

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學系

碩士論文



Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

十字花科根瘤病生物防治資源之開發與應用

Exploration and application of bio-control resources
for the clubroot disease of Brassicaceae

江維翰

Wei-han Chiang

指導教授：沈偉強博士

Advisor: Wei-Chiang Shen, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July 2013



國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：十字花科根瘤病生物防治資源之開發與應用

英文題目：Exploration and application of biocontrol resources for the clubroot disease of Brassicaceae

本論文係 江維翰 君 (學號 R98633015) 在國立臺灣大學微生物學所完成之碩(博)士學位論文，於民國 102 年 07 月 26 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

沈偉強 (簽名)
(指導教授)

王肇芬 陳昭瑩

劉瑞芬

鍾嘉媛


系主任、所長

張雅君 (簽名)

中文摘要



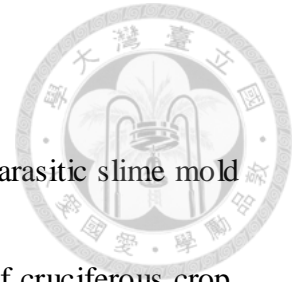
十字花科根瘤病 (clubroot disease of Brassicaceae) 是由絕對寄生之內部寄生性黏菌 *Plasmodiophora brassicae* Woronin 所引起之十字花科重要病害。目前本病害多以施用石灰提高土壤酸鹼值，進行防治，但也造成土壤鹽鹼化之問題，因此開發其他防治方法，實為刻不容緩之事。本論文目標有三，一為藉由實際的田間調查，了解臺灣根瘤病之發病狀況，以及農民耕作習慣與防治施行等；二為嘗試探討臺灣 *P. brassicae* 小種的不同，提供十字花科作物育種及田間品系種植選擇之參考資訊；三為開發生物防治資源，藉由分離田間土壤中具芥子酶 (myrosinase) 活性之微生物，分解硫配醣體 (glucosinolate) 產生異硫氰化物 (isothiocyanate)，進行十字花科根瘤病生物防治燻蒸測試。針對上述目標，實際調查田間發病狀況，全省各主要高冷蔬菜產區皆有此病害之發生，發病率於10至100%不等。在根瘤病菌小種分群方面，我們自臺灣8縣市23處病田採得樣本，嘗試進行分子分群試驗，結果發現臺灣根瘤病菌無法以 rDNA 進行分群，但以一特殊序列分子標記可發現臺灣平地和高山的菌株分屬不同的小種，可作為未來進一步分群之用。在分離具芥子酶活性之微生物方面，自臺灣許多十字花科蔬菜種植田，分得19株具有芥子酶活性的真菌，並進行其中5株真菌之生長特性及防治測試，發現由臺北市北投區分離之 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*，不論在



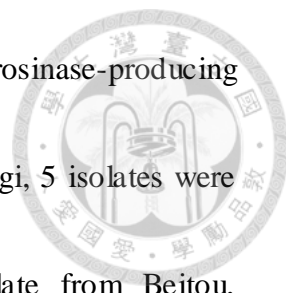
中溫（20-30°C）生長速度，及於植物根部根圍定棲能力，皆有不錯之能力，而於溫室和田間試驗中，當該菌和菜籽粕共同施用於土壤時，對根瘤病皆得到穩定且優良的防治效果。藉由本論文的研究，找到頗具生物防治潛力之真菌，期待未來能結合耕作防治，應用於十字花科根瘤病之防治，提供有效且對環境無不良影響的防治新方法。

關鍵詞：十字花科根瘤病，*Plasmodiophora brassicae*，芥子酶，硫配醣體，異硫氰酸酯，生物燻蒸，小種

Abstract



Clubroot disease of Brassicaceae, caused by an obligate endo-parasitic slime mold *Plasmodiophora brassicae* Woronin, is one of serious problems of cruciferous crop. Currently, one of major control methods for clubroot disease is to elevate pH value by adding lime into soil; however, detrimental effects including soil alkalization and hardening often occur and exhibit impact on plant growth and environment. Thus, alternative and effective control measures are currently in need. The goal of our study is to explore bio-control resources and develop new disease control method for clubroot disease. To achieve this goal, three specific aims include: (i) to investigate the occurrence of clubroot disease in the high elevation fields of Taiwan; (ii) to collect and differentiate *P. brassicae* races; (iii) to isolate myrosinase-producing microbes and develop a biofumigation control protocol based on degradation products, isothiocyanate, of glucosinolates. Our field survey revealed that clubroot disease occurs in the fields of high elevation growth areas with incidence of 10-100%. Twenty three clubroot samples collected from 8 different counties in Taiwan were subjected to race differentiation experiments. We failed to differentiate these samples by rDNA sequence, but samples from plain fields or high mountains can be separated into 2



pathotypes based on specific sequence marker. Furthermore, 19 myrosinase-producing fungal isolates were isolated from field samples. Among these fungi, 5 isolates were subjected to growth and disease control assays and one isolate from Beitou, *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* showed good growth ability at 20-30°C and extensive root colonization capability. In both green house and field tests, this isolate also exhibited good disease control results when combining with canola meal. In this study, a myrosinase-producing fungal isolate was identified and combination of this bio-control agent with other culture control measures may potentially provide an effective and environmental-friendly method to control the clubroot disease.

Keywords: clubroot disease of Brassicaceae; *Plasmodiophora brassicae*; myrosinase; glucosinolate; isothiocyanate; biofumigation; race

目錄



口試委員會審定書.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
一、前言.....	1
二、前人研究.....	3
2.1 十字花科根瘤病菌.....	3
2.2 硫配醣體(glucosinolate)和芥子酶(myrosinase)系統.....	7
2.3 生物燻蒸(bio-fumigation)	10
2.4 根瘤病菌小種(race)的分群	11
三、材料與方法.....	14
3.1 臺灣地區十字花科根瘤病樣本收集、病害調查與小種分群.....	14
3.2 具芥子酶活性之真菌分離、培養與鑑定.....	17
3.3 根瘤病菌接種原之製備及接種.....	18
3.4 具芥子酶活性真菌特性測試.....	19
3.5 具芥子酶活性真菌之溫室防治測試.....	21
3.6 具芥子酶活性真菌之田間防治測試.....	23


3.7 <i>Aspergillus japonicus</i> var. <i>aculeatus</i> 簡單製劑化及其田間效果初探.....	25
3.8 防治機制初探.....	27
四、結果.....	31
4.1 臺灣十字花科根瘤病之病害調查及病株樣本之採集.....	31
4.2 根瘤病菌 DNA 之抽取、增幅與分子分群.....	33
4.3 具芥子酶活性真菌分離、培養與鑑定.....	34
4.4 具芥子酶活性真菌特性測試.....	36
4.5 具芥子酶活性真菌之溫室防治測試.....	37
4.6 田間測試.....	38
4.7 初步製劑化之田間測試.....	39
4.8 異硫氰酸酯與生物燻蒸對於休眠孢子的影響.....	40
五、討論.....	42
六、參考文獻.....	50
七、表.....	59
八、圖.....	75
附錄.....	102



壹、前言



十字花科植物為臺灣極重要的蔬菜種類，以甘藍為例，民國101年全國栽植面積達7,369公頃，總產量達341,279公噸(農委會，2013)。十字花科作物的病害甚多，而根瘤病 (clubroot) 為其重要病害之一。本病由一種絕對寄生之內部寄生性黏菌 *Plasmodiophora brassicae* Woronin 所引起。十字花科根瘤病於臺灣夏季好發於臺中福壽山、南投仁愛鄉等高冷蔬菜生產區，而冬季則多出現於桃園新竹等北部地區的冬季蔬菜產區，影響作物品質產量頗鉅。若是在氣候、土壤環境適當，且田間蔬菜連作時，根瘤病極可能會發生大流行。十字花科根瘤病之發生，受環境及氣候的影響甚大，在溫度20~25°C，濕潤 (70~80%土壤含水量)，酸性 (pH 5-6左右) 的土壤環境最適合根瘤病菌的生長繁殖。傳統上，防治十字花科根瘤病多以施用石灰、S-H混合物、矽酸爐渣等方式，藉由提高土壤酸鹼度至7.4以上來防治本病(蔡，1987)。但這些物質的過度使用，將造成土壤因鈣離子過高而鹽鹼化的副作用，且不利好弱酸性土壤之十字花科作物的生長。本病害雖有推薦農藥氟硫滅，但效果不佳且價格昂貴，亦不符現今推展無毒農業之趨勢。吾人已知十字花科作物多會產生硫配醣體 (glucosinolate)，其會被芥子酶 (myrosinase) 分解進而產生異硫氰酸酯 (isothiocyanate)，該產物已知在較高濃度下對許多植物病原菌有毒殺效果或抑制其生長，此結果或可應用於十字花科根瘤病之防治。



根據前人研究，有許多土壤微生物可產生該酵素並分解硫配醣體，但目前尚未應用於根瘤病之病害防治，若進一步了解其作用機制，進行防治測試並將其實用化，除可有效防治根瘤病，亦符合未來無毒農業之潮流。十字花科作物內的硫配醣體之分解產物也可能影響休眠孢子的行為。若是能夠更加了解各項影響的因子，或可以此修正現行之防治方式。除此之外，藉由田間訪查、收集樣本、進而以分子生物學方法了解臺灣根瘤病菌的小種差異，或可調整栽培習性，以達到耕作防治的效果。本論文之總目標，在於自土中分離具芥子酶活性之真菌，並以之進行防治測試及應用、了解孢子發芽之影響因子與生物燻蒸對休眠孢子之影響等三方面，搭配田間訪查蒐集樣本和了解根瘤病菌小種及其分布，及了解目前田間實際耕作及防治情況，期望研究成果可應用於十字花科根瘤病之耕作防治及生物防治上，並減少傳統化學防治方法對作物生長及環境等方面的不良影響。

貳、前人研究




一、十字花科根瘤病菌 *Plasmodiophora brassicae* Woronin

十字花科根瘤病菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) 為一種內部寄生性黏菌 (Plasmodiophoromycetes); 其主要特徵為: (一) 圓柱狀的細胞分裂; (二) 絕對內寄生的營生方式; (三) 游走子著生前生馬鞭狀雙鞭毛; (四) 具有高耐受性的休眠孢子 (Dixon, 2006)。根據small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 序列分析結果, 發現*P. brassicae*和雙鞭毛蟲門 (Dinzoa)、纖毛蟲門 (Ciliophora) 和頂複合器門 (Apicomplexa) 之親緣關係較相近, 而和真菌界、雜色藻界等親緣較遠 (Castlebury and Domier, 1998)。根瘤病菌目前的分類地位如下: 原生生物界 (Protista)、寄生黏菌門 (Plasmodiophoromycota)、寄生黏菌綱 (Plasmodiophoromycetes)、寄生黏菌目 (Plasmodiophorales)、寄生黏菌科 (Plasmodiophoraceae)、寄生黏菌屬 (*Plasmodiophora*)。


生活史

本病原以絕對寄生方式維生, 其生活史複雜: 病原於土壤內以休眠孢子殘存, 平均殘存時間約 3.6 年, 最長可達 18 年 (Dixon, 2006); 休眠孢子直徑約 3.0 至 5.0 μm , 在掃描式電子顯微鏡下可見其表面有棘, 單套單核, 核直徑 1.5 μm , 俟



適當環境或寄主出現時，即發芽生成梨形、兩根前生馬鞭狀鞭毛之初生游走子 (primary zoospore) 進行侵染 (Macfarlane, 1970)。根據前人研究，休眠孢子在以下的狀況較容易萌發為游走子：(一) 腐爛的根瘤；(二) 十字花科植物之根分泌物；(三) pH 6~6.5；(四) 溫度 20~25°C；(五) 相對濕度 70% 以上 (Macfarlane, 1970；Suzuki *et al*, 1992；Takahashi, 1994)。游走子的萌發開啟了該病原的生活史，此時胞內產生一大液泡及侵入釘 (penetration peg)，藉由液泡產生的壓力將侵入釘與胞質注入寄主細胞 (Aist and Williams, 1971)，侵入後在根毛內進行細胞核分裂形成多核的初生原生質體 (primary plasmodium)，之後初生原生質體內產生膜並將原生質體分割成多核的游走子囊 (zoosporangium)，游走子囊內的核再行有絲分裂並產生單核的次生游走子 (secondary zoospore)，可再進入土中作為感染原。具親和性的次生游走子進行細胞質融合 (plasmogamy) 轉為雙核態 ($n+n$)，並侵染根部皮層；游走子於其內進行核分裂，產生多核態的次生原生質體 (secondary plasmodium)，之後具親和性的兩核進行核融合 (karyogamy)，形成雙套 ($2n$) 細胞核並進行減數分裂，此時次生原生質體轉為休眠孢子囊 (resting sporangium) 並於其內生成無數休眠孢子，釋放於土中開始另一個侵染循環 (Ingram and Tommerup, 1972)。

發生生態



本病好發於氣候冷涼（20°C 左右）且濕度高之區域，故於溫帶地區容易大發生，而臺灣地區則易發生於海拔較高之夏季蔬菜及平地之冬季蔬菜產區。土壤條件也是發病的決定性因子，除濕度（70~80%含水量）外，酸鹼度更是重要的影響因素，通常在土壤呈微酸性（pH 5~6）時容易發病。本病所造成最明顯的病徵即根部不規則畸形腫大，表面凹凸不平，影響根部對水份及養分的吸收，至後期病根因細菌或真菌之二次感染而腐爛空洞化並發出惡臭，致使全株死亡；地上部則因根部失去功能而造成全株萎凋、下位葉黃化，該症狀在溫度高、日照強之正午時分尤為明顯，另外本病也會造成甘藍類作物無法結球或結球甚小，以致不能收成。十字花科根瘤病在加拿大每年造成至少約 10% 的損失，嚴重時幾乎全無收成（Faggian *et al*, 1999；Xue *et al*, 2008）。

P. brassicae 寄主範圍主要為十字花科的芸苔屬（*Brassica* spp.），如甘藍、油菜、白菜、芥菜等皆是，另外像蘿蔔屬（*Raphanus* spp.）、阿拉伯芥（*Arabidopsis* spp.）、山葵屬（*Wasabia* spp.）、芥子屬（*Sinapis* spp.）等十字花科植物亦為該病原之寄主。此外在某些非十字花科作物中，根瘤病菌雖然可以侵入根部並完成生活史，但是卻沒有明顯的根瘤及地上部萎凋症狀，如金蓮花（*Tropaeolum majus*）、木瓜（*Carica papaya*）、甜菜（*Beta vulgaris*）等（Ludwig-Müller *et al*, 1999.）。


而有些植物雖然不是根瘤病菌的寄主，但是其根分泌物卻有誘導休眠孢子發芽的效果，如韭蔥 (*Allium porrum*)、黑麥 (*Secale cereale*)、黑麥草 (*Lolium perenne*) 等 (Friberg *et al*, 2006)。



防治方法

目前植物保護手冊推薦的化學防治方式主要為 0.3% 氟硫滅 (flusulfamide) 粉劑 (商品名:根必強)，其詳細的作用機制目前並不了解，但可能和影響孢子發芽有關 (Tanaka *et al*, 1999)。現在田間最常使用的防治方式為施用生石灰以提高土壤酸鹼值至 7.4 以上及土中二價離子濃度，其原因應亦為影響孢子發芽 (Niwa *et al*, 2008；村上和平柳，2007)，但是土壤的酸鹼值及二價離子濃度過高將導致土壤鹽鹼化及硬化，使農地不適於耕作，因此亟需研擬新的防治方法。


目前已有許多關於根瘤病生物防治的研究，包括 *Trichoderma* spp. (Cheah *et al*, 1997)、*Streptomyces* spp. (Cheah *et al*, 2000)、*Acremonium alternatum* (Järscheke *et al*, 2010)，但作用方式仍莫衷一是，可能為產生抗生物質、二次代謝物影響根瘤病菌或根圈微生物相等原因，而 *A. alternatum* 可能以內部共生的方式影響根瘤病之發病。另外有一種真菌 *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel 雖然不會直接對 *P. brassicae* 造成影響，但施用其培養液於植株卻可防止根瘤生成，



推測其原因可能為該菌產生一種拮抗生長素 (IAA) 的物質 epoxydon，使植株不會因生長素過量產生根瘤 (Arie *et al.*, 1998)。在加拿大亦有學者以 *Gliocladium catenulateum* 與 *Bacillus subtilis* 之製劑進行防治測試，可有效防治油菜根瘤病之發生達 80% (Peng *et al.*, 2011)，其中後者已被我國植物保護手冊列為治療本病之推薦用藥。

二、硫配醣體 (glucosinolate) 和芥子酶 (myrosinase) 系統

植物體內常會有些二次代謝物 (secondary metabolites)，雖然這些物質並非為植物生存所必需，但卻具有各式各樣的生理作用，並可為人類利用；硫配醣體 (glucosinolate) 便是一類這樣的物質。硫配醣體又稱為芥子油苷 (mustard oil glucosides)，主要分布於十字花科芸苔屬 (*Brassica* spp.) 及同科之植物，另外非十字花科植物如旱金蓮科 (Tropaeolaceae)、番木瓜科 (Caricaceae)、木犀草科 (Resedaceae) 等亦有之 (Ludwig-Müller *et al.*, 1999)。該物為一群含硫與氮、帶負電、中性的醣苷 (glycoside) 分子，結構上可分為三部分：由硫氫基(-SH)和 β -D-glucose 形成的葡萄糖苷、磺酸根、及來自各式胺基酸的支鏈，根據支鏈來源之胺基酸及形式可將硫配醣體分為三群：芳香族硫配醣體 (aromatic glucosinolates；



來自Phe和Tyr)、脂肪族硫配醣體 (aliphatic glucosinolates; 來自Ala、Leu、Ile、Met或Val)、吲哚族硫配醣體 (indolic glucosinolates; 來自Trp)、上述胺基酸經過chain elongation, 由細胞色素79 (CYP79) 轉變為醛肟 (aldoxime), 最後接上一個葡萄糖分子即成為硫配醣體 (Halkier and Gershenzon, 2006)。

硫配醣體在植物中具有許多功能; 吲哚族硫配醣體為植物生長素 (IAA) 的前驅物 (Ludwig-Müller *et al*, 1999), 另外在植物的防禦機制上, 該物為合成一種植物殺菌素 (phytoalexin) - camalexin的前驅物 (Siemens *et al*, 2008), 除此之外也與系統性抗病 (systemic defense) 有關, 如癒傷醣 (callose) 的形成 (Clay *et al*, 2009)。硫配醣體對於真菌、細菌性病原的直接毒性不高 (Doughty *et al*, 1991), 但是當該物在自然狀況下或經酵素催化分解後所產生的物質卻可抑制微生物生長或其他的生理反應 (Vidhyasekaran, 2008)。因此接下來將敘述硫配醣體之分解機制與其產物。

植物內所含的硫配醣體除在高溫下可自行分解外, 自然界中最主要還是以芥子酶 (myrosinase) 催化分解反應。芥子酶為貝塔-葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 的一種, 分布於植物組織中的特化細胞 (myrosin cell) 的細胞質中, 除植物外, 亦有許多微生物具有該酵素, 如 *Aspergillus sydowi*、*A. niger*、*A. oryzae*、*Fusarium oxysporum*、*Enterobacter cloacae* 等 (Ohtsuru *et al*, 1973; Tani *et al*, 1974; Smits *et*



al, 1993)。芥子酶在整個反應中將硫配醣體的葡萄糖分子剪除，形成一不穩定的中間產物thiohydroxamate-O-sulfonates，該物在不同的反應條件下（如酸鹼值、epithiospecifier protein或亞鐵離子存在與否等），可以被芥子酶重新排列成不同的產物：異硫氰酸酯（isothiocyanate）、腈類（nitrile；epithionitrile）、硫氰酸酯（thiocyanate）、唑烷硫酮（Oxazolidine-2-thione）（Halkier and Gershenzon, 2006）。

在這些產物中，最為人熟知的為異硫氰酸酯。該物為芥子酶在酸鹼為中性時分解硫配醣體所生的物質，依其所攜帶支鏈的不同可將之分為丙烯基型（allyl type）和苯基型（phenyl type）兩類，具有揮發性及刺激性味道。如前所述，硫配醣體對於微生物的直接毒性不高，但當其轉換為異硫氰酸酯時，便可抑制許多微生物生長，如*Aspergillus niger*、*Rhizopus oryzae*（Drobnica et al, 1967）、*Fusarium oxysporum*（Davis et al, 1964）、*Leptosphaeria maculans*（Mithen and Lewis, 1986）、*Glomus mosseae*（Vierheilig and Ocampo, 1990）等；而*Plasmodiophora brassicae*於5 ppm的丙烯基異硫氰酸酯（allyl isothiocyanate）或2.5 ppm的苯基異硫氰酸酯（phenyl isothiocyanate）下，其休眠孢子的發芽即可被抑制，但有趣的是，在更低的濃度下（1 ppm），兩種異硫氰酸酯反可促進休眠孢子發芽（Hooker et al, 1945）。


長期以來，以該物進行病害防治的例子不勝枚舉，如土壤燻蒸劑邁隆

(Dazomet) 即為一種丙烯基異硫氰酸酯的製品，本藥劑不僅可燻殺土中的真菌病原外，亦可用以防治線蟲；除化學藥劑外，常用於有機防治的生物燻蒸法 (bio-fumigation) 亦為一例。



三、生物燻蒸 (bio-fumigation)


