

臺灣五種果樹炭疽病菌之鑑定、病原性及對殺菌劑之感受性

段中漢^{1*} 潘蕙如¹ 王群中¹

摘要

段中漢、潘蕙如、王群中。2018。臺灣五種果樹炭疽病菌之鑑定、病原性及對殺菌劑之感受性。臺灣農藥科學 5: 91-111。

Colletotrichum spp. 引起的果樹炭疽病，是臺灣普遍且嚴重的植物病害。炭疽病菌之分類及對防治藥劑的感受性是影響病害發生與防治的關鍵因素。本研究應用分生孢子、菌落形態及多重基因序列比對等屬性，對分離自楊桃 (*Averrhoa carambola*)、葡萄 (*Vitis vinifera*×*V. labrusca*)、芒果 (*Mangifera indica*)、木瓜 (*Carica papaya*) 及蓮霧 (*Syzygium samarangense*) 等 5 種果樹炭疽病菌各 2 株單孢菌株進行比對分析，鑑定出 *C. asianum*、*C. siamense* 各 2 株，及 *C. brevisporum*、*C. fructicola*、*C. tropicale*、*C. viniferum* 各 1 株等 6 個菌種，另有 2 菌株待鑑定。將 5 種果樹炭疽病菌以交互接種方式測試其對無傷口摘離果實之病原性，結果顯示供試炭疽病菌均能感染其原寄主果實，多數菌株亦能感染 1 或 2 種原寄主以外的果實，但僅有分離自葡萄之晚腐 (炭疽) 病菌能感染葡萄。果實成分對不同寄主來源之炭疽病菌的菌絲生長影響差異不顯著。供試炭疽病菌對 9 種防治藥劑：亞托敏、賽普護汰寧、克熱淨、免得爛、百克敏、得克利、甲基多保淨、三氟敏及三氟派瑞之抗性反應相似。多點作用機制藥劑如免得爛及克熱淨藥效最佳，分別能抑制全部或大部分供試菌株之孢子發芽，其他 7 種單點作用機制藥劑則僅能對少部分菌株之孢子發芽具抑制作用。

關鍵詞：炭疽病菌、病原性、殺菌劑

接受日期：2019 年 3 月 6 日

* 通訊作者。E-mail: chduan@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

緒言

由 *Colletotrichum* spp. 所引起的果樹炭疽病是以果實為主要危害部位，為臺灣常見的果樹病害之一。「植物保護手冊」即列有以藥劑為主的 24 種果樹炭疽病防治方法⁽¹⁾，顯見果樹炭疽病在臺灣之普遍性與重要性。植物病原菌的種類決定病害之發生與防治方法之擬定，實因病原菌決定病原性、寄主範圍及對防治藥劑之感受性等特性，是植物病理學的主要研究對象；而病原菌之鑑定與分類更是研究果樹炭疽病首要釐清的問題。臺灣果樹炭疽病菌學名以 *C. gloeosporioides* 最常見，該菌發表於 1882 年並至少涉及 470 屬 (genus) 1000 種 (species) 植物的炭疽病，是該屬最常見的菌種⁽¹⁵⁾。惟隨著近年生物科技的快速進步，果樹炭疽病菌的鑑定及分類亦出現新的面貌。例如，約 10 年前在中南半島泰、寮等國分離自 8 種果樹的 25 株炭疽病菌，依其分生孢子形態及基因序列比對數種 *Colletotrichum* 模式菌株 (extype strains)，發現其均非 *C. gloeosporioides*，而是 *C. asianum* 及 *C. fructicola*，或為其他尚無法鑑別之菌種⁽³⁵⁾。近年在中國廣西分離之芒果炭疽病菌經鑑定亦非 *C. gloeosporioides*，而分別是 *C. asianum*、*C. fructicola* 及 *C. siamense*⁽³¹⁾；而福建及貴州的葡萄晚腐 (炭疽) 病菌亦經鑑定是以 *C. viniferum* 為優勢種⁽²⁹⁾。臺灣近年針對葡萄晚腐病菌應用多重

基因序列分析，也發現新記錄菌種 *C. viniferum*⁽³⁾；而芒果炭疽病菌應用 ApMat 及 TUB2 基因序列進行鑑定亦證實 *C. asianum* 為臺灣優勢種⁽⁴⁾，且這兩種果樹炭疽病菌均無 *C. gloeosporioides*。臺灣以往對果樹炭疽病菌鑑定之依據，僅止於形態及核糖體核酸內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 基因序列比對，病原菌鑑定多為 *C. gloeosporioides* 及 *C. acutatum* 等 2 種^(2, 7, 9)。隨著基因定序技術與生物資訊學的快速進展，運用多種基因序列與生物資訊分析技術已能更有效地進行植物炭疽病菌的分類與鑑定，在國際學術界亦相繼發表許多炭疽病菌之新學名^(13, 14, 30, 32, 45)，而國內相關的研究工作亦乘勢而興。

Colletotrichum spp. 在鑑定上常用的基因序列有核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、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 1, CHS-1)、麩醯胺酸合成酶 (glutamine synthetase, GS) 及超氧化物歧化酶 (manganese-superoxide dismutase, SOD2) 等多種基因⁽⁴²⁾。應用不同組合的基因序列可能產生不同的鑑定結果，但學界對於使用何種基因序列組合於最常見之 *C. gloeosporioides* 複合種 (species complex) 的分類鑑定並無共識⁽²⁰⁾。在這些用於分類鑑定的基因中，仍以 ITS 作為通用基因標誌

(universal DNA barcoding marker)，但其僅具中等鑑別度^(14, 18)。另一新的鑑定用基因序列 Apn2-Mat1-2 intergenic spacer (ApMat) 已導入 *Colletotrichum* spp. 之鑑定，且證實其效能等同前述多基因鑑定之結果^(39, 40)，頗具應用價值。由於近年炭疽病菌分類研究的長足進步，揭開了果樹炭疽病菌分類上多樣且複雜的面貌，這些研究成果一方面促進植物病理學的進步，同時也為病害防治帶來更多的挑戰。一種果樹炭疽病可能受數種 (species) 炭疽病菌感染，而單一種炭疽病菌亦可感染不同種類的果樹^(11, 22, 23)。Cai 等建議運用多相策略 (polyphasic strategy) 來釐清炭疽病菌在鑑定上的爭議，這包含形態、生理、次級代謝產物、病原性及應用多種基因序列比對之系統發生學 (phylogenetics) 等方法進行炭疽病菌分類與親緣性研究⁽¹⁴⁾，其目的在藉由多種因子互補互證，避免僅靠單一因子造成偏頗與缺失，以期獲得最正確的鑑定結果。

