

小花蕙蘭細斑病菌 *Fusarium proliferatum* 之 生長與寄主侵染特性

黃巧雯^{1,*} 黃晉興² 謝廷芳³

摘要

黃巧雯、黃晉興、謝廷芳。2022。小花蕙蘭細斑病菌 *Fusarium proliferatum* 之生長與寄主侵染特性。台灣農業研究 71(1):35–47。

細斑病 (fleck spot) 為小花蕙蘭栽培過程中重要葉部病害之一，主要危害幼葉，在幼葉上產生細小黑褐色圓形或不規則形病斑，有時病斑周圍產生淡黃色暈環，雖然葉片被病原菌感染後其病斑不會繼續擴大，但葉片具有斑點不美觀而影響植株的商品價值，偶而會造成葉片基部腐敗而死亡。由病組織所分離到真菌，依據形態特徵及核糖體內轉錄區間與 translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1α*) 基因的核酸序列比對鑑定為 *Fusarium proliferatum*，並完成柯霍氏法則證明本菌對小花蕙蘭具有病原性。本病原菌最適菌絲生長與孢子發芽溫度分別為 24–28°C 與 20–32°C。小花蕙蘭葉細斑病菌分離株 (*F. proliferatum* Fp-172) 可在四季蘭、報歲蘭及春蘭等品種嫩葉上造成細小黑褐色斑點，但在成熟葉片上則不造成病斑。另將此菌株的孢子懸浮液 (10^6 spores mL⁻¹) 噴施接種於四季蘭不同齡期幼芽葉片上，經 28 d 後，苗齡 0.5、1.0、1.5、2.5、3.5 及 4.5 mo 的幼芽罹病度分別為 58.3–59.3%、52.8–62.5%、29.2–49.3%、13.9–25.9%、2.8–14.6% 及 0%，成熟葉片則無病斑產生。由細斑病菌易於感染 1.5 mo 內齡期幼芽的結果，可作為未來擬定葉細斑病防治時程之參考依據。

關鍵詞：小花蕙蘭、細斑病、細斑病菌。

前言

小花蕙蘭俗稱國蘭 (Chinese cymbidium)，是由蕙蘭屬 (Genus *Cymbidium*) 的四季蘭 (或稱建蘭) (*C. ensifolium*)、報歲蘭 (*C. sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*)、寒蘭 (*C. kanran*) 及九華蘭 (*C. faberi*) 等植物所組合成複合族群的統稱，其原生地分布在中國、台灣、韓國及日本等地區，又稱東洋蘭；這類植株株型、花型較小，與大花型的虎頭蘭或稱大花蕙蘭具區別性，又稱為小花蕙蘭 (oriental cymbidium)，其繁殖各自以組培苗及分株為主 (Hung *et al.* 2017)。台灣小花蕙蘭多以外銷為主，70–80% 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、南投、雲林、嘉義、高雄及屏東等中南部為主，多數以雙層遮陰網室栽培，其中栽培品種依序為四季蘭 (53%)、報歲蘭 (36%)、春蘭 (6%) 及其他小花蕙蘭 (5%) 等 (Hung *et al.* 2010; Lin 2015)。

小花蕙蘭為地生蘭，主要由葉片 (leaf)、假球莖 (pseudobulb)、鞘葉 (sheath leaf) 及肥大的根 (root) 組成，慣行栽培以分芽繁殖為主 (Du Puy & Cribb 2007; Hsu 2010)。小花蕙蘭生育緩慢且幼年性長，假球莖的側芽長出新芽，發育成叢生狀的植株。由田間觀察發現，嫩葉外觀上淺綠色、葉質柔軟又光滑細緻，逐

投稿日期：2021 年 8 月 11 日；接受日期：2021 年 10 月 15 日。

* 通訊作者：cwhuang@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

漸長大成成熟葉時其外觀上轉深綠色、葉質硬厚且葉面較粗糙。四季蘭從新芽萌發至發育成熟約 5–6 mo；報歲蘭新芽萌發至成熟需約 8 mo (Hung *et al.* 2010)。於栽培農友術語中小花蕙蘭之不同齡期芽 (shoot age)，以植株成熟葉片 (10 分) 之相對應長度比例區分為幾分芽幼葉齡期，此時期與本研究觀察四季蘭剛冒新芽時期約為新芽生長 2 wk 時間；當新芽生長 1 mo 時間相對於 1–2 分芽幼葉齡期；新芽生長到 1.5 mo 時間相對於 2–3 分芽；當新芽生長長度到成熟植株一半時為 5 分芽，需 2.5 mo 時間；當新芽生長到 8 分芽時需 3.5 mo 時間；當新芽生長成成熟葉時則需要 4–5 mo 時間。四季蘭一年可完成 1–2 個生長週期。

台灣迄今正式記載之小花蕙蘭主要病害有由 *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) 引起的蕙蘭嵌紋病、由 *Odontoglossum rigspot virus* (ORSV) 引起的齒舌蘭輪斑病；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*、*P. 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、由 *Fusarium oxysporum* 引起的基腐病或假球莖腐敗病及由 *F. proliferatum* 引起的小花蕙蘭葉細斑病；另外亦有葉芽線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*, *A. bicaudatus*)、根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*)、南方根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 引起的線蟲病害 (Hsu *et al.* 2002; Chen *et al.* 2015; Wang *et al.* 2018; Huang *et al.* 2020)。其中由 *F. proliferatum* 引起的葉細斑病 (fleck spot, leaf spot)，在台灣不僅危害蕙蘭、文心蘭、石斛蘭及嘉德麗雅蘭，亦為百合苗枯病 (Wu & Huang 1997) 及孤挺花赤斑病 (Su *et al.* 2011) 主要病原菌；而國外則會造成圓錐石頭花冠腐病 (crown rot of gypsophila) (Lee *et al.* 2011)、紫苜蓿根腐病 (root rot of alfalfa) (Cong *et al.* 2016)、萱草花腐病 (flower rot of daylily) (Li *et al.* 2018) 及糖松根腐病 (*Fusarium* root of sugar pine) (Stewart *et al.* 2016) 等。

