

臺灣木瓜炭疽病菌之鑑定

陳冠穎¹、段中漢^{1*}

¹ 農業部農業藥物試驗所農藥應用組，臺灣臺中市。

* 聯絡作者，E-mail: chduan1@hotmail.com

摘要

陳冠穎、段中漢。2023。臺灣木瓜炭疽病菌之鑑定。植物醫學 65(4): 125-138。

由 *Colletotrichum* spp. 所引起的木瓜炭疽病是木瓜主要病害之一，受害果實腐壞，喪失商品價值。本研究選取2014~2022年分離自臺灣各地木瓜果實的28株炭疽病菌，以分生孢子形態及多基因親緣關係分析進行菌種鑑定並測其病原性。依據分生孢子形態及ITS序列，供試菌株分屬以下5個複合種 (species complex, SC)： *C. acutatum* species complex (CASC)、 *C. gloeosporioides* species complex (CGSC)、 *C. magnum* species complex (CMSC)、 *C. orchidearum* species complex (COSC) 及 *C. truncatum* species complex (CTSC)。鏈結多基因 (*ACT*、*CHS-1*、*GAPDH* 及 *TUB2*) 及ITS核酸序列作親緣關係分析得知，木瓜炭疽病菌菌種依其菌株數分別為 *C. okinawense* (CMSC, 10株)、 *C. tropicale* (CGSC, 6株)、 *C. fructicola* (CGSC, 4株)、 *C. siamense* (CGSC, 2株)、 *C. plurivorum* (COSC, 2株)、 *C. truncatum* (CTSC, 2株)、 *C. schimae* (CASC, 1株) 及1株屬CGSC之待鑑定種。以上8種炭疽病菌均可於台農2號木瓜果實以人工接種產生中央褐色周圍水浸狀，其上著生鮭魚色分生孢子堆之炭疽病徵。除卻 *C. okinawense* 及 *C. plurivorum*，其他5個菌種均為台灣地區首次報導之木瓜炭疽病菌。

關鍵詞：多基因親緣關係分析、分類

前言

木瓜 (*Carica papaya* L.) 屬番木瓜科 (Caricaceae)，為多年生常綠木本性果樹。台灣木瓜種植可能在清朝末年由大陸引進，由於栽培容易且生長迅速，結果期長產量又高，每公頃可達5公噸，加以果實香甜可口，吸引許多農民種植⁽²⁾。木瓜屬熱帶果樹，頗適合臺灣中南部地區種植，全臺現有栽

培面積約2800公頃，依面積排序，分布在臺南、屏東、南投、高雄、嘉義及雲林等縣市⁽²⁾。木瓜的營養價值高，除含有蛋白質、脂肪、醣類、維他命及豐富的礦物質，更富含具保健功效的木瓜酵素 (papain)，是深受消費者喜愛的大眾化水果 (<https://healthjade.net/papaya/>)。

由於木瓜栽培環境潮濕炎熱，正符合許多真菌性病害的好發條件，其中又以為害果實為主的炭疽病最普遍也最嚴重。依據台灣植物病害名彙第五版所載，引起木瓜病害的真菌及類真菌計有37種 (species)，炭疽病菌則記錄有 *Colletotrichum boninense*、*C. capsici* 及 *C. gloeosporioides* 等3個菌種⁽¹⁾。近年來，由於分子生物學的快速進步與其相關技術的運用，*Colletotrichum* 的分類已有極大改變。根據最近的研究報告，*Colletotrichum* 擁有16個複合種 (species complexes) 及15個不屬於任何複合種的單一種 (singleton species)，全屬總計已達280個菌種，且仍在增加⁽¹⁷⁾。現今 *Colletotrichum* 的分類鑑定是以形態及基因條碼序列 (barcoding sequences) 作為依據，惟足以區別菌種間差異的形態特徵有限⁽¹⁷⁾。但隨著菌種附加模式標本 (epitype) 及新模式標本 (neotype) 的重新指定，乃開啟了應用核酸序列解決菌種鑑定的契機，而多基因系譜學 (multi-gene phylogeny) 被認為是當前執行 *Colletotrichum* 菌種分類與鑑定的有力工具^(4, 6, 12, 13, 17)。*Colletotrichum* 分類鑑定所用的基因序列有肌動蛋白 (actin, *ACT*)、微管蛋白 (β -tubulin 2, *TUB2*)、鈣調蛋白 (calmodulin, *CAL*)、幾丁質合成酶 (chitin synthase, *CHS-1*)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、穀氨醯胺合成酶 (glutamine synthetase, *GS*)、錳超氧化物歧化酶 (manganese-superoxide dismutase, *SOD2*) 及專用於 *C. gloeosporioides* 複合種鑑定的 *ApMat* (*Apn2-Mat1-2* intergenic spacer) 與核糖體核酸內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 等序列^(20, 30)。其中又以肌動蛋白 (*ACT*)、微管蛋白 (*TUB2*)、幾丁質合成酶 (*CHS-1*) 及甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (*GAPDH*) 等4種基因序列與核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS) 序列所鍊結而成的多重核酸序列最為常用^(8, 9, 13, 17, 18)。實

務上，對於未知菌種可先以分生孢子形態及核糖體核酸內轉錄間隔區序列鑑別其所屬的複合種或單一種；接著再用多基因序列親緣分析 (multi-locus phylogenetic analyses) 及其他表型特徵 (phenotypic characterization) 確定其菌種^(4, 7, 17)。操作上，則是將待鑑定菌株以其特定基因如 *ACT*、*CHS-1*、*GAPDH*、*TUB2* 及 ITS 等之序列與模式菌株 (ex-type culture) 或可信菌株 (authentic culture) 的相同核酸序列進行比對，以百分率表示其相似度；並以之建構多基因親緣關係樹 (multilocus phylogenetic tree)，用樹形圖表示待鑑定菌株與其相近菌種模式菌株的親緣關係。在多基因建構的樹形圖中，具有一致性的最小單系群 (monophyletic group) 被視為一個菌種。聯合多個未相連基因 (unlinked genes) 在親緣分析中形成的一致系譜，可顯示菌種間未有遺傳物質交換而為各個系譜 (lineage) 獨立演化的結果，此即當今 *Colletotrichum* 分類研究最常使用的“系譜一致的系统發育學種識別法 (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition, GCPSR)”⁽²⁶⁾。

