

研究報告

## *Nectria haematococca* Berk. & Br.

### 引起山葵的根腐病

傅春旭<sup>1)</sup> 黃勁暉<sup>2)</sup> 黃怡菁<sup>3)</sup> 張東柱<sup>4)</sup> 李鎧彤<sup>2,5)</sup>

#### 摘要

山葵(*Wasabia japonica* Matsum)之根腐病於2015年7月在桃園市復興區首次發現，病徵為根基部及葉柄基部水浸狀軟化及腐爛、最後植株葉片下垂、萎凋死亡，部分發病根莖及葉柄上產生白色黴狀物及橘紅色的子囊殼。經組織分離、形態鑑定及分子鑑定，發現病原菌為*Nectria haematococca*，將純培養的病原菌菌落以均質機做成菌泥浸泡根部接種，可產生與自然界相同的病徵，發病率為55.6%，而自人工接種的發病株上亦可以分離出與接種相同的病原菌，完成柯霍氏法則。實驗中初步篩選出殺菌劑腐絕、三得芬、貝芬替、免賴得及土肉桂葉片、檸檬香茅葉片及樟樹葉片的精油，加入PDA培養基內對菌絲生長均有良好的抑制效果。

關鍵詞：山葵、*Nectria haematococca*、*Fusarium solani*、根腐病。

傅春旭、黃勁暉、黃怡菁、張東柱、李鎧彤。2018。*Nectria haematococca* Berk. & Br.引起山葵的根腐病。台灣林業科學33(1):49-61。

<sup>1)</sup> 林業試驗所森林保護組副研究員，10066台北市南海路53號 Associate Researcher, Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

<sup>2)</sup> 國立臺灣大學森林環境暨資源學系碩士研究生，10617台北市羅斯福路四段1號 Master student of Department of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University. No. 1, Section 4, Roosevelt Road, Taipei 10617, Taiwan.

<sup>3)</sup> 林業試驗所育林組研究員，10066台北市南海路53號 Researcher, Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

<sup>4)</sup> 林業試驗所森林保護組研究員，10066台北市南海路53號 Researcher, Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

<sup>5)</sup> 通訊作者 Corresponding author, e-mail:dorali614@gmail.com

2017年2月送審 2017年6月通過 Received February 2017, Accepted June 2017.

## Research paper

## Root Rot of *Wasabia japonica* Caused by *Nectria haematococca*

Chuen-Hsu Fu,<sup>1)</sup> King-Fai Wong,<sup>2)</sup> Yi-Ching Huang,<sup>3)</sup>  
Tun-Tschu Chang,<sup>4)</sup> Hoi-Tung Li<sup>2,5)</sup>

### 【 Summary 】

Root rot of *Wasabia japonica* caused by *Nectria haematococca* was first observed in Fuxing District of Taoyuan City in July, 2015. Diseased plants showed stem and rhizome rot, and subsequently leaves wilted and the plants died. *Nectria haematococca* was isolated from infected tissues, and the disease was reproduced in the lab by inoculation of the roots with a mycelial and spore suspension of the pure pathogen culture. After inoculation, 55.6% of plants developed the same stem and rhizome rot symptoms, and the pathogen was reisolated from inoculated plants to complete the pathogenicity test. Amendment with the pesticides Thiabendazole, Tridemorph, Benomyl, or Carbendazim, or essential oils of *Cinnamomum osmophloeum*, *Cymbopogon citrates* and *Cinnamomum camphora* leaves into potato dextrose agar medium, effectively inhibited mycelial growth of *N. haematococca*.

**Key words:** *Wasabia japonica*, *Nectria haematococca*, *Fusarium solani*, root rot.

**Fu CH, Wong KF, Huang YC, Chang TT, Li HT. 2018.** Root Rot of *Wasabia japonica* caused by *Nectria haematococca*. Taiwan J For Sci 33(1):49-61.

### 緒言

山葵(別名山蕎菜)，學名為 *Wasabia japonica* Matsum.，以往亦曾被名為 *Eutrema wasabi* Maxim. 及 *Allaria wasabi* Prantl (Yen 1962)，英文稱為 Wasabi 或 Japanese horse radish，是十字花科(Brassicaceae)山葵屬(*Wasabia*)的多年生草本植物，擁有香、辛、甘、黏的獨特風味，為日本人最常用的香料及生魚片的必備佐料(Oda 1949, Yen 1962, Liang 1983, Chou 1987, Huang and Hung 1988)。中醫指山葵性寒、味辛，能清血、利尿、發汗、並有促進食慾、防腐殺菌的功效(Hsueh 2000)；山葵的根莖、葉片及葉柄都可以採收、食用，其中以根莖的風味最重、價值最高。

山葵喜歡陰涼多濕的栽培環境，多栽種於海拔2000~3000米(m)的山林蔭下，最適生長溫

度為12~18℃、光度為10,000勒克斯(lux)，適合栽種於林下腐植層豐富之土壤或溪流兩旁之沙礫地，可以種子或分株繁殖，栽培期為18~24個月(Wu 1992, Hsueh 2000)。山葵原產於日本，自1914年由東京大學佐藤昌氏引進後，成為出口日本的重要經濟作物(Lo et al. 2002)，初期栽種面積約20公頃(ha)，阿里山佔17 ha、約50戶農民，太平山、八仙山、花蓮光復鄉深山等零星佔3 ha，梨山亦有少量栽培(Liang 1983)；後期大幅拓展至400 ha，主要栽種於阿里山、約500戶農民(Meng 1990)，另外太平山、八仙山、木瓜山、花蓮光復、南投立霧溪、梨山、鞍馬山、桃園石門、新竹、谷關、溪頭等亦有種植(Wu 1992, Hsueh 2000)。根據行政院農業委員會農業知識入