本病主要危害初生芽之葉片，初期在葉背上產生細小黑褐色圓形或不規則形病斑，有時病斑周圍產生淡黃色暈環，不久後病斑逐漸呈現褐化壞疽，病斑不再繼續擴大，有時嚴重時導致幼芽褐化枯萎死亡，而小花蕙蘭是以芽計價，若新芽、幼葉無法健康生長，則嚴重影響植株的商品價值。目前雖已知 *F. proliferatum* 為引起小花蕙蘭葉細斑病之主要病原菌，然其在田間之發生生態仍未明，另外，觀察園區葉細斑病發生情形，發現病徵容易出現在幼芽葉片上，隨著幼芽越成熟其病徵越不易表現，為釐清小花蕙蘭葉細斑病病原特性與發生生態，本研究進行病原菌形態觀察、生理特性及病原性分析外，另探討 *F. proliferatum* 感染小花蕙蘭之不同齡期葉片之難易度，作為未來防治葉細斑病之參考依據。

材料與方法

病原菌分離與保存

將田間罹患細斑病病徵之罹病葉片攜回實驗室，直接切取罹病葉片，以 0.5% (w/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 4–5 d，其分離所得之菌株置於 potato dextrose agar (PDA; Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 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，並置於 10℃ 保存備用。本研究使用之 Fp-165 及 Fp-172 菌株為分別由南投縣魚池鄉及雲林縣莿桐鄉小花蕙蘭罹病葉片上所分離之菌株。

接種源配製

將由小花蕙蘭葉細斑病組織分離之 *F. proliferatum* Fp-172 分離株培養於 PDA 斜面，置於 25℃ 黑暗培養約 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, Pomona, CA, USA) 計算孢子濃度，再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^6 spores mL⁻¹) 供接種試驗用。

病原菌形態觀察與分子鑑定

將所純化之病原菌菌株 Fp-165 與 Fp-172 培養於 PDA 培養基上，置於 24℃ 黑暗培養約 7 d 後觀察菌落形態；後再將本病原菌置於 PDA 持續培養約 7 d 待其產孢，以滅菌之針頭挑取培養基上產孢之分生孢子，置於載玻片上，以光學顯微鏡 (Leica DM2500, Leica, Wetzlar, Germany) 觀察孢子形態與分生孢子梗構造，並以 NIS-Elements 4.51 版軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 測量 50 個以上分生孢子大小。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 Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 5 min 並吸取上清液，與 9 倍體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 混合，直接吸取混合後之溶液，以 Taq DNA Poly (Protech, Taipei, Taiwan) 聚合酶醣素進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應，分別增幅 internal transcribed spacer (ITS) (White *et al.* 1989) 與 translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1α*) 基因片段 (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，定序後之序列再於 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。

小花蕙蘭葉細斑病菌之病原性測定

購買市售小花蕙蘭之報歲蘭、「富山」四季蘭、「彩虹」四季蘭及「鐵骨素心」四季蘭等品種植株。將 *F. proliferatum* Fp-172 菌株濃度為 10^6 spores mL⁻¹ 孢子懸浮液以噴霧瓶均勻噴霧於小花蕙蘭新芽部位 (約 1 mo 內，1–2 分芽)，每株約 2 mL，隨即以塑膠袋套袋進行保濕 (一直保濕到試驗結束)，並置於 28℃ 定溫箱中，持續觀察葉片上病徵進展及植株是否有基部褐化、植株枯死之情形。發病後，再由罹病組織依上述組織分離法分離病原菌，以完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)。

溫度對病原菌菌絲生長與孢子發芽之影響

將 *F. proliferatum* Fp-165 及 Fp-172 菌株分別於 PDA 培養基室溫培養 7 d 後，以直徑 0.5 cm 滅菌過之打孔器切取菌絲邊緣，置於 PDA 平板中央，分別置於 4℃、8℃、12℃、16℃、20℃、24℃、28℃、32℃、36℃ 及 40℃ 之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 8 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，*F. proliferatum* 之 Fp-165 及 Fp-172 菌株皆培養於 PDA 培養約 8 d 待其產孢後，以無菌水配製約 200 spores 20 μL⁻¹ 之孢子懸浮液，置於八孔載玻片上，並將玻片保濕於玻璃培養皿中，分別靜置於 4℃、8℃、12℃、16℃、20℃、24℃、28℃、32℃、36℃ 及 40℃ 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。

不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性

供試小花蕙蘭品種計有報歲蘭 (*Cymbidium sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*)、「富山」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Fu-shan')、「市長紅」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Shih-jhang-hong')、「彩虹」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tsai-hong') 及「鐵骨素心」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tie-gu-su-sin') 等 6 種不同小花蕙蘭品種品系。接種方式仿上述病原性測定模式，將 *F. proliferatum* Fp-172 菌株孢子懸浮液直接均勻噴霧於植株新芽部位 (約 1 mo 內，1–2 分芽)，隨即以塑膠袋套袋進行保濕，並置於 28℃ 定溫箱中，以無菌水作為對照組，每種蘭花品種處理 3 重複，每重複 4 株，每週觀察病徵進展情形，本試驗觀察至 28 d 止，本試驗重複進行 2 次。病害調查係計算小花蕙蘭植株葉片 (由內而外) 上病斑數，並將其分成 5 級，其中無病斑者為 0 級，葉片上病斑數在 1–10 個病斑為 1 級，11–25 個病斑為 2 級，26–50 個病斑為 3 級，51 個以上或基部褐化枯萎死亡現象為 4 級，再以下列公式求得葉片的罹病度 (disease severity)：罹病度 (%) = $[\Sigma(\text{指數} \times \text{該等級罹病葉數}) / (4 \times \text{總調查葉數})] \times 100$ 。

四季蘭「彩虹」之不同齡期葉片對細斑病之感病性

將由小花蕙蘭葉細斑病病組織分離之 *F. proliferatum* 菌株 Fp-172 分離株培養於 PDA 培養基上，1 wk 後以無菌水將 PDA 上所產生之分生孢子洗下，並製成孢子懸浮液 (10^6 spores mL⁻¹) 供試驗葉片接種用。購買自南投縣魚池鄉黃先生園區內之「彩虹」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tsai hong') 植株，本試驗選取 2 wk (剛冒新芽)、1 mo (1–2 分芽)、1.5 mo (2–3 分芽)、2.5 mo (5 分芽)、3.5 mo (8 分芽) 及 4–5 mo (成熟葉, mature) 等 6 種不同齡期葉片後，將 Fp-172 分離株孢子懸浮液直接均勻噴佈於葉片上，每株噴施約 2–4 mL，接種後植株隨即以塑膠袋進行套袋保濕，並置於 28°C 光照 12 h 定溫箱中，記錄每株植株病害發生情形，觀察至 28 d 止，對照組則以無菌水進行接種，每種處理 3 重複，每重複 4 株，試驗觀察 28 d，本試驗重複進行 2 次。依上述所示方法調查罹病度。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 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

