

國立台灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學研究所

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology


College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

可可椰子果實蒂腐病之研究

The Research on Fruit Basal Rot of Coconut



曾勝志

Sheng-Jr Tzeng

指導教授：孫岩章 博士

Advisor: En-Jang Sun, Ph.D.

中華民國九十七年七月

July, 2008

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

可可椰子果實蒂腐病之研究

The Study on Fruit Basal Rot of Coconut

本論文係曾勝志君（R95633013）在國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十七年七月十七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 (指導教授)

國立臺灣大學植物病理與微生物學系 教授

蘇鴻基 博士

國立臺灣大學植物病理與微生物學系 名譽教授

柯文雄 博士

國立中興大學植物病理學系 講座教授

沈湯龍 博士

國立臺灣大學植物病理與微生物學系 助理教授

系主任、所長 _____ (簽名)

誌謝(Acknowledgement)

這份論文的完成，要感謝實驗室的諸多學長姐：玉婷、宗翰、加興、魁偉、友倫、翁維與同學宇威、筱筑、凱婷和以前實驗室的蛙蛙、晉興、明進、小可、以錚學長等人的鼎力協助，才能讓論文內容達到盡善盡美的地步。除此之外當然還要感謝當時協助最初鑑定的啓予學長(現在要改口叫老師了~)，以及肯讓我開始這項研究，並且了解到研究哲學的林益昇 教授。最後一定要感謝的，就是可以借我如此龐大研究材料以及上好刀具和刀工的媽~~~，還有就是敬愛的指導教授孫老師給我繼續研究這項主題的機會，才能有呈現在各位眼前的這份研究成果！



內容目錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
內容目錄.....	iii
表目錄.....	vi
圖目錄.....	vii
中文摘要.....	ix
英文摘要.....	xi
第一章 前言.....	1
一、可可椰子的介紹.....	1
二、可可椰子果實收穫後的管理問題.....	2
三、研究目的.....	2
第二章 前人研究.....	4
第三章 材料方法.....	6
一、可可椰子採收後病害之調查.....	6
二、可可椰子黑腐病病原菌株之分離及鑑定.....	8
三、可可椰子黑腐病分離株之病原性檢定.....	9
(一) 分離株菌絲之病原性檢定.....	9
(二) 分離株孢子懸浮液之病原性檢定.....	9
(三) 分離株菌絲對可可椰子中果皮切面之接種實驗.....	9
四、可可椰子黑腐病菌株孢子發芽特性之觀察.....	10
(一) 可可椰子黑腐病菌株分生孢子發芽特性之觀察.....	10
(二) 可可椰子黑腐病菌株厚膜孢子發芽特性之觀察.....	10
五、可可椰子黑腐病菌株有性世代之誘發.....	11
六、溫度對可可椰子黑腐病菌株生長速度之影響.....	11

七、溼度對可可椰子接種黑腐病菌後發病嚴重度之影響.....	11
八、可可椰子黑腐病菌株之寄主範圍測定.....	12
(一) 可可椰子黑腐病菌株對甘蔗苗之病原性檢定.....	12
(二) 可可椰子黑腐病菌株對鳳梨果實之病原性檢定.....	12
第四章 結果.....	14
一、可可椰子收穫後病害之調查.....	14
二、可可椰子黑腐病病原菌株之分離及鑑定.....	16
三、可可椰子黑腐病分離株對可可椰子果實之病原性檢定結果.....	20
(一) 以分離株培養菌絲塊對可可椰子全果實進行接種之結果.....	20
(二) 以分離株孢子懸浮液對可可椰子全果實進行接種之結果.....	20
(三) 以分離株培養菌絲塊對可可椰子果實切片進行接種之結果.....	22
四、可可椰子黑腐病病原菌株孢子發芽特性之觀察.....	24
(一) 可可椰子黑腐病病原菌株分生孢子發芽特性之觀察.....	24
(二) 可可椰子黑腐病病原菌株厚膜孢子發芽特性之觀察.....	26
五、可可椰子黑腐病病原菌株有性世代之誘發.....	28
六、溫度對可可椰子黑腐病病原菌株生長速度之影響.....	29
七、溼度對可可椰子黑腐病發生之影響.....	31
八、可可椰子黑腐病病原菌株之寄主範圍測定.....	32
(一) 可可椰子黑腐病病原菌株對甘蔗苗之病原性檢定.....	32
(二) 可可椰子黑腐病病原菌株對鳳梨果實之病原性檢定.....	33
第五章 討論.....	35
一、可可椰子採收後病害之調查.....	35
二、可可椰子黑腐病病原菌株之分離及鑑定.....	35
三、可可椰子黑腐病分離株之病原性檢定.....	36
四、可可椰子黑腐病菌株孢子發芽特性之觀察.....	37

五、可可椰子黑腐病菌株有性世代之誘發.....	39
六、溫度對可可椰子黑腐病菌株生長速度之影響.....	40
七、溼度對可可椰子接種黑腐病菌後發病嚴重度之影響.....	40
八、可可椰子黑腐病菌株之寄主範圍測定.....	41
參考文獻.....	42



表目錄

表一、可可椰子果實黑腐病罹病度(Disease index)之分級對照表。.....	7
表二、於 2005 年不同月份對本地可可椰子果實調查不同儲存日數發生兩型果腐病 害之發病率。.....	15
表三、本研究所分離之黑腐病菌株來源及鑑定結果。.....	18
表四、本研究所分離之黑腐病菌株，並量測其孢子與分生孢子梗大小之結果。.....	19
表五、可可椰子果實接種 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 孢子懸浮液(10^5 /ml)後 10 日之試驗結 果。.....	22
表六、椰子黑腐病菌 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 分生孢子在不同營養與覆蓋條件下，各 不同發芽形態之比較。.....	26
表七、椰子黑腐病菌 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 厚膜孢子在不同營養與覆蓋條件下，各 不同發芽形態之比較。.....	27
表八、自椰子黑腐病菌 <i>Ceratocystis paradoxa</i> 子囊孢子單孢培養所得菌株之遺傳特性 與形態特徵。.....	29
表九、椰子黑腐病菌 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 各分離株在 PDA 培養基不同溫度下之生 長速度。.....	30
表十、可可椰子果實接種黑腐病菌後在三種溼度下發病嚴重度之比較。.....	31
表十一、鳳梨果實接種 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 孢子懸浮液(10^5 /ml)後 7 日之試驗結 果。.....	34
表十二、不同學者對於 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 菌株微觀構造測量值之比較。.....	36
表十三、自可可椰子果實分離之 <i>Ceratocystis sp.</i> 與其他同屬真菌的比較。.....	40

圖目錄

圖一、可可椰子果實解剖構造示意圖。.....	2
圖二、田間發現果蒂處明顯黑化之可可椰子果實(A)，將此果實切開後所見果實內部呈黑化病徵(B)。.....	6
圖三、田間發現可可椰子果實傷口處明顯褐化且出現白色似孢子之物質(A)，將此果實切開後所見果實內部皆已黑化(B)。.....	7
圖四、自淺型黑化椰子果實分離所得 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> 之形態。.....	17
圖五、自罹患黑腐病椰子果實分離所得 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 之形態。.....	17
圖六、以分離所得 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> 分離株與 TP-03 菌株接種於可可椰子果實 11 日後所表現之果實內部病徵。.....	20
圖七、分離自可可椰子果實之 TP-27 菌株(A)與分離自鳳梨果實之 TP-28 菌株(B)，接種於可可椰子果實 10 日後所表現之果頂病徵。.....	21
圖八、分離自可可椰子果實之 TP-27 菌株(A)與分離自鳳梨果實之 TP-28 菌株(B)，接種於可可椰子果實 10 日後所表現之果實內部病徵。.....	21
圖九、椰子果實中果皮切面打洞接種 TP-03 菌株 2 天後(A)與 3 天後(B)之發病情形。.....	23
圖十、椰子果實中果皮切面不打洞接種 TP-03 菌株 3 天後，進行縱剖後，可見內部果肉明顯褐化與黑化。.....	23
圖十一、 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 分生孢子於 WA 平板培養基表面、未施加蓋玻片條件下所產生自分生孢子處產生單一氣生分生孢子梗，而後自原孢子處產生單一營養菌絲的特殊發芽形態。.....	25
圖十二、由椰子黑腐病菌 TP-05W 與 TP-06 二菌株對峙培養所得之有性世代構造。.....	28
圖十三、椰子黑腐病菌 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> 11 個分離株在 PDA 培養基不同溫度下之生長速度比較圖。.....	30

圖十四、可可椰子健康果實接種黑腐病菌 TP-06 菌株並置於室內溼度環境(A)及防潮箱環境下(B)10 日後之病兆比較。.....	31
圖十五、可可椰子黑腐病菌接種健康甘蔗節苗一個月後之結果，左側為健康對照組，右側為接種 TP-19 菌株者。.....	32
圖十六、可可椰子黑腐病菌接種甘蔗健康節苗一個月後剖開各節苗是否發病之結果，A 圖為健康對照組，B 圖為接種 TP-19 菌株者，兩者皆僅兩端黑化。.....	33
圖十七、分離自可可椰子果實之 TP-27 菌株(A)與分離自鳳梨果實之 TP-28 菌株(B)，接種於鳳梨果實七日後所表現之果頂病徵。.....	34
圖十八、在 WA 平板培養基下培養之白化 TP-05W 菌株，於培養基表面產生之厚膜孢子發芽時會先產生單一氣生分生孢子梗並產孢。.....	39



中文摘要

可可椰子(*Cocos nucifera* L.)為熱帶地區重要經濟作物，然而採收後鮮果實的儲藏問題，一直以來皆困擾著相關行業從事者。作者於 2005 年間，發現採自屏東縣九如、長治、內埔等地之椰子果實，在採收數日後，開始自果頂或果實傷口出現果肉黑化、軟化之病徵，以及帶有特殊香味之病兆。自罹病果實內部可分離出一種於 PDA 平板培養基上菌落初期白色、一至二天後變黑，且散發強烈水果香氣之有隔真菌。該菌可產生兩種無性孢子，一種為自長形壺狀產孢梗開口冒出成長串之分生孢子，分生孢子短筒至長筒形、無色，成熟後為卵形，且略為厚壁，顏色轉為黑色，大小為 $8.5-16.0 \times 4.7-6.7 \mu\text{m}$ ，其產孢梗大小為 $80.0-155.0 \times 5.0-7.8 \mu\text{m}$ ；另一種為菌絲末端特化形成之卵形、黑色，排列成短鏈狀之厚膜孢子，大小為 $13.4-25.0 \times 8.9-12.5 \mu\text{m}$ 。以分離所得菌株配對進行對峙培養，在兩個月後發現其中一組菌株配對產生淡咖啡色、球狀子囊殼，大小約 $280 \mu\text{m}$ ，有長約 $1100 \mu\text{m}$ 之黑色長喙；此子囊殼產生之子囊孢子為梭形，部分彎向一側，大小約 $12 \times 3 \mu\text{m}$ 。依上述之形態特性，將此菌鑑定為 *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau (無性世代：*Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Höhn)。將此分離菌株接種於椰子果實上，可產生與最初發現相同之病徵，並且可再分離得到相同之菌株。此病原菌菌絲最適生長溫度為 $25-30^\circ\text{C}$ ，此時生長速度可達 3.3cm/day ，低於 10°C 或高於 35°C 時則幾乎不生長。在已知文獻中，此病原菌可在椰子樹上造成樹幹流膠病(stem bleeding)與心芽腐敗病(bud rot)，另在 1955 年巴西曾有果實蒂腐病(fruit basal rot)之報導，且病源同為 *C. paradoxa*，但建議本病害亦可稱為黑腐病(black rot)。在病害調查上，發現此病害週年均可發生，但採收後開始發病之日數，則依時序而異，尤其在 6~10 月間，採收後 10 天內之發病率可上升至 2%。而在寄主範圍上，本菌株可在鳳梨果實上造成鳳梨黑腐病(病原菌亦為 *C. paradoxa*) 之病徵，故此二病害之病原應屬相同。

關鍵字:可可椰子;黑腐病;收穫後病害; *Ceratocystis paradoxa*; *Thielaviopsis paradoxa*



Summary

Coconut (*Cocos nucifera* L.) is an important economic crop in tropical areas. Just like other fruits, the post-harvest diseases are big problems for farmers. Since 2005, coconut fruits harvested from Jiouru, Changjr, Neipu in Pintung county have showed a fruit rot disease. Principal symptoms are blackening of exocarp, mesocarp and then endocarp of coconut fruit. The affected fruit usually emitted fruit-type fragrant. A fungus was consistently isolated from the diseased fruits. Its colony on PDA plate was white in early stage but became black one or two days later. It emitted a strong fruity fragrance. This fungus produced two asexual spores. The first was phialospore-type conidia released in long chains from tip of long phialides. They were hyaline to mid-brown, cylindrical to somewhat oval and thick-walled when mature, $8.5-16.0 \times 4.7-6.7 \mu\text{m}$. The phialide had the size of $80.0-155.0 \times 5.0-7.8 \mu\text{m}$. The second was chlamyospore formed in short chains from specialized hyphal tip, oval, black, $13.4-25.0 \times 8.9-12.5 \mu\text{m}$. Dual cultures of all paired isolates on PDA with one piece of coconut exocarp induced the production of perithecia. Perithecia were brown, globose, $280 \mu\text{m}$ in diameter, with a $1100 \mu\text{m}$ long neck. Ascospores were ellipsoid, but some were unequally bent, $12 \times 3 \mu\text{m}$. According these characteristics, this fungus was identified as *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau (Anamorph : *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Höhn). Inoculation of all wild-type isolates on healthy coconut fruits reproduced the same black rot disease. The same pathogen was reisolated from the inoculated fruits. The temperature for hyphae growth of this fungus was $25-30^{\circ}\text{C}$, with the growth rate of 3.3cm/day . It cannot grow at temperatures lower than 10°C or higher than 35°C . This pathogen was reported to cause stem bleeding disease in 2004 and bud rot disease of coconut in 1993, but a disease called fruit basal rot of coconut have been reported in 1955 in Brazil. With the same pathogen, we suggest this newly found disease can be also named as black rot. This disease

accused on coconut fruits around all seasons, but is more serious in warm seasons, especially in the period from June to October. Disease incidence could reach 2% after 10 days of fruit storage. This black rot pathogen caused black rot disease of pineapple, while the pathogen from black rot of pineapple also caused black rot of coconut fruit, indicating that both diseases have the identical pathogen.