國內外果樹炭疽病菌的學名過往常用 *C. gloeosporioides*，其實是依據病原菌形態所定的一個複合種 (species complex)^(5, 25)

。而 *C. gloeosporioides* 已不被認為是常見於熱帶或亞熱帶作物炭疽病菌的學名⁽¹⁹⁾。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，包含木瓜在內的多種果樹炭疽病菌即屬其中。台灣近年對木瓜炭疽病菌菌種已有多篇報導^(11, 23, 24, 28)，但尚缺乏系統性的探討。本研究為鑑定臺灣地區木瓜炭疽病菌的菌種與分布，爰就近年自全臺各地分離所得的木瓜炭疽病菌，依其形態與基因序列分別定其學名；另選取各菌種的代表菌株進行人工接種 (artificial inoculation) 以測定其病原性 (pathogenicity)，俾完成科霍氏法則 (Koch's postulates)，以作為日後木瓜炭疽病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2022年，分別前往臺灣中部及南部各木瓜產地採集罹炭疽病的成熟木瓜果實供分離病原菌。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)。罹病木瓜果實攜返實驗室後，將病斑上的炭疽病菌分生孢子塗佈於2%洋菜平板 (water agar)，再以玻璃針行單孢分離 (single spore isolation)，以獲得單孢菌株。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。木瓜炭疽病菌經數年之採集，逢機選取不同採集地之28株菌

表一、木瓜炭疽病菌菌株列表

TABLE 1. *Colletotrichum* isolates collected from papaya fruit used in this study

Isolate ID	Geographical origin	Collection date
PC1	Meinong, Kaohsiung	Nov. 2014
PC3	Linnei, Yunlin	Aug. 2015
PC4	Linnei, Yunlin	Aug. 2015
PC5	Linnei, Yunlin	Aug. 2015
PC6	Linnei, Yunlin	Aug. 2015
PC7	Jiji, Nantou	Oct. 2015
PC8	Jiji, Nantou	Oct. 2015
PC9	Jiji, Nantou	Oct. 2015
PC10	Yujing, Tainan	Nov. 2015
PC11	Yujing, Tainan	Nov. 2015
PC13	Yujing, Tainan	Nov. 2015
PC14	Shanlin, Kaohsiung	Nov. 2015
PC15	Shanlin, Kaohsiung	Nov. 2015
PC16	Shanlin, Kaohsiung	Nov. 2015
PC17	Nanhua, Tainan	Nov. 2015
PC18	Nanhua, Tainan	Nov. 2015
PC19	Nanhua, Tainan	Nov. 2015
PC20	Nanhua, Tainan	Nov. 2015
PC22	Linnei, Yunlin	Nov. 2015
PC23	Linnei, Yunlin	Dec. 2015
PC24	Linnei, Yunlin	Dec. 2015
PC25	Jiji, Nantou	Nov. 2016
PC26	Linnei, Yunlin	Jun. 2018
PC28	Gaushu, Pingtung	Jan. 2021
PC29	Changihih, Pingtung	Jan. 2021
PC30	Shinpi, Pingtung	Jan. 2021
PC31	Shinpi, Pingtung	Jan. 2021
PC32	Wufeng, Taichung	Oct. 2022

(表一)，供本研究菌種鑑定與病原性試驗之用。

親緣關係分析

1. 核酸萃取與基因定序

為鑑定臺灣各地木瓜炭疽病菌之菌種，乃進行菌株特定基因之定序並分析之。將前述28株菌以同上之方法獲得其培養菌體。刮取其菌絲及(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)、肌動蛋白基因 (*ACT*, 引子對ACT-512F/ ACT-783R)、幾丁質合成酶基因 (*CHS-1*, 引子對CHS-79F/ CHS-354R)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶基因 (*GAPDH*, 引子對GDF/ GDR) 及微管蛋白基因 (*TUB2*, 引子對T1/ T2) 等基因序列⁽³⁰⁾。聚合酶連鎖反應液總體積為25 μ L，內含12.5 μ L 2X *Taq* PCR

Master Mix (0.1 units / μL Taq DNA polymerase、0.4 mM 4種dNTP、Tris-HCl pH8.5、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、4 mM MgCl_2 及0.2% Tween 20) (慧眾生技公司, 臺灣), 另加前後向引子各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 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 接著進入35次增幅循環, 每一循環開始為95 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec, 引子黏合溫度 (annealing temperature) 分別為ITS (55 $^{\circ}\text{C}$)、ACT (55 $^{\circ}\text{C}$)、*CHS-1* (58 $^{\circ}\text{C}$)、*GAPDH* (55 $^{\circ}\text{C}$)及*TUB2* (52 $^{\circ}\text{C}$), 均作用30 sec; 延伸溫度 (extension temperature) 為72 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec, 最後再以72 $^{\circ}\text{C}$, 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)⁽²²⁾。各核酸序列將作為後續菌種鑑定及親緣關係分析之用, 菌種代表菌株的基因或核酸序列並登錄於基因銀行(GenBank)。

2. 菌種分子親緣性分析

菌株間親緣關係分析是以核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS) 及4種蛋白質或酵素基因 (*ACT*、*CHS-1*、*GAPDH*及*TUB2*) 序列鏈結成多基因核酸序列進行分析 (multilocus sequence analysis, MLSA)⁽¹⁴⁾, 分析結果以親緣關係樹 (phylogenetic tree) 呈現。惟因*C. okinawense* (*C. magnum* complex) 模式標本 (holotype) 菌株MAFF240517缺*CHS-1*基因序列, 分析時未列入。多基因核酸序列分析係先將供試菌株的各種核酸序列分別並列再切齊, 接著將同一菌株的不同核酸序列鏈結成多基因核酸序列。核酸序列之編輯 (edit) 及排列 (align) 係使用套裝軟體Lasergene software package之SeqBuilder module及MegAlign Pro (DNASTAR, USA)。多基因核酸序列進行親緣關係分析時, 並納入相關菌種的衍生模式菌株 (ex-type) 作為參考菌株 (reference strain)。分析方法是貝葉斯推斷法 (Bayesian inference method, MrBayes v.3.2.7) 及最大似然法 (maximum likelihood method with 1000 bootstrap replicates, MEGA-X) 併用。此外, 經親緣性分析後屬相同菌種之各菌株並就其上述各種基因序列進行相似度比較, 以探討其關聯性。

