

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

菱角炭疽病之流行病學及非農藥防治

Epidemiological study and non-pesticide control of
anthracnose disease of water caltrops

林彥安

Yen-An Lin

指導教授：孫岩章 博士

Advisor: En-Jang Sun, Ph.D.

中華民國 105 年 1 月

January, 2016



國立臺灣大學碩士學位論文



口試委員會審定書

菱角炭疽病之流行病學及非農藥防治
Epidemiological study and non-pesticide control of
anthracnose disease of water caltrops

本論文係林彥安君（學號 R02633023）在國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程完成之碩士學位論文，於民國 105 年 1 月 21 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：

孫岩章 博士 孫岩章 (指導教授)
國立臺灣大學植物病理與微生物學系 教授

郭章信 博士 郭章信
國立嘉義大學植物醫學系 副教授兼系主任

楊秀珠 博士 楊秀珠
行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 研究員

鍾嘉綾 博士 鍾嘉綾
國立臺灣大學植物病理與微生物學系 助理教授

誌謝



兩年半的研究所時光，從懵懂的最初、忙碌的田間調查、寫論文的緊湊到最後口試前的慌張，最終還是劃下一個暫時的休止符。自生科領域跨越到生農領域開始，各種新挑戰不斷的出現，尤其是兩年田間調查期，更讓我了解即便理論學的專精，亦還是需要累積經驗才能解決問題。

感謝孫老師的指導，即使是臺灣菱這麼難做的題目，還要跑無敵遠的路程做調查，老師還是支持我構想出來的題目，在登革熱大爆發的期間，還擔心臺灣菱的水池會不會有病媒蚊孳生。其次要感謝口試委員們，三位口試委員在口試時求好心切的建議，卻又不過度的給予壓力，讓我在口試時壓力減緩不少，對於自己的實驗也能有信心的侃侃而談，而且下了講台，更發現每一本論文初稿都註記了密密麻麻的叮嚀，更是倍感窩心。

在做實驗及寫作論文時，總會有很多無法預測的麻煩，感謝臺南官田友善大地有機聯盟的幫忙，讓我得以取得試驗用的菱角苗及調查田區。還有要感謝實驗室的韋辰、立雯、佩琳、嘉玲、鈺平、政融、志千及其他實驗室同仁，在我種植臺灣菱與做實驗時給予的建議及協助。最後特別感謝嘉義大學森林系的古鎮嘉學弟，在我寫論文沒辦法好好研究統計之時，義不容辭的幫忙，讓論文能順利完成。

中文摘要



臺灣菱 *Trapa taiwanensis* Nakai 為一年生之水生作物，是臺南官田地區大宗之經濟作物，適合栽培於低窪的沼澤地或池塘。常見病害有炭疽病及白絹病兩種，炭疽病由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig 所引起，主要為害植株葉片，尚可為害葉柄及果實。發病初期在葉表產生黑褐色之細小斑點，嚴重時多數病斑則會癒合成不規則之大班塊，葉片變薄凹陷且容易破裂。本研究主要在確認其病原性及官田地區之流行病學調查，並選取植物萃取液與拮抗微生物測試其防治潛力。所得之分離株經科霍氏法則測試分離株之病原性，再以分子生物學鑑定後，確認其為菱角炭疽病病原。將此病原以不同溫度培養，發現在 25°C 時菌絲生長速度最快。在流行病學調查中，發現需經過夏季長時間之降雨，田間方會開始出現菱角炭疽病之病株，此病害嚴重度會持續到 12 月，直到冬季結束。將田間病害嚴重度與前一個月總降雨量進行分析，發現 2014 年與 2015 年之相關係數分別為 0.9371 及 0.9297；若將符合適合發病溫度、蒲氏二級風級、降雨三種條件之時數作為綜合因子進行分析，發現病害嚴重度與前一個月之綜合因子相關係數分別為 0.9485 及 0.9271，顯示溫度、風速、降雨對於病害發生具正相關性。在研究非農藥防治方面，發現拮抗微生物之抑制效果較中草藥萃取液顯著。共 9 種中草藥之水萃取液對抑制菱角炭疽病效果不佳，而酒精萃取液雖在孢子抑制及菌絲生長抑制有良好效果，但實際應用於盆栽試驗時則未見顯著效果。在拮抗微生物防治方面，將盆栽試驗表現較佳之枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)及放線菌 YU01(*Streptomyces* sp.)在接種前三天施用於盆栽上，可達到約 45%之防治效果。而木黴菌(*Trichoderma asperillum*)雖然在 PDA 上有良好抑制率，但在盆栽試驗中只有約 30%防治效果。除非農藥資材外，農用藥劑中以待克利及貝芬替抑菌效果最佳。本研究亦以芒果炭疽病菌、草莓炭疽病菌、文旦炭疽病菌進行交叉感染試驗，發現此三種炭疽病皆不會在臺灣菱葉片造成病徵。

關鍵字：臺灣菱、炭疽病、流行病學、非農藥防治

Abstract

Water caltrops (*Trapa taiwanensis* Nakai) is a common annual aquatic crop in Guan Tian, Tainan. It adapts well in wetland like swamp or paddy areas. The most common diseases affecting water caltrops are anthracnose and sclerotium rot. The anthracnose disease of water caltrops is caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig. On water caltrops, the anthracnose can cause black spot symptoms that can coalesce into big lesions on leaves, petiole and fruits. This study is aimed to confirm the pathogenicity of anthracnose fungi on water caltrops and to investigate the epidemiology of this disease in Guan Tian area. Some herbal material extracts and antagonistic microorganisms are also evaluated for their potential for controlling this disease. Through the pathogenicity tools and molecular identification, we accomplish the Koch's postulates of this disease. Culturing this pathogen at different temperatures showed that the pathogen grows best at 25°C. The epidemiological study from 2014 to 2015 showed that the disease occurred after a long period of raining summer season and may continue to the winter time. The correlation coefficient between last-monthly rainfall and disease severity in 2014 and 2015 are 0.9371 and 0.9297, respectively. If we combine the favorable rainfall, temperature and wind speed in together, the correlation coefficient between favorable hours and the disease severity in 2014 and 2015 can be as high as 0.9485 and 0.9271, respectively. Results indicated that the disease severity is positively correlated with favorable temperature, high wind speed and high rainfall. The non-pesticide control study showed that antagonistic microorganism had better effectiveness than herbal extracts. Water extracts of all herbal material showed low control rate on PDA. Although ethanol extracts of all nine herbal material showed significant inhibition rate in spore germination and mycelial growth tests, they didn't have good effectiveness in the pot plant test. Both *Bacillus subtilis* and *Streptomyces* sp. YU01 has about 45 % control rate

in pot plant test, when applied 3 days before inoculation with pathogen. Whereas *Trichoderma asperillum* expressed only about 30% control rate in pot plant test. Besides non-pesticide materials, difenoconazole and carbendazim showed best satisfactory to control this disease. We also found that anthracnose isolates from mango, strawberry and pomelo, cannot cause anthracnose disease on the water caltrops.

keyword : Water caltrops ; anthracnose ; epidemiology ; non-pesticide control

目錄



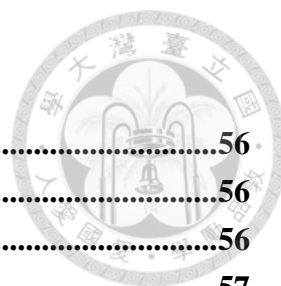
口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
ABSTRACT	iv
目錄	vi
表目錄	ix
圖目錄	x
第一章 前言	1
一.臺灣菱之簡介	1
二.臺灣菱之栽培管理	2
三.研究目的	3
第二章 前人研究	4
一.炭疽病菌	4
二.菱角炭疽病	5
三.中草藥萃取液防治法	6
四.拮抗微生物防治法	8
(一)枯草桿菌	8
(二)木黴菌	8
(三)鏈黴菌	9
五.植物流行病學	10
第三章 材料與方法	11
一.臺南市官田地區臺灣菱菱角炭疽病之田間調查	11
二.菱角炭疽病之病原菌分離、保存及鑑定	11
三.菱角炭疽病分離株之病原性測試	12
(一)供試健康臺灣菱植株之栽種	12
(二)接種源之製備	12
(三)臺灣菱葉部以孢子懸浮液進行傷口接種之試驗	12
(四)人工接種菱角炭疽病之病原再分離	13
四.菱角炭疽病菌分離株之鑑定	13



(一)型態學鑑定	13
(二)分子生物學鑑定	13
五.溫度對菱角炭疽病菌菌絲生長速度之影響	14
六.臺南地區菱角炭疽病流行病學調查	14
(一)調查樣區	14
(二)菱角炭疽病葉片危害重度調查方法	14
(三)氣象資料來源	15
七.菱角炭疽病之非農藥防治	15
(一)非農藥資材來源	15
(二)中草藥萃取液對孢子發芽抑制之試驗	18
(三)中草藥萃取液對菌絲生長抑制之試驗	18
(四)拮抗微生物對峙培養試驗	19
(五)植物萃取液對菱角炭疽病之盆栽防治試驗	19
(六)拮抗微生物對菱角炭疽病之盆栽防治試驗	19
八.農藥對菱角炭疽病菌絲生長抑制試驗	20
九.以不同來源炭疽病菌對臺灣菱進行病原性之測定	21

第四章 結果

一.臺灣南部地區臺灣菱菱角炭疽病之田間調查	22
二.臺灣菱菱角炭疽病之病原菌分離及初步鑑定	24
三.臺灣菱炭疽病分離株之病原性測試	27
(一)供試健康台灣菱之栽種	27
(二)接種源之製備	27
(三)臺灣菱葉片以孢子懸浮液接種之試驗	27
(四)人工接種臺灣菱菱角炭疽病之病原再分離	29
四.菱角炭疽病分離株之鑑定	29
(一)菱角炭疽病菌 GL05 分離株之 DNA 片段之 PCR 增幅及 NS 序列分析	29
(二)病原菌之型態學鑑定	32
五.溫度對菱角炭疽病菌菌絲生長速度之影響	33
六.臺南地區菱角炭疽病流行病學調查	34
七.菱角炭疽病之非農藥防治	40
(一)中草藥萃取液對菱角炭疽病孢子發芽之抑制試驗	40
(二)中草藥萃取液對菱角炭疽病菌菌絲生長之抑制試驗	44
(三)拮抗微生物對菱角炭疽病菌對峙培養試驗	48
(四)中草藥萃取液對菱角炭疽病之盆栽防治試驗	50
(五)拮抗微生物對菱角炭疽病之盆栽防治試驗	51
八.農藥對菱角炭疽病菌絲生長抑制試驗	53
九.以不同來源炭疽病對臺灣菱進行病原性之檢測	54



第五章 討論

一.臺灣南部菱角炭疽病之田間調查	56
二.菱角炭疽病之病原分離及初步鑑定	56
三.菱角炭疽病分離株之病原性檢測	56
四.菱角炭疽病分離株之鑑定	57
五.溫度對菱角炭疽病菌菌絲生長速度之影響	57
六.臺南地區菱角炭疽病之流行病學調查	58
七.菱角炭疽病之非農藥防治	59
八.農藥對菱角炭疽病菌絲生長抑制	59
九.以不同來源炭疽病對臺灣菱進行病原菌之檢定	60
參考文獻	61



表目錄

表一 菱角炭疽病葉片罹病指數標準	15
表二 本研究用以進行非農藥防治菱角炭疽病之中草藥種類及其前處理方法	17
表三 臺灣南部地區菱角炭疽病之病害調查結果	23
表四 臺灣南部臺灣菱炭疽病病株以組織塊分離法分離病原之結果	25
表五 臺灣南部臺灣菱以稀釋分離法分離病原之結果	25
表六 臺灣南部臺灣菱分離所得菱角炭疽病菌分離株及其來源	25
表七 臺灣南部臺灣菱炭疽病菌分離株接種健康臺灣菱之結果	28
表八 菱角炭疽病菌 GL05 以引子對 NS1/NS6 經 PCR 增幅所得之序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果	32
表九 菱角炭疽病菌株 GL05 於不同溫度下培養 5 天之菌絲生長長度	34
表十 2014 年與 2015 年兩期菱角炭疽病嚴重度調查數據與相關氣象因子	36
表十一 臺南官田地區菱角炭疽病嚴重度與官田地區前一月氣象資料之相關分析	40
表十二 9 種中草藥水萃取液對菱角炭疽病 GL05 孢子發芽率之影響	41
表十三 酒精及待克利對菱角炭疽病菌株 GL05 孢子發芽之影響	42
表十四 9 種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌 GL05 孢子發芽率之影響	43
表十五 酒精及農藥對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之影響	45
表十六 9 種中草藥水萃取液對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之影響	46
表十七 9 種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之影響	47
表十八 枯草桿菌、木黴菌及放射線菌 YU01 對菱角炭疽病菌株 GL05 對峙培養之菌絲生長結果	49
表十九 6 種中草藥萃取液對菱角炭疽病菌 GL05 在盆栽防治試驗之結果	51
表二十 三種拮抗微生物對菱角炭疽病菌株 GL05 在盆栽防治試驗之結果	52
表二十一 五種農用殺菌劑對菱角炭疽病菌 GL05 菌絲生長之影響	53
表二十二 四種不同炭疽病菌接種於臺灣菱葉片造成炭疽病之發病率	55

圖目錄

圖一 臺灣菱以菱角炭疽病孢子懸浮液接種後保溼處理之狀況.....	12
圖二 2014年9月於官田區隆本里有機菱角田發生之菱角炭疽病葉片病徵.....	23
圖三 2014年9月於官田區隆本里有機菱角田發生之菱角炭疽病.....	24
圖四 菱角炭疽病病菌於PDA培養後產生之分生孢子.....	26
圖五 臺灣南部菱角炭疽病分離株GL05接種臺灣菱15天後之發病情形.....	29
圖六 菱角炭疽病菌分離株GL05以引子對NS1/NS6進行PCR增幅所得之DNA片段電泳圖.....	30
圖七 菱角炭疽病菌GL05以引子對NS1/NS6進行PCR增幅後所得之DNA序列.....	30
圖八 菱角炭疽病菌株GL05於葉上產生之分生孢子盤.....	33
圖九 菱角炭疽病GL05培養於PDA之菌落形態.....	33
圖十 臺南地區菱角炭疽病病於2014年5月至12月病勢發展曲線.....	37
圖十一 臺南地區菱角炭疽病病於2015年7月至12月病勢發展曲線.....	37
圖十二 2014年5月至12月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與符合發病溫度、蒲氏二級風力之降雨時數(綜合條件時數)分析.....	38
圖十三 2015年7月至11月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與符合發病溫度、蒲氏二級風力之降雨時數(綜合條件時數)分析.....	38
圖十四 2014年5月至12月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與月總降雨量間之相關.....	39
圖十五 2015年7月至11月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與月總降雨量分析間之相關.....	39
圖十六 9種中草藥水萃取液對菱角炭疽病菌GL05孢子發芽抑制率.....	41
圖十七 酒精及農藥處理對菱角炭疽病GL05孢子發芽抑制率.....	42
圖十八 9種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌GL05之孢子發芽抑制率.....	44
圖十九 酒精及農藥處理對菱角炭疽病菌株GL05菌絲生長之影響.....	46
圖二十 9種中草藥水萃取液對菱角炭疽病菌株GL05菌絲生長之抑制率.....	47
圖二十一 9種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌株GL05菌絲生長之抑制率.....	48
圖二十二 枯草桿菌、木黴菌及放射線菌YU01對菱角炭疽病菌株GL05對峙培養之菌絲生長示意圖.....	49

圖二十三 枯草桿菌、木黴菌及放射線菌 YU01 對菱角炭疽病菌株 GL05 對峙培養之菌絲生長抑制率.....50

圖二十四 5 種農用殺菌劑對菱角炭疽病 GL05 之菌絲生長抑制率.....54



第一章 前言



一、臺灣菱之簡介

臺灣菱(*Trapa taiwanensis* Nakai)為一年生之水生作物，在植物分類上屬於菱科(Trapaceae)、菱屬(*Trapa*)之植物，根部固定於沼澤、埤塘之鬆軟淺泥中；莖部細長上有浮水葉簇生於頂，平貼於水面的簇生浮水葉被稱為菱盤；葉片為菱型，分為沉水葉及浮水葉，葉柄具膨大的海綿質氣囊，可幫助浮水葉平貼於水面；花白色，具四片花瓣；果實分為鈍角及尖刺型，為不開裂之堅果(劉，2000)。

臺灣菱適合種植於高溫多溼且日照充足的池塘、沼澤地，經濟栽培時水深宜 60 公分以上，種植區域分布於嘉義縣民雄鄉、新港鄉，南至屏東林邊鄉皆有零星栽培，主要經濟栽培區則為臺南市官田鄉、下營鄉，全臺灣種植總面積約為 500 公頃。農民多於水田一期稻收穫後輪植臺灣菱。每年 9 至 11 月為盛產期，每株臺灣菱約可產出 60 至 70 顆菱角，一年約可循環採收 6 次，產量甚豐(陳和李，1999)。

臺灣之菱角品種依據臺灣植物誌第二卷記載共有三種原生種，分別為鬼菱、菱、臺灣菱(黃，1993)，此外亦有小果菱與自中國引進栽培的四角菱等品種。臺灣菱因栽培技術提升及觀光推廣等原因，產量、栽培面積都有顯著提升，每公頃產量可由 5000 至 6000 公斤提升到 10000 公斤以上。臺灣菱果實除可以做為糧食外，也常供作湯品、炒食，採收後剩下的根、莖、葉部分則可以做為下一季稻作的綠肥。另有報導指出，臺灣菱之果皮可以提煉出抗氧化物質等，未來若能以此發展產業，不但可以解決採收後果皮處理之苦，亦能為臺灣菱產業開創新的方向。