臺灣果樹炭疽病仍以合成化學藥劑為主要防治方法，病原菌抗藥性是本病防治上常見的問題^(6, 8, 12, 17, 26, 44)。果樹炭疽病菌對其防治藥劑之感受性關乎防治成效與農民收益，並涉及環境保護與食品安全等議題，而這些問題均源於殺菌劑之種類與效力。炭疽病菌之鑑定、寄主範圍、病原性、及對藥劑感受性等生物學特性均為植物病理學研究的重要課題。本研究選取楊桃、葡萄、芒果、木瓜及蓮霧等 5 種臺灣常見果樹炭疽病之代表性菌株各 2 株，就

其形態、特定基因序列、營養需求、病原性及對防治藥劑之感受性等項目進行比較，探討不同寄主來源果樹炭疽病菌在這些特性上的差異，以為擬定果樹炭疽病防治方法之參考。

材料與方法

一、供試菌株

於 2014 年 1 月起至 2015 年 12 月止，分別前往臺灣各地採集楊桃 (*Averrhoa carambola*)、葡萄 (*Vitis vinefera* × *V. labrusca*)、芒果 (*Mangifera indica*)、木瓜 (*Carica papaya*) 及蓮霧 (*Syzygium samarangense*) 等 5 種果樹之罹炭疽病果實供分離病原菌。罹病果實攜回實驗室後，先以 70% 乙醇 (ethanol) 作表面消毒，再置於 30.0×22.5×8.0 cm 之有蓋壓克力密閉盒中，盒內鋪以無菌水濕潤之紙巾以保持濕度。經 3 至 4 日，待罹病果實病斑部產生分生孢子盤 (acervulus)，再以玻璃針單孢分離法獲單孢菌株，並移置於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (Potato dextrose agar, PDA)，於 24°C 及每日光照 12 小時之定溫箱培養，供後續試驗之用。培養所得之菌種以打孔器切取菌落周邊直徑 5 mm 之圓形菌絲塊放入內裝 1 mL 無菌水之 2-mL 冷凍小管 (Cryogenic vial, Nalge Co., Rochester, NY, USA)，置於 16°C 定溫箱長期保存。上述 5 種果樹炭疽病菌經 2 年之採集，分別獲得不同果樹之菌株各 25~50 株。任意

選取此 5 種果樹之菌株各 2 株，合計 10 株作為本研究之供試菌株 (表一)。

二、菌株形態

為觀察並記錄供試菌株之形態，包括菌落特徵及分生孢子之度量 (dimension) 及形狀 (shape)，供試炭疽病菌自 16°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 7 日，分別就各菌株之菌落及其所產生之分生孢子形態作描述，並測量孢子的長度與寬度，每菌株計量測 30 個孢子。

三、菌株之基因定序、親緣性分析及菌種鑑定

為探討分離自不同果樹之炭疽病菌的親緣關係並鑑定其菌種，爰以供試菌株之 5 種特定基因序列進行比對分析。供試菌

株分別接種於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板，並於 24°C 及每日光照 12 小時之定溫箱培養 7 日。刮取菌絲後，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)。再以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS, 引子對 ITS1/ITS4)⁽⁴³⁾、甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (GAPDH, 引子對 GDF1/ GDR1)⁽²⁵⁾、肌動蛋白 (ACT, 引子對 ACT-512F/ ACT-783R)⁽¹⁶⁾、微管蛋白 (TUB2, 引子對 T1/ T2)⁽³³⁾ 及幾丁質合成酶 (CHS-1, 引子對 CHS-79F/ CHS-354R)⁽¹⁶⁾ 等基因序列。聚合酶連鎖反應總體積為 25 μ L，內含 12.5 μ L 2X Taq PCR Master Mix (慧眾生技公司，臺灣)，成分為 0.2 units / μ L Taq DNA polymerase、0.4 mM 4 種 dNTP、Tris-HCl pH8.5、(NH₄)₂SO₄、4 mM MgCl₂、0.2% Tween 20、前後向引子各 1 μ L (10 μ M)、2.5 μ L (10 ng) 基因體核酸及水 8 μ L。聚合酶連鎖反應增幅條件先為 95°C，5 min，

表一、本研究所用果樹炭疽病菌列表

Table 1. *Colletotrichum* isolates characterized in this study

Isolate	Host plant	Location	Collection date
CC-1	Carambola	Jhuolan, Miaoli	Oct. 2014
CC-6	Carambola	Yuanshan, Yilan	Jul. 2015
GC-3	Grape	Erlin, Changhua	Jun. 2015
GC-9	Grape	Erlin, Changhua	Jul. 2015
MC-1	Mango	Caotun, Nantou	Jun. 2014
MC-9	Mango	Yujing, Tainan	Jul. 2015
PC-1	Papaya	Meinong, Kaohsiung	Nov. 2014
PC-9	Papaya	Jiji, Nantou	Oct. 2015
WC-1	Wax apple	Jiadung, Pingtung	Mar. 2015
WC-3	Wax apple	Sinyi, Nantou	Oct. 2015

接著進入增幅循環，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)、GAPDH (55°C)、ACT (55°C) 及 CHS-1 (58°C)，均作用 30 sec，接著以 72°C 作用 30 sec，連續 35 個循環，最後以 72°C 作用 12 min 作結。以聚合酶連鎖反應產物進行基因雙向定序，定序結果整理成序列重疊群 (sequence contig)⁽⁴¹⁾ 供後續菌種鑑定及親緣性分析。菌株間親緣性分析是以菌株間多基因序列分析 (multilocus sequence analysis, MLSA)⁽²⁸⁾ 為之。先將供試菌株之各種基因序列分別並列切齊，再將同一菌株之不同基因序列鏈結成多基因序列，並以最大似然分析法 (maximum likelihood analysis) 及 1000 次重複取樣之 bootstrap test 檢驗關係樹各分枝點之可信度，分枝 (branch) 長度則以菌株之核酸序列間每一位點的核酸置換數期望值為依據。基因序列之編輯 (edit) 及對齊 (align) 分別使用 Lasergene software package 之 SeqBuilder module 及 MegAlign Pro (DNASTAR, Madison, WI, USA)。供試菌株之鑑定則以上述 4 種基因序列 (CHS-1 除外) 分別與炭疽病菌菌種 (species) 之模式菌株 (ex-type culture)^(34, 36, 38) 的相同基因序列作比對，以基因序列相同百分率 (percent identity) 表示之，綜合各基因序列比對結果及形態特徵判定各菌株之所屬菌種。