3. 菌種核酸序列相似百分率

以經親緣關係分析鑑定其菌種之PC30 (*C. fructicola*)、PC07 (*C. okinawense*)、PC11 (*C. plurivorum*)、PC09 (*C. schimae*)、PC32 (*C. siamense*)、PC05 (*C. tropicale*) 及PC29 (*C. truncatum*) 等7株代表菌株及待鑑定之PC26供比對其與模式菌株或可信菌株之上述核酸序列相似度。菌株相似度比對是以基因及核酸序列相似百分率 (percent identity) 表示, 以進一步確認菌種鑑定的結果。

菌落與分生孢子形態

為比對木瓜炭疽病菌之形態, 供試菌株自18 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 及每日光照12小時之定溫箱培養7日, 所得之菌體供作形態比對。

各菌種代表菌株之形態特徵記錄項目包括菌落特徵, 生長速率 (每菌株4皿); 及分生孢子形狀 (shape) 及長度與寬度 (size) (每菌株量測40個孢子)。

病原性測定

1. 接種源製備

選用市售外觀健康且成熟的木瓜果實[品種: 台農二號], 以人工接種方式測試源自木瓜各菌種代表菌株之病原性。供試菌株同為PC30 (*C. fructicola*)、PC07 (*C. okinawense*)、PC11 (*C. plurivorum*)、PC09 (*C. schimae*)、PC32 (*C. siamense*)、PC05 (*C. tropicale*)、PC29 (*C. truncatum*) 及PC26 (待鑑定) 等8菌株。將菌株培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板 (PDA), 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 (1×10^5 conidia/mL) 以供接種。

2. 接種方法

供接種木瓜果實先以70%乙醇作表面消毒, 再分別置於30.0 \times 22.5 \times 8.0 cm之有蓋壓克力盒, 盒底鋪以無菌水濕潤之擦手紙保濕, 每盒2粒果實。接種試驗以無傷口定點接種 (non-wound/drop method) 方式進行(27)。接種前, 先用簽字筆在果實上畫出直徑5 mm之接種圈4個, 再將供試菌株孢子懸浮液20 μL 滴至接種圈, 另滴以等量無菌水之處理作為對照。接種後, 蓋緊盒蓋, 置實驗室 (24~28 $^{\circ}\text{C}$), 3日後移去盒蓋, 第7日記錄接種結果。接種後出現炭疽病徵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

親緣關係分析與菌種鑑定

供試之28株木瓜炭疽病菌以ITS及4條基因序列 (*ACT*、*CHS-1*、*GAPDH*、*TUB2*) 進行多基因親緣關係分析, 確定為8個菌種分別歸屬5個複合種, 即*C. gloeosporioides*複合種 (CGSC)、*C. magnum*複合種 (CMSC)、*C. orchidearum*複合種 (COSC)、*C. acutatum*複合種 (CASC)及*C. truncatum*複合種 (CTSC) (表二~四、圖一~五)。CASC有1菌種*C. schimae*且僅1菌株, 係源自南投縣集集鎮 (表二~三、圖一)。CGSC有4菌種, 其中*C. fructicola*有4菌株且核酸序列完全相同, 其中3株 (PC14~16) 源自高雄市杉林區, 另一株PC30源自屏東新埤鄉。*C. tropicale*有6菌株均源自雲林縣林內鄉, 但分成3個分支, PC4~6等3菌株具相同核酸序列, PC23~24等2菌株具相同核酸序列, PC22則異於其他菌株。*C. siamense*有2菌株 (PC3及PC32) 居於不同分支, 分別源自雲林縣林內鄉及台中市霧峰區, 基因序列差異也大。此外, 尚有一菌株PC26之核酸序列與本複合種所含各菌種迥異, 列為待鑑定之新種 (表二~三、圖二)。CMSC有1菌種*C. okinawense*含10菌株, 且各菌株核酸

表二、木瓜炭疽病菌代表菌株之基因序列代號

TABLE 2. GenBank accession numbers of cultures of *Colletotrichum* from papaya used in this study

Species	Isolate ID	GenBank accession number ¹				
		ITS	ACT	CHS-1	GAPDH	TUB2
<i>C. fruticola</i>	PC30	OQ645447	OQ695484	OQ695488	OQ695482	OQ695486
<i>C. okinawense</i>	PC7	OQ642143	OQ723039	ON553307	OQ723038	OQ723040
<i>C. plurivorum</i>	PC11	OQ642144	OQ723042	OQ723044	OQ723041	OQ723043
<i>C. schimae</i>	PC9	OQ642139	OQ723035	OQ723037	OQ723034	OQ723036
<i>C. siamense</i>	PC3	OR462353	OR417339	OR417346	OR417336	OR417342
<i>C. siamense</i>	PC32	OQ642270	OQ723031	OQ723033	OQ723030	OQ723032
<i>C. tropicale</i>	PC5	OQ642142	OQ695483	OQ695487	OQ695481	OQ695485
<i>C. tropicale</i>	PC22	OR462350	OR417337	OR417344	OR417334	OR417340
<i>C. tropicale</i>	PC23	OR462352	OR417338	OR417345	OR417335	OR417341
<i>C. truncatum</i>	PC29	OQ642268	OQ975854	OQ975856	OQ975853	OQ975855
<i>Colletotrichum</i> sp. ²	PC26	OQ629879	OQ992713	OQ992715	OQ992712	OQ992714

¹ ITS: internal transcribed spacer, ACT: actin, CHS-1: chitin synthase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TUB2: β -tubulin.

² The species of the isolate PC26 has not been identified.

