

# 生物防治菌-無病原性尖镰胞菌於田間防治胡瓜萎凋病之效果評估<sup>1</sup>

王照仁<sup>2</sup>、沈原民<sup>2</sup>、鍾文鑫<sup>3</sup>、林益昇<sup>3</sup>

## 摘 要

臺灣產無病原性尖镰胞菌(nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, NPFo)Fo276、Fo95022、Fo95024 及 Fo95026 菌株已被證實，於溫室條件下具有延緩胡瓜萎凋病病勢發展之能力，且 NPFo 配合剪胚軸法導入植株後可表現更佳的防治效果。本研究為縮短剪胚軸胡瓜苗再次發根所需之時間與強化根系的發展，證實胡瓜苗沾取濃度為 50 ppm 植物生長素-吲哚丁酸(Indole-butyric acid, IBA)，與對照組相比可顯著提升發根效果。本研究利用育苗澆菌法與配合發根素之剪胚軸法將 NPFo 菌株導入植株內，於田間條件下評估防治胡瓜萎凋病之效果。2010 年於高雄市路竹區進行田間防治觀察試驗，結果顯示以育苗澆菌法導入 NPFo 菌株 Fo276 與 Fo95026 的胡瓜植株，定植於田間 9 週後發病度分別達 65.1 與 70.3%，與對照組 62.3%發病度相近，而 Fo95024 菌株之發病度為 43.1%，明顯顯示其抑病效果。翌年於南投縣魚池鄉試驗田中，以剪胚軸法導入 NPFo 菌株至胡瓜內，定植於田間 8 週後顯示，處理 Fo276 菌株的植株發病度為 42.9%，與對照組 56.1%發病度無顯著差異；而接種 Fo95022、Fo95024、Fo95026 及混合菌株的發病度則介於 33.3-38.0%，明顯低於對照組之發病度。

**關鍵詞：**無病原性尖镰胞菌、田間生物防治、胡瓜萎凋病

## 前 言

胡瓜萎凋病(*Fusarium wilt of cucumber*)係由*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*所引起之重要病害<sup>(2, 20)</sup>，嚴重影響臺灣胡瓜的生產<sup>(7)</sup>。早年國外針對此類土壤傳播性病害，主要以燻蒸劑(如溴化甲烷)進行土壤消毒，降低土中的初次感染源。然由於該藥劑對環境衝擊極劇，而被限制使用<sup>(8)</sup>，也促使研究人員更積極發展對環境衝擊較小之替代方法，如生物防治<sup>(1, 8)</sup>。其中針對作物萎凋病所使用的生物防治菌-無病原性尖镰胞菌(nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, NPFo)，已被證實具有防治或延緩多種蔬菜與花卉作物萎凋病的能力，為一極具潛力的生物防治菌種<sup>(1, 4, 6, 8, 13, 15)</sup>。於臺灣，本土性具生物防治菌的NPFo也已被報導，並發現本土性NPFo菌株具有防治胡瓜萎凋病的潛力<sup>(19)</sup>。

<sup>1</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 1004 號。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

<sup>3</sup> 國立中興大學植物病理學系教授、榮譽教授。

目前各國皆致力於發展本土性的生物防治菌製劑，但仍以實驗室或是溫室的防治階段為主<sup>(3, 11)</sup>。利用微生物做為生物防治菌易受到外界環境的影響，包括生物因子如土壤中微生物的族群量、種類及生物活性，或非生物因子，如土壤濕度、溫度、結構、甚至是養分，都會改變植物與病原菌間的交互關係，進而影響生物防治菌的防治效果，而這亦是生物防治一直無法在田間穩定，且持續防治作物病害的原因<sup>(12, 16)</sup>。研究人員亦證實以剪胚軸法導入生物防治菌，可降低外界環境的影響，並維持生物防治菌株於植株內的族群量<sup>(9, 18)</sup>，Wang氏等人(2013)<sup>(19)</sup>亦發現本土性NPFo菌株導入植株後，可有效纏據於導管內並限制病原菌的擴展，顯示剪胚軸法導入NPFo確實能提供最佳的防治效果。因此本研究主要目的為測試本土性具生物防治能力之NPFo(包括Fo276、Fo95022、Fo95024及Fo95026等菌株)，配合育苗或剪胚軸法導入胡瓜植株，評估其於田間防治胡瓜萎凋病的成效。