依據 2007 年中華農學會報 8(5):470-483 的報導，臺灣菱角種植區域以官田為主要栽培區，山上、左營、西庄、鹿草、大寮、臺東、麻豆、桃園皆有零星栽培，菱角也因此產生些微族群變異，可以性狀、產量、組成成分再細分為四大群(張等，2007)，然而產量遠不及官田地區，因此市面上仍多以官田菱角為主，市面上販售則通稱為菱角或龍角。



二、臺灣菱之栽培管理

臺灣菱性喜高溫多濕，生育結實最適溫度為 25°C-36°C 之間，性喜池塘、沼澤地，雖於水中即可生長，但經濟栽培時以水深 60 公分以上最為適合，底部土壤以富含礦物質及腐植質之砂質壤土或砂質黏土為佳 (陳和李，1999)。官田地區之栽種時期可分為育苗期與本田期。育苗期主要在農曆年後(約為二月)，將前一年收成之果實種於低淺之小型水田中，至六月一期稻作收成後，引水將水田深度提高至 60 公分(約膝蓋以上)，而後將育苗區之臺灣菱苗移植至本田區種植，6 月至 11 月為開花結果期，而 9 月至 12 月為主要盛產期，每塊田區約可採收 6 至 7 次，採收完畢後則放水輪作水稻，每年如是循環。

臺灣菱採實生栽培，每年採收後需篩選果實碩大，外型飽滿之果實留種，篩選時常將果實置於鹽水中，以果實沉水程度作為依據，越接近底部者品質越好，可做為來年之種苗來源。種植時多將 4 至 5 株幼苗綁成一束，每一束距離約 70 至 90 公分定植於水田土壤中，每公頃約定植 3000 至 5000 株，於清晨、陰天或氣溫較低時定植較佳。臺灣菱栽種初期需有至少約 60 公分之間距，因栽種期間菱盤會分化而導致間距縮小，栽種後期時常有菱盤重疊之現象，若菱盤重疊現象過於嚴重易導致病害嚴重發生，難以防治。種植期間可能因施肥及光照充足產生大量藻類，此時需以人工方式清除，以利臺灣菱之菱盤、根部發育。

臺灣菱為一年水生作物，根據文獻記載，臺灣發生之臺灣菱病蟲害種類，病害共有 3 種；蟲害部分主要有 2 種。主要的病害包含菱角炭疽病，由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penzing 造成 (陳和李，1999)；菱角白絹病，由 *Sclerotium rolfsii* Sacc. 所造成 (蔡等，1981)。次要病害菱角紋枯病，則由 *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk 所造成 (李等，1989)。嚴重危害的昆蟲有菱角金花蟲 (陳等，2003)、褐帶紋水螟蛾(*Parapoynx crisonalis*)等共兩種，有害動物則有福壽螺一種 (陳和李，1999)。



三、研究目的

臺大植微系植醫研究室於 2012 年夏天於臺南官田地區採集回菱角炭疽病植株，並由葉部分離出炭疽病菌。作者於 2013 年再度於官田地區發現相同病徵之臺灣菱，並對臺灣菱之產量造成嚴重損失，農民曾嘗試以農用藥劑進行防治，但未見卓越效果，且臺灣菱種植於水域，使用過多農用藥劑可能影響水生生物生存，嚴重更可能導致水源汙染。

本研究分別於 2014 年 5 月至 12 月與 2015 年 7 月至 12 月，進行為期兩季之臺灣菱田區炭疽病菌危害嚴重程度之調查，希冀能對於菱角炭疽病之發生生態有更深層的了解。於調查期間，亦將病株採回重新接種於健康臺灣菱植株，篩選現行藥劑以外之非農藥等進行防治之研究，鑑於國人對於農產品安全之要求與日俱增，希望能找出良好之防治方式，並能增加臺灣菱之產量，同時減少對於環境之負荷。

第二章 前人研究



一、炭疽病菌

炭疽病菌 (*Colletotrichum spp.*) 在分類學中屬真菌界 (Fungi)、子囊菌門 (Ascomycota)、囊殼菌綱 (Sordariomycetes)、小叢殼目 (Glomerellales)、小叢殼科 (Glomerellaceae)、炭疽病菌屬 (*Colletotrichum*) (Réblová *et al.*, 2011)，目前被列為世界十大重要真菌性植物病原第八名 (Dean *et al.*, 2012)。炭疽病菌可為腐生、寄生菌 (Hyde *et al.*, 2009b)，危害之植物寄主十分廣泛，在臺灣至少有206種寄主植物，包含果樹、蔬菜、觀賞花卉等 (中華民國植物病理學會，2002)，且單一病菌亦可能感染多種植物。炭疽病菌除直接感染植物，造成收成欠佳外，亦會潛伏感染，造成採收後之損害，並農產品進出口時造成經濟損失。

在自然界中，炭疽病菌主要以分生孢子作為感染源，在高濕度的環境下發芽產生發芽管，尾部膨大形成附著器，以附著器侵入植物組織後，可在寄主上產生葉斑、萎凋等病徵，植物死亡後會在殘體中殘存，作為下次的感染源 (Cannon *et al.*, 2012)。

現今炭疽病菌屬 (*Colletotrichum*) 之鑑定主要分兩種，傳統上以寄主範圍及形態構造特徵為分類依據，但因培養時間、環境以及鑑定者之誤差，常使菌種之分類出現分歧。目前則多以分子鑑定作為較準確之分類方式，其中又以多基因座分析探討炭疽病菌親緣關係、種間鑑定最為廣泛應用 (胡，2013)。現今炭疽病菌之種類持續增加，至2013年世界上已有文獻記載之炭疽病已增加至128種，而田間常見之三大複合種 *gloeosporioides complex*、*boninense complex*、*acutatum complex* 之分類研究在近年間才有顯著的進步 (Weir *et al.*, 2012)，未來是否會變動則尚未可知。

二、菱角炭疽病

臺灣菱為菱科(Trapaceae)、菱屬(*Trapa*)之一年生水生作物(黃, 1993), 適合栽培於低窪的沼澤地或池塘, 為臺南官田地區常見之經濟作物。種植方式主要與水稻輪作, 並在第一期稻作收成後, 將每年二月播種於育苗池之菱角移入本田區, 每年九月至十一月為主要收穫期(阮, 1995)。

臺灣菱已知病害有三種分別為菱角炭疽病、菱角白絹病、菱角紋枯病, 田間常見之主要病害則為菱角炭疽病及菱角白絹病, 菱角紋枯病則少見或零星發生。菱角炭疽病由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig 所引起, 主要危害植株葉片, 尚可為害葉柄及果實(陳和李, 1999)。

本病害發生最適合溫度為 24-28°C, 發病初期在葉表產生黑褐色之細小斑點, 嚴重者則會癒合成不定型之大班塊, 葉片變薄、黑褐化乾枯(陳和李, 1999)。依照植物保護手冊, 推薦用藥共有 24.9% 待克利乳劑(Difenoconazole)、70% 甲基鋅乃浦可濕性粉劑(Propineb)、50% 撲克拉錳可濕性粉劑(Prochlorate manganese)等三種(費和王, 2007)。

三. 中草藥萃取液防治法

植物作為生活常用之中草藥行之有年，主要源自於植物本身含有的特殊物質，這些物質包含生物鹼(Alkaloids)、皂素(Saponins)、香豆素(Coumarin)、酚類(Phenols)、單寧(Tannins)、葡萄糖苷(Glucosides)、類胡蘿蔔素(Carotenoids)、類黃酮(Flavonoids)、類萜(Terpenoids)等 (Cowan, 1999)。而這些天然產物也在近年來被學者以不同溶劑製作成萃取液，用以防治植物病蟲害。研究中指出防治病害之中草藥萃取液機制大致分成兩類，第一類為萃取液中含抗菌物質，可直接抑制病原菌生長、抑制真菌孢子發芽；第二類則是誘導植物產生抗性，提高植物抗性以防治病害 (Das et al. 2010)。

由於炭疽病被列為世界十大重要真菌性植物病原第八名 (Dean et al. 2012)，因此以植物作為防治資材的研究亦相當多。在抑制孢子發芽的研究中，Souza Júnior 以香茅、番石榴、丁香、羅勒等精油抑制 *C. gloeosporioides* 孢子發芽，發現在濃度 1,000 $\mu\text{L/L}$ 可完全抑制孢子發芽 (Souza Júnior et al. 2009)；大風子之水萃取液、酒精萃取液對於白菜炭疽病的孢子發芽抑制效果極佳，甚至可達到完全抑制的效果 (謝等, 2005)。在菌絲生長抑制之報導中，2009 年 Souza Júnior 發現香茅在濃度 1,000 $\mu\text{L/L}$ 下可完全抑制炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 菌絲生長 (Souza Júnior et al., 2009)；濃度 0.06% 百里香精油就可使 *C. gloeosporioides* 菌絲停止生長 (Bosquez-Molina et al. 2010)。

除直接測試防治效果外，許多研究亦針對植物資材研究其所含之有效成分，如：霍香所含的單帖類 methyl chavicol，能有效抑制炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 孢子發芽 (Costa et al., 2015)。此外，methyl chavicol 亦能有效抑制細菌的生長 (Kim 2008)；五味子富含 cadinane type compounds (Song et al., 2007)，這些物質被認為具有抑制真菌生長的效果 (Wu et al., 2005)；丁香主要抑菌物質為丁香酚 (eugenol)，可使立枯絲核菌細胞壁穿孔、菌絲原生質滲漏、菌絲表面皺縮，並抑制菌絲生長 (林等, 2002)；在肉桂的研究中，在過往即有學者提出肉桂醛為抑制真菌的主要物質，2008 年亦有學者指出其抑制真菌的效果主要來自於肉桂醛 (cinnamaldehyde)

等物質的化學結構 (Cheng et al, 2008)；薑黃萃取出的薑黃素Curcuminoids能有效的抑制炭疽病的菌絲生長 (Cho et al., 2006)；大黃酒精萃取液能有效的防治黃瓜白粉病 (Yang et al., 2009)；蛇床子,山茱萸在2010年曾用於十字花科炭疽病之孢子發芽抑制試驗中 (林等, 2010), 此外蛇床子中蛇床子素之衍生物JS-B ($C_{12}H_{10}O_3$) 也在2010年被研究出具有抑制真菌之效果 (Wang et al., 2010)。



四、拮抗微生物防治法

(一) 枯草桿菌

枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)在分類上屬於厚壁菌門(Firmicutes)、芽孢桿菌綱(Bacilli)、芽孢桿菌目(Bacillales)、芽孢桿菌科(Bacillaceae)。枯草桿菌為常見的格蘭氏陽性菌之一，已知的病害防治機制包含抗生素的產生(antibiosis) (Katz et al., 1977)、誘導抗病(induced resistance) (Kloepper et al., 2004)、營養競爭(nutrient competition) (Korsten et al., 1995)等。已知脂肽類 (lipopeptides) 抗菌物質是抑制病原菌生長的主要原因，這些物質包含 Iturin(伊枯草菌素)、surfactin(表面素)等 (Bais et al., 2004; Ahimou et al., 2000)。前人研究指出，*Bacillus subtilis* CMB32 會分泌出 Iturin A、Fengycin、Surfactin A 等物質抑制 *Colletotrichum gloeosporioides* 之菌絲生長 (Kim et al., 2003)。而 *Bacillus subtilis* YM10-20 所分泌的物質亦可滲透進入 *Penicillium roqueforti* 孢子中，抑制孢子的發芽 (Chitarra et al., 2003)。在臺灣，已被商品化的枯草桿菌菌株包含 *Bacillus subtilis* Y1336、*Bacillus subtilis* WG6-14、*Bacillus subtilis* BM 136 等，而國外也有許多枯草桿菌被開發作為商品，並廣泛應用於農業 (謝等，2011)。

(二) 木黴菌

木黴菌(*Trichoderma sp.*)在分類上屬於子囊菌門(Ascomycota)、不完全菌亞門(Deuteromycotina)、絲孢綱(Hyphomycetes)、叢梗孢目(Moniliales)、淡色孢綱(Moniliaceae)。木黴菌可與作物根部共生，幫助作物根部發育，並且防治植物病原菌，已知的主要作用機制包含抗生物質之產生(antibiosis)、超寄生病原菌(hyperparasitism)及營養競爭(nutrient competition)、誘導抗性(induced resistance)、細胞壁分解酵素(cell wall hydrolase enzyme)之產生 (陳等，2014)。木黴菌也是一種常見的根圍菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)，其所產生的外切幾丁質分解酵素(exo-chitinases)能夠透過水解細胞壁的方式抑制土壤病原病的生長 (Solanki et al., 2011)；而在盆栽試驗中，*T. harzianum* isolate T-39 能有效的防治

Colletotrichum acutatum 在草莓上引起的炭疽病。(Freeman et al., 2004)。臺灣以木黴菌製成之商品頗多，其中常以 *Trichoderma asperillum* 系列菌種製成之商品作為防治資材，主要借助其防治病蟲害、增加產量、幫助作物根系之效果(陳等，2009)，國外亦曾報導過 *T. harzianum* 所產生的 *exo-chitinases* 具有抑制 *Fusarium sp.* 的效果 (Kumar et al., 2012)。

(三) 鏈黴菌

土壤中常見的鏈黴菌(*Streptomyces spp.*)也常被用於生物防治，許多鏈黴菌研究指出，鏈黴菌的施用能夠有效抑制植物病原菌的生長 (Errakhi et al., 2007; Maldonado et al., 2010)；而在鏈黴菌防治炭疽病的研究中，有研究指出鏈黴菌的使用可以避免受到芒果炭疽病的感染，使芒果在儲存時能夠有更佳的品質 (Haggag et al., 2011)；在石斛蘭上施用鏈黴菌 *Streptomyces hygrosopicus*，能有效的防治炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 的感染 (Prapagdee et al., 2008)；而鏈黴菌萃取物的使用可以有效的降低辣椒炭疽病感染率，並增加產量 (Heng et al., 2015；Suwan et al., 2012)。 *Streptomyces sp.* 產生之二次代謝物，能有效抑制炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 之孢子萌發以及菌絲生長 (Soares et al., 2006)。常被使用的鏈黴菌商品為 Actinovate® 及 Mycostop®，分別含有 *S. lydicus* WYEC108 與 *S. griseoviridis* strain K61 兩種鏈黴菌之孢子 (Crawford et al., 1993; Lahdenpera 1987)，國內來自鏈黴菌並商業化的藥劑如嘉賜黴素(Kasugamycin)、保粒黴素(polyoxins)、維利黴素(Validamycin A)等,已普遍應用於多種重要植物病害的防治 (蔡等，2010)。

五、植物流行病學

植物流行病學(Plant Disease Epidemiology)主要研究植物疾病的發生與相關影響因子之學門，藉由瞭解病害與因子之間之關聯性，以便預測將發生的病害趨勢與嚴重程度，並藉以防治病害。病害的發生，主要與病原菌(pathogen)、寄主(host)、環境(environment)相關。若植物病害影響相當大面積，並持續一段時間，則稱為流行病。將植物病害隨時間之波動繪製成圖表，則稱為植物病害發展趨勢圖(Disease progress curve)，藉此圖表可以預測將來之病害嚴重度，並找出最佳防治時機，在植物病害大規模發生前防範於未然。

在本研究主要想探討的環境因子中，以溫度(temperature)、濕度(humidity)對於病害的影響最大。1990年即有學者以不同溫度與潮濕時間(wetness duration)兩個因子，對草莓炭疽病進行研究，發現在適合病菌生長的溫度下，潮濕時間越久病害嚴重度越高，但在不適合病菌生長的溫度下，即使潮濕環境時間增長，病害嚴重度也無顯著差異 (Wilson et al., 1990)。而在1973年John Colhoun的著作中除歸納出溫度會影響病原菌存活(survival)、病原菌孢子發芽(spore germination)、病徵形成(symptom formation)、植物對病原的反應(response)外，亦提到濕度是地上部植物病害發生的重要因子 (Colhoun, 1973)，濕度除了會影響孢子發芽外 (Manners et al., 1963)，也會影響植物角質層的形成，間接影響植物對於病原菌的抵抗能力 (Colhoun, 1962)。除上述因子外，風(wind)、光線(light)、土壤營養(soil nutrient)等因子亦是影響病害的環境因子。

在環境影響炭疽病的前人研究中，溫度、濕度、風力會影響番石榴炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)分生孢子的發芽(germination)與附著器的形成 (appressoria formation) (Moraes et al., 2015)；柑橘炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*)在潮濕的環境中會產生大量孢子，若處在乾燥的環境中，炭疽病的分生孢子很容易失去活性 (Denham et al., 1981)；毛豆炭疽病(*colletotrichum truncatum*)會藉由風力傳播，擴大感染面積。(Buchwaldt et al., 1996)。

第三章 材料與方法



一、臺南市官田地區臺灣菱菱角炭疽病之田間調查

本研究為深入研究夏季在臺南官田區發現之菱角炭疽病發生之原因，於2014年5月至2014年12月與當地農民合作進行第一期調查，主要調查菱角水田菱角炭疽病之發生情形，並於2015年7月至2015年12月進行第二期之調查。地點包括臺南市官田區隆本里友善大地菱角田、臺南市官田區西庄里之菱角田，除記錄田間植株之發病情形，亦將發病植株及葉片帶回實驗室進行拍照、鏡檢及分離。

二、菱角炭疽病之病原菌分離、保存及鑑定

菱角炭疽病之病原菌分離，主要使用組織塊分離法及稀釋分離法。組織塊分離法係自發病田區採集罹病株，以消毒過之剪刀剪下長寬各約5 mm之病健部，浸泡於1%次氯酸鈉水溶液中進行表面消毒60秒後，以無菌水漂洗三次，每次20秒，將多餘水分吸乾後置於1.5%(w/v)水瓊脂培養基(Water agar, WA, Difco™)中進行常溫培養，待長出菌絲後，於解剖顯微鏡下，以解剖刀切取菌絲尖端，移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(Potato Dextrose Agar, PDA, Difco™)上，置於光週期十二小時25°C定溫生長箱中進行培養，以供後續之鑑定及試驗。

此外，病原菌分離亦使用稀釋分離法，主要先將發病組織浸泡於1%次氯酸鈉水溶液60秒進行表面消毒，而後以無菌水漂洗三次，每次20秒。將組織塊以研磨棒研磨後取300 μL滴於PDA上，再以三角玻棒均勻塗佈於培養基表面，置於光週期十二小時25°C定溫生長箱中進行培養，並觀察分離結果。

為保存菌株，每半個月皆進行繼代培養，確認為同分離株後培養於光週期十二小時25°C定溫生長箱中，並且將確認有病原性之分離株寄存於財團法人食品工業發展研究所生物資源及保存研究中心(BCRC)，以供後續試驗使用。

三、菱角炭疽病分離株之病原性測試

(一)供試健康臺灣菱植株之栽種

健康種苗係自臺南市官田區友善大地農場購入已種植四個月之臺灣菱 (*Trapa taiwanensis* Nakai) 種苗，將種苗種植於深度 40 至 50 公分之水盆中，置於臺大中非大樓及臺大農場溫室中，培育 3 週後供試驗。



圖 1、臺灣菱以菱角炭疽病孢子懸浮液接種後保溼處理之狀況。

Figure 1. Leaves of water caltrop in moist PE bag after wound inoculation with anthracnose conidia suspension.

