

# 臺灣楊桃炭疽病菌之鑑定

段中漢<sup>1\*</sup>、陳冠穎<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 農業藥物毒物試驗所農藥應用組，臺灣 臺中市。

\* 聯絡作者，E-mail: chduan@tactri.gov.tw

## 摘要

段中漢、陳冠穎。2023。臺灣楊桃炭疽病菌之鑑定。植物醫學 65(2): 43-52。

由 *Colletotrichum* spp. 所引起的楊桃炭疽病是為害楊桃果實最嚴重也最普遍的病害，受害果實完全喪失商品價值。本研究針對2014~2019年採集自臺灣各地的25株楊桃炭疽病菌株進行菌種鑑定，部分菌株並作病原性測定依據分生孢子形態及ITS核酸序列，供試菌株均屬 *C. gloeosporioides* species complex。應用多基因 (ITS、*ACT*、*TUB2*及*CHS-1*) 序列以及單基因*ApMat*序列進行親緣關係分析，結果一致顯示楊桃炭疽病菌主要菌種為 *C. siamense* (佔88%)，次要菌種為 *C. fruticola* (佔12%)。 *ApMat* 基因之分析結果除與多基因者類似外，其解析度甚且更佳。接種試驗證實，兩種病原菌均可對成熟楊桃果實造成感染，且病徵無差異。本文為首篇應用分子生物學技術鑑定臺灣楊桃炭疽病菌的報告。

關鍵詞：楊桃、炭疽病菌、台灣

## 緒言

楊桃 (*Averrhoa carambola* L.) 是熱帶果樹，性喜炎熱潮濕但排水良好的生長環境，頗適於臺灣中南部地區種植，現有栽培面積約600公頃，主要分布在臺南及彰化兩縣市<sup>(3)</sup>。楊桃是常綠果樹，全年均可連續開花及結果，每公頃產果近11.5噸，產量既大又無季節限制，頗受農友青睞<sup>(3)</sup>。楊桃果實多汁又富含蔗糖、果糖、葡萄糖、蘋果酸、草酸、檸檬酸、菸鹼酸、胡蘿蔔素及維他命A、C以及鈣、鉀、鎂、微量脂肪和蛋白質等各種營養素，是深受許多消費者喜愛的水果<sup>(23)</sup>。

由於楊桃栽培環境潮濕炎熱，正符合許多真菌性病害的好發條件，已知楊桃的真菌性病害有灰黴病、煤煙病、葉斑病、炭疽病、褐根病及白紋羽病等<sup>(2)</sup>，其中又以為害果實為主的炭疽病最為普遍也最為嚴重。國內外果樹炭疽病菌的學名常用

*Colletotrichum gloeosporioides*，其實是依據病原菌形態所定的一個複合種 (species complex)<sup>(19)</sup>。而 *C. gloeosporioides* 亦確實為該複合種所含近40個菌種 (species) 之一，但近年此菌種已不被認為是常見熱帶果樹炭疽病菌的學名。原因是，以多基因序列為依據的親緣性分析 (phylogenetic analysis) 顯示，許多果樹炭疽病菌與 *C. gloeosporioides* 現行的附加模式標本 (epitype) 分屬不同的演化支 (clade)<sup>(5, 25)</sup>。這使得在臺灣以該學名命名的許多作物炭疽病菌需要重新鑑定，包含楊桃在內的多種果樹炭疽病菌即屬其中<sup>(2)</sup>。

*Colletotrichum* 已知有190個菌種，但足以區別菌種間差異的形態特徵很有限，致常造成不同菌種間難以區別<sup>(19)</sup>。而一些命名年代久遠的菌種因已遺失其正模式標本 (holotype) 及活體菌株，使得欲應用分子生物學技術於 *Colletotrichum* 菌種鑑定而不可得。但隨著菌種附加模式標本及新模式標本 (neotype) 的重新指定，又開啟了應用核酸序列解決菌種鑑定的契機，而多基因譜系學 (multi-gene phylogeny) 則被認為是當前解決 *Colletotrichum* 菌種鑑定的有力工具<sup>(4, 6, 22)</sup>。肌動蛋白 (actin, *ACT*)、微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin 2, *TUB2*)、鈣調蛋白 (calmodulin, *CAL*)、幾丁質合成酶 (chitin synthase, *CHS-1*)、DNA連接酶 (DNA lyase, *Apn2*)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、麩胺合成酶 (glutamine synthetase, *GS*)、組織蛋白 (histone 3, *HIS3*)、核糖體核酸內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS)、錳超氧化物歧化酶 (manganese-superoxide dismutase, *SOD2*)、及配對型 (mating type gene, *Mat1*) 等多種基因序列已被廣泛應用於 *Colletotrichum* 菌種鑑定<sup>(19, 29)</sup>。 *C. gloeosporioides* species complex 更可單獨以 *ApMat* (*Apn2*-*Mat1*-2 intergenic spacer) 基因序列獲得幾與多基因序列分析相同的結果<sup>(27)</sup>，曾有研究顯示，楊桃炭疽病菌單獨以 *ApMat* 基因作親緣性分析的結果甚且優於多基因分析者<sup>(26)</sup>。

楊桃炭疽病在臺灣雖普遍發生，但相關的研究卻極其有限<sup>(2)</sup>，其炭疽病菌學名亦僅有 *C. gloeosporioides* 之記載<sup>(2)</sup>。近年來，由於分子生物技術的快速進步，國內對炭疽病菌的鑑定工作亦有長足進展，果樹炭疽病菌的鑑定報告更不斷發表

(8, 13, 21, 31)，這為炭疽病菌的相關研究樹立了良好的根基。由於 *Colletotrichum* 菌種分子鑑定技術的廣泛應用，使得許多果樹炭疽病菌的菌種分布出現與過往完全不同的面貌。許多果樹炭疽病菌出現新學名且非單一菌種，菌種間所佔比例亦不同，此在近年發表的數篇臺灣果樹炭疽病菌研究報告中已有明證<sup>(11, 15, 21, 31)</sup>。楊桃炭疽病菌在臺灣尚乏相關研究，其菌種學名是值得探討的基本課題。本研究為鑑定臺灣地區楊桃炭疽病菌的菌種與分布，爰就近年自全臺各地分離所得的楊桃炭疽病菌，依其形態與數種鑑定用基因序列分別定其學名；部分菌株並進行人工接種 (artificial inoculation) 以測定其病原性 (pathogenicity)，俾完成科霍氏法則 (Koch's postulates)，這些結果將成為日後楊桃炭疽病病理學研究與病害防治的基礎資料。