小花蕙蘭葉細斑病之病徵

本研究於種植四季蘭之「市長紅」、「彩虹」、「富山」、「鐵骨素心」品系及報歲蘭品種之小花蕙蘭園區陸續調查到葉細斑病發生，細斑病主要危害初生芽之葉片，在嫩葉上產生直徑約 2.3–8.7 mm 之細小圓形或不規則形黑褐色病斑，病斑周圍產生淡黃色暈環，葉片被病原菌感染後其病斑不再繼續擴大 (圖 1)。

小花蕙蘭葉細斑病菌之培養形態與分子鑑定

小花蕙蘭葉細斑病菌經單孢培養於 PDA

平板於 25°C 黑暗培養 7 d 後，菌落為白色略帶淡淡紫色、菌絲綿密生長 (圖 2A)，利用滅菌後之針頭沾取菌落後，透過光學顯微鏡可觀察到分生孢子形態如圖 2B–E 所示，大孢子 (macroconidia) 為鐮刀形，無色，1–3 個隔膜，著生於分生孢子梗 (conidiophores) 之瓶狀枝上，大孢子大小為 $17.9\text{--}41.0\text{ }\mu\text{m} \times 3.8\text{--}2.1\text{ }\mu\text{m}$ ；小孢子 (microconidia) 呈棍棒狀，一端扁平，無色，著生於分生孢子梗之瓶狀枝上，排列方式有假頭狀 (false heads) 或串生孢子鏈 (chains)，小孢子大小為 $5.8\text{--}11.6\text{ }\mu\text{m} \times 1.9\text{--}3.6\text{ }\mu\text{m}$ ；無厚膜孢子 (chlamydospores) 產生。為進一步進行菌株種的鑑定，將 Fp-165 及 Fp-172 分離株之 ITS (accession No. 分別為 MG871252 及 MG871253) 序列及 *EF-1a* 基因部分序列 (accession No. 分別為 MH153751 及 MH153750)，與 NCBI 基因資料庫進行分析比對，結果供試菌株與 RS_79 isolate、Y. H. Yeh 10911 strain 之 ITS (MK332493 與 MK336501) 與 WG 8406 B2C3、GuangD7 strain 之 *EF-1a* (MH383509 與 KY85020) 之序列相似度高達 100%。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果，證明由葉細斑病罹病組織所分離之病原菌為 *F. proliferatum* (Leslie *et al.* 2006; Wang *et al.* 2018)。

小花蕙蘭葉細斑病之病原性測定

為進一步瞭解 *F. proliferatum* 於不同小花蕙蘭品種上之病原性，本研究將 Fp-172 分離株之孢子懸浮液直接噴佈於報歲蘭、「富山」四季蘭及「彩虹」四季蘭之嫩葉上，於接種 10 d 後，報歲蘭嫩葉開始出現黑褐色斑點病斑，隨著接種天數增加，葉片上黑褐色斑點數隨之增加，於接種 30 d 後不僅有黑褐色斑點，且葉尖出現褐化枯萎現象 (圖 3A)。而當接種於「富山」四季蘭與「彩虹」四季蘭嫩葉上，則於接種 7 d 後開始出現黑褐色細小病斑，於接種 14 d 後葉片上黑褐色病斑更為明顯 (圖 3B–C)；另外，於接種 28 d 後，在「彩虹」四季蘭葉片上不僅有黑褐色斑點病徵，且葉片地基部黑褐化枯萎、葉片褐化後易抽起 (圖 3D)，之後再進行罹病組織分離，結果顯示所得菌株與接種病

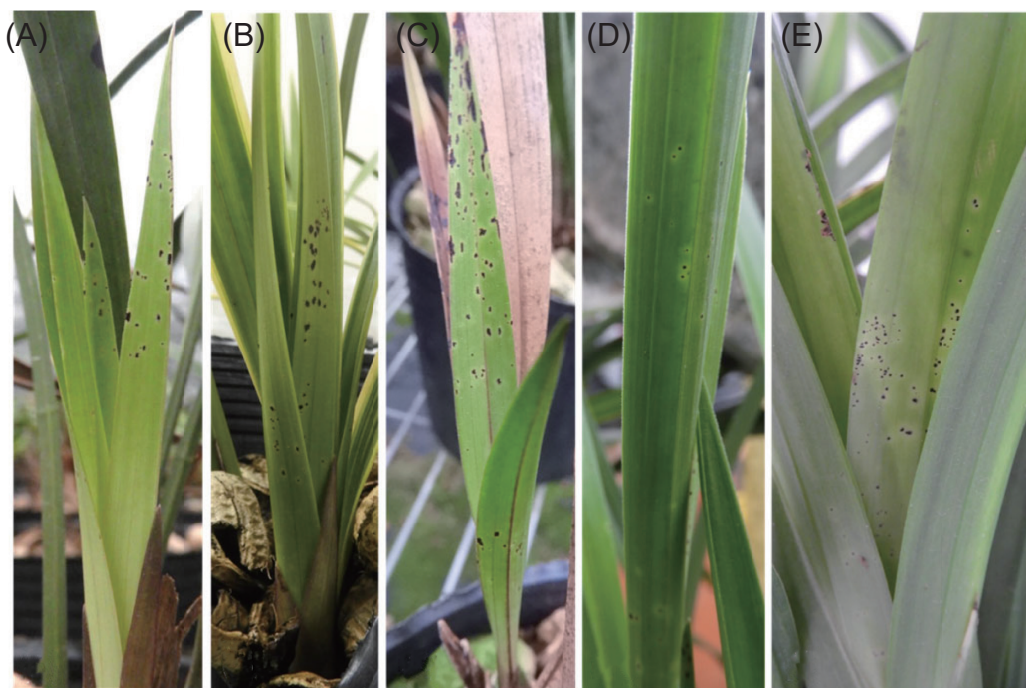


圖 1. 小花蕙蘭細斑病在葉片上病徵。(A)「市長紅」四季蘭；(B)「彩虹」四季蘭；(C)「富山」四季蘭；(D)「鐵骨素心」四季蘭；(E) 報歲蘭。

Fig. 1. Fleck spot symptoms of oriental cymbidium. Small spots with yellowish halo appeared on leaves of (A) *Cymbidium ensifolium* 'Shih-jhang-hong' cultivar; (B) *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar; (C) *C. ensifolium* 'Fu-shan' cultivar; (D) *C. ensifolium* 'Tieh-gu-su-sin' cultivar; and (E) *C. sinense*.

