

角粒菠菜種子誘釣立枯絲核菌之偵測技術¹

劉興隆² 林俊義² 陳隆鐘³

摘 要

利用六種蔬菜種子，偵測土壤中之立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani* AG-4)，結果發現角粒菠菜種子誘釣本菌的百分率最高。其中角粒菠菜種子最易由土中回收挑取，而且其被菌絲纏據者在2%水瓊脂(含300 ppm鏈黴素)平板上，可迅速長出菌絲。以此方法偵測含有不同菌量密度的土壤，發現立枯絲核菌纏據角粒菠菜種子的百分率與芥藍菜立枯病的發生率間呈直線迴歸正相關。進一步利用角粒菠菜種子偵測存在於蔬菜田土中菌體數，可預估土壤中立枯絲核菌的菌體密度及其在田間的分佈。

關鍵字：偵測技術、角粒菠菜種子纏據法、立枯絲核菌。

前 言

田間蔬菜病害調查，發現立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)引起之病害相當普遍，其中芥藍、菠菜、萵苣、白菜與空心菜等皆有被為害記錄，而以芥藍及菠菜較嚴重⁽¹⁾，為了進一步了解本菌在土壤中之接種源密度，查閱有關測定立枯絲核病菌於土壤中之接種源密度方法，可歸類為纏據(Colonization)、選擇性培養基 (Selective medium)^(4,7)、土壤篩選(Soil sieving)^(2,3,11,12)及土壤微生物採樣管(Soil microbiological sampling tubes)⁽⁸⁾等方法；纏據法又分為植物莖斷片纏據法(Plant stem segment colonization)^(6,9,10)及種子纏據法(Seed colonization)⁽⁵⁾兩種。在眾多的方法中，我們引用黃氏之甘藍種子纏據法⁽⁵⁾，來偵測土壤立枯絲核病菌之族群，但在使用時發現甘藍種子與土壤混在一起，由於種子小且顏色與土壤相近，回收操作不易。因此本研究擬從其他蔬菜種子中，找出解決以上問題之種子來進行誘釣偵測，以提高工作效率，期能更精確的檢出接種源密度。

材料與方法

接種源製備

*R. solani*菌株RSI-01分離自空心菜，RSL-01分離自萵苣，RSS-07分離自菠菜，RSK-03分離自芥藍菜。此四菌株與農試所提供之標準菌株(F-8, C1)進行菌絲融合群比對屬於菌絲融合群第四群(*Rhizoctonia solani*, AG-4)，所有菌株，均保存於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基上；而以chopped-potato-soil做為土壤接種源⁽⁷⁾，而病菌土為1份接種源加十份經熱空氣(60℃，30 min)處理過之土壤，土壤採自台中區農業改良場，經10 mesh (2-mm)之篩子篩過。

¹ 台中區農業改良場研究報告第 0371 號。

² 台中區農業改良場助理研究員、場長。

³ 國立中興大學植病系副教授。

不同蔬菜種子誘鈎立枯絲核菌的百分率及回收率

不同蔬菜種子測偵本菌的方法⁽²⁾為(1)利用燒杯盛裝100 g之帶菌土壤後，隨即調整土壤水分含量為12~15% (w/w)。(2)把40粒種子與土壤攪拌均勻，以保鮮膜封口，放在24°C 孵育48 hr。(3)從土壤中回收種子，置於過濾器上，以清水漂洗3分鐘，以紙巾吸乾多餘的水，放在2%水瓊脂(含300 ppm鏈黴素)平板上。(4)在24°C 經24 hr，檢視*R. solani* (AG-4)纏據種子的百分率。所使用的蔬菜種子有空心菜(*Ipomoea aquatica* Forsk)、角粒菠菜(*Spinacia oleracea* L. var. *spinosa* Ashers et Graeden)、圓粒菠菜(*Spinacia oleracea* L. var. *grabra* Gurke)、甘藍(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)、芥藍菜(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)及結球甘藍(*Brassica oleracea* L. var. *caulorapa* DC.)等六種種子，另外於步驟(3)記錄從土壤中回收不同種子時，每隔30秒，其回收種子數，於4分鐘後停止回收計算其總回收率。