四、水果成分對菌株生長之影響

為得知分離自不同果樹的炭疽病菌對不同果品果實成分是否具營養偏好性，將上述 5 種果樹：楊桃 (二林種)、葡萄 (巨峰)、芒果 (愛文)、木瓜 (臺農二號) 及蓮霧 (南洋種) 之成熟果實 (可直接食用之熟度) 製成培養基培養供試菌株，記錄各菌株在不同果實培養基的生長情形。培養基的製作是以上述 5 種果樹之成熟果實分別與水以等重量比放入果汁機打碎，再以 4 層紗布過濾。濾液加入重量比為 2% 之洋菜粉 (Agar, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)，以 121°C 滅菌後倒入直徑 9 公分之培養皿備用。供試菌種先培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 7 日，再切取菌落外緣之直徑 5 mm 菌絲塊置於各種水果培養基平板中心，於 24°C 及每日光照 12 小時之定溫箱培養 7 日，量測菌落直徑，另以培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板之處理為對照。每處理 8 重複。

五、病原性測定

以交互接種 (cross inoculation) 方式比較源自楊桃、葡萄、芒果、木瓜及蓮霧之供試炭疽病菌對此 5 種果樹摘離果實 (detached fruits) 之病原性。選用購自市售之外觀健康且成熟之果實 (可直接食用之熟度) 供接種試驗。果實之品種同於前項試驗。供試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 (1×10^5 spores/mL) 以供接種。供接種果實

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之擦手紙保濕，每盒 3 粒(串) 果實。葡萄之接種，係將供試菌株孢子懸浮液噴至供試葡萄果實。其他果品則以定點接種 (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，以確保果實病癥來自接種菌株，另以噴無菌水之處理作為對照。每處理 4 盒。接種後，蓋緊盒蓋，置實驗室 (24~28°C)，7 日後記錄接種結果。以單孢分離法分離病斑上的病原菌，比對其菌落與孢子形態以完成科霍氏法則 (Koch's postulates)。接種試驗進行 2 次。

六、炭疽病菌對藥劑之感受性

為測試不同寄主來源之果樹炭疽病菌對防治藥劑感受性 (sensitivity) 的差異，

乃以微量滴定板法 (microtiter plate method)⁽⁵⁾ 測試此 5 種果樹炭疽病之 9 種防治藥劑：亞托敏(Azoxystrobin)、賽普護汰寧 (Cyprodinil + fludioxonil)、克熱淨 (Iminoctadine tris (albesilate))、免得爛 (Metiram)、百克敏 (Pyraclostrobin)、得克利 (Tebuconazole)、甲基多保淨 (Thiophanate-methyl)、三氟敏 (Trifloxystrobin) 及三氟派瑞 (Trifloxystrobin + fluopyram) (表二) 對供試 10 菌株分生孢子發芽的抑制作用。測試時，取 49 μL 經稀釋為田間施用濃度之殺菌劑藥液，分別滴入微量滴定板之盤穴，再滴入 1 μL 供試菌株之分生孢子懸浮液 (1×10^5 spores / mL)，均勻混合，孢子懸浮液之製備同接種試驗。另以供試菌加入無菌水之處理為對照。處理後之微量滴定板覆以封口膜 (parafilm, PM-996) 以防水分蒸散並置於實驗室 (24~28°C)。處理 2 小時後，將盤穴內之混合液分別塗布於直徑 9 cm 之 2%洋菜 (water agar) 平

表二、本研究所用殺菌劑列表

Table 2. Fungicides used in this study

Fungicide	Formulation	FRAC code ¹⁾	use rate ($\mu\text{g a.i./}\mu\text{L}$) ²⁾
Azoxystrobin	23% SC	11	115
Cyprodinil + fludioxonil	62.5% WG	9, 12	313
Iminoctadine tris (albesilate)	25% SL	M7	267
Metiram	80% WG	M3	1600
Pyraclostrobin	23.6% EC	11	79
Tebuconazole	25.9% EW	3	173
Thiophanate-methyl	70% WP	1	700
Trifloxystrobin	80% WG	11	125
Trifloxystrobin+fluopyram	50% SC	11, 7	125

¹⁾ FRAC: Fungicide Resistance Action Committee.

²⁾ Use rate represents the active ingredient concentration in a label recommended.

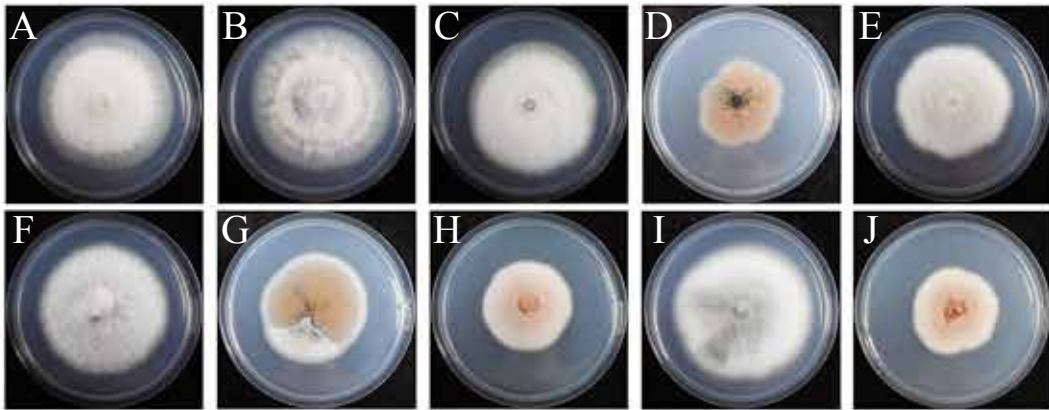
板。洋菜平板靜置於 24°C 黑暗定溫箱，24 小時後，於光學顯微鏡下計數孢子發芽率。每處理 4 重複，每重複計數 200 個孢子，以百分率表示孢子發芽率。各處理之發芽百分率先進行顯著性分析 (One-way analysis of variance, ANOVA)，差異達 5% 顯著水準，則對處理間之差異進行費雪最小顯著差異測驗 (Fisher's protected least signifi-cance test, LSD, 5%)。