表三、木瓜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 3. Molecular identification of *Colletotrichum* representative isolates from papaya based on their identity to the given gene sequences of reference cultures of taxon

Species	Isolate ID	Percent identity (%) ¹				
		ITS	ACT	CHS-1	GAPDH	TUB2
<i>C. fruticola</i>	PC30	99.8/JX010165	100.0/FJ907426	99.3/JX009866	100.0/JX010033	100.0/JX010405
<i>C. okinawense</i>	PC7	100.0/MG600767	99.6/MG600971	N/A	94.7/MG600827	100.0/MG601034
<i>C. plurivorum</i>	PC11	100.0/MG600718	98.9/MG600925	100.0/MG600841	99.6/MG600781	99.3/MG600985
<i>C. schimae</i>	PC9	99.4/MZ595885	100.0/MZ664183	99.0/MZ799347	99.2/MZ664105	99.6/MZ674003
<i>C. siamense</i>	PC32	99.6/JX010171	99.3/FJ907423	98.0/JX009865	98.2/JX009924	99.6/JX010404
<i>C. tropicale</i>	PC5	99.6/JX010264	99.7/JX009489	98.7/JX009870	98.2/JX010007	98.8/JX010407
<i>C. truncatum</i>	PC29	100.0/GU227862	98.8/GU227960	98.4/GU228352	99.2/GU228254	100.0/GU228156
<i>Colletotrichum</i> sp. ²	PC26	N/A	100.0/MZ438726	100.0/MZ457438	100.0/MZ457456	99.8/MZ509122

¹ 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 reference cultures ICMP18581 (*C. fruticola*), MAFF240517 (*C. okinawense*), CBS125474 (*C. plurivorum*), NN046984 (*C. schimae*), ICMP18578 (*C. siamense*), CBS124949 (*C. tropicale*) and CBS151.35 (*C. truncatum*) were used for identification. ITS: internal transcribed spacer, ACT: actin, CHS-1: chitin synthase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TUB2: β -tubulin 2, N/A: not applicable.

² Unidentified species, the accession numbers in this row were from an unidentified isolate Col-1386.

序列完全相同，是本研究中單一菌種株數最多者，分別源自南投、台南、高雄及屏東等縣市(表二~三、圖三)。COSC有1菌種*C. plurivorum*含2菌株，分別源自台南市玉井區及南化區，其核酸序列相同(表二~三、圖四)。CTSC有1菌種*C. truncatum*含2菌株，分別源自屏東縣長治鄉及新埤鄉，其核酸序列相同(表二~三、圖五)。

菌落、生長速率與分生孢子形態

依據各菌株分生孢子形態及ITS序列分析結果，供試菌株

分屬5個複合種；參考後續分子鑑定結果，判定木瓜炭疽病菌計有8個菌種。各菌種選一代表菌株(編號列於括號內)，描述其形態特徵如下。

***C. fruticola* (PC30)**：菌落著生大量灰色菌絲，菌落外緣呈淺灰色，無明顯分生孢子堆，菌落生長平均速率為0.61 cm/day。分生孢子單細胞、無色、圓筒狀，兩端圓形(round)，平均長度及寬度分別為16.63±0.54及5.40±0.50 μ m(圖六A、圖七A、表四)。

***C. okinawense* (PC7)**：菌落著生大量橘色分生孢子堆，菌絲稀

表四、木瓜炭疽病菌之分生孢子度量

TABLE 4. Dimensions of conidia of representative isolates of *Colletotrichum* spp. from papaya¹

Species (isolate ID) ²	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio
<i>C. fructicola</i> (PC30)	16.63 ± 0.54	5.40 ± 0.50	3.10 ± 0.30
<i>C. okinawense</i> (PC7)	15.73 ± 0.85	5.00 ± 0.00	3.15 ± 0.17
<i>C. plurivorum</i> (PC11)	15.15 ± 0.74	5.13 ± 0.33	2.97 ± 0.22
<i>C. schimae</i> (PC9)	15.00 ± 0.23	4.98 ± 0.16	3.02 ± 0.13
<i>C. siamense</i> (PC32)	18.05 ± 0.78	5.10 ± 0.30	3.55 ± 0.25
<i>C. tropicale</i> (PC5)	17.60 ± 0.81	5.48 ± 0.51	3.24 ± 0.31
<i>C. truncatum</i> (PC29)	26.23 ± 0.89	3.03 ± 0.16	8.69 ± 0.46
<i>Colletotrichum</i> sp. (PC26)	17.00 ± 0.72	5.00 ± 0.00	3.40 ± 0.14

¹ Mean ± standard error, n=40.² The PC number within parentheses is the representative isolate of each species. The species of the isolate PC26 has not been identified.

少，菌落周緣生有約1 cm寬度之白色菌絲，菌落生長平均速率為0.49 cm/day。分生孢子單細胞、無色、圓筒形，兩端圓形，平均長度及寬度分別為15.73±0.85及5.00±0.00 µm (圖六B、圖七B、表四)。

***C. plurivorum* (PC11)**：菌落著生大量灰色菌絲，菌落中央呈黑色，周緣生白色菌絲，無明顯分生孢子堆，菌落生長平均速率為0.59 cm/day。分生孢子單細胞、無色、圓筒形或略彎曲，兩端圓形，平均長度及寬度分別為15.15±0.74及5.13±0.33 µm (圖六C、圖七C、表四)。

***C. schimae* (PC9)**：菌落著生大量分生孢子堆排列成多個同心圓，周緣為白色菌絲，菌落生長平均速率為0.40 cm/day。分生孢子單細胞、無色、圓桶形或紡錘形，兩端尖形 (acute)，平均長度及寬度分別為15.00±0.23及4.98±0.16 µm (圖六D、圖七D、表四)。

***C. siamense* (PC32)**：菌落表面密生大量橘色分生孢子堆，上覆少量白色絮狀菌絲，菌落生長平均速率為0.59 cm/day。分生孢子單細胞、無色、圓桶形，兩端圓形，平均長度及寬度分別為18.05±0.78及5.10±0.30 µm (圖六E、圖七E、表四)。

***C. tropicale* (PC5)**：菌落著生白色緻密菌絲，無明顯分生孢子堆，菌落生長平均速率為0.47 cm/day。分生孢子單細胞、無色、圓桶形，兩端圓形，平均長度及寬度分別為17.60±0.81及5.48±0.51 µm (圖六F、圖七F、表四)。

***C. truncatum* (PC29)**：菌落著生深灰色緻密菌絲，外緣為白色菌絲，未見明顯分生孢子堆，菌落生長平均速率為0.33 cm/day。分生孢子單細胞、無色、彎月形，兩端尖形，平均長度及寬度分別為26.23±0.89及3.03±0.16 µm (圖六G、圖七G、表四)。

