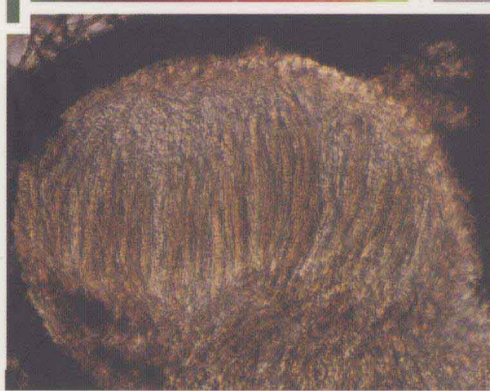
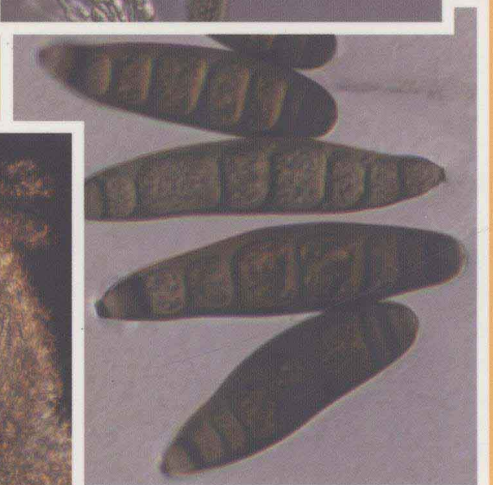
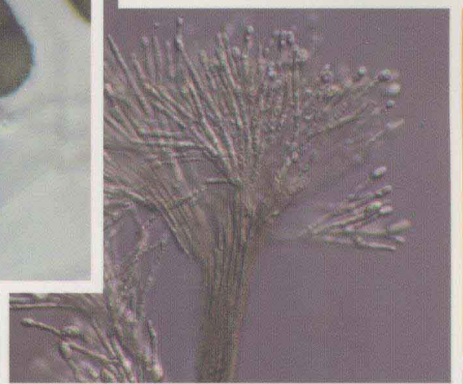
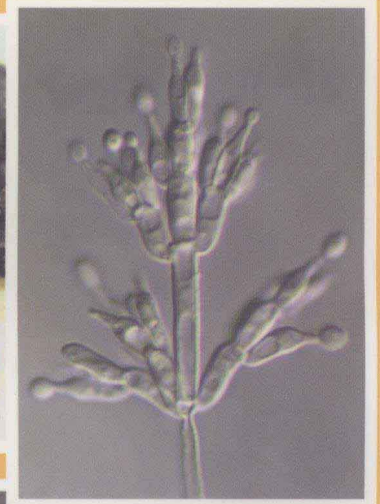


進口植物或其產品 潛在真菌病原之鑑定專誌(II)

曾顯雄、黃子蕨



行政院農業委員會動植物防疫檢疫局
國立台灣大學植物病理與微生物學系
98年6月

國家圖書館出版品預行編目資料

進口植物或其產品潛在真菌病原之鑑定專誌(II) /

曾顯雄等著

—〔台北市〕：農委會動植物防疫檢疫局，

2009〔民98〕面：21×29.7公分

ISBN 978-986-01-8867-7(平裝)

1. 動植物—真菌

2. 動植物—診斷鑑定

433.4

98010666

＝進口植物或其產品潛在真菌病原之鑑定專誌（II）＝

出版：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

國立台灣大學植物病理與微生物學系

發行：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

策劃：洪玉泉、高銘釜、廖永剛、吳欣怡

主編：曾顯雄、黃子葳

電話：(02)2343-4233

傳真：(02)2343-1400

承印者：秀威資訊科技股份有限公司

出版日期：中華民國98年6月

售價：300元 |

展售書局：

國家書店松江門市 台北市松江路209號1樓 02-2518-0270

網路書店 <http://www.govbooks.com.tw> 02-2659-8074

五南文化廣場 台中市中山路6號 04-2226-0330

ISBN：978-986-01-8867-7

GPN：1009801508

防檢局出版品編號：11009805014

著作財產權人：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

本書保留所有權利，欲利用本書全部或部分內容者，須徵求著作財產權人同意或書面授權。

進口植物或其產品 潛在真菌病原之鑑定專誌(II)

曾顯雄、黃子葳

序

我國於加入世界貿易組織之後，由於國際間貿易頻繁，農產品進口種類及數量均急劇增加，連帶使農產品中夾藏有害生物入侵之風險亦日益提高，因此，如何強化進口農產品有害生物檢測與診斷鑑定效率，建立嚴密的進口檢疫及國內防疫線，實成為本局當前施政上之重要課題。

