乾的組織塊置於洋菜培養基



Fig. 1. Wilt symptoms of *Acacia confusa* in the plantation in Nantou, Taiwan in 2019.

上，於25°C環境培養3~5天。於解剖顯微鏡下檢視並切取從組織塊邊緣生長出來的單一純種菌絲，移置馬鈴薯洋菜培養基上進行單菌株的培養。依據分離出真菌的菌落、菌絲、產孢構造、孢子型態等，初步確認從感病組織中分得的真菌為*Fusarium* sp. (Fig. 3)。經菌落與孢子型態鑑定為*Fusarium* sp.之真菌，進一步收取菌絲，以真菌核酸萃取套組Presto™ Mini gDNA Yeast Kit (Geneaid™, New Taipei City, Taiwan)進行核酸萃取。萃取之真菌核酸，以引子對NL11 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3')和CNS1 (5'-GAGACAAGCATATGACTAC-3')進行聚合酶鏈鎖反應(O'Donnell et al. 2009)，增幅出基因體中的核糖體核酸的非轉錄基因間隔區序列(nuclear ribosomal DNA intergenic spacer, IGS)。進一步將PCR放大之核酸片段，分別以引子NL11、NLα (5'-TCTAGGGTAGGCKRGTGTTGTC-3')、CNS1和CNSα (5'-TCTCATRTACCCCTCCGAGACC-3')進行定序(O'Donnell et al. 2009和Shih et al. 2020)。此外，亦從美國生物技



Fig. 2. The cross section of the stem of *Acacia confusa* with wilt symptoms.

術資訊中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)下載*F. oxysporum* f. sp. *koae* (NRRL38885)菌株之IGS序列，以及從日本DNA資料庫(DNA Data Bank of Japan, DDBJ)下載*F. oxysporum* f. sp. *koae* (TFRI_LHC: 1080410)的IGS序列。將本研究所得到的*F. oxysporum*分離株之IGS序列與前述之分離株進行序列比對，可發現序列的相似度高於99% (Appendix Fig. 1)，初步判定*Fusarium* sp.南投分離株和前人研究中所描述，造成相思樹苗木萎凋病之*F. oxysporum* f. sp. *koae*為同種病原菌。此外，是否因地理上的區隔，而開始產生不同的生理小種或專化型，未來將經由多基因親緣關係樹的分析來進行討論(Soleha et al. 2021)。目前不能排除本研究所分離的*F. oxysporum* f. sp. *koae*菌株，可能與先前研究所

發現的菌株因地理上的區隔而產生了分化，而是否也會導致在致病力的強弱上出現差異，也有待後續的研究進行確認。

為確認分離之真菌菌株是否能成功侵染相思樹，造成與造林地相思樹相同的萎凋狀病徵，本研究以相思樹苗木以莖部傷口接種，來確認菌株對相思樹的致病性(Dudley et al. 2007, Jarek et al. 2018, and Lopez-Benitez et al. 2018)。以株高60公分的相思樹苗木來進行2次重覆性接種實驗，每次實驗分別取健康狀況、株高、展葉數相似相思樹苗木5株作為實驗組，5株作為對照組。在接種原的製備上，先以無菌水從PDA培養基培養7~10天的真菌菌落上，洗下真菌的孢子；得到的孢子懸浮液稀釋至 10^6 個孢子/mL備用。接種方式以莖部人工傷口方式進行，於相思樹莖部10公分、20公分、30公分和40公分處，以經75%酒精消毒過約1 mm大小的大頭針，製造深度約5 mm深的傷口；實驗組在每個傷口位置接種50 μ L的孢子懸浮液，對照組則將孢子懸浮液以無菌水取代，接種後以簽字筆標定接種部位，並以石蠟膜包覆接種處保濕，持續觀察實驗組與對照組植株的發病情形，評估真菌分離株對相思樹的致病性。此外，對於接種產生病徵的相思樹苗木，亦進行了進一步的病原菌分離，以完成柯霍式法則。

實驗結果發現，接種*F. oxysporum* f. sp. *koae*之相思樹苗木，於14天後可觀察到苗木開始出現葉片萎凋的情形，並於21天後發現，接種病原菌的相思樹苗木萎凋葉片比率明顯高