Keywords : coconut, black rot disease, post-harvest disease, *Ceratocystis paradoxa*, *Thielaviopsis paradoxa*.

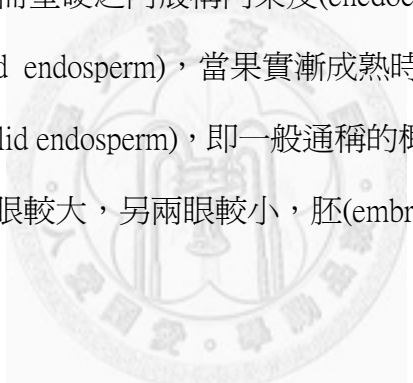


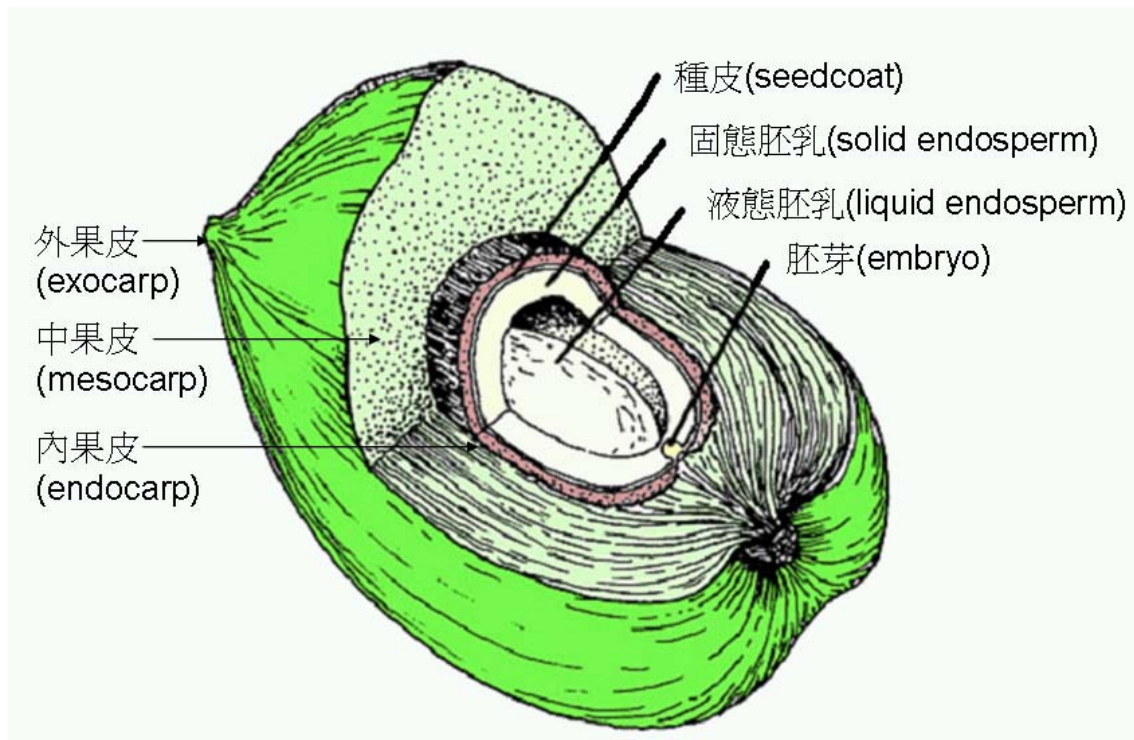
第一章 前言

一、可可椰子的介紹

可可椰子(*Cocos nucifera* L.)屬於棕櫚科，為多年生常綠果樹，主要分佈於熱帶亞洲、大洋洲、拉丁美洲及非洲等熱帶多雨地區。喜好生長於年均溫 26.8°C、年雨量 1500mm 以上、年日照 2000 小時以上且低風害的地區。

可可椰子果實成三稜狀橢圓形，每果重約 1~3 公斤，開花後 10~12 個月後方成熟，但以飲用椰子水為目的者開花後 4~6 個月即可採收。可可椰子果實之解剖構造如圖一所示，其堅韌表皮層通稱外果皮(exocarp)，其內部呈纖維質者稱中果皮(mesocarp)，中心呈黑褐色而堅硬之內殼稱內果皮(encdocarp)，其內飽含液態胚乳，即一般通稱的椰子水(liquid endosperm)，當果實漸成熟時，椰水開始漸漸轉化為富含脂肪的白色固態胚乳(solid endosperm)，即一般通稱的椰果。內殼外表具三稜，頂部各區各有一眼，其中一眼較大，另兩眼較小，胚(embryo)即位於較大眼下方的胚乳中(劉, 1995)。





圖一、可可椰子果實解剖構造示意圖。(引用自
<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/webb/BOT410/Angiosperm/FruitCoconut.htm>)

二、可可椰子果實收穫後的管理問題

果實收穫後之病害(post-harvest diseases)一直以來都是水果產業相當重要的問題，若對於此類病害沒有進行妥善防治管理，常可造成相當大的損失(Janisiewicz and Korsten, 2002)。已知可造成果實收穫後病害的病原菌相當多樣化，但絕大多數皆為真菌造成，例如柑橘類之 *Penicillium* sp.、*Phomopsis citri*，鳳梨之 *Ceratocystis paradoxa*、*Penicillium* sp.，香蕉之 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Lasiodiplodia theobromae*、*Ceratocystis paradoxa*、*Fusarium* sp.(柯, 2008)。

三、研究目的

由於過去有關可可椰子果實病害研究不多，而作者近年來一直注意可可椰子收穫後之病害，希望減少可可椰子因此遭受之損失，故對台灣過去未有人研究過

之疑似黑腐病加以研究，並尋求防治之可能性。



第二章 前人研究

Ceratocystis paradoxa 之無性世代 *Thielaviopsis paradoxa* 在 1886 年由 de Seynes 發現、1894 年 Saccardo 將此種移至 *Chalara* 屬、1904 年時 Höhn 移至現今所用的 *Thielaviopsis* 屬(Dade, 1928)，現為該屬之模式種(type)(Paulin-Mahady *et al.*, 2002)。*Thielaviopsis* 屬之形態特色如下：帶有(或無)自特化菌絲產生深色、厚壁，單生或呈串生之厚垣孢子(aleurioconidia)；另有形態類似 *Chalara* 屬真菌之瓶梗狀產孢梗(phialides)所產生排列為長鏈狀、筒形、顏色保持無色或轉為深色並厚壁化之分生孢子，目前已知此屬無性真菌之有性世代皆置放於 *Ceratocystis* 屬(Paulin-Mahady *et al.*, 2002)。

Thielaviopsis paradoxa 之有性世代構造由 Dade 在 1928 年於象牙海岸(迦納)所採集的可可外殼上發現，當時命名為 *Cerastomella paradoxa*，1934 年此種被 Nannfeldt 移至 *Ophiostoma* 屬，最後於 1952 年由 Moreau 移至現今所用的 *Ceratocystis* 屬(Morgan, 1967)。*Ceratocystis paradoxa* 目前分類地位如下(Alexopoulos *et al.*, 1979)：

Domain Eukaryota

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Ascomycetes

Subclass Sordariomycetidae

Order Microascales

Family Ceratocystidaceae

Genus *Ceratocystis*

Species *Ceratocystis paradoxa*

Ceratocystis paradoxa 為土棲性真菌，主要藉由土壤、流水或未消毒之器械所傳播，通常寄主必須有傷口存在才能進行感染(Morgan, 1967; Aberdeen and

Patil-Kulkarni, 1969; Steer and Coates-Beckford, 1990; Simone, 2004)·此真菌可感染營養繁殖體而造成甘蔗鳳梨病與鳳梨苗腐病等苗期病害，另可感染鳳梨與香蕉造成後熟期果實損失(徐世典 等, 2002; Rohrbach and Phillips, 1990)，其中在感染甘蔗苗與鳳梨果實的病害中有病組織產生特殊香氣的報導與描述。在國外報導中，此病原菌可造成可可椰子樹幹流膠病(stem bleeding)(Simone, 2004)，或是椰棗(date palm)心腐病(heart rot)等多種嚴重病害(Streets, 1933)。而在由此真菌造成可可椰子病害之記錄上，除上述樹幹流膠病外，尚有芽腐病(bud rot)之報導，惟發生區域僅限於部分熱帶國家(Steer and Coates-Beckford, 1990)；但在果實病害之報導則相當稀少，目前僅知在巴西聖保羅附近地區有零星果實蒂腐病(fruit basal rot)(Rossetti, 1955; Carmago and Gimenes-Fernandes, 1997)、以及在牙買加由芽腐病(bud rot)間接造成果實發病之報導(Steer and Coates-Beckford, 1990)。

目前已知可造成可可椰子病害之真菌病原種類相當多樣，而就目前台灣有記錄者為 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Ellisiodothis cocoicola*、*Pestalotiopsis palmarum*、*Phoma (Plenodomus) cocogena* 等四種真菌(徐世典 等, 2002)，但除了 *C. gloeosporioides* 可在果實上發生外，其餘皆為葉部病害。

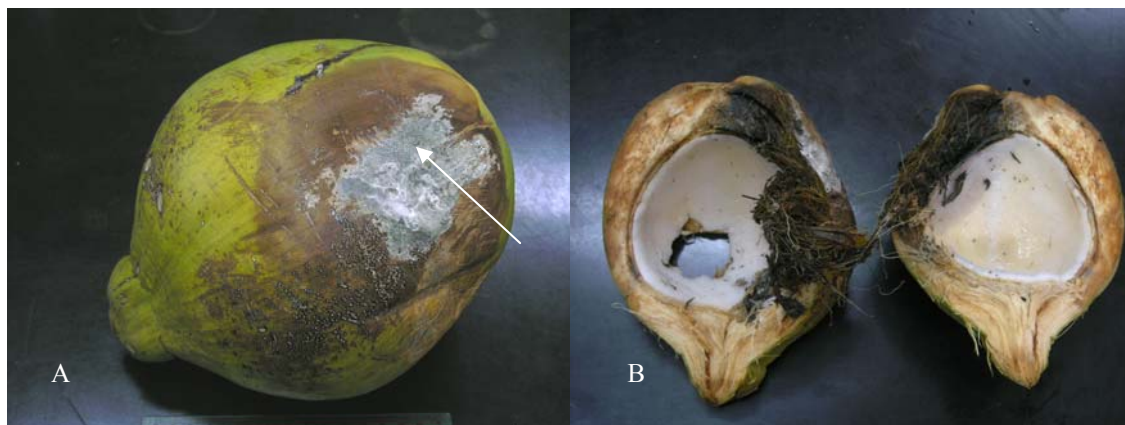
第三章 材料方法

一、可可椰子採收後病害之調查

本研究首先於 2005 年 2 月至 2006 年 6 月間，發現產自屏東縣九如鄉、內埔鎮、長治鄉等地的椰子果實，在採收數日後，常發生果蒂或果實傷口處褐化或黑化之病變(圖二 A)，部分且伴隨有果肉黑化、腐爛、並帶有特殊水果香味之現象(圖二 B)，經取黑化果肉鏡檢，發現果肉組織中有大量深褐色卵形厚膜孢子；溼度高時可發現黑化處表面有白色粉狀似孢子之物質(圖三)，取此部分鏡檢，則可見大量短筒形，少數呈長筒形之透明分生孢子及長條形之壺狀孢子梗。因其病徵主要為黑腐，故初步命名為可可椰子黑腐病。



圖二、田間發現果蒂處明顯黑化之可可椰子果實(A)，將此果實切開後所見果實內部呈黑化病徵(如箭頭所示)(B)。



圖三、田間發現可可椰子果實傷口處(如箭頭所示)明顯褐化且出現白色似孢子之物質(A)，將此果實切開後所見果實內部皆已黑化(B)。

另於 2005 年 5 月至 2006 年 6 月間，作者即在台中市某椰子大宗販賣業者處，每日觀察並記錄上述病害之發生情形，主要係針對所有剖取椰子水後之可可椰子果實殘體，檢視其病徵，並記錄所屬批號之產地、採收日期、發病百分率等。

依據上述病變及病徵，乃將此一病害發病嚴重度分成 4 級，以利疾病嚴重度之量測與量化，茲分述如表一：

表一、可可椰子果實黑腐病罹病度(Disease index)之分級對照表。

級別	病徵描述*
0	無任何病徵，或果實外果皮黑化，但中果皮不黑化。
I	外果皮及中果皮皆發生黑化，但深度未達中果皮之 1/2。
II	外果皮及中果皮皆發生黑化，但深度達中果皮之 1/2 以上，未及內果皮。
III	外果皮及中果皮皆發生黑化，且深及內果皮處，但未超過內果皮。
IV	外果皮及中果皮皆發生黑化，且深度超過內果皮。

*除罹病度 0 以外，其他各級罹病度之判定，皆須將果實縱切觀察之。

依據表.之罹病度分級表，對於採收後之可可椰子果實，乃可依照以下公式，測定全批果實之疾病嚴重度(Disease severity index, DSI)：

$$\text{疾病嚴重度} = (\Sigma(\text{各果實罹病級數}) / 4 \times \text{統計果實總數}) \times 100\%$$