***Colletotrichum* sp. (PC26)**：菌落著生大量灰色棉絮狀菌絲，未見明顯分生孢子堆，菌落生長平均速率為0.61 cm/day。分生孢

子單細胞、無色、圓桶狀略呈卵圓形、兩端圓形，平均長度及寬度分別為17.00±0.72及5.00±0.00 µm (圖六H、圖七H、表四)。

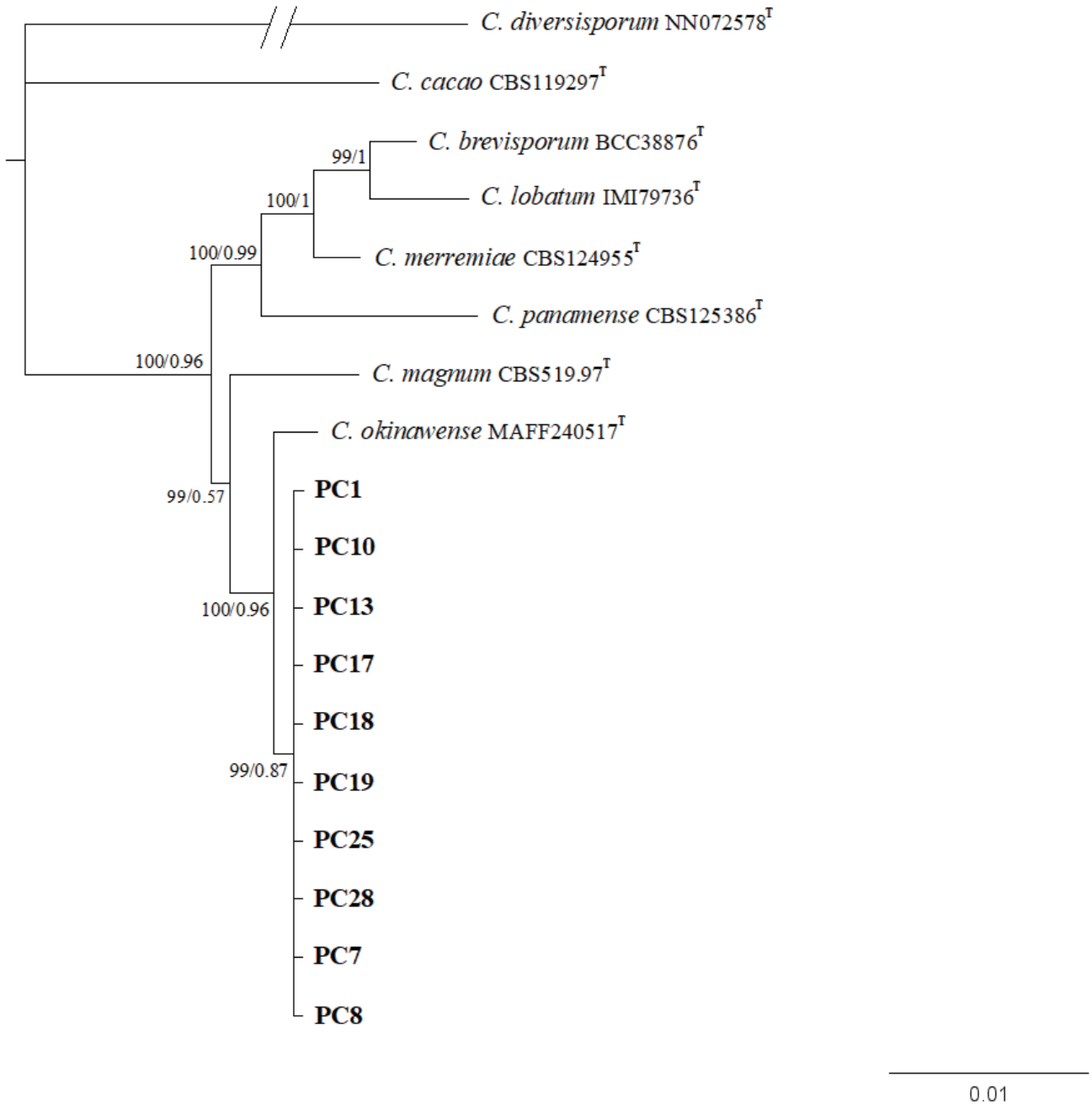
病原性測定

木瓜炭疽病菌菌株之分生孢子懸浮液對台農2號木瓜成熟摘離果實進行病原性測試結果顯示，接種3日後開始出現水浸狀病徵，7日後，接種部位中央出現褐色病斑，上生大量鮭魚色分生孢子堆，此與田間所見木瓜炭疽病病徵相似。而滴以無菌水的對照處理無病徵。以單孢分離病斑上的分生孢子並培養，其菌落與孢子形態均與原接種菌株相似，符合科霍氏法則。接種試驗證實本研究所報告的8種木瓜炭疽病菌 (含待鑑定之新種) 對木瓜果實均具病原性。

討 論

炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 是全球許多重要經濟作物的病原菌，常造成果樹、蔬菜及觀賞植物的嚴重損失⁽¹⁰⁾。病原菌是病害防治的標的，病原菌的分類鑑定是植物病理學研究的基礎工作，對探討病原菌演化史、病原菌監測及病害防治、作物抗病育種以至制定防檢疫法規等均至關重要。由於炭疽病菌的形態特徵有限且差異不顯著，以形態為本的傳統分類方法已不敷所需。運用多基因譜系分析 (multilocus phylogenetic analysis)，並結合病原菌形態、生理、病原性、培養特性及次級代謝物等多項特徵是較理想的炭疽病菌系統分類學 (systematics) 研究方法，但主要仍依靠多基因譜系分析⁽⁴⁾。由於現今炭疽病菌分類現況已迥異於過往，分子生物學的應用導致許多舊菌種學名更新與新菌種發表^(4, 6, 8)。原國內文獻所載各種作物炭疽病菌多僅依據其形態或寄主定其學名，缺乏分子生物學證據，因而需在新的分類系統架構下重新定其學名，這是國內植病研究人員無可旁貸的責任。此外，由於炭疽病菌的分類系統與時俱進，學名迭有更動，即使近年發表的炭疽病菌亦可能因之後新菌種的發表而需修訂^(6, 17)。新菌種不斷出現，亦導致炭疽病菌的分類系統持續擴大，此予分類鑑定工作帶來極大挑戰。依據數個基因所建構的親緣關係樹上的一個單系群或稱演化支 (clade) 即可定義為一個菌種，是目前炭疽病菌新菌種不斷增加的主因⁽¹⁷⁾。然而有些學者已開始質疑，相較於全基因體分析 (whole genome analysis)，菌株少數基因的變異可能不足以反映該菌種的演化歷史⁽³⁾。當炭疽病菌的分類系統日趨擴大，當反思菌種是否需要更嚴謹的定義。