在有害生物種類中，植物病原菌由於個體微小，不易以肉眼辨識鑑定，且具有潛伏感染特性，因此隨植物及其產品之運輸而入侵蔓延之風險極高。為防杜其入侵，必須公告其疫區，禁止或限制相關產品之輸入，並於機場港口加強檢疫，以及時攔阻，或於國內進行嚴密之防疫偵測調查，以便在一旦發現其入侵時即迅速予以撲滅。本局自民國90年起，委請國立台灣大學曾顯雄教授協助定期針對輸入植物及其產品進行真菌性病原之檢測與分離鑑定工作，並以繁殖材料如種子、種球為主要檢測對象，除完成所有檢測分離到之真菌之外，亦利用分子鑑定技術聚合酵素鏈鎖反應進行病原菌種之雙重確認。

本書收錄自輸入植物及其產品中所分離鑑定出之52屬101種真菌，內容包括分類鑑定資料與圖片，分類鑑定之檢索表，俾供檢疫人員進行初步鑑定之用，並可供國內相關研究人員參考應用。相信本圖鑑之出版，可增進植物防疫檢疫人員專業素養及檢疫效能，以加強防杜境外危險性疫病入侵確保我國農業生產安全及維護國人健康。

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 局長

許天來 謹誌

中華民國98年6月

目次

序	003
中文摘要	007
前言	009
材料與方法	011
結果	017
進口作物潛在植物病原真菌之分離鑑定	018
進口農作物分離鑑定出之台灣未曾記載之真菌	022
進口作物之潛在植物真菌病原屬之形態構造特徵	024
進口作物之潛在植物真菌病原屬之檢索表	040
進口作物之潛在植物真菌病原種之檢索表	043
進口作物之潛在植物真菌病原種之形態構造特徵解析	047
討論	151
英文摘要	155
參考文獻	157
名詞解釋	161
誌謝	165
索引	167

摘要

進口植物或其產品潛在真菌病原之鑑定專誌(II)

曾顯雄、黃子葳

國立台灣大學植物病理暨微生物學系

我國在2002年加入WTO後，自世界各國進口之農作物產品急遽增加，重要真菌病原依附此等作物意外入侵之風險也增加。為防杜此等病原入侵，檢疫為重要之措施。自2003年起，即定期陸續由世界數十國所進口之作物，隨機取樣2181種檢體，應用單孢、單菌絲分離法，分離鑑定期附著之真菌，當遭遇鑑定疑難之菌種時，也萃取其核酸，應用廣泛性引子對，以聚合酵素鏈鎖反應（PCR）加以增幅重複性基因序列，定序並上傳NCBI（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）基因資料庫進行線上比對分析。目前業已鑑定出隸屬於結核菌綱（Zygomycetes）、子囊菌綱（Ascomycetes）和絲孢綱（Hyphomycetes）之52屬、101個種，其中24種為寄生，26種為兼寄生，51種為腐生，並且共19種真菌為台灣以前未曾紀錄之新紀錄種，並包括有11種未曾被報導之植物病原，以及兩種*Dendryphiella*與*Penicillium*之疑似新種。此外並解析描寫此等真菌之形態特徵，照相、繪圖、並提供檢索表，撰寫專誌，以供國內外防檢疫單位之參酌。

關鍵字：進口農作物、病原真菌、分離、鑑定、保存

前言

我國自91年1月加入世界貿易組織（WTO）後，各國進口作物的比例逐年增加，至95年七月為止，農耕產品進口量為10,619,926噸，而至97年四月為止，農耕產品進口量達12,567,155噸（行政院農委會）。進口作物所佔的比例逐年攀升，而隨著大量輸入之農產品，亦有大量的微生物夾帶進關，其中包括病原細菌、真菌甚至寄生性線蟲等。此等病原微生物意外入侵偶而可能釀成疫情，故進口農作物的防檢疫研究，對於保育我國本土農林業，是有其重要性與必要性。

以往對於造成農作物病害的病原細菌、真菌或寄生性線蟲等，多採取傳統方式，將其分離培養出單一菌株、蟲系，進行光學顯微鏡鏡檢，觀察其形態構造特徵，比對較具權威性之專誌、論文與相關書籍，並鑑定出其學名（Booth, 1971；Ho et al, 1999；Ellis, 1971,1976；Raper and Fennell, 1965；Subramanian, 1971）。但縱使單一菌種在不同的培養環境下，其巨觀及微觀形態構造亦些許差異，所判定之結果多有觀察者之主觀見解、判斷，若非有較豐富經驗，其鑑定結果歧異難免；且各菌種培養至產孢其特徵構造的時間亦長短不一，甚至有些種類難以產孢，此外縱使易於產孢，多數屬之種間，差異甚微，其鑑定常需經驗及實務訓練之累積。