爲比較各批椰子果實發病率之差異，乃將各日觀測所得，依照其進貨批次進行分析統計並記錄其採收後儲存之日數，所得數值再經由 LSD 檢測(STATISTIX ver2.0 for Windows)以探討不同批次、月份及採收後日數，是否有發病程度之差異。

二、可可椰子黑腐病病原菌株之分離及鑑定

病原之分離係將前述帶有病徵的椰子，沿病徵處切開，以滅菌刀具挑取病健交界部位切取小塊，並立即以 1.5%次氯酸鈉水溶液(Sodium hypochloride)消毒約 10~30 秒後，置於 2% PDA 或 2% WA 平板培養基上進行常溫培養。又若發現病果表面有明顯之產孢，則直接挑取孢粉進行單孢分離，亦於 2% PDA 或 2% WA 平板培養基上進行常溫培養。待 3~4 日後有菌絲長出時，則切取菌絲尖端進行單絲分離；若分離所得菌株有產孢現象，則進行單孢分離予以純化。經此過程純化、確認無其他微生物污染之菌株，即將其培養於 2% PDA 或 2% WA 平板培養基上，用以進行後續之鑑定或病源性檢定等相關試驗。

依上述方法分離所得的分離株，皆依照其在 2% PDA 平板培養基上之培養形態、鏡檢下所見之分生孢子、厚膜孢子、分生孢子梗等形態進行鑑定，其鑑定依據主要爲各菌株之形態、構造及大小，並依據相關鑑定圖說書籍鑑定至屬及種 (Barnett and Hunter, 1972; Upadhyay, 1981)。

在菌株保存方面，作者發現以 PDA 平板或斜面保存上述之分離菌株，極易受到蟻類之入侵與污染，故在短期保存上，均以培養於 1.5%或 2% WA 平板培養基之方式進行保存，此法可維持菌株活性約 1~2 個月，且不易遭受蟻類之污染。而在長期保存上，則使用螺旋試管，各裝填 2% WA 10ml 及 1g 砂土，經混合、高壓滅菌後，接種菌株進行保存，此法可維持菌株活性達 1 年以上。

三、可可椰子黑腐病分離株之病原性檢定

(一) 分離株菌絲之病原性檢定

菌絲之病原性檢定係取外觀無明顯黑化病徵或傷口之可可椰子果實，以刀具剝除果柄後，再將上述分離所得菌株在 PDA 平板培養基長成之瓊脂菌絲塊約 1cm 見方，貼於剝除果柄後露出之傷口處，對照組則以空白 PDA 瓊脂塊替代之，每一菌株各接種三顆果實。接種後即將果實置於室溫下，觀察並記錄病勢之發展，接種 11 日後即以刀具將果實縱剖，觀察並記錄果實內部之病勢發展，並以前述分離方法對果肉病健部進行再分離之程序。

(二) 分離株孢子懸浮液之病原性檢定

可可椰子果實之取得，以及接種前消毒方式同上。分離株孢子懸浮液之係取約 5ml 之無菌水，倒入分離菌株在 PDA 已培養 3 日以上之培養皿中，並以 L 型玻棒輕輕刮取培養基表面後，吸出含有大量分生孢子與厚膜孢子之懸浮液，使用血球計數器定量懸浮液中總孢子濃度，並將濃度調整為 1×10^5 孢子/ml。接種方式為使用定量吸管吸取 0.1ml 之孢子懸浮液，滴加於可可椰子果實剝除果蒂後露出之傷口處，對照組則使用無菌水替代，每一菌株各接種三顆果實。接種完成後，將果實完全置於室溫保濕或無保濕之環境下觀察病徵之發展，接種 10 日後再以刀具將果實縱剖，觀察並記錄果實內部之病勢，並以前述分離方法對果肉病健部進行再分離之程序。

(三) 分離株菌絲塊對可可椰子中果皮切面之接種實驗

由於使用可可椰子果實進行接種之病原性檢定十分費力且成本高。故乃研究利用可可椰子中果皮切面，評估其取代前述正規接種方法之可能性。首先自可可椰子販售處，收集剖取椰子水後剩餘之果實殘體，並以橫切方式將整個果頂切下，取其乾淨之中果皮切面進行接種實驗。待試分離菌株培養方式同上，接種方式有

二，其一為使用打孔器在中果皮切面打直徑約 0.5cm，深約 1cm 之圓洞，再自培養基中以打孔器挖取相同直徑之菌絲塊，塞入打出之孔洞中，再將打孔器挖出之中果皮塞回原處完成接種。另一為取一大小約 0.5 公分之菌絲塊，直接置於乾淨新切開之中果皮切面上，即完成接種。接種完成後，即將果實切面置於保濕環境下，並每日觀察病勢之發展，接種 3 日後即將此果實切面沿果頂再縱切，以確認切面內部是否受到感染。

四、可可椰子黑腐病菌株孢子發芽特性之觀察

(一) 可可椰子黑腐病菌株分生孢子發芽特性之觀察

在本研究分離菌株之過程中，發現菌株孢子在發芽時會有特殊之構造產生，且似乎受到養分及微氣候所左右，故進行以下孢子發芽特性之觀察試驗。本試驗共選取 3 株菌株進行之，包括 TP-05W、TP-06 及 TP-27，其中 TP-27 為正常野生型菌株，而 TP-06 為不產生厚膜孢子變異株、TP-05W 為白化變異株。試驗所使用之分生孢子皆取自培養 24 小時之 PDA 平板培養基，並以滅菌移殖環從菌落中取得。孢子塗抹於 PDA 平板培養基、WA 平板培養基或空白玻片上的水滴，均勻塗抹後，即以滅菌蓋玻片蓋住部分塗抹處，以模擬受水膜覆蓋而缺氧之環境，將其放置於室溫下數天，觀察其發芽之形態，並計數孢子發芽率與不同發芽形態所佔之比率，唯空白玻片加水滴部分需置於加濕培養皿中保濕。

(二) 可可椰子黑腐病菌株厚膜孢子發芽特性之觀察

本試驗所用菌株與處理方式同上述分生孢子發芽特性觀察試驗者，已知該菌分生孢子多屬氣生，而厚膜孢子則非全為氣生，厚膜孢子之取得方式係參考 Ko *et al.*(2001)，將培養約一週之 PDA 平板培養基菌落翻倒於白紙上，再以刀具自底部割取帶有厚膜孢子之瓊脂塊後將其絞碎以釋出厚膜孢子。將釋出後的厚膜孢子以移殖環塗抹於 PDA 平板培養基、WA 平板培養基或空白玻片上的水滴，均勻塗抹後，

即以滅菌蓋玻片蓋住部分塗抹處，以模擬受水膜覆蓋而缺氧之環境，將其放置於室溫下數天，觀察其發芽之形態，並計數孢子發芽率與不同發芽形態所佔之比率，唯空白玻片加水滴部分需置於加濕培養皿中保濕。

五、可可椰子黑腐病病原菌株有性世代之誘發

Thielaviopsis paradoxa 之有性世代 *Ceratocystis paradoxa* 為異宗親和性 (heterothallic) 真菌，意即其有性世代之誘發，必須由不同交配型 (mating type) 菌株，以對峙培養的方式始能誘發 (Dade, 1928)。有關本病菌有性世代的誘發係以前述分離所得之 *T. paradoxa* 菌株約 20 株，因尚未了解其配對標準，故先以其中培養形態差異較大之二菌株 TP-05W、TP-03 作為配對代表，並選用加有滅菌椰子果皮之 PDA 平板培養基，進行兩兩配對之對峙培養，在室溫放置一至兩個月後即以解剖顯微鏡鏡檢，觀察是否有長喙子囊殼之產生。若發現有長喙子囊殼及子囊孢子之存在，即將其產生之子囊孢子進行單孢分離，並將子囊孢子單孢養成之菌株予以編號，以進行其他之試驗。

六、溫度對可可椰子黑腐病菌株生長速度之影響

本項生長速度之實驗係將經病原性檢定測知具有病原性之菌株，先培養於 PDA 平板培養基上 1 天，再取菌絲塊移植到 9cm PDA 平板培養基上進行試驗，測試溫度為 10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C 6 級，並每日量測菌絲生長之半徑。供測之菌株有 11 株，每株每一溫度至少 2 重複。由於菌株在部分溫度下生長過快，故部份觀察之間隔縮短為每 6 小時一次，但最後結果皆以每日公分數表示之。

七、溼度對可可椰子接種黑腐病菌後發病嚴重度之影響

本試驗中果實之接種與前述以孢子懸浮液對可可椰子全果實進行接種之方法

相同，測試菌株選定 TP-06，溼度測定係使用乾濕球溫度計。在以孢子對果蒂接種後，即將果實分別置於 3 種溼度中，包括相對溼度達 100%之濕室、相對溼度 70~75 %之實驗室及相對溼度約 30~35%之防潮箱中，觀察並記錄病勢之發展，每一處理為 3 顆果實，接種 10 日後並以刀具將果實縱剖，觀察並記錄果實內部之病勢發展情形，藉以比較不同溼度對發病嚴重度之影響。

八、可可椰子黑腐病菌株寄主範圍之測定

(一) 可可椰子黑腐病菌株對甘蔗苗之病原性檢定

甘蔗苗係自南投埔里地區某一蔗農處取得，為甘蔗莖頂部約 20 公分之節段苗。待試菌株預先培養於 PDA 平面培養基上一週，使其大量產生厚膜孢子。甘蔗栽培介質為根基旺與荷蘭 BVB 介質依 1:1 比例混合而成，經稀釋平板法測定此一介質中並不含有任何 *Thielaviopsis* 屬真菌。接種方式為將待試菌株培養於 PDA 平板培養基，一周後將之切成大小約 0.5 cm × 0.5 cm 之菌絲塊，每皿之菌絲塊與 2 公升之栽培介質均勻混合後倒入長條砵，再將蔗苗以橫躺之方式，半埋於栽培介質中，每一菌株皆接種三支蔗苗，並取不含菌體之 PDA 平板培養基作對照組處理。接種完成後將盆土澆濕，置於室外陽光充足處，並定期澆水以維持土壤溼度。接種一個月後即觀察蔗苗發芽率與生長情形，並將蔗苗縱剖以觀察切面是否有感染之發生。

(二) 可可椰子黑腐病病原菌株對鳳梨果實之病原性檢定

鳳梨果實係自台南關廟地區鳳梨果農處購得，品種為台農 17 號(品種名為“金鑽鳳梨”)，於接種前先將果實表面以 75%酒精噴施以進行表面消毒，果柄處則以 95%酒精浸泡數秒鐘消毒之。待試菌株孢子懸浮液之製作為取約 5ml 之無菌水，倒入已培養菌株約 3 日之 PDA 平板培養基中，並以 L 型玻棒輕輕刮取培養基表面，吸出含有大量分生孢子及厚膜孢子之懸浮液，再以血球計數器定量總孢子濃度，

並將濃度調整為 1×10^5 孢子/ml。接種時取消毒完成之果柄，以滅菌之刀具橫切出無病傷口，再將定量後之孢子懸浮液，滴加 0.1ml 於果柄橫切面上，對照組則使用無菌水替代之，每一菌株皆接種三顆果實。接種完成後，將果實完全置於室溫保濕或無保濕之環境下，7 日後即以刀具將果實縱剖，觀察並記錄果實內部之發病情形，再以前述分離方法對果肉病健部進行再分離之程序。



第四章 結果

一、可可椰子採收後病害之調查

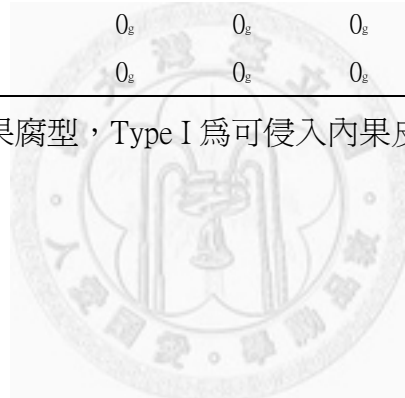
作者自 2005 年 5 月至 2005 年 11 月間，共調查產自屏東縣九如鄉、長治鄉與內埔鎮等地總數約 50 批，總量約為 42000 個可可椰子果實，發現於採收後數日，發生有兩種不同病徵形態之果腐病害：其一(暫稱為” Type O”)為自果頂發生明顯褐化或黑化，末期在病徵處出現大量白色條狀物，溼度高時此條狀物轉為黑色，將此病果剖開後可見中果皮有些微褐化現象，但多侷限於外果皮或中果皮，未達內果皮；另一形態病徵(暫稱為” Type I”)為果頂或果實傷口處發生褐化或黑化，但外果皮黑化程度較前述另一病徵型輕微，於溼度高時會出現大量白色粉狀似孢子之物質，其病果果蒂較易脫落，果實剖開後通常可發現果實內部中果皮發生大面積褐化與黑化，甚至超過內果皮，到達液態胚乳(即椰子水)所在處，造成椰子水腐壞而失去經濟價值。另外，作者於 2005 年 9 月間，曾調查過數批來自泰國進口之可可椰子果實，亦記錄到上述兩型果腐病徵之發生。另在來自於屏東各地之可可椰子果實，亦曾發現過有果實表面有炭疽病之發生。

上述田間或市場調查之結果乃記錄如表二，由採收後不同日數之發病調查可知，上述兩型病徵發病率大致隨著採收日數而增加，但採收後開始發病日數則在不同月份間有明顯差異，在春秋較長而夏日較短，如自 2005 年 5 月至 11 月之始病日數分別為採收後 6、3、1、1、2、4、8 日開始發病。