## 材料與方法

### 菌株之來源與保存

自2014年迄2019年，分別前往臺灣中部及南部各楊桃產區採集罹炭疽病之楊桃果實供分離病原菌。成熟的罹病果實病斑部會產生分生孢子盤 (acervulus)，上有大量分生孢子 (conidium)，只需以棉花棒沾取孢子並置入2-mL有蓋小管 (Eppendorf tube)，即完成採樣。樣品攜返實驗室後，將沾有炭疽病菌分生孢子的棉花棒塗佈於2%洋菜平板 (water agar)，再以玻璃針行單孢分離法 (single spore isolation) 獲得單孢菌株。單孢菌株培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA; Difco, USA)，置於24°C及每日光照12小時之定溫箱，供後續試驗之用。另將培養6日所得之菌體 (culture) 以直徑5 mm 打孔器切取菌落周邊菌絲塊，放入內裝1 mL無菌水之2-mL冷凍小管 (cryogenic vial, Nalgene Co., USA)，置18°C定溫箱作長期保存。楊桃炭疽病菌經數年之採集計獲得菌株36株，乃逢機選取代表各縣市產區之炭疽病菌25株 (表一)，作為菌種鑑定與病原性 (pathogenicity) 試驗之用。

### 菌株形態

為進行炭疽病菌之鑑定，供試楊桃炭疽病菌自18°C定溫箱之菌種小管移至馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板，於24°C及每日光照12小時之定溫箱培養6日，所得之菌體先供作形態鑑定。形態特徵之記錄項目包括菌落特徵及分生孢子大小 (size) 及形狀 (shape)，而後自供試菌株中選取已知屬不同菌種之代表菌株各二株，分別為CC15、CC22及CC16、CC20，就各菌株之菌落及分生孢子形態作描述及照相，並測量分生孢子的長度與寬度，每菌株計量測40個孢子。

### 菌株分子鑑定與親緣性分析

為能準確鑑定臺灣各地楊桃炭疽病菌之菌種及出現頻率，

表一、楊桃炭疽病菌菌株列表

**TABLE 1.** The list of *Colletotrichum* isolates collected from carambola fruit used in this study

Isolate ID	Geographical origin	Collection date
CC2	Juolan, Miaoli	Oct. 2014
CC3	Juolan, Miaoli	Jun. 2015
CC7	Yuanshan, Yilan	Jun. 2015
CC8	Yuanshan, Yilan	Jul. 2015
CC10	Yuanshan, Yilan	Jul. 2015
CC11	Juolan, Miaoli	Oct. 2015
CC13	Juolan, Miaoli	Oct. 2015
CC15	Juolan, Miaoli	Nov. 2015
CC16	Juolan, Miaoli	Nov. 2015
CC17	Juolan, Miaoli	Nov. 2015
CC18	Yuanlin, Changhua	Nov. 2015
CC19	Yuanlin, Changhua	Nov. 2015
CC20	Meishan, Chiayi	Nov. 2015
CC21	Wufeng, Taichung	Feb. 2016
CC22	Wufeng, Taichung	Feb. 2016
CC23	Juolan, Miaoli	Mar. 2016
CC24	Cihtong, Yunlin	Jan. 2017
CC25	Nansi, Tainan	Feb. 2017
CC28	Juolan, Miaoli	Nov. 2017
CC29	Juolan, Miaoli	Nov. 2017
CC30	Juolan, Miaoli	Nov. 2017
CC31	Juolan, Miaoli	May 2018
CC32	Nansi, Tainan	Aug. 2018
CC33	Nansi, Tainan	Aug. 2018
CC34	Juolan, Miaoli	Apr. 2019

乃進行菌株特定基因之定序並分析之。將前述選取之25株菌分別以其菌絲塊移植於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板，於24°C黑暗定溫箱培養6日。先刮取菌絲及(或)分生孢子，再以核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit; 百歐生技公司，臺灣) 抽取基因組核酸 (genomic DNA)。抽取之核酸以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS, 引子對ITS1/ ITS4)<sup>(30)</sup>、肌動蛋白 (*ACT*, 引子對ACT-512F/ ACT-783R)<sup>(7)</sup>、微管蛋白 (*TUB2*, 引子對T1/ T2)<sup>(24)</sup>、幾丁質合成酶 (*CHS-1*, 引子對CHS-79F/ CHS-354R)<sup>(7)</sup>及*ApMat* (引子對AM-F/AM-R)<sup>(26, 27)</sup>等基因序列。聚合酶連鎖反應總體積為25 µL，內含12.5 µL 2X Taq PCR Master Mix (慧眾生技公司，臺灣)，成分為0.1 units / µL Taq DNA polymerase、0.4 mM 4種dNTP、Tris-HCl pH8.5、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、4 mM MgCl<sub>2</sub>及0.2% Tween 20，並加前後引子各1 µL (10 µM) 及2.5 µL (10 ng) 基因體核酸與8 µL水。聚合酶連鎖反應增幅條件先為95°C，5 min，接著進入35次增幅循環，每一循環開始為95°C，30 sec，引子黏合溫度 (annealing temperature) 依不同基因引子對而異，分別為ITS (55°C)、*TUB2* (52°C)、*ACT* (55°C)、*CHS-1* (58°C) 及

*ApMat* (60°C)，均作用30 sec；延伸溫度 (extension temperature) 為72°C，30 sec，最後再以72°C，12 min結束反應。聚合酶連鎖反應產物接續進行基因雙向定序，定序結果整理成序列重疊群 (sequence contig)<sup>(28)</sup>。各基因序列均作為後續菌種鑑定及親緣性分析之用，菌種代表菌株的基因序列並登錄於基因銀行 (GenBank)。菌株間親緣性分析分為二種，其一是以核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS)、肌動蛋白 (*ACT*)、微管蛋白 (*TUB2*) 及幾丁質合成酶 (*CHS-1*) 等4種核酸序列鏈結之多基因序列分析 (multilocus sequence analysis, MLSA)<sup>(20)</sup>，另一則是以*ApMat* 單基因進行分析，分析結果以系統發生樹 (phylogenetic tree) 呈現。多基因序列分析係先將全部供試菌株的各種基因序列分別並列切齊，再將同一菌株的不同基因序列鏈結成多基因序列。基因序列之編輯 (edit) 及排列 (align)，分別使用 Lasergene software package之SeqBuilder module及MegAlign Pro (DNASTAR, USA)。多基因及單基因序列進行親緣性分析時，並納入相關