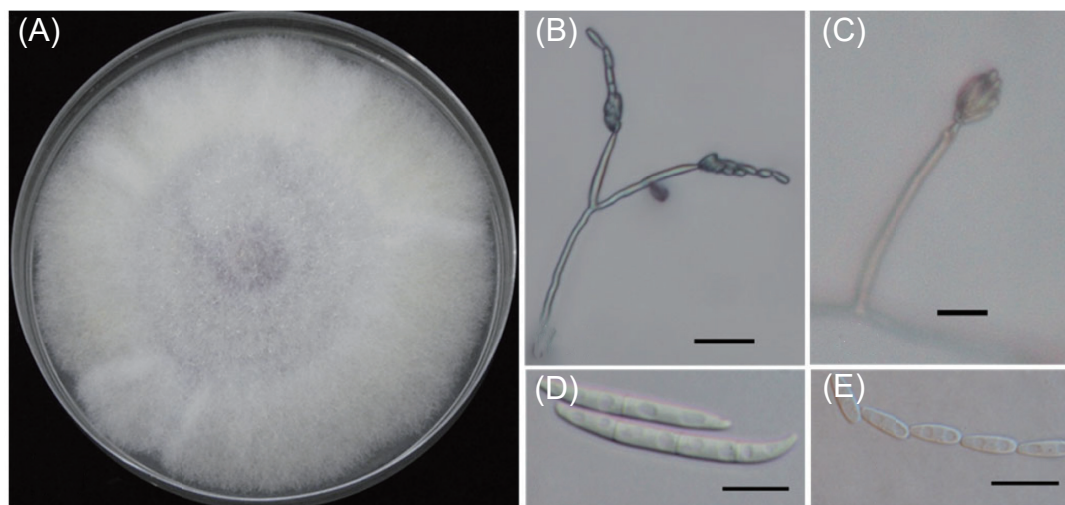


圖 2. 小花蕙蘭葉細斑病菌之形態特徵。(A) 小花蕙蘭葉細斑病菌於 PDA 培養基上於 25°C 培養 7 d 後的菌落形態；(B) 小孢子呈鏈狀排列；(C) 小孢子呈假頭狀排列；(D) 大孢子；(E) 小孢子。標尺 = 10 μm。

Fig. 2. Morphology of *Fusarium proliferatum*. (A) colony pattern of *F. proliferatum* cultured on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 7 d; (B) microconidia produced in short chains; (C) microconidia produced in false heads; (D) morphology of macroconidia; and (E) microconidia. Bar = 10 μm.

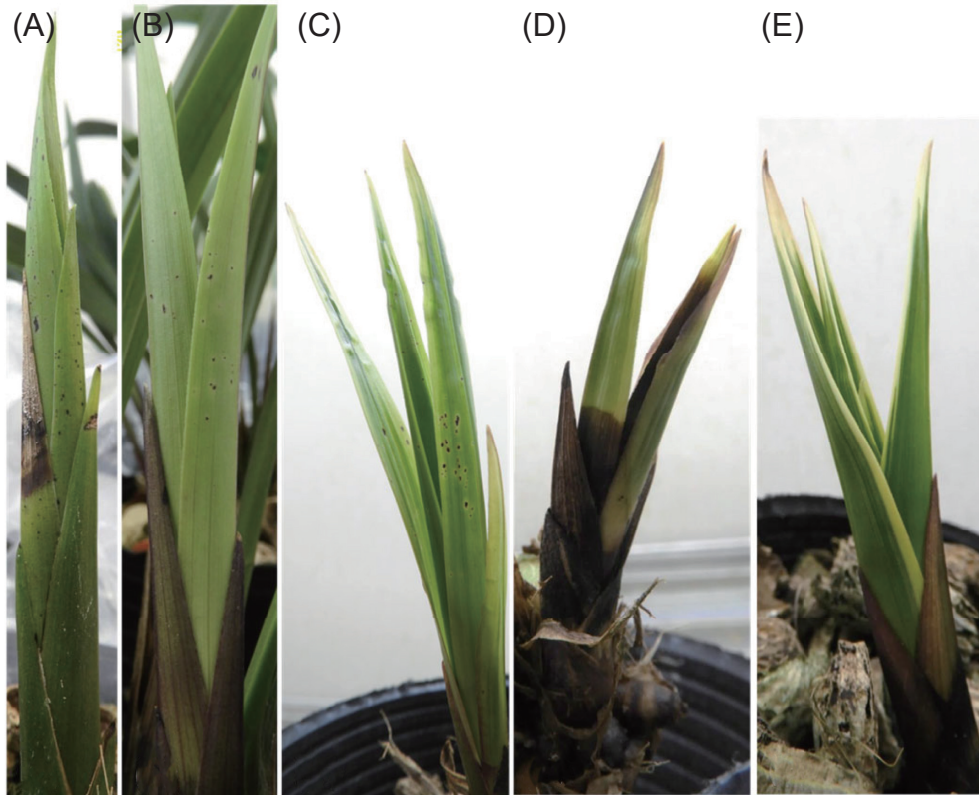


圖 3. 小花蕙蘭葉細斑病病原菌 (*Fusarium proliferatum* Fp-172) 分別接種於 (A) 報歲蘭；(B) 「富山」四季蘭；(C、D) 「彩虹」四季蘭葉片上之病徵表現，以 (E) 無菌水接種於「彩虹」四季蘭為對照組。

Fig. 3. Symptoms of fleck spot disease of oriental cymbidium appeared on leaves after artificial inoculation with conidial suspension of *Fusarium proliferatum* Fp-172. (A) Fleck spot on leaves of *Cymbidium sinense*; (B) *C. ensifolium* 'Fu-shan' cultivar; (C) *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar; (D) basal leaves brown rot on *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar; and (E) healthy leaves of *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar without artificial inoculation.