近年來，由於分子生物學迅速的進展，如各種分子標記、基因核酸序列之相同相異度之分析，對於菌種之鑑定有極大之助益，亦可提供較客觀之鑑定輔助依據。此種方法係利用不同菌株中，部分基因序列有其獨特性，抽取其DNA，以廣泛性或專一性引子對進行聚合酵素鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）（Innis et al, 1990；White, 1993；Pařenicová et al, 2001；Williams et al, 2001；Leach et al, 2005）加以增幅此特定序列，並加以定序，之後上傳比對基因資料庫，如NCBI之GenBank，對其菌種學名屬性，有初步之概念和認知。此種方式只須少量的檢體，不僅快速且準確性高，且有分子生物學基礎之人員即可操作，但此種方式無法正確鑑定出菌種之亞種、變種或生理小種。但

是部分屬種其可供鑑定之分子序列極為相似，或極少數寄存基因之序列的物種學名有誤，此皆會造成鑑定誤判或疑惑。比較兩種方法顯然皆有其優缺點，但若綜合應用則可收到相輔相成，事倍功半之效，即應用分子鑑定快速篩選疑似病原真菌之屬，而至種間之鑑定則仍須以傳統巨觀與微觀形態構造特徵加以解析、驗證。

國內少有針對進口農林作物或其產品潛藏之真菌病原菌的相關研究。據以往之報告，有些種類擬隸屬植物之真菌病原，如*Alternaria*、*Cladosporium*、*Colletotrichum*、*Fusarium*、*Pestalotiopsis*、*Phoma*、*Verticillium*、*Ulocladium*等，對國內作物皆有造成病害之實例，如數年前國外輸入之洋蔥所夾帶之*Fusarium oxysporum*造成黃萎病即為其一；事實上，此等真菌也常由世界各國進口之農林作物或培養基質等被分離檢出。近年來，我國進出口農產品之種類與數量、來源亦有不同變動趨勢。進口之部分除美國、日本與澳洲等農業先進之國家，部份輸出國對於其出口農產品上病原之篩檢，尤其是種子，偶有消毒處理不夠周延或疏落，導致易於夾雜病原。目前農委會強力催化提昇我國農業轉型，多種新興農林園藝產品輸出至日本、美國等防檢疫較為嚴格之國家。為防杜此種病原之意外輸入及輸出，以及明瞭、評估對於進出口之農作物究竟會夾雜那些微生物，對於其種類、數量如何，可能引起生物安全性或風險評估等參酌，皆需預作防患。鑑諸上述，建立一套可信之篩選機制及標準作業防檢疫流程極需加速進行。在第一版之“進口植物或其產品潛在病原真菌之鑑定專誌”，出版後又已經歷兩年，持續之研究工作已累積不少分離鑑定進口農林作物及其產品上之真菌，故提供更新之資訊，亦有其合理性和迫切性。故此次研究成果、撰寫、增訂、修正，刊印第二版之“進口植物或其產品潛在病原真菌之鑑定專誌”，提供檢索、鑑定方法及相關資訊，以供第一線之防檢疫人員酌參，其冀對於防檢疫之把關有所助益。

材料與方法

樣品之取得及保存

由防檢局基隆分局取得由歐美、東亞、東南亞各國進口之種子、種球、蔬菜、水果等農作物。取得樣品後即進行可能潛藏之病原真菌之分離，或暫時保存於4°C之冷凍櫃以避免因腐爛而影響後續之分離、鑑定工作。

真菌之分離流程

單菌絲分離法。隨機將每一種類樣品之組織以無菌之鋒利刀片切割為適當之大小，置於2%之水瓊脂培養基（water agar, WA）上，置於室溫進行培養24–48小時之後，再切取由樣品上生長延伸出之真菌單菌絲，移植於馬鈴薯–葡萄糖培養基之斜面試管（potato dextrose agar slant, PDA），並於室溫中培養保存。

單孢子分離法。將樣品之組織（如果皮或種子）表面沾黏之真菌孢子轉印於3%之水瓊脂培養基平板上，於實體解剖顯微鏡下，以玻璃微針掃動孢子，藉此將黏附於孢子上之細菌或其他雜質去除，待掃動擬分離之真菌孢子至一適當之距離後，以無菌鋒利之刀片切割成含單孢之單一洋菜方格，再行移植於馬鈴薯——葡萄糖培養基（PDA）斜面試管以獲取純粹之菌株。

