研究報告

火災後龍柏受損枝條之真菌分離與鑑定

莊鈴木[1]、林文薇[2]、張東柱[3]、傅春旭[4*]、王俐涵[5]

（收件日期：民國111年5月25日、接受日期：民國111年8月29日）

【摘要】*Pithya cupressi* (Batsch. ex Fr.) Rehm引起的龍柏枝枯病是臺灣龍柏最常見的病害之一。它會引起枝條枯萎，更嚴重會造成樹冠枯萎。2020年12月17日甘蔗農場發生火災，火災導致甘蔗農場附近的龍柏園受損。爲釐清造成龍柏枯萎的原因，火災後3個月採集受損龍柏枝條樣品，以麥芽抽出物培養基進行組織分離培養。以內轉錄區間ITS區域序列通用性引子對ITS5，鑑定潛在的病原眞菌。從受損的龍柏園枯萎枝條中分離到4種眞菌 *Pseudopestalotiopsis* sp., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.)Griffon & Maubl, *Alternaria longipes* (Ellis & Everh.) E.W.Mason. 及 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.。這些眞菌皆爲臺灣首次於龍柏枝條上分離到的眞菌。然而，常引起龍柏枝枯病的*P. cupressi*病原體，並未在火災後的枯枝上分離到。

【關鍵詞】龍柏、枝枯病、病原菌。

[1] 林業試驗所森林保護組助理研究員。100051台北市中正區南海路53號。*通訊作者。
Assistant Researcher, Forest Protection Division, Taiwan Forestry Research Institute. 53 Nanhai Rd.,Zhongzheng Dist., Taipei city 100051, Taiwan
[2] 林業試驗所森林保護組助理。100051台北市中正區南海路53號。
Assistant, Forest Protection Division, Taiwan Forestry Research Institute. 53 Nanhai Rd.,Zhongzheng Dist., Taipei city 100051, Taiwan
3 林業試驗所森林保護組研究員。100051台北市中正區南海路53號。
Assistant Researcher, Forest Protection Division, Taiwan Forestry Research Institute. 53 Nanhai Rd.,Zhongzheng Dist., Taipei city 100051, Taiwan
4 林業試驗所森林保護組研究員。100051台北市中正區南海路53號。*通訊作者。
Researcher, Forest Protection Division, Taiwan Forestry Research Institute. 53 Nanhai Rd.,Zhongzheng Dist., Taipei city 100051, Taiwan
* Corresponding author. Email:fch@tfri.gov.tw
5 林業試驗所森林保護組助理。100051台北市中正區南海路53號。
Assistant, Forest Protection Division, Taiwan Forestry Research Institute. 53 Nanhai Rd.,Zhongzheng Dist., Taipei city 100051, Taiwan

Research paper

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI FROM DAMAGED DRAGON JUNIPER TWIG AFTER A FIRE

Ling-Mu Jaung[1], Wen-Wei Lin[2], Tun-Tschu Chang[3], Chuen-Hsu Fu[4*], Li-HanWang[5]

（Received: May 25, 2022; Accepted: August 29 , 2022）

【**Abstract**】Twig blight of dragon juniper caused by *Pithya cupressi* (Batsch. ex Fr.)Rehm is one of the most common disease of dragon juniper in Taiwan. It causes the twig blight, and more severely part of tree crown wilt. There was a fire in the sugarcane farm on Dec.17 in 2020, and the fire caused the damage of dragon juniper garden nearby the sugarcane farm damaged. In order to verify the causes of twig wilt of dragon juniper, the samples of dragon juniper for 3 months after a fire were taken and cultured on malt-extract agar plate. The potential pathogenic fungi were identified by the organization of the internal transcribed spacer (ITS) region ITS5 sequence. There are four species fungi: *Pseudopestalotiopsis* sp., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, *Alternaria longipes* (Ellis & Everh.) E.W. Mason and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. first isolated from wilt twigs of damaged dragon juniper 3 months after a fire. However, the common pathogen *P. cupressi* which causes twig blight of dragon juniper was not isolated on wilted twigs after a fire.

【**Keywords**】*Juniperus chinensis* L. var. *kaizuca* Hort, twig blight, pathogenic fungi.