燻蒸 (fumigation)，乃是利用氣態有效殺菌物質滲透進入目標物，以達到除滅害蟲與有害微生物的方法。吾人所熟知的燻蒸方式不外乎以化學藥劑 (如溴化甲烷等) 進行之，但傳統的化學燻蒸劑對包括人在內的非目標生物均具極高毒性，並且容易破壞環境，因此已漸被捨棄不用。在耕作防治法中也有應用類似方法以達到防治效果者，此即為生物燻蒸。生物燻蒸 (bio-fumigation) 即將植物殘體、組織或其他物質埋於土壤之中，利用微生物的酵素將其中部分物質分解並產生氣體殺菌物質，以達到病害防治的效果；這其中最著名的例子即為利用十字花科植物進行的生物燻蒸，本法乃埋入該科植物之前作或綠肥殘體，讓土壤中具芥子酶活性的微生物分解硫配醣體產生異硫氰酸酯，產生土壤燻蒸的效果 (Kumar, 2005)。本法已廣泛應用於土壤病害的防除，例如若在小麥栽植前種植油菜 (canola；*Brassica napus* L.) 或印度芥菜 (Indian mustard；*B. juncea* L. Czern and Coss.)，之後將之殘體犁入土中，可減少小麥全蝕病 (wheat take-all disease) 的發生 (Angus



et al., 1994)。除利用栽植十字花科植物之綠肥之方法外，亦有將蕓薹屬 (*Brassica* spp.) 榨油後之種子粉，和一具芥子酶活性之微生物 *Pseudomonas boreopolis* 搭配施用於西瓜幼苗，具有防治因 *Pythium* spp. 所造成之幼苗猝倒病的效果 (Chung *et al.*, 2003)。另外於土中施用尿素經微生物產生的尿素酶 (urease)，將尿素分解產生氨氣，對於土壤病原也有防治之效果 (方，1988)，該方法已使用於褐根病之防治，亦可算是生物燻蒸的一種應用。

四、根瘤病菌小種 (race) 的分群

許多病原在種以下，尚有小種的分類，不同的小種可影響同一種病原對寄主的病原性，因此了解一病原的小種在植病研究上有其重要性。Honig (1931) 證明了 *P. brassicae* 也有小種之別，而最早被廣為使用的分群方法為 Williams 於 1965 年所提出，利用甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) 與瑞典蕓菁 (*B. napobrassica* Mill.) 各兩個不同品種對根瘤病菌之感病性來進行分群 (Williams, 1965)；後來 ECD (European Clubroot Differential Series) system 取代 Williams' system 成為小種判別的主流方法，此乃利用三種蕓苔屬 (*Brassica* spp.) 植物 *B. campestris*、*B. napus* 和 *B. oleracea*，共 15 個栽培種，針對不同小種之根瘤



病菌感病性的差異進行分群 (Buczacki *et al*, 1975)，如謝文瑞等人曾以該系統對臺灣各地區 *P. brassicae* 進行分群 (Hsieh *et al*, 1988)。根據該法得知，臺灣根瘤病菌共可分為兩種ECD群，兩種各分布於山地及平地。本研究迄今已超過20年，期間再無相關報導提出，故臺灣根瘤病菌小種是否有變化乃屬未知。

不論是Williams法或是ECD法，每個栽培種需接種至少30株以上方能進行統計與判定，且需等待約一個月時間使之發病，十分耗時費工，故分子分群方式便應運而生。分子分群已經被廣泛應用於其他植物病原之小種分群，而根瘤病菌亦不例外。內津等人以根瘤病菌rDNA作為標的進行該病原菌之分子分群，可將日本長野縣的樣本分成兩群，並和其他國家的樣本繪製樹狀圖 (內津等，2004)；Buhariwalla 等人以High copy number DNA sequence polymorphism 將英國、瑞典、法國與德國境內各地的樣本進行序列比對，並繪製樹狀圖 (Buhariwalla *et al*, 1995)；Klewer 等人以RFLP marker分群，並用不同line的阿拉伯芥測試各群的病原性(Klewer *et al*, 2001)；RAPD是最被廣泛用於根瘤病菌小種分群的分子標記，並且許多報告探討各小種和致病性的關係(Möller and Harling *et al*, 1996、Osaki *et al*, 2008、Yano *et al*, 1997)；Manzanares-Dauleux 利用RAPD marker與SCAR marker進行分群，並且復以三種油菜栽培種(*Brassica napus* cv. Nevin、*B. napus* cv. Wilhelmsburger、*B. napus* cv. Brutor)測試感病性，將樣本分為八種小種(Pathotype

1-8)，最後針對兩者的關聯性進行研究，發現分子分群可將根瘤病菌分成 Pathotype 1 與 Pathotype 2-8 兩群（Manzanares-Dauleux *et al.* 2001、Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000）；Niwa等則是利用rDNA large subunit中的exon和 group 1 (catalytic) intron的序列差異性進行分群，他們將日本各地的根瘤病菌以該法分成三群（Niwa *et al.*, 2011）。雖然國外已有許多根瘤病菌分子分群的報導，但國內尚無相關報告。



參、材料與方法



1. 臺灣地區十字花科根瘤病樣本收集、病害分布調查與小種分群

本實驗所採集之根瘤樣本，來自全省8縣市共23處病田。田間判定病株的方法，除直接拔起植株觀察有無根瘤外，亦可根據地上部有無萎凋、下位葉黃化與否、甘藍結球不良等症狀進行辨別。發病率之估算則根據田間隨機挖出植株地下部判定，並計算其病株所佔比例而估計，並且記錄當地田間耕作、防治等狀況。

為進行分子親緣分析，必須要取得根瘤病菌的DNA。首先取一小段根瘤剝開後，以無菌之解剖刀切下內部組織(約200-300 mg)，置於液態氮冷凍的研鉢中磨碎，移入已裝有1 mL CTAB溶液(0.1 M Tris, pH 7.5、0.7 M NaCl、0.01 M EDTA、1% SDS、0.14 M β -mercaptoethanol)的2 mL微量離心管中，輕搖後置於65°C水浴一小時(每隔一段時間輕搖之)。水浴後，加入酸鹼enol-chloroform(phenol:chloroform:CTAB+樣本=1:1:2)，充分混合均勻後，以6,000rpm在4°C下離心15分鐘，取上清液後加入等體積的chloroform，混合均勻後再以相同條件，離心10分鐘。離心後，取上清液加入0.6倍體積的isopropanol以使DNA沈澱析出。之後，於相同條件離心10分鐘，倒掉isopropanol後，沉澱物以70%酒精清洗懸浮，再以相同條件離心5分鐘，倒除上清液，沈澱於抽風櫥風乾，風乾後以65°C ddH₂O回溶。純化之DNA以Nanodrop[®]分光光度計測量核酸濃度與品質，並利用0.5 x TBE 0.8%

瓊脂凝膠於60V電泳一小時，以確認核酸有無降解。



為進行*P. brassicae*的分子類緣分析，乃選擇保守性rDNA區域中的ITS序列進行之(圖3)。ITS區域PCR引子的設計，乃根據Faggian等人於1999年發表文章中所設計之引子 (WC-682：5'-AAACAA CGA GTC AGC TTG AAT GCT AGT-3')，以及另一條本實驗室原有之真菌保守性 28S rDNA通用引子 (WC-35：5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')，此對引子對可專一性地增幅根瘤病菌之ITS1-5.8S-ITS2序列。核酸模板則利用來自各地根瘤抽取所得的genomic DNA，以進行PCR反應；預期所得PCR產物大小為850 bp，產物利用1 %瓊脂凝膠及0.5 x TBE緩衝液，進行電泳分析。

PCR反應之總體積為25 μ L，其中包含：20 ng genomic DNA、WC682-WC35引子對各3.2 pmole、2 μ l 2.5 mM dNTP、2.5 μ L 5x PCR buffer、0.5 μ L KAPA[®] Polymerase。PCR反應條件為：95 $^{\circ}$ C 5分鐘，再進行98 $^{\circ}$ C 20秒、58 $^{\circ}$ C 15秒、72 $^{\circ}$ C 1分鐘之35次循環反應，最後再進行72 $^{\circ}$ C 10分鐘，完成增幅反應。

所取得的PCR產物，經電泳確認為單一條帶後，以EasyPure PCR Clean up/Gel extraction Kit (Bioman Co. Ltd.) 純化PCR產物，送至臺大生技中心核酸定序分析核心實驗室進行解序，解序所得序列於NCBI BLAST確認為根瘤病菌，並用

SeqMan (DNASTAR Inc.) 軟體，與自NCBI取得的世界各地樣本序列，進行排列比對，以分析序列的差異性及親緣關係。



除以rDNA ITS序列進行分群外，我們亦選擇一段前人研究所得特別分子標記，並以一引子對對此特定序列進行PCR增幅分析(WC1040：5'-GTG ACA GGC TGA CCC GAA GGA TTA- 3'、WC1041：5'-GTC ACA GGC TGT GAT CAG TC - 3') (Manzanares-Dauleux *et al*, 2000)。本段分子標記大小約1.2 Kb，該產物的有無，可將*P. brassicae*分為兩群。核酸模板則利用來自各地根瘤抽取所得的genomic DNA為之，以進行PCR，PCR產物利用1 %瓊脂凝膠及0.5 x TBE緩衝液，進行電泳分析。

PCR反應之總體積為25 μ L，其中包含：20 ng genomic DNA、WC1040-1041引子對各3.2 pmole、2 μ L 2.5 mM dNTP、2.5 μ L 5x PCR buffer、0.5 μ L Prime Taq[®] Polymerase。PCR反應條件為：94°C 10分鐘，再進行94°C 1分鐘、60°C 1分鐘、72°C 3分鐘之35次循環反應，最後再進行72°C 5分鐘，完成增幅反應。

PCR產物經電泳確認為單一條帶後，以EasyPure PCR Clean up/Gel extraction Kit (Bioman Co. Ltd.) 純化PCR產物，送至臺大生技中心核酸定序分析核心實驗室進行解序，由於該序列並未於NCBI上登錄，因此所得序列須和文獻上之序列進行比對，以了解各樣品是否有所不同。根據該篇文獻作者的定義，將根瘤病菌


分為pathotype 1-7；若能增幅該標記的PCR產物，便是pathotype 1，若無產物則可能為pathotype 2-8。



2. 具芥子酶活性之真菌分離、培養與鑑定

本研究自土壤中分離具芥子酶活性之真菌方法如下。為進行本實驗，自台灣各地十字花科蔬菜田收集根圈土壤（地表下 5~10 cm 處）或附於根部之土壤製備懸浮液；以 10 g 土壤加入 100 mL 的無菌水中以 150 rpm 震盪 30~60 分鐘，接著取 1 mL 土壤懸浮液進行十倍序列稀釋，取 10^{-2} 及 10^{-3} 兩種稀釋液各取 200 μ L 塗布於 Rose bengal-PDA，以排除細菌與生長過快之真菌干擾實驗（39 g PDA、0.05 g Rose bengal、100 mg Streptomycin 溶於 1 L ddH₂O；Dhingra and Sinclair, 1994），培養於 26°C 下數日，將其上生長之真菌菌落移接至 1% WA，再切單菌絲移植至 1/4 PDA 斜面，最後接到 sinigrin barium agar（以下簡稱 SBA）（5 mM sinigrin、5 mM NH₄Cl、2.5 mM BaCl₂、1.5% Agar; Sakorn *et al*, 2001）上進行篩選，若是菌落周圍有白色暈圈，即代表測試菌株具有芥子酶活性。有活性的真菌以 1/2 PDA 培養以預備接下來的實驗並進行保存。


鑑定真菌的方法，首先以 PCR 進行初步分子鑑定。以 50 mL PDB、28°C 液



態培養真菌，數日後過濾收取菌絲，並以 EasyPure Genomic DNA mini kit (Bioman Co. Ltd.) 抽取 genomic DNA，進行 PCR，所用引子對為真菌 rDNA ITS 保守性通用引子 WC-33 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 與 WC-35 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')。PCR 反應之總體積為 25 μ L，其中包含：20 ng genomic DNA、WC33/WC35 引子各 3.2 pmole、2 μ L 2.5 mM dNTP、2.5 μ L 10x PCR buffer、0.5 μ L Taq Polymerase。PCR 反應條件為：94 $^{\circ}$ C 3 分鐘，再進行 94 $^{\circ}$ C 30 秒、59 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒之 35 次循環反應，最後再進行 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘，完成增幅反應。所取得的 ITS 區域 PCR 產物經電泳確認為單一條帶後，利用 EasyPure PCR Clean up/Gel extraction Kit (Bioman, Co. Ltd.) 純化 PCR 產物，送至臺大生技中心核酸定序分析核心實驗室，進行解序，所得序列於 NCBI 資料庫進行 BLAST 序列比對及初步鑑定，部分菌株亦取菌絲塊觀察產孢構造，以進行形態分類。

3. 根瘤病菌接種原之製備及接種

由於根瘤病菌為絕對寄生之病原微生物，目前尚無法以人工合成培養基培養，故必須以活體植物為之。關於根瘤病菌之接種原製備與接種方式如下 (Trigiano *et al*, 2006)：取新鮮或冷凍並已解凍的根瘤病病根泡於無菌水（水與



根瘤組織的比例為：水 400 mL/組織 100 g) 中，用果汁機打碎成汁。以八層紗布過濾兩次，並擠出紗布濾渣內的汁液，分裝入 50 mL 離心管，以 2,000 g 離心十分鐘，倒掉上清液，用無菌水重新懸浮清洗之，如此步驟重複 3-5 次至上清液澄清為止。製備完成後以血球計數器計算並調整孢子濃度至 10^7 spore/ml 準備接種。如此取得的孢子懸浮液可以在 -20°C 下保存三到四個月。

在供試植物預備方面，我們選擇使用結球甘藍「初秋」(タキイ種苗株式會社) 進行試驗。首先以 1% 的漂白水消毒種子 3 分鐘，洗淨後將種子鋪於濕潤的擦手紙上，置於密閉容器內避光/ 22°C 3 天使其發芽，接著將苗種植於裝有滅菌土(以 80°C 滅菌 40 分) 的 25 cm^2 正方形容器內，並滴入 1 mL 的孢子懸浮液。植物種植於 22°C 、16 小時光照 8 小時黑暗的環境，每周施用一次花寶五號液體肥料 (N-P-K:30-10-10; HYPONeX CORP. LTD.)。接種約一個月後便可挖出植株觀察根瘤。

4. 具芥子酶活性真菌特性測試

具芥子酶活性的真菌，進行生長測定；自分得的菌株中挑選五株以三重複接種直徑 0.5 cm 的圓形菌絲塊於 1/2 PDA 上，分別培養於五種溫度 (10°C 、 15°C 、

20°C、25°C、30°C)，第 2、4、6、8、10 天測量其菌落直徑，比較生長的速度。

另一方面，為探討這些待測菌株對十字花科作物有無病原性，我們選取相同之五株菌株接種於 PDA 上，約一周後以刮刀收取孢子或菌絲（收取菌絲乃針對未產孢之真菌），用無菌水或 0.1% Tween 80 製備懸浮液，接種於初秋甘藍幼苗觀察這些真菌致病與否。

另外，為探討這些真菌可否隨植株根部延展而定棲於根上或根圈土壤，我們利用直徑 4 cm，深 17 cm 的穴植管進行實驗，內部襯以軟塑膠片(圖 10A)。首先以 80°C/40 分鐘或 100°C/30 分鐘將泥炭苔（BVB peat moss）滅菌，每滅完一次待其降溫後，再以同樣條件滅菌，如此反覆進行三次。之後取 40 g 滅菌土填充管底，再以接種真菌並已於 26 °C 培養一週的土壤 20 g 鋪於滅菌土上，並以一次水潤濕土壤後，種植育苗 3 天的初秋甘藍幼苗，置於 22°C、16 小時光照 8 小時黑暗的環境，所需水份則由穴植管底部之水杯供應之。待植株根部完全抓住管內土壤並長出穴植管底部時，即可將軟塑膠片連同土柱取出。為了解土中真菌是否有隨根部進展而定棲，我們取上、中、下部根部及根圈土壤各三塊，接種於 Rose bengal-PDA，觀察是否有我們接種的真菌生長。



5. 具芥子酶活性真菌之溫室防治測試：

5.1 真菌接種源之製備及培養

待測真菌自母盤以直徑 0.5 cm 打洞器取菌絲塊，接種於 1/2 PDA 培養基上，於 28°C 培養 1 星期。接著自該培養皿以直徑 1 cm 打洞器取 7 塊菌絲塊，接種於 50 mL PDB 液體，以 150 rpm/ 28°C 震盪培養，三天後以均質機打碎菌絲球，然後繼續培養至一週後收取菌絲。收取菌絲的步驟如下：將菌絲連同 PDB 一同裝入 50 mL 離心管，以 2,000 g 離心十分鐘，倒掉上清液，用無菌水重新懸浮清洗之，如此步驟重複 3-5 次至上清液澄清為止，最後調整其體積至 50 mL 待用。若是直接自 PDA 收取孢子，則是以無菌水或 0.1% Tween 20 每盤 10 mL 滴加於其表面，接著用圓頭解剖刀片刮下孢子，倒入 50 mL 離心管，並調整濃度至 10^7 spore/ml。

5.2 溫室防治測試之進行

本防治測試目的在於了解具芥子酶活性之真菌，在硫配醣體存在下，對於根瘤病的防治效果。由於純品硫配醣體甚貴且不易取得，不適合直接於田間施用，因此我們選擇常作為有機肥的菜子粕（福壽牌），做為硫配醣體的來源，因其為

油菜籽或芥籽榨油所餘之殘渣，故必含有該物質。首先以 80°C/40 分鐘或 100°C/30 分鐘將泥炭苔 (BVB peat moss) 滅菌，每滅完一次待其降溫後，再以同樣條件滅菌，如此反覆進行三次。接著，分別以下列處理，進行溫室防治測試：



1. 土：菌絲/孢子懸浮液：菜籽粕以 400 g：50 mL：20 g 之比例混合；
2. 土：菌絲/孢子懸浮液以 400 g：50 mL 之比例混合；
3. 土：菜籽粕以 400 g：20 g 之比例混合；
4. 土：氟瘤滅 0.3% 粉劑 (商品名：根必強；惠光化學) 以 400 g：20 g 之比例混合；
5. 未作任何處理。

上述各處理樣品，於 26°C 放置一週，期間每日攪拌使其均勻。一週後，取各處理土以 5 cm x 5 cm 容器，種植已於濕室發芽 3 天之初秋甘藍小苗，每一處理組十株，並於此時接種 2 mL 濃度為 10^7 spores/ml 的根瘤病菌休眠孢子懸浮液；植物的培養條件為 22°C、16 小時日照 8 小時黑暗，並且每週施以花寶五號 1000 倍稀釋液。接種兩個月後，挖出植物觀察其根部有無根瘤生成，評估其嚴重程度，並計算病害指數 (disease index；DI%)。病害嚴重度評估原則與 DI 計算方式如下 (Donald *et al*, 2004)：

(0) 無明顯可見之根瘤



- (1) 側根有單個根瘤
- (2) 側根有數個小根瘤
- (3) 直根輕微根腫，側根有數個小根瘤
- (4) 直根中度根腫，側根有數個小根瘤及少數大根瘤
- (5) 直根嚴重根腫，側根有數個大根瘤
- (6) 全根嚴重根瘤，尚有部分健康根
- (7) 全根嚴重根瘤，殘存少數健康根
- (8) 已無健康根

$$DI\% = \{[n_0 \times 0] + [n_1 \times 1] + \dots + [n_8 \times 8] / n_0 + n_1 + \dots + n_8\} \times 100 / 8$$

6. 具芥子酶活性真菌之田間防治測試：

田間試驗分別於臺北市北投區頂湖與新竹縣五峰鄉民石進行，處理種類共12

種如下-

- (1)/(6) *Humicola* sp.(桃園)和菜子粕混合/僅*Humicola* sp.(桃園)；
- (2)/(7) *Humicola* sp.(仁愛1)和菜子粕混合/僅*Humicola* sp.(仁愛1)；
- (3)/(8) *Humicola* sp.(仁愛5)和菜子粕混合/僅*Humicola* sp.(仁愛5)；
- (4)/(9) *Fusarium* sp.(桃園)和菜子粕混合/僅*Fusarium* sp.(桃園)；



(5)/(10) *Aspergillus* sp.(北投)和菜子粕混合/僅*Aspergillus* sp.(北投)；

(11) 僅添加菜子粕；

(12) 不做任何處理。

兩地均已於事前進行病害調查，並確認未於實驗前進行防治工作，此可避免因病原菌分布不均所造成之誤差。北投試驗田約為33平方公尺，分成24畦，每畦內單行植五株初秋甘藍（共120株），每株間隔20-25公分，各種處理兩重複，以亂數表分配至各畦中。五峰試驗田面積約為165平方公尺，分為五大區，各大區內再分為12個小區，每小區雙行植10棵初秋甘藍苗（共600株），每株株距約30公分，每大區內之小區即代表一個處理，該次實驗各處理有五重複。兩次田間試驗設計皆以逢機完全區集設計(RCBD)處理。

北投及五峰田間測試育苗時，待測真菌的培養及土壤接種方式皆與溫室測試相同，只是所有處理於育苗土中不加入菜子粕。各種處理的土壤放置一週後，便以之進行穴盤苗的種植，植物培養條件和溫室測試時相同。田間定植前一週進行整地及分區，並於施用菜子粕的處理組，撒播菜籽粕於土中，其施用量以每分地250 kg 之量進行估算，並以鋤頭將之和土壤混合均勻。一週後將苗種植於土中，三個月後將根部挖起，進行嚴重度的評估及 DI 的計算。

7. *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 簡單製劑化及其田間效果初探



接種原製備如下：先以 1/2 PDA 進行 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 之培養，在攝氏 28 度下培養一週後，以 10 mL/plate 之 0.1%(v/v) Tween 20 及圓頭解剖刀刮下孢子，調整其濃度至 10^7 spores/mL。之後加入已滅菌的泥炭苔 (peat moss) 中，泥炭土和懸浮液的比例為 1 kg 泥炭土:125 mL 懸浮液。混合均勻後，置於攝氏 28 度下培養兩週。此為原始接種原之製備。

兩週後，進行泥炭土-*Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 田間接種原之放大。首先以高溫高壓消毒大量之泥炭土 (約 100-120 kg)，之後以下列比例將原始接種原和滅菌泥炭土混合-含菌土 1: 滅菌土 4 之比例，每七天將接種原總量放大。放大後，將泥炭苔置於攝氏 28-30 度下一個月，讓該真菌在其中進行拓殖。

本次田間試驗於梅峰農場第二平台之有機菜田進行，該地已於前季進行病害調查，其發病分布均勻且發病率超過九成，試驗進行前並未進行任何防治措施。該菜地取其中四畦進行測試 (30m×1m)，兩畦之間隔一畦作為兩重複，另，進行實驗之四畦再自長邊挖溝分成八小區，形成每重複各四小區之設計。四小區內，隨機安排四種處理。