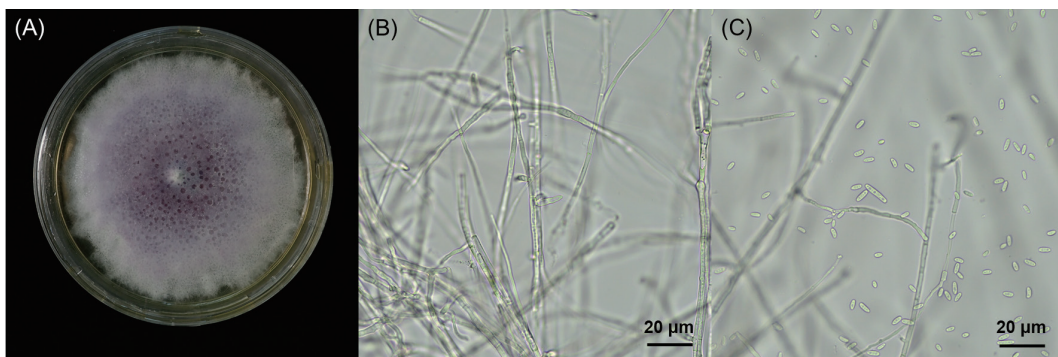


Fig. 3. The morphologies of *F. oxysporum* f. sp. *koae*. (A) The colony on PDA; (B) hyphae and conidiophores; (C) conidia.

於對照組，在30天後，接種病原菌的相思樹相較於接種前和對照組，植株的多數葉片會產生明顯的萎凋狀病徵，嚴重者甚至可觀察到全株呈現葉片枯死的情形(Fig. 4和5)。將呈現萎凋病徵的相思樹苗木莖部進行縱剖觀察，可見除了接種點的維管束組織有產生褐化的病徵外，該褐化病徵會自接種點沿著維管束向下和向上擴散，顯示*F. oxysporum* f. sp. *koae*南投分離株可經由莖部傷口成功侵染相思樹苗木，並在被危害的苗木上造成相同的萎凋狀病徵。此外，將接種發病的相思樹苗木進行病原菌的分離培養，亦可成功自感病組織中，分離到*F. oxysporum* f. sp. *koae*菌株，完成柯霍式法，證實該病原菌對相思樹具有致病性。

有別於先前研究集中於探討*F. oxysporum* f. sp. *koae*經由根部侵染造成相思樹苗木萎凋病(Shih et al. 2020)。本研究從造林地萎凋的相思樹，分離出潛在病原真菌，並嘗試透過莖部的傷口接種，完成柯霍式法則，驗證*F. oxysporum* f. sp. *koae*可透過樹幹部或枝條的傷口侵染相思樹，造成其維管束的褐化，最終導致樹木水分運輸受阻，而呈現萎凋的病徵。在2次重覆性的病原菌接種實驗中也可觀察到，相思樹本身的生長狀況，也會影響病原菌的致病力，當相思樹苗木本身生長狀況不佳時，在未被病原菌為害的情況下，也會產生輕微的萎凋情形；此時病原菌的接種，會加劇植株生長所遭遇的逆境(Gardner 1980)，使植株呈現更明顯的萎凋病徵。

值得注意的是，先前研究已指出*Fusarium* spp.為造成林木幼苗猝倒病的重要病原菌之一，因該病原菌為土壤傳播性病原菌，故多以根部接種方式評估該病原菌的致病力(Gordon et al. 1997, Stewart et al. 2006, Ortoneda et al. 2006, and Wu et al. 2010)。本研究首次將臺灣相思樹相造林地的*F. oxysporum* f. sp. *koae*分離株成功透過莖部傷口感染的方式(Jarek et al. 2018)，回接至相思樹苗木上，且於接種病原菌的植株上，觀察到相同的萎凋病徵，並再次分離到同樣之病原菌，完成柯霍式法則的驗證。此外，接種植株的莖部維管束，可見到自接種點向上及向下產生褐化的病徵，顯示病原菌在接種