不同孵育時間對角粒菠菜種子被立枯絲核病菌纏據之影響

按上述方法取被纏據效果最好之角粒菠菜種子，在步驟(2)之孵育時間分別進行0、6、12、18、24、30、36、42與48 hr，然後調查不同孵育時間對*R. solani*纏據種子百分率之影響。

比較纏據角粒菠菜種子的百分率與芥藍立枯病的發生率之關係

在接種源比健土為1比3、3²、3³、3⁴、3⁵、3⁶、3⁷及0比1等8種不同菌量密度的土壤，A.)以角粒菠菜種子誘鈎立枯絲核菌偵測方法，偵測不同病土纏據角粒菠菜之百分率，方法為40粒角粒菠菜種子與100 g土壤攪拌均勻後，放在24°C 孵育24 hr後回收種子並清洗之，將種子放在2%水瓊脂(含300 ppm鏈黴素)平板上，在24°C 經24 hr，檢視*R. solani* (AG-4)纏據種子的百分率，每處理三重複；B.)以消毒過之芥藍種子，播種於不同病土之直徑12 cm之塑膠盆中，每盆30粒每處理三重覆，然後置於溫室中，2星期後調查芥藍菜猝倒率，包括萌前及萌後猝倒百分率。

蔬菜田土壤中立枯絲核菌菌體密度偵測

於蔬菜專業區永靖及社頭採集土壤，共5點、每點分土壤深度0~5、5~10、10~20、及20~30 cm等4個樣品，共20個樣品，以角粒菠菜種子誘鈎立枯絲核菌偵測方法，偵測土壤中立枯絲核菌密度，每個樣品三重複，每重複放40個角粒菠菜種子；角粒菠菜種子被纏據時，如造成其不發芽或發芽後死亡，才確認為被纏據的種子。

結 果

不同蔬菜種子誘鈎立枯絲核菌的百分率及種子的回收率

不同蔬菜種子在病菌土中孵育2天後，各別取出種子並水洗，再置於培養基上，24 hr後檢視*R. solani*纏據種子的百分率。在四個菌株中皆以角粒菠菜被立枯絲核菌纏據率最高，分別由82~100%；而以空心菜纏據效果最差，只有35.3~49.0%；而其他種子效果差不多，介於前述二者之間(表一)。在調查纏據率之同時，調查被纏據之種子，其上之立枯絲核菌之菌絲生長情形，經統計分析以角粒菠菜及空心菜之被纏據的種子，其上的菌絲生長最快，其菌落大小約在28.6~31.7 cm之間，而其他種子彼此之間差異不顯著，菌落較小。在回收時，

由於各種種子大小及顏色不一，其回收速度及回收率就有所不同；在種子大小上，千粒體積以空心菜最大(39.0 cc)，角粒菠菜其次(22.9 cc)，其他依序為圓粒菠菜、甘藍、及結球甘藍；在回收上，空心菜及角粒菠菜，於1分30秒內，40粒種子全數由病土中挑出，而圓粒菠菜於2分內全數挑出，結球甘藍、芥藍菜、甘藍於4分鐘內分別挑出36.7、37.0、及37.9粒種子，故回收率以角粒菠菜、空心菜及圓粒菠菜最好(表二)。

表一、比較立枯絲核菌纏據六種蔬菜種子之效率及被纏據後之菌絲生長速度

Table 1. Comparative efficiency of six vegetable seeds for baiting *Rhizoctonia solani* (AG-4) and its mycelial growth from colonized seeds on 2% water agar plate

Seeds	RSI-O1		RSL-O1		RSS-O7	
	Colonization	Diameter	Colonization	Diameter	Colonization	Diameter
	%	mm	%	mm	%	mm
Angle-spinach	100.0a ¹	28.7a	100.0a	26.8a	97.5a	28.0a
Round-spinach	76.1a	20.9b	71.0b	16.7b	76.4b	20.9b
Water convolvulas	49.0b	31.7a	35.6c	29.3a	35.3d	31.1a
Cabbage	91.3a	20.8b	63.0b	14.3b	85.3ab	19.0b
Kale	86.9a	17.2b	71.5b	16.9b	55.6c	16.2b
Kohlrabi	74.7a	15.5b	71.3b	15.1b	58.7c	16.5b

