

行政院農業委員會林務局九十七年度委託研究計畫期末報告

一、計畫編號：97-00-5-36

二、計畫名稱：小花蔓澤蘭生物防治一病原真菌大面積噴施對抑制小花蔓澤蘭種子傳播之研究

三、主持人：姓名：王均琍 執行單位：國立屏東科技大學

四、內容：

摘要

小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha* H.B.K.) 開花後產生大量種子，傳播速度極為快速，已對台灣林木與一些果園造成重大威脅，如何有效抑制其種子傳播為防除上之重要課題。本研究室將小花蔓澤蘭不同花期之花器接種病原真菌 *Pestalotiopsis* (Fic-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 抑制種子發芽率效果佳，且以初期花時接種病原菌，對小花蔓澤蘭種子之形成與發芽影響最大。本年度進行大面積試驗，先行開發量產病原真菌孢子之方法，篩選生產孢子之最適培養介質、溫度及光照，再將病原真菌 Fic-2 與 FV-1a 孢子接種於小花蔓澤蘭花器，在六龜山區小花蔓澤蘭群聚處設置大面積樣區，分別噴施兩種病原菌之孢子懸浮液於各樣區，定期觀察並於種子成熟期多次赴樣區採回種子，調查種子百粒重及發芽率，評估以 Fic-2 與 FV-1a 作為真菌性除草劑之可行性。結果顯示，利用七種介質麥片、蕎麥、高粱、糙米、茶葉、蔗渣與咖啡渣分別培養 Fic-2 與 FV-1a，以高粱培養基的產孢量最高，溫度以 28°C 為佳，於 LED 藍光(450 nm)與日光燈(20W)照射下，產孢量較豐。由樣區採回之種子，於噴灑 Fic-2 孢子懸浮液的三個樣區，其種子平均百粒重為 5.19mg，平均發芽率則為 15.00%；而噴灑 FV-1a 孢子懸浮液兩個樣區種子平均百粒重為 6.09mg，平均發芽率則為 18.75%，均顯著低於對照組未噴施孢子之平均百粒重 9.62mg 與平均發芽率 49.50%，顯示 Fic-2 與 FV-1a 對小花蔓澤蘭種子之發育與發芽有抑制作用，有潛力發展為真菌性除草劑。取四種 *Pestalotiopsis* 屬病原真菌之 DNA 經 PCR 檢測後，RAPD 引子 OPB-08 與 OPB-10 較能區別 Fic-2；OPA -12 則能區別 FV-1a。未來將利用 ITS 專屬引子進行病原真菌之 PCR 檢測、DNA 片段選殖以及序列比對等工作。

前言

生物入侵被認為是對全球生物多樣性的主要威脅(Wang and Chen, 2007)，入侵的植物種類可能對當地群落和生態系造成重大的影響(Inderjit, 2005)。小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha* H. B. K.) 為菊科 (Asteraceae) 假澤蘭屬蔓性草本植物，原生於中南美洲，在大陸又稱薇甘菊，具無性繁殖及種子繁殖能力(Galway and Brooks, 2007; Xie *et al.*, 2001)。匍匐莖每一根節均能生長出新根系，植株向光性強，生長於一千公尺以下之中低海拔各山區向陽坡地、溪谷、河岸及水源地，多於當年 10 月至 12 月中下旬開花，後隨之萎凋，開花後種子隨風飄散，落地後再萌芽生長，

繁殖力極強(Ismail and Mah, 1993)。小花蔓澤蘭本於 1960 年被印尼從巴拉圭引進作為橡膠園之地面覆蓋植物，然因生長與繁殖力強，很快於東南亞、印度、泰國、澳洲、熱帶非洲等地區大量生長蔓延，並已分布世界各地。在臺灣，於十多年前僅於屏東地區出現，現今於中低海拔山區均可看見其蹤跡，由於其快速生長攀緣於林木，被其覆蓋包住的樹木，常無法獲得充分光照與空氣，最後死亡(Waterhouse, 2003)，目前已對台灣林木與一些果園造成很大威脅。如何有效防除為一重要課題。

早期對雜草的防治以人工及機械方式，非僅效率不高，雜草之控制亦未徹底(郭等，2002)。近年來，因人工及機械化除草耗時費工，再加上工資高漲，勞力缺乏，漸以一般的化學殺草劑取而代之。一般化學殺草劑多於作物萌芽前或生育初期使用(徐，2003)。然長期施用，對環境依然會造成持續性殘留及污染，造成人畜傷害，帶來環保的問題(蔡，1988)。此外，化學性殺草劑的施用亦容易導致林木幼苗生長受抑制，對幼樹造成畸形生長(郭等，1974 和 1976)。

生物性殺草劑(bioherbicides)為利用植物病原菌、由病原菌或其他微生物產生之植物毒素，大量應用來防除雜草。通常這類生物均以當地存在之雜草病原為主，其性質溫和，對環境傷害低，對植物傷害具選擇性(多為同一科或同一屬)(李，1992；Auld and Morin, 1995)。其防治成本則較傳統殺草劑及人工或機械化除草低許多(李，1992)。因此，為減少施用化學殺草劑對環境及水源保護區之污染，研發生物性殺草劑(bioherbicides)，為未來的趨勢。國外有關蔓澤蘭以微生物防除之研究，在印度曾引入銹病菌 *Puccinia spegazzinii*，目前台灣大學曾教授也正在對此菌進行試驗中(曾，2005)。馬來西亞則由當地蔓澤蘭病株上分離得到之病原菌 *Cercospora mikaniicola* 接種於蔓澤蘭上，可惜該病原菌以人工培養產孢量少，且病害發展程度較慢。香港大學 Goh 與 Wong 近年亦從事由當地蔓澤蘭病株上分離得到之病原菌 *Cercospora mikaniicola*，針對蔓澤蘭擬研發成為生物性殺草劑，然均尚未成功。台灣有學者想利用白絹病菌防治小花蔓澤蘭，但它亦會感染花生或空心菜等作物，若要實際應用在田間則還要經過長久評估(傅等，2003)。

本研究室上年度將小花蔓澤蘭不同花期之花部接種由小花蔓澤蘭病株上分離的病原真菌菌株 FIa-1、FIc-2、FV-1a 與 FV-1c 四種病原真菌之孢子懸浮液或真菌菌絲體，並模擬自然環境下接種，不予套袋，待種子成熟後採收，測其重量並作發芽率試驗，結果顯示接種 FIc-2 與 FV-1a 於小花蔓澤蘭之初期花時，對種子的結實與發芽有影響，且發芽情形受抑制。故本年度進一步在六龜山區作較大面積之病原真菌 FIc-2 與 FV-1a 的孢子懸浮液接種，並繼續探討該病原真菌對其他植物之致病性，評估其真菌性殺草劑實際應用之可行性與安全性。

材料與方法

一、試驗材料

(一) 大面積之小花蔓澤蘭群聚試區

於六龜山區挑選果園、廢耕果園或森林邊緣、陽光充足且不易受人為干擾之小花蔓澤蘭群聚區六個樣區作為試驗用地，病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)各具有三個試驗樣區，以其它未噴施病菌孢子懸浮液之地區為對照。

1. 病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2)之試驗樣區(97.11.08)

- a. 樣區一座標【X：214143，Y：2539163】，海拔 225M，長×寬=25×28(M)
- b. 樣區二座標【X：214456，Y：2540408】，海拔 354M，長×寬=13×7.5(M)
- c. 樣區三座標【X：214559，Y：2540051】，海拔 376M，長×寬=16×8(M)

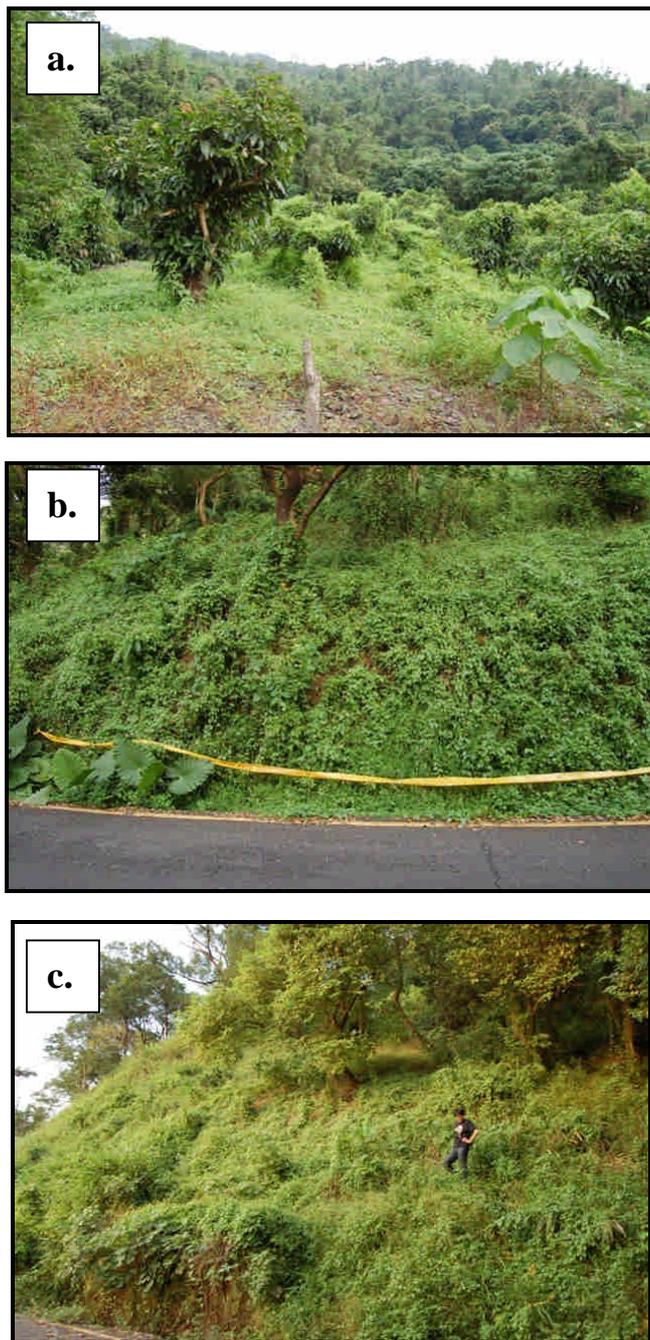


圖 1. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2)大面積噴施之六龜試驗樣區 (97.11.08)

2. 病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a)之試驗樣區(97.11.08)

- a. 樣區一座標【X：214407，Y：2541338】，海拔 279M，長×寬=20×19(M)
- b. 樣區二座標【X：214540，Y：2540252】，海拔 364M，長×寬=13×9(M)
- c. 樣區三座標【X：214419，Y：2541424】，海拔 276M，長×寬=12×10(M)



圖 2. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a)大面積噴施之六龜試驗樣區
(97.11.08)

(二) 小花蔓澤蘭病原菌之大量培養與製備

1. 小花蔓澤蘭病原菌來源

將由本實驗室分離保存之小花蔓澤蘭病原菌株 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 培養於 PSA 平板培養基上備用。