各處理於田間的含菌泥炭土與菜子粕每小區之使用量如下：




1. 菜子粕 30 kg、含菌土 30 kg，施用前於容器內進行混合；
2. 含菌土 30 kg；
3. 菜子粕 30 kg；
4. 不做任何處理。

將上述各添加物灑布於對應之小區，分別編為處理 1、2、3、4，並蓋上塑膠布，進行三週的燻蒸及作用。三週後，開始種植初秋甘藍穴盤苗（臺大山地農場春陽分場製）。每小區種植 120 株。預計 2.5-3 個月後進行防治效果評估，期間每兩周左右上山觀察情況。病害嚴重度及病害指數(DI)的判定和計算方法同溫室測試。

本實驗收集之資料除病害嚴重度及病害指數外，尚有計算地上部之園藝性狀，以了解各防治法對植株地上部之影響，另外也進行各處理土壤收集，了解真菌在土壤內定棲狀況與各處理對根瘤病菌休眠孢子的影響。

地上部園藝性狀之計量包括外葉長寬、結球重、球徑、球高等四項。外葉長寬之計算，每一處理小區我們隨機從 10 株植株中，每株挑選 3 片葉型完整之外葉（即包住結球之葉片），量測各小區收集葉片之長寬，平均後取標準差計量之。而結球特性計量方式亦如上述，惟田間植株結球量有限，故遍取各小區之結球計量其性質。

為瞭解 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 在田間土壤的拓殖情形，我們針對




各處理進行土壤採樣與稀釋平板製備。於各田間處理小區中，取植株生長處土表下 5 cm 與 15 cm 土壤若干，每個小區隨機選擇 3 點取樣；取回後以 10 g 土壤加入 100 mL 的無菌水中以 150 rpm 震盪 30-60 分鐘，接著取 1 mL 土壤懸浮液進行十倍序列稀釋，以 10^{-2} 稀釋液 200 μ L 塗布於 Rose bengal-PDA，以排除細菌與生長過快之真菌干擾實驗（39 g PDA、0.05 g Rose bengal、100 mg Streptomycin 溶於 1 L ddH₂O；Dhingra and Sinclair, 1994），培養於 26°C 下數日後，計數各培養皿內 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 的菌落數，並推估其 CFU/mL 值：

$$\text{CFU/mL} = \text{菌落數} \times \text{稀釋倍數} \times \text{稀釋液總量} / \text{稀釋液取樣量}$$

8. 防治機制初探

為探究芥子酶-硫配醯體系統對根瘤病菌休眠孢子的影響，我們根據該系統所產生之主要產物（亦為主要具微生物毒性之產物）異硫氰酸酯對根瘤病菌休眠孢子的影響。首先，取用冷凍或新鮮之根瘤，依前述方法製備孢子懸浮液，並將其濃度調整至 10^8 spores/ml，之後取 1 mL 加入 15 mL 離心管。

根據前人研究（Suzuki *et al.*, 1992），休眠孢子於栽種過十字花科作物之水耕液內具有較佳的發芽力，因此我們需先取得該種水耕液。取 30 顆初秋甘藍種子，以 1% 的漂白水消毒種子 3 分鐘，洗淨後將種子鋪於濕潤的擦手紙上，置於密閉



容器內避光/22°C 3 天使其發芽。然後將製備完成、未栽植過植物的水耕液（含 1.0 mM CaCO₃、1.0 mM KNO₃、0.4 mM MgSO₄、0.4 mM KH₂PO₄）200 mL 加入 250 mL 燒杯，並於杯口套上一鋼絲網，網底需浸於液面下。最後將幼苗根部插於網孔使之浸於水耕液，將該燒杯置於濕室內，於 16 小時日照、8 小時黑暗、22°C 下養之。一星期後收取水耕液分裝，並以針筒過濾器(Millipore Corporation) 過濾使之無菌，所得液體取 1 mL 加於裝有孢子懸浮液的管中混合。

本實驗所探討為不同濃度之異硫氰酯對於孢子發芽的影響，待測濃度為 0 ppm、1 ppm、2.5 ppm、5 ppm、10 ppm、50 ppm 與 100 ppm；我們先配製 1,000 ppm 的原液待用（100 μL 的丙烯基異硫氰酸酯（Sigma Co, Ltd.）加入 100 mL 的無菌水中）混勻後蓋上蓋子並以石蠟膜封妥以防其揮發，冷藏保存於 4°C。之後依據其不同試驗濃度，添加不同量的 1,000 ppm 丙烯基異硫氰酸酯原液，於已分裝之孢子懸浮液與水耕液之混合物中。最後以 0.1 M MES buffer(US Biochemicals Co, Ltd.) 調整各管酸鹼至 6.0。為確保各處理孢子濃度不變，孢子懸浮液與水耕液混合物在添加異硫氰酸酯及調整酸鹼度前，均已先取 200 μL，最後根據各管添加物之量，補充無菌水使孢子懸浮液總量仍為 2 mL。

將加入不同異硫氰酯濃度的孢子懸浮液置於 28°C，避光，每 2 天取 5 μL 孢子懸浮液於 DIC（differential interference contrast）顯微鏡下觀察並計數孢子發芽

狀況，共記錄 8 天。計算方法為於視野下隨機挑選 100 個孢子，判定其發芽與否；

判定法為若圓形飽滿孢子即為未發芽，而空泡化且孢子內凹陷者則為已發芽

(Suzuki *et al*, 1992)。

另外為探討生物燻蒸對休眠孢子之影響，我們進行在密閉容器內模擬燻蒸的試驗。首先以下列方式於可密閉保鮮盒內混合各處理元素：

1. 25 g 泥炭苔+25 g 菜籽粕+15 mL 根瘤病菌休眠孢子懸浮液+15 mL

Aspergillus japonicus var. aculeatus 孢子懸浮液；

2. 25 g 泥炭苔+25 g 菜籽粕+15 mL 根瘤病菌休眠孢子懸浮液；

3. 25 g 泥炭苔+15 mL 根瘤病菌休眠孢子懸浮液+15 mL *Aspergillus japonicus*

var. aculeatus 孢子懸浮液；

4. 25 g 泥炭苔+15 mL 根瘤病菌休眠孢子懸浮液。

上述各孢子懸浮液濃度皆為 10^7 spore/mL。混合後以保鮮膜覆於表面，置於避光


處。每兩天取 1 g 混合物觀察一次，以辨識混合於其中之根瘤病菌休眠孢子是否

仍具活性。為分離混合物中的休眠孢子，我們採取以下方法 (Takahashi and

Yamaguchi, 1987)：取 1 g 各處理泥炭土加入 5 mL 0.05% tween 80 內，震盪 2-3

小時，以八層紗布過濾取得濾液，再以 2,500 rpm 離心 10 分鐘，之後以水回溶離

心沈澱物，重複離心 2-3 次，直至上清液澄清為止。



為分別有無感染活性之休眠孢子，我們以 CFW-EtBr 螢光染色進行之
(Takahashi and Yamaguchi, 1988)。配製 CFW (1 mg/ml) 和 EtBr (10 mg/ml)，
兩染劑和孢子懸浮液以 1:1:2 比例混合，常溫下避光等待約一小時，以 13,000 rpm
離心 1 分鐘，取 50 μ L 水回溶後，利用螢光顯微鏡觀察，若休眠孢子成藍白色螢
光為具感染活性者，若同時孢子內有紅色螢光則為不具感染活性者，於視野下
100 個孢子中分別計算兩種孢子數目。




肆、結果

一、臺灣十字花科根瘤病之病害調查及病株樣本之採樣

由臺灣 8 縣市 23 處十字花科蔬菜種植地區，進行病害調查及田間病株樣品的收集，以進行各地不同病原菌株之分析。相關採集地點均詳加記錄，並取得農民連絡資訊，以利未來病害之追蹤調查，以及田間測試等用途。

樣本採集地主要集中於各山地鄉鎮，少數來自平地。臺北市為北投區頂湖，桃園縣包括蘆竹鄉與復興鄉雪霧鬧，新竹縣則為五峰鄉民石部落與尖石鄉新光和鎮西堡兩部落，臺中市為和平區平等里志良、福壽山農場、平等里勝光三地，南投縣則集中於仁愛鄉，包括南豐村、春陽村、北東眼山、榮興村、梅峰農場、翠華村華崗、合作村靜觀部落，花蓮縣則為秀林鄉富世村關原、洛韶，嘉義縣有梅山鄉太和村及阿里山鄉十字村兩處，宜蘭縣大同鄉南山村，台東縣海端鄉利稻村等地(表 1、圖 1)。

實際田間訪查結果顯示，不同地方發病率大相逕庭。整體而言，田間的發病率約為 10-100% (表 2)，以梅峰農場為例，其場區部分田地發病率接近 100%，但在部分區域約 20-30%；在發病率甚高的田區，其地勢較低窪易淹水，可能為高罹病率發生的原因，並且該區種植甘藍已有三年左右，根瘤病之發生逐年漸增，因此連作十字花科對於病情的控制，將有不利的影響。華崗、靜觀和利稻之發病



率大約為 40-50%，為叢集式發病，該現象尤以華崗和靜觀二地最為明顯(圖 2C、E)。病害蔓延和當地地形與氣候條件等有關，以臺東霧鹿(海拔 750 公尺)、利稻(海拔 1,000 公尺)及摩天(海拔 1,568 公尺)一線為例，根瘤病最早發現於海拔最高的摩天，漸次沿新武呂溪及其支流蔓延至海拔較低的利稻及霧鹿，而霧鹿田區採集時並無找到病害。本病於台灣高冷地區除冬季外，皆有此病害之發生，而其中南投縣仁愛鄉甚為嚴重；在中部以北海拔 500 公尺以下的平地，則發病於冬季的蔬菜生產區，但較少發生。

目前田間防治本病害，主要仍以施用生石灰為主。防治之有無大大地影響病害嚴重度，宜蘭南山和台中勝光因長期使用藥劑及石灰進行防治，是故發病甚微，僅有少部分畦面邊緣的植株較易發病，而整體的發病率約為 10%。而新竹新光及民石兩部落部分田地，則因未施以適當防治，致此病過於嚴重而廢耕或轉作(圖 2F)。另外，由於高冷地區多為專業蔬菜生產區，較少與其他作物共植，在連續耕作十字花科作物的情況下，發病甚為嚴重。但在中部部分地區如清境、福壽山農場與梅峰農場會和白蔥進行輪作、共植或於甘藍前期種植蔥蒜類，皆可降低根瘤病的發生。由於過去曾有文獻探討蔥屬 (*Allium* spp.) 等非十字花科植物對根瘤病菌休眠孢子與病害發生之影響 (Friberg *et al*, 2006、Kowalski and Bochow, 1996)，因此輪作或共植蔥屬作物是否確實影響臺灣根瘤病發病狀況，或僅為一

時之現象，仍須進一步探討。另外，我們在田間發現，若於種植前兩到三週於田間施以烏肥並覆土攪拌之，亦可減少根瘤病的發生。上述各現象值得繼續深究，或可作為未來防治之用。




而這些生產區的農田四周，常有散生的油菜或小白菜，採集時亦發現有根瘤病的發生，這些伴生植物在田間亦為一潛在的病原菌接種來源。

二、根瘤病菌 DNA 之抽取、增幅與分子分群

採集所得之根瘤樣本，每個田區根據寄主種類的不同，每一寄主選擇一個獨立樣品，以 CTAB 法抽取 DNA。所獲得的根瘤樣品先抽取 DNA，並利用 rDNA-ITS 引子對進行 PCR(圖 3)，取得一約 850 kb 的增幅產物(圖 4)，各樣本間定序並比對 ITS 序列的結果，序列並無差異，無法以此法進行臺灣根瘤病菌分群。


為了解臺灣各樣本間，及這些樣本和世界其他地區間根瘤病菌的親緣關係，我們自 NCBI 資料庫取得日本名古屋、日本長野、韓國、澳洲、英國及瑞士等地根瘤病菌 rDNA ITS 序列，和我國各地樣本進行親緣樹分析(圖 5)。結果發現臺灣的樣本 rDNA ITS 皆落於同一群(cluster)內，無法分別其親緣；而這些樣本和名古屋(AB526843.1)及瑞士(EF195335)的親緣關係最為接近。



而以特定序列標記進行分群時，除蘆竹一地的樣本外，其他地區的樣本皆有該標記之增幅產物，產物大小約 1.2 kb。Manzanares-Dauleux 等人藉由三種 differential host 將根瘤病菌分成 7 種小種 (pathotype)，而若是 RAPD 有出現產物，則為小種 1，若無出現則為小種 2-8。根據前述，我們於所獲得的所有樣本經特定序列標記測試後，中高海拔地區與台北北投的樣本可得到增幅產物，而平地之桃園蘆竹樣本則無該產物(圖 6)，因此初步判定蘆竹的 *P. brassicae* 之小種可能和臺灣高山地區 (包括臺北市北投區) 者有所不同。由此或可推論平地若有根瘤病之發生，應為非小種 1 之 *P. brassicae* 所造成，但該推論尚需更多來自於平地樣本佐證之；此外，平地菌株是屬於小種 2-8 中的何種小種，仍有待未來之研究。

三、具芥子酶活性之真菌分離、培養與鑑定

土壤內的真菌種類何其之多，而不同性質的土壤，其內的真菌種類組成可能大相逕庭，因此如何制定選擇策略，以縮小選取的範圍，以提高篩選到特定菌株的機率，實為分離土壤真菌時之要務。由於原本在液泡內的硫配醣體，於十字花科植物根部生長時，會因根部細胞破裂時釋出 (Grob and Matile, 1978)，因此十




十字花科作物田區土壤應該有較高量的硫配醣體，尤其在根圈附近。因此篩選策略為收集十字花科作物田區根圈土壤，進行分離可產生芥子酶真菌的工作。分離的土壤來自桃園縣八德市、復興鄉、臺中市和平區、南投縣仁愛鄉、臺北市北投區等地(表 3)，攜回實驗室後將土壤製成懸浮液、塗於 Rose bengal-PDA，挑選其上的真菌菌株接種於 sinigrin barium agar。當芥子酶分解硫配醣體後，會產生一個硫酸根 (SO_4^{2-})，硫酸根和該培養基內的鋇離子形成白色沈澱，便可以之判定待測菌株芥子酶之有無(圖 13A)。經過測試後，我們分別自八德市、仁愛鄉南豐村及臺北市北投區三地種植十字花科作物農田土壤中，分離出 19 株具有芥子酶活性的真菌(圖 13B、表 4)，並對其進行分子(圖 8-12)及形態鑑定。其中，有 17 株根據其異形孢子 (aleuroconidia; 7.2-12 μm) 及 PDA 上灰黑色菌落，判定為 *Humicola fuscoatra* (圖 7A)(Gruyter *et al*, 1992); 1 株根據其 PDA 上之紫色菌落、鐮刀狀大孢子(21-50 μm X 3-6.5 μm)及小孢子三者形態，判定為 *Fusarium oxysporum*(圖 7A); 1 株根據其產孢瓶梗形狀大小(6-8 μm X 2.5-4 μm)、孢子大小(4-5 μm)、頭狀構造、孢子上尖棘(長約 1 μm)，判定為 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*(曾等，2007)(圖 7B、C)。

四、具芥子酶活性真菌特性測試




前述分離各株菌可分為三群：*Humicola fuscoatra*、*Fusarium oxysporum*、*Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*，我們自其中挑選五株進行進一步的測試，包括三株 *Humicola fuscoatra*（一株來自桃園、兩株來自仁愛鄉），一株分離自桃園的 *Fusarium oxysporum*，一株為來自北投的 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*；在進行防治測試前，我們對這五株菌進行其特性之測試，比較了它們在不同溫度時的生長情形，及其對植物是否有致病性，並且也對這些真菌在根部及根圈土壤定棲能力進行測試，因為上述兩性質攸關這些真菌在面對田地複雜的土壤或大氣環境時，是否具有競爭的優勢並進而發揮保護的效果。我們以這些真菌的孢子/菌絲懸浮液接種於植物根部進行觀察，發現這些真菌對於初秋甘藍苗並無致病性；接著測試這些真菌在五種溫度（10、15、20、25、30°C）下的生長，我們可以發現在最低溫 10°C 時，所有真菌的生長皆受抑制，在中高溫度範圍（20-30°C）時，生長速度最快的前二菌株均為 *Fusarium oxysporum* 與 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*（圖 14）。種植甘藍的適合溫度大致落在 15-25°C 間，而夏季山地的表土溫度因太陽照射亦可達 30°C，因此這兩種真菌應可於甘藍種植期間，於田間環境有效生長。另外，在以穴植管進行真菌定棲力之測試時，我們發現不論是以植物根部，抑或根圈土塊接種於 Rose Bengal-PDA 培養，皆只有接種 *Aspergillus*



japonicus var. *aculeatus* 者可以在該培養基上快速長出菌落(圖 15B)，經鏡檢產孢構造後，確定為我們接種的菌株(圖 15C、D)，而且不論是從近土表處、土表下 5-10 公分處抑或根圈最底部處進行分離，皆可得到 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 菌落(圖 15B)，由此可知該菌可以有效隨根圈之發展而定棲於其中，因此對於保護根部與應用於病害防治上，應有所助益及潛力。

五、具芥子酶活性真菌之溫室防治測試

截至目前為止，我們進行了四次的溫室測試，每次為期兩個月。前兩次測試進行五種待測真菌 (*H. fuscoatra* 三株、*F. oxysporum* 一株、*A. japonicus* var. *aculeatus* 一株) 並加入菜子粕，與僅加菜子粕的對照組進行比較(表 5)；第三次增加僅含真菌及未作任何土壤處理之對照組，以了解菜子粕在防治上所扮演的角色(表 6)。前三次測試中，*A. japonicus* var. *aculeatus* 加入菜子粕的處理組，所得到的病害指數為 0%、4.4%、0%，顯示該處理組合具有穩定且極佳的防治效果(圖 11B、D)。至於其他真菌和菜子粕的防治組合，效果較不穩定，三次測試所得結果相差甚大；以其中一株 *H. fuscoatra* 為例，三次所得到病害指數分別為 55.6%、0%、10%。藉由這三次溫室防治實驗結果所提供的訊息，我們在第四次實驗時，僅測試以不同接種原 (菌絲和孢子) 之 *A. japonicus* var. *aculeatus* 加菜子粕之處



理時，兩者是否有所差異，以作為我們未來施用製劑製備時的考慮項目；另外我們也多了施用氟硫滅的處理組(表 7)，以和本研究發展的防治方法進行比較。實驗結果發現，不論是以何種接種原處理，*A. japonicus* var. *aculeatus* 加入菜子粕之處理者，植株均無根瘤，病害指數皆為 0%，且效果和施用氟硫滅者相當。由上述溫室測試結果可以得知，*A. japonicus* var. *aculeatus* 和菜子粕的施用組合，具有相當且穩定的防治效果，並且和傳統的化學防治效力相差無幾，因此，我們以此為基礎進一步進行田間試驗。

六、田間測試

100 年度，我們於北投與五峰兩地進行田間試驗，雖然部分植株在測試時因蟲害或環境因素有所折損，但是仍然可進行田間防治效果的評估。各種處理之病害指數 (disease index ; DI) 平均後，我們發現和溫室測試時相比，*Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 和菜子粕之處理組，依然具有不錯的防治效果，兩地所獲得的 DI 值皆甚低 (北投為 0%，五峰為 3.2%)，其餘菌株與菜子粕的處理則不甚穩定，甚至無明顯效果(圖 17，表 8、9)。另外，整體而言經真菌處理過的苗，若未於田間土壤添加菜子粕，則效果較差，甚或無效果，由此或可說明菜子粕所

扮演的關鍵性角色。



由於 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 與菜子粕其組合的顯著效果，因此我們於台大梅峰農場僅實驗該法之防治效果，並且進行製劑化的效果初步測試。

七、初步製劑化之田間測試

為了便於田間施用，製劑化是必須的。由於前述溫室防治測試中，以泥炭苔、真菌與菜子粕混合處理甚為有效，故本次我們予以擴大培養後，進行田間測試。試驗結果，我們發現各處理地下部病害嚴重度及病害指數皆在 90% 以上(表 10)，看似無效，但在處理一(菌和菜子粕)植株地上部之生長勢遠較其他處理為佳(圖 18E)，其次為處理三(僅有菜子粕)(圖 18G)。我們計算園藝性狀後，發現該處理植株外葉長寬遠大於其他三種處理，葉型也較優(圖 19A、B、D、E)，最重要的是，四種處理中僅有處理 1 有結球生成(圖 19C)，其相關性狀直分別為球重 700 g±380、球圍 43.4 cm±8.5、球徑 14.3 cm±3.3、球高 12 cm±2.1(表 11)。

為了解土中 *A. japonicus* var. *aculeatus* 定棲狀況，我們取土表下 5 及 15 cm 兩深度之根圍土壤製備稀釋平板觀察之，結果發現處理一(菌和菜子粕)的土中，該菌之定棲頗佳，且深處淺處皆有之；其他處理雖亦有分得該菌者，但濃度低，


分布亦較不均(表 12)。此或可解釋為何處理一有較好的地上部性狀。



八、異硫氰酸酯與生物燻蒸對於孢子的影響

我們於 pH 6.0 的環境下，以 0、1、2.5、5、10、50、100 ppm 不同濃度的丙烯基異硫氰酸酯進行孢子發芽測定。過去研究顯示，極低濃度之丙烯基異硫氰酸酯具有促進許多真菌孢子發芽的功能，而若為較高濃度者則會抑制其發芽，這個現象在根瘤病菌上也會發生。為了解該防治法之可能作用機制，我們進行該實驗。結果每兩天的觀察中（2、4、6、8 天）發現，在 1 ppm 丙烯基異硫氰酸酯下，已發芽孢子之百分比是所有不同丙烯基異硫氰酸酯濃度中最高的（20.7%、64.7%、64.7%、67.7%），甚至超過未添加該物之控制組孢子（14.3%、32.8%、49%、50.3%），而當丙烯基異硫氰酸酯濃度在 2.5 ppm 以上時，孢子發芽率就大幅下降，尤其在 50 ppm（4%、8.3%、6.3%、5%）與 100 ppm（2%、6.7%、4%、4.3%）時，孢子發芽率都在 10% 以下(圖 20)。本實驗顯示了異硫氰酸酯在影響孢子發芽上所扮演的角色。