結果

一、炭疽病菌之形態

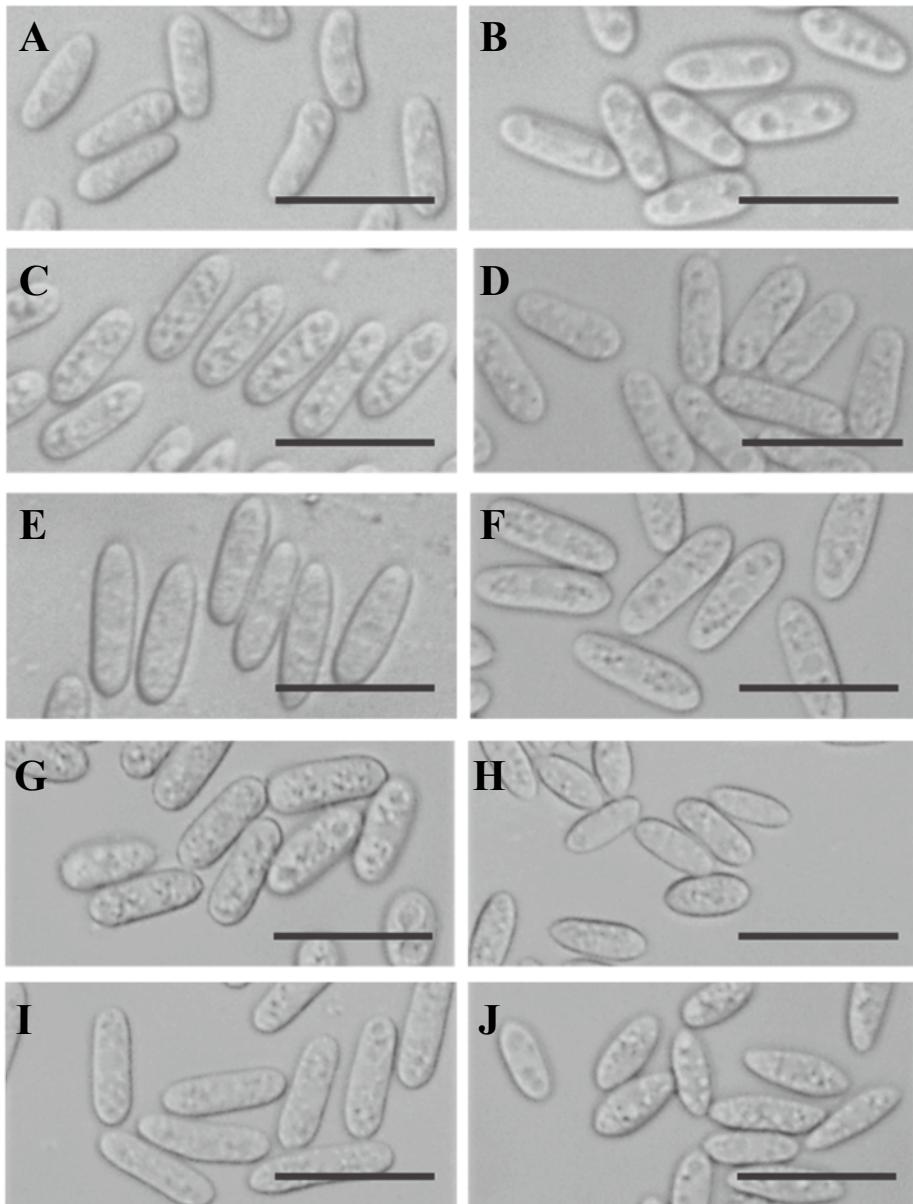
供試炭疽病菌在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板經 7 日之培養，雖其菌落大小不一，但可大略分為菌絲型及孢子型二大類，並以菌絲顏色、數量、濃密度 (density)、

質地 (texture)、是否具扇形 (sector) 菌落及孢子盤之多寡等呈現不同菌落型 (colony type)。CC-1、CC-6、GC-3、MC-1、MC-9、WC-1 等 6 菌株屬菌絲型菌落，均著生大量白色菌絲，少見孢子盤，彼此差異不大。GC-9、PC-1、PC-9、WC-3 等 4 菌株雖均屬孢子型菌落，但仍有局部差異。GC-9 著生大量孢子，但少見菌絲；PC-1 具扇形菌落且有白色外緣；PC-9 及 WC-3 菌落形態相同，孢子盤均勻分佈於白色菌絲上 (圖一)。各菌株之分生孢子均為單細胞、透明、桿狀，除 PC-9 及 WC-3 兩菌株之孢子一端較尖 (acute) 另一端圓形 (round) 或二端皆尖，其他各菌分生孢子兩端均為圓形 (圖二)。各菌株分生孢子之平均長度介於 12.1 至 17.3 μm 之間，平均寬度介於 4.4 至 5.3 μm 之間，長寬比介於 2.8 至 3.3 之



圖一、五種果樹炭疽病菌在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基生長 7 天之菌落。

Fig. 1. Seven-day-old colonies of *Colletotrichum* isolates collected from 5 fruit crops grown on PDA at 24°C under 12 h cool white fluorescent light / 12 h darkness. A=CC-1, B=CC-6, C=GC-3, D=GC-9, E=MC-1, F=MC-9, G=PC-1, H=PC-9, I=WC-1, J=WC-3. Refer to Table 1 for isolate information.



圖二、果樹炭疽病菌分生孢子之形態。

Fig. 2. Conidia of *Colletotrichum* isolates collected from 5 fruit crops. The fungi were grown on PDA for 10 days at 24°C under 12 h darkness / 12 h cool white fluorescent light. A=CC-1, B=CC-6, C=GC-3, D=GC-9, E=MC-1, F=MC-9, G=PC-1, H=PC-9, I=WC-1, J=WC-3. Refer to Table 1 for isolate information. Bars= 20 μ M.

間 (表三)。依據孢子形態判定，PC-9 及 WC-3 應屬 *C. acutatum* 複合種，其他 8 株菌屬 *C. gloeosporioides* 複合種。

二、菌株之親緣性分析與分子鑑定

供試炭疽病菌之 5 種基因 (ITS,

GAPDH, ACT, TUB2, CHS-1) 序列鏈結後經親緣性分析，計分成 3 組分支群 (clade)，PC-1 單獨成 1 個分支群，PC-9 及 WC-3 共屬 1 個分支群且相似度 100%，其餘 7 株菌分佈在另一個涵蓋較廣的分支群。源自楊桃之 CC-1 及 CC-6 與源自芒果之 MC-1 及 MC-9 分別同屬 2 個次分支群 (圖三)。源自相同寄主之炭