菌種的衍生模式菌株 (ex-type culture) 作為參考菌株 (reference culture) (表三)<sup>(29)</sup>，分析方法是貝葉斯推斷法 (Bayesian inference method, MrBayes v.3.2.7a)，單基因*ApMat*之分析方法與多基因者相同。供試菌株之基因序列與衍生模式菌株基因序列相似度比對則是以經親緣性分析確定為*C. fructicola*代表菌株CC15及CC22及*C. siamense*代表菌株CC16及CC20的上述5種基因序列與此兩菌種衍生模式菌株 ICMP18581 (*C. fructicola*) 及ICMP18578 (*C. siamense*)<sup>(29)</sup>進行序列比對，而以核酸序列相同百分率 (percent identity) 表示，以進一步確認菌種鑑定結果。

### 菌株病原性測定

以人工接種方式測試源自楊桃之供試炭疽病菌代表菌株對楊桃摘離果實 (detached fruit) 之病原性。選用市售之外觀健康且成熟楊桃果實 [品種：二林]供接種試驗。供試菌株同為*C. fructicola*代表菌株CC15及CC22以及*C. siamense*代表菌株CC16

表三、楊桃炭疽病菌代表菌株及參考菌株之基因序列代號

**TABLE 3.** GenBank accession numbers of cultures of *Colletotrichum* from carambola and reference strains used in this study

Isolate ID <sup>2</sup>	Species	GenBank accession number <sup>1</sup>				
		ITS	<i>ACT</i>	<i>TUB2</i>	<i>CHS-1</i>	<i>ApMat</i>
CC15	<i>C. fructicola</i>	ON045773	ON206659	ON206663	ON553306	ON169964
CC22	<i>C. fructicola</i>	ON055730	ON206660	ON206664	ON553303	ON169965
CC16	<i>C. siamense</i>	ON055094	ON206661	ON553307	ON553305	ON169966
CC20	<i>C. siamense</i>	ON055715	ON206662	ON553308	ON553304	ON169967
ICMP 18608	<i>C. aenigma</i>	JX010244	JX009443	JX010389	JX009774	KM360143
ICMP 17673	<i>C. aeschynomenes</i>	JX010176	JX009483	JX010392	JX009799	KM360145
ICMP 12071	<i>C. alienum</i>	JX010251	JX009572	JX010411	JX009882	KM360144
ICMP 17919	<i>C. alatae</i>	JX010190	JX009471	JX010383	JX009837	KC888932
ICMP 18580	<i>C. asianum</i>	FJ972612	JX009584	JX010406	JX009867	FR718814
GAUG 17	<i>C. conoides</i>	KP890168	KP890144	KP890174	KP890156	N/A
YN1A4	<i>C. endophyticum</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	KU251734
CGMCC 3.17889	<i>C. fructicola</i>	KU251520	KU251601	KU252152	KU251868	KU251706
ICMP 18581	<i>C. fructicola</i>	JX010165	FJ907426	JX010405	JX009866	JQ807838
CBS 112999	<i>C. gloeosporioides</i>	JX010152	JX009531	JX010445	JX009818	JQ807843
MFLUCC 13-0726	<i>C. hebeiense</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	KF377562
ICMP 18187	<i>C. nupharicola</i>	JX010187	JX009437	JX010398	JX009835	KU239773
ICMP 1778	<i>C. queenslandicum</i>	JX010276	JX009447	JX010414	JX009899	KC888928
ICMP 19051	<i>C. salsolae</i>	JX010242	JX009562	JX010403	JX009863	KC888925
ICMP 18578	<i>C. siamense</i>	JX010171	FJ907423	JX010404	JX009865	JQ899289
ICMP 12567	<i>C. siamense</i>	JX010250	JX009541	JX010387	JX009761	N/A
ICMP 17795	<i>C. siamense</i>	JX010162	JX009506	JX010393	JX009805	N/A
ICMP 18121	<i>C. siamense</i>	JX010245	JX009460	JX010402	JX009845	N/A
ICMP 18653	<i>C. tropicale</i>	JX010264	JX009489	JX010407	JX009870	GU994425
GZAAS 5.08601	<i>C. viniferum</i>	JN412804	JN412795	JN412813	JX009413	N/A
ICMP 17903	<i>C. xanthorrhoeae</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	KC790689

<sup>1</sup> ITS: internal transcribed spacer, *ACT*: actin, *TUB2*:  $\beta$ -tubulin 2, *CHS-1*: chitin synthase, *ApMat*: Apn2-Mat1-2 intergenic spacer, N/A: not applicable.

<sup>2</sup> Refer to table 1 for isolate information.

及CC20。菌株先培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板，培養條件同前，而後刮取菌落上的分生孢子配製孢子懸浮液 ( $1 \times 10^5$  conidia/mL) 以供接種。接種果實先以70%乙醇作表面消毒，再分別置於30.0×22.5×8.0 cm之有蓋壓克力盒，盒底鋪以無菌水濕潤的擦手紙保濕，每盒2粒果實。本試驗以定點接種 (spot inoculation) 方式進行。接種前，先以簽字筆在果實上畫出直徑5 mm之接種圈，再將供試菌株孢子懸浮液滴至接種圈，另以滴無菌水之處理作為對照。每菌株接種4粒果實。接種後，蓋緊盒蓋，置實驗室 (24~28°C)，經3及5日後記錄接種結果。罹病指數分為0、1、2、3及4代表病斑直徑分別為0、1、2、3及 $\geq 4$  mm。本試驗記錄各接種菌株所有的果實接種圈 (50~60個) 的罹病指數，而以其平均值作為衡量菌株病原性的依據。部分接種試驗之病果並以單孢分離法分離病斑上的病原菌，經培養後與原接種菌株比對其菌落與孢子形態，以完成科霍氏法則。接種試驗進行2次。