(二)接種源之製備

本研究之菱角炭疽病菌，皆以 PDA 培養於光週期十二小時 25°C 定溫生長箱中(培養皿大小為 9 公分)。製備接種源時，主要取培養十天之菱角炭疽病菌，加入無菌水並以三角玻棒將孢子洗下，配製成濃度為 1×10^5 conidia/mL 之孢子懸浮液，以供各試驗之使用。

(三)臺灣菱葉部以孢子懸浮液進行傷口接種之試驗

本試驗主要目的為確認自田間病株分離所得炭疽病菌株之病原性，故以臺灣

菱作為試驗材料，先以 75% 酒精去除葉面髒汙，再以無菌水去除殘留酒精，立即以消毒過之解剖刀在葉部刮傷造成約 1cm² 之傷口(未穿孔)，另取於 PDA 培養 10 天之菱角炭疽病分離株，以無菌水配製成濃度 1x10⁵/mL 之孢子懸浮液，取 1mL 滴於傷口處，待其自然風乾。並以蒸餾水噴灑作為對照組，每組實驗皆進行 3 重複，接種後以夾鏈袋套封該臺灣菱葉片保溼並置於溫室中，十二小時後將塑膠袋去除，依時間間隔記錄是否發病，並進行再分離以確認病原性。除以解剖刀刮傷之傷口接種外，亦使用無傷口接種，觀察其發病之差異。

(四)人工接種菱角炭疽病之病原再分離

為確認上述分離株之病原性，將上述接種後之發病植株進行病原再分離，採用的再分離方式為前述之組織分離法，皆自病健部進行再分離，所得之分離株則與原接種之分離株進行比對及鑑定，以完成柯霍氏準則。

四、菱角炭疽病菌分離株之鑑定

(一)形態學鑑定

本研究所使用的菱角炭疽病病菌主要為自官田區隆本里(友善大地田區)，於 2014 年 9 月分離到之菌株 GL05，目前之炭疽病菌分類主要以分子生物學鑑定技術為主，因形態學鑑定無法鑑定至種(至多至屬)，因此本研究主要以分子生物學鑑定作為依據，但亦紀錄並附上菌落形態及分生孢子形態做為參考。

(二)分子生物學鑑定

分子生物學鑑定部分，因 ITS 基因在前人研究中顯示對於 *C. gloeosporioides* complex 鑑別能力較弱，故選擇 NS 基因作為鑑定依據。首先萃取核苷酸(DNA)，並以選定 NS 基因作為鑑定所需片段，以 NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') 及 NS6(5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3')兩個引子對(primer)進行目標片段之增幅(PCR 反應)進行片段放大，目標片段之增幅(PCR 反應)後以電泳分析

PCR 後之產物片段大小。進行電泳分析後，以電泳圖確定片段大小，再將選定之核苷酸(DNA)片段純化，以此產物進行基因片段之定序。定序後之序列經校正後，於美國 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 功能鑑定本研究使用之分離株分類地位。本部分研究委由基龍米克斯生物科技股份有限公司代為進行。

五、溫度對菱角炭疽病菌菌絲生長之影響

為觀察菱角炭疽病菌於不同溫度下生長之情況，選取經病原性測試得知具有病原性之菌株培養於 PDA(培養皿大小為 9 公分)，於光週期十二小時 25°C 定溫生長箱中培養十天後，以直徑 5 mm 打孔器切取菌絲塊，移置於 PDA 之中央，分別置於 15、20、25、30、35°C 之光週期十二小時梯度定溫生長箱，觀察溫度對於菌絲生長速度之影響，每處理各 5 重複，並於五日後紀錄。本部分進行三次獨立試驗。

六、臺南地區菱角炭疽病流行病學調查

(一) 調查樣區

現行栽種臺灣菱的方式除慣行農法外，在有機農業興起及水雉保育的推廣下，有機栽種臺灣菱的田區規模亦不可小覷，因此本研究主要以有機農田為調查對象，並進行兩期各約半年的調查，第一期調查時間為 2014 年 5 月至 2014 年 12 月，第二期調查時間為 2015 年 7 月至 2015 年 12 月。每月前往南部兩個樣區，調查菱角炭疽病危害嚴重度，調查樣區地點如下：

1. 臺南市官田區隆本里(臺南市官田區隆本里中山路二段 400 巷 30 號)
2. 臺南市官田區西庄里(臺南市官田區西庄段 440 號週邊田區)

(二) 菱角炭疽病葉片危害嚴重度調查方法

每樣區皆調查三塊水田，每塊水田沿田緣進行調查，每 10 公尺取 1 小區(每

小區大小為 1 平方公尺)，觀察植株中葉片受菱角炭疽病危害與否並依照葉片罹病指數(見表 1)進行記錄，最後計算各樣區植株罹病之平均嚴重度。



表 1、菱角炭疽病葉片罹病指數標準。

Table 1. The disease index of anthracnose disease of water caltrop used in this study.

罹病指數	定義
0	葉片未產生病徵
1	葉片病徵佔葉表面積 10% 以下
2	葉片病徵佔葉表面積 10%-20%
3	葉片病徵佔葉表面積 20%-50%
4	葉片病徵佔葉表面積 50% 以上

$$\text{危害嚴重度}(\%) = (\sum(\text{罹病指數} \times \text{葉片數}) / (4 \times \text{調查總葉數})) \times 100\%$$

(三)氣象資料來源

係自國家實驗研究院台灣颱風洪水研究中心，由大氣水文研究資料庫取得臺南官田區(中央氣象局自動測站，站碼：C0X130，站名：官田，120°30' 75" E，23°19' 50" N，標高 27M)之氣象資料。

七、菱角炭疽病之非農藥防治

(一)非農藥資材來源

自中藥店(國安中藥房，宜蘭縣宜蘭市文昌路 12 號)購買丁香、大風子、山茱萸、大黃、五味子、肉桂、蛇床子、薑黃、藿香、等共九種中藥材粉末做為防治資材。首先將防治資材各取 30g 加入 150 mL 水或 50% (w/v)乙醇 150 mL 中(表 2)，置於陰涼處三天，每天搖盪一次，先將萃取液以 3000 rpm 離心 15 分鐘後，再將上清液以孔徑 0.22 μ L 之濾紙過濾後倒入無菌玻璃瓶內密封，儲存於 4 °C 備用(謝等，2005)。上述成品即為 20% 萃取液，並依實驗需求稀釋成不同濃度以供使用。

拮抗微生物選用(1)百泰公司商業化產品台灣寶枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)、
(2)百泰公司商業化之產品強根王(*Trichoderma asperillum*)，以及(3)本實驗室分離
自花蓮玉里水稻田之放射線菌(*Streptomyces* sp.)編號 YU01。

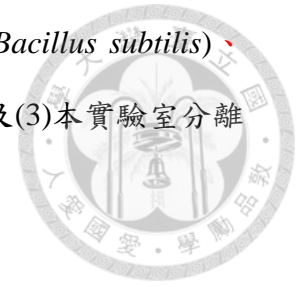


表 2、本研究用以進行非農藥防治菱角炭疽病之中草藥種類及其前處理方法。



Table 2. The herbal materials used for non-pesticide control test against the anthracnose pathogen in this study and their pretreatment.

普通名 Common name(Chinese)	學名 Scientific name	科別 Family name(Chinese)	使用部位及前處理 Part & Preparation
Cablin Potchouli Herb (霍香)	<i>Agastache rugosa (Fisch. et Mey.) O. Ktze.</i>	Lamiaceae(脣形花科)	地上部乾燥
Chaulmoogra(大風子)	<i>Hydnocarpus anthelminthicus Pierre</i>	Flacourtiaceae(大風子科)	乾燥種仁
Chinese magnoliavine fruit(五味子)	<i>Schisandra sphenanthera Rehd.et Wils.</i>	Magnoliaceae(木蘭科)	乾燥果實
Cinnamon (肉桂)	<i>Cinnamomum cassia Nees</i>	Lauraceae(樟科)	乾燥樹皮
Clove (丁香)	<i>Syzygium aromaticum (L.) Merrill & Perry</i>	Myrtaceae(桃金娘科)	乾燥花蕾
Cnidii fructus(蛇床子)	<i>Cnidium monnieri (L.) Cusson</i>	Umbelliferae(繖形科)	乾燥果實
Dogwood(山茱萸)	<i>Cornus officinalis Sieb. et Zucc.</i>	<i>Cornaceae</i> (山茱萸科)	乾燥果實
Rhubarb(大黃)	<i>Rheum palmatum L.</i>	Polygonaceae(蓼科)	乾燥根及根莖
Turmeric(薑黃)	<i>Curcuma longa L.</i>	Zingiberaceae(薑科)	乾燥根莖

(二) 中草藥萃取液對孢子發芽抑制之試驗

為測定中草藥萃取液對菱角炭疽病菌分生孢子發芽之抑制效果，取於 PDA 培養 10 天之菱角炭疽病分離株，加入無菌水並以三角玻棒將孢子洗下，配製成濃度為 1×10^5 conidia/mL 之孢子懸浮液，而後取 30 μ L 孢子懸浮液與中草藥萃取液混合，使中草藥萃取液最終濃度為 2%、1.5%、1%、0.5%、0.25%，並各添加無菌葡萄糖水，使葡萄糖濃度為 0.1% 以促進孢子之發芽，置於懸滴載玻片上，另以無菌水、酒精(2%, 1.5%, 1%, 0.5%, 0.25%)、24.9% 待克利乳劑 3000 倍做為對照組，每處理 6 重複，於光週期十二小時 25°C 定溫生長箱培養後，即以光學顯微鏡觀察孢子發芽之情形，每一處理之玻片皆計數 100 個孢子，並以發芽管長度超過孢子長度判定為發芽，共進行三次獨立試驗，最後依下列公式計算孢子發芽之抑制率(謝等，2005)：

$$\text{孢子發芽抑制率(\%)} = ((\text{對照組發芽率} - \text{實驗組發芽率}) / \text{對照組發芽率}) \times 100\%$$

(三) 中草藥萃取液對菌絲生長抑制之試驗

為測定中草藥萃取液對菱角炭疽病菌菌絲生長之抑制效果，配製 PDA 250 mL 於血清瓶中，經高溫高壓滅菌後約 50°C 時加入中草藥萃取液，使萃取液最終濃度為 2%、1.5%、1%、0.5%、0.25%，各倒入 9 cm 培養皿中做為萃取液培養基，另以無菌水、酒精(2%, 1.5%, 1%, 0.5%, 0.25%)、24.9% 待克利乳劑 3000 倍做為對照組。試驗前先以 PDA 培養菌株 10 天後，以消毒過之打孔器製作出直徑 5 mm 圓形菌絲塊，移置於萃取液培養基中央，於光週期十二小時 25°C 定溫生長箱培養，五天後觀察並記錄菌絲生長直徑，每處理 6 重複，共進行三次獨立試驗，並計算菌絲生長抑制率(林等，2010)：

$$\text{菌絲生長抑制率(\%)} = ((\text{對照組菌絲生長長度} - \text{實驗組菌絲生長長度}) / \text{對照組菌絲生長長度}) \times 100\%$$



(四)拮抗微生物之對峙培養試驗

為測試拮抗微生物(枯草桿菌、木黴菌及放射線菌)對於菱角炭疽病菌之抑制效果，將各拮抗微生物培養於 PDA 上，培養五天後以移植環挑取單菌落，畫於事先註記標記線之 PDA 上，標記線位置距培養基邊界 2 公分，再取 PDA 培養 10 天後之菱角炭疽病菌株，以打孔器製出直徑 5 mm 圓形菌絲塊，接種置於相對位置且距邊界 2 公分處。另以未使用拮抗微生物之 PDA 做為對照組，於光週期十二小時 25℃ 定溫生長箱培養，待對照組菌絲生長至標記線時記錄各實驗組菌絲生長半徑，每處理做 6 重複，共進行三次獨立試驗，並計算菌絲生長抑制率。

(五)中草藥萃取液對菱角炭疽病之盆栽防治試驗

為測試中草藥萃取液對菱角炭疽病之防治效果，以臺灣菱作為供試植株，使用酒精噴在擦手紙用以去除葉片之髒污，再以清水噴在擦手紙以去除葉片上之酒精共兩次，而後以消毒過之解剖刀對葉片刮傷造成約 1cm² 之傷口(未穿孔)，立即將不同濃度之中草藥萃取液稀釋液噴灑於傷口上，待其自然風乾後，將濃度為 1x10⁵ 之孢子懸浮液 1mL 滴於傷口上。另以蒸餾水噴灑於有接種之傷口作為負對照組，以 2% 酒精噴灑於有接種之葉片作為酒精對照組，以只噴灑孢子懸浮液於傷口者作為正對照組，每棵菱角各取 5 片葉片參與試驗，每處理各 7 片葉子共 7 重複，接種後使用塑膠袋套封臺灣菱之葉片保濕並置於溫室，十二小時後將塑膠袋去除。為確認中草藥萃取液為保護型或殺菌型，亦進行噴灑病原菌孢子後再施用中草藥萃取液之試驗。隨後對已發病者進行再分離，以確認其病原性。本部分進行一次獨立試驗。

(六)拮抗微生物對菱角炭疽病之盆栽防治試驗

本項係以臺灣菱作為供試植株，將市售臺灣寶枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)以無菌水按照推薦使用濃度稀釋 800 倍，並額外稀釋 400 倍待用；木黴菌(*Trichoderma asperillum*)部分以無菌水按照推薦使用濃度稀釋 500 倍(育苗)及稀釋 1000 倍(澆

灌)待用；放射線菌 YU01 部分，則取以 PDA 培養 10 天產孢後之培養基，以無菌水洗下孢子，並以序列稀釋法，稀釋成三種濃度(10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} /mL)待用。

配製各拮抗菌菌液後，即使用酒精噴在擦手紙用以去除臺灣菱葉片之髒污，再以清水噴在擦手紙以去除葉片上之酒精共兩次，而後以消毒過之解剖刀對葉片刮傷造成約 1cm^2 傷口，立即將濃度為 1×10^5 之孢子懸浮液噴灑於葉片傷口上，待其自然風乾，再將木黴菌、枯草桿菌、放射線菌噴灑於，並以只噴灑孢子懸浮液於傷口者作為對照組。

每棵菱角各取 7 片葉片參與試驗，每處理各 7 片葉片共 7 重複，接種後即使用內部噴水之塑膠袋套封，十二小時後將塑膠袋去除。為確認拮抗微生物效果為保護型或殺菌型亦進行施用拮抗微生物後再接種病原菌孢子之試驗，拮抗微生物施用時機分別為接種前一天預先施用、接種前三天預先施用，隨後對已發病者進行再分離，以確認其病原性。本部分進行一次獨立試驗。

八、農藥對菱角炭疽病菌絲生長抑制試驗

使用藥劑為植物保護手冊中推薦使用於菱角炭疽病之農藥，共有 24.9% 待克利乳劑(Difenoconazole)、70% 甲基鋅乃浦可濕性粉劑(Propineb)、50% 撲克拉錳可濕性粉劑(Prochlorate manganese)等三種。除推薦之三種藥劑外，亦使用本實驗室常用於防治炭疽病之 23.6% 百克敏乳劑(Pyraclostrobin)及 50% 貝芬替水懸劑(Carbendazim)共兩種參與試驗。

試驗前先配製 PDA 於血清瓶中，待高溫高壓滅菌後尚未凝固前約 50°C 立即加入藥劑，使三種藥劑有效成分濃度分別為 10, 50, 100, 500, 1000 ppm，混合均勻後倒入 9 cm 培養皿製成農藥培養基，另以無菌水作為對照組。培養基製成後取 PDA 培養 10 天之菌株，以打孔器製作出直徑 5 mm 圓形菌絲塊，反貼於農藥培養基中央，於 25°C 定溫生長箱中培養，五天後觀察並記錄菌絲生長直徑，每處理進行 5 重複，並計算其菌絲生長抑制率，本部分共進行三次獨立試驗。