## 材料與方法

### 一、供試菌株與培養條件

供試 NPFo 菌株，包括 Fo276、Fo95022、Fo95024 及 Fo95026，均來自 Wang 氏等人(2013)<sup>(19)</sup>所開發之 NPFo 專一性引子對 FIGS11/NPIGS-R 所篩選出的菌株，且經溫室試驗證實皆具防治胡瓜萎凋病能力。各供試菌株皆經單孢培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar, PDA)斜面培養基，每天給予 12 hr 光照(2 支日光燈管(FL40D, 旭光, 臺灣)，距離高度為 30 cm)與合適的溫度(24-28 °C)，以保持菌株穩定生長。各菌株另培養於 PDA 平板，5 天後切取其菌絲尖端(直徑約 0.5 cm)的菌絲塊，隨後置於含有砂土瓊脂培養基(含 1%的 water agar 與 10%的沙土)的螺旋試管(長 12 cm，直徑 1.5 cm)內，置於室溫(24-28°C)下進行保存。

### 二、發根素對剪胚軸胡瓜苗之影響

先前試驗中得知(Wang et al., 2013)，剪胚軸胡瓜苗於溫室環境下發根時間較長(需 7-10 天)。為解決此問題，本研究以植物生長素(indole-3-butyric acid, IBA)處理胡瓜植株，觀察對此處方法植株根系生長之影響。

(一)依上所述先以 1/2 MS(Murashige and Skoog medium, Sigma)將 IBA 調整為 0.1、0.5、1 及 5 ppm 的濃度後，直接澆灌至泥炭土內，使泥炭土吸取配製液至飽和，並以無菌水作為對照組。隨後將兩個品種(萬吉與秀綠，農友種苗)之剪胚軸胡瓜苗直接扦插於泥炭土中，並於扦插 3、5 及 7 天後剪開育苗盤，觀察胡瓜苗於泥炭土內發根情形與固著泥炭土之能力。每次觀察 28 株植株並登記其發根指數，筆者自訂標準並將發根指數定義為 0 級：根部無法固著於泥炭土上；1 級：根部可固著於泥炭土上，且根系可包覆 1/4 以下的泥炭土；2 級：根部能固著於泥炭土上，且根系可包覆 1/2 以下的泥炭土；3 級：根部能固著於泥炭土上，且根系可包覆 1/2 以上的泥炭土。

(二)將 IBA 調整為 1、10、50 及 100 ppm 的濃度，並添加 0.05%展著劑(tween 20)，於剪胚軸接種

的同時將植株下胚軸浸泡含有展著劑 tween 20 之 IBA 中，藉此將 IBA 均勻附著於下胚軸表面，再扦插於含水飽和之泥炭土中，於處理 7 天後取出泥炭土塊，觀察胡瓜苗於泥炭土內發根情形與固著泥炭土之能力。每處理共 18 株，並登記其發根指數。

### 三、無病原性尖鏽胞菌於田間防治試驗之施用方法

#### (一)育苗介質澆菌接種法

將供試胡瓜(萬吉)作物種子以流水催芽 12 hr 後(胚根長出)，將其播植於盛有混合泥炭土(peat moss; TKS2, Floragard Product, Germany)和珍珠石(perlite)(3:1, v/v)的穴盤(50 或 60 格，每格直徑 5 cm，深 5 cm)中育苗，待幼苗子葉完全展開後供接種使用。將培養於 PDA 斜面 2-3 週的供試菌株，以無菌水洗下孢子並用雙層 Miracloth(475855 Calbiochem, Merk Darmstadt, Germany)過濾，配製成  $10^6$  spores/ml 之孢子懸浮液，每格穴孔內加入 3 ml 之  $1 \times 10^6$  spores/ml 的 NPFO 菌株孢子懸浮液後，即完成接種，待植株 1-2 片真葉展開後即可供後續實驗用。

#### (二)剪胚軸接種法

將前述生長 7-10 天且未經接種的健康胡瓜(萬吉)苗，以消毒利刃自植株下胚軸處(地基部)切下，並浸泡於 100 ml 含有  $10^6$  spores/ml 的供試 NPFO 菌株孢子懸浮液中 20-30 min 後，將下胚軸迅速浸漬於濃度為 50 ppm 的 IBA 液體後，立即插入已吸水飽和之泥炭土中，於溫室(25-35°C)內保濕 5-7 天，待植株發根且正常生長後即完成接種。