口網(<https://kmweb.coa.gov.tw/jigsaw2010/Detail.aspx?item=260548>)最新的數據,阿里山現時還有種植約64 ha,於花蓮縣、台中市亦有少量生產,全台生產量達480萬公噸(mt)。山葵因為吸引大量栽培者加入,造成林地的非法開墾種植,亦引起多年林地景觀及水土問題之爭議(Hu et al. 1991)。因此,近年有栽培者嘗試打破限制,把山葵從高海拔下移至海拔約1300 m的拉拉山以設施成功栽種,此種新的栽培模式避開了破壞林地水土保持的問題,可是新的氣候讓以往幽居高海拔山林的山葵面臨前所未見的病蟲害及挑戰。

根據Suzuki 1976所載,山葵在日本的主要病害有白銹病(*Albugo wasabiae* Hara引起)、露菌病(*Peronospora alliariae-wasabiae* Gaumann引起)、黑心病(*Phoma wasabiae* Yokogi引起)、軟腐病(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ham. et Hun.引起)、苗立枯病(*Rhizoctonia solani* Kuhn引起)、菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum* Masse引起)、角斑病(*Septoria wasabiae* Hara引起)及萎縮病(TMV, CMV, TuMV病毒引起)等多種病害(Lo et al. 2000),至於《臺灣植物病害名彙》中,只有白銹病、露菌病、黑心病及根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita* Kofoid & White及*M. javanica* Treub.引起)的記錄(Tsu 2002)。另外Chou 1986的《蔬菜主要病害彩色圖鑑》中所載,對山葵的7種病害的病徵有較詳細的描述,包括軟腐病、白銹病、露菌病、菌核病、苗立枯病、墨入病(同黑心病)及角斑病(*Septoria wasabiae* Hara引起)。2015年7月在桃園市復興區的拉拉山上之栽培區內,發現山葵根莖腐爛,葉柄及葉基部水浸狀軟化、葉片下垂的根腐病病徵,部分根部轉黑,部分發病後期的根莖及葉柄上會發黑及產生白色黴狀物及橘紅色的子囊殼。此等病徵與以往記錄的山葵病害的病徵不同,故判斷為新一種病原菌引起的新病害;為提供栽培者更多資訊及防治方法,故作進一步的研究及探討。

## 材料與方法

### 一、病原菌之分離

清除病株根部土壤,以大量清水沖洗乾

淨,切除腐爛發黑及完好根部中間交接的病健部組織約1 cm大小,以10%次氯酸納水溶液作表面消毒30 s,然後以滅菌過的濾紙吸去附著表面的次氯酸納水溶液,再以無菌水清洗兩次,以減少次氯酸納的殘留。以滅菌過的濾紙吸去經消毒及清洗的根部組織上的多餘水份後,再以火燄滅菌過的解剖刀切成約長1 mm之小片段,置於馬鈴薯抽取物平板培養基(potato dextrose agar, PDA; 39 g HIMEDIA PDA powder, 1 L distilled water)及水洋菜平板培養基(water agar, WA; 20 g HIMEDIA agar PT powder, 1 L distilled water)上,於室溫中不光照的條件下培養。另外,取病徵部上的白色黴狀物輔以光學顯微鏡觀察,可發現許多鐮刀狀孢子及橢圓形的小孢子,部分病徵部上有橘紅色的子囊殼,取出壓開、以光學顯微鏡觀察,可發現子囊殼內之有性孢子。利用小攝子把上述之白色黴狀物及橘紅色的子囊殼,置於PDA及WA上,於室溫中不照光的條件下培養。當菌絲自病根組織或白色黴狀物及橘紅色的子囊殼生長到培養基時,以火燄滅菌過的解剖刀切取單一菌絲及菌絲尖端,移到新的PDA上培養,以取得純培養菌株。

### 二、病原性檢定

於直徑9 cm的PDA上,在室溫中不照光的條件下培養病原菌14天後,加入50 mL無菌水到均質機以低轉速攪拌約30 s作為菌泥接種源,以根部浸泡菌泥接種,另外以浸泡無菌水的植株為對照組。接種的山葵植株為一年生,根莖直徑約1 cm,每組接種3株,實驗重複一次,接種後所有植株裝入透明夾鏈袋保濕,於室溫下進行實驗,其後每天觀察及拍照記錄各組之病害發展情況。

### 三、病原菌之分子鑑定

選取四個純培養的病原菌菌株樣本,依據Hung et al. 1999的DNA萃取方法修改後進行DNA萃取,供聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)之用。PCR中使用GoTaq® Green Master Mix (Promega, 內含Taq DNA

polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>及reaction buffers), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)及ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG), PCR起始變性(denaturation)溫度為94°C 3 min; 變性溫度為94°C 30 s, 黏合(annealing)溫度為56°C 30 s, 增幅溫度72°C 30 s, 循環30週期; 最後延展(extention)溫度72°C 5 min。以電泳估計各樣本之鹼基對長度(bp)後, 把產物送至昕穎生醫技術股份有限公司以Sanger Sequencing Method (ABI3730)進行定序。取得定序結果後, 與美國生物技術資訊中心網站(National Center for Biotechnology Information; NCBI)之資料庫內登錄的基因序列, 以核酸基因庫序列群組分析程式(Basic Logical Alignment Search Tool;