原菌菌株，其形態特徵皆相同，完成柯霍氏法則，證實 *F. proliferatum* 對報歲蘭與四季蘭具有病原性。

溫度對病原菌菌絲生長與孢子發芽之影響

小花蕙蘭葉細斑病菌菌絲塊培養於不同溫度之培養箱中，其生長結果如圖 4 所示，於 24℃ 培養時，病原之生長最為快速，於培養後 8 d 時 Fp-165 及 Fp-172 之平均生長直徑分別為 8.4 cm 與 8.2 cm；於 28℃ 培養時其平均生長直徑為 7.9 cm，而於 20℃ 及 32℃ 培養時其平均生長直徑皆約為 5.5 cm，於 16℃ 培養時其平均生長直徑約為 4.3 cm，於 12℃ 培養時其平均生長直徑約為 3.1 cm，於 8℃ 培養時其平均

生長直徑則僅有 1.0 cm，而 4℃ 及 40℃ 培養時病原菌幾乎不生長。另外，溫度對本菌孢子發芽之影響結果則如圖 5 所示，Fp-165 菌株而言，其於 24–32℃ 時，發芽率可達 91% 以上，為最適孢子發芽之溫度。Fp-172 菌株，則以 24–28℃ 為最適發芽溫度，其發芽率可達 96% 以上，兩菌株在 8℃ 以下及 40℃ 時，孢子完全不發芽。

不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性

選取報歲蘭 (*C. sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*)、「富山」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Fu-shan')、「市長紅」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Shih-jhang-hong')、「彩虹」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tsai-hong') 及「鐵骨素心」四季蘭 (*C. ensifo-*

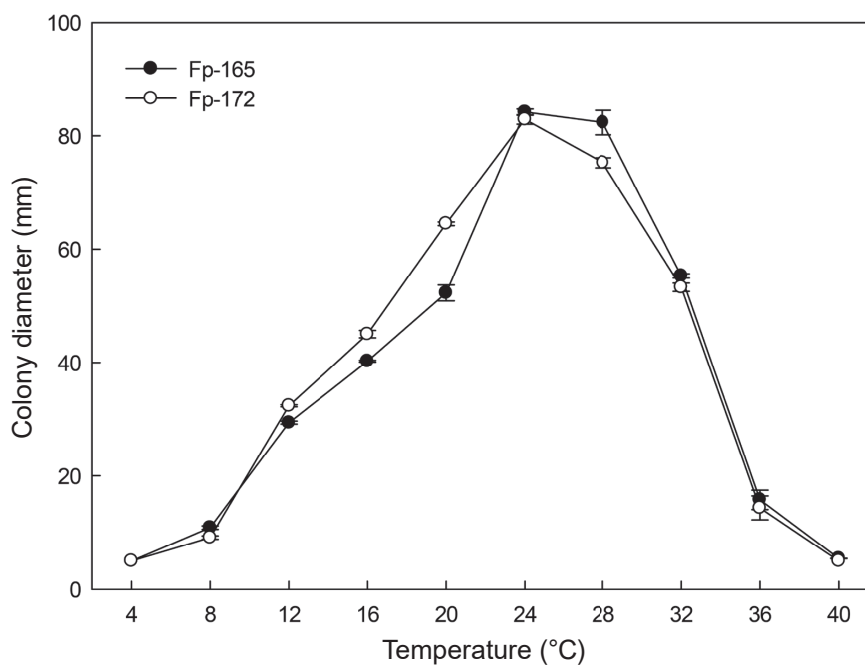


圖 4. 溫度對 *Fusarium proliferatum* Fp-165 及 Fp-172 分離株菌絲生長之影響 (在 PDA 平板培養 8 d)。

Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Fusarium proliferatum* Fp-165 and Fp-172 isolates cultured on potato dextrose agar (PDA) plates for 8 days.

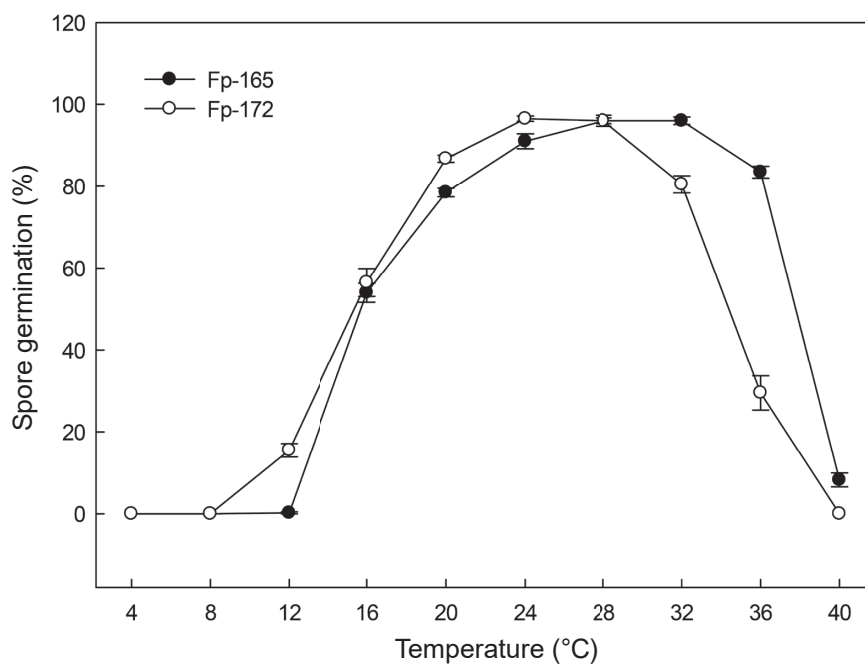


圖 5. 溫度對 *Fusarium proliferatum* Fp-165 及 Fp-172 分離株孢子發芽之影響。

Fig. 5. Effect of temperature on spore germination of *Fusarium proliferatum* Fp-165 and Fp-172 isolates.

lium ‘Tie-gu-su-sin’) 等 6 種不同小花蕙蘭品種，分別接種 *F. proliferatum* Fp-172 菌株孢子懸浮液於植株新芽部位 (約 1 mo 內，1–2 分芽)，於接種 12 wk 後，結果如表 1 所示，第 1 次試驗中，以「富山」四季蘭之罹病度為 72.9% 最高，其次為「彩虹」四季蘭、「鐵骨素心」四季蘭、「市長紅」四季蘭，罹病度分別為 70.0%、61.1%、60.0%，罹病度最低則為春蘭 9.4%；第 2 次試驗中，仍是以「富山」四季蘭之罹病度為 66.1% 最高，其次為「市長紅」四季蘭、「鐵骨素心」四季蘭、「彩虹」四季蘭，罹病度分別為 62.1%、47.2%、44.5%，罹病度最低則仍為春蘭 8.4%，與對照未處理間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。此外，在病害調查時發現成熟株 (苗齡超過 1 年) 的葉片雖有接種供試菌的分生孢子，但皆未出現任何細斑病的病徵。

四季蘭「彩虹」之不同齡期葉片對細斑病之感病性

由不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性試驗結果得知，「彩虹」四季蘭品種之罹病度高，且為目前主要栽種品種之一，因此本研究挑選「彩虹」四季蘭品種 (*C. ensifolium* ‘Tsai-hong’) 為試驗材料，幼葉齡期 (新芽齡期) 分為 2 wk (剛冒新芽)、1 mo (1–2 分芽)、1.5 mo

(2–3 分芽)、2.5 mo (5 分芽)、3.5 mo (8 分芽) 及 4.5 mo (成熟葉，mature) 共 6 種程度齡期葉片，分別接種 *F. proliferatum* Fp-172 菌株孢子懸浮液，於接種 4 wk 後，結果如表 2 所示，由第 1 次及第 2 次試驗結果中，幼葉從剛

表 2. 「彩虹」四季蘭之不同齡期葉片對細斑病之感病性。

Table 2. Effect of shoot age on susceptibility of fleck spot disease of *Cymbidium ensifolium* ‘Tsai-hong’ inoculated with *Fusarium proliferatum* Fp-172 isolate for 4 wk.