### 四、評估無病原性尖鏽胞菌於田間防治胡瓜萎凋病之效果

#### (一)高雄市路竹區田間試驗

2009 年 12 月至翌年 2 月在高雄市路竹地區進行，篩選之 NPFO 菌株 Fo276、Fo95024 及 Fo95026 之田間試驗。本試驗田為一塑膠網室，面積約 290 m<sup>2</sup>(約 0.3 分地)，前期作物為胡瓜，且有胡瓜萎凋病發病史。試驗田整地成 4 畦(畦寬 1.2 m、畦溝寬 60 cm、畦長約 30 m)，每畦前後各以 5 株植株作為保護行。胡瓜(秀綠)以育苗澆菌法於溫室(18-28°C)分別接種 NPFO 菌株 Fo276、Fo95024 及 Fo95026 等三種處理，未添加 NPFO 菌株的植株作為對照組，每處理共 190 株，待接種後 7-10 天則移植至試驗田中，每畦統一栽植一種處理組，第一畦至第四畦依序為 Fo276、Fo95024、Fo95026 及對照組。

#### (二)南投縣魚池鄉田間試驗 I 和 II

試驗 I 與試驗 II 皆於 2011 年 6 月至 8 月在南投縣魚池鄉進行，試驗田 I 與試驗田 II 面積皆約 490 m<sup>2</sup>(約 0.5 分地)，曾栽種過胡瓜且有萎凋病發病史，試驗田 I 之胡瓜萎凋病發病率約為 60-70%，而試驗田 II 之胡瓜萎凋病發病率約在 30-40%(M. J. Huang, personal communication)。由於先前研究證實剪胚軸法接種 NPFO 於溫室試驗具有較優之防治效果，因此將剪胚軸接種 NPFO 菌株的胡瓜植株種植於試驗田 I 處，而育苗法接種 NPFO 菌株的植株則種植於試驗田 II 處，並評估供試 NPFO 菌株 Fo276、Fo95022、Fo95024 及 Fo95026 等，於田間防治胡瓜萎凋病之效果。

1. 試驗田 I 整地為 8 畦，每畦長約 30 m，並將其劃分為 3 個區集，第一畦與第八畦為保護行，而第二至第七畦前後各有 3 株植株作為保護行。參照前述剪胚軸法將 NPFo 菌株包括 Fo276、Fo95022、Fo95024、Fo95026 及複合(Fo276、Fo95022、Fo95024 及 Fo95026)菌株等五種配製完畢之  $10^6$  spores/ml 孢子懸浮液導入胡瓜(秀綠)苗內，未接種 NPFo(接種無菌水)的植株則為對照組，共六種處理。將接種完畢之剪胚軸胡瓜苗置於溫室(25-35°C)等待發根，每處理 3 重複，每重複 20 株共 60 株，待胡瓜苗發根後移植至試驗田中，並將上述六種處理組，以逢機排列種植於第二畦至第七畦中所劃分的 3 個區集內。
2. 試驗田 II 整地為 4 畦，每畦左右側可各種植一排植株共八排，每排長約 30 m，並將其劃分為 3 個區集，將第一排與第八排為保護行，而第二至第七排前後各留 3 株植株作為保護行。參照前述育苗法將 NPFo 菌株包括 Fo276、Fo95022、Fo95024、Fo95026 及複合(Fo276、Fo95022、Fo95024 及 Fo95026)菌株等五種配製完畢之  $10^6$  spores/ml 孢子懸浮液導入胡瓜(秀綠)苗內，未接種 NPFo(接種無菌水)的植株則為對照組，共六種處理，每處理 3 重複，每重複 20 株共 60 株，待胡瓜苗第一片真葉展開後便移植至試驗田中，並將上述六種處理組，以逢機排列種植於第二至第七排中所劃分的 3 個區集內。

### (三)病害調查

胡瓜植株定植後，每週調查胡瓜萎凋病發生的情形，若無法自地上部病徵判斷，則利用刀片些微削取莖基部，觀察維管束是否褐化，並隨機選取罹病級數 3 級以上的植株帶回實驗室，以組織分離法確認是否為萎凋病。胡瓜發病分級如下，0 級：無任何病徵；1 級：胡瓜出現矮化、第一片子葉黃化及維管束出現褐化；2 級：胡瓜半數葉片以下出現萎凋黃化的情形；3 級：胡瓜半數葉片以上出現萎凋黃化的情形；4 級：植株全株乾枯死亡。按照下列公式換算植株的發病度 (Disease severity)：

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{\text{Sum (class frequency x score of rating class)}}{(\text{total number of plants}) \times (\text{maximal disease index})} \times 100$$