BLAST)作序列相似度比對。

另外定序結果也會跟Table 1之GenBank中其他*Fusarium*屬之ITS序列作親緣樹分析, 當中使用*Choiromyces alveolatus* (Harkn.) Trappe (GenBank accession nos.: HM485332, HM485333)作為外群比較。各群組ITS序列以網路程式MAFFT 7 (Katoh and Standley 2013)排列整齊後, 再以網路程式Gblocks 0.91b (Castresana 2000)檢查及去掉排列不佳的序列片段, 然後以MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013)的最大似然分析(maximum likelihood; ML)作基因親緣分析, bootstrap值設定為1000, 最後以FigTree 1.4.3 (Rambaut 2014)整合出基因親緣關係圖。

**Table 1. ITS sequences used for the phylogenetic analysis in this study**

Species	Origin	Voucher no.	GenBank accession no.
<i>Choiromyces alveolatus</i>	USA	MES97	HM485332
<i>Choiromyces alveolatus</i>	USA	HS2886	HM485333
<i>Fusarium biseptatum</i>	Slovenia	CBS 110138	EU926251
<i>Fusarium biseptatum</i>	Slovenia	CBS 110311	EU926252
<i>Fusarium equiseti</i>	Algeria	F19RS1	JX114791
<i>Fusarium equiseti</i>	China	YT2	KX576658
<i>Fusarium lateritium</i>	Mexico	22L-213-Mexico	AY904057
<i>Fusarium lateritium</i>	Mexico	SGLMf40	EU715687
<i>Fusarium lateritium</i>	Poland	19521	KT004553
<i>Fusarium oxysporum</i>	China	XSD-73	EU326215
<i>Fusarium oxysporum</i>	USA	2425	KT828536
<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i>	USA	ATCC 96285	EF590328
<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i>	China	EPPI04	EU022521
<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i>	India		HQ694500
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	China	NJLS1301	KJ806518
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	China	JSGY1304	KJ806519
<i>Fusarium solani</i>	China	H4470	GU595038
<i>Fusarium solani</i>	Colombia	PCO.30	HQ248197
<i>Fusarium solani</i>	India	AF14	JX173101
<i>Fusarium solani</i>	India	IHB F 2353	KF679356
<i>Fusarium solani</i>	China	CF64	KM979745
<i>Fusarium solani</i>	Venezuela	C219	KU377470
<i>Fusarium solani</i>	Taiwan	WF1	This study
<i>Fusarium solani</i>	Taiwan	WF2	This study
<i>Fusarium solani</i>	Taiwan	WF3	This study
<i>Fusarium solani</i>	Taiwan	WF4	This study

#### 四、溫度對病原菌生長之影響

把純培養的單菌絲病原菌株，以室溫及不光照的條件下培養7天後，用直徑0.8 cm、已滅菌的打孔器截取菌落邊緣的菌絲塊作接種源，把接種源移至新的PDA中央，分別置於16、20、24、28及32°C的恆溫箱內，每種溫度接種3個培養基，實驗重複1次，以不照光的條件下培養5天後，量度各菌落的生長長度。

#### 五、酸鹼度對病原菌生長之影響

以直徑0.8 cm的打孔器截取菌落邊緣的菌絲塊，移至pH 2、4、6、8、10及12的PDA上，置於24°C恆溫箱內，每種pH接種3個培養基，實驗重複1次，以不照光的條件下培養3天後，量度各菌落的生長長度。

#### 六、防治藥劑的篩選

選取市面上容易買到的殺菌劑作篩選對象，其名稱及劑型如下：25%依得利乳劑(25% Etridiazole E.C., Chemtura Corporation)；40%亞賜圃乳劑(40% Isoprothiolane E.C., Sundat Singapore)；50%撲滅寧可濕性粉劑(50% Procymidone W.P., 立農)；42.37%滅芬農水懸劑(42.37% Metrafenone S.C., 巴斯夫)；42.2%腈硫醯水懸劑(42.2% Dithianon S.C., 巴斯夫)；10.5%平克座乳劑(10.5% Penconazole E.C., 世大)；24.9%待克利乳劑(24.9% Difenoconazole E.C., 瑞芳)；9.4%賽座滅水懸劑(9.4% Cyazofamid S.C., 石原產業)；50%貝芬替水懸劑(50% Carbendazim S.C., 大成)；50%免賴得可濕性粉劑(50% Benomyl W.P., 杜邦)；50%達滅芬可濕性粉劑(50% Dimethomorph W.P., 巴斯夫)；50%福多寧可濕性粉劑(50% Flutolanil W.P., 日本農藥)；23.6%百克敏乳劑(23.6% Pyraclostrobin E.C., 巴斯夫)；30%賽福座可濕性粉劑(30% Triflumizole W.P., 日本曹達)；33.5%快得寧水懸劑(33.5% Oxine-copper S.C., 嘉泰企業)；41.8%腐絕水懸劑(41.8% Thiabendazole S.C., ThanhSon Agrochemicals)；84.2%三得芬乳劑(84.2% Tridemorph E.C., ALFA)；40%甲基多