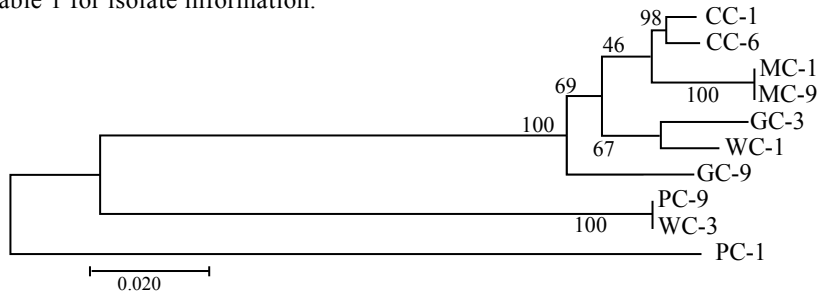
表三、供試菌株孢子度量列表

Table 3. Spore dimensions of *Colletotrichum* isolates in this study¹⁾

Isolate ²⁾	Length (μm)	Width (μm)	L/W ratio
CC-1	13.3±0.3 (12.0-18.0)	4.5±0.1 (3.0-5.0)	3.1±0.1
CC-6	12.9±0.3 (10.0-15.0)	4.6±0.1 (3.5-6.0)	2.9±0.9
GC-3	15.7±0.3 (12.5-22.5)	5.2±0.1 (3.0-7.0)	3.1±0.1
GC-9	13.0±0.2 (11.0-15.0)	4.5±0.1 (3.0-5.0)	3.0±0.1
MC-1	17.3±0.3 (13.5-20.5)	5.3±0.1 (4.5-6.0)	3.3±0.1
MC-9	13.7±0.3 (10.0-18.0)	4.9±0.1 (4.0-5.5)	2.8±0.1
PC-1	12.1±0.4 (7.0-15.0)	5.0±0.1 (4.0-6.0)	2.4±0.1
PC-9	13.3±0.2 (11.0-15.0)	4.6±0.1 (3.0-5.0)	3.0±0.1
WC-1	15.2±0.2 (12.5-18.0)	4.7±0.1 (3.5-5.5)	3.3±0.1
WC-3	12.6±0.2 (10.5-15.0)	4.4±0.1 (3.0-5.0)	2.9±0.1

¹⁾ Mean±standard error (minimum to maximum), n=30.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.



圖三、果樹炭疽病菌多基因親緣性分析圖。

Fig. 3. Phylogenetic tree generated by maximum likelihood analysis based on concatenated DNA sequences of ACT, CHS1, GAPDH, ITS and TUB2 genes of *Colletotrichum* isolates from various fruit crops. Bootstrap values are shown above or below branches. Scale bar=0.02 substitutions per site (branch length represents residue substitution per site in average). Refer to Table 1 for isolate information.

疽病菌有些親緣性極接近，有些則相去甚遠，缺乏一致性的規則。另依據供試菌株之 4 種基因 (ITS, GAPDH, ACT, TUB2) 定序結果與標準菌株 (type culture) 相同基因之序列比對並結合孢子形態資料，所得之鑑定結果如表四，惟 PC-9 及 WC-3 因基因序列與形態比對結果無相近菌種，暫無法定其菌種名。

三、水果成分對菌株生長之影響

比較不同水果培養基成分對不同寄主來源炭疽病菌菌絲生長之影響，其結果多無特別差異。CC-1、CC-6、GC-3、MC-9、WC-1 等 5 株菌在各種水果培養基及馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基之生長均佳，

GC-9 則在各培養基之生長均較差。MC-1 在芒果、木瓜及蓮霧培養基生長良好，葡萄培養基次之，但在楊桃培養基則不良，是唯一因培養基成分造成生長顯著差異的菌株 (表五)。

四、菌株病原性測定

不同寄主來源之炭疽病菌均可感染其原寄主。由於接種試驗是以大量炭疽病菌孢子接種成熟果實，如接種菌株對其具病原性，病斑數均甚多並隨接種時間而逐漸擴大病斑面積，致難以病斑數或病斑面積區別不同接種菌株病原性之強弱。反之，如不具病原性者則無病斑產生。分離接種病斑所得之炭疽病菌與原接種菌株之分生

表四、本研究所用果樹炭疽病菌之分子鑑定

Table 4. Molecular identification of *Colletotrichum* isolates based on their identity to given gene sequences

Isolate	<i>Colletotrichum</i> sp.	Reference culture ²⁾	Percent identity (%) ¹⁾			
			ITS	GAPDH	ACT	TUB2
CC-1	<i>C. siamense</i>	MFLU090230	99 / FJ972613	99 / FJ972575	99 / FJ907423	99 / FJ907438
CC-6	<i>C. siamense</i>	MFLU090230	99 / FJ972613	99 / FJ972575	99 / FJ907423	99 / FJ907438
GC-3	<i>C. tropicale</i>	CBS124949	99 / JX010264	98 / JX010007	99 / JX009489	99 / JX010407
GC-9	<i>C. viniferum</i>	GZAAS5.08616	100 / JN412807	99 / JN412799	95 / JN412790	97 / JN412809
MC-1	<i>C. asianum</i>	MFLU090233	99 / FJ972612	95 / FJ972576	100 / FJ907424	100 / FJ907439
MC-9	<i>C. asianum</i>	MFLU090233	99 / FJ972612	94 / FJ972576	100 / FJ907424	99 / FJ907439
PC-1	<i>C. brevisporum</i>	BCC 38876	100 / JN050238	94 / JN050227	100 / JN050216	98 / JN050244
WC-1	<i>C. fructicola</i>	MFLU090228	100 / FJ972603	99 / FJ972578	99 / FJ907426	100 / FJ907441

¹⁾ Percent identity: identity between each gene sequence of the isolate with that of reference culture in percentage ratio / Genbank accession number of the gene sequence of reference culture; ITS: complete rDNA-ITS region; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ACT: actin; TUB2: partial β -tubulin.

²⁾ Reference culture: ex-type or authentic culture of each *Colletotrichum* species.

表五、水果培養基對不同果樹炭疽病菌菌絲生長之影響

Table 5. The effects of fruit pulp media on the growth of mycelia of *Colletotrichum* isolates collected from 5 fruit crops