九、以不同來源炭疽病菌對臺灣菱進行病原性之測定

本項不同來源炭疽病菌共有 3 株，包括(1)自台南官田取得具有病原性之芒果炭疽病菌，(2)自麻豆取得具病原性之文旦炭疽病菌，(3)由苗栗農業改良場提供並確認具病原性之草莓炭疽病菌株 ML133 (梁，2014)。本試驗之不同來源炭疽病菌株，皆以 PDA 培養於光週期十二小時 25°C 定溫生長箱中(培養皿大小為 9 公分)。製備接種源時，主要取培養十天之炭疽病菌，加入無菌水並以三角玻棒將孢子洗下，配製成濃度為 1×10^5 conidia/mL 之孢子懸浮液，以供試驗使用。接種時先以酒精去除臺灣菱葉表之髒污，再以清水噴在擦手紙以去除葉表上之酒精進行兩次後，在葉面以消毒過之解剖刀造成約 1cm^2 之傷口，將濃度為 1×10^5 之芒果炭疽病、文旦炭疽病、草莓疽病之病原菌分生孢子懸浮液 1mL 滴於傷口之上。同時以確認具病原性之菱角炭疽病菌分離株做為對照組，接種後即以內部噴水之塑膠袋套封該葉片保溼並置於溫室，十二小時後將塑膠袋去除，觀察並記錄是否發病，並進行再分離以確認其病原性，再分離方法與前述分離病原菌方法相同。每種炭疽病之接種各取 5 片葉片進行，為 5 重複。除了以不同來源之炭疽病進行接種外，並以無菌水作為對照組。

第四章 結果



一、臺灣南部地區臺灣菱菱角炭疽病之田間調查

本研究為深入研究夏季在臺南官田區發現之菱角炭疽病發生之原因自 2014 年 5 月至 2014 年 12 月間進行第一期之調查，並於 2015 年 7 月至 2015 年 12 月進行第二期之調查，皆前往臺灣南部種植臺灣菱之主要產地官田區進行田間病害嚴重度之調查。本項調查主要與臺南官田友善大地農場合作，選用農場契作之有機水田。共選取兩大樣區，包括官田區隆本里及官田區西庄里，兩大樣區內分別調查三塊水田，合計六小區，每次皆記錄各小區菱角炭疽病之發生嚴重度，並將罹病葉片、植株帶回研究室進行病徵拍照、鏡檢及病原分離。有關田間發病之病徵案例如表 3。樣區調查結果概述如下：

1.臺南市官田區隆本里樣區：調查的第一年間(2014 年 5 月至 2014 年 12 月)，5 至 8 月並無炭疽病發生，至 2014 年 9 月時開始有零星的炭疽病發生，並且嚴重度持續增加，病害嚴重度延續至 12 月時則有下降趨勢。調查的第二年(2014 年 7 月至 2014 年 12 月)，9 月即開始有炭疽病發生，其嚴重度持續上升，12 月稍有下降趨勢，但下降趨勢較 2014 年平緩。除了菱角炭疽病外，田間亦可以常發現菱角白絹病之發生，尤其以菱盤外圍葉片為多，但是菱角白絹病只零星發生在田區，至於次要病害菱角紋枯病在調查期間則未曾發現。

2.臺南市官田區西庄里樣區：調查的第一年間(2014 年 7 月至 2014 年 12 月)，與隆本里的發病趨勢相同，5 至 8 月同樣並無炭疽病發生，至 2014 年 9 月時開始有炭疽病發生，並且嚴重度持續增加，病害嚴重度延續至 12 月時則有下降趨勢。調查的第二年(2014 年 7 月至 2014 年 12 月)，9 月後在田間有炭疽病發生其嚴重度持續上升，12 月稍有下降趨勢，但下降趨勢較 2014 年平緩。除了菱角炭疽病外，2015 年亦可觀察到菱角白絹病零星發生，菱角紋枯病在調查期間則未曾發現。

表 3、臺灣南部地區菱角炭疽病之病害調查結果。

Table 3. The results of field investigation on anthracnose disease of water caltrop in southern Taiwan.

地點	菱角品種	病徵
官田隆本里有機農田	臺灣菱	葉片出現黑褐色斑點，嚴重時病斑癒合並枯萎
官田西庄里有機農田	臺灣菱	葉片出現黑褐色斑點，嚴重時病斑癒合並枯萎



圖 2、2014 年 9 月於官田區隆本里有機菱角田發生之菱角炭疽病葉片病徵。

Figure 2. Symptoms of anthracnose on water caltrop leaf at the organic field of Longben in September, 2014.



圖 3、2014 年 9 月於官田區隆本里有機菱角田發生之菱角炭疽病。

Figure 3. Anthracnose on water caltrop at the organic field of Longben in September, 2014.

二、臺灣菱菱角炭疽病之病原菌分離及初步鑑定

本研究使用組織塊分離法及稀釋分離法，將各樣區包括官田區隆本里有機菱角田、官田區西庄里有機菱角田、麻豆區慣行菱角田之臺灣菱葉片進行病原分離，結果如表 4、表 5 所示。獲得之真菌分離株，皆以炭疽病菌為主。

本項統計自官田區隆本里樣區典型菱角炭疽病病斑上，以組織分離法分得 11 株真菌分離株，其中 7 株為炭疽病菌；另以稀釋分離法分離出 4 株炭疽病菌，此區所得分離株之編號皆以 GL 後加數字表示(如表 6)。而官田區西庄里樣區以組織分離法共獲得 14 株真菌分離株，其中 7 株為炭疽病菌；以稀釋分離法則分離出 3 株炭疽病菌，其編號皆以 GW 後加數字表示(如表 6)。自麻豆區慣行菱角田以組織分離法亦分 5 株真菌分離株，其中 3 株為炭疽病菌，其編號為 MD 後加數字表示(如表 6)。

表 4、臺灣南部臺灣菱炭疽病病株以組織分離法分離之結果。

Table 4. The fungi isolated from diseased water caltrop with anthracnose in southern Taiwan by tissue isolation method.

地點	分離樣本數	炭疽病菌分離率
官田隆本里有機菱角田	11	7/11(63%)
官田西庄里有機菱角田	14	7/14(50%)
麻豆慣行菱角田	5	3/5(60%)

表 5、臺灣南部臺灣菱以稀釋分離法分離之結果。

Table 5. The fungal isolates of anthracnose from water caltrop in southern Taiwan by dilution method.

地點	分離樣本數	炭疽病菌分離率
官田隆本里有機菱角田	7	4/7(57%)
官田西庄里有機菱角田	5	3/5(60%)

表 6、臺灣南部臺灣菱分離所得菱角炭疽病菌分離株及其來源。

Table 6. Fungal isolates of anthracnose isolated from water caltrop in southern Taiwan.

分離株編號	分離地點	分離部位	菌株種類
GL01	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL02	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL03	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL04	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL05	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL06	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL07	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL08	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL09	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GL10	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.

GL11	官田區隆本里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW01	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW02	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW03	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW04	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW05	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW06	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW07	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW08	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW09	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
GW10	官田區西庄里有機菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
MD01	麻豆區慣行菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
MD02	麻豆區慣行菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.
MD03	麻豆區慣行菱角田	葉片	<i>Colletotrichum</i> sp.



圖 4、菱角炭疽病病菌於 PDA 培養後產生之分生孢子。

Figure 4. The conidia of *Colletotrichum* sp. on PDA isolated from anthracnose disease of water caltrop in southern Taiwan.



三、臺灣菱炭疽病分離株之病原性測試

(一)供試健康臺灣菱之栽種

於 2014 年 6 月及 2015 年 6 月自臺南官田區友善大地農場各購入約 300 株健康之臺灣菱，於臺大中非大樓頂樓陽台及臺大農場溫室各以 10 吋塑膠盆套袋加水種植，並以花寶作為營養源，每週施肥一次。

(二)接種源之製備

本研究之分離株，均以 PDA 培養於光週期十二小時 25°C 定溫生長箱中(培養皿大小為 9 公分)，經培養 10 天後可於表面看到分生孢子堆形成，以無菌水將孢子洗下，配製成濃度為 1×10^5 conidia/mL 之孢子懸浮液。

(三)臺灣菱葉片以孢子懸浮液接種之試驗

本部分以解剖刀於臺灣菱葉片製造出傷口，而後噴灑濃度為 1×10^5 /mL 之孢子懸浮液做為接種源，並以無菌水做為對照組。接種後以塑膠夾鍊帶封保濕 12 小時，並於 12 小時後去除塑膠夾鍊袋避免日灼，經 10 天後觀察並計錄發病情形，其結果如表 7 所示。此外，亦有測試無傷口接種，然而無傷口接種發病時間較長(需 7-15 天)，這個部分證實植物受傷時，受傷處的糖分、有機營養會流出，有助於孢子的發芽及侵入(Eckert & Ratnayake, 1994, Pandey et al., 1993)，故在後續實驗皆使用葉片傷口接種法。

表 7、臺灣南部臺灣菱炭疽病菌分離株接種健康臺灣菱之結果。

Table 7. The inoculation result of major fungal isolates derived from anthracnose disease of water caltrop by wound inoculation method.

接種分離株	接種葉片數	葉片發病數	發病率(%)
GL01	5	5	100
GL02	5	5	100
GL03	5	5	100
GL04	5	5	100
GL05	5	5	100
GL06	5	5	100
GL07	5	5	100
GL08	5	4	80
GL09	5	3	60
GL10	5	5	100
GL11	5	5	100
GW01	5	4	80
GW02	5	5	100
GW03	5	3	60
GW04	5	5	100
GW05	5	5	100
GW06	5	3	60
GW07	5	4	80
GW08	5	4	80
GW09	5	5	100
GW010	5	5	100
MD01	5	4	80
MD02	5	5	100
MD03	5	3	60
Water (control)	5	0	0



圖 5、臺灣南部菱角炭疽病分離株 GL05 接種臺灣菱 15 天後之發病情形。

Figure 5. The symptom development of anthracnose disease of water caltrop after inoculation with isolate GL05 for 15 days.

(四)人工接種菱角炭疽病之病原再分離

取前項經解剖刀製造傷口，並以孢子懸浮液接種產生病徵之葉片，再以組織塊分離法進行病原再分離。結果顯示所有自發病病徵再分離之分離株皆與原接種源菌株相同，完成柯霍氏準則第四條。

四、菱角炭疽病分離株之鑑定

(一)菱角炭疽病菌 GL05 分離株之 DNA 片段之 PCR 增幅及 NS 序列分析

經確定菱角炭疽病菌之病原性，並在接種過程中得知各分離株之病原性皆相似，且在 PDA 之生長形態及植株上產生之病徵無明顯差異，故取其中由組織分離法而得之菌株 GL05 做為代表性菌株，以 NS 基因片段進行分子鑑定。經過 DNA 萃取，並利用 PCR 進行片段放大後，NS 序列分析及序列比對分析進行分子生物學鑑定。利用引子對 NS1(forward)、NS6(reverse)進行 PCR，所得之電泳圖如圖 6，得到大小約為 1500 bp 之 DNA 片段，經 NS1 端及 NS6 端序列分析得到兩條 DNA 序列，將序列比對除錯後得到大小為 1044 bp 之 DNA 序列，如圖

7, 將序列資料以 NCBI 網站之基因庫進行 Blast 比對, 得到結果如表 8, 可以看到與基因庫中 6 個序列 100% 相似, 6 個序列分屬 *Colletotrichum sp.*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum musae* 三種真菌之基因, 但經進一步以 Max Score 進行比對, 發現與 *Colletotrichum gloeosporioides*. (Accession# FJ227900.1) 在 Max Score 部分得到最高數值(1929)故認定菱角炭疽病菌 GL05 應為 *Colletotrichum gloeosporioides*。

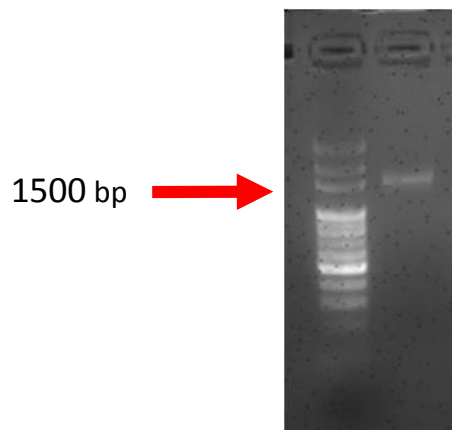


圖 6、菱角炭疽病菌分離株 GL05 以引子對 NS1/NS6 進行 PCR 增幅所得之 DNA 片段電泳圖。

Figure 6. Electrophoresis pattern of anthracnose isolate GL05 from water caltrop pathogen after PCR amplification with primer NS1 and NS6.



1 GCTGCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTAC
51 TACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCG
101 ACTTACGAAGGGATGTATTTATTAGATTAAAACCAATGCCCTTCGGGGC
151 TCACTGGTGATTCATAATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCG
201 ATGGTTCATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTCGATGCTAGAGTAGTGT
251 TCTAGCATGGTTACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGA
301 AGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
351 ATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACGATAAATACTGATACAGG
401 GCTCTTTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
451 AGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
501 TCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTAGAAC
551 CTTGGGCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGCACTGGTCCGGCCGG
601 GCCTTTCCCCCTGTGGAACCTCATGCCCTTCACTGGGTGTGTGGGAAAAC
651 AGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCG
701 AATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTGTG
751 GTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTA
801 TTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGC
851 GAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTTCATTTATCAGGAACGAAAGTTAGGGG
901 ATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGAC
951 TAGGGATCGGACGATGTTATTTTTTACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAA
1001 TCAAAGTGCTTGGGCTCCAGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAA

圖 7、菱角炭疽病菌 GL05 以引子對 NS1/NS6 進行 PCR 增幅後所得之 DNA 序列。

Figure 7. DNA sequence of anthracnose isolate GL05 from water caltrop pathogen after PCR amplification with primer NS1 and NS6.

表 8、菱角炭疽病菌 GL05 以引子對 NS1/NS6 經 PCR 增幅所得之序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果。

Table 8. The identification result of anthracnose isolate GL05 from water caltrop with its DNA sequence submitted to NCBI gene bank.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max identity
FJ227900.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides.</i>	1929	1929	100%	0	100%
EU375524.1	<i>Colletotrichum sp.</i>	1927	1927	99%	0	100%
DQ916151.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides.</i>	1927	1927	99%	0	100%
AJ301904.1	<i>Colletotrichum musae.</i>	1927	1927	99%	0	100%
AJ301909.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides.</i>	1927	1927	99%	0	100%
AJ301908.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides.</i>	1927	1927	99%	0	100%
AJ301912.1	<i>Colletotrichum fragariae.</i>	1921	1921	99%	0	99%
AJ301907.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides.</i>	1921	1921	99%	0	99%

(二)病原菌之形態學鑑定

菱角炭疽病菌可在寄主表面產生分生孢子盤，但不產生剛毛，田間可見寄主殘體表面有分生孢子堆(圖 8)。將孢子以蒸餾水洗下後觀察，可發現分生孢子為透明長橢圓形，兩端呈鈍圓狀或尖狀，在適當環境時，分生孢子會發芽並且形成附著器(appressorium)，附著器內部含黑色素並形成侵入釘(penetration peg)，會以物理性壓力入侵寄主表皮，進而感染寄主。若以 PDA 人工培養菱角炭疽病菌，會生成白色至灰色之菌落(圖 9)，菌絲成熟後會形成分生孢子柄，且會分泌深色色素至 PDA 中，若光照強度高，深色色素分泌的量有減少的趨勢。



圖 8、菱角炭疽病菌株 GL05 於葉上產生之分生孢子盤。

Figure 8. The acervulus of anthracnose isolates GL05 formed on leaf.

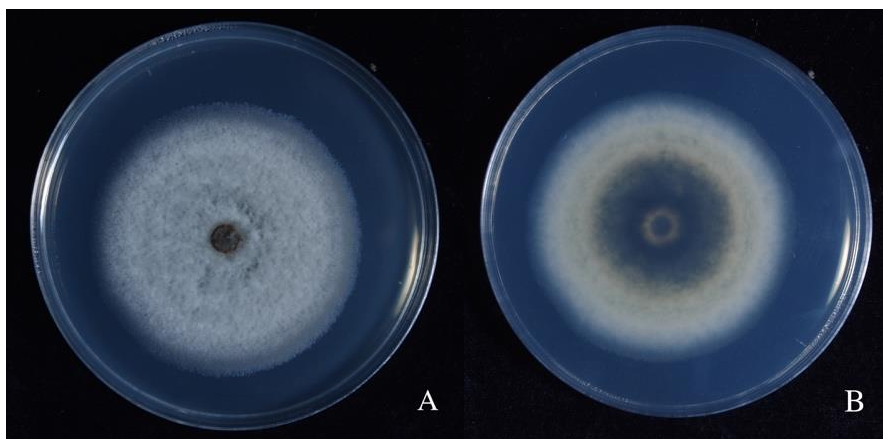


圖 9、菱角炭疽病 GL05 培養於 PDA 之菌落形態。(A)為正面觀，(B)為背面觀。

Figure 9. Cultural morphology of anthracnose isolate GL05 on PDA. (A) Front view, (B) Back view.

五、溫度對菱角炭疽病菌菌絲生長速度之影響

本試驗選擇 15、20、25、30、35°C 共五種溫度，比較菱角炭疽病 GL05 在不同溫度培養 5 天之菌絲長度。結果如表 9 所示，顯示菱角炭疽病在 25°C 時生長速度最快，隨著溫度上升或下降生長速度減緩。試驗溫度中又以 35°C 時生長速度最慢，而 15°C 時生長速度雖緩慢，但仍有一定的生長能力。

表 9、菱角炭疽病菌株 GL05 於不同溫度下培養 5 天之菌絲生長長度。

Table 9. Mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop on PDA at different temperature for 5 days.