保淨水懸劑(40% Thiophanate-methyl S.C., 大勝)；30%殺紋寧溶劑(30% Hymexazol S.L., 大勝)；23%亞托敏水懸劑(23% Azoxystrobin S.C., ThanhSon Agrochemicals)；35%滅達樂可濕性粉劑(35% Metalaxyl W.P., Sundat Singapore)；10%克枯爛可濕性粉劑(10% Tecloftalam W.P., 大勝)。PDA經高壓滅菌後，待溫度下降到約45°C時，趁未凝固前加入殺菌劑，配製成含量1000 ppm殺菌劑的PDA。用直徑0.8 cm滅菌過的打孔器截取純培養菌落邊緣的菌絲塊，接種在各種殺菌劑PDA上，同時亦接種在沒有添加殺菌劑的PDA上作對照組，每種殺菌劑及對照組接種3個培養基，實驗重複1次。以28°C及不照光的條件下培養5天後，量度各菌落的長度，以下列方程式計算各藥劑對病原菌生長的抑制率(Ho 1975)，生長率為各處理的菌落平均直徑減去原本菌絲塊的0.8 cm：

$$\text{藥劑對病原菌生長的抑制率(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{病原菌在藥劑PDA上的生長率}}{\text{病原菌在對照組PDA上的生長率}} \right) \times 100$$

篩選出四種抑制率最高的殺菌劑，再配製成10及100 ppm的PDA進行相同實驗，以找出藥劑對病原菌的半致死劑量(50% lethal dose, LD50)。

#### 七、植物萃取精油的防治篩選

選取下列植物之葉片：土肉桂(*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira)、檸檬香茅(*Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf)、樟樹(*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.)、白千層(*Melaleuca leucadendra* Linn.)、澳洲茶樹(*Melaleuca alternifolia* Cheel.)、牛樟(*Cinnamomum kanehirae* Hayata)、陰香(*Cinnamomum burmannii* (Nees) Blume)、柳杉(*Cryptomeria japonica* (L.f.) D. Don)、龍柏(*Juniperus chinensis* L. var. *kaizuka* Hort. Ex)、馬告(*Litsea cubeba* (Lour.) Persoon)、琉球松(*Pinus luchuensis* Hayata)、世界爺(*Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) J. Buchholz)、五葉松(*Pinus morrisonicola* Hayata)、紅檜(*Chamaecyparis formosensis* Matsum.)、二葉松(*Pinus taiwanensis*

Hayata)及水杉(*Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng)萃取的精油,以及樟樹果實,作為精油防治篩選對象。PDA經高壓滅菌後,待溫度下降至約45°C時,趁未凝固前加入以比例1:1混合的精油及1% Tween,配製成含量1000 ppm的精油PDA。用直徑0.8 cm滅菌過的打孔器截取純培養菌落邊緣的菌絲塊,接種在各種精油PDA上,亦接種在沒有添加精油的PDA上作對照組,每種精油及對照組接種3個培養基,實驗重複1次。以28°C及不照光的條件下培養3天後,量度各菌落的長度,並以藥劑篩選中使用的方程式計算各精油對病原菌生長的抑制率。