I、前言

龍柏(*Juniperus chinensis* Linn. var. kaizuca Hort. ex Endl. Syn.)是圓柏的變種，主要做爲觀賞用，爲世界最優美園景樹種之一(劉棠瑞，1960)。觀賞用的龍柏價格除了依照樹木大小及年齡外，外形亦是決定價格的因素，當然這也是最容易發生價格爭議的地方。在台灣龍柏最常見的病害爲枝枯病(圖1)，龍柏枝枯病除引起樹木局部褪色枯萎之外，嚴重時也可造成整棵樹木枯萎、死亡。在田間進行診斷時，龍柏枝枯病在冬、春之際，容易觀察到紅色或橘紅色大小約1-3 mm的群生子囊盤 (圖2)。南部某公司農場甘蔗園收割後於2010年12月7日中午發生火災，殃及鄰近居民種植之龍柏園，龍柏園種植人提出求償。但是農場質疑龍柏本來就已經感染龍柏枝枯病，龍柏的枯萎或是價值的減損不應完全歸咎於火災。爲協助釐清是否因龍柏枝枯病枯萎，作者於2021年3月17日前往現場勘查及採樣，希望藉由一些科學的佐證能釐清造成龍柏枯萎的原因，除了直接的火災外，是否部分爲龍柏枝枯病所致。

II、材料及方法

於110年3月17日赴臺南農場現地進行勘查，分別由農場的管理人員在東邊(圖3)、西邊(圖4)及接近中央位置區域(圖5)龍柏之枯枝進行取樣，共取三包檢體。利用自來水將檢體清洗乾淨後，用滅菌過的吸水紙將水分吸乾，再以酒精及火焰將修枝剪、鑷子等工具消毒後，切除曝露於外的

圖1. 龍柏枝枯病的病徵
Fig 1. The symptom of twig blight of dragon juniper

圖2. 龍柏枝枯病的病兆-子囊盤
Fig 2. Sign (apothecium) of twig blight of dragon juniper

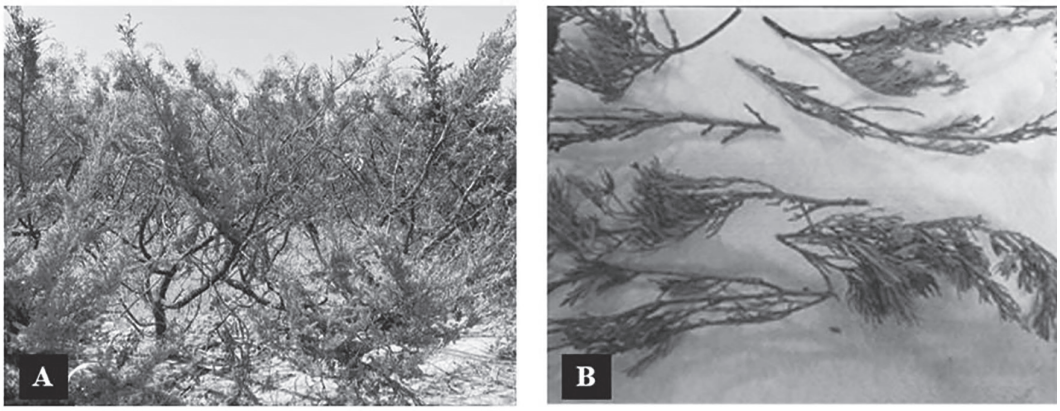

圖3 火災區域東邊A.火災區域東邊取樣位置B.東邊位置取樣的組織

Fig.3 East region of fire site. A. Sampling location of east region of fire site. B. sampling tissue of east region of fire site.