Shoot age (months)	Disease severity (%) ^z	
	Experiment 1	Experiment 2
0.5	58.3 a ^y	59.3 a
1.0	52.8 a	62.5 a
1.5	49.3 a	29.2 b
2.5	13.9 b	25.9 b
3.5	2.8 b	14.6 bc
4.5	0.0 b	0.0 c
LSD	28.1	15.0

^z The disease severity was recorded using a 0–4 rating index as follows: 0 = no symptoms, 1 = fleck spot number 1–10, 2 = fleck spot number 11–25, 3 = fleck spot number 26–50, and 4 = > 51 of fleck spot number or necrotic to death of basal leaves. Disease severity (%) = $[(N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4) / (N \times 4)] \times 100$.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 1. 不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性。

Table 1. Susceptibility of fleck spot disease of different oriental cymbidium cultivars inoculated with *Fusarium proliferatum* Fp-172 isolate for 4 wk.

Cultivation	Disease severity (%) ^z	
	Experiment 1	Experiment 2
<i>Cymbidium sinense</i>	37.5 b ^y	33.3 c
<i>C. goeringii</i>	9.4 c	8.4 d
<i>C. ensifolium</i> ‘Fu-shan’	72.9 a	66.1 a
<i>C. ensifolium</i> ‘Shih-jhang-hong’	60.0 ab	62.1 a
<i>C. ensifolium</i> ‘Tsai-hong’	70.0 a	44.5 b
<i>C. ensifolium</i> ‘Tie-gu-su-sin’	61.1 a	47.2 b
CK	0.0 c	0.0 e
LSD	23.5	7.9

^z The disease severity was recorded using a 0–4 rating index as follows: 0 = no symptoms, 1 = fleck spot number 1–10, 2 = fleck spot number 11–25, 3 = fleck spot number 26–50, and 4 = > 51 of fleck spot number or necrotic to death of basal leaves. Disease severity (%) = $[(N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4) / (N \times 4)] \times 100$.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

冒新芽 2 wk 至 1 mo (1–2 分芽) 齡期其細斑病罹病度高達 52% 以上，其次為 1.5 mo (2–3 分芽) 齡期其細斑病罹病度分別為 49.3% 及 29.2%；當幼葉生長到 2.5 mo (5 分芽) 齡期則分別為 13.9% 及 25.9%；當幼葉到 3.5 mo (8 分芽) 齡期其細斑病罹病度降至 15% 以下，當幼葉轉成成熟葉片 (4–5 mo) 則細斑病皆不發生。

討論

小花蕙蘭俗稱國蘭，為蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 蘭科植物，是台灣主要經濟栽種的蘭花之一。台灣小花蕙蘭是以外銷為主的產業，每年外銷產值約 1 千萬美元，其中植株是以芽計價。本研究由田間病害調查得知，細斑病為小花蕙蘭於幼葉時期重要病害之一，在嫩葉上產生細小黑褐色圓形或不規則形病斑，病斑周圍有淡黃色暈環，有時會在葉片基部產生黑褐化大型病斑，甚或造成芽體枯萎現象，嚴重影響植株的商品價值。本試驗由葉細斑病病斑進行組織分離純化後，經培養特性、核酸序列比對及柯霍式法則確定引起小花蕙蘭葉細斑病之病原為 *F. proliferatum*。在美國、日本、澳洲、德國及韓國皆曾報導，*F. proliferatum* 為蘭花病原菌之一，不僅危害蕙蘭 (*Cymbidium*)，亦對齒舌蘭 (*Odontioda*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、文心蘭 (*Oncidium*) 及嘉得麗雅蘭 (*Cattleya*) 等造成黑褐色、黃色葉部病斑；在蕙蘭 (*Cymbidium*)、石斛蘭 (*Dendrobium*) 及蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 造成莖部與根部腐爛 (Chang *et al.* 1998; Ichikawa & Aoki 2000; Latiffah *et al.* 2009; Zakaria *et al.* 2009; Swett & Uchida 2015; Srivastava *et al.* 2018; Wang *et al.* 2018)。在鐮孢菌屬 (*Fusarium*) 中，引起蕙蘭 (*Cymbidium*) 葉片產生病斑 (leaf spot) 之病原除了 *F. proliferatum* 外，還包含 *F. fractiflexum* 與 *F. subglutinans*，其中 *F. fractiflexum* 感染葉片產生黃色病斑；而 *F. subglutinans* 則初期產生細小黃斑，漸漸地轉變成黑褐色至黑色病斑、病斑外圍具黃暈，逐漸擴大呈黑褐色凹陷病斑，病斑邊緣微凸起狀，後期老舊病斑中

央呈空心狀，最後使葉片變形而失去商品價值 (Broadhurst 1996; Ichikawa & Aoki 2000; Aoki *et al.* 2001; Ichikawa 2004; Han *et al.* 2015; Ruan *et al.* 2021)，與本研究由 *F. proliferatum* 引起葉片黑褐色斑點病徵有差異，然而 *F. fractiflexum* 與 *F. subglutinans* 目前在台灣無任何紀錄可引起蘭科作物病害 (Wang *et al.* 2018)，這部分仍有待未來進一步釐清。