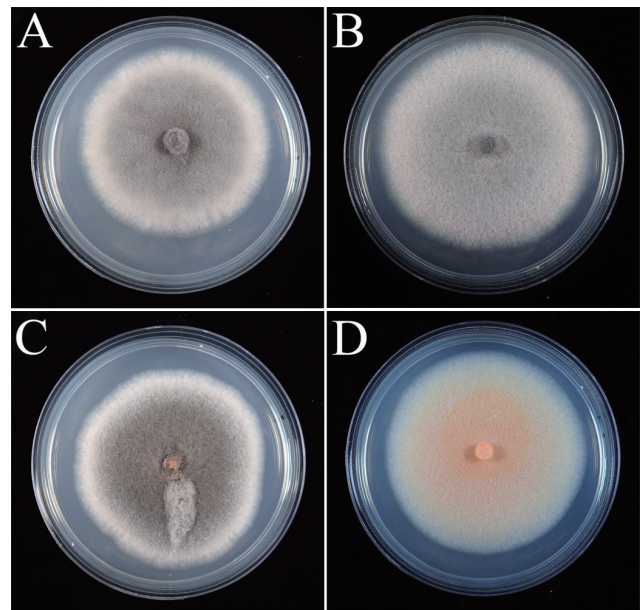
## 結果

### 菌株形態

供試楊桃炭疽病菌依其分生孢子形態及ITS核酸序列均歸屬 *C. gloeosporioides* species complex。參考後續分子鑑定之結果，供試菌株可區分為 *C. fructicola* 及 *C. siamense* 二菌種。*C. fructicola* 代表菌株CC15及CC22在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板經6日之培養，菌落表面密生淺灰色、棉花狀氣生菌絲，菌落周緣為更淺之灰色或白色菌絲，菌落上散生少量鮭魚色 (salmon-colored) 分生孢子盤 (圖一)。分生孢子無色 (hyaline)，單細胞無隔膜，細胞壁薄且平滑，孢子直柱形 (straight and cylindrical)，兩端呈圓形，細胞內含油滴狀物 (guttulate)；分生孢子之大小平均值分別為  $16.13 \pm 0.24 \times 5.03 \pm 0.03$   $\mu\text{m}$  (CC15) 及  $15.35 \pm 0.13 \times 5.13 \pm 0.05$   $\mu\text{m}$  (CC22) (圖二、表二)。另一楊桃炭疽病菌 *C. siamense* 代表菌株CC16及CC20在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板經6日之培養，CC16菌落表面為深灰色菌絲，周緣為白色菌絲，菌落中央有大量鮭魚色分生孢子盤；CC20菌落上生稀疏之白色菌絲，菌落表面布滿分生孢子盤 (圖一)。*C. siamense* 之分生孢子亦為無色、單細胞，胞壁薄且平滑，孢子為柱狀或棍棒狀 (clavate)，兩端鈍圓 (obtuse at both ends)，細胞內也含油滴狀物；分生孢子之大小平均值分別為  $12.83 \pm 0.20 \times 5.38 \pm 0.08$   $\mu\text{m}$  (CC16) 及  $13.15 \pm 0.19 \times 5.75 \pm 0.07$   $\mu\text{m}$  (CC20) (圖二、表二)。

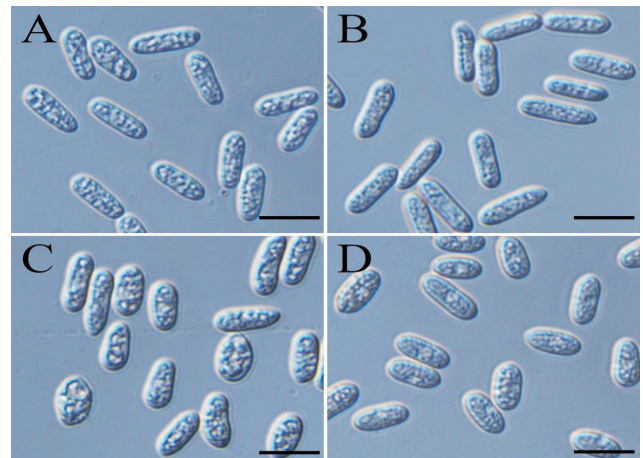
### 菌株鑑定與親緣性分析

供試之25支菌株分別鏈結其核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS)、肌動蛋白 (*ACT*)、微管蛋白 (*TUB2*) 及幾丁質合成酶 (*CHS-1*) 等基因序列進行多基因親緣性分析 (multigene phylogenetic analysis)。結果顯示，供試菌株分成二演化支，其



圖一、楊桃炭疽病菌在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基生長6天之菌落。

**Fig. 1.** Six-day-old colonies of *Colletotrichum* isolates from carambola grown on PDA at 24°C under 12 h darkness/12 h cool white fluorescent light. Upper plates: *C. fructicola* (A=CC15, B=CC22), lower plates: *C. siamense* (C=CC16, D=CC20).



圖二、楊桃炭疽病菌之分生孢子。

**Fig. 2.** Conidia of *Colletotrichum* isolates from carambola. The fungi were grown on PDA for 10 days at 24°C under 12 h darkness/12 h cool white fluorescent light. Upper plates: *C. fructicola* (A=CC15, B=CC22), lower plates: *C. siamense* (C=CC16, D=CC20). Bars=10  $\mu\text{m}$ .

一為由CC15、CC22及CC33等3菌株組成屬 *C. fructicola*，其餘22支菌組成另一演化支，屬 *C. siamense* (圖三)。單基因 *ApMat* 之分析結果與上述多基因分析結果類同，亦分為二個演化支，均涵蓋相同代號之菌株，分屬 *C. fructicola* 及 *C. siamense* (圖四)。為進一步比對供試菌株之基因序列與衍生模式菌株之基因序列相同百分率，以確認菌種鑑定之結果。在代表菌株之4

表二、楊桃炭疽病菌之分生孢子度量

**TABLE 2.** Dimensions of conidia of representative isolates of *Colletotrichum* spp. from carambola<sup>1</sup>

Isolate ID <sup>2</sup>	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio
CC15 ( <i>C. fruticola</i> )	16.13±0.24 (12.00-20.00)	5.03±0.03 (5.00-6.00)	3.21±0.05
CC22 ( <i>C. fruticola</i> )	15.35±0.13 (13.00-17.00)	5.13±0.05 (5.00-6.00)	3.01±0.04
CC16 ( <i>C. siamense</i> )	12.83±0.20 (10.25-15.00)	5.38±0.08 (5.00-6.00)	2.40±0.04
CC20 ( <i>C. siamense</i> )	13.15±0.19 (10.50-15.00)	5.75±0.07 (5.00-6.00)	2.30±0.04

<sup>1</sup> Mean±standard error (minimum to maximum), n=40.<sup>2</sup> Refer to Table 1 for isolate information.