表二、於 2005 年不同月份對本地可可椰子果實調查不同儲存日數發生兩型果腐病害之發病率。

2005 年 /		發病率(%)													
月份	病徵型*	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7	Day8	Day9	Day10	Day11	Day12	Day13	Day14
五月	Type O		0 _d	0 _d	0 _d	0 _d	0 _d	0.18 _{cd}	5.48 _b	0.48 _c	8.69 _a				
	Type I		0 _d	0 _d	0 _d	0 _d	0.09 _{cd}	0.35 _{cd}	0.26 _{cd}	0.48 _c	0 _d				
六月	Type O			0 _b	0.13 _{ab}	0.2 _{ab}	0 _b	0.43 _a	0 _b						
	Type I			0.29 _{ab}	0.19 _{ab}	0.15 _{ab}	0 _b	0.22 _{ab}	0.53 _a						
七月	Type O	0.16 _{def}	0.15 _{def}	0.22 _{cdef}		0 _f	0.75 _{bc}	0.27 _{cdef}	0.52 _{bcd}	0 _f	1.17 _b				
	Type I	0 _f	0.05 _{ef}	0.03 _{ef}		0.17 _{cdef}	0.43 _{bcd}	0.27 _{cdef}	3.13 _a	0.58 _{bcd}	2.33 _a				
八月	Type O			1.24 _{bcd}	0.62 _{defg}	0.55 _{defg}	1.58 _{bc}	0.57 _{defg}	1.15 _{bcd}	5.1 _a	1.63 _{bc}	2.31 _b			0 _g
	Type I			0.47 _{efg}	0.53 _{defg}	0.44 _{fg}	0.25 _{fg}	0.63 _{defg}	0.84 _{cdef}	0.45 _{efg}	0 _g	1.32 _{bcd}			0 _g
九月	Type O		0.51 _{efgh}	0.29 _{fighi}	0 _i	0.45 _{efgh}	1.69 _{bcd}	0.24 _{ghi}	0.93 _{def}	1.04 _{cde}	13.31 _a	0 _i	0 _i	0 _i	
	Type I		0.42 _{efgh}	0.49 _{efgh}	0.62 _{efg}	2.05 _{bc}	0.34 _{efghi}	0.12 _{hi}	0.16 _{ghi}	0.17 _{ghi}	0 _i	0 _i	0 _i	2.91 _b	
十月	Type O		0 _f	0 _f	3.44 _{cd}	3.41 _{cd}	7.2 _b	4.11 _c	3.82 _c	4.55 _c	7.14 _b	10.76 _a			
	Type I		0 _f	0 _f	0.16 _f	1.08 _e	2.28 _d	0.17 _f	0.1 _f	0.19 _f	0 _f	0 _f			
十一月	Type O			0 _g	0 _g	0 _g	0 _g	0 _g	0 _g	2.12 _{de}	1.05 _{ef}	4.69 _b	2.71 _d	32.62 _a	4.69 _b
	Type I			0 _g	0 _g	0 _g	0 _g	0 _g	0 _g	0.35 _{fg}	3.14 _{bcd}	1.44 _c	4.4 _{bc}	2.84 _{cd}	0 _g

*Type O 為侷限外果皮之果腐型，Type I 為可侵入內果皮之果腐型。

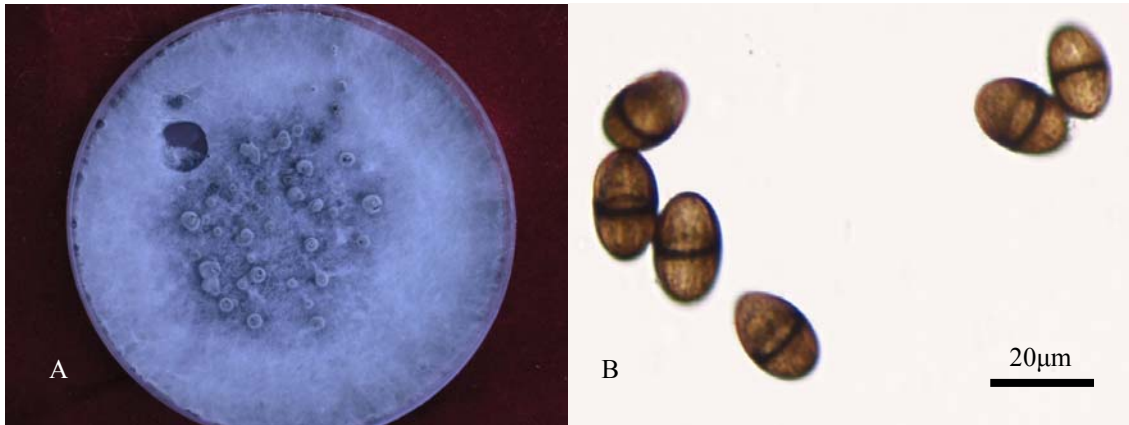


二、可可椰子黑腐病病原菌株之分離及鑑定

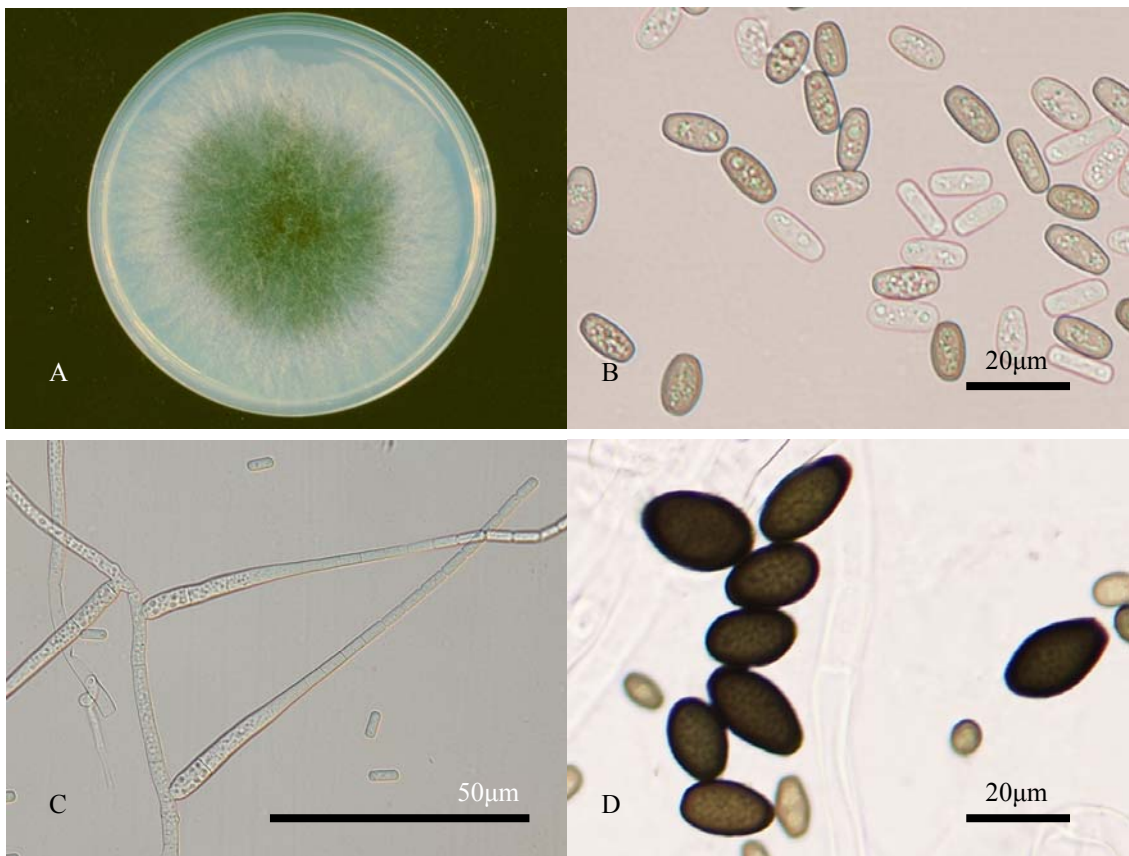
自果表帶有明顯黑化病徵之椰子果實上，主要可分離得 2 種真菌，其一經鑑定應為 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maudl (舊名 *Botryodiplodia theobromae* Pat.)，在 PDA 培養形態初期為白色密集菌落，待菌絲佈滿全皿後開始變黑(圖四 A)，並於培養約一週後開始產生柄子殼，其分生孢子形態為卵形，初生時單胞透明，成熟時漸變黑並且產生橫隔成為雙胞，此時期孢子表面有縱向條紋為該菌之鑑別依據(圖四 B)，大小為 $17.3-20.1-22.7 \mu\text{m} \times 9.8-11.7-12.9 \mu\text{m}$ ，此菌在淺型黑化之病果上較易分離獲得。另一經鑑定為 *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Höhn，其在 WA 平板培養基上之培養形態為稀疏放射、略呈旋渦形之菌落，在 PDA 平板培養基之培養形態初期為白色稀疏菌絲，但很快自中央處開始黑化(圖五 A)，其 PDA 培養體初期會散發濃烈之水果香味，但在菌落完全變黑後停止散發。該菌孢子有二型，即分生孢子與厚膜孢子。分生孢子(conidia)係自一長條狀、內有特化產孢細胞(conidiogenous cell)之壺狀產孢梗(phialides)中產生(圖五 C)，並排列成長鏈狀，其形態初生者為長筒形、透明，成熟後略呈橢圓形、變深色且厚壁化(圖五 B)，大小為 $8.5-10.8-16.0 \mu\text{m} \times 4.7-5.5-6.7 \mu\text{m}$ ；厚膜孢子(chlamydospore)則自特化之菌絲末端產生，排列成短鏈狀，其形態為卵形至橢圓形、黑色並具有厚壁(圖五 D)，大小為 $13.4-18.8-25.0 \mu\text{m} \times 8.9-10.6-12.5 \mu\text{m}$ ，此真菌主要在椰子果實內部發生黑化，並伴隨軟腐之病果(即黑腐病病徵)上分離獲得。

在本研究中，共自罹病可可椰子果實上分離到三十餘株 *T. paradoxa* 菌株，皆以 TP+數字編號(表三)，其中 TP-13 採自泰國進口之可可椰子果實，但 30 多菌株之培養形態大致上如同上述，詳細微觀構造則列於表四，另有一株不產生厚膜孢子菌株 TP-06，以及一株自 TP-05 突變而來之白化菌株 TP-05W。

另為比較來自不同寄主之 *T. paradoxa* 菌株之差異，乃自罹患黑腐病之鳳梨果實上進行分離，共分得四株 *T. paradoxa* 菌株，包括 TP-28、TP-29、TP-30 及 TP-31，以供後續其他試驗之使用。



圖四、自淺型黑化椰子果實分離所得 *Lasiodiplodia theobromae* 之形態，PDA 平板培養基培養 7 日之培養形態如圖 A(成團菌絲為柄子殼)，其分生孢子如圖 B，成熟者呈深色且有縱向條紋。



圖五、自罹患黑腐病椰子果實分離所得 *Thielaviopsis paradoxa* 之形態，在 PDA 平板培養基培養 3 日之菌落如圖 A，而分生孢子如圖 B，長條狀分生孢子梗如圖 C，厚膜孢子如圖 D。

表三、本研究所分離之黑腐病菌株來源及鑑定結果。

菌株編號	鑑定種	分離地點/來源	菌落顏色
TP-03	<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白轉黑
TP-05	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白轉黑
TP-05W	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白
TP-06	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	灰
TP-13	<i>T. paradoxa</i>	泰國進口/椰子果實	白轉黑
TP-19	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白轉黑
TP-23	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白轉黑
TP-25	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白轉黑
TP-27	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白轉黑
TP-28	<i>T. paradoxa</i>	台南關廟/鳳梨果實	白轉黑
TP-32	<i>T. paradoxa</i>	屏東長治/椰子果實	白轉黑