鐮孢菌屬 (Genus *Fusarium*) 為一大群的菌絲狀真菌，歸屬於叢赤殼科 (Family *Nectriaceae*)，廣泛分布於果園、苗圃、溫室及田間，可在任何土壤中殘存好幾年。鐮孢菌屬 (*Fusarium* sp.) 在自然界扮演多重角色，有些菌株以腐生性 (saprophytes) 方式殘存於土壤中，有些菌株以內寄生 (endophytic) 方式存於植物體內，有些則是以致病性 (pathogenic) 方式感染植株任何部位，產生頸腐 (crown)、根腐 (root rot)、莖腐 (stalk rot)、葉斑 (leaf spot)、葉片枯萎 (leaf blight)、葉片腐爛 (leaf rot)、幼鞘腐爛 (sheath rot) 及維管束萎凋 (vascular wilt) 等病徵表現，其中具病原性鐮孢菌 (*Fusarium* spp.) 是栽培高經濟蘭花主要限制因子之一 (Srivastava *et al.* 2018)。對蘭花具病原性鐮孢病菌包含 *F. proliferatum*、*F. oxysporum*、*F. solani*、*F. subglutinans*、*F. fractiflexum* 及 *F. circinatum* 等 (Latiffah *et al.* 2009; Srivastava *et al.* 2018; Wang *et al.* 2018)，其中以 *F. proliferatum* 為台灣小花蕙蘭葉部病害主要病原菌之一。本研究測試溫度對 *F. proliferatum* 分離株菌絲生長與孢子發芽的影響，結果發現 24–28°C 為本菌菌絲生長最適溫度，20–32°C 為本菌孢子發芽最適溫度，顯示本菌適應溫度範圍廣，台灣的亞熱帶氣候條件下有利本病原菌之發芽與侵染。

於 Fp-172 菌株病原性測試結果，指出該菌株對報歲蘭 (*C. sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*) 及四季蘭 (*C. ensifolium*) (「富山」、「市長紅」、「彩虹」及「鐵骨素心」) 均具有病原性，以罹病度來看，對四季蘭的病原性較強，且由試驗結果顯示，*F. proliferatum* 對小花蕙蘭目前主力品種四季蘭與報歲蘭皆具有威脅性，應注意防治。另外，從文獻得知，鐮孢菌屬 (Ge-

nus *Fusarium*) 易危害種苗及幼嫩芽部位，當幼嫩植株被鐮孢病菌侵入感染後，不利於植株生長，有時甚至出現死亡，造成植株嚴重損失 (Srivastava *et al.* 2018)。從台灣田間病害發生情形觀察，初步得知 *F. proliferatum* 引起的細斑病主要好發於新芽、嫩葉時期，與國外有類似現象；又小花蕙蘭幼葉生長健康與否，與植株商品價值直接相關，因此為了進一步瞭解幼葉葉齡對本病原菌之感受性，以人工接種方式將 *F. proliferatum* 孢子懸浮液噴施於「彩虹」四季蘭之不同齡期幼葉上，評估該病原對各齡期葉片之感受性差異，可作為後續防治葉細斑病時確實掌握最佳防治時機之依據。由試驗結果得知，新芽萌發到生長 2 wk 至 1 mo (冒新芽至 1–2 分芽) 幼葉齡期時其細斑病罹病度高達 52% 以上，2.5 mo (5 分芽) 幼葉齡期時仍有 25% 罹病度，但 3.5 mo (8 分芽) 幼葉齡期齡期時其細斑病罹病度降至 15% 以下，而幼葉轉成成熟葉片時則細斑病皆不發生。值得注意的是，在進行 *F. proliferatum* 細斑病菌對不同小花蕙蘭品種接種測試時，未在四季蘭、報歲蘭及春蘭之成熟葉片上觀察到細斑病病徵的產生。另外，幼葉齡期被細斑病菌感染後，逐漸生長為成熟葉，再從成熟葉上病斑進行分離，仍然可分離到細斑病菌，顯示此病原菌可殘存在成熟葉片上，且可能仍具有感染力，因此建議本病害防治仍應將出現病徵的幼葉及成熟葉一併摘除並帶離園區，以降低田間感染源密度。

本研究報導台灣小花蕙蘭葉細斑病主要由 *F. proliferatum* 病原所引起，除 *F. proliferatum* 外，是否還有其他種類鐮孢菌屬病原，又其發病生態、生長適溫及寄主作物感受性是否有所差異，仍有待未來進一步探討。目前小花蕙蘭之主要栽培品種 (品系) 皆屬於感病品種，如報歲蘭、四季蘭之「富山」、「鐵骨」、「彩虹」及「市長紅」等。有關各齡期葉片對本病原菌之感病性試驗，結果顯示新芽萌發生長 2 wk 至 1.5 mo (剛冒新芽至 3 分芽) 時期為本病害好發時機，隨著嫩芽幼葉越趨成熟，則對本病原菌越具耐病性，因此得知小花蕙蘭於抽梢期 (春梢期、秋梢期) 之嫩芽、嫩葉為感病部

位，田間栽培時應特別注意 *F. proliferatum* 之侵染，加強田間防治作業，避免植株失去商品價值而造成嚴重損失。未來仍待持續進行如化學防治、物理防治或生物防治等防治方法的評估，期能提供防治本病害之有效解決方案。

誌謝

本研究工作承黎貴枝小姐、張立詳小姐、鄭淑貞小姐及曾淑瓊小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Aoki, T., K. O'Donnell, and K. Ichikawa. 2001. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. *Mycoscience* 42:461–478. doi:10.1007/BF02464343
- Broadhurst, P. G. 1996. Occurrence of *Fusarium subglutinans* on *Cymbidium* orchids in New Zealand. *Plant Dis.* 80:711. doi:10.1094/PD-80-0711D
- Chang, M., I. K. Hyun, Y. H. Lee, and D. H. Lee. 1998. Leaf spot of *Cymbidium hybrida* caused by *Fusarium proliferatum*. *Korean J. Plant. Pathol.* 14:664–667. (in Korean with English abstract)
- Chen, U. C., J. H. Huang, and T. F. Hsieh. 2015. Effect of rainproof rolling blinds on improvement of disease prevention of oriental cymbidium. p.111–125. in: *Proceeding of Chinese Cymbidium Industry Conference*. November 17, 2015. Nantou, Taiwan. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Publ., Taichung, Taiwan. (in Chinese)
- Cong, L. L., Y. Sun, J. M. Kang, M. N. Li, R. C. Long, T. J. Zhang, and Q. C. Yang. 2016. First report of root rot disease caused by *Fusarium proliferatum* on alfalfa in China. *Plant Dis.* 100:2526. doi:10.1094/PDIS-04-16-0505-PDN
- Du Puy, D. and P. Cribb. 2007. *The Genus Cymbidium*. Kew Publishing. Kew, UK. 369 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. doi:10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0
- Han, K. S., J. H. Park, C. G. Back, and M. J. Park. 2015. First report of *Fusarium subglutinans* causing leaf spot disease on *Cymbidium* orchids in