## 五、統計分析

本研究所有數據皆以 SPSS 10.0 for Windows® (LEAD Technologies, Inc., Charlotte, NC, USA)軟體進行變異數分析(Analysis of variance, ANOVA)。並以 LSD 測驗與鄧肯氏檢定法(Duncan post-hoc test)於機率度(probability level)為 0.05 的標準下檢測本實驗之各處理組差異。

## 結果與討論

### 一、發根素對剪胚軸胡瓜苗之影響

- (一)將不同濃度的 IBA 發根液直接添加至泥炭土中，觀察對剪胚軸胡瓜發根之影響，結果顯示添加不同濃度發根液 3 天後，對所扦插之萬吉與秀綠品種的剪胚軸苗無顯著影響，皆完全無法

固著泥炭土塊；而添加發根液 5 天後之剪胚軸苗的根系皆已包覆泥炭土塊約 25%體積，然固著泥炭土的能力仍不足。扦插第 7 天，萬吉與秀綠的胡瓜苗植株根系已可包覆近 50%體積的泥炭土塊，且皆具有固著泥炭土之能力，然不同 IBA 處理濃度與不同胡瓜品種間的發根效果無顯著差異(表一)。

表一、不同濃度生長素 IBA 添加至泥炭土內對剪胚軸胡瓜苗發根指數之影響

Table 1. Effect of different auxin (IBA) concentrations on rooting index of cucumber seedlings with hypocotyl cutting treatment<sup>a</sup>

Cultivars	IBA(ppm)	Rooting index <sup>b</sup> after treatment		
		3	5	7
Vantage (萬吉)	0	0.8a <sup>c</sup>	1.9a	2.3a
	0.1	0.9a	1.9a	2.6a
	0.5	1.0a	2.2a	2.4a
	1	0.8a	1.8a	2.3a
	5	0.9a	1.7a	2.2a
Showy Green (秀綠)	0	0.9a	2.3b	2.5a
	0.1	0.9a	2.1ab	2.6a
	0.5	0.9a	1.9a	2.5a
	1	1.0a	1.9a	2.4a
	5	0.9a	2.3ab	2.9a

<sup>a</sup> The different concentrations of auxin (IBA) solutions were irrigated into peat moss with saturation. Each treatment have 28 seedlings.

<sup>b</sup> Rooting index assayed on a scale of 0-3: 0=roots could not anchor the plant body to the peat moss, 1=root could anchor the plant body to the peat moss, and the root cover was less than 25% area of peat moss, 2=root could anchor the plant body to the peat moss, and the root cover was less than 50% area of peat moss, 3=root could anchor the plant body to the peat moss, and the root cover was more than 50% area of peat moss.

<sup>c</sup> Values followed by the same letter in the column are not significantly different at p= 0.05, according to Duncan's Multiple Range Test.

(二)利用剪胚軸胡瓜苗沾取不同濃度之 IBA 液體，觀察對促進植株發根的效果，結果顯示當施用濃度 50 與 100 ppm 的 IBA 配合 tween 20 時，對剪胚軸苗具有最佳的發根效果與泥炭土固著能力，於處理 5 天後即可有效固著泥炭土塊，且根系已可包覆 25-50%體積的泥炭土塊，而對照組僅能包覆 25%體積的泥炭土塊(表二)。

表二、浸漬不同濃度生長素 IBA 對剪胚軸胡瓜苗發根指數之影響

Table 2. Effect of dipping different concentrations of auxin (IBA) on rooting index of cucumber seedlings with hypocotyl cutting treatment<sup>a</sup>

IBA concentration (ppm)	Rooting index <sup>b</sup>
0	1.63b <sup>c</sup>
0 with tween 20	1.63b
1 with tween 20	1.63b
10 with tween 20	1.56b
50 with tween 20	2.13a
100 with tween 20	2.38a

<sup>a</sup> The cucumber seedlings, treated with hypocotyl cutting, were dipped with different concentrations of auxin (IBA) solution and transplanted into peat moss with saturation immediately in greenhouse (25-35°C). Each treatment has 18 seedlings. The seedlings were collected and the rooting index was calculated at five days later.

<sup>b</sup> Rooting index assayed on a scale of 0-3: 0= roots could not anchor the plant body to the peat moss, 1= root could anchor the plant body to the peat moss, and the root cover was less than 25% area of peat moss, 2=root could anchor the plant body to the peat moss, and the root cover was less than 50% area of peat moss, 3=root could anchor the plant body to the peat moss, and the root cover was more than 50% area of peat moss. The disease scale was converted to disease severity and rounded off, as described in the Materials and Methods section.