條基因 (ITS、*ACT*、*TUB2*及*CHS-1*) 與模式菌株基因序列比對中，基因相似度均達99%以上。*ApMat*基因的相似度則因菌種而異，*C. fruticola*均達99.7%，*C. siamense*為97.7及99.8% (表三、四)。

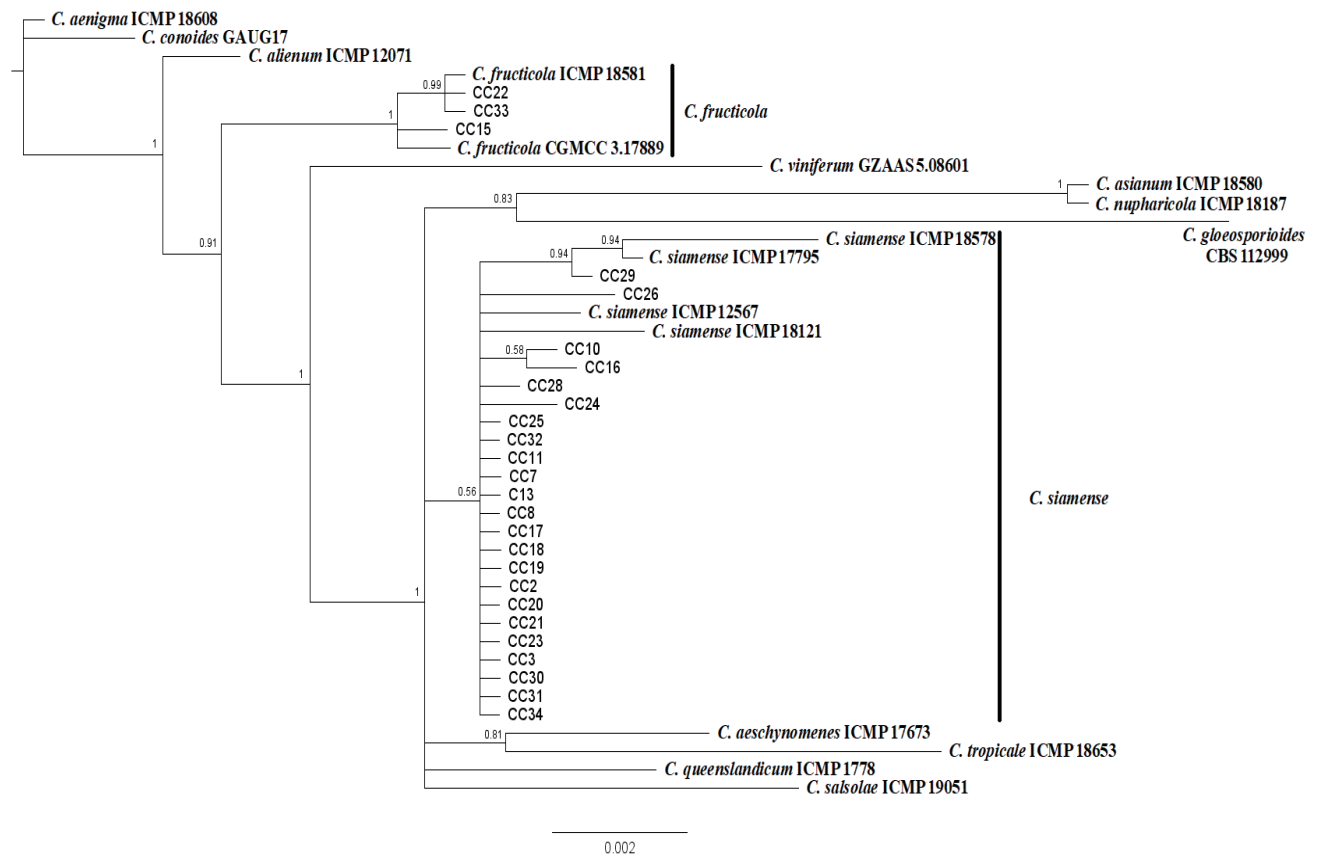
### 菌株病原性測定

楊桃炭疽病菌代表菌株之分生孢子懸浮液以定點接種方式

對楊桃摘離果實進行病原性測試，處理3日後，接種部位出現褐色水浸狀病斑，病斑隨時間逐漸擴大，並產生鮭魚色分生孢子盤，此病徵與田間所見之楊桃炭疽病病徵相似，噴施無菌水之對照處理無病徵。各菌株在接種後第5日紀錄各菌株接種果實全部接種圈之罹病指數，其總平均值分別為3.25 (CC15)、3.75 (CC16)、3.25 (CC20) 及1.50 (CC22)。另以單孢分離法分離前述4菌株接種果實病班上的分生孢子並培養。經比對，其菌落與孢子形態俱與原接種菌株相似，完成科霍氏法則。