¹ Mean in the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

表二、比較六種蔬菜種子從土壤中的回收率

Table 2. Comparison of recovery efficiency of six vegetable seeds from soil

Seeds	1000-grains volume (ml)	Number of recovery seeds at different seconds ²								Recovery (%)
		30	60	90	120	150	180	210	240	
Angle-spinach	22.9	15.3	34.3	40.0						100a ¹
Round-spinach	14.5	12.3	29.6	39.3	40.1					100a
Water convolvulas	39.0	15.3	35.7	40.0						100a
Cabbage	6.9	9.0	19.3	30.0	34.3	35.6	36.9	37.6	37.9	95b
Kale	7.4	7.0	14.3	21.6	26.3	31.0	34.3	36.0	36.7	92b
Kohlrabi	6.2	7.0	19.0	27.0	33.0	36.0	36.7	37.0	37.0	93b

¹ See Table 1.

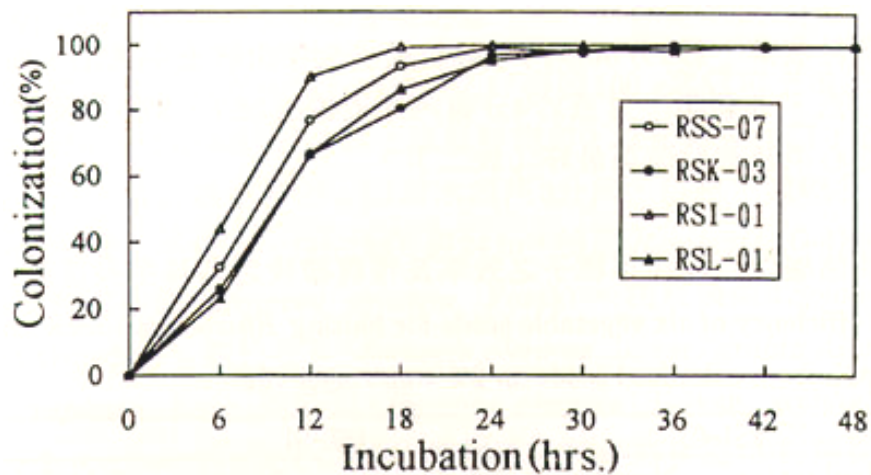
² Forty seeds of six vegetable crops were respectively mixed in soil before the seeds were recovered.

不同孵育時間對角粒菠菜被立枯絲核菌纏據之影響

四個菌株皆隨著孵育時間的延長，纏據種子的百分率相對的增加，其中以RSI-01菌株之纏據種子的百分率最高；四個菌株皆以培育18~48 hr之纏據率較好，但整體而言以24 hr後，其纏據率可達最高(圖一)。

比較纏據角粒菠菜種子的百分率與芥藍立枯病的發生率之關係

在四個菌株中，均隨病土中立枯絲核菌密度增加，相對的增加立枯絲核菌對角粒菠菜之纏據率及芥藍菜之猝倒率(表三)，立枯絲核菌纏據角粒菠菜種子的百分率與芥藍菜立枯病的發生率間呈直線迴歸正相關($r=0.96-0.97$, $P<0.001$)。



圖一、立枯絲核菌在 24°C 於角粒菠菜種子上之纏據情形。

Fig. 1. Colonization of angle-spinach seeds by *Rhizoctonia solani* (AG-4) by after different incubation periods at 24 °C.