2. 培養介質

麥片、蕎麥、高粱、糙米由大賣場購得、茶葉渣從飲料店取得、蔗渣由甘蔗汁攤販取得、咖啡渣由 85°C 店家取得。

(三) 試驗用之蜜棗、番石榴、芒果等果實購自屏東縣農家。

(四) 噴灑病原孢子懸浮液之噴霧器為高壓背負式動力噴霧器 SHP-800。

(五) 利用 RAPD 以及 ITS 進行小花蔓澤蘭病原菌鑑定分析

1. RAPD 引子

所使用之引子為 OPA01~OPA20 和 OPB01~OPB20(購自 OPERON)，共 40 個。

2. PCR 梯度基因擴增儀 (TaKaRa Bio Inc. TP600)

3. 電泳分析之 Marker

所使用之 Marker 為 Gen100 DNA Ladder(GeneMark)。

二、試驗方法

(一) 病原菌之大量培養與製備

1. 最適產孢介質試驗

為篩選最適病原菌培養介質，將麥片、蕎麥、高粱、糙米、茶葉、蔗渣與咖啡渣等作為基本介質(88%)，添加米糠(9%)、蔗糖(1%)、石灰(1%)、 KH_2PO_4 (0.05%)、 MgSO_4 (0.025%)、尿素(0.025%)等，製成培養基填入培養皿(直徑 9 cm)內，每一皿皆含 30 克，經高壓高溫滅菌後，將病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 分別接種培養於上述培養基內，定期調查菌絲體生長直徑，待產孢後以 300 mL 無菌水洗出其孢子，篩選能夠有效促進病原真菌大量產孢之介質，以利後續該病原真菌能大量產孢而廣泛應用。

2. 最適產孢溫度試驗

將病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 培養於高粱培養基中，分別置於 16°C、20°C、24°C、28°C、32°C 與 36°C 之梯度生長箱中，以日夜週期 (12/12hrs) 照光，定期調查菌絲體生長與產孢情形。

3. 最適產孢之光照試驗

將病原真菌 *Pestalotiopsis* (FIC-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)培養於高粱培養基中，照射 LED (Light Emitting Diode)燈之紅光、遠紅光及藍光等，另以日光燈(20W)作為對照，燈與培養皿之工作距離為 15 公分，測試何者能夠有效促進病原真菌 FIC-2 與 FV-1a 生長及大量產孢。

表 1. LED 燈之基本設定條件

LED	紅光	遠紅光	藍光
波長(nm)	660	735	450
頻率(Hz)	1000	1000	1000
振幅(V)	1.23	1.23	1.23
工作比(%)	100	100	100

4. 太空包量產孢子

將最適產孢之介質置於太空包內，每一包裝入 200 克之介質，經高溫高壓滅菌後，接種病原真菌 *Pestalotiopsis* (FIC-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)菌絲塊，照光培養，30 天後將產孢之太空包介質置入紗網袋內，於 2000mL RO 水中洗出孢子備用。

(二) 病原菌株接種於小花蔓澤蘭花器，對其種子結實影響之試驗

1. 孢子懸浮液對小花蔓澤蘭花部之噴施：

將製備好濃度為 10^5 spores/mL 的病原真菌孢子懸浮液，以電動噴霧機大量噴施於六龜小花蔓澤蘭試驗樣區之花器上(圖 3)。兩種病原真菌 *Pestalotiopsis* (FIC-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)分別具有三個試驗樣區，以其他未噴施孢子懸浮液之地區作對照區。定期上山觀察，待種子完全成熟則開始陸續大量採收，每處理三樣區，每一樣區採集大量成熟種子，調查後續種子百粒重與發芽率。

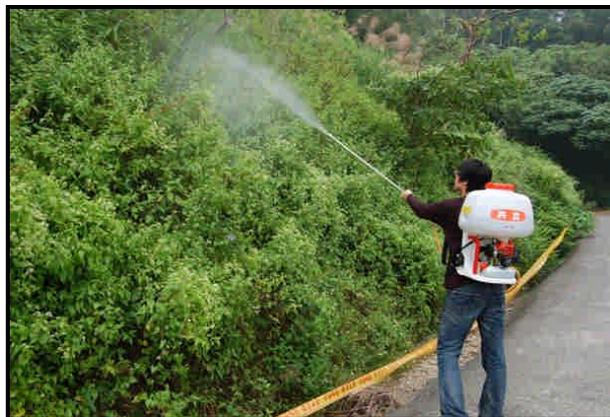


圖 3. 六龜地區噴施孢子懸浮液之情形

2. 小花蔓澤蘭花部接種病原菌對採收後種子百粒重與發芽率之影響試驗：

(1) 百粒重調查：

每一病原菌噴施之三個樣區，於每一樣區採集之大量種子，隨機檢取 30 小包種子，每一包內有 100 粒種子。試驗共 3 處理(FIc-2、FV-1a 和 CK)，每處理三個樣區，每樣區有 5 重覆，每重覆 6 包種子，共 30 包種子，每包有 100 粒種子，秤其百粒重並計算出其平均值。

(2) 種子發芽率調查試驗：

將各種處理採收後的小花蔓澤蘭種子，以 0.5% 之次氯酸鈉消毒十分鐘，並用無菌水清洗三次，將殘留於種子表面之次氯酸鈉沖洗乾淨之後，種子分置於水洋菜平板培養基 (1.8%) 中培養，調查發芽率。試驗共 3 處理，每處理三樣區每樣區有 5 重覆，每重覆 6 包種子中取第 3 包之種子作發芽試驗，每包有 100 粒種子，從 100 粒種子中隨機取 40 粒種子，每 10 粒種子置於一培養皿內，共四皿，調查其平均發芽率。

(三) 小花蔓澤蘭病原菌安全性評估--對蜜棗、番石榴、芒果與蓮霧等花器與果實行安全性評估

1. 果實處理：

自田間取回蜜棗果實，以清水洗淨外表泥土及污物，放置 2~3 日，使碰傷之傷口結痂，並將有傷口之果實剔除不使用，將無傷口之果實浸入 75% 之酒精中表面消毒約 5 秒鐘，並晾乾備用。

2. 供試病原菌：

病原真菌 *Pestalotiopsis* (FIc-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 於培養皿內以高粱培養基光照培養，促進其產孢，約兩週後，將孢子堆洗入無菌水中，以血球計數器算出濃度，配製成濃度 10^2 與 10^5 spores/mL 之孢子懸浮液。

3. 致病性測試：

(1) *Pestalotiopsis* (FIc-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 對蜜棗果實之致病性

將果實頂端朝上，置於下層有無菌水之保濕保鮮盒內的塑膠架上，以解剖刀在果實表面製造 X 形之傷口，每顆果實製造 1 處傷口之後，於傷口上分別以 FIc-2 與 FV-1a 之 10^2 與 10^5 spores/mL 之孢子懸浮液與無菌水 CK 進行接種，懸浮液及無菌水皆以微量吸管各接種 10 μ L，每個保鮮盒放置 5 顆棗子，每顆棗子作一種處理，每處理有 5 重覆，共 5 個保鮮盒，25 顆棗子，棗子排列位置採 RCBD 設計。定期調查發病情形。

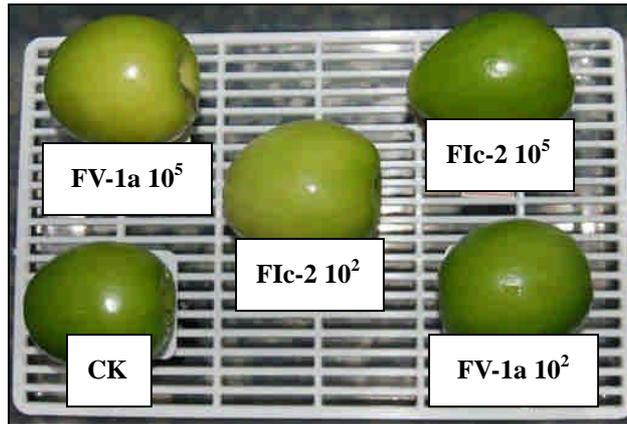


圖 4. 蜜棗在保鮮盒中的處理情形，每盒 5 顆棗子，共五盒

(2) *Pestalotiopsis* (FIC-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)對番石榴果實之致病性

將果實頂端朝上，置於下層有無菌水之保濕保鮮盒內的塑膠架上，以解剖刀在果實表面製造 X 形之傷口，每顆果實製造 5 處傷口之後，於傷口上分別接種 10 μ L 之 10² 與 10⁵spores/mL 之 FIC-2 與 FV-1a 孢子懸浮液及無菌水，兩週後調查發病情形。

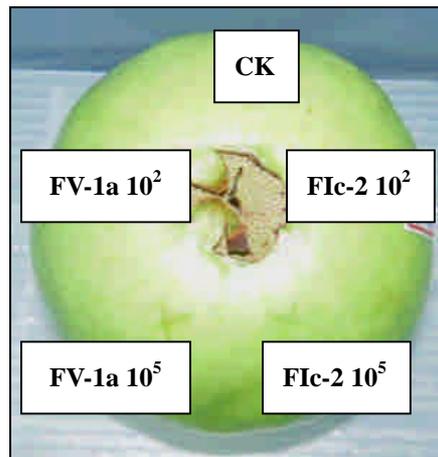


圖 5. 番石榴在保鮮盒中的處理情形，共 5 種處理，每處理 4 重覆(4 顆果實)

(3) *Pestalotiopsis* (FIC-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)對芒果果實之致病性

將果實頂端朝上，置於下層有無菌水之保濕保鮮盒內的塑膠架上，以解剖刀在果實表面製造 X 形之傷口，每顆果實製造 5 處傷口之後，於傷口上分別接種 10 μ L 之 10² 與 10⁵spores/mL 之 FIC-2 與 FV-1a 孢子懸浮液及無菌水，兩週後調查發病情形。

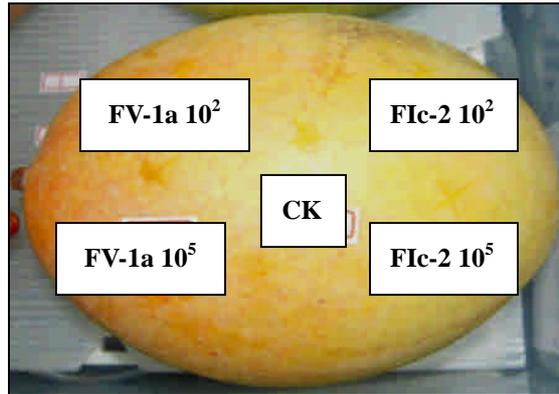


圖 6. 芒果在保鮮盒中的處理情形，共 5 種處理，每處理 4 重覆(4 顆果實)

(4) *Pestalotiopsis* (FIC-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)對蓮霧花器之致病性

分別以 10^2 與 10^5 spores/mL 之 FIC-2 和 FV-1a 孢子懸浮液與無菌水(CK)進行接種，將孢子懸浮液均勻噴於整個花序上，每種處理 3 重覆，每重覆 1 個花序，處理後套袋(仿照一般農民栽培方式)，定期調查結實情形。

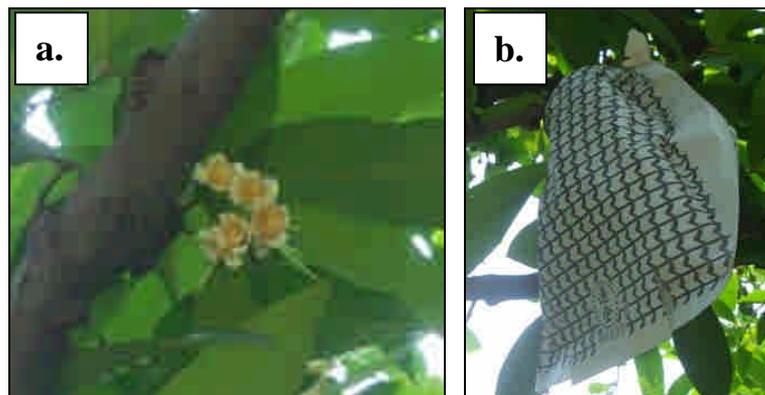


圖 7. 左圖 a 為噴施孢子懸浮液於蓮霧花序；右圖 b 為噴菌處理後套袋

(四) 利用 RAPD 以及 ITS 進行小花蔓澤蘭病原菌鑑定分析

1. 供試菌種

將蓮霧果腐病菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 及番石榴瘡痂病菌 (*Pestalotiopsis psidii*) 作為對照，而與 *Pestalotiopsis* (FIC-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)進行親源分析，代號依序分別為 1、2、3 及 4 號 (表 2)。

表 2. 進行 RAPD 分子檢測之四種菌種及代號

Genome 代號	菌 種	學名
1	蓮霧果腐病菌	<i>Pestalotiopsis eugeniae</i>
2	番石榴瘡痂病菌	<i>Pestalotiopsis psidii</i>
3	F1c-2	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
4	FV-1a	<i>Pestalotiopsis</i> sp.