## 結果

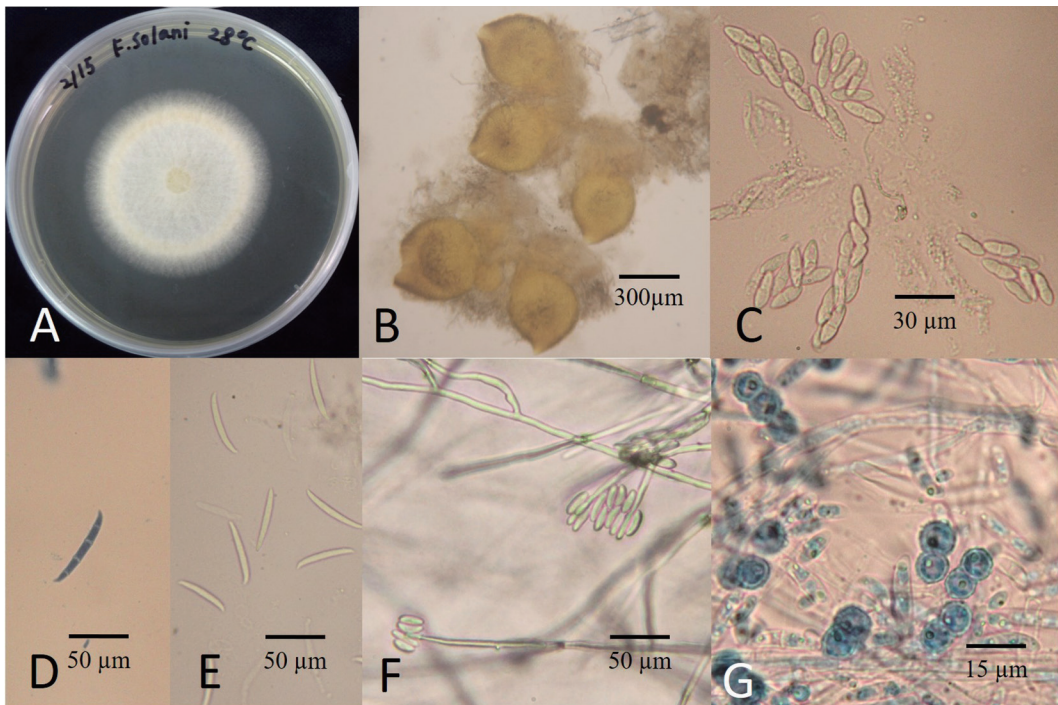
### 一、病原菌的形態

病原菌於28°C不照光的條件下,於PDA中5天的菌落生長長度為3.7 cm,菌絲平鋪生長,

菌落呈白色至淡黃色(Fig. 1),有時候會產生淡橘色的孢子泥。分生孢子有分大、小孢子兩種,小孢子數量很多,形狀呈橢圓形、長橢圓形、腎形及倒卵形等,大小為7.5~25 (~30)×2.5~5 μm,隔膜0~2個;大孢子為鐮刀或茄形,頂細胞及足細胞略為彎曲,似鳥啄狀,隔膜4~5 (~6)個,大小為(32.5~) 37.5~52.5 (~65)×3.8~5 μm。子囊殼為橘紅色梨形,直徑為300~350 μm,子囊為棍棒狀,每個子囊內有8顆子囊孢子,子囊孢子為雙室,中央有縊縮,大小為12.5~17.5×5 μm。會形成球形及橢圓形的厚膜孢子,普遍端生及對生,也有間生、單生及串生,直徑為7~12.5 μm。從上述形態鑑定此病原菌有性世代為*Nectria haematococca* Berk. & Br.,無性世代為*Fusarium solani* Mart.。

### 二、病原菌的分子鑑定

Table 2為四個純培養的病原菌菌株樣本



**Fig. 1. Morphological characteristics of *Nectria haematococca*. A, Mycelium morphology on PDA; B, perithecial; C, ascospores; D, E, macrospores; F, microspores; G, chlamydospores.**

WF1-WF4之定序結果，結果序列長564~566 bp，與資料庫進行核酸基因序列比對後顯示與基因庫內的*Fusarium solani* Mart. (accession nos. KF918584, KF918588, KR350652)的相似度達99% (Table 3)。

以病原菌菌株樣本WF1-WF4之定序結果及從GenBank選取*Fusarium*屬之序列進行ITS基因親緣分析，全部共26段序列，排列後序列全長1254 bp，經Gblocks 0.91b檢查及去掉排列不佳

的片段後，排列序列長510 bp，經MEGA 6.0計算以最佳的K2 + G Model進行最大似然分析，得到親緣關係圖(Fig. 2)。親緣關係圖中WF1、WF2與*Fusarium solani*都分為同一群，顯示基因上沒有顯著差異(significant variation)，而WF3及WF4同分為*Fusarium solani*的姐妹群，顯示病原菌菌株樣本基因上都與*Fusarium solani*最相近，而WF1、WF2及WF3、WF4被分為兩姐妹群，基因上有些微差異。

**Table 2. ITS sequences of the 4 isolates of *Nectria haematococca* (WF1~WF4)**

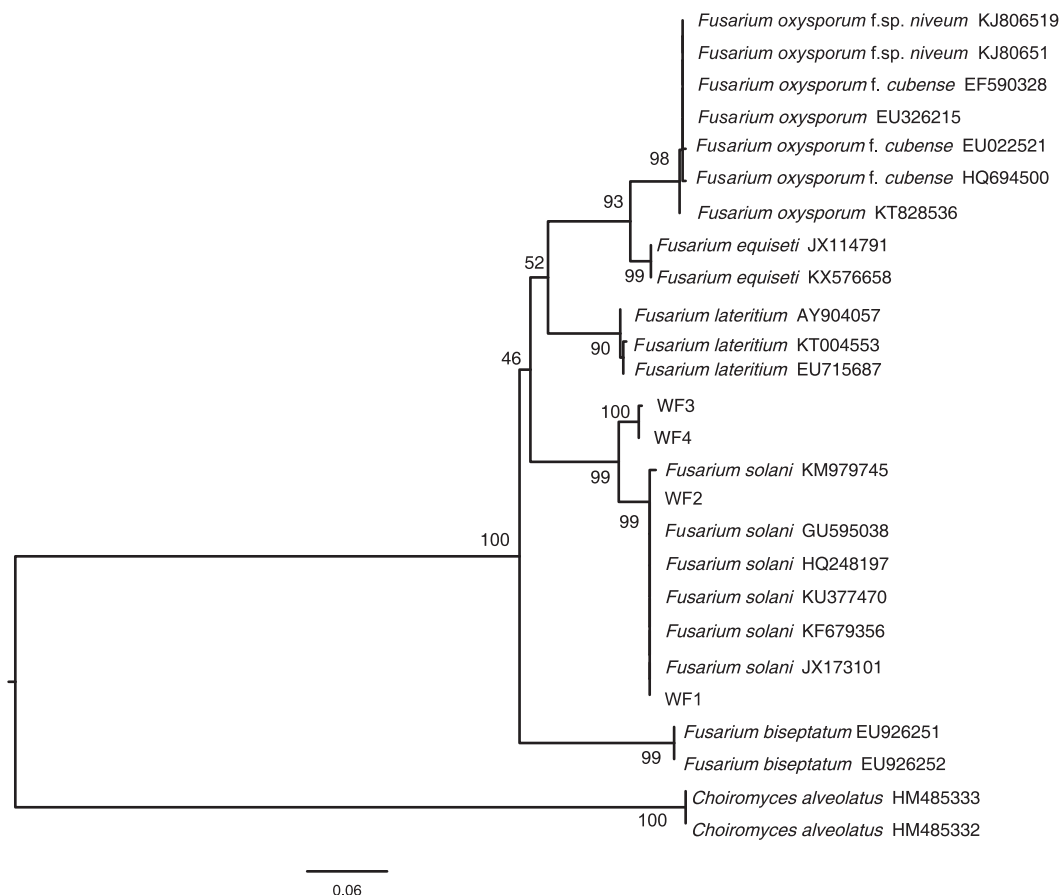
WF1 (566 bp)
GCGGTTTTTGTACGCGGAGGGACATTACCGAGTTATTCAACTCATCAACCCTGT GAACTTACCTATAACGTTGCTTCGGCGGGAATAGACGGCCCCGTAAAACGGGCC GCCCCCGCCAGAGGACCTTTAACTCTGTTTCTTTTAGTGTATCTTCTGAGTAAAA CAAGCAAATAAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGC GTCATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCCC GTGGGCACACGCCGTCCCCCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATC GCGTAGTAGCTAACACCTCGCGACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCCGTAAAA CACCCA ACTCTTCTGAAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCCGGAGGAA
WF2 (564 bp)
CCTTTTGGGTGACGCGGAGGGACATTACCGAGTTATTCAACTCATCAACCCT GTGAACTTACCTATAACGTTGCTTCGGCGGGAATAGACGGCCCCGTAAAACGGGC CGCCCCCGCCAGAGGACCTTTAACTCTGTTTCTTTTAGTGTATCTTCTGAGTAAAA CAAGCAAATAAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGC GTCATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCCC GTGGGCACACGCCGTCCCCCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATC GCGTAGTAGCTAACACCTCGCGACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCCGTAAAA CACCCA ACTCTTCTGAAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCCGGAGG

WF3 (566 bp)
TCCTTTTTGGGTTACAGCGGAGGGACATTACCGAGTCTAACAACATCATCAACCCT GTGAACATACCTAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCCGTAACACGGGC CGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAAATGTTTTTCTGAGTA AACAAGCAAATAAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGC GTCATTACAACCCTCAGGCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCCC GTGGGCACACGCCGTCCCCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATT GCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGGCCATGCCGTA AAA CACCCAATTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCGGGAGGA
WF4 (566 bp)
CCCGTTTTTGTGCTGACGCGGAGGGACATTACCGAGTCTAACAACATCATCAACCCT GTGAACATACCTAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCCGTAACACGGGC CGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAAATGTTTTTCTGAGTA AACAAGCAAATAAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGC GTCATTACAACCCTCAGGCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCCC GTGGGCACACGCCGTCCCCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATT GCGTAGTAGCTAACACcTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCCGTA AAA CACCCA ACTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA TATCAATAAGCGGAGGA

**Table 3. Results of the molecular analysis of the ITS sequence of *Nectria haematococca* with the NCBI GenBank database**

Isolate no.	Sequence length (bp)	Closest BLAST match	Bases matched	Similarity	Best match GenBank accession no.
WF1	566	<i>Fusarium solani</i>	559/563	99%	KF918588
WF2	564	<i>Fusarium solani</i>	557/560	99%	KF918584
WF3	566	<i>Fusarium solani</i>	543/545	99%	KR350652
WF4	566	Uncultured <i>Fusarium</i>	549/551	99%	HG937015





**Fig. 2. Phylogenetic analysis (ML) of the ITS region of 4 isolates of *Nectria haematococca* (WF1~WF4) and other *Fusarium* species from GenBank, with *Choiromyces alveolatus* as the outgroup. Numbers below the branches identify the bootstrap statistical percentages.**

### 三、病原性測定

兩次實驗中的對照組山葵植株皆維持正常生長；於第一次實驗中，處理組中有1株於接種後16天出現葉片下垂萎凋、葉柄水浸狀軟化及縊縮的情況，葉柄軟化部上長出白色黴狀物，經鏡檢可以看到鐮刀狀的大孢子及橢圓形的小孢子，這些地面上的病徵與自然界發現的相似 (Fig. 3)；挖取病株及除去土壤檢查，發現根莖腐爛、根部部分變黑，後來從葉柄及根部的病健部的組織分離都可以分到原接種的病原菌。第二次實驗中，處理組的接種植株增加到6株，其中有3株於接種後11天及有1株於接種後16天出現葉片下垂萎凋、葉柄水浸狀軟化及縊縮的

情況，二次實驗平均發病率為55.6%。其中1株葉柄軟化部上長出白色黴狀物，經鏡檢看到鐮刀狀的大孢子；挖取病株及除去土壤檢查，其中2株發病較初期的根莖開始水浸狀軟化，切開根莖發現維管束變色。後來從4株病株的葉柄及根部的病健部的組織分離都可以分到原接種的病原菌。

### 四、環境因子對病原菌生長之影響

病原菌於不光照、16~32℃的條件下，都能在PDA上生長 (Fig. 4)，當溫度由16℃上升到28℃時，生長速度加快，病原菌的最適生長溫度為24~28℃，於32℃下生長遲緩。於28℃不



Fig. 3. Symptoms of fusarial root rot of *Wasabia japonica*. Left, Natural; Right, by artificial inoculation.

照光的條件下，病原菌在pH 2~12的PDA上皆能生長(Fig. 5)，當pH由2上升到6時，生長速度加快，最適生長pH為6~12。

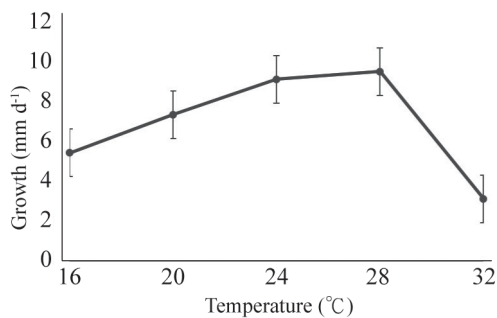


Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Nectria haematococca* on potato dextrose agar medium.