表三、不同密度之立枯絲核菌纏據角粒菠菜種子的百分率與芥藍猝倒病發生率間的比較

Table 3. Colonization of angle-spinach seeds by *Rhizoctonia solani* (AG-4, isolates RSI-01, RSL-01, RSS-07 and RSK-03) compared with damping-off of kale seedlings in soil with various concentrations of inoculum of the pathogens

Inoculum level	RSI-01		RSL-01		RSS-07		RSK-03	
	Colonization %, X	Damping-off %, Y	Colonization %, X	Damping-off %, Y	Colonization %, X	Damping-off %, Y	Colonization %, X	Damping-off %, Y
1:3	100	75	100	100	99	100	99	100
1:9	99	79	100	100	99	100	97	100
1:27	88	74	90	100	78	94	74	99
1:81	50	49	55	93	45	64	32	64
1:243	17	32	30	30	33	19	22	41
1:729	7	10	12	19	8	6	4	15
1:2187	5	10	6	15	3	6	3	0
0:1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Y=8.54+0.67X		Y=8.00+X		Y=0.08+1.06X		Y=10.73+1.00X	
Correlation	r=0.97		r=0.96		r=0.97		r=0.96	
	P<0.001		P<0.001		P<0.001		P<0.001	

蔬菜田土壤中立枯絲核菌菌體密度偵測

表四中，永靖(Yeong-jing)為設施栽培連作田，社頭(Sheh-tour)1及社頭2屬於連作田，社頭3為休耕田，社頭4為經耕耘機深犁過之田，以角粒菠菜種子誘釣立枯絲核菌偵測法，偵測得知蔬菜田中立枯絲核菌普遍存在，在20個樣品的纏據率為0~75%，不過密度和連作與否及土壤深度有關，連作田永靖、社頭1及社頭2，其纏據率較其它採集點高；而不同土壤深度之立枯絲核菌分布，普遍以0~10 cm之間最高。

表四、以角粒菠菜種子偵測蔬菜田立枯絲核病菌菌體密度

Table 4. Use of angle-spinach seed colonization method for detection of *Rhizoctonia solani* from vegetable field soil

Depth (cm)	Colonization (%)				
	Yeong-jing	Sheh-tour(1)	Sheh-tour(2)	Sheh-tour(3)	Sheh-tour(4)
0~5	42	42	75	8	12
5~10	30	57	30	16	15
10~20	9	37	14	7	10
20~30	0	19	16	3	4

討 論

爲了解立枯絲核病菌在土壤中之生態，故在眾多的偵測方法中，選用黃氏⁽⁵⁾開發之以甘藍種子偵測土壤中立枯絲核菌菌體密度的方法，但在使用時發現甘藍之種子小，且顏色與土壤接近，回收操作不易；又因在蔬菜病害調查時，得知菠菜及芥藍菜等都被立枯絲核病菌爲害相當嚴重⁽¹⁾，因此推想，可否以此類種子替代甘藍種子進行實驗，結果顯示在測試的六種種子中，以角粒菠菜纏據率最高，且被纏據的種子在2%水瓊脂(含300 ppm鏈黴素)上其菌落生長直徑亦大，在回收時可輕易的從土中挑出(表二)，不僅解決了回收之困擾，且提高了纏據率(表一)。

Davey及Papavizas⁽³⁾比較不同測定立枯絲核病菌在土壤中接種源密度的方法，指出植物殘粒法(Plant debris particle method)反映出立枯絲核菌之靜止狀況，而誘鈎法則代表立枯絲核病菌的活動情形；本試驗中，角粒菠菜種子之所以能在24 hr培育時間內即有很好的纏據率，可能是角粒菠菜種子表面較粗糙，而且對立枯絲核菌屬於感病植物，因此以角粒菠菜種子誘鈎立枯絲核病菌，更能表現出其活動的狀況。

以角粒菠菜種子偵測土壤中立枯絲核菌的密度，能提高工作效率、節省試驗時間，且能保留甘藍種子誘鈎法⁽⁵⁾中纏據百分率與芥藍菜立枯病發生率之直線迴歸正相關(表三)。進一步偵測田間5個蔬菜田土壤，得知立枯絲核菌之菌體密度和連作與否及土壤深度有密切關係，連作田永靖、社頭1及社頭2，其纏據率較其它採集點高；而不同土壤深度之立枯絲核菌分布，普遍以0~10 cm之間最高，因此可有效的預知土壤中立枯絲核病菌之密度及其在田間之分布層面。以角粒菠菜種子誘鈎立枯絲核菌偵測方法如下：(1)利用燒杯盛裝100 g之帶菌土壤後，隨即調整土壤水分含量爲12-15% (w/w)。(2)把40粒角粒菠菜種子與土壤攪拌均勻，並在24°C培育24 hr。(3)從土壤中回收種子並以清水漂洗後，放在2%水瓊脂(含300 ppm鏈黴素)平板上。(4)在24°C經24 hr，檢視*R. solani* (AG-4)纏據種子的百分率。

