



## 以分子檢測技術

# 輔助酪梨褐根病田間診斷之案例分享

文 / 圖 王誌偉

### 前言

臺東地區常見之果樹番荔枝、枇杷與酪梨等，皆有農友前來反應園區植株發生全株性衰弱或急性枯死等情形，經現場診斷後，常可判定為褐根病菌所造成。褐根病菌(*Phellinus noxius*)寄主紀錄超過200種，主要為害植物根部及樹幹基部，受害嚴重的樹木在地上部會出現全株黃化、萎凋、小葉化與樹冠葉片稀疏等徵狀，最後枯死。但一般根部病害或根部功能異常亦會造成樹木全株衰弱。因此田間診斷褐根病一般根據以下3項特有的病徵來判斷：1.受感染的樹皮內面及白色腐朽木材組織上鑲嵌不規則褐色網紋。2.樹幹基部及根部表面常出現帶

有白邊的黃、深褐至黑褐色菌絲面。3.染病樹木的樹幹基部有黃褐色到黑褐色的平伏子實體。但褐根病特有的病徵常因發病期程、寄主樹種和環境因素等造成其病徵表現不明顯而難以判斷。本文以酪梨褐根病之診斷鑑定案例，分享如何以分子檢測技術與病原菌分離試驗來輔助確定植株為褐根病菌感染。

### 酪梨全株性萎凋病害之診斷與褐根病鑑定過程

#### 一、田間病徵檢視與病根樣本採集

本案例為轄區太麻里鄉農友通報酪梨田區相繼出現植株全株衰弱枯死情形，前往現場勘查後發現，除1株已枯死約1個月的植株，鄰近

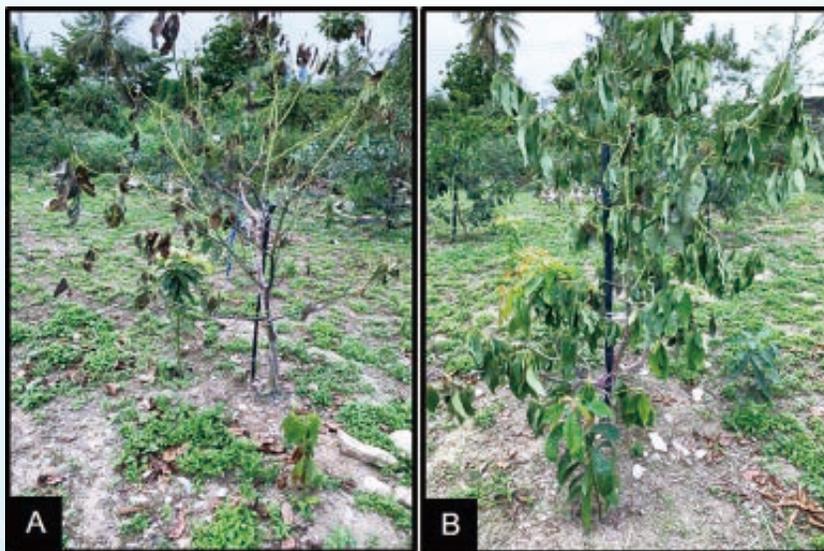


圖1. 酪梨田區相繼出現2週前開始發生(A)與3日前開始發生全株性葉片失水、樹勢衰弱萎凋之植株(B)。



分別有2週前與3日前開始出現全株葉片失水萎凋的植株(圖1A、B)。觀察萎凋植株葉片無明顯病斑、枝條與樹幹亦無明顯病斑或昆蟲危害，且葉片失水現象為全株性，非發生於局部性枝條。推測極有可能為根部病害傳播所造成，田區可能自發病較早的植株開始，傳播至鄰近植株並陸續造成全株性萎凋的相似病徵。檢視酪梨植株樹幹基部，無法觀察到褐色菌絲面纏據的褐根病典型病徵(圖2A)，挖起受害植株檢視根系後，發現主根與大多根系已褐化死亡(圖2B)，為了進一步確認是否為褐根病所感染，遂將根部病害樣本帶回實驗室進行進一步分析。

## 二、以褐根病專一性引子對進行分子檢測

切取不同部位的病害根部樣本(圖3A)，包括細根、主根樹皮、主根樹皮含土或主根樹皮含白色菌絲等部位進行DNA萃取，使用蔡等(2007)發表之褐根病專一性引子對PN-1F(5'-AGTTTGCCTCATCCATCTC-3')與PN-2R(5'-AGCCGACTTACGCCAGCAG-3')進行聚合酶連鎖反應(PCR)與瓊脂膠體電泳分析，取樣的根部病害樣本，皆可成功增幅出預期大小的DNA片段(圖3B)，顯示這些病害樣本含有褐根病菌的DNA。因此推斷此田區酪梨全株性萎凋病害為褐根病菌所造成。