表四、本研究所分離之黑腐病菌株，並量測其孢子與分生孢子梗大小之結果^a。

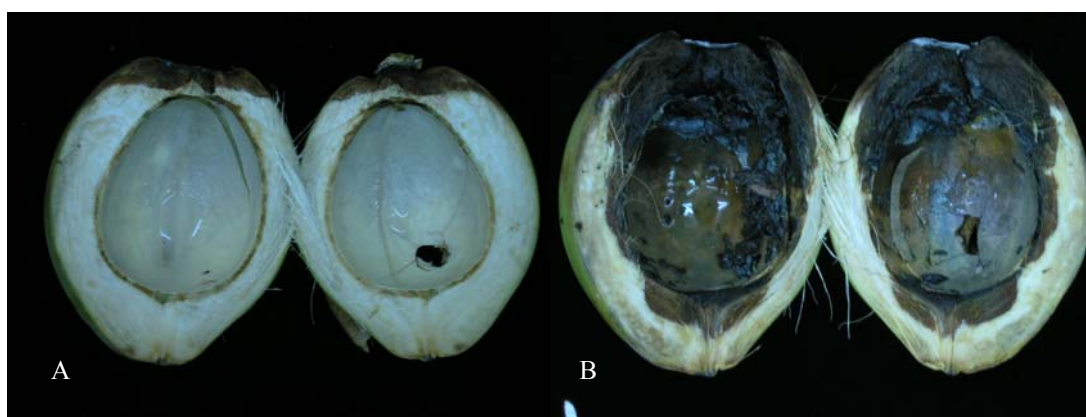
菌株編號	分生孢子梗大小 (μm)	分生孢子大小(μm)	厚膜孢子大小(μm)
TP-03	80.0-121.8-170.0 × 5.3-7.0-7.8	8.9-10.5-14.5 × 4.5-5.3-6.5	11.8-16.8-24.3 × 6.5-8.8-10.9
TP-05	65.0-112.7-187.5 × 5.3-6.9-8.5	9.1-10.7-14.5 × 4.7-5.7-8.5	13.8-18.3-27.2 × 7.6-10.6-14.5
TP-05W	80.0-106.3-132.5 × 5.0-6.6-7.8	8.9-11.1-13.6 × 4.5-5.4-6.7	13.8-18.9-24.3 × 7.6-10.5-13.4
TP-06	87.5-172.2-270.0 × 4.8-5.6-8.0	6.7-10.4-14.7 × 4.2-4.9-6.0	不存在
TP-13	80.0-119.8-190.0 × 5.0-6.6-8.8	10.5-12.5-17.8 × 5.3-6.2-6.7	12.9-16.1-21.2 × 8.9-10.1-13.6
TP-19	80.0-112.1-155.0 × 5.0-6.1-7.8	8.5-10.8-16.0 × 4.7-5.5-6.7	13.4-18.8-25.0 × 8.9-10.6-12.5
TP-23	90.0-133.8-165.0 × 4.5-5.6-7.5	6.7-10.3-12.9 × 4.4-5.3-6.7	14.0-17.7-20.3 × 7.8-9.4-11.1
TP-25	80.0-121.1-155.0 × 4.8-5.9-7.0	6.7-10.2-13.6 × 4.2-5.2-6.2	14.5-17.1-20.1 × 8.7-9.6-10.9
TP-27	60.0-76.3-98.5 × 5.5-7.7-9.5	7.3-11.0-14.0 × 5.3-6.1-7.3	17.5-19.9-25.0 × 9.8-11.2-17.0
TP-28	97.5-122.9-165.0 × 5.0-5.8-7.0	8.2-11.1-15.8 × 4.5-5.4-6.5	15.2-18.8-26.7 × 8.0-9.5-10.9
TP-32	75.0-157.3-352.5 × 4.5-5.9-7.8	8.7-10.9-13.6 × 4.7-5.8-6.7	13.6-18.0-23.4 × 8.9-11.2-15.4

^a孢子與分生孢子梗量測皆為 25 重複，並以最小值-平均值-最大值表示之。

三、可可椰子黑腐病分離株對可可椰子果實之病原性檢定結果

(一) 以分離株培養菌絲塊對可可椰子全果實進行接種之結果

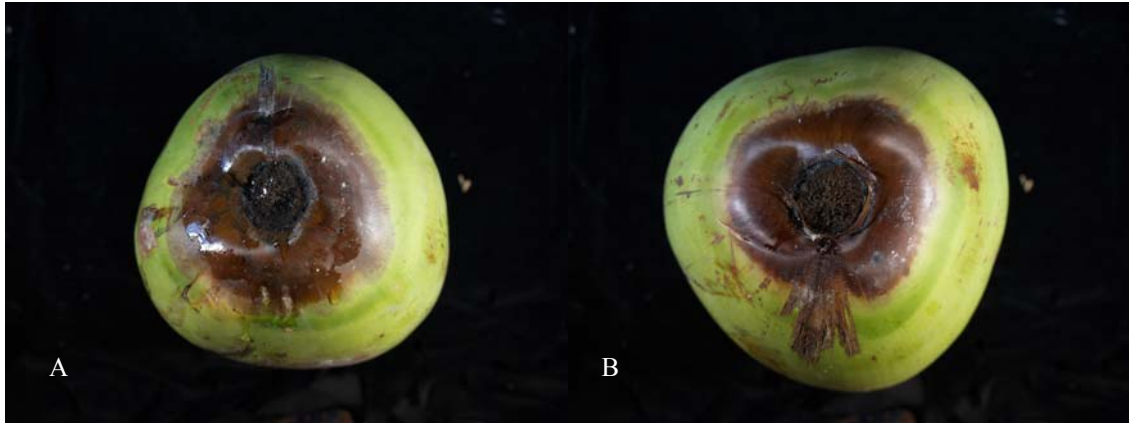
於可可椰子果實果蒂處接種待試菌株菌絲塊，發現在 3~5 日後即開始發生果頂黑化之病徵。在接種後 11 日剖開接種 *T. paradoxa* 之果實，發現內果皮內外皆有嚴重之黑化，伴隨大面積軟腐與濃烈水果香味(圖六 B)。而接種 *L. theobromae* 及對照組者則僅果表附近果肉發生略為褐化之現象(圖六 A)。對上述三組果實之病健部進行分離，發現接種 *T. paradoxa* 之果實可再分離得原接種菌株，而接種 *L. theobromae* 及對照組之再分離結果發現主要為 *L. theobromae*，未見 *T. paradoxa* 之存在。



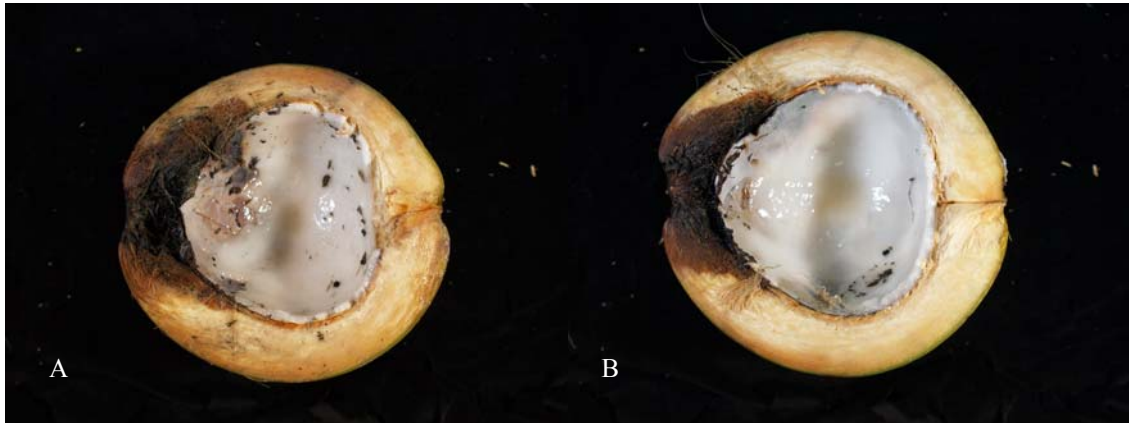
圖六、以分離所得 *Lasiodiplodia theobromae* 分離株與 TP-03 菌株接種於可可椰子果實 11 日後所表現之果實內部病徵，分別如圖 A 與圖 B 所示。

(二) 以分離株孢子懸浮液對可可椰子全果實進行接種之結果

於可可椰子果實果蒂處接種濃度 $10^5/\text{ml}$ 待試菌株孢子懸浮液 0.1ml 並保濕 10 日後，發現所有接種之可可椰子果實皆發生果頂黑化、果蒂掉落之病徵(圖七)，而病果經縱切後，可見果實內部有大面積褐化與黑化病徵並散發獨特水果香味，其發病率及嚴重度如表。本項試驗發現各待試菌株，包括分離自鳳梨黑腐病果實之菌株 TP-28，皆可在可可椰子上發生果肉黑化之病徵(圖八)，且皆可經由再分離獲得原接種之分離株，如表五所示。



圖七、分離自可可椰子果實之 TP-27 菌株(A)與分離自鳳梨果實之 TP-28 菌株(B)，
接種於可可椰子果實 10 日後所表現之果頂病徵。



圖八、分離自可可椰子果實之 TP-27 菌株(A)與分離自鳳梨果實之 TP-28 菌株(B)，
接種於可可椰子果實 10 日後所表現之果實內部病徵。

表五、可可椰子果實接種 *Thielaviopsis paradoxa* 孢子懸浮液(10^5 /ml)後 10 日之試驗結果。

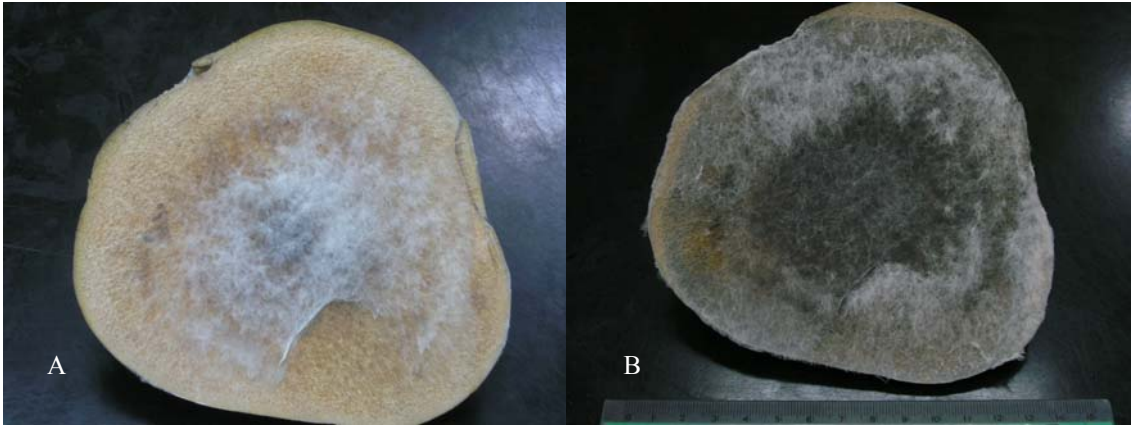
待試菌株編號	發病率(%)	病害嚴重度*	再分離率(%)
TP-05W	100 _a	0.50 _c	100.0 _a
TP-06	100 _a	1.00 _a	100.0 _a
TP-13	100 _a	0.83 _{ab}	100.0 _a
TP-19	100 _a	1.00 _a	100.0 _a
TP-23	100 _a	0.50 _c	91.7 _{ab}
TP-25	100 _a	1.00 _a	100.0 _a
TP-27	100 _a	1.00 _a	100.0 _a
TP-28	100 _a	1.00 _a	100.0 _a
TP-32	100 _a	0.83 _{ab}	100.0 _a
CP1-2	100 _a	0.75 _{ab}	66.7 _b
CP1-9	100 _a	0.83 _{ab}	66.7 _b
CK(dH ₂ O)	0 _b	0.00 _d	0.0 _c
Untreated	0 _b	0.00 _d	0.0 _c

*病害嚴重度(Disease severity index)為依據表一將各果實黑腐嚴重情形分為 0~4 之等級，再予以累加平均後所得。

(三) 分離株菌絲塊對可可椰子中果皮切面之接種實驗

在可可椰子中果皮切面打洞，接種待試菌株菌絲塊並保濕兩天後，可在切面處發現中果皮開始褐化，並有大量白色菌絲產生(圖九 A)，隔天褐化處即明顯黑化(圖九 B)，經鏡檢確認黑化處為病原菌之分生孢子與厚膜孢子。而將此接種之中果皮縱切，可發現內部有明顯之黑化發生。本試驗中所有待試菌株皆可造成上述中果皮之黑化病徵，並於病原菌再分離時可達到近 100%之再分離率。

而以中果皮切面不打洞皆種菌絲塊之結果與上述打洞者十分相似，如圖十所示。



圖九、椰子果實中果皮切面打洞接種 TP-03 菌株 2 天後(A)與 3 天後(B)之發病情形。



圖十、椰子果實中果皮切面不打洞接種 TP-03 菌株 3 天後，進行縱剖後，可見內部果肉明顯褐化與黑化。

四、可可椰子黑腐病菌株孢子發芽特性之觀察

(一) 可可椰子黑腐病菌株分生孢子發芽特性之觀察

在分生孢子發芽率方面，本研究測試黑腐病菌分生孢子在不同營養及覆蓋條件影響孢子發芽形態，結果如表六。其中將分生孢子塗於空白玻片加水滴所得之發芽率近於 0%，而塗於 WA 平板培養基者為 14.3~33.3%，但白化變異菌株 TP-05W 在 WA 上之發芽率可達 54.4%，塗於 PDA 培養基之分生孢子發芽率則近於 100%，是否施加蓋玻片處理並不明顯影響發芽率。

而在分生孢子發芽後之形態觀察上，塗於 WA 平板培養基、沒有施加蓋玻片處理之分生孢子，明顯有在發芽後直接自分生孢子處產生單一氣生分生孢子梗，而後自原孢子處產生單一營養菌絲之傾向如圖十一，在白化菌株 TP-05W 曾發現到分生孢子發芽後直接在孢子上產生三根分生孢子梗的特殊狀況。而在施加蓋玻片處理後，分生孢子之發芽方式全部轉變為直接產生營養菌絲之一般真菌孢子發芽形態；但 TP-05W 白化變異株則仍有部分在發芽後直接產生單一分生孢子梗的情形發生。在塗抹於 PDA 平板培養基之部分，分生孢子不論是否有施加蓋玻片處理，發芽形態全部傾向於直接產生營養菌絲 (表六)。



圖十一、*Thielaviopsis paradoxa* 分生孢子於 WA 平板培養基表面、未施加蓋玻片條件下所產生自分生孢子處產生單一氣生分生孢子梗，而後自原孢子處產生單一營養菌絲的特殊發芽形態。

表六、椰子黑腐病菌 *Thielaviopsis paradoxa* 分生孢子在不同營養與覆蓋條件下，各不同發芽形態之比較。

處理	各菌株不同發芽形態之發芽比率(%) ^a					
	Isolate TP-05W		Isolate TP-06		Isolate TP-27	
	Type S	Type G	Type S	Type G	Type S	Type G
Slide, moist	<0.1 _k	0.0 _k	0.0 _k	0.0 _k	0.0 _k	0.0 _k
Slide, covered with water	0.0 _k	<0.1 _k	0.0 _k	0.0 _k	0.0 _k	0.0 _k
WA, moist	54.4 _d	0.6 _{jk}	14.3 _g	0.0 _k	33.3 _e	0.0 _k
WA, with cover slide	3.1 _{hi}	10.8 _g	0.0 _k	25.1 _f	0.0 _k	32.2 _e
PDA, moist	1.0 _{ijk}	99.0 _{ab}	2.7 _{hij}	97.3 _{bc}	3.5 _h	96.5 _c
PDA, with cover slide	0.0 _k	100.0 _a	0.0 _k	100.0 _a	0.0 _k	100.0 _a