Isolate ²⁾	Medium made of ¹⁾					PDA ³⁾
	Carambola	Grape	Mango	Papaya	Wax apple	
CC-1	7.50±0.09 b	7.24±0.05 bc	7.06±0.04 cd	7.85±0.15 a	7.96±0.04 a	6.93±0.03 b
CC-6	8.20±0.00 a	7.28±0.03 b	8.2±0.00 a	8.20±0.00 a	8.20±0.00 a	8.20±0.00 a
GC-3	6.86±0.05 b	6.69±0.05 bc	7.93±0.07 a	6.64±0.08 cd	6.59±0.02 cd	6.44±0.06 d
GC-9	2.30±0.14 e	4.15±0.08 c	5.98±0.04 a	4.95±0.17 b	3.50±0.12 d	4.34±0.05 c
MC-1	1.71±0.03 e	5.49±0.06 d	7.26±0.03 b	7.93±0.04 a	7.19±0.10 b	6.98±0.06 c
MC-9	7.24±0.02 c	7.11±0.03 d	7.49±0.01 b	7.46±0.03 b	8.15±0.03 a	7.14±0.02 d
P C-1	5.39±0.05 b	5.01±0.07 c	5.69±0.07 a	6.05±0.02 c	4.36±0.02 e	4.68±0.09 d
P C-9	6.35±0.03 b	5.19±0.04 d	5.99±0.02 c	6.05±0.02 c	6.71±0.01 a	4.45±0.01 e
WC-1	6.98±0.05 b	7.04±0.14 b	7.46±0.08 a	7.00±0.02 b	7.01±0.10 b	6.50±0.07 c
WC-3	6.30±0.03 b	5.40±0.07 d	6.10±0.03 c	6.05±0.02 c	6.71±0.01 a	5.20±0.11 e

¹⁾ Colony diameter after 7-day-growth, unit=cm. Numbers in each row are mean±standard error (n=8). Values in each row followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significant difference test.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.

³⁾ Potato dextrose agar.

孢子與菌落形態皆相同。多數菌株亦能感染 1 至 2 種原寄主以外的果實，但 MC-9 及 PC-1 為例外，僅能感染原寄主。這表示不同寄主來源之炭疽病菌其寄主範圍有其限制，但也因菌株而異。就寄主果樹觀之，葡萄僅有源自葡萄的晚腐（炭疽）病菌能感染，芒果則有多達 7 株供試菌株能予感染並造成病徵（表六）。

對 10 株供試菌株之分生孢子發芽均具完全抑制作用；其次為克熱淨 (Iminoctadine tris (albesilate))，除源自楊桃之 CC-1 及 CC-6 外，對其他菌株均具完全抑菌作用；其餘 7 種供試藥劑則僅能對少部分菌株具抑菌作用（表七）。本項試驗結果顯示，大部分供試菌株對多數供試藥劑已產生抗藥性。

五、炭疽病菌對藥劑之感受性

大部分供試果樹炭疽病菌對亞托敏 (Azoxystrobin) 等 9 種藥劑之感受性反應相似，但部分菌株對某些藥劑仍有差異。藥效最佳的藥劑是免得爛 (metiram)，其

討論

病原菌是植物傳染性病害的致病因子 (causal agent)，也是病害防治的標的，病原菌的分類及相關特性決定病害發展與防治方法之擬定。植物病害的研

表六、果樹炭疽病菌交互接種之結果

Table 6. Disease incidence of fruits after cross inoculation with *Colletotrichum* isolates from 5 fruit crops

Isolate ²⁾	Inoculation on ¹⁾				
	Carambola	Grape	Mango	Papaya	Wax apple
CC-1	+	—	+	—	+
CC-6	+	—	+	—	—
GC-3	—	+	+	—	—
GC-9	—	+	+	—	—
MC-1	+	—	+	—	—
MC-9	—	—	+	—	—
PC-1	—	—	—	+	—
PC-9	—	—	—	+	+
WC-1	—	—	+	—	+
WC-3	+	—	—	+	+

¹⁾ “+” symptomatic, “—”no symptom. Results were recorded 7 days after inoculation.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.

表七、殺菌劑對果樹炭疽病菌分生孢子發芽之影響

Table 7. Effects of fungicides on conidial germination of *Colletotrichum* isolates collected from 5 fruit crops

Fungicide	Isolate ^{1,2)}				
	CC-1	CC-6	GC-3	GC-9	MC-1
Azoxystrobin	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	90.5±0.5 b	91.8±0.6 c
Cyprodinil + Fludioxonil	89.5±0.5 c	83.0±1.3 c	100.0±0.0 a	0.0±0.0 e	81.0±1.0 e
Iminoctadine tris (albesilate)	79.8±0.6 d	94.8±1.1 b	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e	0.0±0.0 f
Metiram	0.0±0.0 e	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e	0.0±0.0 f
Pyraclostrobin	94.8±0.5 b	94.3±0.9 b	96.5±0.0 b	86.3±0.9 c	0.0±0.0 f
Tebuconazole	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	90.5±1.0 d	10.3±0.3 d	96.5±0.5 b
Thiophanate-methyl	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	94.3±0.9 a	100.0±0.0 a
Trifloxystrobin	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	90.5±0.5 b	90.0±0.8 c
Trifloxystrobin + Fluopyram	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	97.3±0.8 b	9.0±0.4 d	96.0±0.8 b
Control (water)	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	94.0±1.5 c	93.0±1.3 a	85.5±0.6 d

表七(續)、殺菌劑對果樹炭疽病菌分生孢子發芽之影響

Table 7 (continued). Effects of fungicides on conidial germination of *Colletotrichum* isolates collected from fruit crops

Fungicide	Isolate ^{1,2)}				
	MC-9	PC-1	PC-9	WC-1	WC-3
Azoxystrobin	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	0.0±0.0 d	100.0±0.0 a
Cyprodinil + Fludioxonil	100.0±0.0 a	0.0±0.0 c	91.5±1.0 b	85.8±0.3 c	0.0±0.0 d
Iminoctadine tris (albesilate)	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d
Metiram	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d
Pyraclostrobin	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	71.8±0.6 c	100.0±0.0 a	90.8±0.5 b
Tebuconazole	100.0±0.0 a	0.0±0.0 c	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Thiophanate-methyl	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Trifloxystrobin	90.5±0.5 c	90.5±0.5 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Trifloxystrobin + Fluopyram	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	91.0±0.6 b	100.0±0.0 a	86.3±0.6 c
Control (water)	94.8±0.5 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	96.0±1.1 b	100.0±0.0 a

¹⁾ Mean±standard error (n=4). Values in each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significant difference test.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.