2. RAPD 檢測

(1) PCR 條件設定

首先將四種 *Pestalotiopsis* 屬之 DNA 用 1 號 PCR 條件將 40 個引子均做一次檢測，若經電泳分析發現區別性較高的引子，則再用 2 號 PCR 條件進行檢測並選殖（表 3）。

表 3. PCR 條件設定

Cycle number	No. 1		No.2	
1	94°C	5 min	94°C	5 min
	94°C	40 s	94°C	40 s
35	42°C	40 s	47°C	40 s
	72°C	2 min	72°C	2 min
1	72°C	7 min	72°C	7 min
Hold at 4°C				

(2) 電泳分析

配置 1% 之膠片，DNA 以 100V 在水平電泳槽中跑 80 分鐘後，將膠片以 EtBr 染色 5~10 分鐘，再以清水退染 10 分鐘，照膠後即得電泳圖。

(3) 選殖與定序

將具有區別性之條帶，切膠純化及選殖後送定序，再至 NCBI 網站將序列與其他真菌進行序列比對。

結果與討論

一、病原菌之大量培養與製備之條件

(一) 不同培養介質對 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 產孢之影響

將咖啡渣、蔗渣、茶葉、麥片、蕎麥、高粱及糙米，分別加入固定比例之米糠、糖、石灰及營養元素等製成平板培養基，接種病原真菌 FIC-2 培養。結果如圖 8 所示，各介質培養之 FIC-2 菌絲生長勢皆良好，唯以蔗渣的菌絲生長勢最弱，培養 30 天後各以 300 mL 無菌水洗出其孢子，結果以高粱為介質者孢子濃度最高，可達 26.5×10^5 spores/mL(表 4)，其次依序為糙米、麥片、PSA、茶葉、咖啡、蔗渣及蕎麥。

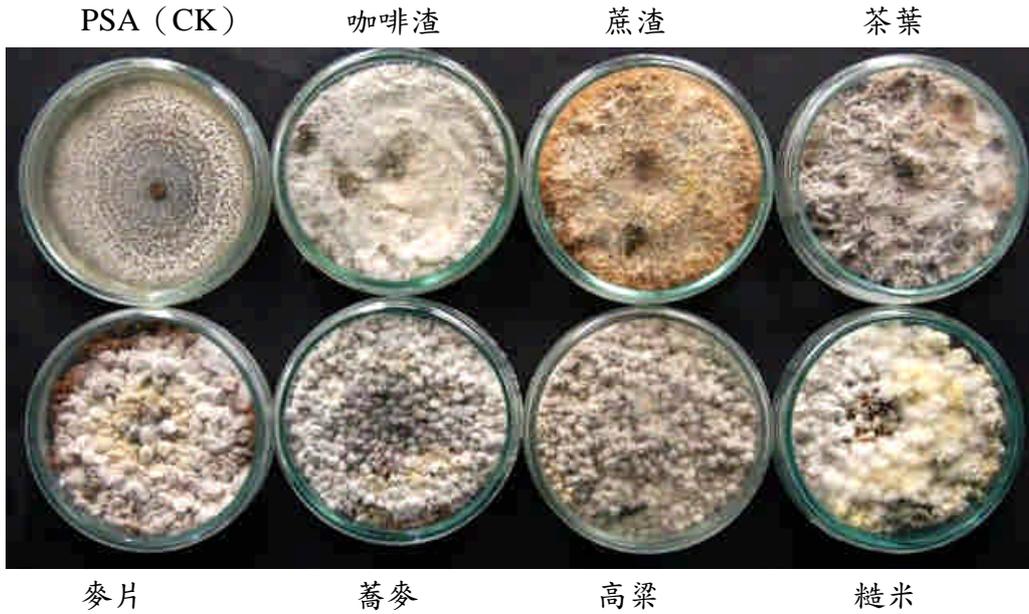


圖 8. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FIC-2) 接種於不同介質 20 天後之情形

表 4. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FIC-2) 接種於不同介質 30 天後孢子濃度

介質	孢子濃度 (10^5 spores/mL)
PSA	8.84 b
高粱	26.50 a
糙米	22.00 a
麥片	10.88 b
茶葉	6.75 b
咖啡	6.67 b
蔗渣	5.34 b
蕎麥	1.38 b

病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 接種於不同介質之產孢情形如圖 9 與表 5 所示，亦以高粱為介質者產孢量最高。

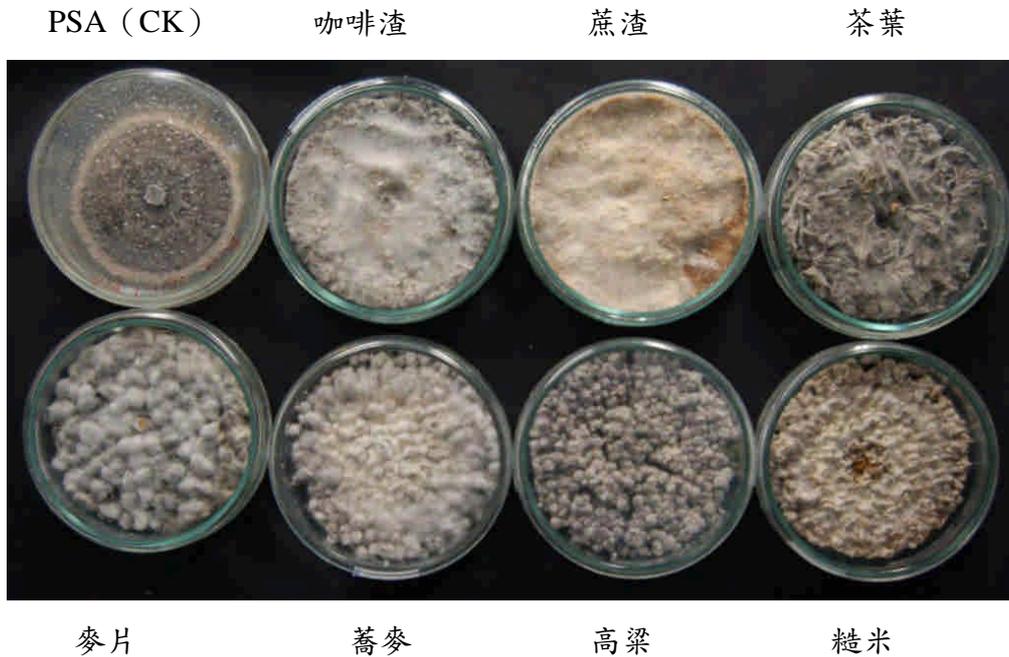


圖 9. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 接種於不同介質 20 天後之情形

表 5. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 接種於不同介質 30 天後孢子濃度

介質	孢子濃度 (10^5 spores/mL)
PSA	3.67 b
高粱	6.34 a
麥片	4.67 b
糙米	4.00 b
茶葉	1.50 c
咖啡	1.34 c
蕎麥	1.17 c
蔗渣	0.84 c

(二) 不同培養溫度對 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 產孢之影響

以高粱為介質之平板培養基，將病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 培養於不同溫度。結果如圖 10 所示，以培養於 28°C 下其孢子濃度最高，可達 20.34×10^5 spores/mL (表 6)，其次依序為 24°C 與 20°C，而 16°C、32°C 與 36°C 則無觀察到孢子。

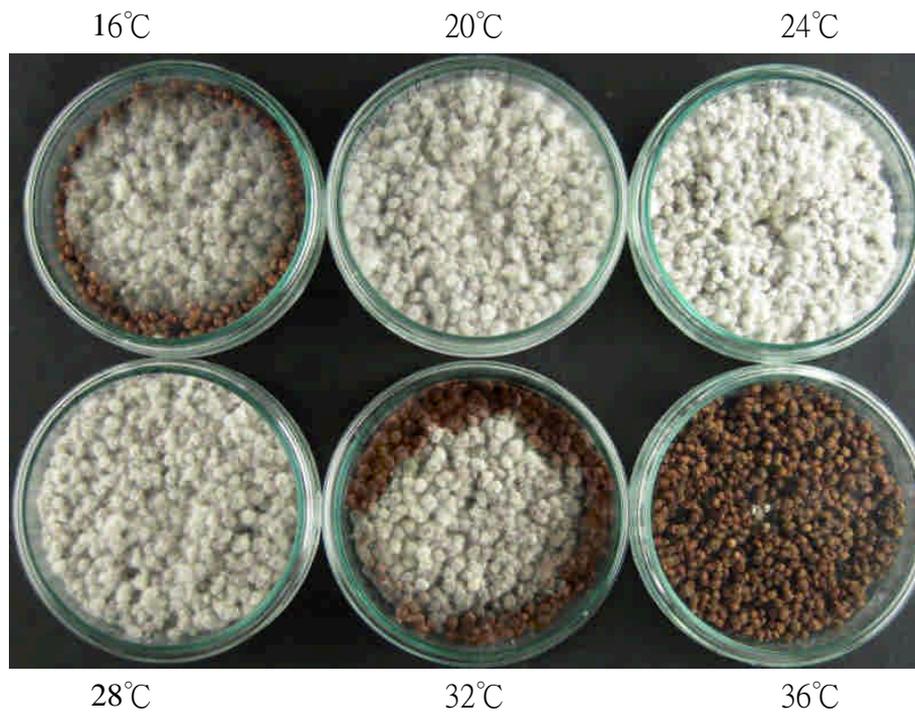


圖 10. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (Fic-2) 以高粱培養於不同溫度下，兩週後之情形

表 6. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (Fic-2) 以高粱培養於不同溫度下 30 天後孢子濃度

溫度	孢子濃度 (10^5 spores/mL)
16°C	0.00 b
20°C	4.84 b
24°C	16.50 a
28°C	21.34 a
32°C	0.00 b
36°C	0.00 b