溫度(°C)	菌絲生長長度(cm) *	標準差
15°C	2.17	0.06
20°C	3.76	0.11
35°C	5.66	0.06
30°C	4.38	0.01
35°C	0.31	0.05

*每組試驗為 6 重複之平均。

六、臺南地區菱角炭疽病流行病學調查

為了解菱角炭疽病之發生生態，自 2014 年 5 月至 2014 年 12 月間進行第一期調查，並於 2015 年 7 月至 2015 年 12 月進行第二期調查，每月前往臺南官田地區之隆本里、西庄里兩樣區對臺灣菱進行菱角炭疽病危害嚴重度之調查。

本項之 2014 年、2015 年調查結果如圖 10 及圖 11，所採用之氣象資料取自中央氣象局自動測站(站碼：C0X130，站名：官田，120°30' 75" E，23°19' 50" N，標高 27M)。各樣區發病嚴重度之變遷狀況簡述如下：

1. 2014 年隆本里、西庄里菱角炭疽病嚴重度之變遷：

2014 年結果如表 10 及圖 10 所示，5 月至 8 月時兩個樣區並無菱角炭疽病發生，至 9 月時開始兩個地區同時有菱角炭疽病發生，嚴重度分別為 18% 及 20%，10 月持續上升至 24.4% 及 28.9%，此後維持此嚴重度至 12 月，1 月則放水剷除菱角作為輪作水稻之前置處理。

從表 10 中，可以看到 5 至 9 月之病害嚴重度之數值與前一個月之氣象因子，如：適合發病溫度時數(24-28°C)、符合蒲式二級風力時數、降雨時數、綜合因子之時數、月總降雨量可能相關，將綜合因子、月總降雨量與兩個樣

區 2014 年病害嚴重度做圖，結果如圖 12 及圖 14 所示，可以發現符合綜合因子的時數頻率很高(共 54 小時)或是總降雨量很高(mm)，9 月即有病徵產生。進行相關性分析後如表 11 所示，發現此區間之病害嚴重度與前一個月之綜合條件時數最為相關，相關係數(r)為 0.9485；其次為前一月總降雨量，相關係數為 0.9371。

2. 2015 年隆本里、西庄里流行病學分析：

2015 年結果如表 10、圖 11 所示，菱角炭疽病發生生態與 2014 年相似，從調查的 7 至 8 月都沒有病害發生，9 月開始在田間記錄到菱角炭疽病發生，嚴重度分別為隆本里 23%、西庄里 20.7%，10 月持續上升至 29.3%及 25.8%，此後維持此嚴重度至 12 月。將嚴重度與當月氣象因子進行分析(分析方式同 2014 年)，結果如表 10 所示。

從表 10 中，可以看到 7 至 8 月之病害嚴重度之數值與前一個月之氣象因子，如：適合發病溫度時數(24-28°C)、符合蒲式二級風力時數、降雨時數、綜合因子之時數、月總降雨量可能相關，將綜合因子、月總降雨量與兩個樣區 2015 年病害嚴重度做圖，結果如圖 13、15 所示，可以發現符合綜合因子的時數頻率很高(共 75 小時)或是總降雨量很高(mm)，9 月即有病徵產生。進行相關性分析後如表 11 所示，發現此區間之病害嚴重度與前一個月總降雨量最為相關，相關係數(r)為 0.9297；其次為前一月之綜合條件時數，相關係數為 0.9271。

表 10、2014 年與 2015 年兩期菱角炭疽病嚴重度調查數據與相關氣象因子。

Table 10. The anthracnose disease severity of water caltrop and meteorological factors from 2014 to 2015.

項目	201405	201406	201407	201408	201409	201410	201411	201412
隆本里嚴重度(%)	0	0	0	0	18.1	24.4	23.7	23.1
西庄里嚴重度(%)	0	0	0	0	20	28.9	30	28.9
月均溫(°C)	25.9	28.2	29.7	28.9	28.8	25.4	23.2	17.2
月平均濕度(%)	82.6	80.6	76.8	80.5	78.7	71.8	75.8	74
月平均風速(m/s)	1.4	1.8	1.7	1.6	1.4	1.4	1.5	1.8
月總降雨量(mm)	21	165.5	138.5	490	88.5	8	1	13
溫度 24~28°C 時數	345	372	236	377	330	246	198	26
風速>1.6m/s 時數	294	375	374	360	241	289	325	442
降雨時數	71	56	42	83	29	2	2	12
綜合條件(時數)*	12	14	17	54	18	0	0	0
項目	201507	201508	201509	201510	201511	201512		
隆本里嚴重度(%)	0	0	23	29	32	31.8		
西庄里嚴重度(%)	0	0	20	25	31.8	30		
月均溫(°C)	28.6	27.8	27.9	26.2	24.5	20		
月平均濕度(%)	79.1	85.8	80	83.1	81.1	80.7		
月平均風速(m/s)	1.9	1.9	1.5	1.3	1.5	1.85		
月總降雨量(mm)	279	647.5	262	43	0	14.5		
溫度 24~28°C 時數	342	418	405	368	259	85		
風速>1.6m/s 時數	385	391	271	243	286	456		
降雨時數	65	125	35	16	0	6		
綜合條件(時數)*	29	75	23	5	0	0		

*綜合條件為符合溫度 24~28、風速>1.6m/s 及降雨之氣象因子。

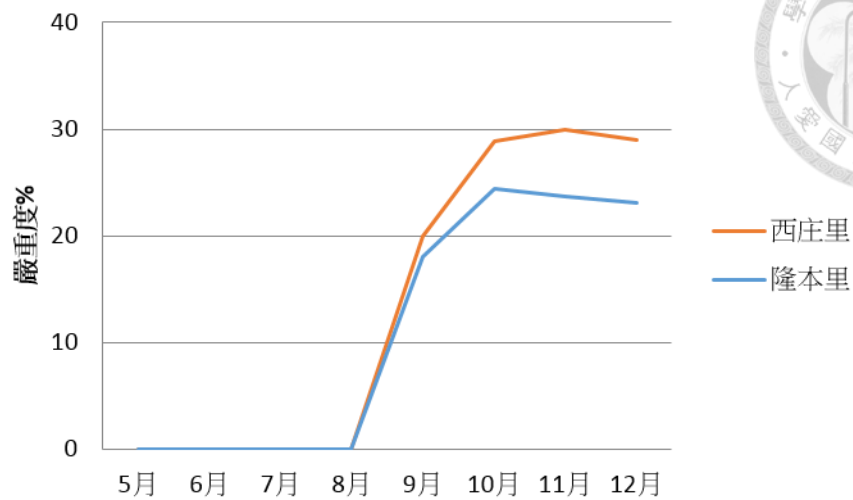


圖 10、臺南地區菱角炭疽病病於 2014 年 5 月至 12 月病勢發展曲線。

Figure 10. Monthly anthracnose disease severity of water caltrop investigated from May 2014 to December 2014 at Guan Tian, Tainan.

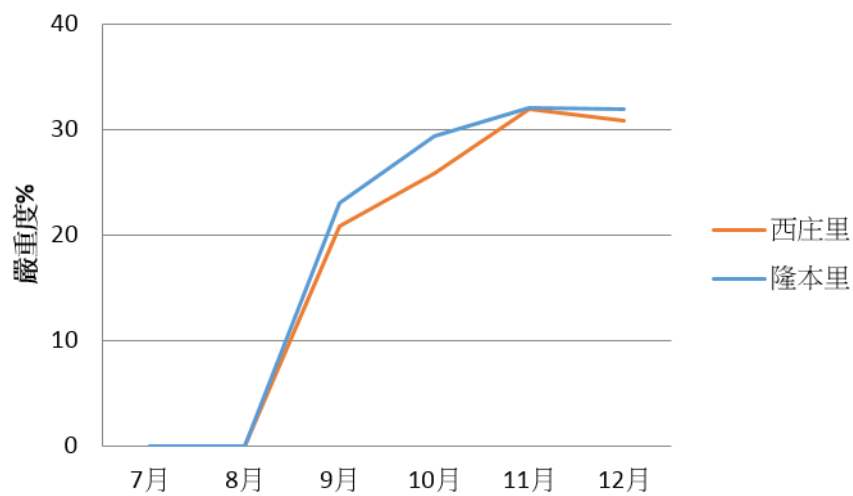


圖 11、臺南地區菱角炭疽病病於 2015 年 7 月至 12 月病勢發展曲線。

Figure 11. Monthly anthracnose disease severity of water caltrop investigated from July 2015 to December 2015 at Guan Tian, Tainan.

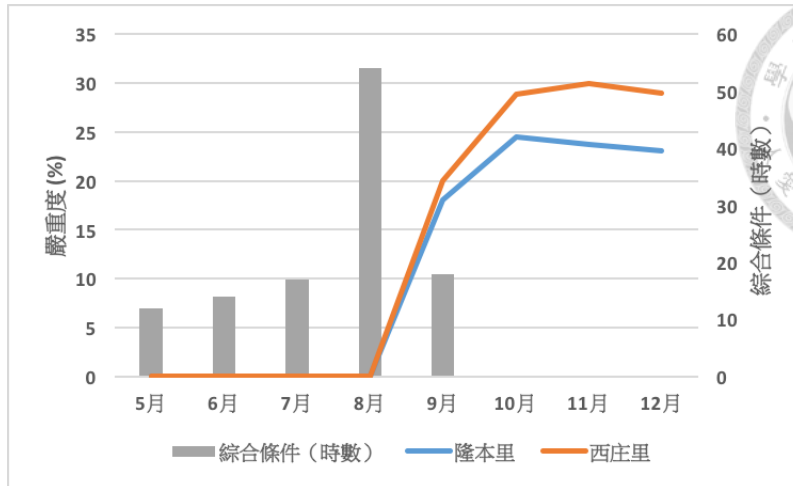


圖 12、2014 年 5 月至 12 月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與符合發病溫度、蒲氏二級風力之降雨時數(綜合條件時數)分析。

Figure 12. Relationship between anthracnose disease severity of water caltrop and 3 meteorological factors investigated form May 2014 to December 2014 at Guan Tian, Tainan.

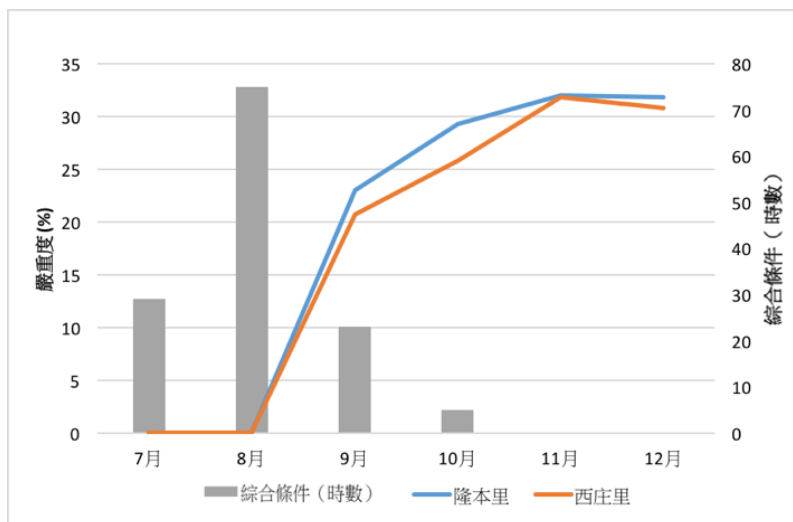


圖 13、2015 年 7 月至 11 月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與符合發病溫度、蒲氏二級風力之降雨時數(綜合條件時數)分析。

Figure 13. Relationship between anthracnose disease severity of water caltrop and 3 meteorological factors investigated form July 2015 to November 2015 at Guan Tian, Tainan.

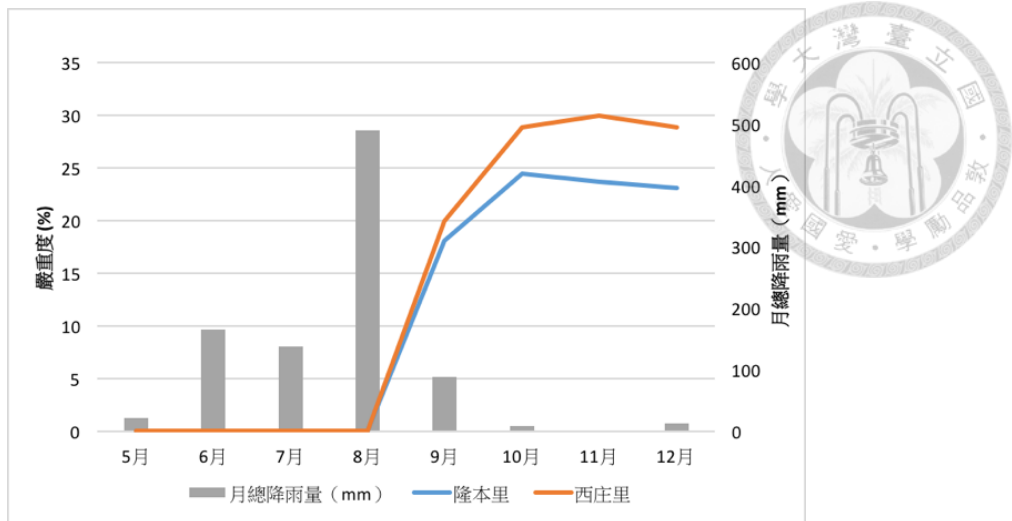


圖 14、2014 年 5 月至 12 月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與月總降雨量間之相關。

Figure 14. Relationship between anthracnose disease severity of water caltrop and last-monthly rainfall investigated form May 2014 to December 2014 at Guan Tian, Tainan.

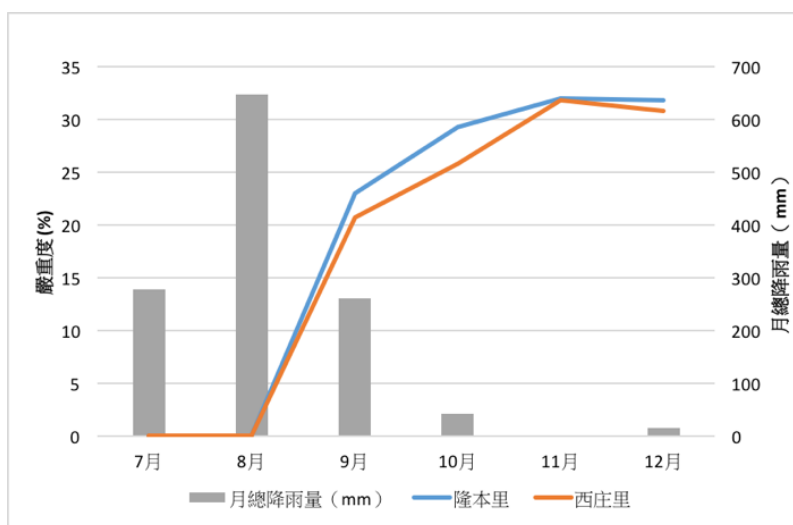


圖 15、2015 年 7 月至 11 月臺南官田地區隆本里與西庄里菱角炭疽病嚴重度與月總降雨量分析間之相關。

Figure 15. Relationship between anthracnose disease severity of water caltrop and last-monthly rainfall investigated form July 2015 to November 2015 at Guan Tian, Tainan.

表 11、臺南官田地區菱角炭疽病嚴重度與官田地區前一月氣象資料之相關分析。

Table 11. The correlation between anthracnose disease severity of water caltrop and 3 meteorological factors in last month investigated at Guan Tian, Tainan.

前一月氣象因子	相關係數(r)			
	官田隆本里		官田西庄里	
	(2014/5-9)	(2015/7-9)	(2014/5-9)	(2015/7-9)
適合發病溫度時數	0.5027	0.7932	0.5027	0.7932
蒲氏風級 2 級以上時數	0.2532	0.6496	0.5928	0.6496
降雨時數	0.5928	0.8636	0.5928	0.8636
綜合條件時數	0.9485	0.9271	0.9485	0.9271
總降雨量(mm)	0.9371	0.9297	0.9371	0.9297

七、菱角炭疽病之非農藥防治

(一) 中草藥萃取液對菱角炭疽病孢子發芽之抑制試驗

本試驗選擇 9 種中草藥，以純水及 50% 酒精分別萃取出 9 種中草藥萃取液 (共 18 種)，並將中草藥萃取液與菱角炭疽病 GL05 之孢子懸浮液混合後，配製成不同濃度的萃取液孢子懸浮液，並加入葡萄糖使葡萄糖濃度為 0.1%，而後觀察孢子發芽是否受到影響，其結果如表 12、13、14 及圖 16、18 所示。以水作為處理之對照組平均發芽率約為 95%，其中 9 種水萃取液抑制孢子發芽率之效果均低，只有大風子 2% 效果較有效果，抑制率約為 20%；9 種酒精萃取液均有良好效果，為除去酒精之干擾，附上以酒精處理之對照組結果做為參考，如表 13 及圖 17 所示，可知 2% 酒精抑制率約為 38%。酒精萃取液中以肉桂及丁香抑制率最高，在濃度 0.25% 仍能完全抑制孢子發芽，而藿香、五味子、大黃、薑黃亦有良好效果，在濃度 0.5% 時皆可完全抑制孢子發芽。

表 12、9 種中草藥水萃取液對菱角炭疽病 GL05 孢子發芽率之影響。

Table 12. Effect of nine herbal extracts on conidial germination of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

水萃取液	孢子發芽率(%) *					
	濃度	2%	1.50%	1%	0.50%	0.25%
霍香		92.8ab	92.1ab	93ab	93.3ab	94.1a
大風子		77.8e	80.3e	85.3d	93.3ab	94.5a
五味子		86.8cd	88.5cd	89.3bcd	90.6bc	94.8a
肉桂		94.3a	95a	94.5a	94.8a	93.6ab
丁香		86d	86.5d	88.1cd	86.6d	91.6ab
蛇床子		88.8bcd	92.8ab	92.1abc	93.6ab	93.1ab
山茱萸		93.5ab	93.6ab	94.3a	94.6a	95.3a
大黃		87.1cd	86.6d	87.8d	88.8cd	89.8b
薑黃		91.5abc	91.1bc	92.6ab	91.8abc	92.6ab

*每一數值之計算為六重複之平均，每一行中相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異(P>0.05)，本部分以水作為對照組。

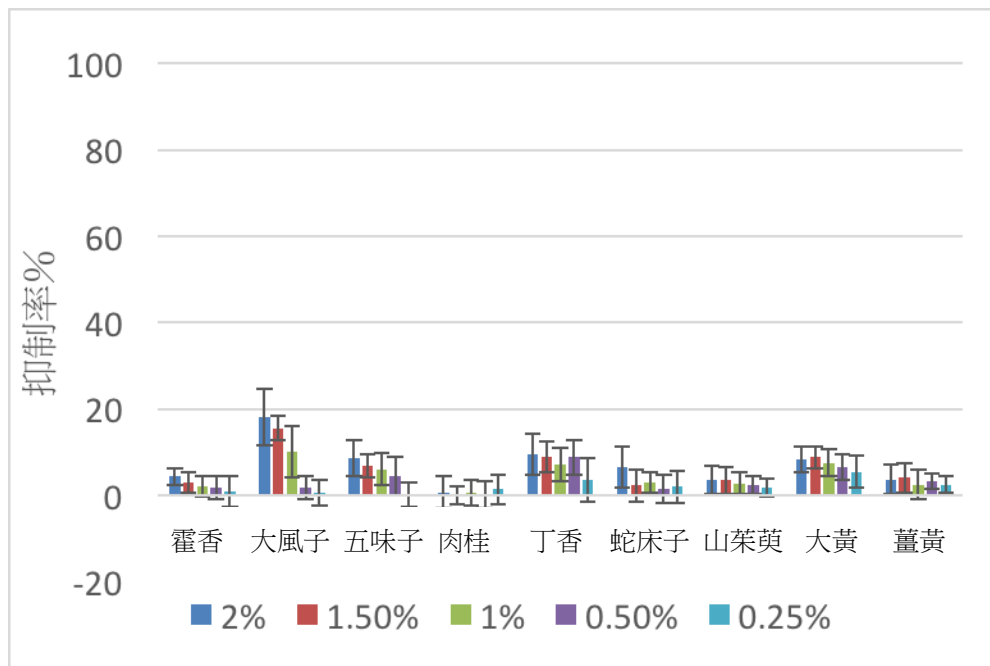


圖 16、9 種中草藥水萃取液對菱角炭疽病菌 GL05 孢子發芽抑制率。

Figure 16. Inhibition rates of nine herbal extracts on conidial germination of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.