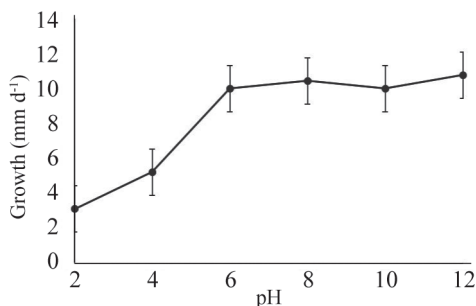


Fig. 5. Effect of pH on mycelial growth of *Nectria haematococca* on potato dextrose agar medium.

#### 五、防治藥劑的篩選

於濃度1000 ppm殺菌劑的PDA上，以腐絕及三得芬對抑制病原菌生長的效果最好(Table 4)，達100%的抑制，其次為貝芬替及免賴得，抑制率為92.8%。依得利、克枯爛及達滅芬對病原菌生長沒有明顯的抑制效果；賽座滅、滅達樂、滅芬農及腈硫醯對本病原菌的生長則有加強的效果。篩選出效果最好的腐絕、三得芬、貝芬替及免賴得再配製成10及100 ppm的PDA進行實驗(Table 5)，發現即使用10ppm，四種殺菌劑都對本病原菌有超過67%的抑制效果。

#### 六、植物萃取精油的防治篩選

於濃度1000 ppm精油PDA上，以土肉桂及檸檬香茅葉片精油對抑制病原菌生長的效果最好(Table 6)，抑制率高達100%，其次為樟樹葉

Table 4. Inhibition of mycelial growth of *Nectria haematococca* by various fungicides

Fungicide	Inhibition of mycelial growth (%)
Thiabendazole 41.8%	100
Tridemorph 84.2%	100
Benomyl 50%	92.8
Carbendazim 50%	92.8
Thiophanate-methyl 40%	78.4

con't	
Difenoconazole 24.9%	71.2
Oxine-copper 33.5%	64.9
Triflumizole 30%	63.1
Pyraclostrobin 23.6%	62.2
Penconazole 10.5%	53.2
Hymexazol 30%	45.9
Procymidone 50%	44.1
Isoprothiolane 40%	35.1
Azoxystrobin 23%	24.3
Etridiazole 25%	18.9
Flutolanil 50%	4.5
Tecloftalam 10%	1.8
Dimethomorph 50%	0
Cyazofamid 9.4%	-5.4
Metalaxyl 35%	-6.3
Metrafenone 42.37%	-10.8
Dithianon 42.2%	-11.7

Remarks: 1000 ppm of each fungicide was added to potato dextrose agar (PDA) medium for testing mycelial growth of *N. haematococca* compared to growth on PDA medium without a fungicide added.

**Table 5. Inhibition of mycelial growth of *Nectria haematococca* by various fungicides at different concentrations**

Fungicide / conc.	Inhibition of mycelial growth (%)		
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
Carbendazim 50%	68.4	74.4	92.8
Benomyl 50%	74.8	84.1	92.8
Thiabendazole 41.8%	96.9	100.0	100.0
Tridemorph 84.2%	67.1	88.3	100.0

Remarks: 10, 100, and 1000 ppm of each fungicide was added to potato dextrose agar (PDA) medium for testing mycelial growth of *N. haematococca* compared to growth on PDA medium without a fungicide added.

片，抑制率為91.6%。紅檜及二葉松葉片精油對病原菌生長沒有明顯的抑制效果；水杉葉片精油則對本病原菌的生長有加強的效果。

## 討論

*Nectria haematococca* (*F. solani*) 主要入侵作物與土面接觸的莖基部、根部及根莖部，致使組織軟化、進而壞疽腐爛，造成根基腐病徵(root/butt rot)；台灣地區有豌豆根腐病、百香果頸腐病、蒜頭乾腐病、日日春根腐病、柳橙果腐病、馬鈴薯塊根乾腐病、落花生萎凋病、硃砂根基腐病、馬拉巴栗基腐病等因 *N. haematococca* 侵害以致的作物病害報告 (Sun and Huand 1996, Fu and Chang 1999, Tsu 2002)，但於山葵上因 *N. haematococca* 侵害引致的根腐病則為首次報告，現時台灣地區山葵的病害，只有軟腐病、白銹病、露菌病、菌核病、苗立枯病、墨入病(同黑心病)、角斑病及

**Table 6. Inhibition of mycelial growth of *Nectria haematococca* by various essential oils**

Essential oil	Inhibition of mycelial growth (%)
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	100
<i>Cymbopogon citrates</i>	100
<i>Cinnamomum camphora</i> (leaves)	91.6
<i>Cinnamomum camphora</i> (fruits)	74.7
<i>Melaleuca leucadendra</i>	63.2
<i>Melaleuca alternifolia</i>	60.0
<i>Cinnamomum kanehirae</i>	53.7
<i>Cinnamomum burmannii</i>	49.5
<i>Cryptomeria japonica</i>	48.4
<i>Juniperus chinensis</i>	43.2
<i>Litsea cubeba</i>	41.1
<i>Pinus luchuensis</i>	33.7
<i>Sequoiadendron giganteum</i>	27.4
<i>Pinus morrisonicola</i>	25.3
<i>Chamaecyparis formosensis</i>	16.8
<i>Pinus taiwanensis</i>	15.8
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	-8.4

Remarks: 1000 ppm of each essential oil was added to potato dextrose agar (PDA) medium for testing mycelial growth of *N. haematococca* compared to growth on PDA medium without an essential oil added.