## 三、褐根病菌之分離純化培養

除了分子檢測，病害根部樣本經過清洗與表面消毒後，利用馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(PDA)或麥芽糖

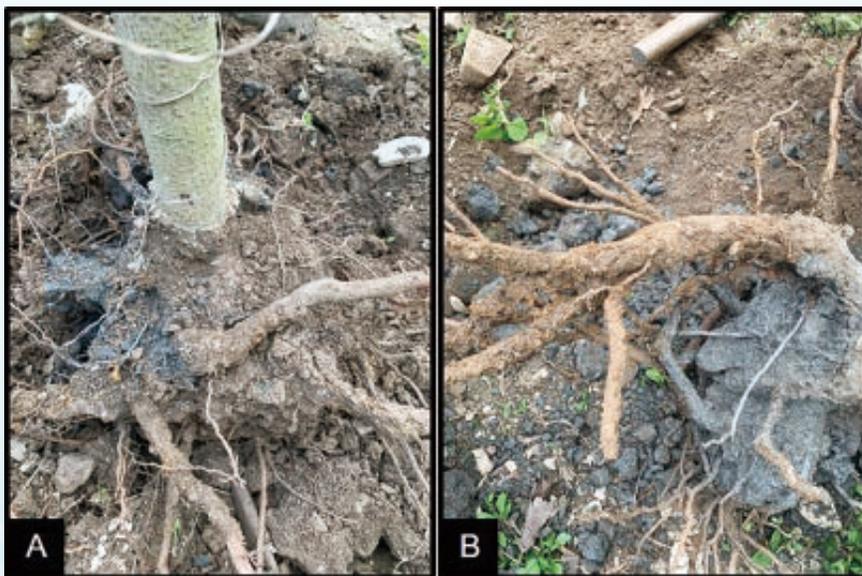


圖2. 罹病酪梨植株樹幹基部(A)與挖開之根系(B)

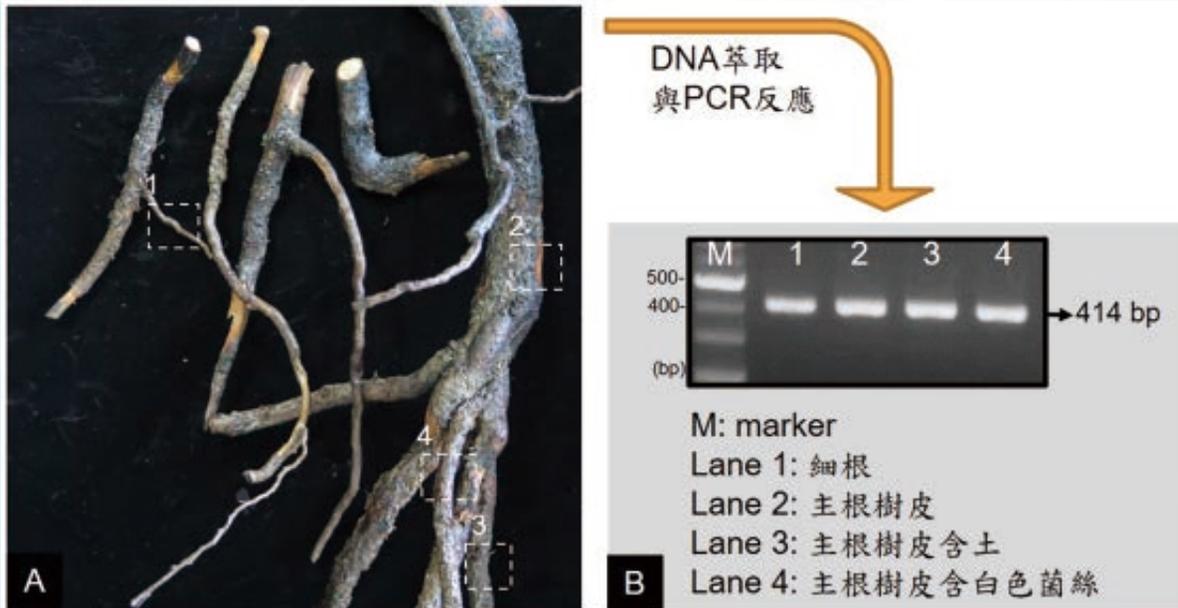


圖3. 田間採集之病害根部樣本切取不同部位(A, 白色虛線框), 萃取DNA後, 以褐根病專一性引子對進行PCR反應與瓊脂膠體電泳分析結果(B)。

選擇性培養基(MA+4, 含4種化學藥劑)進行病原菌分離與純化, 病害根部樣本成功分離培養出典型的褐根病菌菌落, 菌絲呈乳白色綿密狀, 隨著培養時間加長, 菌落漸漸轉化為黃褐色(圖4)。將培養菌株之菌絲進行DNA萃取後, 再利用褐根病菌專一性引子對進行檢測, 出現專一性條帶者可以確認該菌株為褐根病菌。結果顯示, 除了菌株編號CWR-529外, 其餘菌株皆為褐根病菌(圖5)。