^a 發芽形態之發芽率 = (產生特定發芽形態之孢子數量 / 計數之孢子總數) × 100%。其中 Type S(Special)者為先產生單一氣生分生孢子梗並產孢後再從原孢子發芽產生營養菌絲；Type G(General)者為直接產生單一營養菌絲。

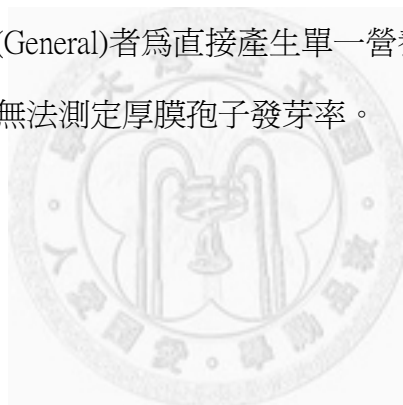
(二) 可可椰子黑腐病病原菌株厚膜孢子發芽特性之觀察

在厚膜孢子發芽率方面，本研究測試黑腐病菌分生孢子在不同營養及覆蓋下之發芽情形，結果如表七。發現厚膜孢子塗於空白玻片水滴或 WA 平板培養基上所得之發芽率皆為 0%，而塗於 PDA 培養基者發芽率為 24.0~31.6%，其是否施加蓋玻片處理並不影響發芽率。而在厚膜孢子發芽後形態觀察上，所有可發芽之厚膜孢子，不論是否有施加蓋玻片處理，其發芽皆不再氣生產孢，而是直接產生營養菌絲。

表七、椰子黑腐病菌 *Thielaviopsis paradoxa* 厚膜孢子在不同營養與覆蓋條件下，各不同發芽形態之比較。

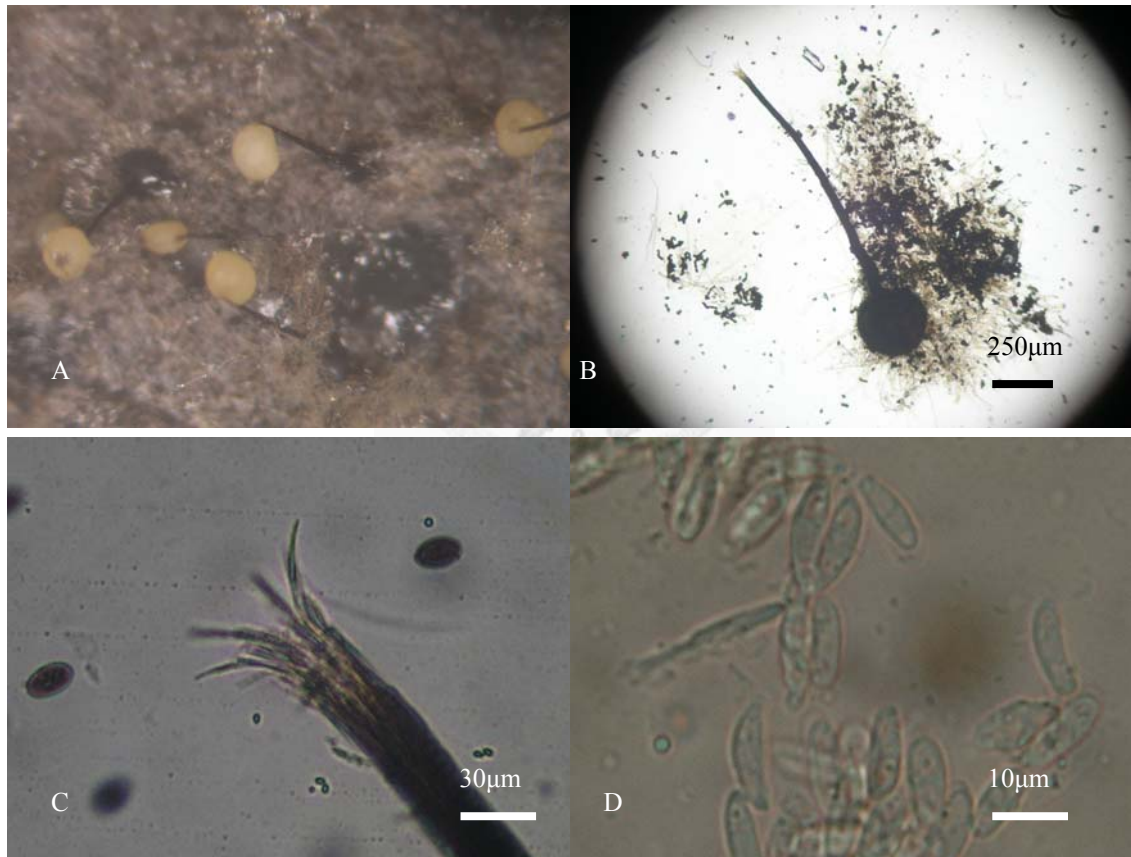
處理	各菌株不同發芽形態之發芽率(%) ^a					
	Isolate TP-05W		Isolate TP-06		Isolate TP-27	
	Type S	Type G	Type S	Type G	Type S	Type G
Slide, moist	0.0 _b	0.0 _b	—	—	0.0 _b	0.0 _b
Slide, covered with water	0.0 _b	0.0 _b	—	—	0.0 _b	0.0 _b
WA, moist	0.0 _b	0.0 _b	—	—	0.0 _b	0.0 _b
WA, with cover slide	0.0 _b	0.0 _b	—	—	0.0 _b	0.0 _b
PDA, moist	0.0 _b	24.0 _a	—	—	0.0 _b	31.6 _a
PDA, with cover slide	0.0 _b	27.6 _a	—	—	0.0 _b	30.8 _a

^a 發芽形態之發芽率 = (產生特定發芽形態之孢子數量 / 計數之孢子總數) × 100%。其中 Type S(Special)者為先產生單一氣生分生孢子梗並產孢後再從原孢子發芽產生營養菌絲；Type G(General)者為直接產生單一營養菌絲。而 TP-06 為不產生厚膜孢子之變異菌株，故無法測定厚膜孢子發芽率。



五、可可椰子黑腐病菌株有性世代之誘發

本研究利用 TP-03 與 TP-05W 兩菌株和其他菌株兩兩對峙培養，經過兩個月僅發現 TP-05W 對 TP-06 的配對產生淡咖啡色、球狀子囊殼，其大小約 $280\mu\text{m}$ ，且有一長約 $1100\mu\text{m}$ 之黑色長喙，如圖十二 A 與圖十二 B，子囊殼口菌絲呈帚狀散生(圖十二 C)。其內之子囊在孢子釋出子囊殼前已溶解，子囊孢子為梭形，部分彎向一側(圖十二 D)，大小約 $12 \times 3\mu\text{m}$ 。自此批子囊孢子進行單孢分離培養，共得 CP1-1~CP1-10 等 10 菌株，發現此批分離菌株部分呈現白化菌株 TP-05W 之培養形態，其他菌株則呈現 TP-06 之性狀，詳細遺傳特性分列於表八。



圖十二、由椰子黑腐病菌 TP-05W 與 TP-06 二菌株對峙培養所得之有性世代構造：
(A)解剖顯微鏡下所見之子囊殼之黑色長喙與橘色子囊孢子露；(B)光學顯微鏡下所見之長喙子囊殼；(C) 帚狀之子囊殼口構造；(D)由子囊殼釋出之子囊孢子。

表八、自椰子黑腐病菌 *Ceratocystis paradoxa* 子囊孢子單孢培養所得菌株之遺傳特性與形態特徵^a。

菌株編號	遺傳菌落顏色	分生孢子梗大小 (μm)	分生孢子大小 (μm)	厚膜孢子大小 (μm)
CP1-1	白	-- × --	-- × --	-- × --
CP1-2	白轉黑	60.0-110.1-145.0 × 4.5-5.6-7.8	8.2-9.7-14.0 × 4.4-5.0-7.1	14.4-19.6-28.9 × 7.8-11.3-14.4
CP1-3	白轉黑	-- × --	-- × --	-- × --
CP1-4	白	95.0-140.7-187.5 × 5.0-6.4-7.5	10.0-12.6-18.9 × 4.7-5.5-6.7	10.3-15.8-22.3 × 7.4-9.1-11.8
CP1-5	白	110.0-155.1-180.0 × 5.5-7.1-7.5	8.7-11.9-13.4 × 4.7-5.8-6.9	不存在
CP1-6	灰	75.0-109.1-132.5 × 5.0-6.3-7.5	9.1-11.2-15.2 × 4.5-5.4-6.2	11.6-15.9-20.3 × 6.5-8.7-10.7
CP1-7 ^b	—	—	—	—
CP1-8	白	82.5-138.7-165.0 × 5.3-6.8-8.3	8.5-11.3-13.4 × 4.5-5.2-6.2	不存在
CP1-9	白	102.5-138.9-175.0 × 6.0-7.1-10.0	9.4-11.8-15.6 × 4.5-5.8-6.7	不存在
CP1-10	白	82.5-118.2-162.5 × 5.8-7.3-8.3	8.9-11.5-13.6 × 4.5-5.5-6.7	不存在

^a所有微觀構造測量結果皆為 25 重複，經計算後取平均值、最大值與最小值。

^bCP1-7 菌株途中死亡，故無測量數據。

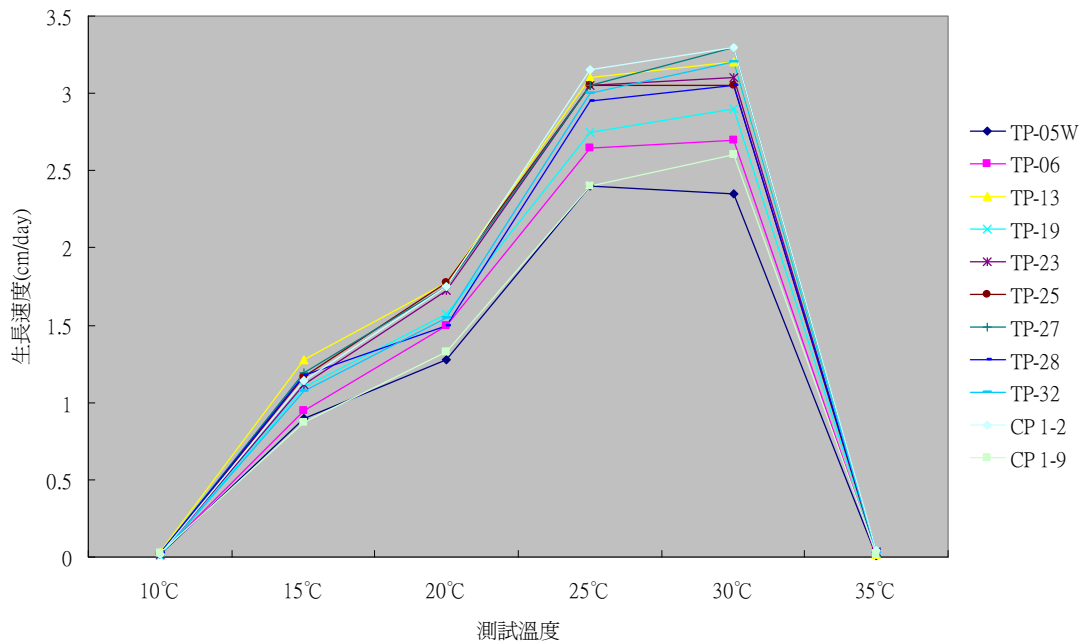
六、溫度對可可椰子黑腐病病原菌株生長速度之影響

本研究比較 6 級溫度下可可椰子黑腐病菌菌絲之生長速度，結果如表九及圖十三，發現所有待試菌株均在 25°C 或 30°C 生長最快，而在 10°C 以及 35°C 下皆幾乎停止生長，野生型之菌株在最適生長溫度下其生長速度皆可達到 3.0 cm/day，但不產生厚膜孢子之變異菌株 TP-06 為 2.7~2.9 cm/day，而白化菌株(TP-05W、CP1-9)則為 2.35~2.6 cm/day 之間，如表九、圖十三所示。

表九、椰子黑腐病菌 *Thielaviopsis paradoxa* 各分離株在 PDA 培養基不同溫度下之生長速度。

分離株	菌絲生長速度(cm/day)*					
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
TP-05W	0.016 _{de}	0.84 _d	1.22 _e	2.28 _d	2.28 _e	0.005 _e
TP-06	0.021 _{bcd}	0.99 _c	1.53 _c	2.68 _{bc}	2.82 _c	0.011 _{de}
TP-13	0.031 _a	1.28 _a	1.78 _a	3.07 _a	3.22 _a	0.013 _{bcd}
TP-19	0.012 _{ab}	1.09 _d	1.55 _c	2.65 _c	2.83 _c	0.029 _{abc}
TP-23	0.021 _{bcd}	1.13 _b	1.77 _a	2.95 _a	3.08 _{ab}	0.034 _{ab}
TP-25	0.019 _{cd}	1.16 _b	1.78 _a	2.93 _{ab}	3.05 _{ab}	0.024 _{abcd}
TP-27	0.022 _{bc}	1.16 _b	1.75 _{ab}	2.93 _{ab}	3.20 _a	0.030 _{abc}
TP-28	0.029 _a	1.12 _b	1.50 _{cd}	2.83 _{abc}	3.97 _{bc}	0.043 _a
TP-32	0.011 _e	1.13 _b	1.57 _{bc}	2.90 _{abc}	3.12 _{ab}	0.029 _{abc}
CP1-2	0.020 _{cd}	1.14 _b	1.78 _a	3.05 _a	3.22 _a	0.043 _a
CP1-9	0.027 _{bcd}	0.88 _d	1.32 _{de}	2.35 _d	2.53 _d	0.019 _{bcd}

*各數值為二次重複之平均值。



圖十三、椰子黑腐病菌 *Thielaviopsis paradoxa* 11 個分離株在 PDA 培養基不同溫度下之生長速度比較圖。

七、溼度對可可椰子接種黑腐病菌後發病嚴重度之影響

本研究以三種溼度測試溼度對黑腐病發病嚴重度的影響，其結果如表十。可知可可椰子果實於接種 TP-06 菌株 10 日後，在三種溼度下發病率皆為 100%，且各果實之發病嚴重度皆已達到最大，即嚴重度為 100%，故不同之溼度並不影響發病之嚴重度。但在果實病徵之表現上，發現溼度高低，會影響果表接種處病兆之表現，如圖十四，即在高溼度下果表會大量產孢，低溼度下則幾乎不產孢。但果實剖面病徵則無明顯之差異存在。



圖十四、可可椰子健康果實接種黑腐病菌 TP-06 菌株並置於室內溼度環境(A)及防潮箱環境下(B)10 日後之病兆比較。

表十、可可椰子果實接種黑腐病菌後在三種溼度下發病嚴重度之比較。

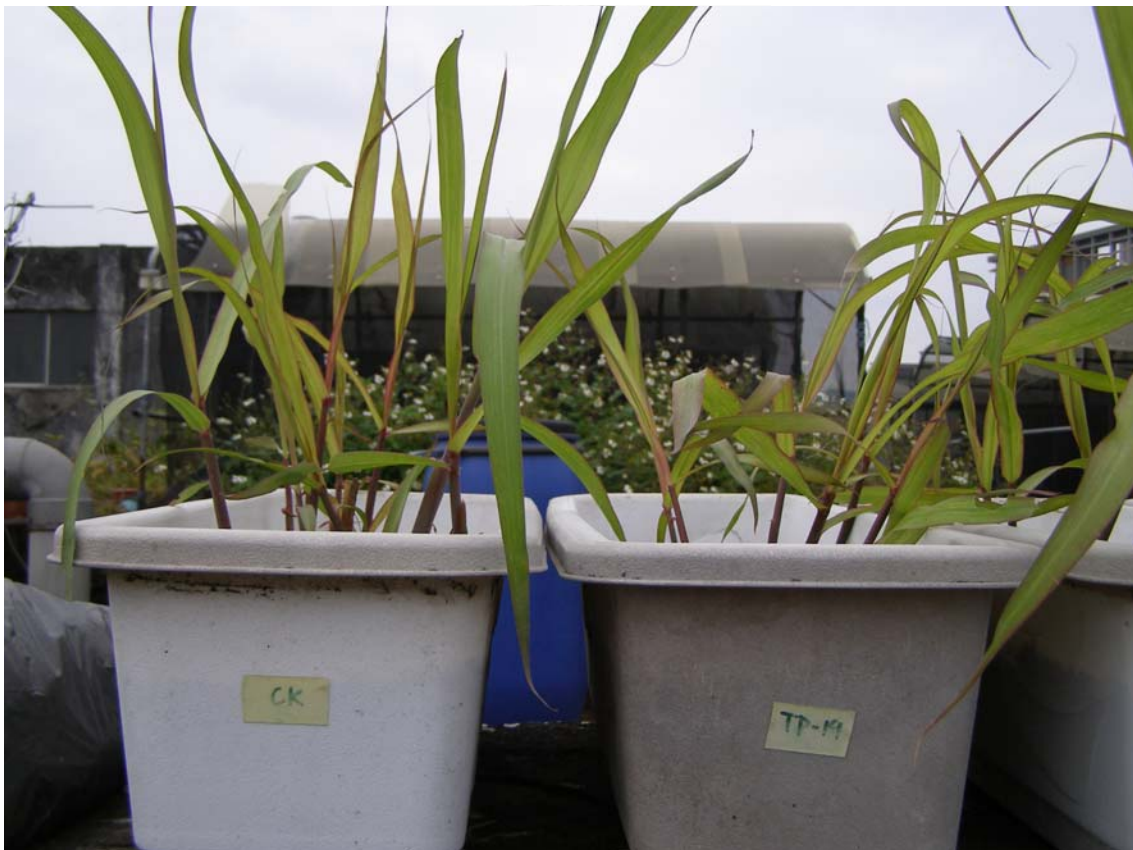
Treatments ^a	發病率(%)	病害嚴重度(%)	病原菌再分離率(%)
Untreated (RH: 70~75%)	0 _b	0 _b	0 _b
Moist chamber (RH: 100%)	100 _a	100 _a	100 _a
Laboratory (RH: 70~75%)	100 _a	100 _a	100 _a
Dessication chamber (RH:30~35%)	100 _a	100 _a	100 _a

^a 各試驗處理皆為 3 重複。

八、可可椰子黑腐病菌株寄主範圍之測定

(一) 可可椰子黑腐病菌株對甘蔗苗之病原性檢定

取甘蔗節苗種入接種黑腐病菌菌絲塊之長條砵介質中，一個月後檢視甘蔗苗之發病情形，發現接種者與對照組在發芽率與生長勢上均無太大差異存在，如圖十五。進一步將甘蔗苗莖部剖開觀察，發現僅在蔗苗兩端接觸土壤之節間有黑化現象，如圖十六。對此黑化處進行組織分離，僅分離到 *Trichoderma* 屬與 *Fusarium* 屬之真菌，未能分離到 *Thielaviopsis paradoxa*。然而上述被剖開觀察之甘蔗苗，切面在保濕一週後皆會產生大量 *Thielaviopsis paradoxa* 之孢子，經再分離培養後確認為原先接種之菌株。



圖十五、可可椰子黑腐病菌接種健康甘蔗節苗一個月後之結果，左側為健康對照組，右側為接種 TP-19 菌株者。



圖十六、可可椰子黑腐病菌接種甘蔗健康節苗一個月後剖開各節苗是否發病之結果，A 圖為健康對照組，B 圖為接種 TP-19 菌株者，兩者皆僅兩端黑化。

(二) 可可椰子黑腐病菌株對鳳梨果實之病原性檢定

在鳳梨果柄橫切面上接種濃度 10^5 /ml 待試菌株孢子懸浮液各 0.1ml 並保濕 7 日後，發現所有接種之鳳梨果實果柄切面上皆有大量 *T. paradoxa* 孢子之產生，且部分果實已呈現嚴重感染，致果皮呈現水浸、軟腐病徵並流出汁液，將接種之鳳梨果實剖開後，發現所有接種病源之果實內部皆有水浸狀軟腐病徵並散發香味(圖十七 A)，部分病果在果柄病徵處有黑化現象，經鏡檢確認為病原菌厚膜孢子。統計發現各可可椰子黑腐病菌株皆可感染鳳梨果實，而分離自之鳳梨果實之菌株 TP-28 亦可再感染鳳梨果實(圖十七 B)，至於白化菌株 TP-05W，其亦可感染鳳梨果實，唯病害嚴重度不及其他菌株之嚴重。有關上述各菌株對鳳梨果實造成病害之嚴重度資料列如表十一。



圖十七、分離自可可椰子果實之 TP-27 菌株(A)與分離自鳳梨果實之 TP-28 菌株(B)，接種於鳳梨果實七日後所表現之果頂病徵。

表十一、鳳梨果實接種 *Thielaviopsis paradoxa* 孢子懸浮液(10^5 /ml)後 7 日之試驗結果。

待試菌株編號	發病率(%)	病害嚴重度*	分離率(%)
TP-05W	100 ^a	0.33 ^d	91.7 ^a
TP-06	100 ^a	0.75 ^{ab}	100.0 ^a
TP-13	100 ^a	0.58 ^{abc}	100.0 ^a
TP-19	100 ^a	0.58 ^{abc}	100.0 ^a
TP-23	100 ^a	0.67 ^{ab}	91.7 ^a
TP-25	100 ^a	0.58 ^{abc}	100.0 ^a
TP-27	100 ^a	0.50 ^{bc}	100.0 ^a
TP-28	100 ^a	0.83 ^a	100.0 ^a
TP-32	100 ^a	0.58 ^{abc}	100.0 ^a
CP1-2	100 ^a	0.83 ^a	100.0 ^a
CP1-9	100 ^a	0.50 ^{bc}	100.0 ^a
CK(dH ₂ O)	0 ^b	0.00 ^e	0.0 ^b
Untreated	0 ^b	0.00 ^e	0.0 ^b

*病害嚴重度(Disease severity index)為將各果實病害嚴重情形分為 0~4 之等級(0 為果實無褐化現象、1 為果柄處發生褐化(尚未擴展至果肉)、2 為果肉 1%~25%面積發生褐化、3 為果肉 26~50%發生褐化、4 為 51%以上之果肉發生褐化)，再予以加權平均後所得。

第五章 討論

一、可可椰子採收後病害之調查

由田間或市場病害調查的結果，在可可椰子採收後數日起，由 *Lasiodiplodia theobromae* 所造成之果頂表皮黑化病徵，以及由 *Ceratocystis paradoxa* 造成之果實內部黑腐病徵，皆可在台灣終年發生，尤其在 6~10 月為發病高峰期，且前者較後者發病率為高，而在 9 月時尚可發現 *Colletotrichum gloeosporioides* 造成之炭疽病。但由於台灣地區水果銷售業者，常將此類外表品相不佳的可可椰子果實直接剖取椰水販賣以獲取剩餘價值，故實際經濟損失，反而以 *C. paradoxa* 造成者較大。在對照國外相關文獻後，發現 *L. theobromae* 在可可椰子果實上的病害在印度與巴西等地皆有報導(Rao *et al.*, 1972; Viana *et al.*, 2002)，而 *C. gloeosporioides* 所造成之病害在台灣早已有報導(楊, 1990)，但 *C. paradoxa* 在可可椰果實上的病害則目前已知只有在巴西聖保羅地區有零星報導，而該文獻使用之病害名稱為果實蒂腐病(coconut fruit basal rot)(Rossetti, 1955; Carmargo and Gimenes-Fernandes, 1997)，然而就目前在台灣所觀察到的病害病徵而言，此病害除了可危害果蒂外，尚可經由果實其他位置之傷口感染，相當類似於同為 *C. paradoxa* 造成之鳳梨黑腐病的病徵與發病生態(Rohrbach and Phillips, 1990)，故作者認為此病害亦可稱為黑腐病(black rot)較為妥當。

二、可可椰子黑腐病病原菌株之分離及鑑定

作者在發生有果實內部嚴重黑化病徵的可可椰子果實中，都可分離到一種菌落散發獨特香味之真菌，經初步形態鑑定為不完全菌之 *Thielaviopsis* 屬(Barnett and Hunter, 1972)，而後觀察該分離株之分生孢子於成熟時會變圓、變黑且厚壁化的獨有特徵，將其鑑定為 *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Höhn (Morgan, 1967; Upadhuay, 1981)。比較其他學者對於 *T. paradoxa* 之測量結果(表十二)，發現可可椰子黑腐病菌株之厚膜孢子長度平均值皆在其他學者描述之上限，部分並超過之；在分生孢子

梗長度上，大抵落在其他學者所描述的範圍中，部分菌株且有觀察到 Dade 氏所述的超長分生孢子梗(Dade, 1928)，其最長記錄為 352 μm ；在分生孢子長度上，絕大部分菌株的平均值皆落在與其他學者所述相當的 10~12 μm 之間，但寬度平均值則多接近上限。就以上測量結論而言，雖與前人研究有些微落差存在，但由於特徵明顯，故應仍可將其鑑定為 *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Höhn。

另外，對於 *Ceratocystis paradoxa* 菌株在培養時所產生之特殊香氣，其正常培養形態菌株味道為類似洋香瓜或鳳梨的香味，而白化變異菌株味道則偏向酒味。在前人關於此屬真菌所產生氣味之研究上，同屬之 *Ceratocystis fimbriata* 相關研究較多，其氣味主要成份約有 75~80% 為乙酸乙酯(Ethyl acetate)，15~20% 為乙醇(Ethanol)，剩餘成分主要為其他醇類、酯類及些許乙醛(Acetaldehyde)或酮類(Ketones)(Christen *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 2000)。

表十二、不同學者對於 *Thielaviopsis paradoxa* 菌株微觀構造測量值之比較。

測量來源	分生孢子梗大小 (μm)	分生孢子大小 (μm)	厚膜孢子大小 (μm)
Morgan, 1967	-200 × ?	6-13-24 × 2-5.5	10-25 × 7.5-20
Upadhyay, 1981	-250 × 3-9	7-15 × 2.5-6	(7.5-)9.5-25 × 5.5-15(-17)
TP-19	80.0-112.1-155.0 × 5.0-6.1-7.8	8.5-10.8-16.0 × 4.7-5.5-6.7	13.4-18.8-25.0 × 8.9-10.6-12.5

三、可可椰子黑腐病分離株之病原性檢定

將病果上分離所得之 *Thielaviopsis paradoxa* 與 *Lasiodiplodia theobromae* 菌絲塊接種於可可椰子果蒂處，前者可重現最初所發現之果實內部果肉明顯黑化與腐爛之病徵，而後者則否，且病原菌再分離結果亦可重新獲得原先接種之菌株，故可證明 *T. paradoxa* 為造成可可椰子果實黑腐病之病原菌；由於實驗中之對照組有時亦會發生明顯 *L. theobromae* 型之病徵，故在此試驗中尚無法證明 *L. theobromae* 的病