<sup>c</sup> Values followed by the same letter in the column are not significantly different at  $p=0.05$ , according to Duncan's Multiple Range Test.

## 二、田間防治試驗

### (一) 高雄市路竹區田間觀察試驗

供試胡瓜苗初期生長良好，直至第 5 週接種 NPFo 菌株之胡瓜植株出現病徵，發病度介於 1.0-2.9%，而對照組發病度為 3.2%。第 6 週持續出現下位葉黃化或萎凋病徵之植株，而施用 NPFo 菌株之植株的發病度皆低於 6.0%，對照組發病度為 4.5%。植株移植於田間 7 週後，萎凋病病勢開始擴展，處理 NPFo 菌株的胡瓜植株之發病度介於 2.6 至 24.7%，對照組的發病度為 13.1%。持續觀察到 8 週後，處理 NPFo 之 Fo276 與 Fo95026 菌株的發病度分別達 50.9% 和 49.8%，而處理 Fo95024 菌株的胡瓜植株發病度則為 12.8%，對照組發病度為 38.8%。第 9 週的結果顯示，對照組、Fo276 及 Fo95026 菌株的植株發病度分別為 62.3、65.1 及 70.3%，無顯著差異，然處理 Fo95024 菌株植株之發病度為 43.1%，延緩胡瓜萎凋病效果顯著(表三)。

表三、2009 年於高雄市路竹區測試無病原性尖镰胞菌防治胡瓜萎凋病之田間結果

Table 3. Field experiment on the control of *Fusarium* wilt of cucumber by using nonpathogenic *Fusarium oxysporum* at Luzhu, Kaohsiung<sup>a</sup>

Treatment	Disease severity <sup>b</sup> after transplanting				
	5wk	6wk	7wk	8wk	9wk
Water (CK)	3.2	4.5	13.1	38.8b <sup>c</sup>	62.3a
Fo276	2.1	5.9	24.7	50.9a	65.1a
Fo95024	1.0	2.3	2.6	12.8c	43.1b
Fo95026	2.9	3.4	15.5	49.8a	70.3a

<sup>a</sup> Field experiment was conducted during Dec., 2009 -Feb., 2010 at Luzhu, and cucumber plants were inoculated with Fo276, Fo95024 and Fo95026 by using the substrate irrigation inoculation method.

<sup>b</sup> 190 plants of each treatment were assayed on a scale of 0-4 : 0=health, 1=cotyledon and first leaf with yellowing symptom, 2=stunting, or <1/2 leaves with yellowing symptom, 3=stem yellowing, vascular discoloration, and >1/2 leaves with wilt symptom, and 4=plant wilted and died. The disease scale was converted to disease severity and rounded off, as described in the Materials and Methods section.

<sup>c</sup> Values followed by the same letter in the column are not significantly different at  $p=0.05$  according to Duncan's Multiple Range Test.

## (二)南投縣魚池鄉試驗田 I 和 II

- 試驗田 I 以剪胚軸導入 NPFo 菌株的胡瓜植株，於定植田間 3 週後出現病徵，處理 NPFo 菌株的胡瓜植株發病度介於 0-2.9%間，對照組之發病度為 2.4%。持續觀察至 7 週後，處理 NPFo 菌株的胡瓜植株，發病度介於 11.5-20%，顯著低於對照組 37.7%。於第 8 週的結果顯示，處理 NPFo 之 Fo95022、Fo95024、Fo95026 及混合菌株的胡瓜植株其發病度介於 33.3 至 38%，顯著低於對照組與處理 Fo276 菌株之發病度 56.1 與 42.9%(表四)。
- 試驗田 II 以育苗法接種不同 NPFo 菌株之胡瓜植株，定植於田間 6 週後，僅少數植株零星出現葉片黃化之地上部病徵，發病度皆低於 1.6%。觀察至第 7 週後，處理 NPFo 菌株與對照組胡瓜植株之發病度仍僅介於 3.2-7.5%間。於第 8 週的結果顯示，處理 NPFo 菌株的胡瓜植株發病度介於 5.7-10.4%，與對照組發病度 6%無顯著差異(表五)。

表四、2011 年於南投縣魚池鄉測試無病原性尖镰胞菌防治胡瓜萎凋病之田間試驗 I

Table 4. Field experiment I on the biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber by using nonpathogenic *Fusarium oxysporum* at Yuchi, Nantou<sup>a</sup>