真菌之鑑定

光學顯微鏡鏡檢。先將菌種自保存之試管接種至玉米培養基（corn meal agar, CMA）或1/4PDA平板培養基；針對難以產孢之菌株，則以馬鈴薯–紅蘿蔔培養基（potato–carrot agar, PCA）或MLA（modified Leonian's agar）（表一）加以培養。待產孢後，製成玻片，於光學顯微鏡下鏡檢，記錄其各部之特徵，如無性世代產孢方式、產孢細胞（conidiogenesis cell）特徵、孢子形態、顏色、紋路、飾物、大小或有性世代之產孢構造以及有性孢子之特徵，並以繪圖管描繪形態構造，顯微攝影記錄存檔。參酌相關之論文，專誌或檢索表，先進行鑑定至屬之層次，再由其特徵進一步鑑定至種之層次（Booth, 1971；de Hoog, 1985.；Ellis, 1971,1976；Ho et al, 1999；Pitt, 1985.；Raper and Fennell, 1965；Subramanian, 1971；Gams, 1971.；Hanlin, 1990；Shoemaker, 1984.）。

分子標記核酸序列比對。針對難以用傳統光學顯微鏡觀察方式鑑定之特定菌種，則輔以核酸序列比對之方式加以鑑定。將菌種接種至PDA，培養數天後，刮取適量之菌絲，以CTAB方式抽取DNA

(表二)，以ITS-4及ITS-5引子對(表三)加以增幅(表四、表五)，並將增幅之DNA產物定序。將所得到之DNA序列上傳至NCBI GenBank database網站作線上DNA序列比對(BLASTn)，以鑑定或複核該菌種之屬與種(Innis et al, 1990；Website NCBI：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。

生理特徵。針對部分真菌屬，其種之成員數目繁多，若僅依形態構造特徵作為分類依據，有時對近似種則難以加以區分，此時則需借助生理性狀特徵，如菌落特徵，對營養成分或生長溫度之不同需求或反應，作為輔助鑑別依據，如：*Aspergillus*、*Penicillium*等屬之不同種時，常應用不同的培養基質、不同的生長溫度、菌落形態、色素、液滴之分泌等特徵作為輔助鑑定之標準，並拍照紀錄存證。*Aspergillus*以查氏瓊脂(Czapek agar, CZ)培養，*Penicillium*則以查氏酵母瓊脂(Czapek yeast agar, CYA)培養。其他菌株則以PDA與麥芽抽取物培養基(Malt extract agar, MEA)培養(Huang and Sun, 1997；Pitt, 1985；Tzean et al, 1991)。並需於培養基中可添加適宜濃度的抗生素，如100ppm之Chloramphenicol(氯絲菌素)或Streptomycin sulfate(鏈黴素)，以抑制細菌之生長和污染。

表一、分離鑑定培養真菌之不同種類之培養基組成成分

WA(2%)		Czapek concentrate*	
Agar	20 g	NaNO ₃	30 g
Dist. water	1 lit.	KCl	5 g
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	5 g
PDA		FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
Potato dextrose agar powder		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
	39 g	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.05 g
Dist. water	1 lit.	Dist. water	100 ml
MEA		CZ	
Malt Extract	20 g	K ₂ HPO ₄	1 g
Yeast Extract	20 g	Czapek concentrate	10 ml
Dextrose	20 g	Surcose	30 g
Peptone	1 g	Agar	15 g
Agar	15 g	Dist. water	1 lit.
Dist. water	1 lit.		
CYA		MLA	
K ₂ HPO ₄	1 g	Maltose	6.25 g
Czapek concentrate	10 ml	Malt extract	6.25 g
Surcose	30 g	Yeast extract	1 g

Agar	15 g	K ₂ HPO ₄	1.25 g
Dist. water	1 liter.	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.625 g
		Agar	20 g
		Dist. water	1 lit
PCA**			
Potato	50 g		
Carrot	50 g	Antibiotics***	
Agar	15 g	Chloramphenicol	100 ppm
Dist. water	1 lit.	Streptomycin sulfate	100 ppm

* : Czapek concentrate配製後，因離子間作用會形成FeSO₄沉澱，而並不會完全溶解，使用前需加熱並攪拌均勻，使其回溶，以避免離子濃度不一。

** : PCA製備方法：先將馬鈴薯與胡蘿蔔切成小塊，以一次水煮沸約十分鐘後，將其過濾，取濾液加入瓊脂，再以滅菌釜滅菌。

*** : Chloramphenicol需先溶解於99%酒精中，再加於培養基中滅菌。而Streptomycin sulfate則需先溶解於水中，以無菌之0.45µm Millipore membrane過濾，且不可加熱，於培養基溫度低於65°C再行添加。