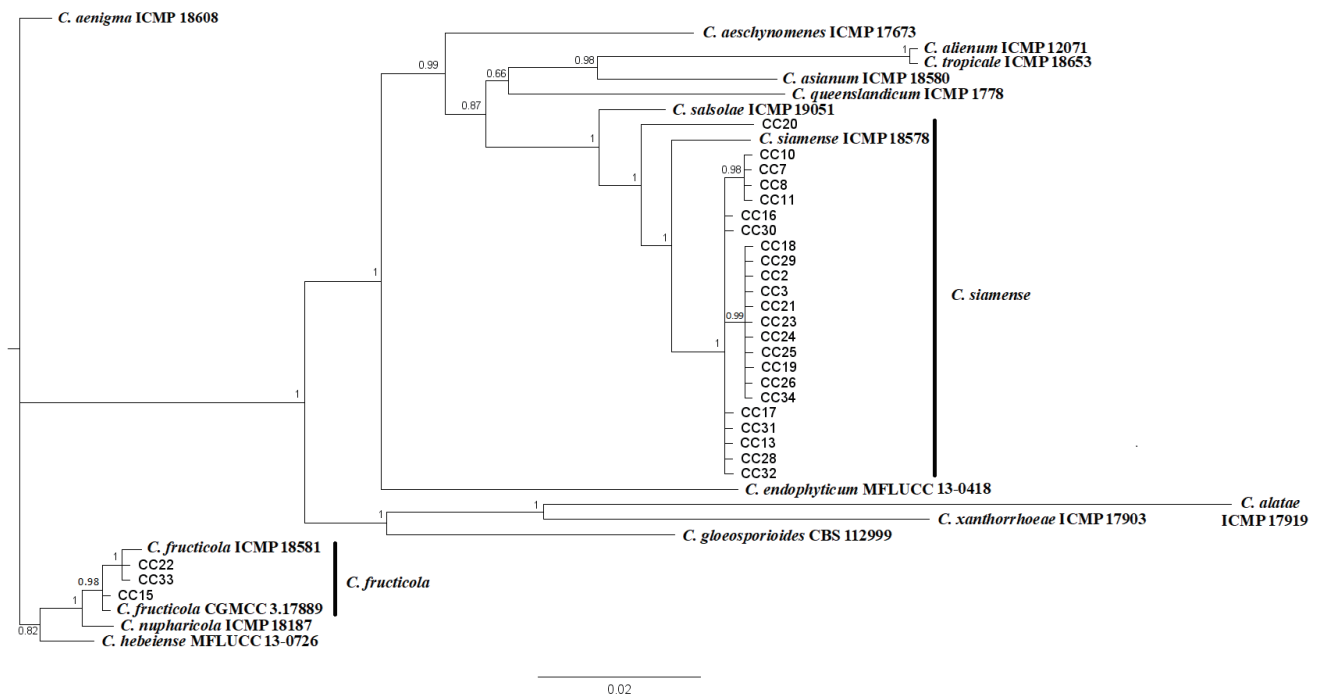
## 討 論

*Colletotrichum* spp.作為全球許多重要經濟作物的病原菌<sup>(10)</sup>，其菌種鑑定在過去數十年經歷多次修訂，現已知有11個複合種及23個獨立種 (singleton species)，合計超過190個菌種<sup>(19)</sup>。由於*Colletotrichum* spp.的形態特徵僅能區別複合種間的差異，而複合種內的個別菌種需依靠特定基因序列作為鑑定依據<sup>(4, 6, 19)</sup>。常用的*Colletotrichum* spp.鑑定用基因及序列有肌



圖三、楊桃炭疽病菌多基因親緣關係圖。

**Fig. 3.** Phylogenetic analysis of the isolates of carambola anthracnose pathogen and their closely related species of *Colletotrichum* based on the concatenate sequences of ITS, *ACT*, *TUB2* and *CHS-1* genes. This analysis was performed by Bayesian inference method using MrBayes v.3.2.7a. The numbers beside nodes are posterior probability. Scale bar=0.002 substitutions per site.



圖四、楊桃炭疽病菌ApMat基因親緣關係圖。

**Fig. 4.** Phylogenetic analysis of the isolates of carambola anthracnose pathogen and their closely related species of *Colletotrichum* based on the sequences of *ApMat* gene. This analysis was performed by Bayesian inference method using MrBayes v.3.2.7a. The numbers beside nodes are posterior probability. Scale bar=0.02 substitutions per site.

表四、楊桃炭疽病菌代表菌株鑑定用基因序列與模式菌株相似百分率列表

**TABLE 4.** Molecular identification of *Colletotrichum* representative isolates from carambola based on their identity to the given gene sequences of ex-type cultures of taxon

Isolate ID <sup>2</sup>	Species	Percent identity <sup>1</sup>				
		ITS	ACT	TUB2	CHS-1	ApMat
CC15	<i>C. fructicola</i>	99.8	99.1	100.0	99.3	99.7
CC22	<i>C. fructicola</i>	99.8	99.6	100.0	100.0	99.8
CC16	<i>C. siamense</i>	99.1	99.3	99.6	99.0	98.7
CC20	<i>C. siamense</i>	99.2	99.6	99.6	99.0	97.7

<sup>1</sup> Percent identity: identity between each gene sequence of the representative isolate with that of the ex-type culture in percentage ratio. The gene sequences of ex-type cultures ICMP18581 and ICMP18578 are for identification of *C. fructicola* and *C. siamense*, respectively. *ITS*: internal transcribed spacer, *ACT*: actin, *TUB2*:  $\beta$ -tubulin 2, *CHS-1*: chitin synthase, *ApMat*: Apn2-Mat1-2 intergenic spacer.

<sup>2</sup> Refer to table 1 for isolate information.

動蛋白 (*ACT*)、微管蛋白 (*TUB2*)、鈣調蛋白 (*CAL*)、幾丁質合成酶 (*CHS-1*)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (*GAPDH*)、麩胺合成酶 (*GS*)、核糖體核酸內轉錄間隔區 (*ITS*) 及錳超氧化物歧化酶 (*SOD2*) 等多種<sup>(29)</sup>。惟這些基因對不同菌種的鑑別度有別，例如，鈣調蛋白或微管蛋白基因可有效區別 *C. siamense* 與 *C. alienum*、*C. fructicola* 或 *C. tropicale*；麩胺合成酶或錳超氧化物歧化酶基因則有利於區別 *C. fructicola* 與 *C. aeshynomenes* 及一些 *C. siamense* 菌株<sup>(29)</sup>。但在未完成菌種鑑定前，無從得

知何種基因序列適合決定其分類地位。實務上，即使依據形態特徵對部分 *Colletotrichum* 複合種亦難以區別，因而有報告稱，可依據核糖體核酸內轉錄間隔區 (*ITS*) 序列區別其複合種<sup>(4)</sup>，此乃是該序列仍為許多菌種鑑定最基本且必要的緣故，即使該序列並不是用以區別 *Colletotrichum* 個別菌種的可靠依據<sup>(9, 29)</sup>。故為鑑定 *Colletotrichum* spp.，仍以應用多基因系譜分析 (multi-gene phylogeny) 與模式標本 (type specimen) 的基因序列進行比對，並參酌菌種之多重特性 (polyphasic characters)，例