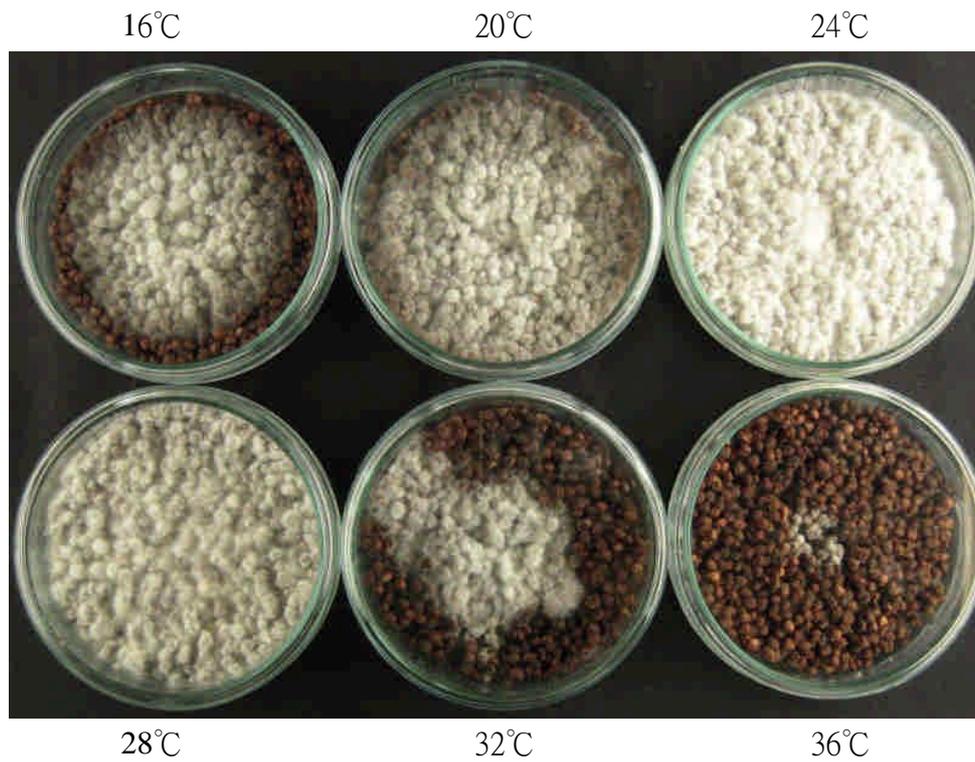


圖 11. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a)以高粱培養於不同溫度下，兩週後之情形

表 7. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a)接種於不同溫度 30 天後孢子濃度

溫度	孢子濃度 (10^5 spores/mL)
16°C	0.00 c
20°C	1.17 c
24°C	3.34 b
28°C	5.50 a
32°C	0.00 c
36°C	0.00 c

病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a)培養於不同溫度之試驗中(圖 11)，結果以培養於 28°C 之孢子濃度較高，約可達 5.50×10^5 spores/mL (表 7)，其次依序為 24°C 與 20°C，而 16°C、32°C 與 36°C 亦無觀察到孢子。

(三) 不同光照對 *Pestalotiopsis* (F1c-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)產孢之影響

以高粱為介質之平板培養基，將病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2)培養於光照下。結果如圖 12 所示，以培養於日光燈及 LED 藍光下之孢子濃度較高，分別可達 12.15×10^5 spores/mL 與 11.50×10^5 spores/mL (表 8)。

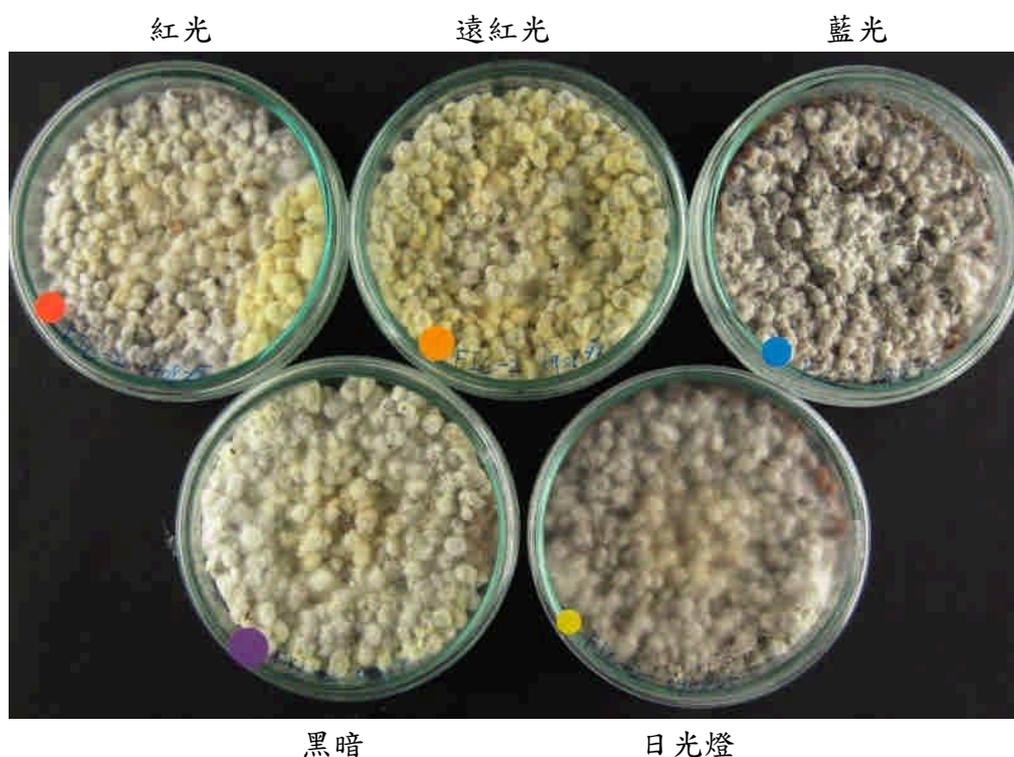


圖 12. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2)以高粱培養於不同光照下，兩週後之情形

表 8. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2)培養於不同光照下 30 天後孢子濃度

光照	孢子濃度 (10^5 spores/mL)
日光燈	12.15 a
LED 紅光	4.84 b
LED 遠紅光	4.67 b
LED 藍光	11.50 a
黑暗	6.84 b

如圖 13 所示，病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 培養於不同光照之試驗中，結果以培養於藍光及日光燈之孢子濃度較高，分別可達 3.34×10^5 spores/mL 與 3.17×10^5 spores/mL (表 9)。

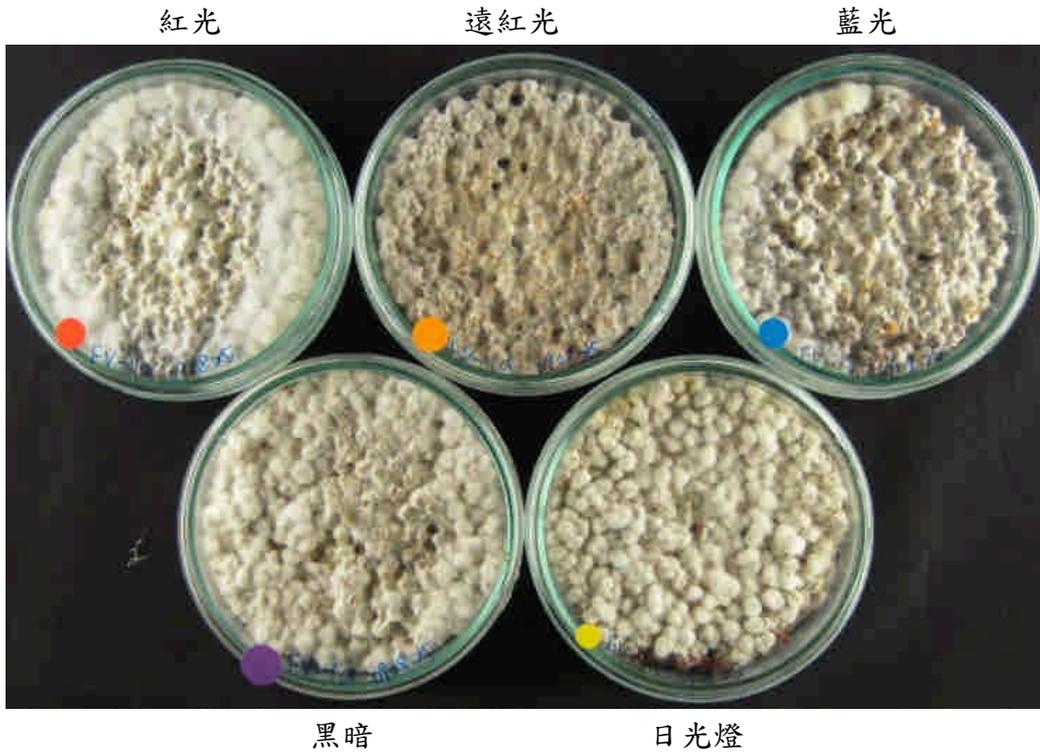


圖 13. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 以高粱培養於不同光照下，兩週後之情形

表 9. 小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 培養於不同光照下 30 天後孢子濃度

光照	孢子濃度 (10^5 spores/mL)
日光燈	3.17 ab
LED 紅光	1.17 c
LED 遠紅光	2.17 bc
LED 藍光	3.34 a
黑暗	2.50 ab

(四) 太空包量產孢子

以高粱為介質製作太空包培養 *Pestalotiopsis* (F1c-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)於 28℃，每天照光 12 小時及黑暗 12 小時下，20 天後已產出大量孢子，30 天後每包 F1c-2 太空包以 2000mL RO 水洗出的孢子濃度約為 4×10^6 spores/mL，而 FV-1a 太空包者洗出的孢子濃度約為 1×10^6 spores/mL(圖 14)。



圖 14. 高粱太空包培養小花蔓澤蘭病原菌 20 天後的情形，左為 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 太空包；右為 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 太空包。

二、 小花蔓澤蘭噴施病原菌對種子百粒重與發芽率之影響

於 97 年 11 月 8 日起在六龜山區選擇小花蔓澤蘭群聚區，噴施兩種病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)，待 12 月小花蔓澤蘭種子開始成熟，於 97 年 12 月 24 日開始定期上山，陸續採收種子調查其百粒重與發芽率，結果如表 10 所示，小花蔓澤蘭病原菌 F1c-2，在六龜三樣區平均百粒重(mg)及平均發芽率(%) 都與對照組(CK)有顯著差異。FV-1a 所設置三個樣區中，由於樣區三在種子採收期發現種子量不足，因此此次實驗將不採用樣區三之數據，故未記錄其結果；而樣區一與樣區二之平均百粒重(mg)及平均發芽率(%)皆與對照組(CK)有顯著性差異(表 11)。

表 10. 接種 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 之 10^5 /mL 孢子懸浮液於六龜山區小花蔓澤蘭花部種子採收後平均百粒重(mg)及平均發芽率(%)

F1c-2	樣區一	樣區二	樣區三	平均	CK
平均百粒重 mg	4.76 b	5.44 b	5.38 b	5.19	9.62 a
相對百粒重%	(49.48)	(56.55)	(55.93)	(53.99)	(100)
平均發芽率%	12.00 b	17.50 b	15.50 b	15.00	49.5 a
相對發芽率%	(24.24)	(35.35)	(31.31)	(30.30)	(100)

表 11. 接種 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 之 10^5 /mL 孢子懸浮液於六龜山區小花蔓澤蘭花部種子採收後平均百粒重(mg)及平均發芽率(%)

FV-1a	樣區一	樣區二	平均	CK
平均百粒重 mg	7.26 b	4.92 c	6.09	9.62 a
相對百粒重%	(75.47)	(51.14)	(63.31)	(100)
平均發芽率%	27.00 b	10.50 c	18.75	49.50 a
相對發芽率%	(54.55)	(21.21)	(37.88)	(100)

三、小花蔓澤蘭病原菌安全性評估

(一) 小花蔓澤蘭病原菌對蜜棗果實之致病性

病原真菌對蜜棗果實安全性評估試驗中，接種病原真菌 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 和 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 的 10^2 與 10^5 spores/mL 濃度於蜜棗果實，觀察其發病情形，結果顯示果實傷口皆無發病，兩種病原真菌對蜜棗果實無致病性。