另外在生物燻蒸對根瘤病菌休眠孢子之影響(表 14、圖 21)，我們發現 *A. japonicus* var. *aculeatus* 和菜子粕混合之處理組，在每兩天(2、4、6、8 天)和處理後三周的觀察中，不具感染活性的孢子(紅色螢光)比例皆為各處理之冠(33%、



46.3%、50.3%、41.7%、51%)，超過添加菜子粕(11.3%、27%、24%、26.3%、24%)、
添加 *A. japonicus* var. *aculeatus*(3%、16%、24.3%、24.3%、21.3%)和未施任何處
理(1.4%、17%、26.3%、27.6%、26.3%)，可說明該種處理具有去除休眠孢子感
染活性的效果，但 *A. japonicus* var. *aculeatus* 和菜子粕混合處理者，不具感染活
性之休眠孢子比例停滯於 40-50%不再上升，則是一個值得討論的現象。


伍、討論



本篇論文的主要目的在於藉由硫配醣體(glucosinolate)和芥子酶(myrosinase)系統的建構、田間探勘、樣本採集與小種的調查，以期建立或提供可用於十字花科根瘤病的方法或資訊。


我們走訪田間了解實際狀況，以作為未來設計防治法的參考。目前臺灣種植十字花科蔬菜之高冷地區，多以定植前施用生石灰提高土壤酸鹼值，施用量則需視田間發病狀況而定，無一定標準，通常一甲地用量可達數噸之多，嚴重影響土壤酸鹼度並造成土壤鈣化，而高酸鹼值也會造成喜微酸性的十字花科作物生長不佳，以致於需施用更多肥料，造成環境的負擔。除石灰外，氰硫滅和烏肥也有農民使用。氰硫滅目前是臺灣唯一被農委會推薦的化學用藥，但實際訪查後農民普遍反應效果不穩定且價格過高，而烏肥尚未成為推薦防治方法，卻已為梨山、福壽山一帶農民使用，而實際探查結果發現頗受好評，惟目前不清楚其防治機制，可能和其中所含氰胺化鈣（calcium cyanide）之鈣離子或氰離子（CN⁻）有關（Donald and Poeter, 2009）。

臺灣十字花科根瘤病好發於高冷地區，除了環境因素之外，跟農民耕作方式也有關係。高冷地區蔬菜時常只有十字花科一類，並未進行輪作，造成土中根瘤




病菌接種原居高不下，並且持續累積，以致於發病較為嚴重。平地雖然冬天亦適於發病，但是一年僅有少數時日栽植十字花科蔬菜，其餘多種植其他作物，且夏天溫度極高不適根瘤病菌生長，因此就算冬季也不易見到根瘤病的發生。而山地田間時常可見薺菜 (*Capsella bursa-pastoris*)，其為十字花科野草，另外田地邊緣亦時常可見油菜 (*Brassica rapa*) 等十字花科植物散生其中，這些植物在田中成為根瘤病菌很重要的接種原來源，因此剷除這些雜草應可減少田間發病嚴重度。另外，輪作 (crop rotation) 是一種常作為耕作防治的方法，而高冷地區種植十字花科作物數十年如一日，不常進行輪作，造成田間接種原持續增加，因此輪作非十字花科作物或可降低病情，惟根瘤病菌休眠孢子平均殘存期可至 3.6 年 (Wallenhammer, 1996)，因此在效果上恐難收立竿見影之效。實際走訪的結果，發現已有部分農民已用萵苣 (*Lactuca sativa*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、蔥蒜類 (*Allium* spp.) 等非十字花科植物進行輪作，而農民也常以蔥蒜類植物和十字花科者共植。有意思的是，共植或輪作蔥蒜類似乎可以降低根瘤病的發生率，以臺大梅峰農場為例，原本發病極為嚴重的田地，病情獲得有效控制，發病率從接近 100% 下降至 20-30%；根據 Kowaski 與 Bochow (1996) 研究，韭蔥 (*A. porrum*) 的根分泌物可影響根瘤病菌休眠孢子的發芽狀況，是否因此而降低發病率，有待進一步研究。一旦建立起有效的有機或耕作防治平台，將有效減少農藥、石灰及

各種肥料等之使用，減少環境負擔，並達到防治十字花科根瘤病的目標。




植物病原的小種影響了病原菌的寄主範圍，在植病防治上至為重要。根據謝文瑞等（1988）發表的報告指出，臺灣十字花科根瘤病依據 ECD 系統可分為兩小種，而這兩種小種各分布於山地與平地。相隔約 20 年後，我們嘗試再次進行根瘤病菌的分群，並使用分子生物學的方法為之。我們首先比對各地根瘤病菌樣本的 rDNA ITS 序列差異性，經解序並繪製樹狀圖後，發現並無法以此區分臺灣各地的樣本。原因可能是臺灣本地根瘤病菌本無小種的區分，抑或是臺灣各地雖有小種的區分，但只有一種優勢小種，且該小種甚為強勢，以致於無法從田間的混合感染株區分其他小種。因此若要繼續以該工具進行分子分群，由於根瘤病菌無法培養，因此勢必要取得單孢感染株（single spore inoculum）並建立純粹感染系（pure line），或是將 ITS 增幅產物進行選殖（cloning），以取得單一小種的序列。

除以 ITS 方法外，我們也以一特定序列標記之有無進行分子分群。根據 Manzanares-Dauleux 等（2001）的研究，利用一特定序列標記之有無搭配一組 3 種十字花科作物的 differential host 進行分群。以 RAPD 電泳條帶之有無可將根瘤病菌分成 2 群，而 differential host 復可分為 8 種小種，以特定序列標記分成之 2 群中，可得增幅產物者為小種 1，無法得產物者為小種 2-8。我們以此法發現，




臺灣樣本中除桃園蘆竹取得的樣本外，其餘高冷地樣本均可得到增幅產物，故臺灣臺灣根瘤病菌應可分為 2 群：小種 1 與小種 2-8。但仍有疑點待釐清：蘆竹一地的樣本究竟是小種 2-8 中何種？仍需要以 Manzanares-Dauleux 等 (2001) 所建立之 differential host 系統鑑別之；而本方法和原有的 ECD 鑑別系統有何關係？和過去謝文瑞等 (1988) 之區分結果有何關連性？這些皆有待未來繼續研究，這些結果或可有利於抗病育種及栽培種之選擇，減少病害的發生。

在硫配醣體和芥子酶系統上，我們已經藉由前人的所開發的 sinigrin barium agar (SBA) (Sakorn *et al*, 2002)，分得許多具芥子酶活性的真菌，並經過測試後發現，*Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 不論在生長速率、根圈拓殖力等能力上都屬上乘，似乎是一種可以作為防治材料的真菌。而該菌和菜子粕的組合，在溫室防治測試上效果頗佳，不僅可大幅降低發病率至 0%-4%，而且和其他施測真菌相比，該組合在各次重複所取得的成果遠較其他處理穩定，防治效果不會有太大的落差，唯溫室測試所得到之結果若要施用於田間，包括施用方法、劑量、劑型等課題，仍待未來繼續研究之，以期該法之實用化。同樣具有芥子酶之真菌，防治效果及其穩定性竟然有如此大之差異，原因可能不全然取決於芥子酶的產生效率，因為當三種待測真菌 (*Humicola fuscoatra*、*Fusarium oxysporum*、*Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*) 在 SBA 上時，我們發現接有 *H. fuscoatra* 的 SBA，其產



生硫酸鋇白色暈圈速率最快，顏色也最明顯，但是從我們溫室防治測試的實驗結果可以得知該菌的防治效果並不穩定；而 *F. oxysporum* 在 SBA 上產生硫酸鋇白色暈圈的速率最慢、顏色最淺，因此在溫室防治測試的結果和 *H. fuscoatra* 一樣不甚穩定。而 *A. japonicus* var. *aculeatus* 接於 SBA 上時，其白色暈圈的產生速率以及顏色深淺都居中，但是該菌的防治效果卻是最佳。推測其原因，可能是 *A. japonicus* var. *aculeatus* 可以有效地在根圈定棲，因為從穴植管根圈定棲試驗中，只有該菌可以從不同深度的根圈土壤中分得，甚至是根尖處土壤亦可，因此據此推測由於該菌優異的根圈與土壤拓殖力，得以保護植物根部，另外也由於其在中高溫時（20-30 度）生長速率頗快，正符合高山地區夏季十字花科的生長溫度及土溫，這些可能就是為何 *A. japonicus* var. *aculeatus* 和菜子粕的組合可以得到穩定且有效的防治功效的原因。

當真菌或菜子粕單獨存在時，其防治效果及穩定度通常遠遠不如兩者並存的處理，特別是當真菌單獨處理時，其發病率和未施用任何處理的控制組相差無幾，其中原因可能是和異硫氰酸酯(isothiocyanate)對孢子行為之影響有關，由此可以看出菜子粕在其中扮演的重要角色。根據 Hooker 等人（1945）的研究，1 ppm 的異丙基異硫氰酸酯(allyl isothiocyanate)可促進根瘤病菌休眠孢子發芽，2.5 ppm 以上則會抑制其發芽。我們已知十字花科植物的根部分泌物中，含有原本存在於



細胞液泡內的硫配醣體 (Halkier and Gershezon, 2006.)，而這些微量的硫配醣體或是其被真菌分解後產生的異硫氰酸酯可能是促進孢子發芽甚或吸引遊走子感染的化學信號 (French, 1992)，但當真菌與菜子粕存在時，大量的硫配醣體被真菌有效率地分解為異硫氰酸酯，多量的異硫氰酸酯可抑制休眠孢子的發芽，甚至有可能殺死之，達到防治的效果。惟異硫氰酸酯對休眠孢子的致死濃度為何，乃至抑制發芽或致死的內部機制，則仍有待未來之研究。


為了瞭解在執行生物燻蒸時，該法對孢子的影響，我們設計了燻蒸測試：以密閉環境搭配不同處理。誠如結果所言，*A. japonicus* var. *aculeatus*-菜子粕之共同處理可顯著地減少土中具感染活性之休眠孢子。另外，當我們打開該處理之保鮮盒蓋時，可嗅到極為刺鼻的異硫氰酸酯臭味，或可作為 *A. japonicus* var. *aculeatus* 可將硫配醣體分解為異硫氰酸酯之佐證，且 *A. japonicus* var. *aculeatus*-菜籽粕之處理可以觀察到該菌在菜籽粕上大量產孢，由此可見菜籽粕亦為 *A. japonicus* var. *aculeatus* 的良好生長及擴張的介質，這使該菌得以在土壤中建立族群，達到較佳的保護效果。在實驗起始時，僅有菜籽粕處理者，不具感染活力孢子比例較僅有 *A. japonicus* var. *aculeatus* 及未處理者來得高，因此或可將菜籽粕視為一項防治的決定因子：提供硫配醣體以為分解。而 *A. japonicus* var. *aculeatus*

或可加速硫配醣體分解，但並未直接影響孢子的存活，此可從僅含 *A. japonicus* var. *aculeatus* 和未處理組兩者不具活性孢子比例極為接近得知。



此外我們發現，隨著時間推進，不具感染活性(紅色螢光)之休眠孢子比例理應該持續增加，但數據顯示該比例增加至 40-50%後即未上升。推測原因或許是因菜籽粕內的硫配醣體已被分解殆盡，連帶異硫氰酸酯不再增加之故，所以不具感染活性的休眠孢子比例自然不易加增。如何調整 *A. japonicus* var. *aculeatus* 和菜籽粕間的比例，使其在田間可以延長作用時間並增進防治效果，乃為該法可否實用化於田間之關鍵因素。

目前我們已設計出有效的溫室防治策略，但是對於田間施用的方法仍有很多需要進行商榷的地方。雖然在北投、五峰等地的施用法取得和溫室測試一致的效果，但是尚不能確定在其他地方具有相同的功效，因為各不同的田地其自然條件(水流、土壤性質等)本有不同，而許多人為的因素參雜其中(施肥、化學防治、育苗等)，這些都可能影響真菌之定棲和分解硫配醣體的效率，使防治效果變得更加無法預測，因此若能設計出通用的資材劑型或施用方式，方可廣泛應用於田間。目前我們的方法主要聚焦於將 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 與菜子粕(同時可作為肥料用)作為土壤添加劑使用於土中，並利用塑膠布覆蓋以求建立一合適的環境進行燻蒸。在梅峰農場的田間測試中我們便採取了上述做法，雖然



地下部病況依然嚴重，但從地上部各性狀的觀察我們可以發現，不論是結球、葉長寬、生長勢等，施以 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*-菜子粕之處理，生長狀況皆較其他處理為佳，甚至只有該處理之高麗菜方有結球。雖然因未施肥及病害之因素，園藝性狀統計數值皆較正常為少，但仍不失為有用之結果，或在調整施用方式後即可達成一定程度的保護效果。

陸、參考文獻



方新政。1988。尿素及其他氮化合物在土壤中毒殺白絹病菌之機制及防治應用之

研究。國立台灣大學植物病蟲害研究所博士論文。台北。170 頁。

柯侑婷。2007。十字花科蔬菜中硫醣苷含量與芥子酶特性之研究。國立台灣大學

園藝學研究所碩士論文。台北。92 頁。

行政院農業委員會。2013。101 年農業統計年報。行政院農業委員會。台北。321

頁。

曾顯雄、黃子歲、袁如陵。2007。進口植物或其產品潛在真菌病原之鑑定專誌。

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。台北。194 頁。

蔡竹固。1987。十字花科根瘤病及其防治。中國園藝 33:9-15。

內津政直、橫山正、村上敏文。2004。長野県で分離したハクサイ根こぶ病菌の

18S rRNA 領域と ITS 領域の塩基配列に基づく系統分類とレースの関係。

日本土壤肥料学雑誌 75:203-210。

村上弘治、畔柳有希子。2006。アブラナ科野菜根こぶ病菌に及ばず酸鹼の影響。

日本土壤肥料学雑誌 78:77-79。

Aist, J. R., and Williams, P. H. 1971. The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*. Can. J. Bot. 49:2023-2034.

Angus, J. F., Gardner, P. A., Kirkegaard, J. A., and Desmarchelier, J. M. 1994.

Biofumigation: Isothiocyanates released from Brassica roots inhibit growth of take-all fungus. Plant Soil:107-112.

Bennett, R. 1999. Indole glucosinolate and auxin biosynthesis in *Arabidopsis*

thaliana (L.) Heynh. glucosinolate mutants and the development of clubroot disease. Planta 208:409-419.

Buczacki, S. T., Toxopeus, H., Mattusch, P., Dixon, G. R., and Hobolth, L. A. 1975.


Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposal for attempted rationalization through an international approach. Trans. Br. Mycol. Soc. 65:295-303.

Castlebury, L. A., and Domier, L. L. 1998. Small subunit ribosomal RNA gene

phylogeny of *Plasmodiophora brassicae*. Mycologia 90:102-107.

Chung, W. C., Huang, J. W., Huang, H. C., and Jen, J. F. 2003. Control, by *Brassica*

seed pomace combined with *Pseudomonas boreopolis*, of damping-off of watermelon caused by *Pythium* sp. Can. J. Plant Pathol. 25: 285-294.

- 
- Chung, W. C., Huang, J. W., and Huang, H. C. 2004. Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani*. *Biol. Control* 32: 287-294.
- Clay, N. K., Adio, A. M., Denoux, C., Jander, G., and Ausubel, F. 2009. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323:95-101.
- Dingra, D. O., and Sinclair, J. B. 1994. *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Florida, USA. 434 pp.
- Dixon, G. R. 2006. The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. – a review of recent advances. pp. 271-282. *In* Y. P. Lim [ed.], *Proceedings, Joint Meeting 14th Crucifer Genetics Workshop & 4th ISHS Symposium on Brassicas*. 2006, *Acta Hort.* 706.
- Donald, C., and Porter, I., 2009. Integrated control of clubroot. *J. Plant Growth Regul.* 28:289-303.
- Faggian, R., Bulman, S. R., Lawrie, A. C., and Porter, I. J. 1999. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. *Phytopathology* 89:392-397.

French, R. C. 1992. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. *Mycologia* 84:277-288.



Grob, K. and Matile, P. 1979. Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Sci. Lett.* 14: 327-335.

Halkier, B. A., and Gershenzon, J. A. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57:303-333.

Honig, F. 1931. Der Kohlkropferreger (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) .
Gartenbauwissenschaft 5:116-225.

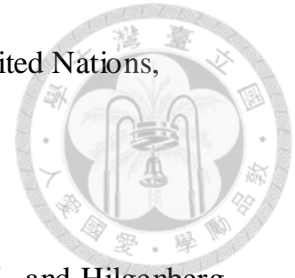
Hooker, W. J., Walker, J. C., and Link, K. P. 1945. Effects of two mustard oils on *Plasmodiophora brassicae* and their relation to resistance to clubroot. *J. Agric. Res.* 70:63-78.

Hsieh, W. H., and Huang, Y. H. 1988. Pathotype differentiation in *Plasmodiophora brassicae* with the European clubroot differential set in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 30:393-398.

Ingram, D. S., and Tommerup, I. C. 1972. The life history of *Plasmodiophora brassicae* Woronin. *Proc. B. Soc. Lond. B.* 180:103-112.

Kumar, P. 2005. Biofumigation: concept note & compilation of session guides on

biofumigation. Food & Agriculture Organization of the United Nations,
Rome, Italy.34 pp.



- Ludwig-Müller, J., Bennett, R. N., Kiddle, G., Ihmig, S., Ruppel, M., and Hilgenberg, W. 1999. The host range of *Plasmodiophora brassicae* and its relationship to endogenous glucosinolate content. *New Phytol.* 141:443-458.
- Ludwig-Müller, J., Pieper, K., Ruppel, M., Cohen, J. D., Epstein, E., Kiddle, G., and Matthiessen, J. N., and Kirkgaard, J. A. 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Crit. Rev. Plant Sci.*25:235-265.
- Macfarlane, I. 1970. Germination of resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:97-112.
- Manzanares-Dauleux, M. J., Barret, P., and Thomas, G. 2000. Development of a pathotype specific SCAR marker in *Plasmodiophora brassicae*. *Eur. J. Plant Pathol.*106:781-787.
- Manzanares-Dauleux, M. J., Divaret, I., Baron, F., and Thomas, G. 2001. Assessment of biological and molecular variability between and within field isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Pathol.*50:165-173.

Mithen, R. F., Lewis, B. G., and Fenwick, G. R. 1986. *In vitro* activity of glucosinolates and their products against *Leptosphaeria maculans*. Trans. Br. Mycol. Soc. 87:433-440.



Möller, M. and Harling R., 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiling of *Plasmodiophora brassicae*. Lett. Appl. Microbiol. 22:70-75.

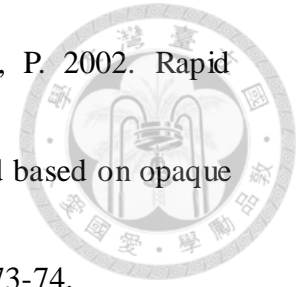
Niwa, R., Nomura, Y., Osaki, M., and Ezawa, T. 2008. Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. Plant Pathol. 57:445-452.

Niwa, R., Kawahara, A., Murakami, H., Tanaka, S., and Ezawa, T. 2011. Complete structure of nuclearr DNA of the obligate plant parasite *Plasmodiophora brassicae*: intraspecific polymorphisms in the exon and group 1 intron of the large subunit rDNA. Protist 162:423-34.

Ohtsuru, M., Tsuruo, I., and Hata, T. 1973. The production and stability of intracellular myrosinase from *Aspergillus niger*. Agr. Biol. Chem.37:967-971.

Osaki, K., Fujiyama, S., Nakayama, A., Shimizu, Y., Ito, S., and Tanaka, S. 2008. Relation between pathogenicity and genetic variation within *Plasmodiophora brassicae*. J. Gen. Plant Pathol. 74:281-288.

Sakorn, P., Rakariyatham, N., Niamsup, H., and Nongkunsarn, P. 2002. Rapid detection of myrosinase-producing fungi: a plate method based on opaque barium sulphate formation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:73-74.



Siemens, J., Glawischnig, E., and Ludwig-Müeller, J. 2008. Indole glucosinolates and Camalexin do not influence the development of the clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *J. Phytopathology* 156:332-337.

Susuki, K., Matsumiya, E., Ueno, Y., and Mizutani, J. 1992. Some properties of germination-stimulating factor from plants for resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58:699-705.

Takahashi, K. 1991. Correlation between fluorescent staining reaction and germination in resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 57:160-164.

Takahashi, K., and Yamaguchi, T. 1988. A method for assessing the pathogenic activity of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* by fluorescence microscopy. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 54:466-475.

Takahashi, K., and Yamaguchi, T. 1987. An improved method for estimating the number of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *Ann.*

Phytopath. Soc. Jap. 53:507–515



Tanaka, S., Kochi, S., Kunita, H., Ito, S., and Kameya-Iwaki, M. 1999.

Biological mode of action of the fungicide, flusulfamide, against

Plasmodiophora brassicae (clubroot). Eur. J. Plant Pathol. 105:577-584.

Tani, N., Ohtsuru, M., and Hata, T. 1974. Isolation of myrosinase producing

microorganisms. Agr. Biol. Chem. 38:1617-1622.

Trigiano, R. N., Windham, M. T., and Windham, A. S., 2003. Plant pathology:

Concepts and laboratory exercises. CRC Press, Florida, USA. 702 pp.

Vidhyasekaran, P. 2008. Fungal pathogenesis in plants and crops, 2nd ed. CRC press,

Boca Raton, USA. 536 pp.

Vierhelig, H., and Ocampo, J. A. 1990. Effect of isothiocyanates on germination of

spores of *G. mosseae*. Soil Biol. Biochem. 22:1161-1162.

Wallenhammar, A. C. 1996. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring

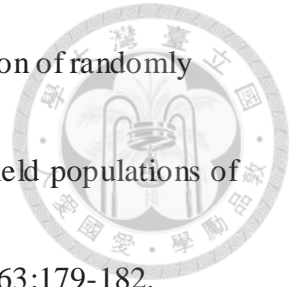
oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil

infestation levels. Plant Pathol 45:710–719.