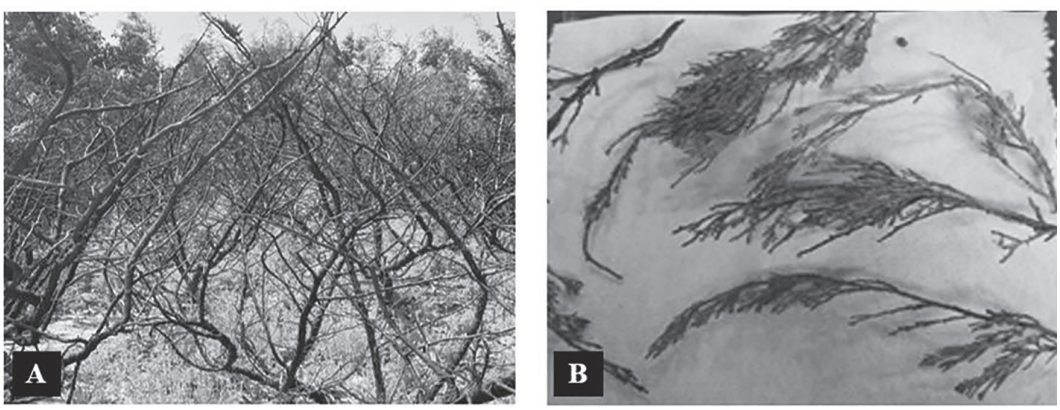

圖4 火災區域西邊A.火災區域西邊取樣位置B.西邊位置取樣的組織

Fig.4 West region of fire site. A. Sampling location of east region of fire site. B. sampling tissue of west region of fire site.

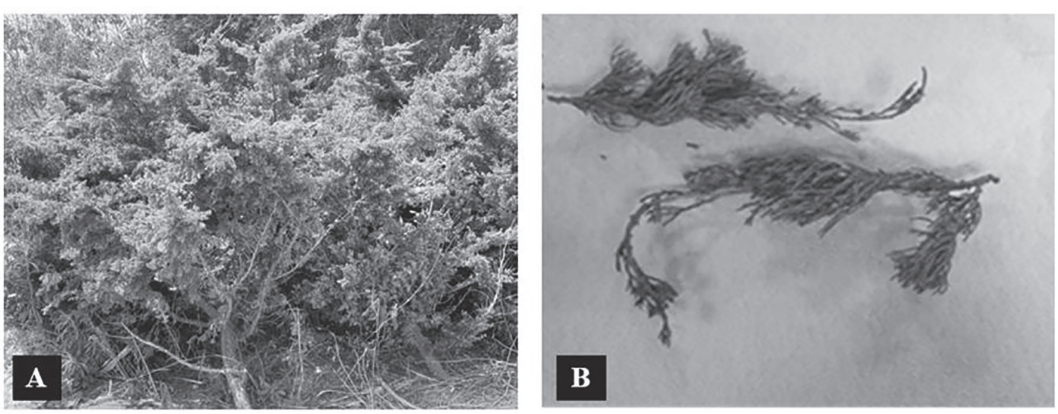

圖5 火災區域中央A.火災區域中央取樣位置B.中央區取樣的組織

Fig.5 Middle region of Fire site A. Sampling location. B. sampling tissue.

樹皮組織，將檢體剪成長度1 cm的小塊，放入75 %酒精中浸泡5 sec，以鑷子夾起後，再放入1 %的次氯酸鈉消毒水中進行表面消毒1 min，取出後用滅過菌的吸水紙吸去附著於表面的次氯酸鈉水溶液，再將檢體放入無菌水中漂洗後，置於滅過菌的吸水紙上吸乾水分，最後隨機切取大小約1 mm的檢體放置在麥芽抽出物洋菜培養基(20 g/l malt-extract, 20 g/l agar)上進行組織培養，每個培養皿放置5個點，每件檢體隨機進行取樣25個點的組織分離培養，並以石臘膜封口。置於實驗室培養箱(25℃，不照光下)培養4天，觀察所培養的組織，菌絲自培養組織生長到培養基上後，即以滅菌過的解剖刀切取菌絲尖端進行再純化培養工作。參考ITS分子序列診斷樹木靈芝病害之方法(傅春旭等，2016)，爲能更快速完成分離後純培養菌株的菌種鑑定工作，將分離純化的菌株直接進行核酸萃取，省略等待菌株產生繁殖構造的時間及顯微鏡的鏡檢比對工作。核酸萃取步驟主要參考Hung *et al*.(1999)之方法，並稍微修改後進行DNA萃取。方法如下:切取培養基上分離菌株的中菌絲，將菌絲移置離心管內，加入核酸萃取試劑進行研磨，混和後依照臺灣圓點奈米技術股份有限公司的說明書指引，利用核TANBead®Nucleic Acid Extraction Kit Fungal DNA Auto Plate/Auto Tube，再配合自動化核酸萃取機器(Smart LabAssist-32(64)的L-BNA-PK-AUTO Program)萃取DNA。萃取完成之DNA樣本以內轉錄區間ITS區域序列ITS5通用性引子對(5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al*., 1990)，進行聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)，PCR是利用Multigene Thermal Cycler(Labnet Internaitonal)進行，起始變性(denaturation)溫度爲94 ℃、時間30 s，黏合(annealing)溫度爲36 ℃、時間30 s，增幅溫度72 ℃、時間30 s，循環30週期；以混合2.5 μL DNA萃取樣本、12.5 μL 2xTaq Master Mix(基龍米克斯生物科技股份有限公司)、1 μM引子ITS5及8 μL ddH2O，配置總容量爲24 μL的PCR反應溶液。最後延展(extension)溫度爲72 ℃、時間5 min。經過PCR增幅後的DNA樣本，以含有1.4 % agarose、0.5 M Tris-acetate-EDTA(TAE)溶液的洋菜膠及5 μL/100 mL Healthview TM Nucleic acid stain，於100 V 電壓下進行電泳分析約25 min，電泳完成後，比較DNA ladder與所得的DNA樣本，估算各樣本之長度（bp），並將樣本送到基龍米克斯生物科技股份有限公司進行定序。定序結果與美國生物技術資訊中心網站（NCBI）之GenBank資料庫登錄基因序列進行比對，再以核酸基因庫序列群組分析程式（BLAST）進行相似度比對。