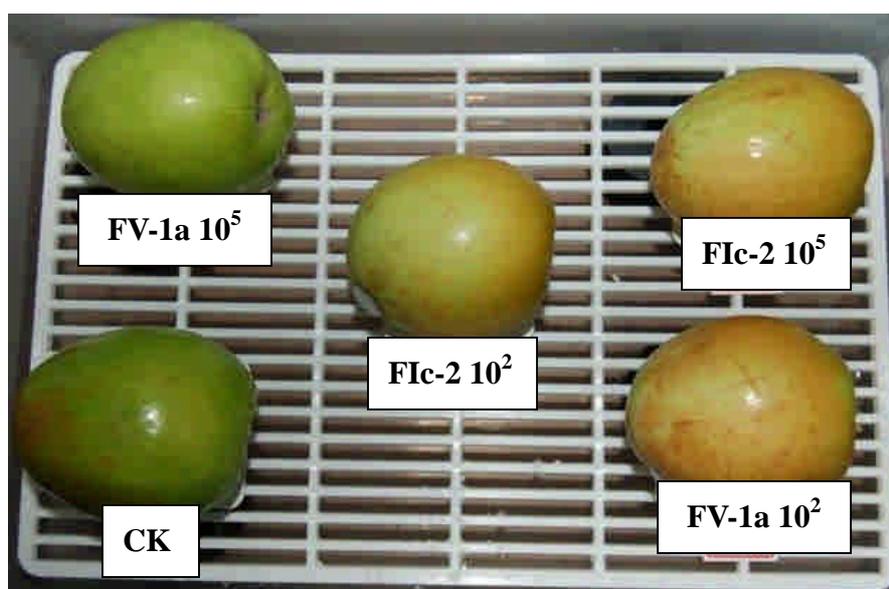


圖 15. 蜜棗果實在接種 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 和 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 後四天傷口皆無發病

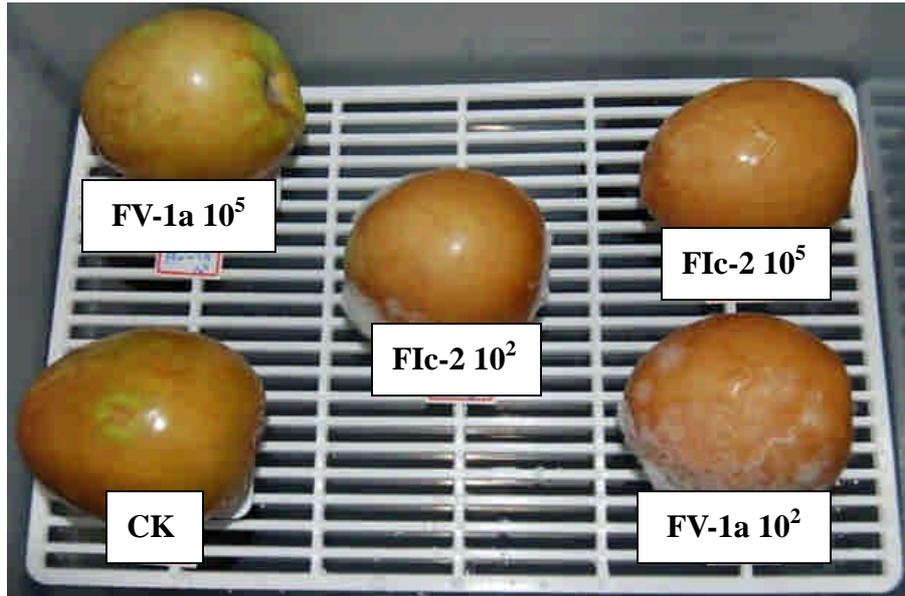


圖 16. 蜜棗果實在接種 *Pestalotiopsis* (Fic-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)後六天傷口皆無發病

(二) 小花蔓澤蘭病原菌對番石榴果實之致病性

病原真菌對番石榴果實安全性評估試驗中，分別接種病原真菌 *Pestalotiopsis* (Fic-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)的 10^2 與 10^5 spores/mL 濃度於番石榴果實，觀察其發病情形，結果顯示果實傷口皆無發病，兩種病原真菌對番石榴果實無致病性。

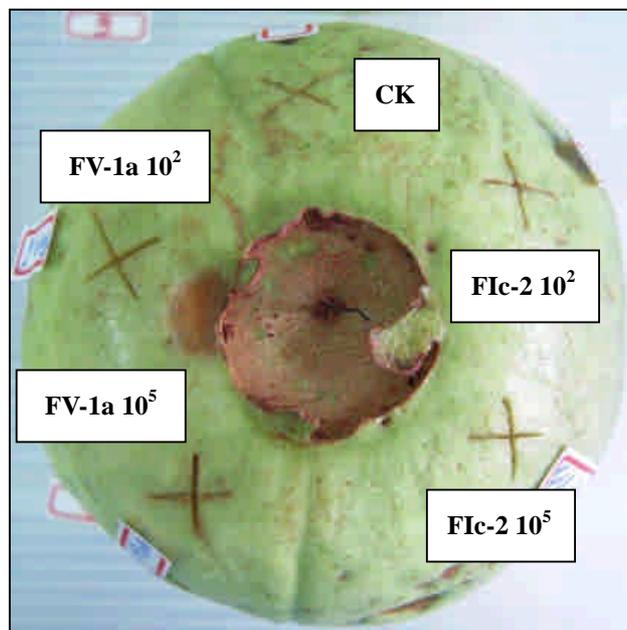


圖 17. 番石榴果實在接種 *Pestalotiopsis* (Fic-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)兩週後傷口皆無發病

(三) 小花蔓澤蘭病原菌對芒果果實之致病性

病原真菌對芒果果實安全性評估試驗中，分別接種病原真菌 *Pestalotiopsis* (Fic-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)的 10^2 與 10^5 spores/mL 濃度於芒果果實，觀察其發病情形，結果顯示果實傷口皆無發病，兩種病原真菌對芒果果實無致病性。

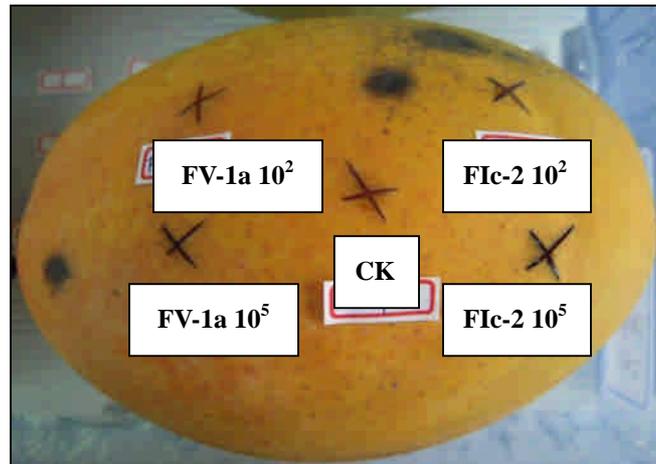


圖 18. 芒果果實在接種 *Pestalotiopsis* (Fic-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)兩週後傷口皆無發病

(四) 小花蔓澤蘭病原菌對蓮霧花器之致病性

病原真菌對蓮霧花器安全性評估試驗中，噴施病原真菌孢子懸浮液於花序後套袋，待果實膨大飽滿且呈紅色時則予採收。圖 19 為蓮霧花器接種病原真菌 *Pestalotiopsis* (Fic-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)的 10^2 /mL 與 10^5 /mL 孢子懸浮液，20 天後果實成熟情形(圖 20)，大部分花器都有膨大為果實，並未受到病原菌影響結實(表 12)。