如：形態、生理、病原性、培養特性及次級代謝物等，以作為 *Colletotrichum* 理想的系統分類 (systematics) 依據<sup>(4)</sup>。儘管分類上可運用的工具甚多，但基於核酸是穩定的生物分子，因而核酸序列仍是較可靠的分類依據。

近年有研究指稱，欲鑑定 *C. gloeosporioides* 複合種內所含個別菌種時，單獨使用 Apn2-Mat1-2 intergenic spacer 基因座 (locus) 中的 *ApMAT* 分子標記可提供等同前述多基因序列分析的結果<sup>(27)</sup>。例如在印度，對檸檬炭疽病菌的鑑定，單獨使用 *ApMAT* 序列就有良好的鑑定效果。在該研究中，以 *ApMAT* 鑑定甚且優於以 *ACT*、*CAL*、*CHS-1*、*GAPDH*、*ITS* 及 *TUB2* 等6種基因或序列組成的多基因序列分析結果<sup>(26)</sup>。本研究亦指出，就菌種鑑定結果觀之，應用多基因序列分析與單一基因 *ApMAT* 分析的結果類同 (圖三、四)。進一步檢視這兩組親緣關係圖，我們發現僅有的三株 *C. fructicola* 菌株在單基因 *ApMAT* 與多基因的分析結果非常相似，其中 CC22 與 CC33 屬同一演化支，而與 CC15 有別，這3支菌分別源自台中、台南及苗栗等縣市，表示該菌種株數雖少但地理分布卻廣 (圖三、四)。而在屬 *C. siamense* 的菌株，其多基因序列分析結果顯示，除 CC29 外，其他各菌株均屬同一演化支，且多數菌株基因序列差異小 (圖三)。但在以 *ApMAT* 序列為依據的分析，除唯一源自嘉義梅山的 CC20 為差異較大的一獨立演化支，其餘菌株可略分成三個演化支。其中僅有的3株宜蘭員山菌株 (CC7、8及10) 屬同一演化支，而僅有的2株彰化員林菌株 (CC18及19) 則屬另一演化支，此表示菌株的親緣關係可能與地理分布有關 (圖四)。詳細比較上述兩種核酸序列分析結果，應用 *ApMAT* 序列的分析結果具較佳解析度 (finer resolution)。在代表菌株基因序列相似百分率的比較上，屬多基因者均達99.0%以上，但 *ApMAT* 基因則高低有別，屬 *C. fructicola* 者分別為99.7及99.8%，而屬 *C. siamense* 則分別為97.7及98.7%，此表示，*ApMAT* 基因序列在某些菌種內可能存有較大的變異 (表四)。雖然依據 *ApMAT* 序列的分析結果良好，但依賴單一基因作分類或鑑定仍存有極大風險，此已有相關研究可證<sup>(22)</sup>。由於 *C. gloeosporioides* 複合種仍是許多果樹炭疽病菌所屬的類別，應用 *ApMAT* 序列並加上其他鑑定用基因，可使得該複合種內個別菌種的鑑定更為可信<sup>(18)</sup>。因此可將 *ApMAT* 納入譜系一致的系统發育學種識別法 (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition, GCPSR)<sup>(22)</sup>，並思在鑑定應用時，評估其作為鑑定條碼 (barcode) 的可行性，以加快鑑定流程並節省試驗資源。此外，在分生孢子形態部分，本研究之 *C. fructicola* 均長於 *C. siamense*，其長度存有3~4 μm 差距 (表二)。此是否可作為區別不同菌種的依據，則須考慮分生孢子的形態深受培養條件、生長齡期及個體差異等因素影響，特別是其大小在同一菌株的眾多孢子間本就存有差異，因此尚難以此特徵用於分類鑑定。

炭疽病是臺灣楊桃常見的病害，田間成熟果實先於果稜出現褐變病徵；但在果瓣上的病徵更為顯著，圓形病班上著生大

量分生孢子盤，是本病主要感染源 (inoculum)。本研究顯示，臺灣楊桃炭疽病菌共有二菌種，即 *C. fructicola* 與 *C. siamense*；但從病原性試驗結果觀之，並未見其病徵差異，這使得研究人員不易察覺有不同菌種存在其中。就田間發病狀況而言，罕見幼果呈現病徵，成熟罹病果實則有明顯病徵，這可能導因於潛伏感染。潛伏感染的原因可能係幼果組成分尚不利於炭疽病菌生長，或有其他因素，尚待探討。但亦有研究指出，不同齡期的楊桃果實皆可以人工接種使其發病，且病斑數量與病斑大小皆同，只是在成熟果實上，病斑擴展較速<sup>(12)</sup>。楊桃炭疽病菌在本研究中所見的兩個菌種 *C. fructicola* 及 *C. siamense* 亦常見於國內外許多果樹炭疽病菌的報告<sup>(16)</sup>，這是依據病原菌形態及數條基因序列比對的結果，屬真菌分類 (taxonomy) 問題。但不同菌種在不同種類果實的致病能力則屬病原性的問題，雖能以人工接種方式進行探討，但結果分歧<sup>(1, 17)</sup>。因其涉及個別菌株特性及接種條件及接種果實之差異等，且其終究與自然感染有別。我們只能以完成柯霍氏法則，確定病原菌與其寄主間的關係，至於不同果樹炭疽病菌是否能交互感染非原寄主果樹之果實則難有定論<sup>(12, 13)</sup>。由於臺灣楊桃栽培面積僅約600公頃<sup>(3)</sup>，屬小面積作物，雖然其炭疽病普遍發生，目前亦僅發現兩個菌種且分布頻率差異大。而臺灣近三千公頃的葡萄，其晚腐病亦屬主要病害，然其病原菌也僅見3個菌種，且亦有主要及次要菌種之情況<sup>(11, 21)</sup>。菌種數目的多寡除可能與栽培面積、為害程度及採樣數有關，臺灣檸檬炭疽病的菌種數可為明證<sup>(31)</sup>。本研究就臺灣地區楊桃炭疽病菌的菌種完成初步調查，其結果對楊桃以及其他果樹炭疽病的研究，希能有參考價值。

## 謝 辭

本研究承行政院農業委員會107農科-8.4.1-藥-P1及107農科-8.4.1-藥-P3計畫經費補助，謹此致謝。

## 引用文獻

- Alahakoon, P. W., Brown, A. E., and Sreenivasaprasad, S. 1994. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44: 93-103.
- Anonymous, 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, 329 pp. (in Chinese)
- Anonymous, 2020. Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan (R.O.C.), Taipei, 340 pp. (in Chinese)
- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P. W. J., Weir, B.S., Waller, J.