III、結果

採集之3份檢體共進行75個小片段龍柏組織分離培養，僅有6個樣本組織分離出眞菌，將分離純化後疑似病原菌的菌落進行編號及照相(圖6)。將所分離出6個疑似病原菌菌株進行分子鑑定，將定序結果與NCBI GenBank資料庫內登錄的基因序列比對，以核酸基因庫序列群組分析程式（BLAST）作相似度比對。比對結果6株菌株分別*Alternaria alternata(GenBank accession*

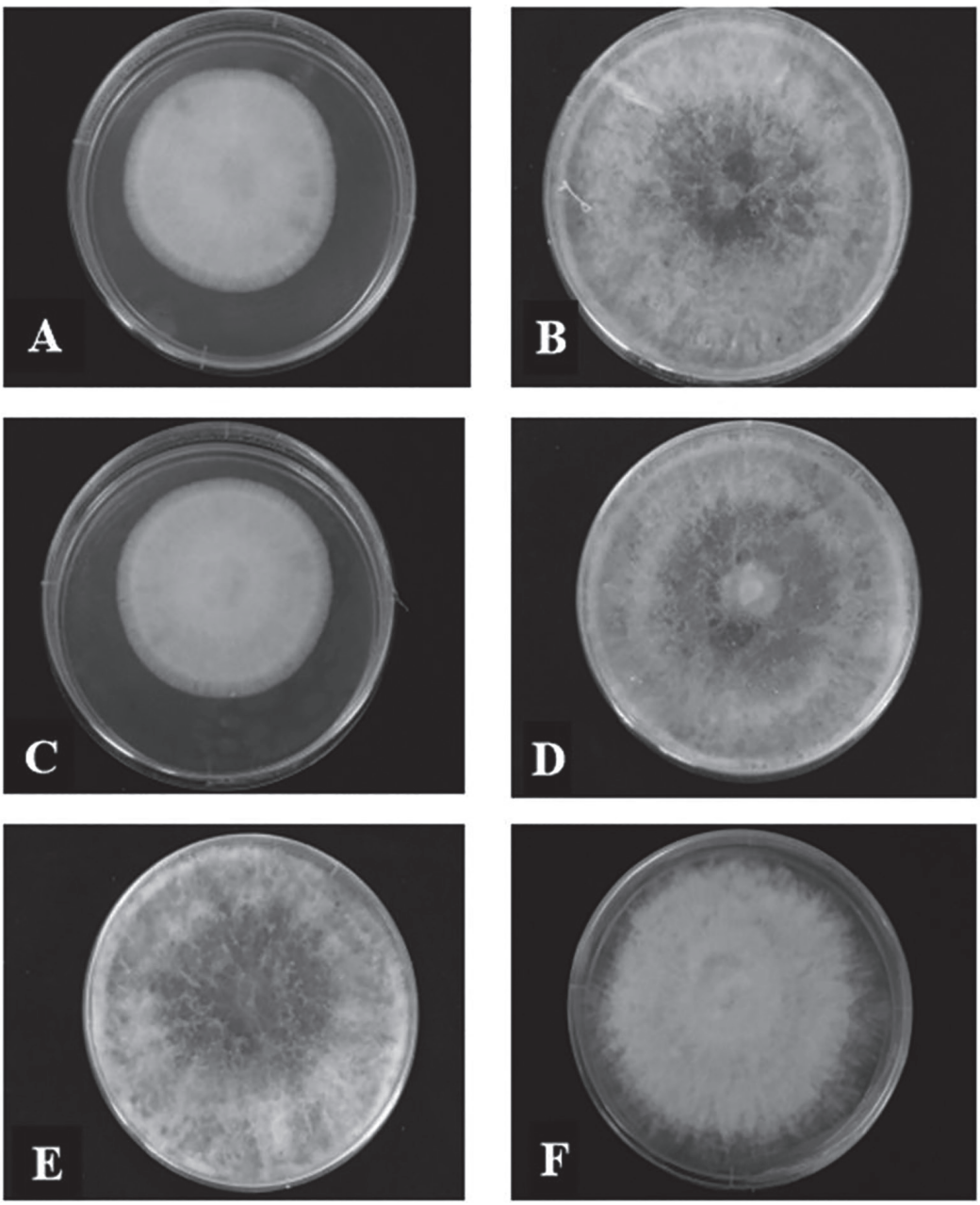

圖6 分離純化培養所得菌株菌落外形A.火災跡地東邊(NO.1 分離株). B.火災跡地西邊(NO.2 分離株) C.火災跡地西邊(NO.3 分離株) D.火災跡地西邊(NO.4 分離株) E.火災跡地中央部位(NO.5 分離株) F.火災跡地中央部位(NO.6 分離株)

Fig.6 Morphologies of fungal isolates from twigs of dragon juniper after a fire. A.East region of fire site (NO.1 isolate.)、B. West region of fire site (NO.2 isolate.)、C. West region of fire site (NO.3 isolate.)、D. West region of fire site (NO.4 isolate.)、E. Middle region of Fire site (NO.5 isolate.)、F. Middle region of Fire site (NO.6 isolate.)

number SUB11855809 HO_1OP132517) 、*Lasiodiplodia theobromae(GenBank accession number SUB11855809 HO_2OP132518)*、*Alternaria alternata (GenBank accession number SUB11855809 HO_3OP132519)*、*Alternaria longipes(GenBank accession number SUB11855809 HO_4OP132520)*、*Lasiodiplodia theobromae (GenBank accession number SUB11855809 HO_5OP132521)*及*Pseudopestalotiopsis sp. (GenBank accession number SUB11855809 HO_6OP132522)* (表1)，所分離培養出的菌株並無龍柏枝枯病的病原菌*P. cupressi*。

IV、討論

「臺灣植物病害名彙」中登載了龍柏及其他變種的兩種病害分別是銹病及枝枯病病(曾顯雄等，2019)。其中以*P. cupressi*引起的枝枯病最爲普遍常見。「臺灣常見樹木病害」一書中龍柏的重要病害在臺灣有褐根病、莖腐病及枝枯病三種爲主，病原菌分別爲*Phellinus noxius , Phellinus punctatus*及*P. cupressi*(張東柱等，1999)。褐根病、莖腐病兩者主要危害龍柏樹幹及根基部，但是在現場的檢查及取樣過程中並未發現有褐根病、莖腐病之發生。至於農場員工認爲在火災前龍柏就有枝枯病部分，雖然現場沒有觀察到龍柏枝枯病的病兆，但是基於農場管理人員爲植物病理科系畢業，受過相當的專業訓練，他的陳述應該有參考價值。所幸被火燒過的龍柏樹並未完全枯萎死亡，雖然樹冠明顯被火燒而呈現焦枯狀，但其樹幹、樹基部及樹枝開始有新的枝葉萌發。我們可以明顯看到火災對於龍柏的傷害是直接而明顯的，至於發生火災前是否有龍柏枝枯病之發生，我們只能假設火災沒有將樹木燒死其枝條上的組織仍能萌發新葉片，如果進行組織分離順利培養出龍柏枝枯病菌的話或許能夠說明火災前可能有龍柏枝枯病的發生。現場工作人員也能接受這樣的假設，於是我們透過採樣、分離培養及鑑定的方式來進行了解。