Williams, P. H. 1965. A system for the determination of races of *Plasmodiophora*

brassicae that infect cabbage and rutabaga. Phytopathology 56:624-626.

Yano, S., Tanaka, S., Ito, S., and Kameyama-Iwaki M. 1997. Variation of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns among field populations of *Plasmodiophora brassicae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63:179-182.



柒、表

表一、十字花科根瘤病樣本採集地



Table 1. Collection sites

採集縣市	採集地	寄主植物	採集日期
台北市	北投區頂湖	高麗菜	2010.12.22
	北投區頂湖	花椰菜	2010.12.22
	北投區頂湖	大白菜	2010.12.22
桃園縣	復興鄉雪霧閣部落	高麗菜	2010.01.27
	蘆竹鄉	芥菜	2009.11.03
新竹縣	五峰鄉民石部落	高麗菜	2010.08.26
	尖石鄉鎮西堡部落	高麗菜	2010.08.28
	尖石鄉新光部落	高麗菜	2010.08.28
臺中市	和平區平等里志良	高麗菜	2010.07.12
	和平區福壽山農場	高麗菜	2010.10.13
	和平區平等里勝光	高麗菜	2011.10.22
南投縣	鹿谷鄉	高麗菜	2008.12.19
	仁愛鄉臺大春陽分場	高麗菜	2009.02.19
	仁愛鄉南豐村大同山	芥藍	2010.07.30
	仁愛鄉榮興村	青花菜	2010.10.13
	仁愛鄉榮興村	高麗菜	2010.10.13
	仁愛鄉北東眼山	高麗菜	2010.10.14
	仁愛鄉臺大梅峰農場	高麗菜	2011.07.19
	仁愛鄉翠華村華崗	高麗菜	2011.08.19

	仁愛鄉合作村靜觀	高麗菜	2011.09.09
嘉義縣	梅山鄉太和村樟樹湖	高麗菜	2009.04.05
	阿里山鄉十字村	高麗菜	2010.10.16
宜蘭縣	大同鄉南山村	高麗菜	2011.10.22
花蓮縣	秀林鄉富世村關原	高麗菜	2010.10.13
	秀林鄉富世村洛韶	高麗菜	2011.04.15
台東縣	海端鄉利稻村	高麗菜	2011.04.17

表二、採集地發病率



Table 2. Disease rate in collection sites

採集縣市	採集地	發病率	備註
台北市	北投區頂湖	90%	
桃園縣	復興鄉雪霧閣部落	<10%	大量施用石灰
	蘆竹鄉	NO	桃改場採集
新竹縣	五峰鄉民石部落	20-100%	部分田區廢耕
	尖石鄉鎮西堡部落	40%	田間散生油菜
	尖石鄉新光部落	100%	已廢耕
臺中市	和平區平等里志良	100%	未防治
	和平區福壽山農場	0-40%	未發病田區共植蔥蒜 亦有使用烏肥進行防治
	和平區平等里勝光	<10%	大量施用石灰
南投縣	鹿谷鄉	NO	中改場沈先生採集
	仁愛鄉臺大春陽分場	NO	園藝系陳小姐採集
	仁愛鄉南豐村大同山	20%	雨量多時發病較嚴重
	仁愛鄉榮興村	<10%	
	仁愛鄉北東眼山	100%	
	仁愛鄉臺大梅峰農場	30-90%	發病嚴重處低窪易積水 發病不嚴重處共植大蔥
	仁愛鄉翠華村華崗	>10-90%	施用氟硫滅防治
	仁愛鄉合作村靜觀	40-50%	明顯叢集式發病
嘉義縣	梅山鄉太和村樟樹湖	NO	
	阿里山鄉十字村	100%	無防治

宜蘭縣	大同鄉南山村	<10%	大量施用石灰
花蓮縣	秀林鄉富世村關原	10%	
	秀林鄉富世村洛韶	10%	
台東縣	海端鄉利稻村	20%	田間有薺菜和莧科雜草



表三、土壤樣本表



Table 3. List of soil samples

採集地	備註	是否分離芥子酶真菌
八德市	室內溫室	是
八德市	露天田區	是
復興鄉雪霧鬧部落	附於根上的土	
復興鄉雪霧鬧部落	含石灰土壤	
和平區梨山	田區 1	
和平區梨山	田區 2	
和平區梨山	田區 3	
仁愛鄉臺大春陽分場	N 24° 01' 49.1", E 121° 08' 59.4"; 海拔 1233m	
仁愛鄉溪堡	N 24° 02' 0.02", E 121° 09' 13.0"; 海拔 1275m	
仁愛鄉南豐村大同山	病株根圍土	
仁愛鄉南豐村大同山	健株根圍土	是
北投區頂湖	病田土壤	是

表四、產生芥子酶之真菌採集地與種類。



Table 4. Isolation place and species of myrosinase-producing fungi.

分得場所	株數		
	<i>Humicola</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
桃園縣八德市	7	1	
台北市北投區			1
南投縣仁愛鄉	10		

表五、菜子粕與生物製劑對甘藍根瘤病的防治效果(第一及第二次溫室試驗)



Table 5. Control efficacy of canola meal and biocontrol agent on cabbage clubroot (1st and 2nd trial)

	Treatments*					CK
	1	2	3	4	5	
1 st	50%	55.6%	84.1%	33.3%	0%	100%
2 nd	55.6%	0%	6.7%	51.1%	4.4%	92.2%

*Canola meal (50% ; w/w) was applied in all treatments. The biocontrol agents applied are *Humicola fuscoatra* from Taoyuan (Treatment 1), *H. fuscoatra* from Ren'ai (Treatment 2 & 3), *Fusarium oxysporum* from Taoyuan (Treatment 4), and *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* (Treatment 5).

表四、第三次溫室測驗之病害指數。

Table 4. The disease index of the third greenhouse test.



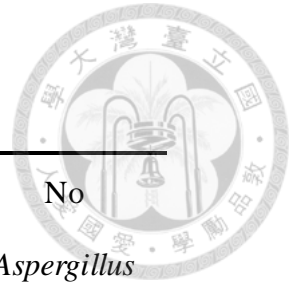
	<i>Humicola</i> ^a	<i>Humicola</i> ^b	<i>Humicola</i> ^c	<i>Fusarium</i> ^d	<i>Aspergillus</i> ^e	No fungi
Canola meal	33.3%	10%	3.4%	0%	0%	14.4%
No Canola meal	98.8%	100%	100%	100%	68.8%	100%

*a. From Taoyaun, b &c. From Ren'ai, d. From Taoyaun, e. From Beitou.

表五、第四次溫室測驗之病害指數。

Table 5. The disease index of the fourth greenhouse test.

	<i>Aspergillus</i> spore	<i>Aspergillus</i> mycellium	Flusulfamide	No <i>Aspergillus</i>
Canola meal	0%	0%	ND	33.3%
No canola meal	93.3%	100%	0%	42.9%



表六、北投田間測驗之病害指數



Table 6. The disease index of field test in Beitou.

	<i>Humicola</i> ^a	<i>Humicola</i> ^b	<i>Humicola</i> ^c	<i>Fusarium</i> ^d	<i>Aspergillus</i> ^e	No fungi
Canola meal	21.1%	31.7%	66.7%	42.2%	0%	29.2%
No canola meal	78.9%	52.2%	54.7%	80%	64.3%	54.4%

*a. From Taoyaun, b &c. From Ren'ai, d. From Taoyaun, e. From Beitou.

表七、五峰田間測試之病害指數。



Table 7. The disease index of field test in Wufeng.

	<i>Humicola</i> ^a	<i>Humicola</i> ^b	<i>Humicola</i> ^c	<i>Fusarium</i> ^d	<i>Aspergillus</i> ^e	No fungi
Canola meal	42%	45.3%	61.5%	28.7%	0%	14.4%
No Canola meal	40.1%	60.3%	60.1%	65%	68.8%	100%

*a. From Taoyaun, b &c. From Ren'ai, d. From Taoyaun, e. From Beitou.

表八、梅峰田間試驗兩大區各處理之病害指數

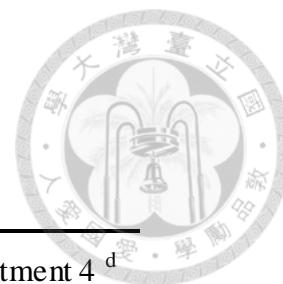



Table 8. Disease index of two blocks in Meifeng field test.

	Treatment 1 ^a	Treatment 2 ^b	Treatment 3 ^c	Treatment 4 ^d
Block 1	97.5%	100%	99.8%	100%
Block 2	84.1%	99.5%	97.5%	100%

*a: *Aspergillus* sp. with canola meal, b: *Aspergillus* sp. without canola meal, c: canola meal only, d: non-treated.

表九、兩大區各處理之外葉長寬(單位:公分)。

Table 9. Length and width of leaves in all treatments (cm).



	Treatment 1 ^a	Treatment 2 ^b	Treatment 3 ^c	Treatment 4 ^d
Block 1	27.4±2.6 X 27±3.1	15.7±4.0 X 14.1±4.3	17.8±2.2 X 16.8±2.5	15.3±2.8 X 14.1±2.8
Block 2	29±1.3 X 26.2±1.9	16.9±2.5 X 14.7±1.5	21.5±5.2 X 19.8±5.1	15.5±3.8 X 13.7±2.5

*a: *Aspergillus* sp. with canola meal, b: *Aspergillus* sp. without canola meal, c: canola

meal only, d: non-treated.

表十、A、B 分別為梅峰第一和第二大區土壤分得 *Aspergillus japonicus* var.

aculeatus 之 CFU。



Table 10. CFU of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* in the soil collected from

Miefeng experimental field site.

A

處理	株別	上部土	下部土	備註
1 ^a	1	10 ⁵	6×10 ⁴	以 25 g 土壤/100 mL 水震盪所得之土壤懸浮液，稀釋至 10 ⁻² 後取 200 μL 塗於 PDA-Rose Bengal。 上部土：土表下約 5 cm 深；下部土：地表下約 15 cm 深。
	2	2×10 ⁴	5×10 ³	
	3	1.75×10 ⁵	0	
2 ^b	1	1.5×10 ⁴	1.5×10 ⁴	
	2	0	7.5×10 ⁴	
	3	0	0	
3 ^c	1	5×10 ³	0	
	2	0	5×10 ³	
	3	0	0	
4 ^d	1	0	0	
	2	0	0	
	3	0	0	

*a: *Aspergillus* sp.+ canola meal , b: *Aspergillus* sp.without canola meal , c: canola meal , d: non-treated。

B

處理	株別	上部土	下部土	備註
1 ^a	1	2.5×10 ⁴	1.1×10 ⁵	以 25 g 土壤/100 mL 水震盪所得之土壤懸浮液，稀釋至 10 ⁻² 後(10 mL)取 200 μL 塗於 PDA-Rose Bengal。 上部土：土表下約 5 cm 深；下部土：地表下約 15 cm 深。
	2	1.5×10 ⁵	6.05×10 ⁵	
	3	4.25×10 ⁵	3.4×10 ⁵	
2 ^b	1	0	4.5×10 ⁴	
	2	0	10 ⁴	
	3	1.4×10 ⁵	0	
3 ^c	1	0	0	
	2	5×10 ³	0	
	3	0	0	
4 ^d	1	0	0	
	2	0	0	
	3	0	0	

*a: *Aspergillus* sp.加菜子粕 , b: *Aspergillus* sp.不加菜子粕 , c:僅有菜子粕 , d: 未做任何處理。

表十一、根瘤病菌休眠孢子在不同濃度之發芽率表；



Table 11. Germination rates of the resting spore germination rate under different concentration of isothiocyanate.

Time	Isothiocyanate concentration (ppm)						
	0	1	2.5	5	10	50	100
Day 2	14.3%	20.7%	9%	7.3%	7.7%	4%	2%
Day 4	32.8%	64.7%	19.3%	16.5%	11.7%	8.3%	6.7%
Day 6	49%	64.7%	21.3%	15.3%	14%	6.3%	4%
Day 8	50.3%	67.7%	20.7%	16.7%	17%	5%	4.3%

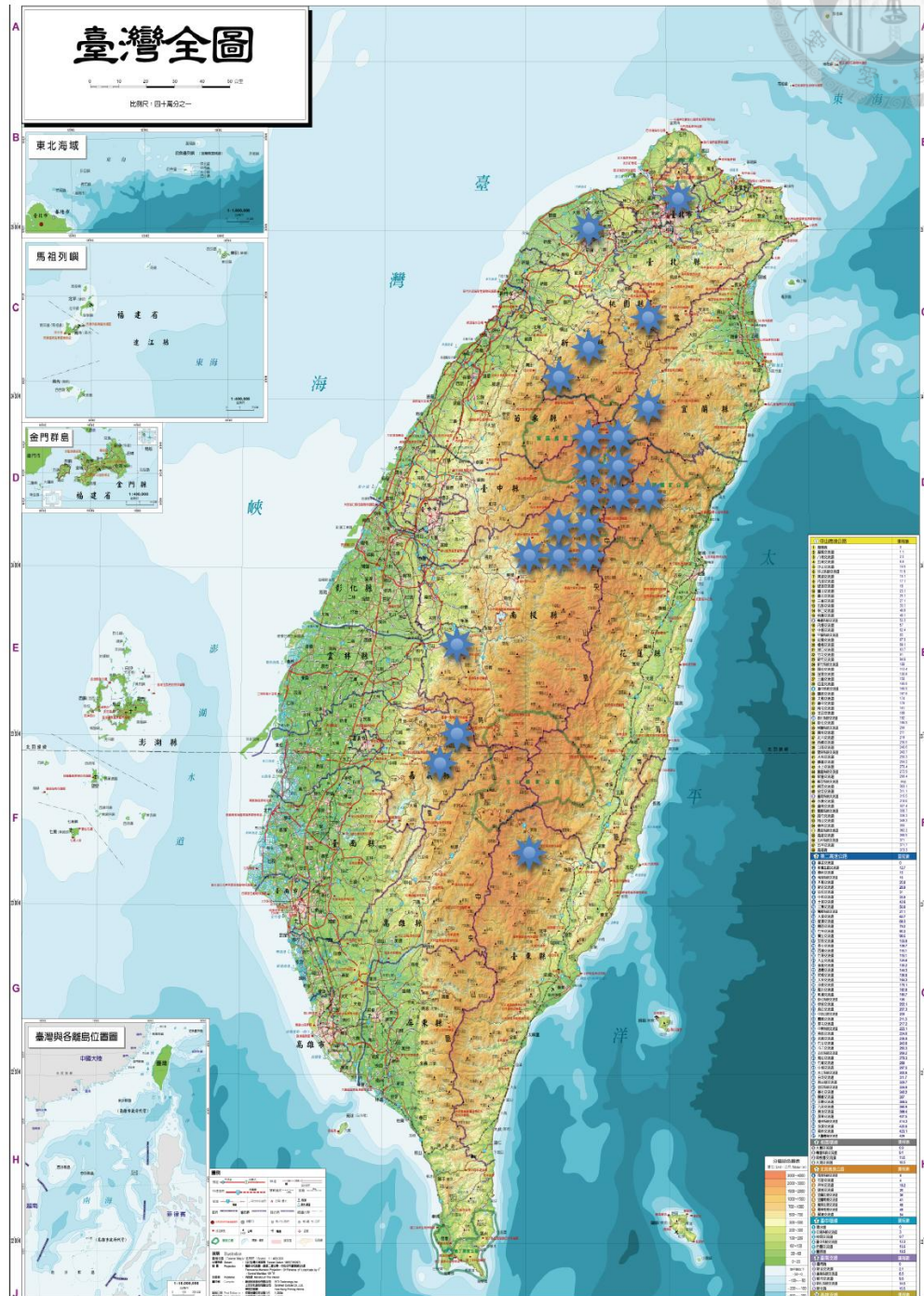
表十二、模擬生物燻蒸實驗的結果，不具感染活性休眠孢子之百分比。



Table 12. The percentage of non-infectious resting spores in the simulation of bio-fumigation.

	<i>Aspergillus</i> sp. w/t canola meal	<i>Aspergillus</i> sp.	Canola meal	CK
Day 2	33±4.6%	11.3±4.2%	3±1%	1.4±0.6%
Day 4	46.3±1.5%	27±1.7%	16±1.7%	17±2.6%
Day 6	50.3±2.1%	24±2.6%	24.3±1.5%	26.3±2.5%
Day 8	41.7±2.1%	26.3±3.2%	24.3±2.5%	27.6±2.5%
Day 21	51±3.5%	24±3.8%	21.3±3.5%	26.3±0.6%


捌、圖



圖一、臺灣十字花科根瘤病樣品採集分布圖

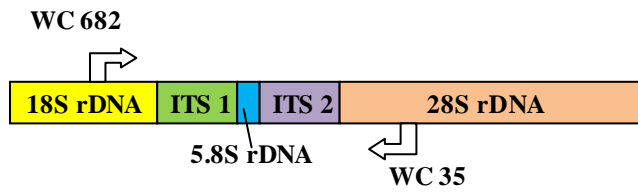
Fig. 1. Locations of brassica clubroot sample collected for this study.





圖二、臺灣地區十字花科根瘤病之田間發病情形。A. 根瘤病菌感染後期，根部嚴重腐敗（大同鄉南山村）；B. 高麗菜因根瘤病菌感染所生之巨大根瘤(仁愛鄉梅峰)；C. 田間群集發病狀態（顏色較淺的區塊；仁愛鄉靜觀）；D. 高麗菜因根瘤病造成地上部萎凋(阿里山鄉十字村)；E. 仁愛鄉華崗之病田（照片前方即為病株聚集處）；F. 因嚴重根瘤病而遭廢棄之田(尖石鄉新光)。

Fig. 2. Clubroot disease condition in fields of Taiwan. A. Root rot in late stage of disease (Datong Township). B. Large clubroot after infection (Ren'ai Township). C. Group incidence in fields (shallow color; Ren'ai Township). D. Cabbages wilt after infection (Alishan Township). E. Disease field (Ren'ai Township). F. Abandoned field because of serious clubroot disease (Jianshi Township).

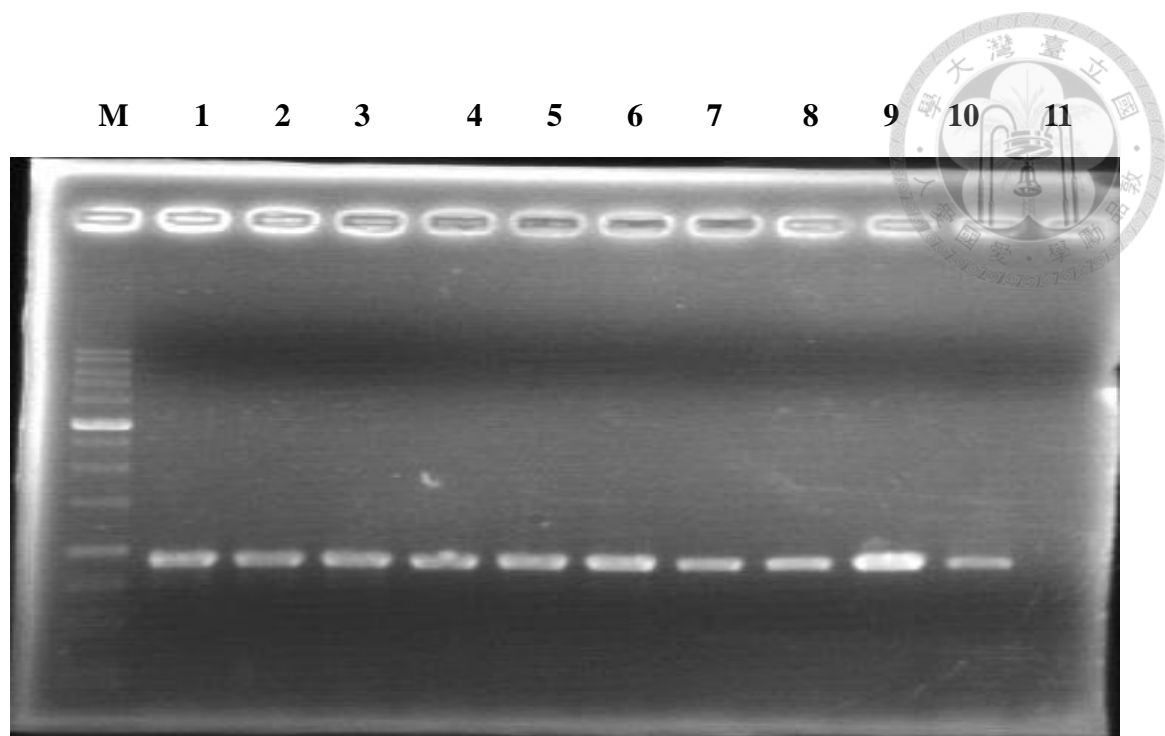


圖三、*Plasmodiophora brassicae* rDNA ITS 區域 PCR 增幅引子及增幅區域示意

圖。

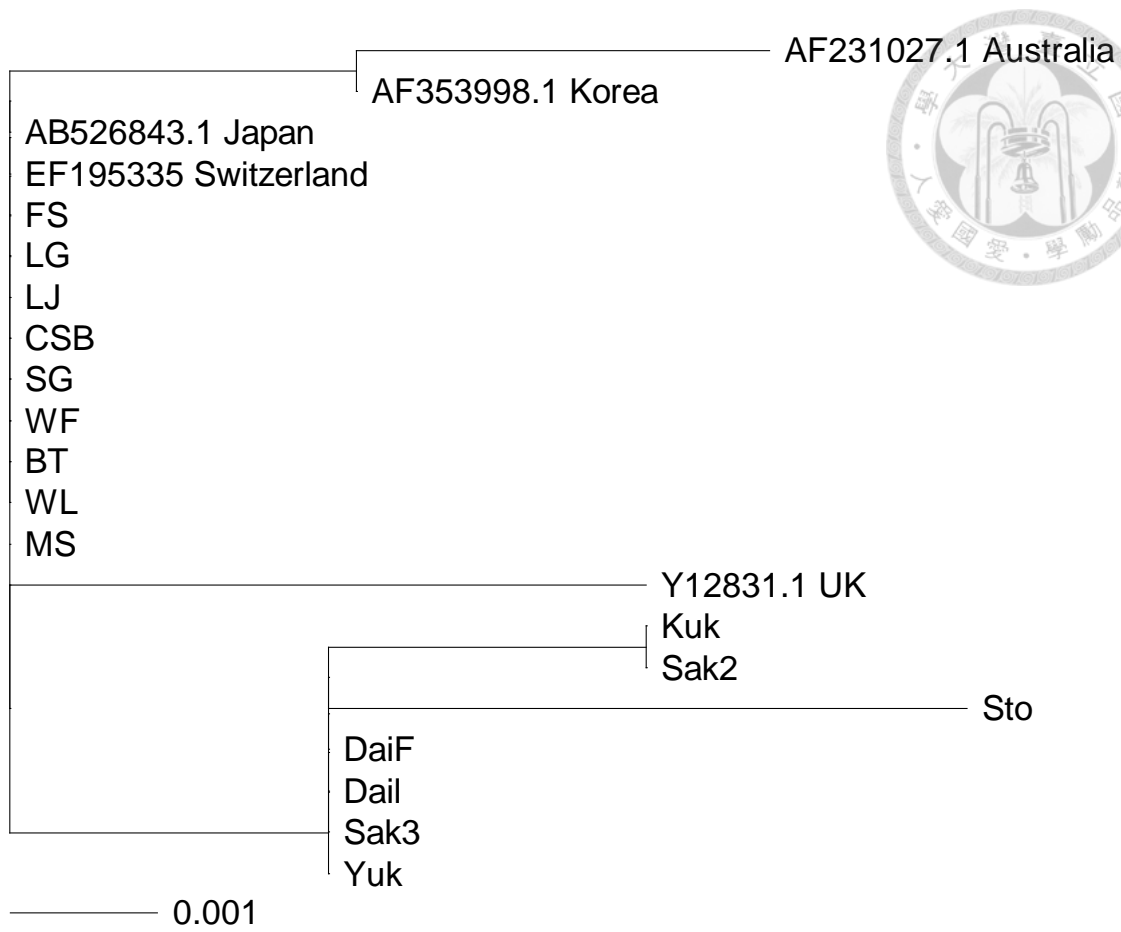
Fig. 3. The primer set for amplification of ribosomal ITS region of *Plasmodiophora*

brassicae.