- M., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., McKenzie, E. H. C., and Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers.* 39:183-204.
5. Cannon, P. F., Buddie, A. G., and Bridge, P. D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104: 189-204.
  6. Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., and Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum* current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73:181-213.
  7. Carbone, I., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
  8. Chung, P. C., Wu, H. Y., Ariyawansa, H. A., Tzean, S. S., and Chung, C. L. 2019. First report of anthracnose crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. *Plant Dis.* 103: 1775.
  9. Crouch, J. A., Clarke, B. B., and Hillman, B. I. 2009. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematic and species diagnosis? A case study using the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101:648-656.
  10. Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414-430.
  11. Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2020. Molecular identification and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from grape in Taiwan. *J. Plant Med.* 62(4): 23-32. (in Chinese)
  12. Duan, C. H., Tsai, W. H., and Tu, C. C. 1991. Pathogenicity and inoculum sources of *Colletotrichum gloeosporioides* on carambola. *J. of Taiwan Agric. Res.* 40(4):425-432. (in Chinese)
  13. Duan, C. H., Pang, H. R., and Wang C. C. 2018. Identification, pathogenicity and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from five fruit crops in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 5:91-111. (in Chinese)
  14. Duan, C. H., Pan, H. R., and Wang, C. C. 2018. First report of *Colletotrichum brevisporum* causing anthracnose on papaya in Taiwan. *Plant Dis.* 102: 2375.
  15. Duan, C. H., Pan, H. R., and Wang C. C. 2019. Molecular identification and fungicides sensitivity of *Colletotrichum* isolates from various fruit crops in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 6:71-104. (in Chinese)
  16. Farr, D. F., and Rossman, A. Y. 2022. *Fungal Databases*, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved from <https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/> (May 1, 2022)
  17. Freeman, S., and Shabi, E. 1996. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 395-404.
  18. Hofer, K. M., Braithwaite, M., Braithwaite, L. J., Sorensen, S., Siebert, B., Pather, V., Goudie, L., Williamson, L., Alexander, B. J. R., and Toome-Heller, M. 2021. First report of *Colletotrichum fructicola*, *C. perseae*, and *C. siamense* causing anthracnose disease of avocado (*Persea americana*) in New Zealand. *Plant Dis.* 105:1564.
  19. Jayawardena, R. S., Bhunjun, C. S., Hyde, K. D., Gentekaki, E., Itthayakorn, P. 2021. *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. *Mycosphere* 12(1):519 – 669.
  20. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
  21. Lin, C. P., Wang, C. L., Tsai, J. N., Dai, Y. L., Ann, P. J., Zhan, Y. M., and Huang, S. Y. 2022. Occurrence of grape ripe rot in Taiwan and the pathogenicity and phylogenetic relationship of its primary causal agent *Colletotrichum viniferum*. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(2):135 – 157. (in Chinese)
  22. Liu, F., Wang, M., Damm, U., Crous, P. W., and Cai, L. 2016. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. *BMC Evol. Biol.* 16: 81.
  23. Liu, Pi-chuan. 2000. Cultivation and management. Pages 201-212 in: *Integrated Crop Management of Carambola*. H. C. Yang ed. Council of Agriculture, Taichung, 325 pp. (in Chinese)
  24. O'Donnell, K. and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium arenonorthologous*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116.
  25. Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Divers.* 44:33-43.
  26. Sharma, G., Kumar, N., Weir, B. S., Hyde, K. D., and Shenoy, B. D. 2013. The *ApMat* marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Divers.* 61: 117-138.
  27. Silva, D. N., Talhinhas, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O. S., and Batista D. 2012. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts, *Mycologia* 104:396-409.
  28. Staden, R. 1980. A new computer method for the storage and

manipulation of DNA gel reading data. *Nucleic Acids Res.* 8: 3673-3694.

29. Weir, B. S., Johnson, P. R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73:115-180.
30. White T. J., Bruns T, Lee S., and Taylor J. W. 1990. Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White 「eds.」, *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Academic, San Diego, CA, USA. pp. 315 – 322.
31. Wu, C.-J., Chen, H.-K., and Ni, H.-F. 2020. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Taiwan. *Eur. J. Plant Pathol.* 157:1 – 15.

### ABSTRACT

Duan, C.-H.\* and Chen, G.-Y. 2023. Identification of *Colletotrichum* species associated with carambola anthracnose in Taiwan. *J. Plant Med.* 65(2): 43-52.

\*Corresponding author, E-mail: chduan@tactri.gov.tw

Carambola anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. affects fruit quality and market values considerably in Taiwan. Twenty-five representative isolates were collected from carambola fruit during 2014~2019 and used for species identification and pathogenicity tests. In addition to conidial morphology, phylogenetic analyses of the isolates were performed based on a 4-gene dataset (ITS, *ACT*, *TUB2*, and *CHS-1*) and *ApMat* sequences. The two phylogenetic results were similar and consistent and indicated that *C. siamense* (22 isolates, 88%) was the dominant specie, followed by *C. fructicola* (3 isolates, 12%) as the minor one. The *ApMat*-based phylogeny was found to be a superior tool to differentiate *Colletotrichum* spp., as it provided a finer resolution. We found both *C. siamense* and *C. fructicola* could cause anthracnose symptoms on mature carambola fruit after artificial inoculation. The fungus was reisolated from symptomatic fruit, thus fulfilling Koch's postulates. This is the first report of *C. siamense* and *C. fructicola* that cause carambola anthracnose in Taiwan.

**Keywords:** carambola, *Colletotrichum fructicola*, *C. siamense*, Taiwan