Treatment	Disease severity <sup>b</sup> after transplanting					
	3wk	4wk	5wk	6wk	7wk	8wk
Water (CK)	2.4	4.3	8.7	16.6	37.7a <sup>c</sup>	56.1a
Fo276	1.7	2.0	6.9	11.3	19.9b	42.9ab
Fo95022	0	0	2.9	4.7	11.5b	35.1b
Fo95024	2.9	3.9	7.0	11.5	20.0b	38.0b
Fo95026	0	0	2.1	5.1	13.7b	33.3b
combination <sup>d</sup>	1.4	6.0	8.5	16.2	15.7b	34.3b

<sup>a</sup> Field experiment was conducted during Jan. -Aug., 2011 at Yuchi. Cucumber plants were inoculated respectively with Fo276, Fo95022, Fo95024, Fo95026 and a combination of the four by using the hypocotyl cutting inoculation method.

<sup>b</sup> 120 plants of each of the hypocotyl cutting inoculation treatments were assayed on a scale of 0-4: 0=health, 1=cotyledon and first leaf with yellowing symptom, 2=Stunting, or <1/2 leaves with yellowing symptom, 3=stem yellowing and/or with vascular discoloration, and >1/2 leaves with wilt symptom, and 4=plant wilted and died. The disease scale was converted to disease severity and rounded off, as described in the Materials and Methods section.

<sup>c</sup> Values followed by the same letter in the column are not significantly different at p= 0.05 according to Duncan's Multiple Range Test.

<sup>d</sup> The combination treatment was prepared by combining the spore suspensions of 4 isolates, namely Fo276, Fo95022, Fo95024 and Fo95026, and inoculated into cucumber plants by the hypocotyl cutting method.

表五、2016 池鄉測試無病原性尖镰胞菌防治胡瓜萎凋病之田間試驗 II

Table 5. Field experiment II on the biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber by using nonpathogenic *Fusarium oxysporum* at Yuchi, Nantou<sup>a</sup>

Treatment	Disease severity <sup>b</sup> after transplanting			
	5wk	6wk	7wk	8wk
Water (CK)	0	1.3	4.5a <sup>c</sup>	6.0a
Fo276	0	1.4	6.2a	5.7a
Fo95022	0	1.6	5.8a	7.2a
Fo95024	0	1.4	3.2a	6.3a
Fo95026	0	1.2	7.5a	10.4a
combination <sup>d</sup>	0	1.1	5.2a	9.1a

<sup>a</sup> Field experiment was conducted during Jan. -Aug., 2011 at Yuchi, and cucumber plants were inoculated respectively with Fo276, Fo95022, Fo95024, Fo95026 and a combination of the four by using the substrate irrigation inoculation method.

<sup>b</sup> 120 plants of each treatment were assayed on a scale of 0-4 : 0=health, 1=cotyledon and first leaf with yellowing symptom, 2=stunting, or <1/2 leaves with yellowing symptom, 3=stem yellowing and/or with vascular discoloration, and >1/2 leaves with wilt symptom, and 4=plant wilted and died.

<sup>c</sup> Values followed by the same letter in the column are not significantly different at p= 0.05 according to Duncan's Multiple Range Test.

<sup>d</sup> The combination treatment was prepared by combining the spore suspensions of 4 isolates, namely Fo276, Fo95022, Fo95024 and Fo95026, and inoculated into cucumber plants by the substrate infestation method.



## 檢討與建議

NPFo 菌株已被證實具有防治作物萎凋病的能力<sup>(4, 6, 10, 13, 15)</sup>，然大多僅止於溫室防治試驗。筆者所篩選出的臺灣產 NPFo 菌株 Fo276、Fo95022、Fo95024 及 Fo95026，已證實於溫室條件下皆具有延緩胡瓜萎凋病能力<sup>(19)</sup>。進一步於田間測試對胡瓜萎凋病的防治效果，結果指出 Fo276 與 Fo95026 菌株以育苗法導入植株後，於第九週發病度分別為 65.1 和 70.3%，無延緩病勢發展的現象，然 Fo95024 菌株處理的植株則有延緩病勢發展的趨勢，於第九週發病度為 43.1%，低於對照組的 62.3%(表三)。此外，於田間防治試驗過程中，觀察到處理 NPFo 菌株 Fo276 之植株生長勢，有優於對照組或其他處理組的情形(unpublished data)。Van der Ent 氏等人(2009)<sup>(17)</sup>指出，可促進植物生長的微生物(plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF))，其部分作用機制具有提升植株本身光合作用的效率、增加植株對於環境逆境的耐受性或保護植株避免病原菌感染而增加植株之生長勢。雖目前針對 NPFo 菌株是否可促進植株生長並無相關研究報導，且本研究供試 NPFo 菌株 Fo276 於田間試驗後期，並無明顯降低病害發生的效果，因此是否還有其它因素導致其促進胡瓜植株生長，需進一步探討。