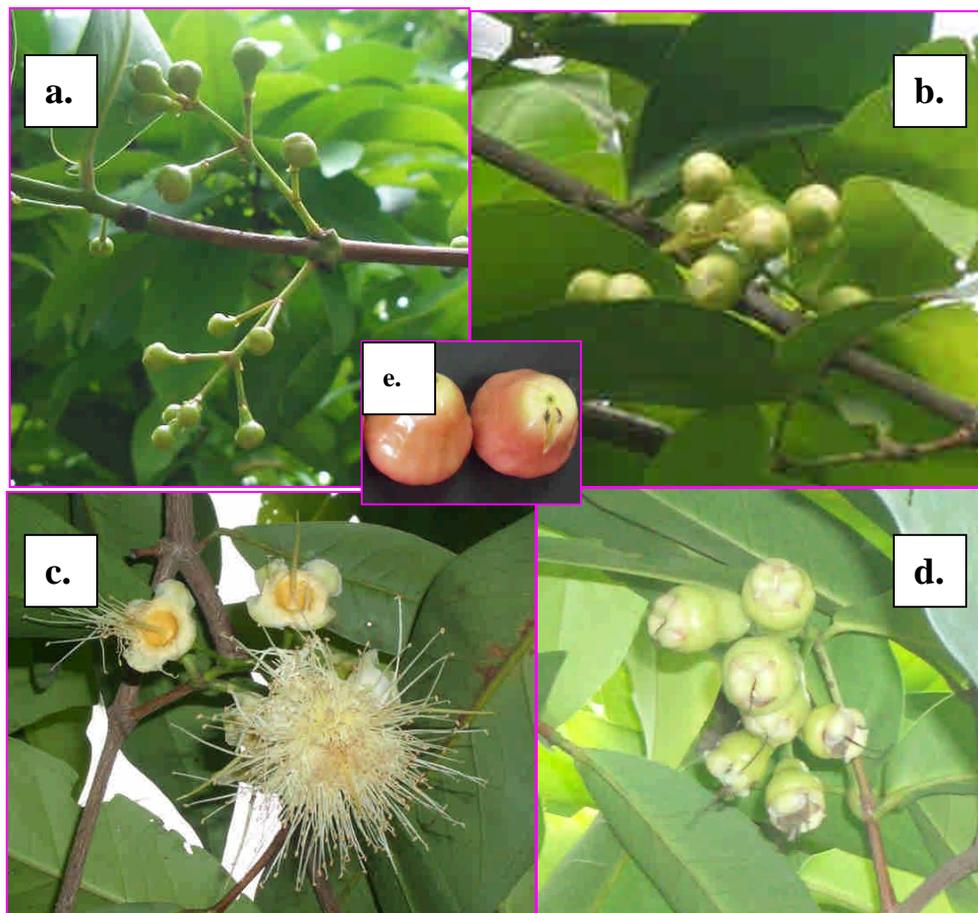


圖 19. 蓮霧不同花期之情形：a. 花苞剛出現；b. 花苞膨大，準備開花；
c. 花朵綻放；d. 果實開始膨大 e. 採收之蓮霧果實

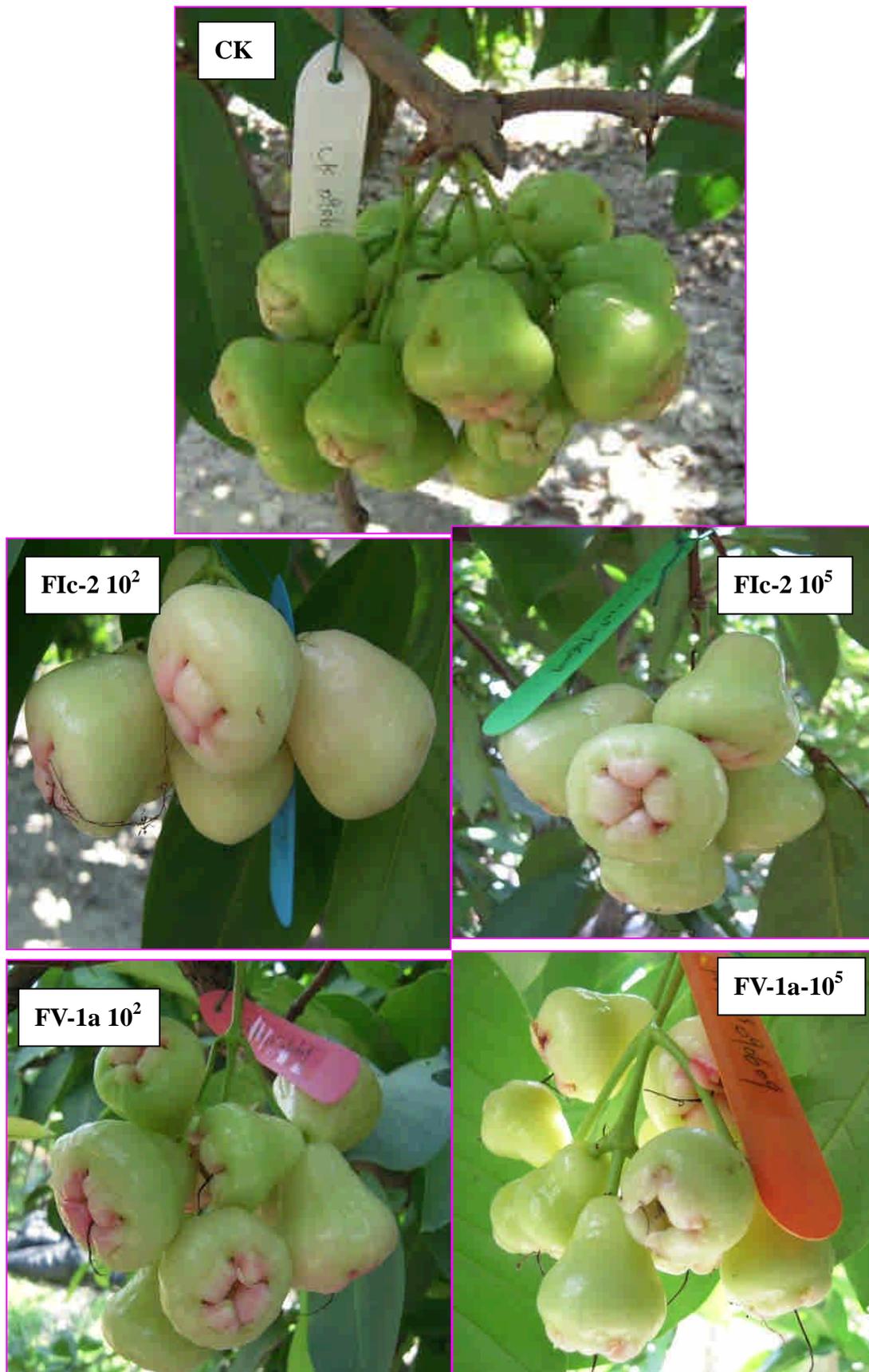


圖 20. 蓮霧花器分別接種 *Pestalotiopsis* (F1c-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)的 10² 與 10⁵ 孢子懸浮液 20 天後果實成熟情形。

表 12. 蓮霧花序接種病原真菌 *Pestalotiopsis* (Fic-2)和 *Pestalotiopsis* (FV-1a)孢子懸浮液 20 天後果實結實紀錄

處理	花序重複數	果實數 (顆)	未發育成果實之花數 (朵)	未發育成果實比率 (%)
CK	1	20	2	9
	2	遭強風吹落	-	-
	3	5	0	0
Fic-2 10 ²	1	4	0	0
	2	遭強風吹落	-	-
	3	20	0	0
Fic-2 10 ⁵	1	3	0	0
	2	6	1	14
	3	11	0	0
FV-1a 10 ²	1	8	0	0
	2	10	0	0
	3	14	2	13
FV-1a 10 ⁵	1	6	1	14
	2	12	0	0
	3	14	0	0

四、利用 RAPD 以及 ITS 進行小花蔓澤蘭病原真菌鑑定分析

病原真菌之 DNA 經 RAPD 檢測後，四種 *Pestalotiopsis* 屬菌種中較能表現區別性的 RAPD primer 分別為 OPA-10、OPA-12、OPA-18、OPA-19、OPA-20、OPB-01、OPB-06、OPB-08 及 OPB-10。

研究結果顯示四種菌之 DNA 經 OPA-10 引子 PCR 檢測後，在 1kb DNA 片段的位置，出現 *Pestalotiopsis psidii* 與 *Pestalotiopsis* (Fic-2)有相同大小之條帶，*Pestalotiopsis eugeniae* 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)則無此條帶(圖 21)，而圖 22 結果指出 OPA-12 PCR 產物檢測四種菌種，在 0.5 kb DNA 片段的位置，四種菌種中出現 *Pestalotiopsis eugeniae*、*Pestalotiopsis psidii* 與 *Pestalotiopsis* (Fic-2)有相同大小之條帶，*Pestalotiopsis* (FV-1a)則無此條帶，利用引子 OPA-12 可以區別鑑定進行 *Pestalotiopsis* (FV-1a)與其他三個菌種。以引子 OPA-18 PCR 產物檢測後，在 0.7 kb DNA 片段的位置，四種菌種中出現 *Pestalotiopsis eugeniae* 與 *Pestalotiopsis psidii* 有相同大小之條帶，*Pestalotiopsis* (Fic-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)有相同大小之條帶(圖 23)。利用引子 OPA-19 PCR 產物電泳分析後，在 0.6 kb DNA 片段的位置，四種菌種中出現 *Pestalotiopsis eugeniae* 與 *Pestalotiopsis psidii* 有相同大小之條帶，*Pestalotiopsis* (Fic-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)有相同大小之條帶(圖 24)。由圖 25 得知，以引子 OPA-20 PCR 產物之電泳分析，在 1 kb DNA 片段的位置，四種菌種中

Pestalotiopsis eugeniae 與其他 *Pestalotiopsis psidii*、*Pestalotiopsis* (F1c-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 之 DNA 片段有差異，因此 OPA-20 可以區別鑑定 *Pestalotiopsis eugeniae* 與其他三個菌種之不同。

利用引子 OPB-01 PCR 產物檢測後，在 0.7 kb DNA 片段的位置，四種菌種中出現 *Pestalotiopsis psidii* 與 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 有相同大小之條帶，*Pestalotiopsis eugeniae* 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 則無此條帶(圖 26)。以引子 OPB-06 PCR 產物分析後，在 0.7 kb DNA 片段的位置，四種菌種中出現 *Pestalotiopsis eugeniae* 與 *Pestalotiopsis psidii* 有相同大小之條帶，*Pestalotiopsis* (F1c-2) 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 有相同大小之條帶(圖 27)。由圖 28 得知，利用引子 OPB-08 PCR 產物檢測後，在 1 kb DNA 片段的位置以上，四種菌種中出現 *Pestalotiopsis eugeniae*、*Pestalotiopsis psidii* 與 *Pestalotiopsis* (FV-1a) 有相同大小之條帶，*Pestalotiopsis* (F1c-2) 則無，因此 OPB-08 可以進行區別 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 與其他三個菌種之鑑定。以引子 OPB-10 PCR 產物分析後，在 0.1 kb DNA 片段的位置，四種菌種中僅 *Pestalotiopsis psidii* 無出現該條帶，在 0.3 kb DNA 片段，四種菌種中僅 *Pestalotiopsis psidii* 出現該條帶，在 1.2 kb DNA 片段，四種菌種中僅 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 出現該條帶(圖 29)，

因此引子 OPB-10 可以區別鑑定 *Pestalotiopsis* (F1c-2) 與其他三個菌種之不同。由 OPB-10 之結果，進而選殖 0.1 kb 及 0.3 kb、1.2 kb DNA 片段，進行序列分析(表 13) 與比對，因而為 0.1 kb 及 0.3 kb DNA 片段設計專一性的引子(表 14)，1.2 kb DNA 片段則正在進行選殖中。

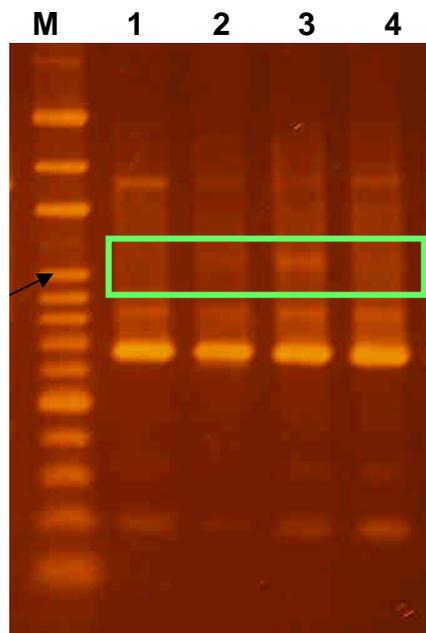


圖 21. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPA -10 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 1kb DNA 片段(箭頭所指)，四種菌種中出現 2 與 3 有相同大小之條帶，1 與 4 則無此條帶(方框所指)。M: DNA marker; 1: *Pestalotiopsis eugeniae*; 2: *Pestalotiopsis psidii*; 3: *Pestalotiopsis* (F1c-2); 4: *Pestalotiopsis* (FV-1a)。

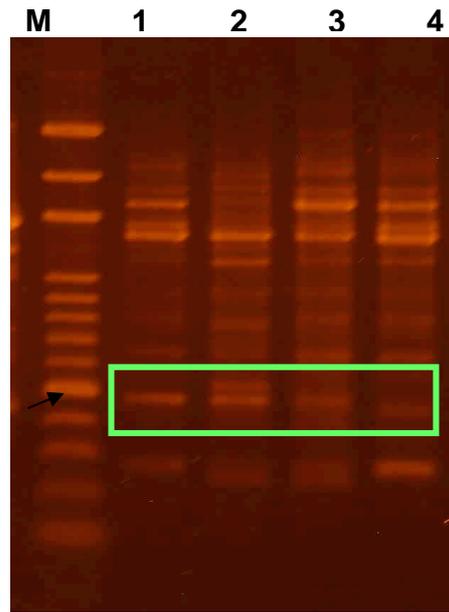


圖 22. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPA -12 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 0.5 kb DNA 片段(箭頭所指)，四種菌種中出現 1、2 與 3 有相同大小之條帶，4 則無此條帶(方框所指)。M：DNA marker；1：*Pestalotiopsis eugeniae*；2：*Pestalotiopsis psidii*；3：*Pestalotiopsis* (F1c-2)；4：*Pestalotiopsis* (FV-1a)。

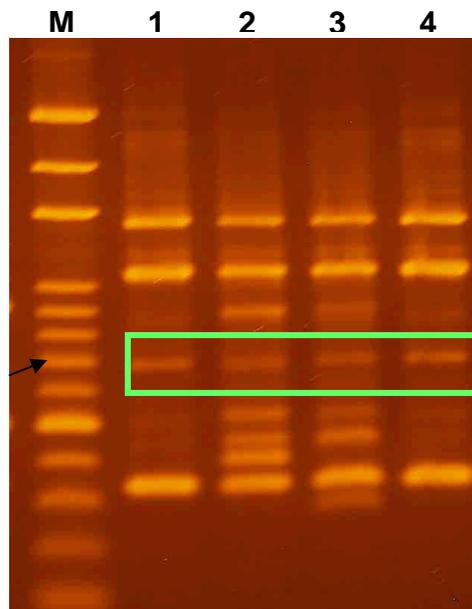


圖 23. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPA -18 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 0.7 kb DNA 片段(箭頭所指)，四種菌種中出現 1 與 2 有相同大小之條帶，3 與 4 有相同大小之條帶(方框所指)。M：DNA marker；1：*Pestalotiopsis eugeniae*；2：*Pestalotiopsis psidii*；3：*Pestalotiopsis* (F1c-2)；4：*Pestalotiopsis* (FV-1a)。