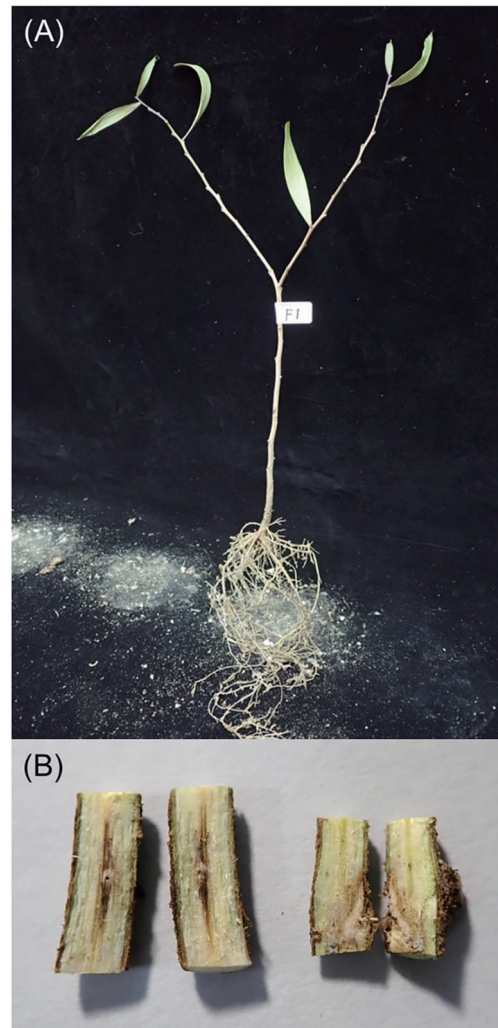


Fig. 4. The symptoms of *Acacia confusa* after inoculated *F. oxysporum* f. sp. *koae*. (A) The symptoms of *Acacia confusa* seedlings; (B) the cross sections of *Acacia confusa* seedlings.

後，會沿著維管束組織對植株造成危害。進一步經由2次重覆的獨立接種實驗，可發現接種*F. oxysporum* f. sp. *koae*植株葉片的萎凋情形明顯高於對照組，以此可推測，造林地的相思樹苗木，除了根部有可能被*F. oxysporum* f. sp. *koae*感染而發病外(Dudley et al. 2007 and Jarek et al. 2018)，當樹幹部或枝條出現傷口時，存活於土壤中的病原菌亦有可能經由雨水飛濺等方式入

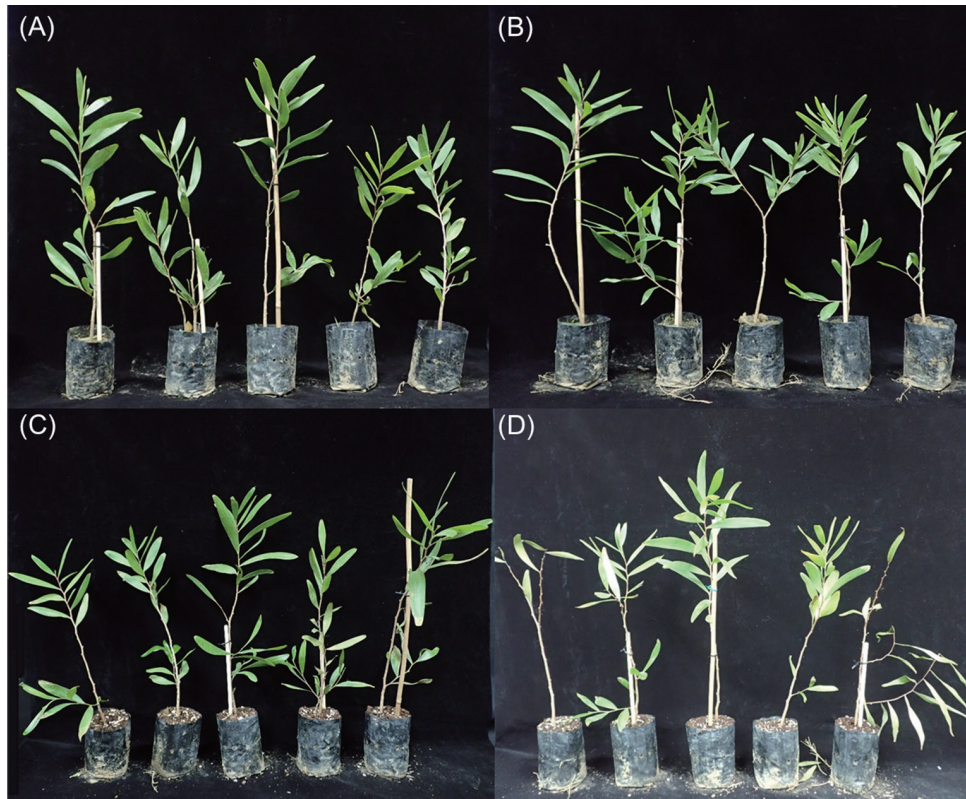


Fig. 5. The *Acacia confusa* seedlings before (A and B) and after (C and D) inoculated with sterilized ddH₂O and *F. oxysporum* f. sp. *koae*, respectively. The seedlings were inoculated with sterilized ddH₂O (A and C); the seedlings were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *koae* spores (B and D) after 30 days.