而筆者所篩選的 NPFo 菌株，雖於溫室皆表現出延緩病勢發展的能力，但於田間防治效果與溫室不同，且菌株間的防治效率也有所差異。推測可能是 NPFo 菌株於田間植株上的存活受到環境或其他土壤中微生物的干擾，使得該 NPFo 菌株無法維持有效的防治族群量，此現象普遍發生於利用生物防菌防治之田間狀態，為目前微生物防治作物病害急需克服的問題。前人研究指出，透過養分添加、施用方式、或配合其他防治策略等，可減少生物防治菌與環境中微生物相互競爭的機率，藉此維持生物防治菌之有效族群量與其活性<sup>(3, 12, 16)</sup>。因此，本研究進一步利用剪胚軸法導入 NPFo 菌株，盼能透過此方法提供 NPFo 菌株在植體內維持有效的防治濃度，且避免外界環境的影響，提供更優的防治效果<sup>(9, 18)</sup>。然田間防治試驗結果顯示，剪胚軸法導入 NPFo 菌株的植株，於田間發病度介於 33.3 至 42.9%，而對照組發病度達 56.1%，雖有延緩病勢發展的情形，但降低的幅度有限。此外，觀察剪胚軸胡瓜植株於田間的生長情形，得知剪胚軸處理之植株生長勢，普遍低於育苗澆菌處理的胡瓜植株。前人研究指出，植株的生長狀況會影響植株自身抗病能力的表現<sup>(5)</sup>，是否剪胚軸胡瓜植株因生長勢較差而造成防治效率上的差異，仍需進一步研究。

利用 Wang 氏等人(2013)<sup>(19)</sup>開發之 NPFo 專一性引子對所篩選出的菌株，在田間防治胡瓜萎凋病的效率不同，筆者認為所獲得的 NPFo 菌株係屬一特定族群而非單一個體，易導致各菌株間於防治效果有差異性。Alabouvette 氏等人(2009)<sup>(4)</sup>亦曾提及不同 NPFo 菌株間的防病效果有所差異，乃因其抗病作用機制不同所致，因此施用複合菌株會比施用單獨菌株的防病效果顯著。雖本研究亦嘗試於田間施用複合菌株，然防治效果並非最佳，推測原因為所測試菌株的作用機制分屬同一類群，因此於田間所表現的協力作用較不明顯。另最初所篩選的 NPFo 菌株 Fo276，於田間防治試驗顯示已喪失延緩病勢發展的能力。目前針對尖鏟胞菌產生變異之相關研究，皆僅針對病原菌於毒力或病原性

基因進行探討，並無提及 NPFo 菌株生物防治能力或活性的相關資料<sup>(14)</sup>。而 Fo276 菌株喪失防治能力是否與菌株變異有關，未來需進一步研究。

## 參考文獻

1. Abeysinghe, S. 2009. Use of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and rhizobacteria for suppression of Fusarium, root and stem rot of *Cucumis sativus* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 42: 73-82.
2. Ahn, I. P., H. S. Chung and Y. H. Lee. 1998. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Plant Dis. 82: 244-246.
3. Alabouvette, C., C. Olivain and C. Steinberg. 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. Eur. J. Plant Pathol. 114: 329-341.
4. Alabouvette, C., C. Olivain, Q. Migheli and C. Steinberg. 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. New Phytol. 184: 529-544.
5. Coakley, S. M., H. Scherm and S. Chakraborty. 1999. Climate change and plant disease management. Annu. Rev. Phytopathol. 37: 399-426.
6. Fravel, D., C. Olivain and C. Alabouvette. 2003. Research review: *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol. 157: 493-502.
7. Huang, M. J. and Y. S. Lin. 2006. Identification of the *Fusarium* wilt pathogen on cucumber in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14: 282. (abstract in Chinese)
8. Kaur, R., J. Kaur and R. S. Singh. 2010. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. Plant Pathol. J. 9: 79-91.
9. Kijima, T. 1992. Biological control of soil-borne disease with antagonistic bacteria. Proc. Kanto-Tosan Plant Prot. Soc. 39: 1-5.
10. Larkin, R. P. and D. R. Fravel. 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. Phytopathology 89: 1152-1161.
11. Li, L. H., J. C. Ma, Y. Li, Z. Y. Wang, T. T. Gao and Q. Wang. 2012. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. Crop Prot. 35: 29-35.
12. Meghvansi, M. K., L. Singh, R. B. Srivastava and A. Varma. 2011. Assessing the role of earthworms. Pages 173-189. In biocontrol of earthworm In: Karaca, A. (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 316 pp.