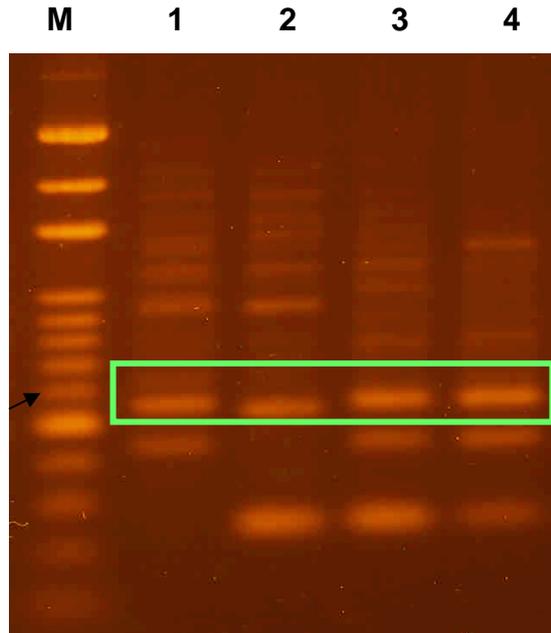


圖 24. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPA -19 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 0.6 kb DNA 片段(箭頭所指)，四種菌種中出現 1 與 2 有相同大小之條帶，3 與 4 有相同大小之條帶(方框所指)。M：DNA marker；1：*Pestalotiopsis eugeniae*；2：*Pestalotiopsis psidii*；3：*Pestalotiopsis* (Flc-2)；4：*Pestalotiopsis* (FV-1a)。

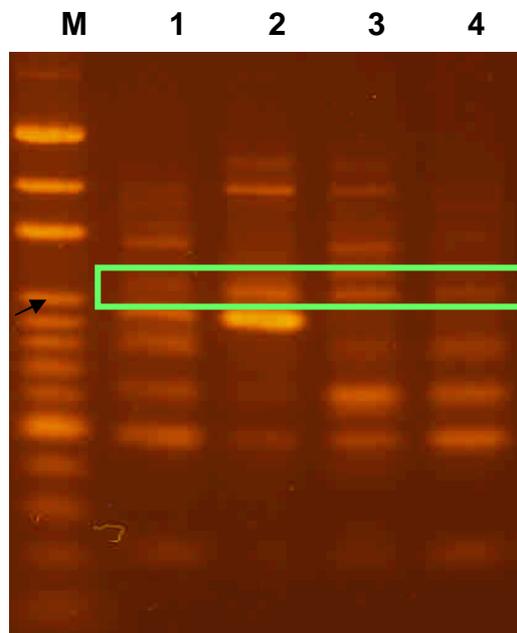


圖 25. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPA -20 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 1 kb DNA 片段(箭頭所指)，四種菌種中 1 與其他 2、3 與 4 之 DNA 片段有差異(方框所指)。M：DNA marker；1：*Pestalotiopsis eugeniae*；2：*Pestalotiopsis psidii*；3：*Pestalotiopsis* (Flc-2)；4：*Pestalotiopsis* (FV-1a)。

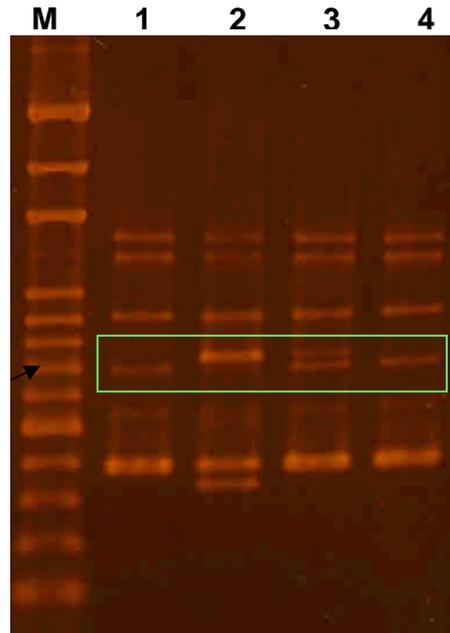


圖 26. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPB -01 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 0.7 kb DNA 片段(箭頭所指)，四種菌種中出現 2 與 3 有相同大小之條帶，1 與 4 則無此條帶(方框所指)。M：DNA marker；1：*Pestalotiopsis eugeniae*；2：*Pestalotiopsis psidii*；3：*Pestalotiopsis* (Flc-2)；4：*Pestalotiopsis* (FV-1a)。

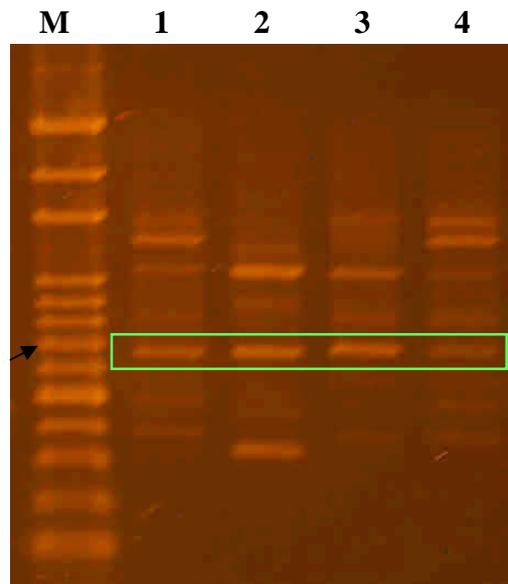


圖 27. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPB -06 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 0.7 kb DNA 片段(箭頭所指)，四種菌種中出現 1 與 2 有相同大小之條帶，3 與 4 有相同大小之條帶(方框所指)。M：DNA marker；1：*Pestalotiopsis eugeniae*；2：*Pestalotiopsis psidii*；3：*Pestalotiopsis* (Flc-2)；4：*Pestalotiopsis* (FV-1a)。

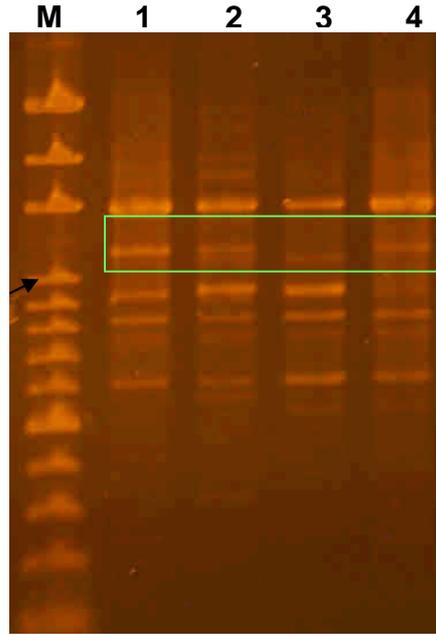


圖 28. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPB -08 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 1 kb DNA 片段(箭頭所指)以上，四種菌種中出現 1、2 與 4 有相同大小之條帶，3 則無(方框所指)。M：DNA marker；1： *Pestalotiopsis eugeniae*；2： *Pestalotiopsis psidii*；3： *Pestalotiopsis* (F1c-2)；4： *Pestalotiopsis* (FV-1a)。

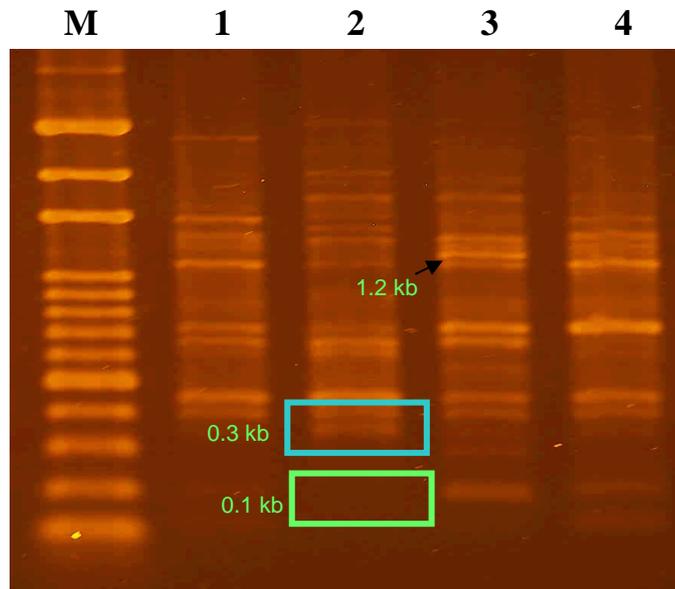


圖 29. *Pestalotiopsis* 屬四種菌種之 OPB -10 PCR 產物之電泳分析。DNA 經 PCR 檢測後，在 0.1 kb DNA 片段，四種菌種中僅 2 無出現該條帶(下方框所指)，在 0.3 kb DNA 片段，四種菌種中僅 2 出現該條帶(上方框所指)，在 1.2 kb DNA 片段，四種菌種中僅 3 出現該條帶(箭頭所指)。M：DNA marker；1： *Pestalotiopsis eugeniae*；2： *Pestalotiopsis psidii*；3： *Pestalotiopsis* (F1c-2)；4： *Pestalotiopsis* (FV-1a)。

表 13. *Pestalotiopsis psidii* 經 OPB-10 檢測之 DNA 差異片段定序結果

差異片段名稱	序列
OPB10 0.1 kb	ACCTGGGTTGGACGCCGGAAGAAGAAAGTTGGTCGACTATGATTCTTCGGGCAGATGA ACCGAGACTTCCATCTACCTCTCATGCTTGTCAATAGTTTTGGCCCTGGGGCATTGCTTTT GTTTGGCTACCAGAAAAGTCACCTTTGGAAGGGATGTATCGCATTGGGCATGGCCAAC TGTATTCTTTCT
OPB10 0.3 kb	TGATTCTTGATCGAACCGCTTTTTATTGTCGTATAGTAAGTTTCCTTCTCAAATTC TCATCATAAGTTGTATGAGGATTATTGGGAAACACCATAAAGGCCTACGTCATCAGGATG CCTGCGGCTAGTAGTTGTACAGGTAGGCGACTAACAAAAATCATTTTGGCTGGGCATACAC ACAGAATTGGCGGGGCCCGGATAAGATGTCAAAAGCTCAACCCCCACTTCAATACCT TGCTATGCCTTAACATGCTCACCAGAAAGAGCCCGTCTGCACCAGCGTAGGGACCTAC TTTCGAATTGGAGTAGTACATAATAGTATAGCCCTACTGTTCTCCATT

表 14. *Pestalotiopsis* 屬四個菌種間 RAPD 分析 DNA 片段差異以及 ITS 之引子設計

引子名稱	引子序列
OPB10-2-300-31F	CGTATAGTAAGGTTTCCTTCTCAAATTC
OPB10-2-300-331R	GGCTATACTATTATGTACTACTCCAATTCGAA
OPB10-3-163-7F	GTTGGACGCCGGAAGAAGA
OPB10-3-163-169R	TGCCCAATGCGATACATCC
28rs-ITS-1F	TCCGTAGGTGAACCTGCGGA
28rs-ITS-548R	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAAGTT

結 論

篩選出小花蔓澤蘭病原真菌 *Pestalotiopsis*(F1c-2)與 *Pestalotiopsis* (FV-1a)量產孢子最適介質為高粱，培養於 28°C 時孢子濃度最高，若將病原真菌置於 LED 藍光與日光燈下皆有不錯的效果，而 F1c-2 置於紅光及遠紅光下菌絲易偏黃，目前可利用穀粒太空包培養達到量產孢子之目的。已應用在六龜地區之小花蔓澤蘭孢子懸浮液噴施試驗。病原真菌 F1c-2 與 FV-1a 之孢子懸浮液大面積噴施於六龜地區小花蔓澤蘭花器，均能降低種子百粒重與抑制發芽率。

Pestalotiopsis 屬病原真菌之 DNA 經 PCR 檢測後，在菌種中較能表現出區別性的 RAPD 引子：F1c-2 菌種為 OPB-08 與 OPB-10；FV-1a 菌種則為 OPA-12。未來會將其他具有差異性之條帶進行選殖並定序，選殖定序後會進行品種間或網路上真菌序列資料庫之比對，並將設計好之具有專一性的引子進行四個品種的 PCR 檢測。另外，還將利用 ITS 專屬引子進行 *Pestalotiopsis* 屬四個物種之 PCR 檢測、DNA 片段選殖以及序列比對等工作，待完成後續未知菌種親緣關係之鑑定。

將病原菌之孢子懸浮液接種於蜜棗、番石榴及芒果果實，果實傷口皆無發病，因此推測病原菌對此三種果實應無致病性。而接種病原菌之孢子懸浮液於蓮霧花器，20 天後觀察蓮霧果實有膨大成健康果實，對蓮霧果實發育並無影響，顯示兩種病原菌有潛力發展為真菌性除草劑。

參考文獻

1. 王均琄。2001。台灣林地雜草-小花蔓澤蘭種子發育與萌芽階段之生物與藥劑防除。行政院農業委員會林務局八十九年度委託研究計畫成果報告。
2. 王兆桓、邱錫佟、郭寶章。1993。三種除草劑對紅檜造林地之除草效應。中華林學季刊 26(4): 49-56。
3. 林正忠、蔡叔芬、卯都木文代。2004。台灣南部大氣真菌孢子圖鑑。行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗所發行。
4. 李文權(譯)。1992。雜草的生物防除。科學農業 40(3/4): 219-296。
5. 徐玲明。2003。蔓澤蘭之生育特性及化學防治。小花蔓澤蘭危害與管理研討會專刊 pp.111-121。
6. 郭寶章。1980。林地除草劑—克林草。豐年 30(12): 30-31。
7. 郭寶章、林文鎮、施文君。1974。臺灣泡桐造林地省工除草方法之研究。中華林學季刊 7(2): 1-16。
8. 郭寶章、林文鎮、施文君。1976。臺灣泡桐造林地省工除草方法之研究—三年研究之綜合結果。中華林學季刊 9(4): 41-48。
9. 郭耀綸、陳志遠、林杰昌。2002。藉連續切蔓法及相剋作用防治外來入侵的小花蔓澤蘭。台灣林業科學 17:171-181。
10. 陳仁昭、梁文進、陳滄海、林正忠、蔡叔芬。2005。蓮霧果樹重要病蟲害圖鑑。pp.66-68。國立屏東科技大學農業推廣委員會發行。
11. 陳滄海、陳仁昭、汪慈慧、王均琄、趙永椿。2003。小花蔓澤蘭之生物防治。小花蔓澤蘭危害與管理研討會專刊。pp.79-96。中華民國雜草學會與行政院農委會花蓮區農業改良場編印。
12. 傅春旭、鍾詩文、姚瑞禎、胡寶元。2003。小花蔓澤蘭的白絹病。台灣林業科學 18(1):81-4。
13. 曾顯雄。2005。小花蔓澤蘭之真菌性天敵生物防治研究。九十四年度行政院農業委員會林務局暨所屬機關委託研究計畫。
14. 蔡文福。1988。雜草防除之研究與展望。科學農業 36(9/10): 290-294。
15. 蔣永正。1985。雜草對殺草劑的抗藥性。農藥世界 26: 68-69。
16. Altom J. V. and D. S. Murray. 1996. Factors affecting eclipta (*Eclipta prostrata*) seed germination. Weed Technology 10: 727-731.
17. Auld B. A. and Morin L. 1995. Constraints in the development of bioherbicides. Weed Technology 9: 638-652.
18. Daniel, J. T., Templeton, G. E., Smith, Jr. R. J. and W. T. Fox. 1973. Biological control of northern jointvetch in rice with an endemic fungai disease. Weed Science 21(4): 303-307.
19. Dyer, W. E. 1991. Applications of molecular biology in weed science. Weed Science 39: 482-488.
20. Galway, K. E., and S. J. Brooks. 2007. Control recommendations for Mikania vine

- (*Mikania micrantha*) and Siam weed (*Chromolaena odorata*) in Australia. Proceedings of the Seventh International Workshop on Biological Control and Management of *Chromolaena odorata* and *Mikania micrantha*. pp. 106-115. Taiwan.
21. Hoagland, R. 1996. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. *Weed Technology* 10: 651-674.
 22. Holt, J. S. 1994. Impact of weed control on weeds: new problems and research needs. *Weed Technology* 8: 400-402.
 23. Huh, Y. H. and Y. H. Ko. 2007. Isolation of a *Pestalotiopsis* species Degrading Mucilage from Fruit of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. *J.Appl. Biol. Chem.* 50(4): 221-226.
 24. Inderjit. 2005. Plant invasions: Habitat invasibility and dominance of invasive plant species. *Plant and Soil* 277:1-5.
 25. Ismail, B. S., and L. S. Mah. 1993. Effects of *Mikania micrantha* H.B.K. on germination and growth of weed species. *Plant Soil* 157:107-113.
 26. Kirkpatrick, T. L., Templeton, G. E. and D. O. TeBeest. 1982. Potential of *Collettrichum malvarum* for biological control of prickly sida. *Plant Disease* 66: 323-325.
 27. Smith, Jr. R. J. 1986. Biological control of northern jointvetch (*Aeschynomene virginica*) in rice (*Oryza sativa*) and soybean (*Glycine max*)—a research's view. *Weed Science* 34(Suppl. 1): 17-23.
 28. Strobel, G. A. 1991. Biological control of weeds. *Scientific American*: 50-54.
 29. TeBeest, D. O. 1993. Biological control of weeds with fungal plant pathogens. In: *Exploitation of Microorganisms*. Ed Jones D.G., Chapman & Hall, London.
 30. Trujillo E. E. and J. N. David. 1995. Septoria leaf spot of lantana from ecuador: A potential biological control for bush lantana in forests of Hawaii. *Plant Disease* 79(8): 819-821.
 31. Wang, T., Y. Su, and G. Chen. 2007. Population Genetic Variation and Structure of the Invasive Weed *Mikania micrantha* in Southern China: Consequences of Rapid Range Expansion. *Journal of Heredity*. Article in Press.
 32. Waterhouse, B. M. 2003. Know your enemy: recent records of potentially serious weeds in northern Australia, Papua New Guinea and Papua (Indonesia). *Telopea* 10:477-485.
 33. Weidemann, G. J., TeBeest, D. O. and R. D. Cartwright. 1988. Host specificity of *Collettrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene* and *C. truncatum* in the leguminosae. *Phytopathology* 78(7): 986-990.
 34. Xie, Y., Z. Li, W. P. Gregg, and D. Li. 2001. Invasive species in China – an overview. *Biodivers. Conserv.* 10:1317-1341.

附 錄

一、期中簡報審查委員意見回覆表

審查委員	審查意見	意見回覆
林業試驗所 張研究員東柱	1. 請將病原菌的學名(至少屬名)列出。	謝謝委員指正與建議，小花蔓澤蘭病原真菌Fic-2與FV-1a皆 <i>Pestalotiopsis</i> 屬。故後續學名將寫成 <i>Pestalotiopsis</i> (Fic-2)， <i>Pestalotiopsis</i> (FV-1a)。
中興大學 陳教授隆鐘	1.請將Fic-2、FV-1a等兩種真菌之生理、生化及生態等再加強研究。	謝謝委員指正與建議，本研究已完成對二菌種之最適生長溫度、pH、培養基、光照等生理試驗，未來將加強其分生與生態之研究。
	2.對培養產孢之基質之開發，希望以更實用性之基質及推廣可行性加以研究。除此，培養之器材及方式亦請加以改良研究。	謝謝委員指正與建議，本研究曾進行液態搖瓶與固態穀粒培養，結果液態培養之產孢量極少，僅培養液表面產孢，而固態培養病原真菌，成本低廉，孢子產量回收豐碩，故仍選擇使用固態穀粒培養。
	3.請將Fic-2、FV-1a二菌加以鑑定及保存，並登錄其基因資料。而該等菌株對小花蔓澤蘭之寄生專一性，請再加以註明。	謝謝委員指正與建議，未來將進行RAPD與ITS之親源鑑定，並與Gene bank或NCBI作親源關係之比對。
台北教育大學 何教授小曼	1.宜將此兩種病原菌加以鑑定並明瞭其生活過程，以便於應用。	謝謝委員指正與建議，擬以孢子形態，配合分子生物分析方法，加以鑑定。

二、期末簡報審查委員意見回覆表

審查委員	審查意見	意見回覆
林業試驗所 張研究員東柱	1. 兩株具有潛力的菌株，可降低發芽率，需進一步評估降低發芽率的作用是否足以有效抑制小花蔓澤蘭的危害。	謝謝委員指正與建議，後續將進一步評估。
中興大學 陳教授隆鐘	1. 由試驗結果得知，F1c-2、FV-1a菌株於16°C及32°C以上均不產孢，而於24°C及28°C之條件下產孢量較理想。因此，請思考於田間應用時之較佳環境為何，才能發揮作用。且孢子懸浮液於使用前，應如何調製及貯藏運用、田間使用。	謝謝委員指正與建議，F1c-2、FV-1a實驗室測試產孢溫度在20~28°C左右，病原真菌孢子懸浮液應用期在10-11月，此時台灣平均氣溫約為20~24°C，而南部平均氣溫約為23~26°C左右，適合該菌在自然界產孢。
	2. 孢子懸浮液製備後，其懸浮液配方為何才能保持較穩定之孢子發芽活性，除此，在貯存過程中亦請調查研究該等孢子是否有發芽之現象。因此現象會影響孢子侵染之能力，另外亦請調查侵染過程之現象（Infection process）作為防治之指標。	謝謝委員指正與建議，該項建議非常重要，目前已經開始進行預備試驗，未來將調查其侵染過程。
	3. F1c-2、FV-1a菌株之鑑定，除了分子比對外，亦請著手從型態特性等加以鑑定。	謝謝委員指正與建議，目前病原真菌孢子已使用光學顯微鏡鑑定，未來將用SEM進一步觀察其菌絲與孢子形態，將配合分生比對作鑑定。
台北教育大學 何教授小曼	1. 對於病原性真菌之親源關係進行檢討，持續中。	謝謝委員指正與建議，目前已完成RAPD分子檢測，另ITS親源鑑定仍在進行中，已有初步結果，但仍需進一步鑑定。