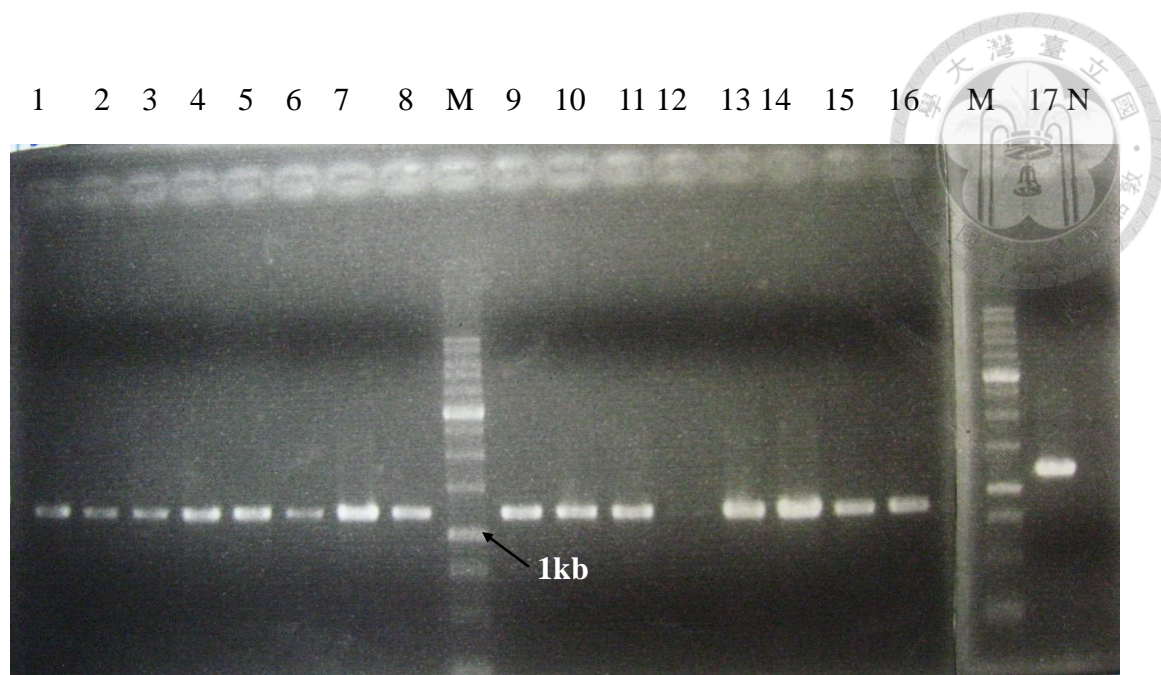
圖四、十字花科根瘤病菌 ITS 區域 PCR 增幅結果之電泳分析圖：M: 1 kb marker；
1-3 為五峰鄉樣本；4-6：為尖石鄉鎮西堡樣本；7-9：為尖石鄉新光樣本；10:正
對照組；11:負對照組。

Fig. 4. The results of *P. brassicae* ITS region amplification. Lane M. 1 kb marker.
Lane 1-3. Samples from Wufeng Township. Lane 4-6. Samples from Smangus, Jianshi
Township. Lane 7-9. Samples from Cinsibu, Jianshi Township. Lane 10. Positive
control. Lane 11. Negative Control.



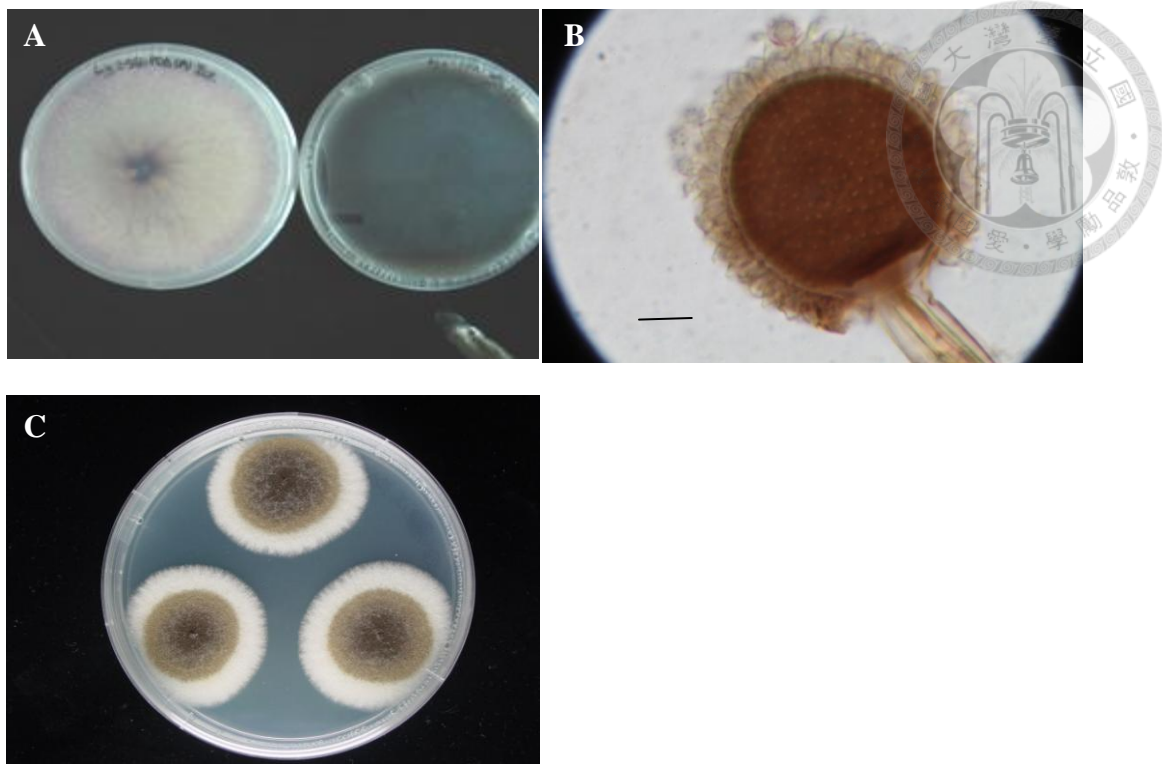
圖五、臺灣地區十字花科根瘤病菌與其他國家病原菌之 ITS 親緣樹狀圖；梅山 (MS)、鹿谷(LG)、北投(BT)、復興(FS)、蘆竹(LJ)、武陵(WL)、五峰(WF)與尖石鎮西堡和新光(CSB、SG)。其他國家的分析序列包括澳洲(AF231027.1)、韓國 (AF353998.1)、瑞士(EF195335)、英國 (Y12831.1)、日本長野縣七個樣品 (AB094984.1、AB094980.1、AB094982.1、AB094977.1、AB094978.1、AB094981.1、AB094983.1)，以及日本名古屋之樣品 (AB526843.1)。

Fig. 5. Phylogenic tree of ITS region of in Taiwan and other countries. Australia(AF231027.1)、Korea(AF353998.1)、Switzerland(EF195335)、United Kingdom(Y12831.1)、MS: Meishan. LG: Lugu. BT: Beitou. FS: Fushin. LJ: Luzhu. WL: Wuling. WF: Wufeng. CSB: Cinsibu. SG: Smangus. Kuk (AB094984.1), Sak2 (AB094980.1), Sto (AB094982.1), DaiF (AB094977.1), Dail (AB094978.1), Sak3 (AB094981.1), and Yuk (AB094983.1) are from Nagano, Japan. AB526843.1 is from Nagoya, Japan.



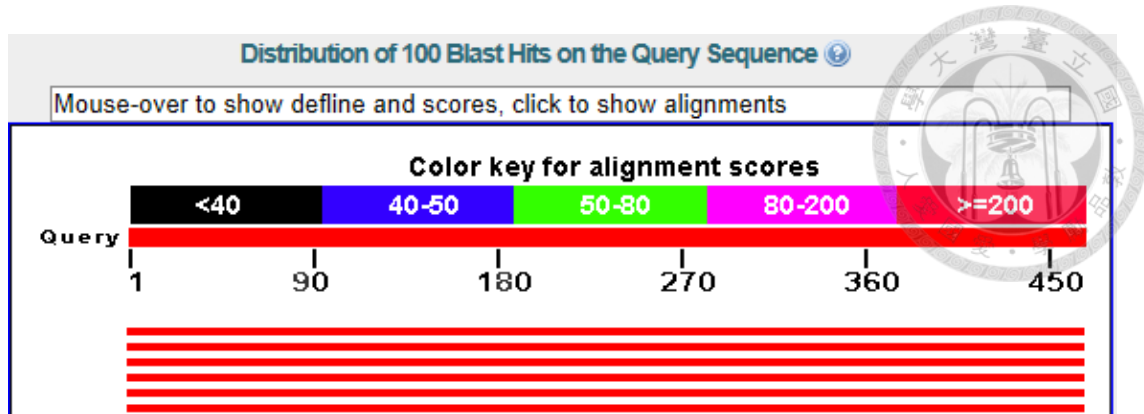
圖六、*P. brassicae* RAPD 分子標記 PCR 增幅產物的電泳分析結果；1. 北投；2. 志良；3. 新光；4. 鎮西堡；5. 五峰；6. 大同山；7. 榮興；8. 十字路；9. 利稻；10. 關原；11. 洛韶；12. 蘆竹；13. 梅山；14. 春陽；15. 福壽山；16. 北東眼山；17. 鹿谷。M: 1 kb DNA ladder，N: PCR 增幅負對照組樣品

Fig. 6. The results of *P. brassicae* RAPD marker amplification in Taiwan. 1. Beitou ; 2. Zhiliang ; 3. Cinsibu ; 4. Smangus ; 5. Wufeng ; 6. Tatung mountain ; 7. Rongxing ; 8. Shizilu ; 9. Lidao ; 10. Guanyuan ; 11. Luoshao ; 12. Luzhu ; 13. Meishan ; 14. Chunyang ; 15. Fushou mountain ; 16. North Donyan mountain ; 17. Lugu. M: 1 kb DNA ladder ; N: negative control.



圖七、具芥子酶活性的真菌其生長及產孢構造圖：A. 左為 *Fusarium oxysporum* (桃園)分離株，右為 *Humicola fuscoatra* (仁愛)分離株；B. *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 的產孢構造；C. *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*(北投)菌落。

Fig. 7. Growth of myrosinase producing fungi. A. *Fusarium oxysporum* from Taoyuan (left). *Humicola fuscoatra* from Ren'ai, Nantou (right). B. The sporulation structure of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*. C. *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* from Beitou.



Sequences producing significant alignments:

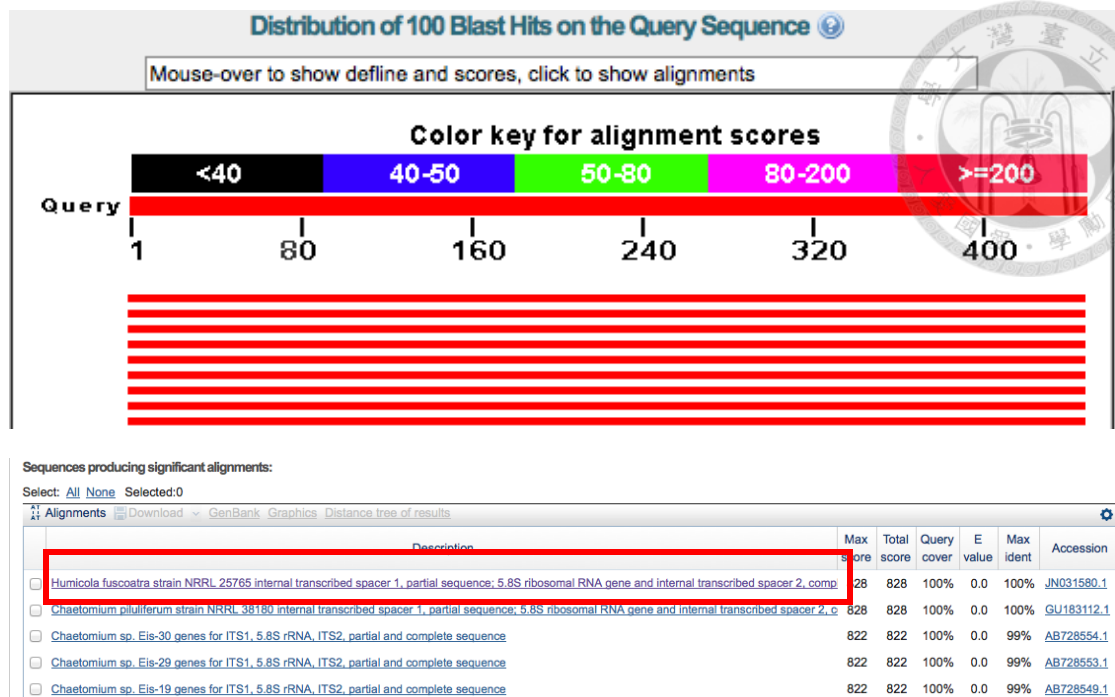
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Humicola fuscoatra strain NRRL 25765 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spa	828	828	100%	0.0	100%	JN031580.1
<input type="checkbox"/>	Chaetomium piluliferum strain NRRL 38180 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	828	828	100%	0.0	100%	GU183112.1
<input type="checkbox"/>	Chaetomium sp. Efs-30 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	822	822	100%	0.0	99%	AB728554.1
<input type="checkbox"/>	Chaetomium sp. Efs-29 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	822	822	100%	0.0	99%	AB728553.1
<input type="checkbox"/>	Chaetomium sp. Efs-19 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	822	822	100%	0.0	99%	AB728549.1

Humicola fuscoatra strain NRRL 25765 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

圖八、自桃園分離之 *Humicola fuscoatra* 之 ITS-5.8S rDNA 序列在 NCBI BLAST 比對結果。

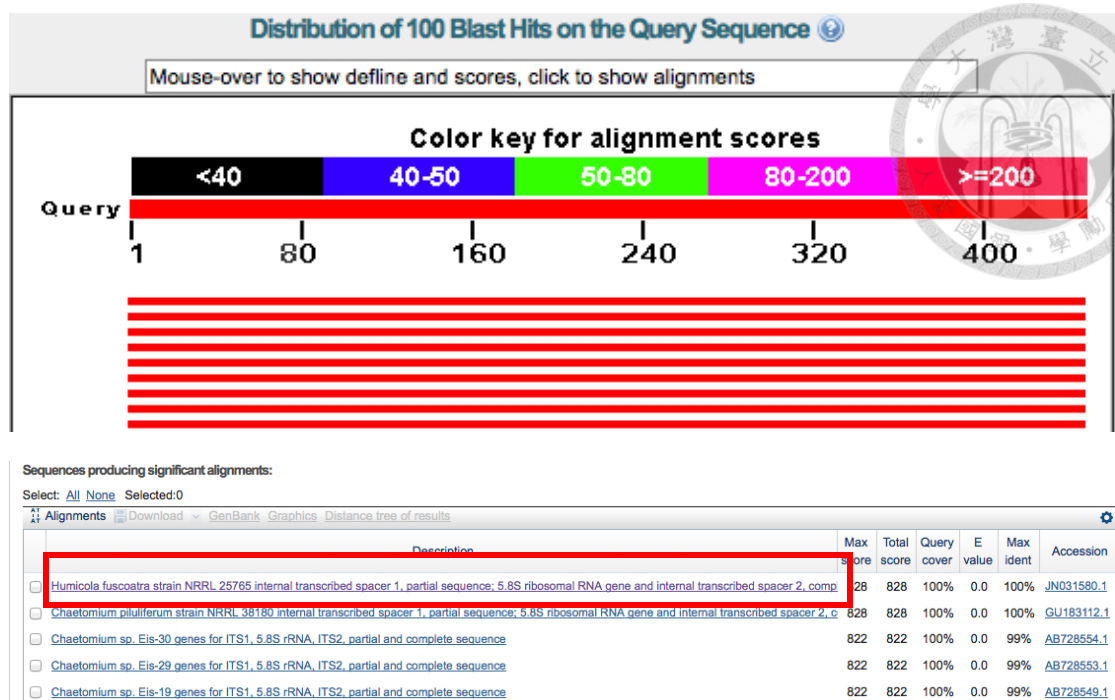
Fig. 8. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Humicola fuscoatra* isolated from Taoyuan was BLASTed against NCBI database



Humicola fuscoatra strain NRRL 25765 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

圖九、自仁愛鄉分離之 *Humicola fuscoatra* 之 ITS-5.8S rDNA 序列在 NCBI BLAST 比對結果。

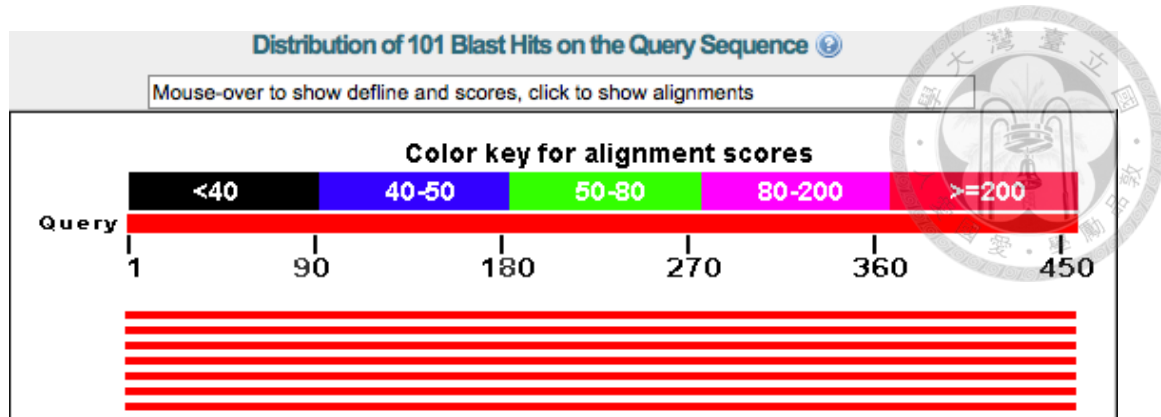
Fig. 9. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Humicola fuscoatra* isolated from Ren'ai was BLASTed against NCBI database.