檢索表之撰寫。依據所分離真菌，比較分析其有性或無性產孢構造之形態特徵，撰寫屬、種之二維或多維式檢索表（第40頁），以方便檢索。

DNA序列萃取液配方及萃取流程

一般採用CTAB buffer萃取不同真菌之核酸，其成分組成如表（二）所示。萃取核酸流程以及聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR），詳見下敘步驟。

核酸（DNA）萃取流程

1. 刮取約0.1 g菌絲置入ependorff中，加入500 µl預熱至65°C之CTAB buffer，使用組織研磨棒將菌絲磨碎。
2. 加入3 µl 2-Mercaptoethanol，混合均勻，置於65°C下10–20分鐘。
3. 加入500 µl CI（Chloroform/isoamyl alcohol = 24:1），並溫和上下旋轉混勻後，以13200 rpm離心2分鐘。
4. 小心抽取上清液，約450–500 µl，移至新的ependorff中，加入0.6倍上清液體積的2-isopropanol，輕微上下旋轉混勻，使DNA沉澱，再以13200 rpm離心2分鐘，小心去除上清液。
5. 加入500 µl wash buffer，輕輕搖晃後放置2分鐘，再以13200 rpm離心2分鐘，去除上清液，將殘留液體低速減壓抽乾。
6. 加入200 µl ddH₂O回溶DNA備用。

表二、CTAB-MINI DNA Extraction Buffer

CTAB Buffer	
2% CTAB	10 ml (10% stock)
1.4 M NaCl	28 ml (5 M)
20 mM EDTA	4 ml (0.5 M)
100 mM Tris (pH8)	10 ml (1 M)
2% PVP-40	37 ml (5.4%)
or PVP-40 solid	2 g
Water	100 ml
Wash Buffer	
76% EtOH	76 ml
10 mM ammonium acetate	1 ml (1M)
ddH ₂ O	23 ml

聚合酶之鏈鎖反應流程、引子對、試劑，以及條件設定

表三、廣泛性引子對ITS-4、ITS-5之序列

ITS-4	5' TCCTCCgCTTATTgATATgC 3' (20mers)
ITS-5	5' ggAAgTAAAgTCgTAACAAgg 3' (22mers)

表四、PCR試劑

試劑	體積	濃度
Sterile deionized water	12.7 ml	
10X Taq buffer	2 ml	
10 mM dNTP	1 ml	10 mM / μ l
Primer I (ITS-4)	1 ml	10 mM / μ l
Primer II (ITS-5)	1 ml	10 mM / μ l
Taq DNA polymerase	0.3 μ l	2 Unit / μ l
DNA template	2 μ l	
總體積	20 ml	

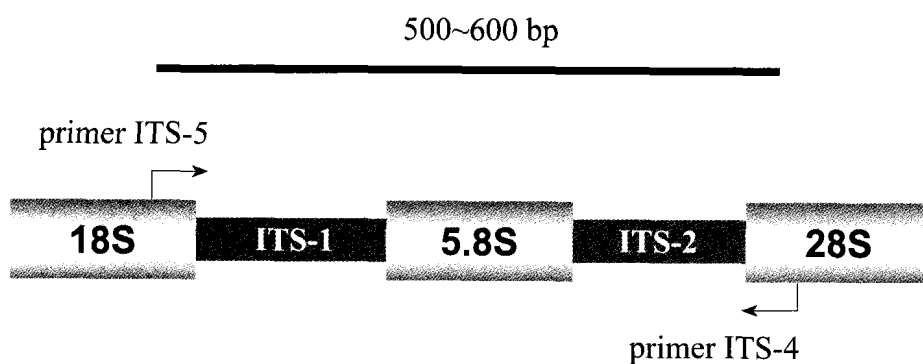
表五、PCR增幅核酸流程

步驟	溫度(°C)	反應時間
1. Initial Denaturation	95	1 minute
2. Denaturation*	95	10 sec
3. Primer Annealing	52~55**	10 sec
4. Extension	72	10 sec
5. Final extension	72	2 minutes
6. Storage	4	

*：重複步驟2~4共30~33次，最後保存於4°C，以避免DNA分解。

**：Annealing溫度依照引子對不同而異。使用ITS-4與ITS-5之最適溫度，可依電泳所得之結果於52~55°C之間調整，若電泳的雜訊過多，則應提高Annealing溫度。

Primer ITS-4 and ITS-5



聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 所增幅之rDNA ITS-1-5.8S-ITS-2重複序列片段，以及所用之廣泛性引子對 (ITS-4、ITS-5) 之示意圖。