根瘤線蟲的記錄。

病原性測試實驗中，於前期也有使用於莖部以針刺注射孢子懸浮液及於莖部傷口接種菌絲塊的方法接種，可是處理組植株都沒有發病，與對照組無異，可見病原菌是從根部傷口入侵的；另外從實驗植株的發病過程，可以觀察到病原菌從根部侵入根莖維管束後，初期先讓根部及維管束變黑，根莖及葉柄基部開始水浸狀軟化，後期根莖腐爛，葉柄基部也軟爛以致無法支撐葉片而下垂萎凋。接種實驗在冬天進行時，所有處理組都與對照組一樣正常生長，一直到五月回暖時再重複實驗時才開始有植株出現病徵，此氣候條件亦與田間發現病害時山上夏天的條件相似，顯示病原菌可能只可在山葵因不適應回暖溫度而弱化的狀態下才能入侵感染。實驗中一年生的山葵植株之根莖於接種11~16天就會根莖腐爛，可見此病害發展快速，而且綜合實驗及田間之觀察，每當發現葉片萎凋的植株大多都已經是發病後期、難以治療，因此建議以預防為主。

## 結論

本研究於桃園市復興區首次發現山葵根腐病徵，經組織分離、形態鑑定及分子鑑定，鑑定病原菌可能為 *N. haematococca*，將純培養的病原菌菌落以均質機做成菌泥浸泡根部接種，可產生與自然界相同的病徵，發病率為55.6%，而自人工接種的發病株上亦可以分離出與接種相同的病原菌，完成柯霍氏法則。

本實驗以含殺菌劑及植物萃取精油的PDA，初步篩選出殺菌劑腐絕、三得芬、貝芬替、免賴得及土肉桂葉片、檸檬香茅葉片及樟葉的精油，對病原菌菌絲生長有良好的抑制效果，後續需要再進行田間試驗，以測試各殺菌劑及精油的於田間實際防治效果。

## 謝誌

本實驗承蒙行政院國家科學委員會計畫(104農科-13.3.3-森-G2)補助經費，以及第一分

道山葵店有限公司及樂鴻農業有限公司提供山葵植株作接種試驗，謹此致謝。

## 引用文獻

- Castresana J. 2000.** Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540-52.
- Chou TK. 1986.** Illustration in color of common diseases of vegetables. Taipei, Taiwan: Shu Hsin Press. 222 p.
- Chou TK. 1987.** Vegetables. Taipei, Taiwan: Shu Hsin Press. 217 p.
- Fu CH, Chang TT. 1999.** Foot rot of *Ardisia crenata* caused by *Fusarium solani*. *Taiwan J For Sci* 14(2):223-7. [in Chinese].
- Ho HH. 1975.** A selective medium for the isolation of *Saprolegnia* spp. from freshwater. *Can J Microbiol* 21(7):1126-8.
- Hsueh TH. 2000.** The encyclopedia of vegetables and fruits in Taiwan (Vol. 2). Chang Hua, Taiwan: Hsueh Press. 160 p.
- Hu MF, Chiu SM, Lo CT, Liu SY, Tu CC. 1991.** Development of wasabi variety. Tainung no. 1. *Jour Agric Res China*. 40(1):13-27. [in Chinese].
- Huang H, Hung L. 1988.** Description and illustration in color of vegetables in Taiwan. Taipei, Taiwan: Harvest Farm Magazine. 210 p.
- Hung TH, Wu ML, Su HJ. 1999.** Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. *J Pathol* 147:599-607.
- Katoh K, Standley DM. 2013.** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772-80.
- Liang NN. 1983.** Growing of stem-vegetables. Taipei, Taiwan: Harvest Farm Magazine. Taipei. 204 p.
- Lo CT, Wang KM. 2000.** Survey of fungal

diseases on aboveground parts of wasabi in Taiwan. *Plant Pathol Bull* 9:17-22. [in Chinese].

**Lo CT, Wang KM, Hu MF, Wang CH. 2002.** Integrated control of black rot disease of wasabi, caused by *Phoma wasabiae*. *Bot Bull Acad Sin* 43:219-25.

**Meng Y. 1990.** Treasure of Alisan: spicy wasabi sauce. *Country Road Mag. Harvest Farm Mag.* 16:10-1. [in Chinese]

**Oda F, Takimoto K. 1949.** Pest and disease of vegetables. Practical agronomy book. Tokyo: Meibundo Planner. 312 p.

**Rambaut A. 2014.** FigTree v1.4. Edinburgh: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.

**Sun SK, Huang CW. 1996.** Plant fusarium diseases in Taiwan. Taichung, Taipei: Shih Wei Press. 170 p.

**Suzuki H. 1976.** Control of disease of wasabi. *Plant Prot Bull* 30(9):34-8.

**Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-9.

**Tsu ST. 2002.** List of plant diseases in Taiwan. Taiwan: The Plant Protection Society of the Republic of China. [in Chinese].

**White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press. 315-22 p.

**Wu CC. 1992.** Vegetables of Taiwan (Vol. 1). Illustration series of the nature of Taiwan (Vol. 10). Taipei, Taiwan: Vacation Press. 176 p.

**Yen LT. 1962.** Vegetables (Vol. 1). University series. Taipei, Taiwan: The Commercial Press. 642 p.