Humicola fuscoatra strain NRRL 25765 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

圖十、自仁愛鄉分離之另一株 *Humicola fuscoatra* 之 ITS-5.8S rDNA 序列在 NCBI BLAST 比對結果。

Fig. 10. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Humicola fuscoatra* isolated from Ren'ai was BLASTed against NCBI database.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

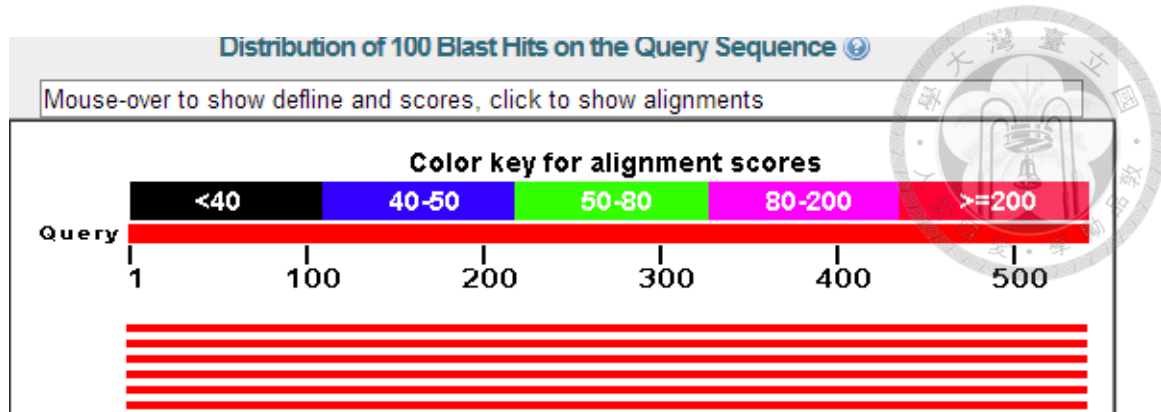
Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Fusarium oxysporum isolate FoxySIN9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal...	843	843	100%	0.0	100%	KC577181.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium oxysporum isolate FoxySIN4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal...	843	843	100%	0.0	100%	KC577179.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium oxysporum isolate FoxySIN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal...	843	843	100%	0.0	100%	KC577178.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium oxysporum isolate FoxySIN2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal...	843	843	100%	0.0	100%	KC577177.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium oxysporum isolate IBSD-GF13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna...	843	843	100%	0.0	100%	KC428399.1

Fusarium oxysporum isolate FoxySIN9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

圖十一、自桃園分離之 *Fusarium oxysporum* 之 ITS-5.8S rDNA 序列在 NCBI BLAST 比對結果。

Fig. 11. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Fusarium oxysporum* isolated from Taoyuan was BLASTed against NCBI database.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

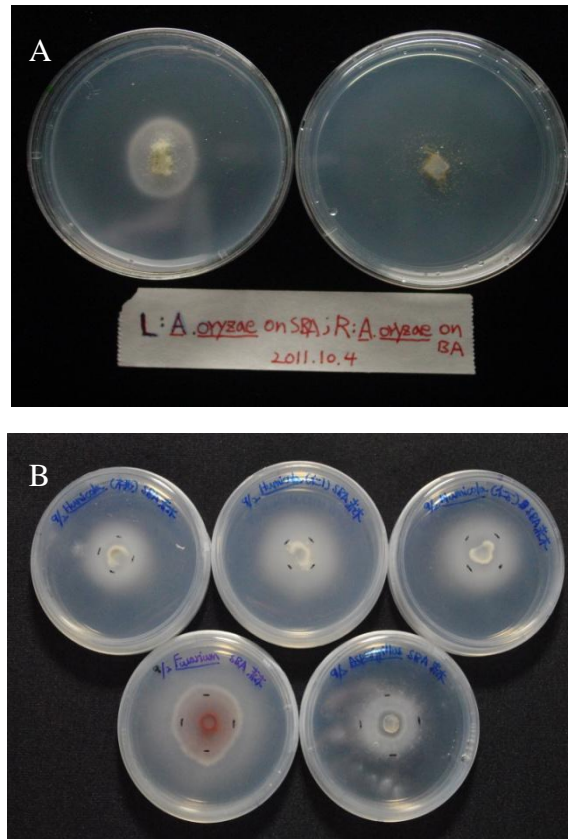
Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Aspergillus aculeatus strain DQ2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	900	900	100%	0.0	100%	KC621081.1
Aspergillus aculeatus genomic DNA containing rDNA, 5.8S rRNA gene and rDNA, clone rDQ1-1.3	900	900	100%	0.0	100%	HF545315.1
Aspergillus aculeatus isolate A3S1_40 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	900	900	100%	0.0	100%	JX501394.1
Aspergillus aculeatus isolate A3S1_16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	900	900	100%	0.0	100%	JX501393.1
Aspergillus aculeatus isolate A2S6_D3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	900	900	100%	0.0	100%	JX501392.1

Aspergillus aculeatus strain DQ2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

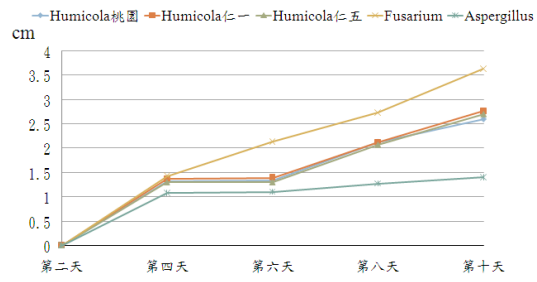
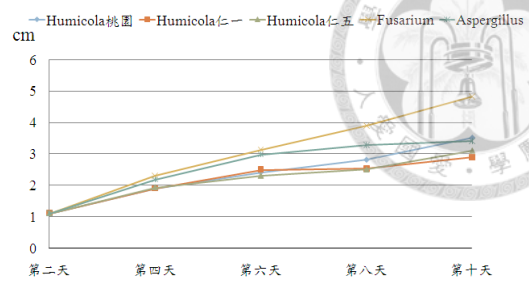
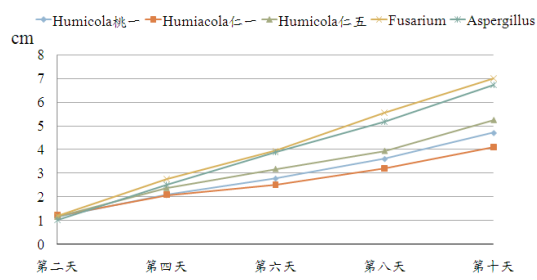
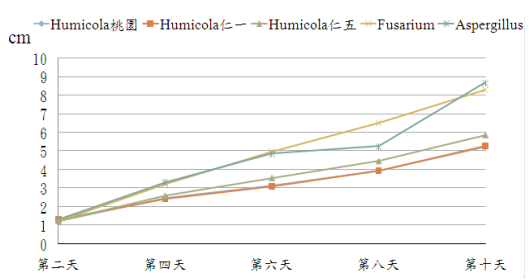
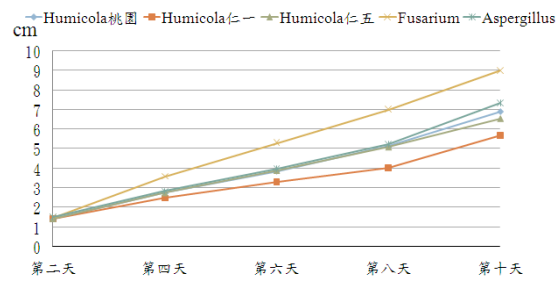
圖十二、自北投分離之 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* (同種異名: *Aspergillus aculeatus*) 之 ITS-5.8S rDNA 序列在 NCBI BLAST 比對結果。


Fig. 12. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* isolated from Beitou was BLASTed against NCBI database.



圖十三、利用 sinigrin-barium agar 鑑別具有 myrosinase 活性之真菌菌株。A.以 *Aspergillus oryzae* 作測試，左盤為 SBA，右盤則未加 sinigrin。左盤可清楚見到白色霧狀物；B.田間分離菌株實際的測試情況。

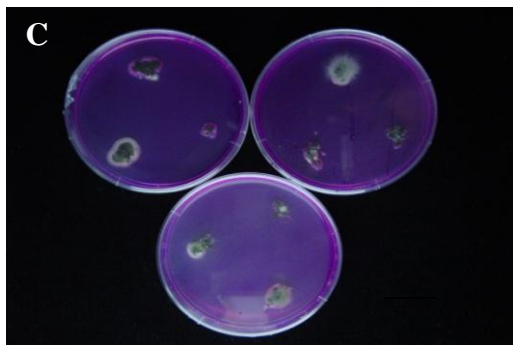
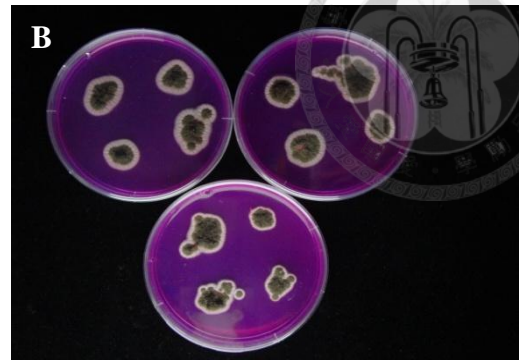
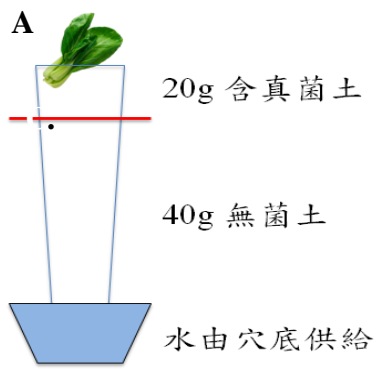
Fig. 13. Identification of myrosinase-producing fungi with sinigrin-barium agar. A. *Aspergillus oryzae* for control test. Left, colony on SBA. Right, colony on medium without sinigrin. B. The test of fungi isolated from fields.

A**B****C****D****E**



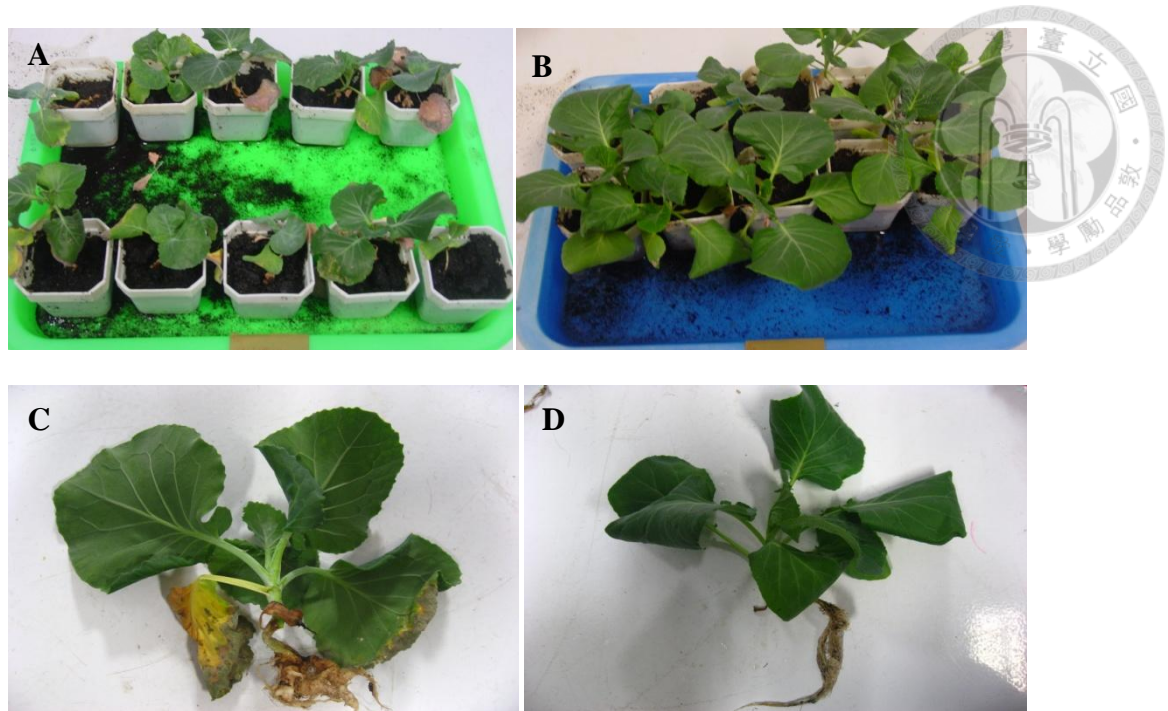
圖十四、產生芥子酶真菌在 10、15、20、25 及 30°C 下生長速度的分析結果，各溫度代表圖依序為 A、B、C、D、E。縱座標-菌落直徑大小(單位 cm)，橫坐標-天數；桃一、仁一、仁五皆為 *Humicola fuscoatra*，*Fusarium* 為從桃園分得之 *F. oxysporum*，*Aspergillus* 為從北投分得之 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*。

Fig. 14. The growth speed of myrosinase-producing fungi under different temperatures . 3 isolates of *Humicola fuscoatra* are from Taoyuan and Ren'ai. *Fusarium oxysporum* is isolated from Taoyuan. *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* is isolated from Beitou. Y-axis: diameter of colonies. X-axis: days.



圖十五、利用穴植管進行產生芥子酶真菌根圈定棲之測試。A. 試驗進行示意圖；
B. 定棲測試分離得到的 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 菌落在 Rose Bengal-PDA 培養基上的生長狀況，每盤中的各點代表穴植管內不同深度的土壤或根段；C. 自未接種真菌之穴植管土壤或根段分離真菌；D、E. 自培養菌落挑取孢子及產孢構造，於 40x 物鏡下之鏡檢圖，比例尺表示 10 μ m。

Fig.15. Dibbling-tubes planting for the colonization test of myrosinase-producing fungi. A. The schematic diagram of experiment. B. Conolies of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* from different soil depth on Rose Bengal-PDA. C. Fungi isolated from non-inoculated soil and roots in the dibbling-tube. D & E. Spores and sporulation structure of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*. Bar: 10 μ m.



圖十六、溫室防治測試。A、C-為僅於土中添加菜子粕者；B、D-為 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 和菜子粕組合之防治測試。

Fig. 16. Results of greenhouse prevention test. A & C. Canola meal. B & D.


Aspergillus japonicus var. *aculeatus* with canola meal.



圖十七、北投田間測驗採得之樣本圖；圖中根瘤分別代表：左-未處理；中-*Humicola* sp.加菜子粕；右-*Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* 加菜子粕。

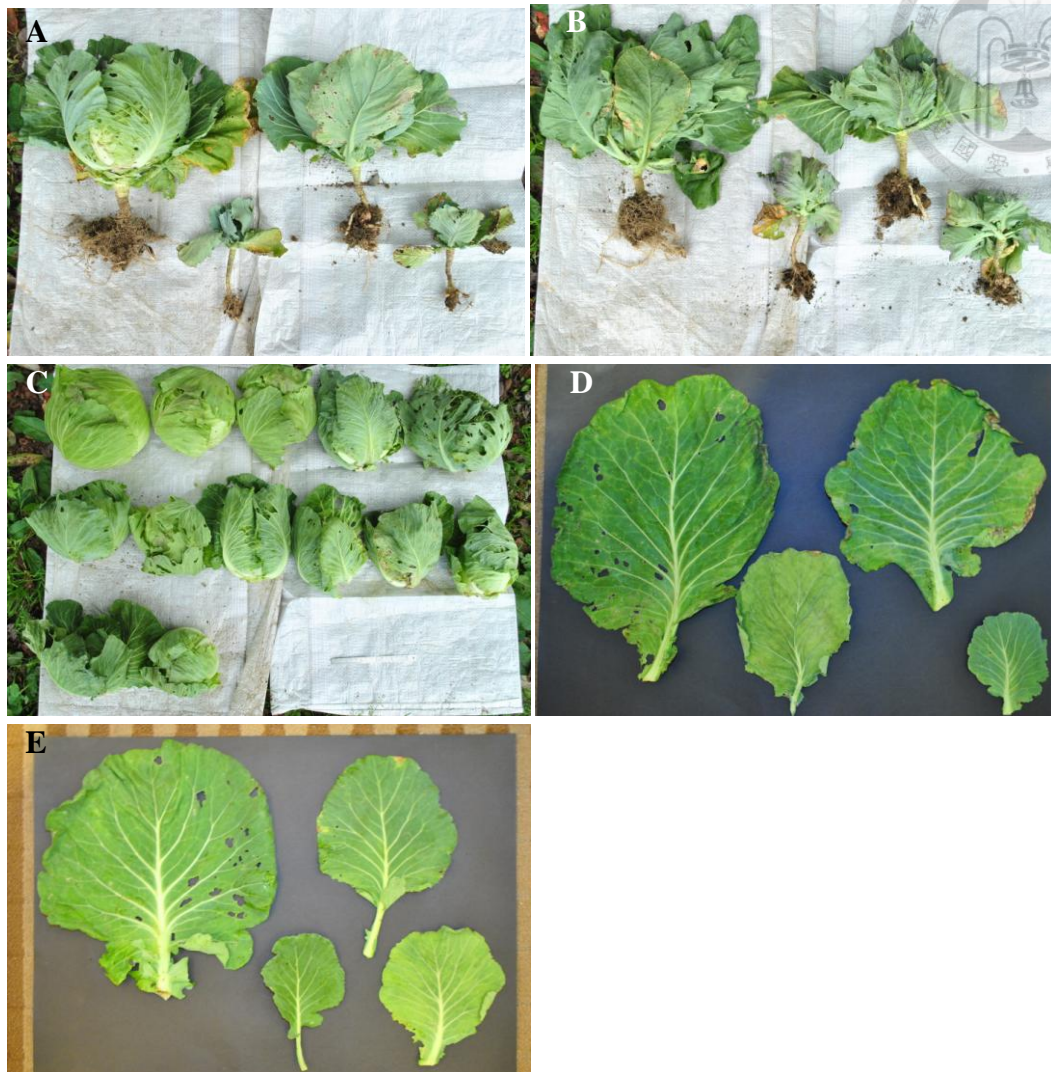
Fig. 17. Samples collected from Beitou. The roots of non-treated (left), treated with *Humicola* sp. with rape seed cake (middle), and *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* with rape seed cake (right).





圖十八、梅峰農場田間測試之實況。A、B 為測試前施用製劑後敷設塑膠布進行
燻蒸；C、D 為兩重複區；E-H 為各處理植株生長狀況，依序為處理 1: *Aspergillus*
japonicus var. *aculeatus* 製劑及菜子粕、處理 2: 僅有 *Aspergillus japonicus* var.
aculeatus 製劑、處理 3: 僅有菜子粕、處理 4: 未施任何處理。試驗以 RCBD 設計，
每個處理兩重複。

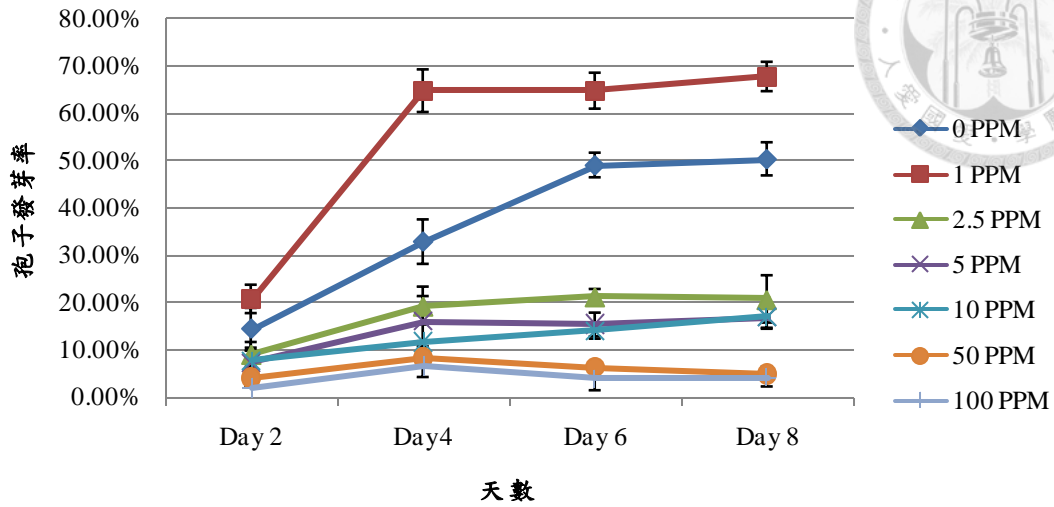
Fig. 18. Condition of field test in Meifeng farm. A & B. The plastic sheetings are covered on soil before the test. C & D. The areas of two repeats. E. Treatment 1. The formulation of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* with canola meal. F. Treatment 2. Only the formulation of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*. G. Treatment 3. Only canola meal. H. Treatment 4. Non-treated. The experiment is designed with RCBD method. Every treatment was repeated twice.



圖十九、地上部之呈現。A、B 為第一和第二重複之代表植株比較，由左至右依序為處理 1、2、3、4；C 為所有得到之 13 顆甘藍結球；D、E 為第一和第二重複之外葉大小之比較，由左至右依序為處理 1、2、3、4。

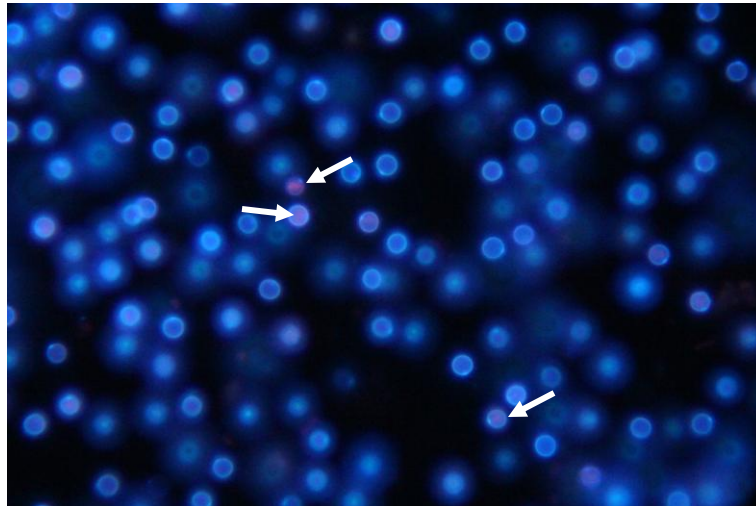
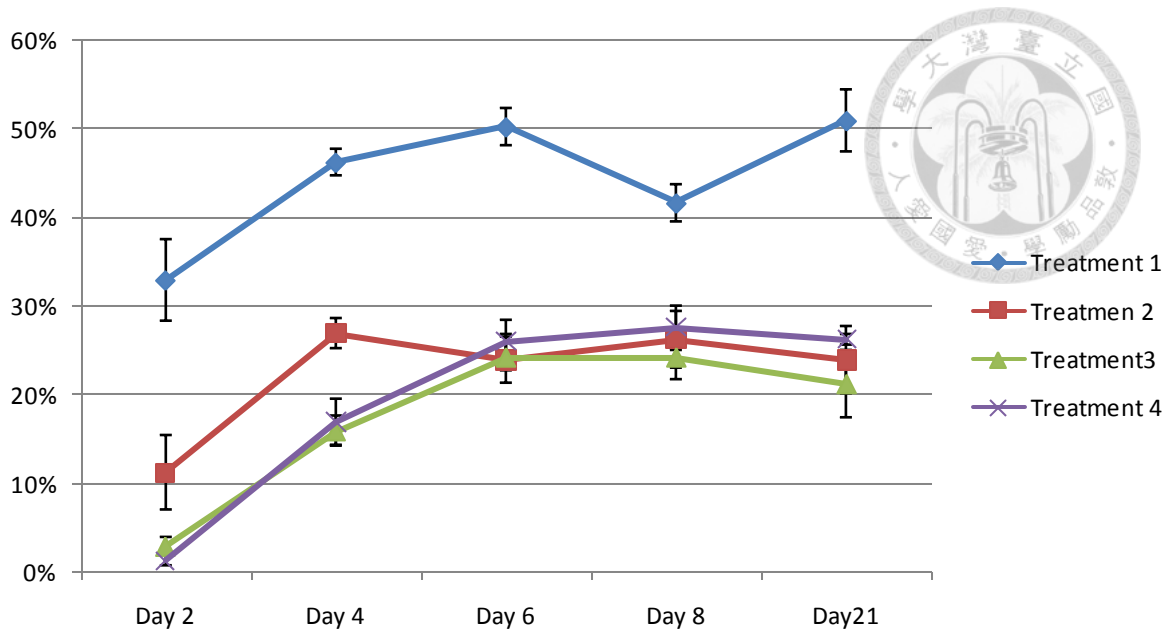
Fig.19. Above-ground parts of cabbage in Meifeng farm. A & B. Plants of the two repeats. The treatments are 1, 2, 3, and 4 from left to right in the figure. C. All cabbages in the test. D & E. Leaves of two repeats. The treatments are 1, 2, 3, and 4 from left to right in the figure.