一般市售的菠菜種子有兩類，一類爲角粒種子，另一類爲圓粒種子。圓粒種子大多爲600 g一小包，由種苗業者自行採種或進口，此類種子拌藥機率較高，筆者曾購買到拌有紅色及白色藥劑的圓粒種子(未註明拌何種藥劑)；而角粒菠菜種子屬於本地種，由農民自行採種處理後，裝入通風塑膠袋內，再賣給種子行，目前尚未發現此類種子拌有農藥。不過，要應用角粒菠菜種子偵測土壤中之立枯絲核菌時，仍須留意是否已拌有藥劑。

參考文獻

1. 劉興隆 1993 中部地區設施蔬菜之病害調查 台中區農業改良場研究彙報 41:1~9。
2. Boosalis, M. G. and A. L. Scharen. 1959. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. *Phytopathology* 49:192-198.
3. Davey, C. B. and G. C. Papavizas. 1962. Comparison of methods for isolating *Rhizoctonia* from soil. *Can. J. Microbiol.* 8:847-853.
4. Henis, Y., A. Ghaffar, R. Baker and S. L. Gillespie. 1978. A new pellet soil-sampler and its use for the study of population dynamics of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 68:371-376.
5. Huang, J. W. and S. H. Yang. 1992. A baiting technique for assay of *Rhizoctonia solani* in kale nurseries. *Plant Pathol. Bull.* 1:26-30.
6. Huang, J. W. and E. G. Kuhlman. 1989. Recovery and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*-like fungi in forest nurseries. *Plant Dis.* 73:968-972.
7. Ko, W. H. and F. H. Hora. 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61:707-710.
8. Martinson, C. A. 1963. Inoculum potential relationships of *Rhizoctonia solani* measured with soil microbiological sampling tubes. *Phytopathology* 53:634-638.
9. Papavizas, G. C. and C. B. Davey. 1959. Isolation of *Rhizoctonia solani* Kuhn from naturally infested and artificially inoculated soils. *Plant Dis. Repr.* 43:404-410.
10. Sneh, B., J. Katan, Y. Henis and I. Wahl. 1966. Methods for evaluating inoculum density of *Rhizoctonia* in naturally infested soil. *Phytopathology* 56:74-78.
11. Ui. T., T. Naiki and M. Akimoto. 1976. A sieving-floatation technique using hydrogen peroxide solution for determination of sclerotial population of *Rhizoctonia solani* Kuhn in soil., *Ann Phytopathol. Soc. Jpn.* p.42, 46.
12. Weinhold, A. R. 1977. Population of *Rhizoctonia solani* in agricultural soils determined by a screening procedure. *Phytopathology* 67:566-569.

A Baiting Technique for Detection of *Rhizoctonia solani* by Angle-spinach Seed¹

Hsing-Lung Liu², Chien-Yih Lin² and Lung-Chung Chen³

ABSTRACT

A detecting technique using angle-spinach seed colonization method provided a rapid, sensitive and accurate means of assessing inoculum population of *Rhizoctonia solani* AG-4 in the soil. The mycelial growth rate of *R. solani* was more rapid when colonized seeds of angle-spinach were incubated on 2% water agar plate. The angle-spinach seed colonization method was more effective for recovering the pathogen because it could shorten incubation period and the angle-spinach seed was obtained from soil more conveniently. Utilizing this technique to detect population of *R. solani* in soil gave a significant correlation between the colonization of angle-spinach seed by *R. solani* and disease incidence of damping-off of kale seedlings. It is suggested that the technique may be used to monitor the population of *R. solani* in vegetable field soil.

Key words: detecting technique, the angle-spinach seed colonization method, *Rhizoctonia solani*.

¹ Contribution No. 0371 from Taichung DAIS.

² Assistant Plant Pathologist and Director of Taichung DAIS.

³ Associate Professor of National Chung Hsiung University, Department of Plant Pathology.