### 結語

本案例田間病害診斷使用之分子檢測技術, 最快可以在1個工作天內完成檢測, 惟植株全株性的萎凋病徵, 有可能為其他根部病原菌或非生物因素所造

成, 欲追根究底需要考量田間現場的各種可能性, 例如風害、淹水等非生物因素。如為其他病原菌所造成, 需要經過病原菌分離與菌種鑑定, 將結果與國內外文獻比對, 可能的病原菌菌株還要經過柯霍式法則驗證等繁複的程序, 方能確定病因。

根據鍾等(2020)最新的研究報告, 褐根病菌只能固守在樹木根部或是殘根組織中, 並且在健康樹木根系接觸到這些被感染的組織時, 才會發動攻擊。換句話說, 褐根病菌無法靠土壤傳播, 清除罹病區域的殘根即可防止病害蔓延。樹木褐根病病害短距離可由病根與健康根的接觸傳播, 長距離為孢子散播感染。因此, 田間發現褐根病植株後, 處理上首重移除病株, 須特別注意土壤中

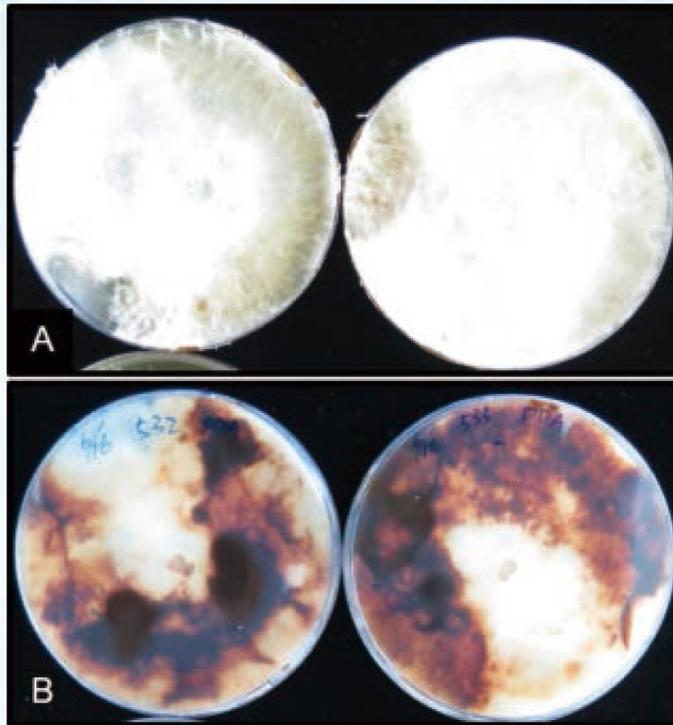


圖4. 分離純化培養之褐根病菌落正面為乳白色綿密菌絲(A)，培養皿背面可清楚觀察到菌落轉為褐化(B)。

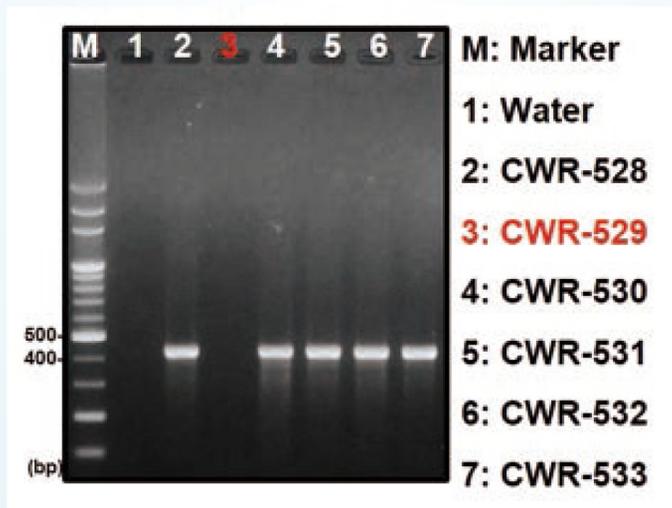


圖5. 分離純化培養之褐根病菌菌株萃取其DNA後，以專一性引子檢測。

的殘根，務必清除乾淨，避免感病組織在環境中殘留成為潛在感染源。關於樹木褐根病更多的診斷及防治建議，可參

考行政院農業委員會林業試驗所出版之建議手冊(<https://www.forest.gov.tw/file.aspx?fno=75523>)。