依管理人員所指定的區域及位置進行採樣，經分離培養並無龍柏枝枯病之病原。但是將分離出的菌株樣本進行核酸萃取。萃取完成之DNA樣本以內轉錄區

表1 分離菌株與NCBI資料庫比對結果

Table 1 Comparison of isolated strains and NCBI database

isolate	scientific name	sequence length (bp)	identities	Identities (%)	Gap	Gap (%)	best match geneBank Sequence ID
NO 1	*Alternaria alternata*	568	557/559	99	1/559	0	KP003824.1
NO 2	*Lasiodiplodia theobromae*	537	531/534	99	1/534	0	MF801620.1
NO 3	*Alternaria alternata*	569	562/563	99	0/563	0	KP003824.1
NO 4	*Alternaria longipes*	566	564/567	99	2/567	0	MH712187.1
NO 5	*Lasiodiplodia theobromae*	538	538/543	99	5/543	0	MT032387.1
NO 6	*Pseudopestalotiopsis* sp.	554	543/546	99	0/546	0	MT322087.1

間ITS區域序列ITS 5通用性引子對，進行聚合酶鏈鎖反應。增幅後的DNA樣本進行定序。定序結果與NCBI GenBank資料庫內登錄的基因序列比對，發現所分離培養的眞菌是可以危害其他植物葉部及枝條的病原菌*Pseudopestalotiopsis* sp.、*L. theobromae*、*A. longipes*、*A. alternata*。但是這些經火燒後的龍柏組織上分離培養所得的眞菌在台灣並未被記錄可危害龍柏。至於*Pseudopestalotiopsis* sp. 這屬的眞菌在臺灣有引起茶輪斑病之紀錄（曾顯雄等, 2019），在中國亦曾有引起金花茶葉斑病之紀錄(Zhao *et al*., 2020)。A. longipes、A. alternata在臺灣有危害香蕉及菸草的葉片的紀錄(曾顯雄等，2019)。*A. alternata* 在波蘭是引起苗圃柏樹 (*Juniperus horizontalis* 'Wiltonii') 枝葉變色及壞疽的主要病原菌 (Kurzawińska *et al* , 2018)；在中國同屬的眞菌 *Alternaria tenuis* Nees 可以同時引起龍柏及側柏(*Platycladus orientalis* (L.) Franco）的枯萎(Lei *et al*., 1996)。*L. theobromae* 在臺灣可以引起百香果的果腐病及其它多種果樹的病害，寄主範圍甚爲廣泛(黃巧雯等，2019)，在林木上則是側柏枝枯病之病原(張東柱等，1999)。但是*L. theobromae*是否會引起龍柏枝枯病則需進一步進行接種試驗完成柯霍氏法則(Koch's postulates)才能確認其病原性。同樣的情形，爲釐清其他所分離到的眞菌是否對龍柏具有病原性皆須完成柯霍氏法則加以驗證。

V、引用文獻

張東柱、謝煥儒、張瑞璋、傅春旭 (1999) 臺灣常見樹木病害。林業叢刊第98號。202頁。

黃巧雯、張詠婷、趙若茵、黃晉興 (2019) 由*Lasiodiplodia theobromae*引起的百香果果腐病。黃臺灣農業研究68(4):333-340。

曾顯雄、曾國欽、張清安、蔡東纂、嚴新富 (2019) 植物病害名彙(修訂第五版)。中華民國植物病理學會出版。臺灣臺中。329頁。

傅春旭、張東柱、李鎧彤、莊鈴木、黃勁暉 (2016) 以ITS分子序列診斷樹木靈芝病害。中華林學季刊49(3):201-209。

劉棠瑞 (1960) 臺灣木本植物圖鑑(上卷)。國立臺灣大學農學院。702頁。

Hung, T. H., M. L. Wu and H. J. Su (1999) Development of a rapid method for the diagnosis of *Citrus* greening disease using the polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology 147: 599-607.

Kurzawi?ska, H., M., S. Mazur, and D. Tekielska (2018) *Alternaria alternata* - The main causal agent of disease symptoms in juniper, rose, yew and highbush blueberry in nurseries in southern Poland. Folia Horticulturae 30(1):15-25.

Lei, Z.P., C. Sheng and Y.Y. Sheng (1996) Study on red blight of old juniper caused by *Alternaria tenuis* Nees. Scientia Silvae Sinicae 32(1):44-49.

Zhao, J., D. P. Zhang, T. Liu, W. C. Liu, L. Q. Pan, N. Y. Liao and D. W. Liu (2020) First report of *Pseudopestalotiopsis* and *Neopestalotiopsis* species causing leaf spot of *Camellia chrysantha* in China. Plant Note: Published Online:28 Sep 2020https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0598-PDN.