木瓜炭疽病在臺灣雖普遍發生，但相關的研究卻有限，近年始有數篇木瓜炭疽病菌菌種報告發表^(11, 23, 24, 28)。例如，蔡氏等報告木瓜炭疽病菌有 *C. gloeosporioides*、*C. capsici* 及 *C. boninense* 等3菌種，但僅有形態描述，未見相關基因序列，難以進行比對⁽²⁸⁾。著者曾於2018年發表 *C. brevisporum* 為台灣木

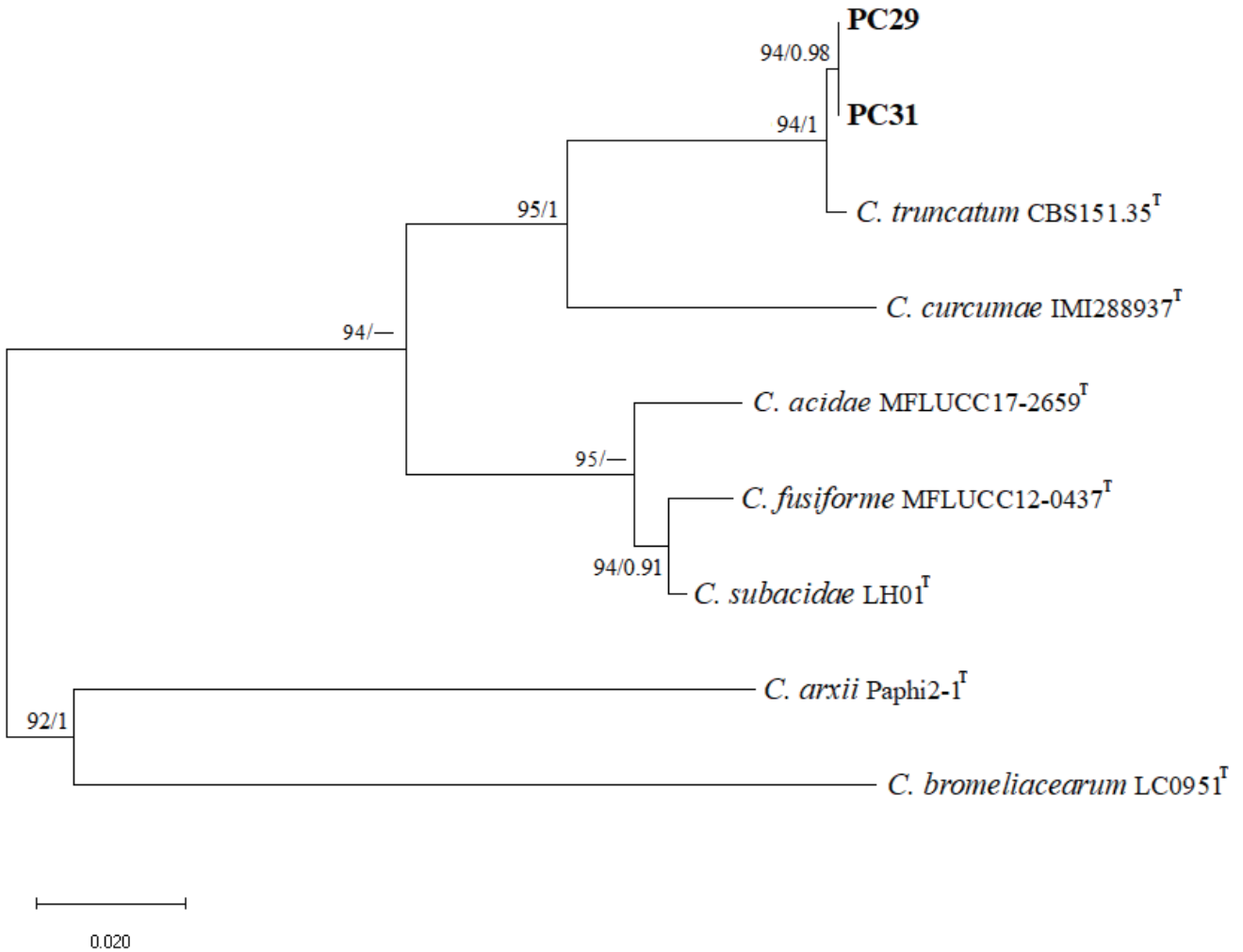


圖三、木瓜炭疽病菌 *Colletotrichum magnum* 複合種多基因親緣關係圖。

Fig. 3. A Bayesian inference phylogenetic tree of *Colletotrichum magnum* species complex isolates collected from papaya fruit. Isolate names from this study are indicated in bold and ex-type strains are indicated with ^T in the end of the taxa labels. This tree was built by the concatenate sequences of ITS and *ACT*, *GAPDH*, and *TUB2* genes. The tree generated by maximum likelihood had a similar topology. Bootstrap support values for maximum likelihood (before the slash) and Bayesian posterior values (after the slash) are shown at each node. *C. diversisporum*, a singleton species, was used as outgroup. The scale bar indicates the number of expected changes per site.

新埤鄉，但核酸序列完全相同，雖分散異地卻可能始於同源。*C. tropicale*有6株菌均源自雲林縣林內鄉，卻成3個分支，顯示*C. tropicale*菌株具有較大的基因變異。*C. siamense*僅有2菌株卻位於親緣關係樹上的不同分支，此二菌株在地理分布有別

(林內及霧峰)，而基因變異也大。此外，本複合種尚有1菌株(PC26)為未知種，其甘油醛-3-磷酸脫氫酶基因(*GAPDH*)序列具獨特性，經比對，其與農業試驗所嘉義分所自咖啡葉片分離之兩菌株Col-1836及Col-1837(菌種未鑑定)的同一基因(代號：



圖五、木瓜炭疽病菌 *Colletotrichum truncatum* 複合種多基因親緣關係圖。

Fig. 5. A maximum likelihood phylogenetic tree of *Colletotrichum truncatum* species complex isolates collected from papaya fruit. Isolate names from this study are indicated in bold and ex-type strains are indicated with “T” in the end of the taxa labels. This tree was built by the concatenate sequences of ITS and *ACT*, *GAPDH*, *TUB2* and *CHS-1* genes. The tree generated by Bayesian inference had a similar topology. Bootstrap support values for maximum likelihood (before the slash) and Bayesian posterior values (after the slash) are shown at each node. Missing values are represented by minus sign. *C. arxii* and *C. bromeliacearum* belong to *C. gigasporum* and *C. boninense* species complex, respectively, were used as outgroup. The scale bar indicates the number of expected changes per site).