侵植物的為管束組織；在病原菌在進入植物體內後，亦會沿著維管束危害植株，造成萎凋的病徵。未來亦可經由本研究建立的莖部傷口接種方式，進行相思樹成樹的病原菌接種實驗，以進一步了解病原菌*F. oxysporum* f. sp. *koae*對相思樹造林地的危害程度。

經現場人員後續觀察至2021年底，發現相較於2019年的發病相思樹數量，並未有持續增加的情形，推測相思樹成樹萎凋病的發生，病原菌*F. oxysporum* f. sp. *koae*的感染並非唯一的因子；亦可能和樹木當時的生理健康狀況，以及整體環境條件，如溫度、降雨量等密切相關。由於造林地不易到達，針對相思樹成樹的整體發病情況，目前尚未有詳細的發病過程調查，本病害的完整發生生態，仍有待未來進一

步的研究。本研究首次自造林地的萎凋相思樹上，分離出病原菌*F. oxysporum* f. sp. *koae*，並發現其與先前報導造成相思樹苗木萎凋病之病原菌IGS序列有99%的相似度。研究中進一步完成了柯霍式法則，確認*F. oxysporum* f. sp. *koae*為造成相思樹萎凋之病原菌。雖然造林地的萎凋病是發生於相思樹成樹，而本研究現階段僅經由相思樹苗木接種來完成柯霍式法則的驗證，但仍反應出*F. oxysporum* f. sp. *koae*對相思樹成樹具有潛在的致病能力，並可作為未來相思樹成樹接種實驗的參考。此外，有別於過去經由種子或土壤的方式傳播，研究中以莖部傷口接種的方式，確認病原菌可以莖部傷口為侵染途徑，危害相思樹的維管束組織，使其產生萎凋的病徵；然而造林地中相思樹萎凋病的發

生，是殘存於土壤中的病原菌經由雨水飛濺自相思樹樹幹或枝條上的傷口入侵，亦或自土壤經由根部侵染病危害樹木的維管束組織，導致其產生萎凋之病徵，仍有待未來長時間的持續追蹤調查，提供更完整的相思樹成樹萎凋病發病生態紀錄。

引用文獻

- Dudley NS, James RL, Snieszko RA, Yeh, A. 2007.** Pathogenicity of four *Fusarium* species on *Acacia koa* seedlings. USDA Forest Service, Northern Region, For Health Pro Rep 07-04.
- Gardner DE. 1980.** *Acacia koa* seedling wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *koae* f. sp. nov. *Phytopathology* 70(7):594-597.
- Gordon TR, Martyn RD. 1997.** The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol* 35:111-28.
- Jarek TM, Santos ÁFD, Tessmann DJ, Vieira ESN. 2018.** Inoculation methods and aggressiveness of five *Fusarium* species against peach palm. *Ciência Rural* 48.
- Kan WS. 1978.** Leguminosae. *Manual of medicinal plants in Taiwan* 2:239-240.
- Lin HY, Chang TC, Chang ST. 2018.** A review of antioxidant and pharmacological properties of phenolic compounds in *Acacia confusa*. *J Tradit Complement Med* 8(4):443-450.
- Lopez-Benitez A, Rodriguez-Herrera SA, Gayosso-Barragan O, Alcalá-Rico JS, Vizcarra-Lopez M. 2018.** Inoculation methods and conidial densities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycoperici* in tomato. *Aust J Crop Sci* 12(8):1322-1327.
- O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, et al. 2009.** A two locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet Biol* 46:936-48.
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, et al. 2004.** *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun* 72:1760-6.
- Qiu, LW, Huang, QX, Wu, JQ, and Xie, XT. 2015.** Summary of the results of the 4th National Forest Resources Survey. *Taiwan For J* 41(4):3-13. [in Chinese].
- Shih HH, Tsai JB, Ou JH, Lee GW, Fu CH, Chen CY. 2020.** First report on vascular wilt of *Acacia confusa* in Taiwan. *Taiwan J For Sci* 35(3):251-5. [in Chinese].
- Soleha S, Muslim A, Suwandi S, Kadir S, Pratama R. 2021.** The identification and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* causing acacia seedling wilt disease. *J For Res* 1-9.
- Stewart JE, Kim MS, James RL, Dumroese RK, Klopfenstein NB. 2006.** Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* isolates from a conifer nursery *Phytopathology* 96:1224-33.
- TPS. 2019.** List of plant diseases in Taiwan (5th) Taipei, Taiwan: Taiwan Phytopathology Society (TPS). p 1-3. [in Chinese].
- Wu ML, Hung TH, Tsai CH, Liu TC, Huang TY. 2010.** Establishment of PCR detection technique for seedling damping-off disease. *Qtly J Chin For* 43(2):339-353. [in Chinese].