- Korea. *Mycobiology* 43:343–346. doi:10.5941/MYCO.2015.43.3.343
- Hsu, J. H. 2010. The role of pseudobulb on the growth of epiphytic orchids. p.154–162. *in*: Special Issue, No. 105. (Tsai, Y. F., ed.) Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Taichung, Taiwan. 248 pp. (in Chinese)
- 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 Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
- 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.* 69:65–76. doi:10.6156/JTAR.202003_69(1).0005 (in Chinese with English abstract)
- Hung, H. C., F. M. Wei, and C. S. Chang. 2010. Chinese Cymbidium Production Operations Manual. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Spec. Publ. No. 106. 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*. Taichung. 135:39–45. (in Chinese with English abstract)
- Ichikawa, K. and T. Aoki. 2000. New leaf spot disease of Cymbidium species caused by *Fusarium subglutinans* and *Fusarium proliferatum*. *J. Gen. Plant pathol.* 66:213–218. doi:10.1007/PL00012948
- Ichikawa, K. 2004. The research of new leaf spot disease of Cymbidium species- The movement and control of Cymbidium yellow spot caused by *Fusarium proliferatum* and *Fusarium fractiflexum*. *Bulletin of the Yamanashi Agricultural Research*. 16:1–51. (in Japanese)
- 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. doi:10.3923/ajppaj.2009.14.21
- Lee, H. B., C. J. Kim, H. Y. Mun, H. S. Choi, Y. H. Lee, and H. O. Yun. 2011. First report of crown rot on gypsophila (*Gypsophila paniculata*) caused by *Fusarium proliferatum* in Korea. *Plant Dis.* 95:220. doi:10.1094/PDIS-05-10-0376
- Leslie, J. F., B. A. Summerell, and S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell. Iowa, IA. 388 pp.
- Li, B. J., W. X. Yan, Y. X. Shi, A. L. Chai, and X. W. Xie. 2018. First report of daylily flower rot caused by *Fusarium proliferatum* in China. *Plant Dis.* 102:825. doi:10.1094/PDIS-07-17-0997-PDN
- Lin, C. L. 2015. Taiwan cymbidium industry overview. p.3–20. *in*: Proceeding of Chinese Cymbidium Industry Conference. November 17, 2015. Nantou, Taiwan. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Publ., Taichung, Taiwan. (in Chinese)
- 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. doi:10.1073/pnas.95.5.2044
- Ruan, R., X. Zhnag, C. Li, F. Zhao, M. Wang, and Q. Fu. 2021. First report of *Fusarium subglutinans* causing heart rot on *Cymbidium hybridum* in China. *Plant protection*. 144:105603. doi:10.1016/j.cro-pro.2021.105603
- Srivastava, S., C. Kadooka, and J. Y. Uchida. 2018. *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiol. Res.* 207:188–195. doi:10.1016/j.micres.2017.12.002
- Stewart, J. E., K. Otto, G. A. Cline, R. K. Dumroese, N. B. Klopfenstein, and M. S. Kim. 2016. First report of *Fusarium proliferatum* causing Fusarium root disease on sugar pine (*Pinus lambertiana*) in a forest container nursery in California. *Plant Dis.* 100:2534. doi:10.1094/PDIS-06-16-0909-PDN
- Su, J. F., Y. H. Chen, L. Y. Chien, J. H. Huang, and T. F. Hsieh. 2011. First report of Amaryllis red spot disease caused by *Fusarium proliferatum* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 20:78–89. doi:10.6649/PPB.201112_20(3_4).0003 (in Chinese with English abstract)
- 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. 408 pp.
- Swett, C. L. and J. Y. Uchida. 2015. Characterization of *Fusarium* diseases on commercially grown orchids in Hawaii. *Plant Pathol.* 64:648–654. doi:10.1111/ppa.12290
- Wang, C. J., Y. J. Chen, Y. C. Jain, W. C. Chung, C. L. Wang, and W. H. Chung. 2018. Identification of *Fusarium proliferatum* causing leaf spots on *Cymbidium* orchids in Taiwan. *J. Phytopathol.* 166:675–685. doi:10.1111/jph.12730
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1989. Amplification and direct sequencing of 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. San Diego, CA. 482 pp. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Wu, R. S. and J. W. Huang. 1997. A major causal agent of lily seedling blight: *Fusarium proliferatum*. *Plant*

- Pathol. Bull. 6:103–110. (in Chinese with English abstract)
- Zakaria, L., L. H. M. D. Zain, B. Salleh, and M. Zakaria. 2009. Morphological and RAPD analysis of *Fusarium* species associated with root and stem rot of *Dendrobium* orchid in Northern Peninsula Malaysia. HAYATI J. Biosci. 16:64–68. doi:10.4308/hjb.16.2.64

Characteristics of Growth and Infection of *Fusarium proliferatum* Causing Fleck Spot on Oriental Cymbidium Leaf in Taiwan

Chiao-Wen Huang^{1,*}, Jin-Hsing Huang², and Ting-Fang Hsieh³

Abstract

Huang, C. W., J. H. Huang, and T. F. Hsieh. 2022. Characteristics of growth and infection of *Fusarium proliferatum* causing fleck spot on oriental cymbidium leaf in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 71(1):35–47.

Fleck spot disease is critical for oriental cymbidium cultivation owing to decreasing the appearance quality of plants. The main symptom is circular or irregular fleck lesions in black to brown on young leaves with or without a yellowish halo around the lesions. Occasionally in severe disease conditions, young shoots showed browning rot of basal leaves and shoot death. A species of fungus was isolated from the diseased tissue and identified as *Fusarium proliferatum* based on morphological characters, nucleotide sequence comparison of internal transcribed spacer (ITS), and translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1α*) gene. Pathogenicity tests were carried out by artificial inoculation with conidial suspensions of the tested fungus to fulfill Koch's postulates. The optimal temperatures for mycelial growth and spore germination of *F. proliferatum* were 24–28°C and 20–32°C, respectively. Seven oriental cymbidium cultivars including *Cymbidium ensifolium*, *C. sinense* and *C. goeringii*, showed brown-to-black fleck lesions on young leaves, but no symptom appeared on mature leaves after artificial inoculation. To investigate the effect of shoot age on the susceptibility of fleck spot disease, potted oriental cymbidium (*C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar) contained different ages of shoots were inoculated with conidial suspension at 28°C. Results showed that disease severities of 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.5 and 4.5-month-old of shoots were 58.3–59.3%, 52.8–62.5%, 29.2–49.3%, 13.9–25.9%, 2.8–14.6% and 0%, respectively; whereas the adult shoots showed no fleck spot symptoms. The above results might provide the information for controlling fleck spot of oriental cymbidium caused by *F. proliferatum*.

Key words: Oriental cymbidium, Fleck spot, *Fusarium proliferatum*.

Received: August 11, 2021; Accepted: October 15, 2021.

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

¹ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.