表 13、酒精及待克利對菱角炭疽病菌株 GL05 孢子發芽之影響。

Table 13. Effect of ethanol and difenoconazole on conidial germination of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

	孢子發芽率(%)*	標準差
Water control	95	1.26
酒精 2%	60.67c	4.3
酒精 1.5%	64.17c	5.1
酒精 1%	72b	1.8
酒精 0.5%	84a	2.8
酒精 0.25%	87.5a	2.5
待克利 3000 倍	16d	3.05

*每一數值之計算為六重複之平均，每一行相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異(P>0.05)。

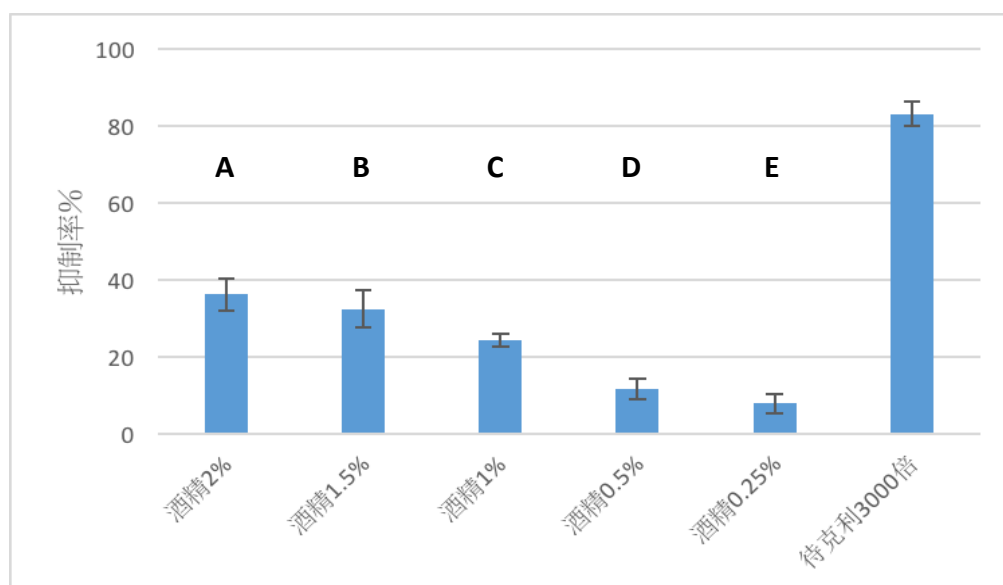


圖 17、酒精及農藥處理對菱角炭疽病 GL05 孢子發芽抑制率。

Figure 17. Inhibition rates of ethanol and fungicide on conidial germination of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.



表 14、9 種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌 GL05 孢子發芽率之影響。

Table 14. Inhibition rates of ethanol extracts from nine herbal materials on conidial germination of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

酒精萃取液	孢子發芽率(%)*					
	濃度	2%	1.50%	1%	0.50%	0.25%
霍香		0c	0c	0c	0c	48.6e
大風子		8.8b	16.5b	31.6b	46.6b	88.1a
五味子		0c	0c	0c	0c	68.5c
肉桂		0c	0c	0c	0c	0h
丁香		0h	0c	0c	0c	0c
蛇床子		0c	14b	30.5b	45.1b	61.1d
山茱萸		35.3a	53.6a	59.3a	64.3a	76b
大黃		0c	0c	0c	0c	40.5f
薑黃		0c	0c	0c	0c	15.5g

*每一數值之計算為六重複之平均，每一行中相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異($P>0.05$)，本部分以水作為對照組。

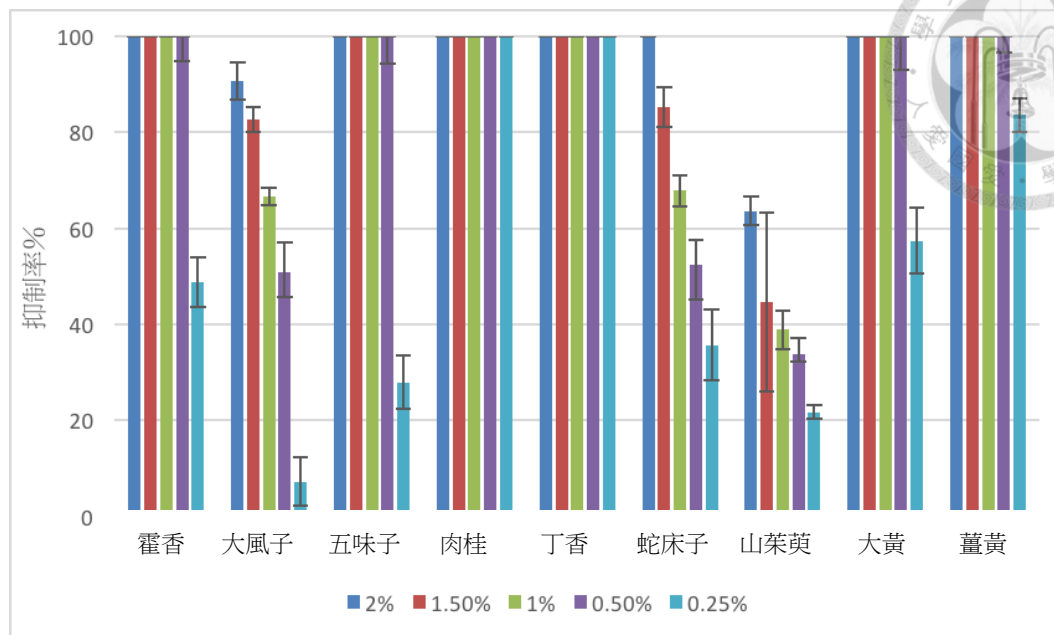


圖 18、9 種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌 GL05 之孢子發芽抑制率。

Figure 18. Inhibition rates of ethanol extracts from nine herbal materials on conidial germination of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

(二)中草藥萃取液對菱角炭疽病菌菌絲生長抑制試驗

本試驗選擇 9 種中草藥，以純水及 50%酒精分別萃取出 9 種中草藥萃取液 (共 18 種)，並將萃取液加入 PDA 中製作成五種有效濃度之萃取液培養基，而後將菱角炭疽病 GL05 菌絲塊接種於萃取液培養基上，觀察萃取液對於菌絲生長之抑制效果，結果如表 15、16、17 及圖 20、21 所示。顯示對照組 PDA 生長長度為 5.25 公分，而 18 種萃取液中以藿香酒精萃取液、肉桂酒精萃取液、丁香酒精萃取液處理組之菌絲生長長度最少，另對照組之酒精培養基以 2%抑制菌絲生長效果最顯著，生長長度為 3.58 公分，抑制率為 32%。

將菌絲生長長度換算成菌絲生長抑制率之結果如圖 20、21，可看出在水萃取液中，以藿香、五味子、山茱萸、大黃有較高之抑制率，其中五味子 2%之抑制率約為 39%為最高。至於酒精萃取液，則以藿香、肉桂、丁香有顯著的抑制能力，其中之肉桂、丁香酒精萃取液在 0.5%即可完全抑制菌絲生長；藿香酒精萃

取液在 1% 亦可完全菌絲生長。除前三種酒精萃取液外，大黃、薑黃之酒精萃取液在 2% 也有 95% 以上之抑制率；五味子、蛇床子在 2% 時抑制率約為 85%。抑制效果最差為大風子、山茱萸，即使在最高濃度下，抑制效果約為 70%。

在 18 種萃取液中，酒精萃取液濃度越高，顯示抑制效果越佳；濃度越低，則抑制效果越差。而在水萃取液中，只有丁香水萃取液隨濃度降低而抑制效果降低；大風子水萃取液抑制率有隨濃度下降而上升之趨勢，藿香、五味子、肉桂、蛇床子、山茱萸、大黃、薑黃等七種水萃取液則以 1% 之濃度抑制率最低。

表 15、酒精及農藥對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之影響。

Table 15. Effect of ethanol and fungicide on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

	菌絲生長長度(cm) *	標準差
Water control	5.25a	0.1
酒精 2%	3.58d	0.09
酒精 1.5%	4.13c	0.1
酒精 1%	4.28b	0.11
酒精 0.5%	5.22a	0.06
酒精 0.25%	5.26a	0.07
待克利 3000 倍	0e	0

*每一數值之計算為六重複之平均，每一行中相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異($P>0.05$)。

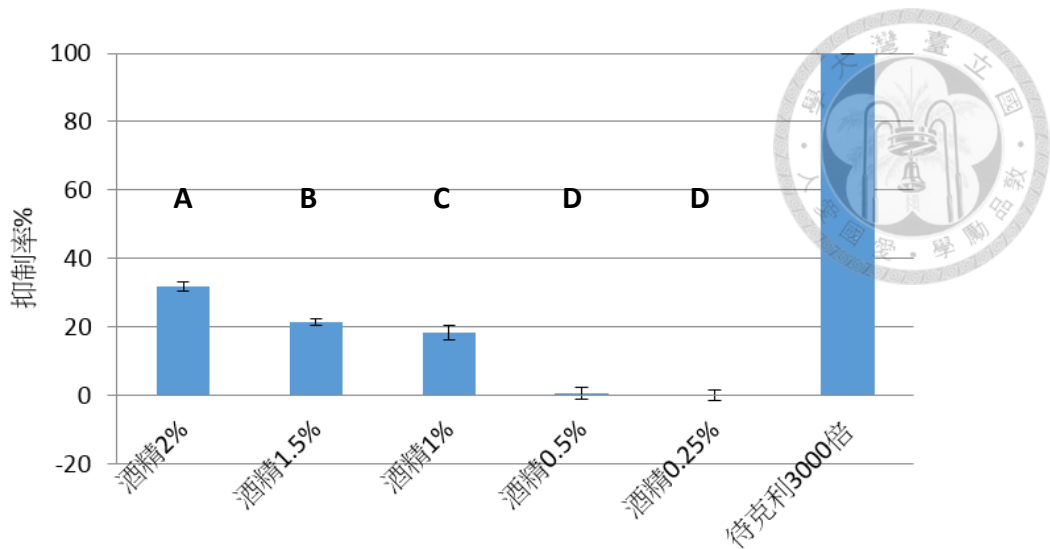


圖 19、酒精及農藥處理對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之影響。

Figure 19. Inhibition rates of ethanol and fungicide on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

表 16、9 種中草藥水萃取液對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之影響。

Table 16. Effect of water extracts from nine herbal materials on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

水萃取液 (Water extract)	菌絲生長長度(cm) * (Mycelial growth length (cm) *)				
濃度 (Concentration)	2%	1.50%	1%	0.50%	0.25%
霍香 (Spatholobus suberectus)	4.18cd	4.01c	4.78bc	4.92cd	4.81e
大風子 (Spatholobus suberectus)	5.11a	4.82a	4.31d	5.18b	5.26b
五味子 (Schisandra chinensis)	3.2e	4.8a	4.92ab	4.8de	4.89de
肉桂 (Cinnamomum cassia)	5ab	4.98a	5.21a	5.03c	5.28b
丁香 (Elettaria cardamom)	4.05cd	4.26b	4.36d	5.55a	5.68a
蛇床子 (Oenanthe javanica)	4.29c	4.8a	4.56cd	4.5f	4.44f
山茱萸 (Cornus officinalis)	4.18cd	4.87a	4.95ab	5.03c	5.02cd
大黃 (Rheum officinale)	3.88d	4.08bc	4.79bc	5.03c	5.14bc
薑黃 (Turmeric)	4.71b	4.81a	4.88bc	4.77e	4.86e

*每一數值之計算為六重複之平均，每一行中相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異(P>0.05)，本部分以水作為對照組。

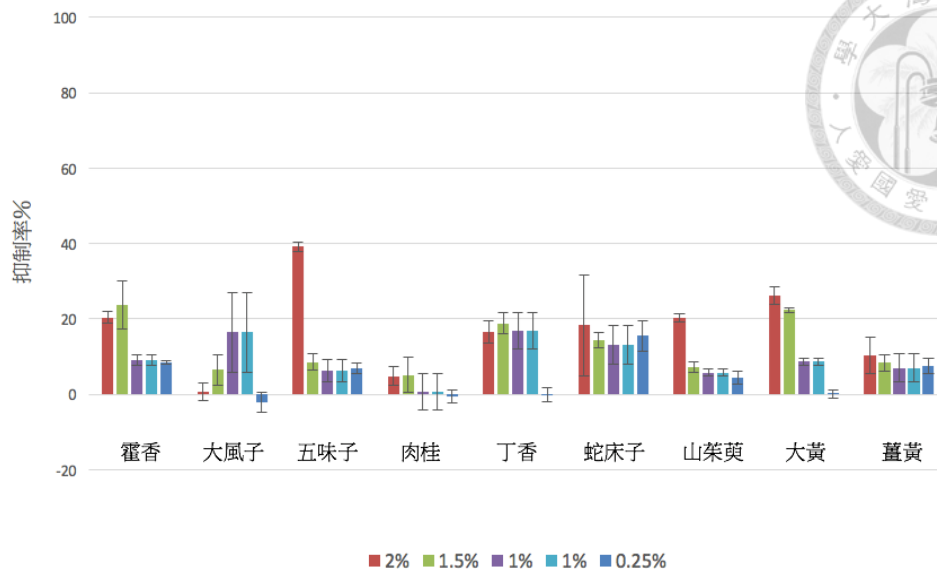


圖 20、9 種中草藥水萃取液對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之抑制率。

Figure 20. Inhibition rates of water extracts from nine herbal materials on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

表 17、9 種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之影響。

Table 17. Effect of ethanol extracts from nine herbal materials on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

酒精萃取液	菌絲生長長度 (cm) *				
	濃度	2%	1.50%	1%	0.50%
霍香	0d	0d	0e	1.67g	4.6c
大風子	1.49b	2.07b	3.16a	3.58c	4.27d
五味子	0.74c	1.08c	1.33d	2.29e	3.85e
肉桂	0d	0e	0e	0h	6.04g
丁香	0d	0e	0e	0h	2.92f
蛇床子	0.62c	0.78d	1.79c	2.85d	5.25b
山茱萸	1.86a	2.91a	2.93b	3.87b	5.39b
大黃	0d	1.99b	2.84b	4.45a	5.94a
薑黃	0.12d	1.05c	1.34d	1.9f	4.45cd

*每一數值之計算為六重複之平均，每一行中相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異(P>0.05)，本部分以水作為對照組。

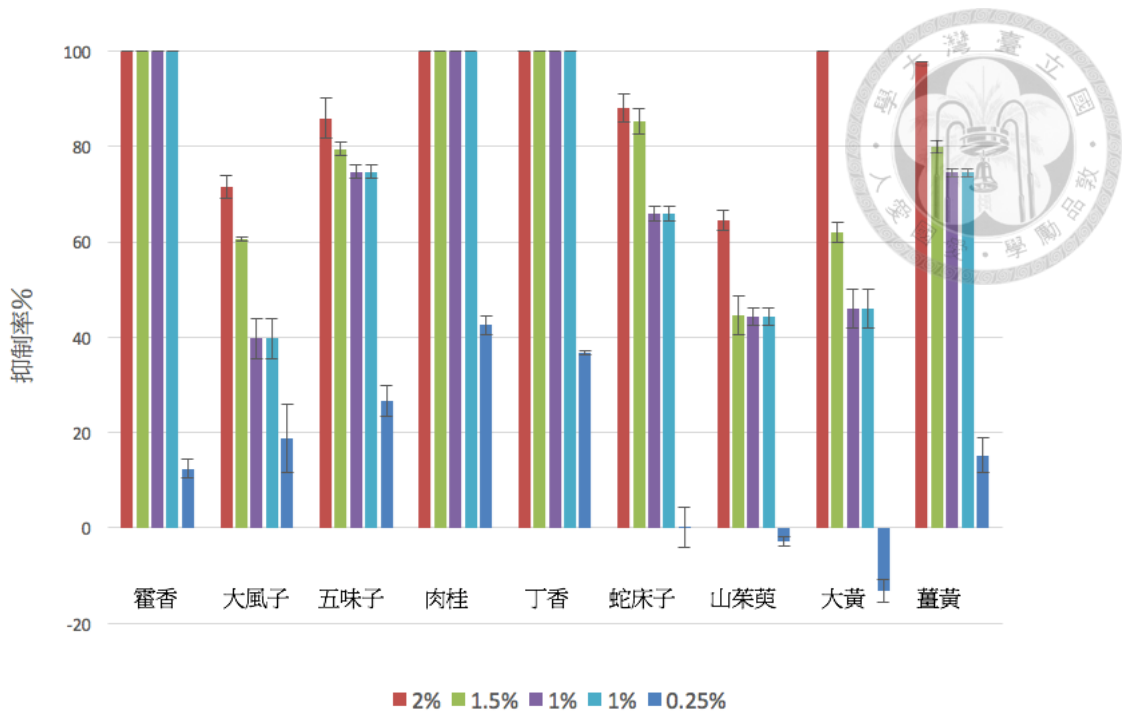


圖 21、9 種中草藥酒精萃取液對菱角炭疽病菌株 GL05 菌絲生長之抑制率。

Figure 21. Inhibition rates of ethanol extracts from nine herbal materials on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

(三)拮抗微生物對菱角炭疽病菌對峙培養試驗

將三種拮抗微生物與菱角炭疽病 GL05 接種於 PDA 上，測試拮抗微生物對於菌絲生長的影響。結果如表 18 及圖 22 所示，三種拮抗微生物對於菱角炭疽病 GL05 均有抑制效果，尤以前三天接種放射線菌 YU01 之效果最佳，菌絲生長長度為 1.1 公分，其次為前三天接種枯草桿菌，菌絲生長長度為 1.13 公分。

以公式換算成抑制率後，結果如圖 23 所示，以前三天接種放射線菌 YU01、前三天接種枯草桿菌、同時接種木黴菌共三種處理之抑制率均高於 70%，剩下的兩種處理，如同時接種放射線菌 YU01 抑制率約為 52%，同時接種枯草桿菌抑制率則約為 61%。

表 18、枯草桿菌、木黴菌及放射線菌 YU01 對菱角炭疽病菌株 GL05 對峙培養之菌絲生長結果。

Table 18. Effect of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperillum* and *Streptomyces sp.* YU01 on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop in dual culture.