AITC濃度和孢子發芽的關係



圖二十、根瘤病菌休眠孢子在不同濃度下異硫氰酸酯發芽率折線圖，下圖為 100X 鏡檢時觀察到之發芽與未發芽孢子，左圖空泡孢子為已發芽，右圖圓實孢子為未發芽（黑線表 1 μm ）。

Fig. 20. The upper chart of resting spore germination rate under different concentration of isothiocyanate. The lower left picture is the germinated spore. The lower right one is the non-germinated spore (Black bar is 1 μm .)



圖二十一、上圖為模擬生物燻蒸實驗中，不具感染活性(紅色螢光)之休眠孢子比例折線圖；處理 1-*Aspergillus* sp.和菜子粕；處理 2-菜子粕；處理 3-*Aspergillus* sp.；處理 4-未處理。下圖為休眠孢子經 CFW 和 EtBr 共同染色後之照片，箭號表紅色螢光之休眠孢子。

Fig. 21. The upper chart is about the percentage of uninfected (red fluorescence) resting spores. Treatment 1- *Aspergillus* sp. with canola meal. Treatment 2- canola meal. Treatment 3- *Aspergillus* sp. Treatment 4- non-treated. The lower figure is resting spores stained with CFW and EtBr. The white arrows are red resting spores stained by EtBr.

附錄


一、培養基

Rose-Bengal PDA	39 g PDA 0.05 g Rose Bengal 100 mg Streptomycin 1 L ddH ₂ O
Sinigrin barium agar	5 mM sinigrin 5 mM NH ₄ Cl 2.5 mM BaCl ₂ 1.5% Agar
Modified Hogland's Solution	1.0 mM CaCO ₃ 1.0 mM KNO ₃ 0.4 mM MgSO ₄ 0.4 mM KH ₂ PO ₄
1/2 PDA	19.5 g Potato dextrose agar powder 7.5 g Water agar powder 1 L Water

二、引子序列

Primer Name	Sequence
WC-33	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
WC-35	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
WC-682	5'-AAA CAA CGA GTC AGC TTG AAT GCT AGT-3'
WC1040	5'-GTG ACA GGC TGA CCC GAA GGA TTA- 3'
WC1041	5'-GTC ACA GGC TGT GAT CAG TC - 3'


三、圖



```
ACGTTACCTAAACCGTTGCTTCGGCGGGCGGGCCCGGGTCTTCCCGCGCCCTCGGCCCTCGCGGGCGC
+++++
TGCAATGGATTTGGCAACGAAGCCGCCCGGGCCAGGAAGGGCCGCGGGAGCCGGGAGCGCCCGCG
T L P K P L L R R A A R V L P G A P R P S R A
R Y L N R C F G G R P G S F P A P L G P R G R
Y V T . T V A S A G G P G P S R R P S A L A G A
CGCCCGGAGGAAAACCAAACCTATTGCATTGTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAC
+++++
GGCGGCCTCCTTTTGGTTTGATAACGTAACATACCGGAGAGACTCAGAAGACATGACTTATTCAGTTTG
P A G G K P N Y C I V W P L . V F C T E . V K T
P P E E N Q . T I A L Y G L S E S V L N K S K
R R R K T K L L H C M A S L S L L Y . I S Q N
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
+++++
AAAGTTGTTGCCTAGAGAACCAAGACCGTAGCTACTTCTTGCCTCGCTTTACGCTATTCATTACACTTAA
F N N G S L G S G I D E E R S E M R . V M . I
L S T T D L L V L A S M K N A A K C D K . C E L
F Q Q R I S W F W H R . R T Q R N A I S N V N
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGT
+++++
CGTCTTAAGTCACTTAGTAGCTTAGAACTTGCCTGTAACGCGGGCGGTCATAAGACCCCGTACGGAC
A E F S E S S N L . T H I A P A S I L A G M P
Q N S V N H R I F E R T L R P P V F W R A C L
C R I Q . I I E S L N A H C A R Q Y S G G H A C
TTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTGAAA
+++++
AAGCTCGCAGTAAAGTTGGTAGTTCGGGGCCCGAACACAACCCCTGGACGCCGACGGCGTCCGGGACTTT
V R A S F Q P S S P G L V L G T C G C R R P . N
F E R H F N H Q A P G L C W G P A A A A G P E
S S V I S T I K P R A C V G D L R L P Q A L K
TGCAGTGGCGGGCTCGCTGTCACTCCGAGCGTAGTAGTTACATCTCGCTCTGGGCGTGCTGCGGGTCCG
+++++
ACGTCACCGCCCGAGCGACAGTGAGGCTCGCATCATCAATGTAGAGCGAGACCCGCACGACGCCCAAGGC
A V A G S L S L R A . L H L A L G V L R V P
M Q W R A R C H S E R S S Y I S L W A C C G F R
C S G G L A V T P S V V V T S R S G R A A G S
GCCGTTAAAAGCCTTATTTACCCAAGGT
+++++
CGGCAATTTTCGGAATAAATGGGTCCA
A V K S L I Y P R
P L K A L F T Q G
G R . K P Y L P K V
```

圖一、自桃園分離之 *Humicola fuscoatra* 之 ITS-5.8S rDNA 序列。

Fig. 1. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Humicola fuscoatra* isolated from Taoyuan.



```

ACCTTGGGTAAATAAGGCTTTTAAACGGCCGGAACCCGCAGCAGCCCAGAGCGAGATGTAAC TACTACGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGAACCCATTTATTCGAAAATTGCCGGCCTTGGGCGTCGTGCGGGTCTCGCTCTACATTGATGATGCG
T L G K . G F . R P E P A A R P E R D V T T T
P W V N K A F N G R E N P Q H A R P Q S E M . L L R
Y L G . I R L L T A G T R S T P R A R C N Y Y A

TCGGAGTGACAGCGAGCCCGCCACTGCATTTTCAGGGCCTGCCGCAGCCGCAGGTCCCCAACACAAGCCCG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCCTCACTGTGCTCGCTCGGGCGGTGACGTAAAGTCCCGGACGCCGTCCGGCGTCCAGGGGTTGTGTTCCGGGC
L G V T A S P P L H F R A C G S R R S P T Q A R
S E . Q R A R H C I S G P A A A A G P Q H K P
R S D S E P A T A F Q G L R Q P Q V P N T S P

GGGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCGAACTACCAACTTTACTGCGAGCTTGTCCGTACGGGCGGTCTTATGACCGCCCGCGTTACACGCAAG
G L M V E M T L E Q A C P P E Y W R A Q C A F
G A . D W L K . R S N R H A R Q N T G G R N V R S
G L D G . N D A R R T G M P A R I L A G A M C V

AAAGATTGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCTAAGCTACTAAGTGACTTAAGACGTTAAGTGAATGAATAGCGTAAAGCGACGCAAGAAGTAGCTA
K D S M I H . I L Q F T L L I A F R C V L H R
K I R . F T E F C N S H Y L S H F A A F F I D
Q R F D D S L N S A I H I T Y R I S L R S S S M

GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGGACTTATTCAGTACAGAAGACTCAGAGAGGCCATACA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGTCTTGGTTCTCTAGGCAACAACCTTTCAAACCTGAATAAGTCATGTCTCTGAGTCTCTCCGGTATGT
C Q N Q E I R C . K F . L I Q Y R R L R E A I Q
A R T K E S V V C S F D L F S T E D S E R P Y
P E P R D P L L K V L T Y S V Q K T Q R G H T

ATGCAATAGTTTGGTTTTCTCCGGCGGGCGCCCGCAGGGCCGAGGGGCGCCGGAAGGACCCGGGCGCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACGTTATCAAACAAAAGGAGGCCCGCCCGGGCGCTCCCGGCTCCCGCGGCCCTTCTGGGCCCGGC
C N S L V F L R R A P A R A E G R R E G P G P
N A I V W F S S G G R P R G P R G A G K D P G R
M Q . F G F P P A G A R E G R G A P G R T R A

CCCGCCGAAGCAACGGTTTAGGTAACGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGCGGCTTCGTTGCCAAATCCATTGCA
P A E A T V . V T
P P K Q R F R . R
A R R S N G L G N V

```

圖二、自仁愛分離之 *Humicola fuscoatra* 之 ITS-5.8S rDNA 序列。

Fig. 2. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Humicola fuscoatra* isolated from Ren'ai.

ACGTTACCTAAACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGGGTCTTCCCGGCGCCCTCGGCCCTCGCGGGGCGC
 ++++++
 TGCAATGGATTTGGCAACGAAGCCGCCCGGGGCCAGGAAGGGCCGCGGGGAGCCGGGAGCCGCCCGCG
 T L P K P L L R R A A R V L P G A P R P S R A
 R Y L N R C F G G R P G S L P A P L G P S R G R
 Y V T T V A S A G G P G P S R R P S A L A G A
 CCGCCGGAGGAAAACCAAATATTGCATTGTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAC
 ++++++ 140
 GGCGGCTCCTTTTGGTTTGATAACGTAACATACCGGAGAGACTCAGAAGACATGACTTATTCAGTTTG
 P A G G K P N Y C I V W P L V F C T E V K T
 P P E E N Q T I A L Y G L S E S S V L N K S K
 R R R K T K L L H C M A S L S L L Y I S Q N
 TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
 ++++++ 210
 AAAGTTGTTGCCTAGAGAACCAAGACCGTAGCTACTTCTTGCCTCGCTTTACGCTATTCATTACACTTAA
 F N N G S L G S G I D E E R S E M R V M I
 L S T T D L L V L A S M K A A K C D K C E L
 F Q Q R I S W F W H R R T Q R N A I S N V N
 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATCTGGCGGGCATGCCTG
 ++++++ 280
 CGTCTTAAGTCACTTAGTAGCTTAGAACTTGGCGTAAACGCGGGCGGTATAAGACCGCCCGTACGGAC
 A E F S E S S N L T H I A P A S I L A G M P
 C R I Q I I E S L N A H C A R Q Y S G G H A C
 TTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTGAAA
 ++++++ 350
 AAGCTCGCAGTAAAGTTGGTAGTTCGGGGCCCGAACACAACCCCTGGACGCCGACGGCGTCCGGGACTTT
 V R A S F Q P S S P G L V L G T C G C R R P N
 F E R H F N H Q A P G L C W G P A A A A G P E
 S S V I S T I K P R A C V G D L R L P Q A L K
 TGCAGTGGCGGGCTCGCTGTCACTCCGAGCGTAGTAGTTACATCTCGCTCTGGGCGTGCTGCGGGTCCG
 ++++++ 420
 ACGTACCCGCCGAGCGACAGTGAGGCTCGCATCATCAATGTAGAGCGAGACCCGCACGACGCCCAAGGC
 A V A G S L S L R A L H L A L G V L R V P
 M Q W R A R C H S E R S S Y I S L W A C C G F R
 C S G G L A V T P S V V V T S R S G R A A G S
 GCCGTTAAAAGCCTTATTTACCCAAGGT
 ++++++ 448
 CGGCAATTTTCGAATAAATGGGTCCA
 A V K S L I Y P R
 P L K A L F T Q G
 G R K P Y L P K V

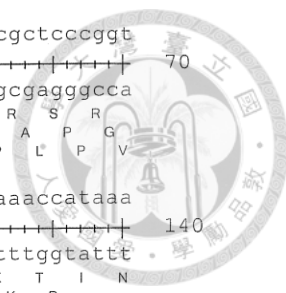
圖三、自仁愛分離之 *Humicola fuscoatra* 之 ITS-5.8S rDNA 序列。

Fig. 3. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Humicola fuscoatra* isolated from Ren'ai.

ACCTCCACCCGCTGCTTACCGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTCGGGCGGCCGGGGCCTGCC
 TGGAGGGTGGGCACGAATGGCATGGGACAACGAAGCCCGGGCGGAAGCCCGGGCCCGGGCCCGGACGGG
 T S H P C L P Y P V A S A G P P S G G P G P A
 P P T R A Y R T L L L R R A R L R A A R G L P
 H L P P V L T V P C C F G G P A F G R P G A C P
 CCGGGACCGCGCCCGGGAGACCCCAATGGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTCGATTGATAC
 GGCCCTGGCGGGGCGCCTCTGGGGTTACCTTGTGACAGACTTTCGCACGTACAGACTCAGCTAACTATG
 P G T A P A G D P N G T L S E S V Q S E S I D T
 P G P R P P E T P M E H C L K A C S L S R L I
 R D R A R R R P Q W N T V . K R A V . V D . Y
 CAATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
 GTTAGTCAGTTTTGAAAGTTGTTACCTAGAGAACCAAGCCGTAGCTACTTCTTGGCTCGCTTTACGCTA
 N Q S K L S T M D L L V P A S M K N A A K C D
 P I S Q N F Q Q W I S W F R H R . R T Q R N A I
 Q S V K T F N N G S L G S G I D E E R S E M R
 AACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC
 TTGATTACACTTAACGTCTTAAGTCACTTAGTAGCTCAGAACTTGGCGTGAACGCGGGGGACCATAAGG
 N . C E L Q N S V N H R V F E R T L R P L V F
 . T N V N C R I Q . I I E S L N A H C A P W Y S
 . L M . I A E F S E S S L . T H I A P P G I P
 GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTCCCCCTCCAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCGCGCCCCCCCGG
 CCCCCGTACGGACAGGCTCGCAGTAAAGAGGGGAGTTCGGGGCGACCAACAACCCGCGCGGGGGGGCC
 R G A C L S E R H F S P P A P L V V G P R P P G
 G G H A C P S V I S P L Q P R W L L G R A P P
 G G M P V R A S F L P S S P A G C W A A P P R
 GGGCGGCCTCGAGAGAAACGGCGCACCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTACCCGCTCTAT
 CCGCCCGGAGCTCTCTTTGCCCGCGTGGCAGGCCAGGAGCTCGCATACCCGAGACAGTGGGCGAGATA
 G G P R E K R R H R P V L E R M G L C H P L Y
 G A G L E R N G G T V R S S S V W G S V T R S M
 G R A S R E T A A P S G P R A Y G A L S P A L
 GGGCCCGCGGGGCTTGCCTCGACCCCAATCTTCTCAGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC
 CCGGGCCCGCCCCGAACGGAGCTGGGGGTTAGAAGAGTCTAACTGGAGCCTAGTCCATCCCTATGG
 G P G R G L P R P P I F S D . P R I R . G Y
 G A G A G A L L D P Q S S Q I D L G S G R D T
 W A R P G L A S T P N L L R L T S D Q V G I P

圖四、自桃園分離之 *Fusarium oxysporum* 之 ITS-5.8S rDNA 序列。

Fig. 4. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Fusarium oxysporum* isolated from Taoyuan.



```

ccgagtttacaactcccaaaccctgtgaacataccacttgttgccctcgccggatcagcccgtcccgt
70
+-----+
ggctcaaagtgtgaggggttggggacacttgtatgggaacaacggagccgctagtcggcgaggcca
P S L Q L P N P C E H T T C C L G G S A R S R
R V Y N S Q T P V N I P L V A S A D Q P A P G
A E F T T P K P L . T Y H L L P R R I S P L P V
aaaacgggacggcccagaggaccctaaactctgtttctatatgtaacttctgagtaaaaccataaa
140
+-----+
ttttgccctgcccggggtctcctggggatttgagacaaagatatacattgaagactcatttggattt
. N G T A R Q R T P K L C F Y M . L L S K T I N
K T G R P A R G P L N S V S I C N F . V K P .
K R D G P P E D P . T L F L Y V T S E . N H K
taaataaaaactttcaacaacggatctcttgggtctggcatcgatgaagaacgcagcaaaatgcgataag
210
+-----+
atthagttttgaaagttgttgccctagagaaccaagaccgtagctacttctgctgcttttacgctattc
K S K L S T T D L L V L A S M K N A A K C D K
I N Q N F Q R I S W F W H R . R T Q Q N A I S
. I K T F N N G S L G S G I D E E R S K M R .
taatggaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgcagttattctggc
280
+-----+
attacacttaacgtcttaagtcacttagtagcttagaaactgctgtaacgcccgggcataagaccg
. C E L Q N S V N H R I F E R T L R P P V F W
N V N C R I Q . I I E S L N A H C A R Q Y S G
V M . I A E F S E S S N L . T H I A P A S I L A
gggcatgcctgttcgagcgtcatttcaaccctcaagcacagcttgggtgttgggactcgcgttaattcgcg
350
+-----+
cccgtacggacaagctcgcagtaaagttgggagttcgtgctgaaccacaaccctgagcgaattaagcgc
R A C L F E R H F N P Q A Q L G V G T R V N S R
G H A C S S V I S T L K H S L V L G L A L I R
G M P V R A S F Q P S S T A W C W D S R . F A
ttcctcaaattgattggcgggtcacgtcgagcttccatagcgtagtagtaaaaccctcgttactggtaatc
420
+-----+
aaggagttaactaaccgccagtcagctcgaaggtatcgatcatcatttgggagcaatgaccattag
S S N . L A V T S S F H S V V V K P S L L V I
V P Q I D W R S R R A S I A . . N P R Y W . S
F L K L I G G H V E L P . R S S K T L V T G N
gtcgcggccacgccgttaaaccccaacttctgaatg
456
+-----+
cagcgcgggtgcggcaatttggggtgaagacttac
V A A T P L N P N F . M
S R P R R . T P T S E C
R R G H A V K P Q L L N

```

圖五、自北投分離之 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* (同種異名:*Aspergillus*

aculeatus)之 ITS-5.8S rDNA 序列。

Fig. 5. The ITS-5.8S rDNA sequence of *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*



GTGACAGGCTGACCCGAAGGATTAAGGCCCGAGGCCGACGGAGGGGAGTACTGTTCCCTTG
 SCL14UP →

AAAAGCATTGGGCATCGTGGAGCATGCGAAGATGAACAAAGTATGGTCGATGGAGGGAAA
 GCCCGCTTATATGTATAACTGAATAGTGTTAGCTTCCCATTAGTGTTACTCACACTAATTAAT
 TAGATTCCAATCCCACCTCCAGCCGGCCTTGAAGCATCTCCACCCGTTGTACCTGAACCTAT
 ACCTAAGCGGACTCATAGGGATCACCAAATTTACAGAAAAATTGGTGCTCCCCCAGCGGTG
 CTCGGCGTCTCTAATTCCTTGAACGTGTGTCGCCGTGGAGTTGTCCGATCCGACGGCGTCCCA
 CGCAATCCGCTGCCGTTGGGCGCTACCTATACTCTGTGACAGATCTGCTCAGATCTGTGGTC
 CCGTTAAAGACTCTACCTAAACGGTTAGGTATAGGTACAACGGGTGGGGAACGAATTCATT
 ATCATTATCTCTAAATCTACGGAAAAATTTAGGTTTAGGTACAACGGGTGAAGATGCTCTTG
 ATATGGGTACGTTAGATCTCGGAATGTCCGTGCACCAAGATGACCTCACGGAGTGGTGGCG
 GACACCGCAGGAGAATGGACCCTCAGACTCTTGACGGAATGGACAAATTCGACTCAACGA
 CCGACTCCGTTTGCCTTCTCGTCATGTGGTTTTCTGGATTCTGGGATATATCATCTGAAG
 TCTTCGACGTTGTCGCACATTGCAGCGAGTAAGTCGCGCTCGGGCTGGACGACGTCCTTGA
 CAACGGCTTTTGTGCGTTGACCGCATACGGGCGTTTGCCGCGGTTGCTCCTGATGGCCGTCGGT
 CTTTGATTGTCGTCGCCGTTGGGAACACTATCGGGCGAGCTCCAGTGTTCACTGCCGGAACCA
 GCGACATCAATTGCCATCTCGAGCAATGGCTTGTACATCGCTATCGGAAGCGCGAGCGGCCA
 CGTGATACATCTGGTCGACAACACTACAGGCGCAATGTTATCAACATTCCGTCCTCATCTCAGAC
 AAATTGACGTCCTTGCAATCACCGACGATAACGCGTTTCTATGCGCTGGTGGGCAGGACGCC
 GTTGCTAACGCGTATGCCTTCGCAGATTGTACGCAGGGTTCCTCTCGGTCTTCGAACCAGTT
 CCAGTTTCACGCTGGACTGATCACAGCCTGTCAC
 ← SCL14LP

圖六、*Plasmodiophora brassicae* RAPD 標記序列圖，箭頭處即為本研究所利用的引子對 (Manzanares-Dauleux *et al*, 2001)

Fig. 6. RAPD sequence of *Plasmodiophora brassicae*. Arrows are primer set used in this research (Manzanares-Dauleux *et al*, 2001).

三、表

表一、Manzanares-Dauleux 等人 (2001) 的分群結果

Table 1. The grouping of pathotype by Manzanares-Dauleux *et al* in 2001.



Pathotype	Differential host <i>B. napus</i>		
	ECD 6 cv. Nevin	ECD 10 cv. Wilhelmsburger	cv. Brutor
P1	+	+	+
P2	+	-	+
P3	-	-	+
P4	-	-	-
P5	-	+	+
P6	+	-	-
P7	-	+	-
P8	+	+	-