究工作首在分離、鑑定病原菌，並完成其病原性 (pathogenicity) 測定，以確定病原菌之分類地位及其與病害之關係。由 *Colletotrichum* spp. 所引起的果樹炭疽病是臺灣地區重要且普遍的植物病害，該屬之菌種數量逾百且部分菌種寄主範圍廣泛^(15, 19, 27)。但如依據其分生孢子形態為分類特徵，則僅能區分成 *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. gloeosporioides* 等 3 個複合種，各複合種包含數目不等之菌種⁽¹⁹⁾。在同一複合種內之炭疽病菌種間的形態差異不顯著，以致難以定其種別。基因序列因鑑別度高且定序技術進步又價格低廉，近年已成菌種鑑定的常用工具^(10, 14, 18, 24, 37)。隨著分子生物學應用日廣，*Colletotrichum*

spp. 之菌種鑑定已能運用多種基因序列作為比對依據，亦使國內外許多既有的炭疽病菌被重訂學名，並陸續發表新的炭疽病菌菌種^(10, 29, 30, 31,32, 35, 45)。本研究僅有 10 株菌株，即發現部分菌株學名異於以往之記錄，且可能有未被發表的新菌種出現。這 10 株菌有 8 株屬 *C. gloeosporioides* 複合種，另二株 (PC-9 及 WC-3) 屬 *C. acutatum* 複合種。從圖三之多基因親緣性分析結果看 *C. gloeosporioides* 複合種之 8 株菌，除 PC-1 以外，其他各菌株均屬同一分支群，表示以基因序列作為分類依據對多數菌株仍具鑑別度，但亦有例外，因而形態特徵在分類鑑定上仍不可或闕。供試炭疽病菌之種別鑑定是先以形態作複合種之歸

類，再以其 4 種基因序列比對模式菌株之相同基因序列，綜合分析後所得之結果(表四)。作者進一步以部分菌株 ApMat 基因序列與各模式菌株之相同基因比對，所得結果與前述多基因之鑑定結果完全相同(著者，未發表)。此表示，ApMat 基因在分類鑑定上具取代多基因之潛力，這將使炭疽病菌之鑑定更為簡便，惟該基因在部分菌株不能增幅而無法定序，存有技術障礙待克服。

菌株 PC-1 經形態與基因序列比對，確認為 *C. brevisporum*，為臺灣及北半球首次發表的木瓜炭疽病菌學名，且此菌種尚未見於臺灣其他作物⁽²¹⁾。PC-1 在本研究中僅能感染原寄主木瓜，其病原性與基因親緣性分析結果均顯示其具特殊性，值得進一步探討。菌株 PC-9 及 WC-3 分別源自木瓜及蓮霧，依據形態特徵應屬 *C. acutatum* 複合種，此二菌株之菌落及孢子形態、營養需求、多基因親緣性分析等均相似，甚至在地緣上亦很接近，可能為同一菌種。然此 2 菌株在病原性及對殺菌劑感受性仍有不同，可能肇因於不同寄主植物及藥劑選汰之作用而衍生出此差異。整合 2 菌株孢子形態及多基因序列分析結果，尚無已知菌種可供歸屬，是否為新菌種尚待探討。

本研究嘗試比較不同果實成分對不同寄主來源果樹炭疽病菌菌絲生長之影響，惟多數供試菌株在這些培養基上的生長並無顯著差異。但源自葡萄之 GC-9 及芒果之 MC-1 卻皆在楊桃果實培養基上生長緩

慢，尤以 MC-1 之差異最明顯，但該菌株卻可經由人工接種而感染楊桃，推斷菌株對果實培養基成分的偏好未必與其病原性有關(表五、表六)。

病原性是植物病原菌最核心的特性，它決定病害之發生與為害程度。源自楊桃、葡萄、芒果、木瓜及蓮霧等 5 種臺灣果樹之炭疽病菌經由人工接種，均能對原寄主造成感染，表示炭疽病菌對原寄主均具病原性，但各菌株對非原寄主果實之病原性則不具規則性，此亦見於過往之研究^(11, 13, 22)。在本研究中，有些菌株僅能感染原寄主，有些可感染其他 1 或 2 種果實，但供試之葡萄果實僅有源自葡萄的 2 株晚腐(炭疽)病菌能感染造成病徵，而芒果則有多達 7 株炭疽病菌可感染(表五)。據此推斷，葡萄與晚腐病菌構成的植物病害系統(plant pathosystem)較封閉，而芒果炭疽病的病害系統則較開放。亦即葡萄晚腐病之病原菌來源可能僅限於葡萄，而芒果炭疽病之病原菌除來自芒果外，亦可能來自楊桃、葡萄及蓮霧等果樹。葡萄為落葉果樹，晚腐病的初次感染源(primary inoculum)對後續病害之發生影響較大；芒果是常綠果樹，繁茂的枝條及葉片可提供病原菌在無果實生長期間存活。因而芒果炭疽病之防治應較葡萄晚腐病更困難，因其必須面對田間任何時期不同來源炭疽病菌之感染。但本研究亦顯示，芒果炭疽病菌並不易感染其他種類果實，炭疽病菌如僅能單方向感染芒果，亦顯示炭疽病菌病原性的複雜度，惟人工接

種之條件終究有別於自然感染，接種結果可能受接種之病原菌，寄主植物特性及接種時的環境條件影響⁽¹¹⁾，這些都有待更深入的研究來釐清。

果樹炭疽病之防治現仍以施用殺菌劑為主要措施，此 5 種果樹炭疽病之共同推薦殺菌劑計有 9 種 (表二)，其中 7 種屬單點 (specific site) 作用機制藥劑，供試菌株對此類藥劑多已產生抗性而不具抑菌效果，而多點作用機制 (multi-site) 藥劑如免得爛對所有供試菌株孢子均能有效抑制其發芽，這在芒果炭疽病菌之相關研究亦有類似結果^(6, 8)；克熱淨則除對源自楊桃之供試菌株孢子不具抑制作用，對其他供試菌株則尚具有良好的抑菌效果。據此推斷，儘管來自不同寄主，大部分的炭疽病菌對藥劑之感受性差異不大，相同藥劑對不同作物炭疽病菌之抑菌效果差異不顯著，這也為殺菌劑延伸使用制度提供有利的科學佐證。單點作用機制藥劑易喪失藥效，而多點作用機制藥劑則能長期保持良好藥效，這也為殺菌劑之開發提供了明確方向。

謝辭

本研究承行政院農業委員會 105 農科-10.5.2-藥-P1(3) 及 106 農科-9.5.1-藥-P1(3) 計畫經費補助，謹此致謝。

引用文獻

1. 王喻其、王泰權、陳富翔、蔡勇勝、李宏萍、費雯綺 編。2012。植物保護手冊。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。臺中。1079 頁。
2. 未具名。2002。臺灣植物病害名彙。中華民國植物病理學會。臺中。386 頁。
3. 林筑蘋、蔡志濃、安寶貞。2018。*Colletotrichum viniferum* 及其他 *Colletotrichum* sp. 引起台灣葡萄晚腐病之初報。植物保護科技新知研討會暨中華植物保護學會 107 年度年會論文集，第 57 頁。中華植物保護學會印。臺中。
4. 林瑋倫、段中漢、王智立。2018。臺灣芒果炭疽病菌之親緣種與生物學特性。中華民國植物病理學會 106 年度年會論文摘要集，第 32 頁。臺中。
5. 段中漢。2015。微量滴定板篩選植物萃取液與植物 (精) 油抑制菜豆銹病菌及草莓灰黴病菌。植病會刊 24: 67-75。
6. 段中漢、張智凱、王群中。2017。芒果炭疽病之藥劑防治與熱處理。臺灣農藥科學 3: 65-78。
7. 翁豐嶽、莊再揚。1995。臺灣芒果炭疽病菌之分群。植保會刊 37: 295-309。
8. 蔡志濃、安寶貞、胡瓊月、鄭秀芳。2006。抑制三種果樹炭疽病之化學藥劑篩選。植病會刊 15: 39-54。
9. 羅佩昕、黃盈潔、鐘文全、鄭安秀、鐘文鑫。2010。利用 PCR-RFLP 調查臺南地區抗苯並咪唑類 (benzimidazoles) 殺菌劑芒果炭疽病菌的發生。植病會刊 19: 255-260。