	菌絲生長長度(cm) *	標準差
Control	4.6	0
枯草桿菌(同時)	1.78b	0.07
枯草桿菌(前三天)	1.13d	0.09
木黴菌(同時)	1.3c	0.21
放射線菌(同時)	2.22a	0.04
放射線菌(前三天)	1.1d	0.11

*每一數值之計算為 10 重複之平均，每一行中相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異(P>0.05)。



圖 22、枯草桿菌、木黴菌及放射線菌 YU01 對菱角炭疽病菌株 GL05 對峙培養之菌絲生長示意圖。(A)為枯草桿菌，(B)為木黴菌，(C)為放射線菌 YU01。

Figure 22. Inhibition of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperillum* and *Streptomyces sp.* YU01 on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop in dual culture. (A) *Bacillus subtilis*, (B) *Trichoderma asperillum*, (C) *Streptomyces sp.* YU01.

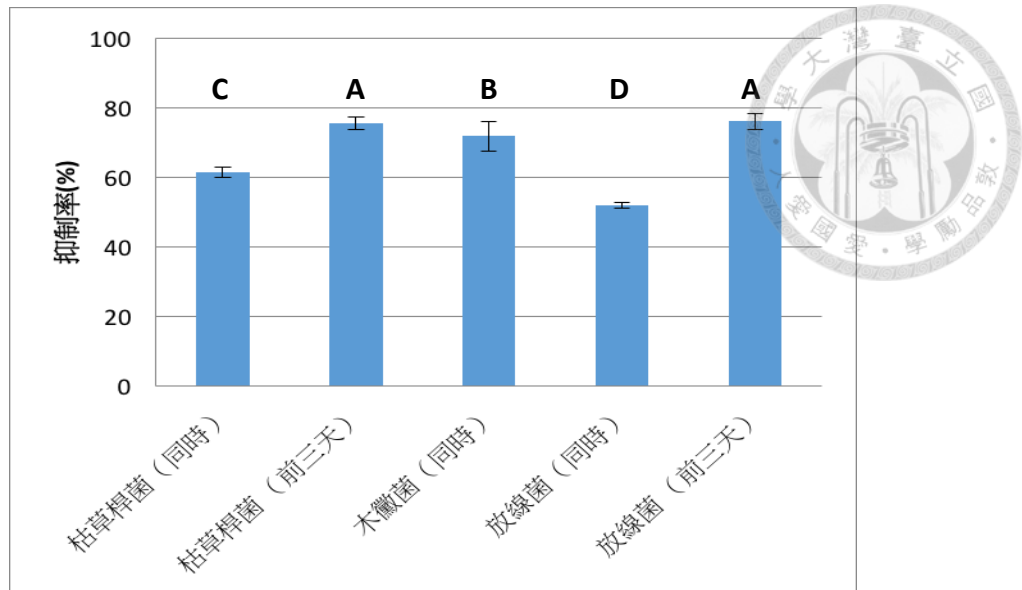


圖 23、枯草桿菌、木黴菌及放射線菌 YU01 對菱角炭疽病菌株 GL05 對峙培養之菌絲生長抑制率。

Figure 23. Inhibition rate of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperillum* and *Streptomyces sp.* YU01 on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop in dual culture.

(四) 中草藥萃取液對菱角炭疽病之盆栽防治試驗

本項選用在於前項試驗中，對於孢子發芽、菌絲生長具良好抑制效果之中草藥萃取液進行試驗，首先使用解剖刀刮傷造成約 1cm² 公分之傷口後，於接種前或接種後噴灑中草藥萃取液測試其防治效果，結果如表 19 所示。18 種處理中，只有在接種前施用霍香酒精萃取液(2%)、肉桂酒精萃取液(2%)、丁香酒精萃取液(2%)、大黃酒精萃取液(2%)有些微效果，接種後再施用只有霍香酒精萃取液(2%)、大黃酒精萃取液(2%)有些微效果。綜觀萃取液部份，以接種前施用肉桂酒精萃取液(2%)有近 30%之效果，然而在第 15 天觀察時又發現一片接種葉受感染，其餘組別則沒有變化。除萃取液處理組別外，對照組之待克利抑制效果近 100%，而酒精 2%之處理組則沒有抑制效果。

表 19、6 種中草藥萃取液對菱角炭疽病菌 GL05 在盆栽防治試驗之結果。

Table 19. Controlling efficiency of extracts from six herbal materials on anthracnose isolate GL05 from water caltrop in pot test.

處理組	施用時間	發病率(%)*		
		5 天	10 天	15 天
霍香酒精萃取液(2%)	接種前	84	84	84
霍香酒精萃取液(2%)	接種後	84	84	84
霍香酒精萃取液(1%)	接種前	100	100	100
霍香酒精萃取液(1%)	接種後	100	100	100
五味子酒精萃取液(2%)	接種前	100	100	100
五味子酒精萃取液(2%)	接種後	100	100	100
肉桂酒精萃取液(2%)	接種前	70	70	84
肉桂酒精萃取液(2%)	接種後	70	100	100
肉桂酒精萃取液(1%)	接種前	100	100	100
肉桂酒精萃取液(1%)	接種後	100	100	100
丁香酒精萃取液(2%)	接種前	84	84	84
丁香酒精萃取液(2%)	接種後	100	100	100
丁香酒精萃取液(1%)	接種前	100	100	100
丁香酒精萃取液(1%)	接種後	100	100	100
蛇床子酒精萃取液(2%)	接種前	100	100	100
蛇床子酒精萃取液(2%)	接種後	100	100	100
大黃酒精萃取液(2%)	接種前	84	84	84
大黃酒精萃取液(2%)	接種後	84	84	84
待克利(3000x)	接種前	0	0	0
待克利(3000x)	接種後	0	0	0
酒精(2%)	接種前	100	100	100
酒精(2%)	接種後	100	100	100
水	接種前	100	100	100
水	接種後	100	100	100

*各處理為 7 片葉片重複之平均。

(五)拮抗微生物對菱角炭疽病之盆栽防治試驗

本試驗使用對峙培養實驗中，對菱角炭疽病菌 GL05 具抑制率菌株進行盆栽試驗，結果如表 20 所示。接種菱角炭疽病菌 GL05 前三天，噴灑枯草桿菌商品

之推薦濃度 800 倍之發病率為 57%；施用木黴菌推薦濃度 500 倍以及 1000 倍發病率為 71%；噴灑放射線菌放射線菌 YU01 濃度 1×10^7 及 1×10^5 之發病率為 57%。接種菱角炭疽病菌 GL05 前一天施用拮抗微生物，枯草桿菌濃度 800 倍發病率為 71%；木黴菌以 1000 倍效果較佳，發病率為 71%；施用 YU01 濃度 1×10^7 後發病率為 86%。施用三種拮抗後同時接種菱角炭疽病菌 GL05 之抑制率皆不高。

表 20、三種拮抗微生物對菱角炭疽病菌株 GL05 在盆栽防治試驗之結果。

Table 20. Application of three antagonistic microorganisms to control the anthracnose isolate GL05 from water caltrop in the green house. (Data taken at 5, 10, 15 days after treatment)

處理組	施用時間	發病率(%)*		
		5 天	10 天	15 天
枯草桿菌(400x)	接種前 3 天	86	86	86
枯草桿菌(400x)	接種前 1 天	100	100	100
枯草桿菌(400x)	同時	100	100	100
枯草桿菌(800x)	接種前 3 天	57	57	57
枯草桿菌(800x)	接種前 1 天	71	86	86
枯草桿菌(800x)	同時	86	86	86
木黴菌(500x)	接種前 3 天	71	71	71
木黴菌(500x)	接種前 1 天	86	86	86
木黴菌(500x)	同時	100	100	100
木黴菌(1000x)	接種前 3 天	71	71	71
木黴菌(1000x)	接種前 1 天	71	71	71
木黴菌(1000x)	同時	86	100	100
放射線菌 YU01(1×10^5)	接種前 3 天	57	57	57
放射線菌 YU01(1×10^5)	接種前 1 天	100	100	100
放射線菌 YU01(1×10^5)	同時	100	100	100
放射線菌 YU01(1×10^7)	接種前 3 天	57	57	57
放射線菌 YU01(1×10^7)	接種前 1 天	86	86	86
放射線菌 YU01(1×10^7)	同時	100	100	100

待克利(3000x)	接種前 3 天	0	0	0
待克利(3000x)	接種前 1 天	0	0	0
待克利(3000x)	同時	0	0	0
水	接種前 3 天	100	100	100
水	接種前 1 天	100	100	100
水	同時	100	100	100



*各處理為 7 片葉片重複之平均。

八、農藥對菱角炭疽病菌菌絲生長抑制試驗

本藥劑試驗選用待克利、撲克拉錳、甲基鋅乃浦、百克敏、貝芬替共五種藥劑，其中待克利、撲克拉錳、甲基鋅乃浦為植物保護手冊中之推薦藥劑，而百克敏及貝芬替則是本實驗室常用之炭疽病防治藥劑。主要將不同濃度之藥劑加入 PDA，並以推薦濃度為中間值取五個有效成份濃度。藥劑培養基配製完成後，接種培養 10 天之菱角炭疽病菌株，待五天後觀察生長情形，並以抑制率公式計算抑制率。

本項試驗結果如表 21 及圖 24 所示，發現五種藥劑中以待克利、貝芬替對菱角炭疽病 GL05 之菌絲生長抑制率最強，即使 10 ppm 也能完全抑制菌絲生長，其次為撲克拉錳在 50ppm 時能完全抑制菌絲生長。效果最差者為甲基鋅乃浦，即便有效濃度達 1000ppm 時，抑制率僅約 38%。

表 21、五種農用殺菌劑對菱角炭疽病菌 GL05 菌絲生長之影響。

Table 21. Effect of five fungicide on mycelium growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

殺菌劑	菌絲生長長度(cm)*				
	1000ppm	500ppm	100ppm	50ppm	10ppm
甲基鋅乃浦	3.36a	3.7a	4.25a	4.29a	4.29a
百克敏	0b	0b	0.21b	0.42b	2.45b
貝芬替	0b	0b	0c	0c	0d
待克利	0b	0b	0c	0c	0d
撲克拉錳	0b	0b	0c	0c	0.29c

*每一數值之計算為五重複之平均，每一行中相同字母表示以最小顯著差異法檢定無顯著差異($P>0.05$)。

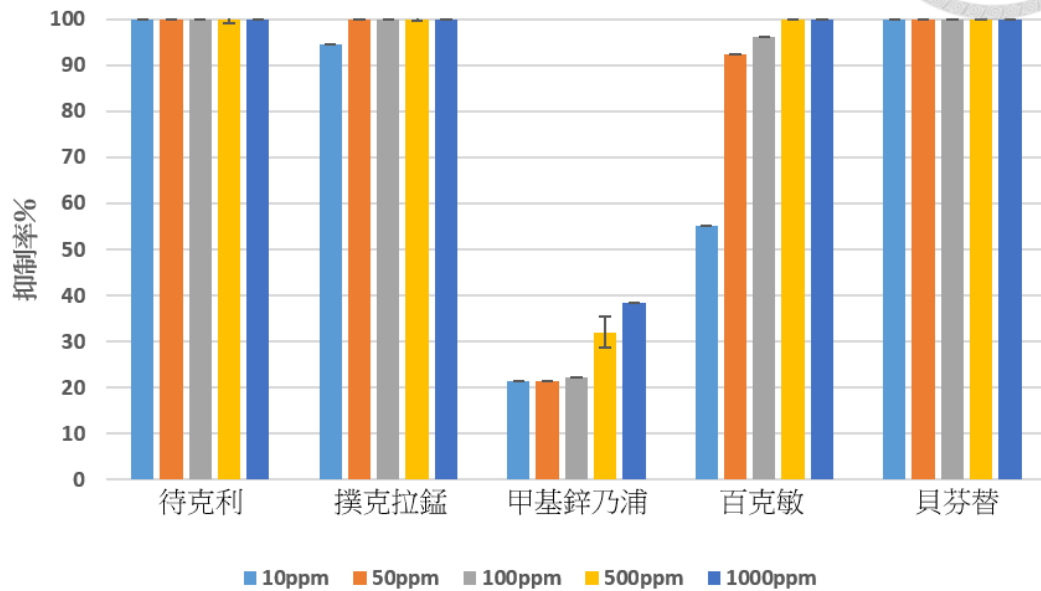


圖 24、5 種農用殺菌劑對菱角炭疽病 GL05 之菌絲生長抑制率。

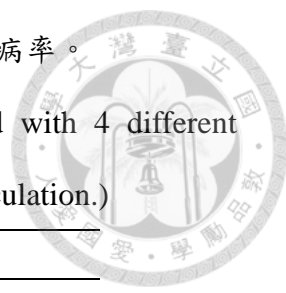
Figure 24. Comparison of inhibition rate of five fungicides on mycelial growth of anthracnose isolate GL05 from water caltrop.

九、以不同來源炭疽病菌對臺灣菱進行病原性之檢定

本項試驗分別以文旦炭疽病、芒果炭疽病、草莓炭疽病、文旦炭疽病三種病原菌，以孢子懸浮液借種於臺灣菱葉片，觀察是否有病癥產生，結果如表 22 所示，除對照組(菱角炭疽病)外皆未觀察到病徵之出現。

表 22、四種不同炭疽病菌接種於臺灣菱葉片造成炭疽病之發病率。

Table 22. The anthracnose incidence of water caltrop inoculated with 4 different *Colletotrichum* sp. in the greenhouse. (Data taken 10 days after inoculation.)