原性。

比較不同 *T. paradoxa* 菌株對於可可椰子果實致病力的差異，發現正常培養形態之菌株在致病力上並無特別明顯之差異，而白化菌株(TP-05W、CP1-9)的致病力則較正常菌株略為低下，子囊孢子單孢分離株(CP1-2、CP1-9)亦具致病力，且與上述培養形態有關；失去厚膜孢子產生能力的變異菌株 TP-06 在致病力雖與正常菌株毫無差異，但可能是由於無法產生黑色厚膜孢子的緣故，果實內部病徵僅呈褐色而非黑色，由此可間接證明可可椰子黑腐病之果肉黑化是因產生黑色厚膜孢子所致。

比較三種用以接種 *T. paradoxa* 分離菌株的方法，其中以中果皮切面接種菌絲塊的方式可在 3 天內明顯產生病徵為最快，其次為使用菌絲塊接種果實果蒂處，最慢者為使用孢子懸浮液接種果實果蒂處之正統方法，造成如此差異之原因可能為果實切片方法可造成接種環境相當高的溼度，促進接種之菌絲大量生長而使發病加速；使用孢子懸浮液接種則需要等待孢子在貧養環境下發芽，並自果實組織獲取養分後才能大量生長，因而使發病速度較慢。若考慮到試驗操作的方便與快速原則，因不同接種方法所表現出的果肉黑化現象幾乎相同，故以可可椰子中果皮切面代替全果實進行接種，應可作為檢定分離株病原性之快速方法。

四、可可椰子黑腐病菌株孢子發芽特性之觀察

將 *Thielaviopsis paradoxa* 之分生孢子與厚膜孢子放在不同的營養或覆蓋條件下，觀察發芽率與不同發芽形態所佔比例，發現在無養分條件下分生孢子與厚膜孢子皆不發芽；而在 WA 平板培養基上僅分生孢子可發芽，其發芽率約在 10.8%~54.4%間；在 PDA 平板培養基上則分生孢子與厚膜孢子皆可發芽，分生孢子發芽率幾近 100%，而厚膜孢子發芽率則為 24.0%~31.6%間，由此結論可得知 *T. paradoxa* 之分生孢子僅需少許養分存在就可發芽，而厚膜孢子則需較為充足的養分才可發芽，符合其他學者對此真菌的相關研究結果(Kumar and Nambiar, 1990)。

而在不同發芽形態所佔比例上，*T. paradoxa* 之分生孢子在 WA 平板培養基、未覆蓋處理下，其發芽形態全部偏向先產生單一氣生分生孢子梗並產孢後，再從原孢子產生營養菌絲的方式；但在相同環境下覆蓋處理後，發芽形態則全部轉變為直接產生單一營養菌絲為主的一般真菌發芽形態，此一結果明顯顯示出 *T. paradoxa* 分生孢子之發芽行為明顯受到是否透氣條件之影響；雖在本試驗中因厚膜孢子在 WA 平板培養基下不發芽，而無法在數據上得出任何結論，但作者在培養於 WA 平板培養基上的 TP-05W 白化變異株中，發現其厚膜孢子可以在培養基的表面上發芽產生單一氣生分生孢子梗並產孢(圖十八)；若再加上其他學者發現子囊孢子之發芽亦有類似行為(Dade, 1928)，則可推論 *Ceratocystis paradoxa* 之分生孢子、厚膜孢子與子囊孢子皆會受到微環境透氣與養分因素之影響，而有不同發芽行為之傾向，之所以有如此現象，推測原因可能為有利於此真菌在貧養環境下，藉由昆蟲或雨水進行被動傳播。

在菌株差異比較上，白化變異菌株 TP-05W 分生孢子在貧養條件下的發芽情況，與正常野生型菌株 TP-27 有些微差異存在，尤其在 WA 平板培養基上有不同發芽形態比率，即使有蓋玻片存在也還是有部分分生孢子傾向於發芽產生單一分生孢子梗並產孢。而不產生厚膜孢子的變異菌株 TP-06，雖在貧養條件下發芽率較 TP-27 略為低下，但在不同覆蓋條件下的發芽行為則與野生型者有相同趨勢。



圖十八、在 WA 平板培養基下培養之白化 TP-05W 菌株，於培養基表面產生之厚膜孢子發芽時會先產生單一氣生分生孢子梗並產孢。

五、可可椰子黑腐病菌株有性世代之誘發

由 TP-05W 與 TP-06 菌株配對所產生之子囊殼，其子囊殼顏色偏淺、子囊孢子形態為梭形、部分彎向一側，又其分生孢子在成熟時會略為變圓與厚壁化，加上各微觀構造的大小數據(表十三)，可據此鑑定此一真菌為 *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau，同時亦可強化原先無性世代構造的鑑定結果(Dade, 1928; Morgan, 1967; Liu and Marcano, 1973; Upadhuay, 1981)，由於此二配對菌株其一為白化變異株，另一為喪失厚膜孢子產生能力的變異菌株，故在子囊孢子單孢分離之菌株上，呈現出正常形態、白化、無厚膜孢子、同時白化及無厚膜孢子等四種性狀。然而參與同一試驗的其他所有菌株配對，皆無法產生有性世代構造，且此一試驗並未使用標準配對菌株進行，故若欲釐清所有分離菌株的配對型，尚需後續研究予以補足

之。

表十三、自可可椰子果實分離之 *Ceratocystis sp.* 與其他同屬真菌的比較。

Fungal Structure	Size(μm) ^a				
	<i>C. fimbriata</i>	<i>C. moniliformis</i>	<i>C. adiposa</i>	<i>C. paradoxa</i>	<i>C. paradoxa</i> on <i>Cocos</i>
Perithecium (diam.)	140-220	130-240	230-275	190-350	280
Neck	-900	-900	1200-5000	-1400	1100
Ascospore	4.5-8×2.5-5.5	3-6×2-3	6-9×3-5.5	7-10×2.5-4	12×3
Conidia	11-25×4-5.5	5-18×1.5-3	8.5-18×3-9	6-24×2-5.5	8.5-10.8-16.0×4.7-5.5-6.7
Chlamydospore	9-18×6-13	7-14×4-9	14-27×9.5-21	10-25×7.5-20	13.4-18.8-25.0×8.9-10.6-12.5

^a*C. fimbriata*, *C. moniliformis* 與 *C. paradoxa* 之測量資料引用自 Morgan(1967)的參考資料，*C. adiposa* 之測量資料引用自 Upadhuay(1981)的參考資料。

六、溫度對可可椰子黑腐病病原菌株生長速度之影響

就測定所得數據而言，所有試驗中的 *T. paradoxa* 菌株在 25~30°C 下生長速度皆可達到最快，而在 10°C 以及 35°C 下則全部停止生長，此結果符合其他學者對於此種真菌的相關研究結果(Kiryu, 1939)。而在生長速度差異上，不產生厚膜孢子的變異菌株 TP-06 生長速度較其他正常培養形態菌株略慢；而白化菌株 TP-05W 與 CP1-9 則顯的更加緩慢，但在 30°C 時仍有 2.35~2.60 cm/day 的生長速度，此一結果同時說明前述可可椰子果實接種試驗中，白化菌株所能造成病害嚴重度較正常菌株低的緣由。

七、溼度對可可椰子黑腐病發生之影響

將可可椰子果實接種 TP-06 菌株後放置在不同的溼度條件下，雖然最終的發病結果並無任何顯著差異，然而在果實表面的病兆顯現程度呈現出相當大的差別，顯示不同溼度僅會對於果表病兆顯現造成差異，但無法對於發病率或發病度造成差別。此外，此結果亦同時表達出此病害無法單憑果實表面病徵與病兆顯現程度，

準確判定果實內部的發病度，而必須將果實沿病徵發生處切開後，始能正確判定發病度。

八、可可椰子黑腐病菌株之寄主範圍測定

將已確定在可可椰子上具有病原性之 *C. paradoxa* 菌株接種於鳳梨果實上，可在鳳梨果實上發生鳳梨黑腐病，且與分離鳳梨黑腐病病果之菌株 TP-28 的病徵相當類似，反之將此菌株接種於可可椰子果實上亦可造成可可椰子黑腐病病徵，故可確定鳳梨黑腐病與可可椰子黑腐病病原菌之寄主範圍相同。然而在對於甘蔗苗之病原菌接種試驗上，所有可可椰子黑腐病病原菌株皆無法對於此甘蔗苗造成明顯病害，目前推斷原因可能為 *C. paradoxa* 感染需要寄主的新鮮傷口 (Steer and Coates-Beckford, 1990)，而本試驗中所使用的甘蔗種苗，其傷口皆已癒合，故無法在種苗發芽前造成病害 (柯, 2008)，然因其他學者已證明此病原菌之寄主範圍十分廣泛 (Sastry et al., 1989)，故自可可椰子果實上分離之 *C. paradoxa* 菌株對甘蔗苗與鳳梨苗的病原性檢定，尚需後續研究予以補足之。

參考文獻

1. 柯 勇。2008。台灣經濟果樹病害彩色圖鑑。藝軒圖書出版社。台北。
2. 徐世典、張東柱、張清安、蔡進來、蔡東纂編。2002。台灣植物病害名彙。第四版。中華民國植物病理學會。
3. 楊秀珠。1990。臺灣植物炭疽病菌種類之研究。日本北海道大學農學院農學博士論文。札幌。
4. 劉顯達。1995。可可椰子栽培與病蟲害防治。國立屏東技術學院農業推廣委員會。屏東。
5. Aberdeen, J. E. C., and Patil-Kulkarni, B. C. 1969. The measurement of the concentration and distribution of *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) moreau in soil. Aust. J. Agric. Res. 20:843-856.
6. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. 4th edition. Wiley Far Eastern Limited, New Delhi.
7. Barnett, H. L., and Hunter B. B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Pub. Co., Minneapolis.
8. Camargo, M., and Gimenes-Fernandes, N. 1997. Occurrence of fruit basal rot in common coconut in the high plain of São Paulo. Summa Phytopathologica 23(2):164-166.
9. Christen, P., Meza, J. C., and Revah, S. 1997. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. Mycol. Res. 101:911-919.
10. Dade, H. A. 1928. *Ceratostomella paradoxa*, the perfect stage of *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) von Höhnelt. Trans. Br. Mycol. Soc. 13:184-194.
11. Janisiewicz, W. J., and Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of

- fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:411-441.
12. Kiryu, T. 1939. Studies on the physiological characters of *Ceratostomella paradoxa*. Report Government Sugar Experiment Station, Taiwan. 6:21-37.
 13. Ko, S. S., Kunimoto, R. K., and Ko, W. H. 2001. A simple technique for purifying fungal cultures contaminated with bacteria and mites. *J. Phytopathol.* 149:509-510.
 14. Kumar, A., and Nambiar, K. K. N. 1990. Effect of certain physical and chemical factors on the germination of endoconidia and chlamydospores of *Thielaviopsis paradoxa*. *Indian phytopathol.* 43(3):460-462.
 15. Liu, L., and Marcano, A. R. 1973. Sexual compatibility, morphology, physiology, pathogenicity and in vitro sensitivity to fungicides of *Thielaviopsis paradoxa* infecting sugarcane and pineapple in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. Puerto Rico* 57:117-128.
 16. Morgan, J. G. 1967. *Ceratocystis fimbriata*. No. 141 in: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England.
 17. Morgan, J. G. 1967. *Ceratocystis moniliformis*. No. 142 in: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England.
 18. Morgan, J. G. 1967. *Ceratocystis paradoxa*. No. 143 in: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England.
 19. Paulin-Mahady, A. E., Harrington, T. C., and McNew, D. 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. *Mycologia* 94(1):62-72.
 20. Rao, K. S. N., Sreekantiah, K. R., and Rao, T. N. R. 1972. Post-harvest infection of coconut kernel by *Botryodiplodia theobromae* and a note on the hydrolytic enzymes secreted by the fungus. *Indian phytopathol.* 24(4):815-819.
 21. Rohrbach, K. G., and Phillips, D. J. 1990. Postharvest diseases of pineapple. *Acta Hort.* 269:503-507.

22. Rossetti, V. 1955. "Crosta Pretas" das folhas e "Podridão Basal" dos frutos de coqueiro. *O Biológico* 21:54.
23. Reyes, M. E. Q., Rohrbach, K. G., and Paull, R. E. 2004. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33:193-203.
24. Sastry, M. N. L., Patil-Kulkarni, B. G., Hegde, R. K., and Hiremath, P. C. 1989. Studies on the disease caused by *Thielaviopsis* state of *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau on arecanut, coconut and sugarcane 1. Morphological, cultural and cross inoculation studies of three isolates of *Ceratocystis paradoxa*. *Mysore J. Agric. Sci.* 23(1):44-48.
25. Simone, G. W. 2004. *Thielaviopsis* diseases. Pages 37-38 in: *Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders*. Elliott, M. L., Broschat, T. K., Uchida, J. Y., and Simone, G. W., eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
26. Soares, M., Christen, P., Pandey, A., and Soccol, C. R. 2000. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation, *Process Biochem.* 35(8):857-861.
27. Steer, J., and Coates-Beckford, P. L. 1990. Role of *Phytophthora katsurae*, *P. palmivora*, *Thielaviopsis paradoxa* and *Enterobacter* sp. in budrot disease of coconuts in Jamaica. *Oléagineux* 45(12):539-545.
28. Streets, R. B. 1933. Heart rot of Date palm Aricono Agriculture. Experimental Station Technical Bulletin, 48:443-463.
29. Upadhyay, H. P. 1981. Monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press, Athens, USA.
30. Viana F. M. P., Freire F. C. O., Barguil B. M., Alves R. E., Santos A. A., Cardoso J. E., and Vidal J. C. 2002. Post-harvest basal rot of coconut fruits in the State of Ceará, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27(5):545.