表的新菌種致無法定其學名。本研究關於 *C. okinawense* 及 *C. schimae* 菌株的案例也表示，*Colletotrichum* spp. 的分類是不斷更新的，新菌種的發表勢將對已定學名的菌株帶來挑戰，對未定學名菌株則可提供鑑定的依據。

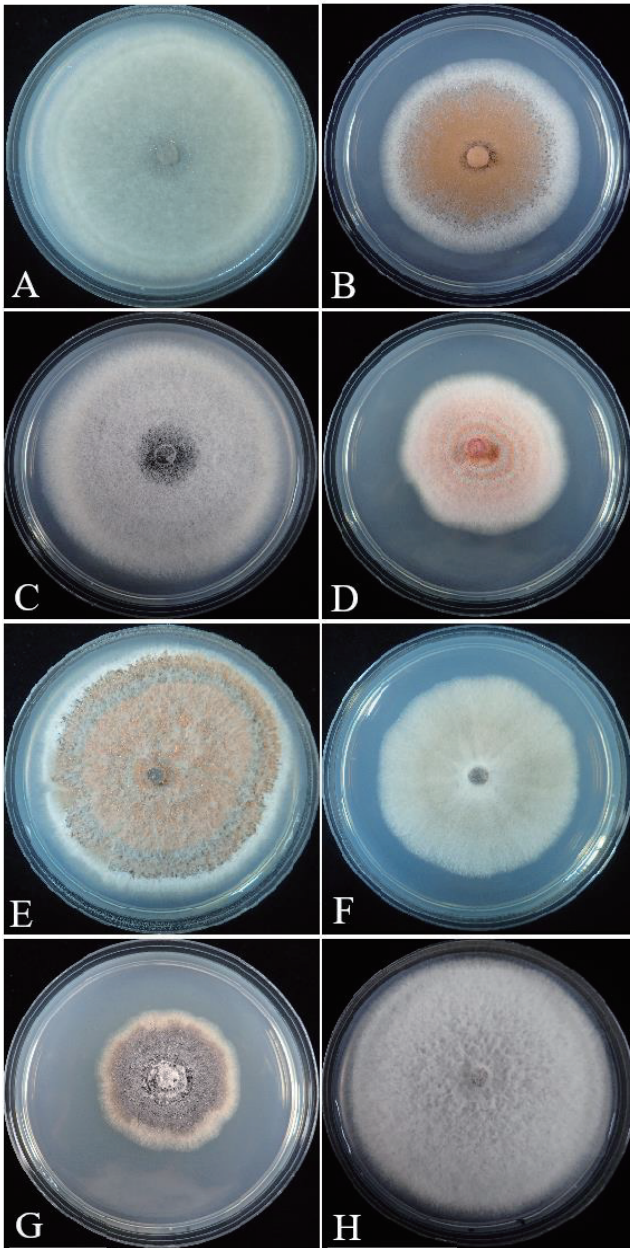
木瓜炭疽病菌在本研究中已鑑定7個菌種，部分菌種在台灣並非僅見於木瓜。根據已知報告，*C. fructicola* 為芒果、葡萄、草莓、茶樹及辣椒等作物的病原菌，*C. siamense* 為芒果及草莓的病原菌，*C. tropicale* 為芒果及葡萄的病原菌，*C. truncatum* 則見於紅龍果等8種植物

(http://mycolab.pp.nchu.edu.tw/PDI_Taiwan)。國外關於木瓜炭疽病菌菌種之記載，自1980年迄今，計有19種，其中

fructicola、*C. okinawense*、*C. plurivorum*、

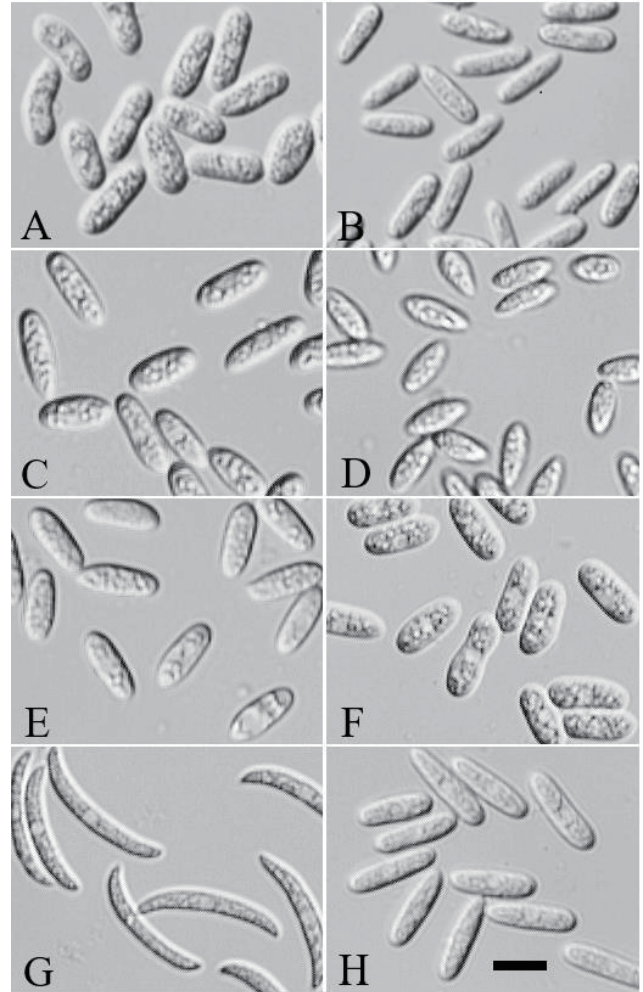
C. siamense 及 *C. truncatum* 等5菌種與本研究相同，而 *C. tropicale* 及 *C. schimae* 等2菌種則國內外均無記錄 (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>)。

本研究就台灣地區木瓜炭疽病菌的菌種分布完成初步調查，這將有助於我們了解此病原菌菌種概況，對病害管理應有助益。面對快速變動且日趨複雜的炭疽病菌分類系統，惟有投入更多的研究資源始能準確掌握田間病原菌菌種族群的分布。期待我植病界先進同好廣續進行田間炭疽病菌的偵測與監測，配合有效防治措施以減輕本病帶來的損失。



圖六、木瓜炭疽病菌各菌種代表菌株在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基生長7天之菌落。

Fig. 6. Seven-day-old colonies of *Colletotrichum* isolates from papaya grown on PDA at 24°C under 12 h darkness/12 h cool white fluorescent light. A. *C. fruticola* (PC30), B. *C. okinawense* (PC7), C. *C. plurivorum* (PC11), D. *C. schimae* (PC9), E. *C. siamense* (PC32), F. *C. tropicale* (PC5), G. *C. truncatum* (PC29), H. Unidentified *Colletotrichum* sp. (PC26).



圖七、木瓜炭疽病菌各菌種代表菌株之分生孢子顯微鏡照片。

Fig. 7. An illustration of conidia of *Colletotrichum* spp. associated with papaya anthracnose.

A. *C. fruticola* (PC30), B. *C. okinawense* (PC7), C. *C. plurivorum* (PC11), D. *C. schimae* (PC9), E. *C. siamense* (PC32), F. *C. tropicale* (PC5), G. *C. truncatum* (PC29), H. Unidentified *Colletotrichum* sp. (PC26). Scale bar = 10 μm.

謝辭

本研究承前行政院農業委員會 (現農業部) 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

1. Anonymous, 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, 329 pp. (in Chinese)
2. Anonymous, 2020. Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan. Taipei, 340 pp. (in Chinese)

3. Cai, L., Giraud, T., Zhang, N., Begerow, D., Cai, G., and Shivas, R. G. 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Divers.* 50:121-133.
4. 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. 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.
8. Damm, U., Sato, T., Alizadeh, A., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2019. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Stud. Mycol.* 92:1-46.
9. Damm, U., Woudenberg, J. H. C., Cannon, P. F. and Crous, P. W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Divers.* 39: 45-87.
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., Pan, H.-R., and Wang, C.-C. 2018. First report of *Colletotrichum brevisporum* causing anthracnose on papaya in Taiwan. *Plant Dis.* 102:2375.
12. Hyde, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., Goodwin, P. H., Chen, H., Johnston, P. R., Jones, E. B. G., Liu, Z. Y., McKenzie, E. H. C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S. R., Pfenning, L. H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R. G., Tan, Y. P., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Yang, Y. L. and Zhang, J. Z. 2009. *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Divers.* 39:147-182
13. 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.
14. 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.
15. 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)
16. Liu, X. B., Feng Y., Zheng X., and Huang. G. X. 2019. First report of papaya anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in China. *Plant Dis.* 103:2473.
17. Liu, F., Ma, Z. Y., Hou, L. W., Diao, Y. Z., Wu, W. P., Damm, U., Song, S., and Cai, L. 2022. Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. *Stud. Mycol.* 101:1-56.
18. 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(14 p.).
19. 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.
20. Silva, D. N., Talhinhos, 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.
21. Squizzato, V., Yucel, Y. H., Richardson, S. E., Alkhotani, A., Wong, D. T., Nijhawan, N., and Chan, C. C. 2015. *Colletotrichum truncatum* species complex: treatment considerations and review of the literature for an unusual pathogen causing fungal keratitis and endophthalmitis. *Med. Mycol. Case Rep.* 9:1-6.
22. Staden, R. 1980. A new computer method for the storage and manipulation of DNA gel reading data. *Nucleic Acids Res.* 8:3673-3694.
23. Sun, Y.-C., and Huang, C.-J. 2019. *Colletotrichum plurivorum*, the causal agent of anthracnose fruit rot of papaya in Taiwan. *Plant Dis.* 103:1040.
24. Sun, Y.-C., and Huang, C.-J. 2020. *Colletotrichum okinawense*, the causal agent of postharvest anthracnose fruit rot of papaya in Taiwan. *J. Plant Pathol.* 102:581-582.
25. Talhinhos, P., and Baroncelli, R. 2021. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Divers.* 110:109-198.
26. Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.

- M., Hibbett, D. S., and Fisher, M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31:21-32.
27. Torres-Calzadada, C., Tapia-Tussellb, R., Higuera-Ciaparac, I., Huchin-Poota, E., Martin-Mexa, R., Nexticapan-Garceza, A., and Perez-Brito, D. 2018. Characterization of *Colletotrichum truncatum* from papaya, pepper and physic nut based on phylogeny, morphology and pathogenicity. *Plant Pathol.* 67:821-830.
28. Tsai, J. N., Ann, P. J., Hsu, Z. H., and Cheng, H. F. 2012. Survey of papaya diseases in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 21:154. (in Chinese)
29. Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Liu, X., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Divers.* 61:165-179.
30. Weir, B. S., Johnson, P. R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73:115-180.
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.

also found one unidentified isolate belongs to CGSC. Inoculation of a representative isolate of each species could cause anthracnose symptoms on mature papaya fruit (cv. Tainung No.2), and the same fungus was re-isolated from symptomatic fruit, thus fulfilling Koch's postulates. Except for *C. okinawense* and *C. plurivorum*, the other 5 species were reported to be the pathogens of papaya anthracnose for the first time in Taiwan.

Keywords: multilocus phylogenetic analysis, taxonomy

ABSTRACT

Chen, G.-Y. and Duan, C.-H.* and. 2023. Identification of *Colletotrichum* species associated with papaya anthracnose in Taiwan. *J. Plant Med.* 65(4): 125-138.

*Corresponding author, E-mail: chduan1@hotmail.com

Papaya anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. affects fruit quality and market values considerably. Twenty-eight isolates collected from papaya fruit during 2014~2022 in Taiwan were used for species identification and pathogenicity tests in this study. Based on conidial morphology and ITS sequences, the isolates were classified into 5 species complexes: *C. acutatum* species complex (CASC), *C. gloeosporioides* species complex (CGSC), *C. magnum* species complex (CMSC), *C. orchidearum* species complex (COSC) and *C. truncatum* species complex (CTSC). Phylogenetic analyses of the isolates were performed by using ITS and 4-gene dataset (*ACT*, *CHS-1*, *GAPDH* and *TUB2*). These analyses confirmed that *C. okinawense* (10 isolates) was the dominant species followed by *C. tropicale* (6 isolates), and *C. fruticola* (4 isolates). Moreover, there were 2 isolates for each species of *C. plurivorum*, *C. siamense*, and *C. truncatum*, and 1 isolate for *C. schimae*. Additionally, we