炭疽病菌	發病率(%)*
菱角炭疽病(GL05)	5/5(100%)
文旦炭疽病	0/5(0%)
草莓炭疽病	0/5(0%)
芒果炭疽病	0/5(0%)
對照組(水)	0/6(0%)

*每一菌株各接種於 5 片葉片。

第五章 討論



一、臺灣南部菱角炭疽病之田間調查

臺灣菱角病害已知有三種，分別為菱角炭疽病、菱角白絹病、菱角紋枯病，後兩者在過往即有詳細的研究，唯菱角炭疽病已在臺南地區發生多年，卻一直缺乏較有系統的研究。因此，本研究自 2014 年 5 月至 12 月，至臺南官田隆本里、官田西庄里等地進行第一期病害調查，並於 2015 年 7 月至 12 月進行第二期調查。

現今官田區臺灣菱的種植方式，每年約於農曆新年前後開始在育苗池育苗，而後等到第一期稻作收穫後，即在原本的田區將臺灣菱定植於水田。雖然在前人研究中顯示菱角炭疽病對於幼苗至成株皆有感染力，但在本研究中，發現幼苗期並未有菱角炭疽病之發生，定植於本田區後也需至 8 月至 9 月才會觀察到病徵，為何需要到成熟期才開始發病，原因尚不清楚。推測的原因可能為潛伏感染，或是或是要等到適合氣候才會大規模發生。

二、菱角炭疽病之病原分離及初步鑑定

本研究自臺南官田隆本里、官田西庄里、麻豆區等三個田區採集具有相似病徵之臺灣菱葉片，而後使用組織分離法、稀釋分離法獲得炭疽病菌及少量疫病菌。此外，感染菱角炭疽病之葉片亦可能同時感染菱角白絹病，但病斑少見重疊，因此不會影響目測判定。而白絹病之菌絲似乎對於漂白水較敏感，容易受到漂白水抑制，因此在組織分離時，即便肉眼可以看到菌絲，若經過漂白水處理後則較難分離到白絹病菌，這也說明為何在田間有白絹病發生，在組織分離法時卻未分離到白絹病之原因。

三、菱角炭疽病分離株之病原性檢測

本部分之研究為確保病徵是由人工接種分離株而得，因此接種方式選擇在解

剖刀所造成的傷口上滴上孢子懸浮液，而非整片葉子噴灑，只要傷口處產生病徵即可確認病原性，藉此避免可能潛伏感染之情況。經葉片傷口接種試驗，確認炭疽病菌會在3-5天內會於臺灣菱葉片產生病徵，初期病徵為大小不一之黑色斑點，而後斑點會癒合，斑點外圍有時會出現黃色暈圈，後期病斑會產生凹陷產生橘色孢子堆，嚴重時植株會整株褐化乾枯死亡。

四、菱角炭疽病菌分離株之鑑定

本次實驗調查所得之分離株 GL05 經分子生物學鑑定後，確認與前人報導之 *Colletotrichum gloeosporioides* Penzing 相同。在形態學鑑定上可在植株殘體及 PDA 上產生肉眼可見之分生孢子堆，此點與本實驗室前人研究中所使用之草莓炭疽病菌(梁，2015)、芒果炭疽病菌相似，但與不產生分生孢子堆之茶赤葉枯病菌(蔡，2014)、咖啡炭疽病菌相異。此外，在強光照下，深色色素的分泌會稍有降低之趨勢，與草莓炭疽病菌相同。

菱角炭疽病菌的孢子發芽所需時間較長，在 25°C 時需要 30-36 小時才能有近 90% 之發芽率，若只有 24 小時之發芽時間則只有 30-40% 之發芽率；若添加葡萄糖(glucose)、半乳糖(galactose)則可縮短發芽時間。孢子發芽後會產生附著器，並會在附著器內部產生黑色素。

五、溫度對菱角炭疽病菌菌絲生長速度之影響

依據溫度試驗可知菱角炭疽病菌 GL05 在 25°C 時，菌絲生長速度最快，與前人研究 24-28°C 生長速度最快相吻合，且於試驗最高溫 35°C 及試驗最低溫 15°C 之環境下仍能生長，但在 35°C 受影響較大。依此結果，推論未來若環境溫度持續升高，可能會使夏季菱角炭疽病之發生嚴重度降低，而秋、冬季溫度升高，菱角炭疽病的大規模發生時間可能會延長。

六、臺南地區菱角炭疽病之流行病學調查

依據農民之說法，通常於颱風天過後菱角炭疽病會開始發生，然而 2014 的第一個登陸颱風(麥德姆颱風)侵台後，在八月底之調查並沒有發現菱角炭疽病之病徵，與農民種植之經驗不符；此外 2015 年第一個登陸颱風(蘇迪勒颱風)親台後，亦沒有在八月底產生病徵。從結果中可以看出，菱角炭疽病之發生可能與前一個月之綜合因子、月總降雨量相關。

綜合兩年的流行病學調查結果推測，臺灣菱在 4-5 月定植於水田後，過了 3-4 個月才有大規模發生，主要是因夏季(每年 6-8 月)的長時間氣象因子導致高溫高濕度，且期間風速達到蒲氏 2 級風速以上(包含颱風)等因素導致菱角葉片摩擦產生細微傷口，菱角炭疽病侵入後，過一個月(約 8-9 月)之調查即可記錄到病害大規模發生，因此颱風是其中一個因子，若颱風沒有帶來長時間降雨，或是田區所受風力強度不高，則未必會有菱角炭疽病之大規模發生。

此外，臺灣菱在剛種植時，每株菱角都有一定距離，即便受到擾動，菱盤亦能平貼水面，當種植 1 至 2 個月後，菱盤會因生長快速而覆蓋整塊田區，此時菱盤除了會互相摩擦產生傷口，颱風過後因為水田水位變動劇烈，在水位下降後菱盤因互相卡住而無法隨水位下降平貼於水面，這也增加了菱角炭疽病菌容易侵入的面積。且菱角炭疽病罹病組織在與水接觸的部分不容易產生孢子，病株與水接觸的面積越少，對於孢子的產生越有利。

除了探討菱角炭疽病發生的原因，兩年的調查也可以發現在 10 月過後病害的嚴重度上升趨緩，並且在 2014 年 11 月有明顯下降趨勢，2015 年則下降趨勢稍減，主要原因可能在於氣溫下降，導致病害的發展趨緩。次要原因可能在於降雨時數的減少，當病害傳播的條件不存在時，病害的嚴重度及範圍自然也會稍微減少。

七、菱角炭疽病之非農藥防治

中草藥萃取液中之酒精萃取液雖可有效抑制炭疽病孢子發芽及菌絲生長，但在菌絲生長抑制實驗中，大黃之酒精萃取液 0.25%、山茱萸之酒精萃取液 0.25% 反而是促進菌絲生長，目前推測植物萃取出之二次代謝物可能有數種，而二次代謝物並非每種都為抑制效果，有些甚至可能促進生長，因此抑制生長之二次代謝物濃度須超過有效濃度，否則反而促進生長之二次代謝物超過有效濃度時會促進菌絲生長。此外，在肉桂酒精萃取液及丁香酒精萃取液處理組中，除了萃取液培養基上的菌絲生長受到抑制外，作為接種源之 PDA 菌絲塊上的菌絲生長亦受到抑制，推測應該是有揮發性物質抑制菌絲生長。

拮抗微生物部分選擇枯草桿菌、木黴菌、放射線菌 YU01 三者，於 PDA 時均有良好抑菌效果，其中又以前三天接種放射線菌 YU01 者效果最佳。在試驗過程中，同時接種木黴菌之處理在第 5 天即開始產生超寄生之現象，而 YU01 之處理在第 7 天後可以發現培養基顏色明顯變色，單獨培養時亦有此現象，顯示 YU01 會分泌抑制菌絲生長之物質進入培養皿中，進而抑制炭疽病菌菌絲生長。YU01 部分之研究結果，與本實驗室之前人研究中 YU01 可抑制茶赤葉枯病(蔡，2014)及鏈隔孢菌(*Alternaria sp.*)、鐮孢菌 (*Fusarium sp.*)等病菌(張，2012)相符。

以上述三種拮抗微生物進行盆栽防治試驗之結果，顯示若提前施用拮抗微生物會有較佳的防治率，此外亦可比照其他學者以 PDB 直接培養後施用於植株上，或以豆類加入砂糖培養數日後施用於田間，或許會更有效果。另亦可進行多次噴灑，也許無法防止感染，但應可減低病害嚴重度。除原本所使用的三種拮抗微生物，也可以使用液化澱粉芽孢桿菌進行防治試驗，比較是否有更佳的防治效果。

八、農藥對菱角炭疽病菌絲生長抑制試驗

整體而言待克利、貝芬替、撲克拉錳三種藥劑皆具有良好抑菌效果，推論三者之抑菌效果較好或具有較高的殘效性。但貝芬替目前非推薦藥劑，故未來在田

間試驗、栽培時可以優先考慮待克利及撲克拉錳。




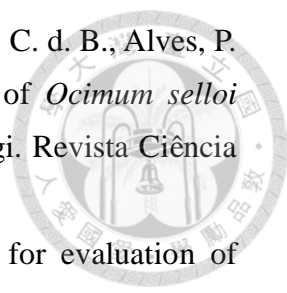
九、以不同來源炭疽病菌對臺灣菱進行病原性之檢定

官田地區為臺灣菱主要產區，為了解產區附近是否有可能交叉感染之炭疽病菌，因此選擇芒果炭疽病(官田區)、文旦炭疽病(麻豆區)、草莓炭疽病(善化區)等炭疽病菌之分離株，將不同植物分離之炭疽病菌接種於臺灣菱葉片，其結果顯示芒果炭疽病、文旦炭疽病、草莓炭疽病、並不會造成臺灣菱產生炭疽病病徵，但炭疽病菌變異性大，若重複以不同來源之炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)重複接種於臺灣菱葉片，亦有可能產生感染的現象。

參考文獻

1. 中華民國植物病理學會。2002。台灣植物病害名彙 第四版。台灣。
2. 阮逸明。1995。台灣農家要覽農作篇(一)。行政院農業委員會。386 頁。
3. 李昱輝、張淳文、呂理燊。1989。菱角紋枯病菌侵害過程之掃描式電子顯微鏡觀察。植物保護學會會刊 31: 211-216。
4. 林宗俊、鄭可大、黃振文。2002。丁香及其主成分防治甘藍苗立枯病的功效。植物病理學會刊 11(4): 189-198。
5. 林秋琍、林宗俊、黃振文。2010。丁香油與植物營養防治十字花科蔬菜炭疽病之效果評估。植物病理學會刊 19(2): 167-176。
6. 胡賢彬。2013。應用黑色素生合成基因研發鑑定炭疽病菌之生物晶片及探討其類緣關係。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。101 頁。
7. 陳文雄、李昱輝。1999。根莖類-菱角。蔬菜病蟲害綜合防治專輯，根 28 頁。
8. 陳俊位、鄧雅靜、蔡宜峯。2014。木黴菌在作物病害防治的開發與應用。臺中區農業改良場特刊 121: 87-115。
9. 陳俊位、鄧雅靜、曾德賜。2009。功能性微生物製劑在有機作物栽培病害管理上之應用。臺中區農業改良場特刊 96: 147-181。
10. 陳昇寬、陳文雄。2003。菱角金花蟲 *Galerucella nipponensis* (Laboissiere)(Coleoptera: Chrysomelidae)生態學初探。台南區農業改良場研究彙報 41:28-34。
11. 梁鈺平。2015。草莓炭疽病檢測及防治研究。國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程碩士學位論文。
12. 張家銘、溫英源、李瑞興。2007。台灣菱角 (*Trapa taiwanensis* Nakai) 族群變異之研究。中華農學會報。8(5): 470-483。
13. 張鳳書。2012。生物製劑多元防治能力快速測試系統之研究。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。
14. 黃增泉。1993。臺灣植物誌。第二版。行政院國家科學委員會。969 頁。
15. 費雯綺、王喻其。2010。植物保護手冊—蔬菜篇，第 85 頁。
16. 蔡依真、鍾文全、鍾文鑫。2010。應用鏈黴菌 *Streptomyces* sp. A272 防治白菜立枯病。植物病理學會刊 19(2): 149-155。
17. 蔡武雄、吳金助。1981。菱白絹病。植物保護學會會刊 23: 47-49。
18. 蔡志千。2014。茶赤葉枯病之流行病學及非農藥防治。國立臺灣大學碩士學位學程碩士學位論文。

- 
19. 劉世慧。2000。台灣菱之花、果及沉水葉之發育。國立中山大學生物科學研究所碩士論文。
 20. 謝廷芳、黃晉興、謝麗娟、胡敏夫、柯文雄。2005。植物萃取液對植物病原真菌之抑菌效果。植物病理學會刊 14：59-66。
 21. 謝奉家、高穗生。2011。具商品化潛力之多功能液化澱粉芽孢桿菌。海峽兩岸生物防治研討會論文專刊：28-29。
 22. Ahimou, F., Jacques, P., and Deleu, M. 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology* 27(10):749-754.
 23. Bais, H. P., Fall, R., and Vivanco, J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology* 134(1):307-319.
 24. Bosquez-Molina, E., Ronquillo-de Jesús, E., Bautista-Banos, S., Verde-Calvo, J., and Morales-López, J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology* 57(2):132-137.
 25. Buchwaldt, L., Morrall, R., Chongo, G., and Bernier, C. 1996. Windborne dispersal of *Colletotrichum truncatum* and survival in infested lentil debris. *Phytopathology* 86(11):1193-1198.
 26. Cannon, P., Damm, U., Johnston, P., and Weir, B. 2012. *Colletotrichum*—current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213.
 27. Cheng, S. S., Liu, J. Y., Chang, E. H., and Chang, S. T. 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource technology* 99(11):5145-5149.
 28. Chitarra, G., Breeuwer, P., Nout, M., Van Aelst, A., Rombouts, F., and Abee, T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology* 94(2):159-166.
 29. Cho, J. Y., Gyung, J. C., Lee, S. W., Kyoung, S. J., Lim, H. K., Lim, C. H., Sun, O. L., Kwang, Y. C., and Kim, J. C. 2006. Antifungal activity against *Colletotrichum* spp. of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. rhizomes. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16(2):280-285.
 30. Colhoun, J. 1973. Effects of environmental factors on plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 11(1):343-364.

- 
31. Costa, L. C. B., Pinto, J. E. B. P., Bertolucci, S. K. V., Costa, J. C. d. B., Alves, P. B., and Niculau, E. d. S. 2015. In vitro antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. *Revista Ciência Agronômica* 46(2):428-435.
 32. Das, K., Tiwari, R., and Shrivastava, D. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(2):104-111.
 33. Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., and Ellis, J. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4):414-430.
 34. Denham, T., and Waller, J. 1981. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. *Annals of Applied Biology* 98(1):65-77.
 35. Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., and Barakate, M. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(11):1503-1509.
 36. Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., and Bilu, A. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110(4):361-370.
 37. Haggag, W., and Abdall, A. 2011. Foliar application of *Streptomyces aureofaciens* improve protection in Mango against post-harvest anthracnose and enhances fruit yield. *Eur J Sci Res* 63:139-149.
 38. Heng, J. L. S., Shah, U. K. M., Rahman, N. A. A., Shaari, K., and Hamzah, H. 2015. *Streptomyces ambofaciens* S2-A Potential Biological Control Agent for *Colletotrichum gloeosporioides* the Causal Agent for Anthracnose in Red Chilli Fruits. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 2015.
 39. Hyde, K., Cai, L., Cannon, P., Crouch, J., Crous, P., Damm, U., Goodwin, P., Chen, H., Johnston, P., and Jones, E. 2009. *Colletotrichum*—names in current use. *Fungal Diversity* 39(1):147-182.
 40. Kim, J. 2008. Phytotoxic and antimicrobial activities and chemical analysis of leaf essential oil from *Agastache rugosa*. *Journal of Plant Biology* 51(4):276-283.
 41. Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., and Chi, Y. T. 2010. Production of biosurfactant

- lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. J Microbiol Biotechnol 20(1):138-145.
42. Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94(11):1259-1266.
43. Korsten, L., and De Jager, E. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. S. Afr. Avocado Growers' Assoc. Yearb 18:124-130.
44. Kumar, D. P., Singh, R. K., Anupama, P., Solanki, M. K., Kumar, S., Srivastava, A. K., Singhal, P. K., and Arora, D. K. 2012. Studies on exo-chitinase production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and its characterization. Indian Journal of Microbiology 52(3):388-395.
45. Maldonado, M., Orosco, C., Gordillo, M., and Navarro, A. 2010. In vivo and in vitro antagonism of *Streptomyces* sp. RO3 against *Penicillium digitatum* and *Geotrichum candidum*. Afr. J. Microbiol. Res 4(22):2451-2456.
46. Moraes, S. R. G., Escanferla, M. E., and Massola, N. S. 2015. Prepenetration and Penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* into Guava Fruit (*Psidium guajava* L.): Effects of Temperature, Wetness Period and Fruit Age. Journal of Phytopathology 163(3):149-159.
47. Prapagdee, B., Akrapikulchart, U., and Mongkolsuk, S. 2008. Potential of a soil-borne *Streptomyces hygroscopicus* for biocontrol of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in orchid. Journal of Biological Sciences 8(7):1187-1192.
48. Réblová, M., Gams, W., and Seifert, K. 2011. Monilochaetes and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the Microascales. Studies in Mycology 68:163-191.
49. Soares, A. C. F., Sousa, C. d. S., Garrido, M. d. S., Perez, J. O., and Almeida, N. S. d. 2006. Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Brazilian Journal of Microbiology 37(4):456-461.
50. Solanki, M. K., Singh, N., Singh, R. K., Singh, P., Srivastava, A. K., Kumar, S., Kashyap, P. L., and Arora, D. K. 2011. Plant defense activation and management of tomato root rot by a chitin-fortified *Trichoderma/Hypocrea* formulation. Phytoparasitica 39(5):471-481.
51. Song, L., Ding, J. Y., Tang, C., and Yin, C. H. 2007. Compositions and biological activities of essential oils of *Kadsura longepedunculata* and *Schisandra*

- sphenanthera*. The American Journal of Chinese Medicine 35(02):353-364.
52. Souza Júnior, I., Sales, N. L. P., and Martins, E. R. 2009. Fungitoxic effect of concentrations of essential oils on *Colletotrichum gloeosporioides*, isolated from the passion fruit. Biotemas 22(3):77-83.
53. Suwan, N., To-anun, C., Soyong, K., and Nalumpang, S. 2012. Evaluation of *Streptomyces*-biofungicide to control chili anthracnose in pot experiment. Journal of Agricultural Technology 8(5):1663-1676.
54. Wang, C. M., Guan, W., Fang, S., Chen, H., Li, Y. Q., Cai, C., Fan, Y. J., and Shi, Z. Q. 2010. Antifungal activity of the osthol derivative JS-B against *Phytophthora capsici*. Journal of Asian Natural Products Research 12(8):672-679.
55. Weir, B., Johnston, P., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73:115-180.
56. Wilson, L., Madden, L., and Ellis, M. 1990. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. Phytopathology 80(1):111-116.
57. Wu, C. L., Chien, S. C., Wang, S. Y., Kuo, Y. H., and Chang, S. T. 2005. Structure-activity relationships of cadinane-type sesquiterpene derivatives against wood-decay fungi. Holzforschung 59(6):620-627.
58. Yang, X., Ma, X., Yang, L., Yu, D., Qian, Y., and Ni, H. 2009. Efficacy of *Rheum officinale* liquid formulation on cucumber powdery mildew. Crop Protection 28(12):1031-1035.