10. Afanador-Kafuri, L., González, A., Gañán, L., Mejía, J. F., Cardona, N., and Alvarez, E. 2014. Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Dis.* 98: 1503-1513.
11. 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.
12. Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. *Plant Dis.* 84: 600-611.
13. Browning, M., Rowley, L. V., Zeng, P., Chandlee, J. M., and Jackson, N. 1999. Morphological, pathogenic, and genetic comparisons of *Colletotrichum graminicola* isolates from Poaceae. *Plant Dis.* 83: 286-292.
14. 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.
15. Cannon, P. F., Buddie, A. G., and Bridge, P. D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104: 189-204.
16. Carbone, I. and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
17. Chung, W. H., Ishii, H., Nishimura, K., Fukaya, M., Yano, K., and Kajitani, Y. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Dis.* 90: 506-512.
18. 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.
19. Damm, U., Cannon, P. F., and Crous, P. W. 2012. *Studies in Mycology 73: Colletotrichum: complex species or species complexes?* CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 215pp.
20. Doyle, V. P., Oudemans, P. V., Rehner, S. A., and Litt, A. 2013. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America. *PLoS One* 8:e62394.
21. 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.
22. 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.
23. Freeman, S., Katan, T., and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.* 82: 596-605.
 24. Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., and Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90: 608-614.
 25. Guerber, J. C., Liu, B., Correll, J. C., and Johnston, P. R. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequences analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95: 872-895.
 26. Hu, M. J., Grabke, A., Dowling, M. E., Holstein, H. J., and Schnabel, G. 2015. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. *Plant Dis.* 99: 806-814.
 27. 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: 147–183.
 28. 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.
 29. Lei, Y., Tang, X. B., Jayawardena R. S., Yan, J. Y., Wang, X. D., Liu, M., Chen, T., Liu, X. M., Wang, J. C., and Chen, Q. X. 2016. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in southern China. *Mycosphere* 7: 1177-1191.
 30. Lima, N. B., de A. Batista, M. V., De Moraes Jr, M. A. Barbosa, M. A. G., Michereff, S. J., Hyde, K. D., and Câmara, M. P. S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Divers.* 61: 75-88.
 31. Mo, J., Zhao, G., Li, Q., Solangi, G. S., Tang, L., Guo, T., Huang, S., and Hsiang, T. 2018. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. *Plant Dis.* 102: 1283-1289.
 32. Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Jones, E. B. G., Bahkali, A. H., and Hyde, K. D. 2012. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Cryptogamie Mycol.*

- 33: 347-362.
33. O'Donnell, K. and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116.
34. Peng, L. J., Sun, T., Yang, Y. L., Cai, L., Hyde, K. D., Bahkali, A. H., Liu, Z. Y. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience* 54: 29-41.
35. 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.
36. Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* 39: 89-109.
37. Rampersad, S. N. 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Dis.* 95: 1244-1254.
38. Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A., Herre, E. A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Y. Q., and Sha, T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102: 1318-1338.
39. 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.
40. 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.
41. Staden, R. 1980. A new computer method for the storage and manipulation of DNA gel reading data. *Nucleic Acids Res.* 8: 3673-3694.
42. Weir, B. S., Johnson, P. R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73: 115-180.
43. White, T. J., Bruns, T, Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *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. 482 pp.

44. Wong, F. P., and Midland, S. L. 2007. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. *Plant Dis.* 91: 1547-1555.
45. Yan, J. Y., Jayawardena, M. M. R. S., Goonasekara, I. D., Wang, Y., Zhang, W., Liu, M., Huang, J. B., Wang, Z. Y., Shang, J. J., Peng, Y. L., Bahkali, A., Hyde, K. D., and Li, X. H. 2015. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. *Fungal Divers.* 71: 233-246.

Identification, Pathogenicity and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* Isolates From Five Fruit Crops in Taiwan

Chung-Hang Duan^{1*}, Hui-Ru Pan¹, Chun-Chung Wang¹

Abstract

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.

Anthraxnose disease caused by *Colletotrichum* species is a major limiting factor to fruit production in Taiwan. These *Colletotrichum* species from different fruit crops share similar morphological characteristics and cause resemble symptoms. The identification, pathogenicity and fungicides sensitivity of *Colletotrichum* isolates from various fruit crops have not been much clarified in Taiwan. Two single-spore isolates of *Colletotrichum* collected from diseased fruits of carambola (*Averrhoa carambola*), grape (*Vitis vinefera*×*V. labrusca*), mango (*Mangifera indica*), papaya (*Carica papaya*) and wax apple (*Syzygium samarangense*) were characterized in this study. Based on their conidial morphology and multi-gene sequences of ITS, GAPDH, ACT and TUB2, eight of the 10 isolates were respectively identified as *C. asianum* (2), *C. brevisporum*, *C. fructicola*, *C. siamense* (2), *C. tropicale*, and *C. viniferum* while the remaining 2 were undetermined. Cross-inoculation of the isolates on detached fruits revealed a degree of variation in their pathogenicity. All tested isolates were able to infect their original hosts and most of them also induced symptoms on one or two alternative hosts. However, grape was only infected by isolates from grape. Media with contents of various fruit pulps did not have much influence on mycelial growth of the tested isolates. According to quantitative assay of conidial germination, most isolates were sensitive to the fungicides with multi-site contact

Accepted: March 6, 2019.

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

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

activity such as metiram and iminoctadine tris (albesilate), while they were not sensitive to the single-site fungicides as azoxystrobin, cyprodinil + fludioxonil, pyraclostrobin, tebuconazole, trifloxystrobin, trifloxystrobin+fluopyram and thiophanate-methyl.

Key words: *Colletotrichum*, pathogenicity, fungicide