13. Ogawa, K. and H. Komada. 1985. Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato with cross-protection by prior inoculation with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Japan Agric. Res. Q.* 19: 20-25.
14. Recorbet, G., C. Steinberg, C. Olivain, V. Edel, S. Trouvelot, E. Dumas-Gaudot, S. Gianinazzi and C. Alabouvette. 2003. Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* 159: 73-92.
15. Sajeena, A., D. S. Nair and K. Sreepavan. 2020. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* as a biocontrol agent. *Indian Phytopathol.* 73: 177-183.
16. Shaukat, S. S. and I. A. Siddiqui. 2003. The influence of mineral and carbon sources on biological control of charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina* by fluorescent pseudomonads in tomato. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 392-398.
17. Van der Ent, S., S. C. M. Van Wees and C. M. J. Pieterse. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588.
18. Wang, C. J., W. H. Chung and Y. S. Lin. 2011. Methods for introduction of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* into cucumber plants for better control of *Fusarium* wilt disease in Taiwan. *Phytopathology* 101: S37.
19. Wang, C. J., Y. S. Lin, Y. H. Lin and W. H. Chung. 2013. Modified primers for the identification of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates that have biological control potential against *Fusarium* wilt of cucumber in Taiwan. *PLoS One* 8: e65093.
20. Wang, C. J., M. J. Huang, J. F. Chen, W. H. Chung and Y. S. Lin. 2019. Identification of the *Fusarium oxysporum formae speciales* of cucumber in Taiwan. *Bull. Taichung DARES* 143: 75-90.

# Evaluation of the Control Efficacy of the Biocontrol Agent-nonpathogenic *Fusarium oxysporum* on Fusarium Wilt of Cucumber in Field Condition<sup>1</sup>

Chao-Jen Wang<sup>2</sup>, Yuan-Min Shen<sup>2</sup>, Wen-Hsin Chung<sup>3</sup> and Yi-Sheng Lin<sup>3</sup>

## ABSTRACT

A previous study indicated that nonpathogenic *Fusarium oxysporum* (NPFo) isolates Fo276, Fo95022, Fo95024 and Fo95026 showed the ability in delaying the disease development on Fusarium wilt of cucumber in greenhouse bioassay tests. Moreover, the satisfactory biological control efficacy of NPFO was achieved when the isolates were introduced into cucumber plants by the hypocotyl cutting inoculation method. To increase the rooting efficacy of hypocotyl cutting seedlings, Indole-butyric acid (IBA) was used here. The results indicated that the hypocotyl cutting seedlings were showed the best rooting index after treating with 50 ppm of IBA. Furthermore, the biocontrol efficacy of NPFO isolates in controlling Fusarium wilt of cucumber was evaluated in field conditions by substrate irrigation and hypocotyl cutting inoculation methods. The preliminary test was conducted at Luzhu in 2010. The isolates Fo276, Fo95024 and Fo95026 were introduced into cucumber plants by substrate irrigation inoculation method. The result indicated that the disease severity rating (DSR) of NPFO isolates of Fo276 and Fo95026 provided after 9 weeks were 65.1 and 70.3%, which was similar to that of the control treatment (62.3%); whereas the DSR of the Fo95024 treatment was 43.1%, which was significantly lower than that of the control. In the following year, the NPFO isolates were introduced into cucumber plants by hypocotyl cutting inoculation method and then transplanted in the field at Yuchi for evaluating the biocontrol efficacy of Fusarium wilt. Eight weeks after the transplantation of seedlings into the field, disease severity was suppressed by the NPFO isolates Fo95022, Fo95024, Fo95026 and combination of isolates, with a DSR between 33.3 and 38.0%. However, the DSR of isolate Fo276 was 42.9%, which was not significantly different from that of the control (56.1%).

**Key words:** nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, biological control in field, Fusarium wilt of cucumber

---

<sup>1</sup> Contribution No.1004 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup> Assistant Researcher of Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA.

<sup>3</sup> Professor and Emeritus Professor of Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan.