

Colletotrichum siamense 引起之荔枝葉部針點病病原特性 及防治藥劑篩選

吳昭蓉¹ 黃巧雯² 張哲瑋³ 倪蕙芳^{4,*}

摘要

吳昭蓉、黃巧雯、張哲瑋、倪蕙芳。2020。*Colletotrichum siamense* 引起之荔枝葉部針點病病原特性及防治藥劑篩選。台灣農業研究 69(1):11–24。

荔枝針點病之病原菌為 *Colletotrichum siamense*，可危害荔枝葉片與葉柄，造成黑色針點狀病斑。本研究由雲林古坑「糯米糍」及「桂味」荔枝品種之針點病病斑上分離得 *Colletotrichum* spp.，經形態觀察及分子類緣關係鑑定確認為 *C. siamense*。由先前研究中確認 *C. siamense* 對荔枝「糯米糍」葉部具有病原性，本研究則對荔枝品種「台農 7 號」進行葉部接種，藉此得知本病原菌亦可侵染糯米糍以外之品種。又進行溫度對 *C. siamense* 菌絲生長與孢子發芽影響試驗，結果發現 *C. siamense* 菌絲最適生長溫度為 25–30°C，且在 15°C 之低溫時仍可生長；分生孢子則在 20–30°C 之間皆可於葉片上萌芽並產生附著器。進行 *C. siamense* 之菌絲生長與分生孢子發芽對化學藥劑之感受性評估，發現腐絕快得寧及甲基多保淨對菌絲生長具有較佳抑制效果，克熱淨及得克利次之；在抑制分生孢子發芽方面，則以腐絕快得寧、腈硫醃及百克敏有較好的抑制能力，亞托待克利及得克利次之。本研究之結果，可提供作為田間荔枝針點病在防治策略及藥劑施用之上參考。

關鍵詞：荔枝、針點病、藥劑篩選。

前言

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonnerat) 為無患子科 (Sapindaceae) 果樹，原生於中國嶺南地區，栽培歷史已超過 2,000 年，主要分布在南北迴歸線內亞熱帶及熱帶地區之中海拔冷涼山區，世界總種植面積約為 80 萬公頃。栽培面積最大的區域為中國大陸，占全世界 80% 以上。荔枝引進台灣已超過 300 多年，目前已成為台灣栽培面積第三大的果樹，根據農委會 2017 年統計年報 (<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>) 顯示，全台栽培面積約 9,984 ha，總產量 59,796 Mg。主要栽培地區，按栽培面積大小依序分布在高雄市、台中

市、台南市、南投縣及嘉義縣，主要栽培品種為「玉荷包」、「黑葉」、「糯米糍」、「桂味」等。

由於荔枝主要產期為 5–7 月，正值高溫多濕的梅雨季，常遭受病蟲之危害，導致產量及品質嚴重降低。已有紀錄的荔枝病害，有由 *Peronophythora litchii* 引起的露疫病 (Kao & Leu 1980; Ann & Ko 1984)，由 *Geotrichum ludwigii* 及 *Geotrichum candidum* 引起的酸腐病 (Tsai & Hsieh 1998)，由 *Phellinus noxius* Corner 引起的褐根病 (Ann et al. 1999)，由 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的炭疽病 (Yang 1990; Anderson & Coates 2009)，由 *Colletotrichum siamense* 引起之針點病 (Ni et al. 2017)，以及由 *Lasiodiplodia the-*

投稿日期：2019 年 6 月 3 日；接受日期：2019 年 9 月 22 日。

* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

² 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所園藝系研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

⁴ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

bromae 引起的果腐病等 (Ann *et al.* 2004; Tzean *et al.* 2019)。其中，針點病的病徵在台灣首先由 Ann *et al.* (2004) 在「桂味」發現，但未以中文定名，病徵為果實上出現密布褐色針尖狀小點。Ni *et al.* (2017) 後來亦於「糯米糍」及「桂味」荔枝葉片上，發現類似黑色針尖狀小點病徵 (圖 1)，藉由病原菌分離、柯霍氏法則驗證及病原形態與分子鑑定，確認葉部針點病乃由 *C. siamense* 所引起。

此病害在澳洲荔枝果園普遍發生，稱為 pepper spot disease，先前報導認為是由 *C. gloeosporioides* 引起 (Cooke & Coates 2002)。澳洲之荔枝針點病於 1982 年被發現，於 1989 年被正式記錄，在大多數澳洲荔枝產區均可發生。之所以稱為 pepper spot disease，乃由於此病害所引起之病徵為小於 1 mm 直徑的密集黑點。在澳洲，被感染的荔枝品種已知有 'Kwai May Pink'、'Bengal'、'Salathiel'、'Wai chee' 以及 'Tai So' (Drew & Drew 2001)。此病害與一般果實採後發生之炭疽病不同，並非潛伏感染，因此一般在未熟果便會出現病徵。雖然此病害不會深入果肉，但仍會影響果實轉色，大幅降低商品品質。由於本病害並未進行中文訂名，以其



圖 1. 由 *Colletotrichum siamense* 引起「糯米糍」品種荔枝針點病之病徵。針頭狀黑點出現於葉片上。

Fig. 1. Pepper spot disease on lychee 'No mi ci' caused by *Colletotrichum siamense*. The little black spots appear on leaves.

病徵表現，本研究以針點病稱之。類似病害在其他果樹亦有發生，如在澳洲 'Hass' 品種之酪梨 (Willingham *et al.* 2000)、在南非的 'Pinker-ton' 及 'Hass' 品種酪梨 (Schoeman & Manicom 2000) 均曾有相關報告。

為釐清荔枝葉部針點病發生生態及病原特性，本研究進行病原菌形態觀察，並探討本病害病原菌菌絲生長及分生孢子發芽適溫、病原菌在罹病組織內的殘存情形及防治藥劑篩選，作為未來針點病發生時之防治參考。

材料與方法

病原菌之收集與保存

本研究測試之菌株來自雲林縣古坑鄉之荔枝園，由感染針點病的荔枝葉及荔枝果實上分離而得。分離的方式為將罹病組織以 75% 酒精及 0.6% 次氯酸鈉消毒後，再以無菌水漂洗 3 次，切取病健部組織置放在 pH 3.8 之含乳酸之 potato dextrose agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany) 培養基上 [acidified PDA，高溫滅菌後之 300 mL PDA 培養基，降溫後加入 750 μ L 50% (v/v) 乳酸溶液 (lactic acid)]。待菌絲長出後，切取菌絲尖端培養在 PDA 培養基上。產孢後，進行單孢分離並培養在水瓊脂培養基 (water agar) 上，待菌落大小約至培養皿直徑三分之二時，將含菌絲之培養基切成小塊，置於含 1 mL 無菌水之保存管中，在 25°C 及 10°C 溫度下各儲放 1 支備用。本研究所用之菌株編號 C-997 與 C-1001 菌株，來自於雲林縣古坑鄉「桂味」品種，C-1133 來自雲林縣古坑鄉「糯米糍」品種。

病原菌分子鑑定

C-1001 先前已由形態及分子鑑定為 *C. siamense* (Ni *et al.* 2017)，C-997 及 C-1133 菌株則於本研究進行形態記錄外，並以貝氏分析 (Bayesian inference) 進行演化樹建構。所使用的基因有 actin (ACT)、calmodulin (CAL)、chitin synthase (CHS)，以及 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)。核酸萃取及增幅方式如下，首先將待測菌株培養於 PDA 培養基上，待菌絲長出後，刮取菌絲置於 1.5 mL 微量離心管

中，加入 0.5 N NaOH 溶液。以均質機將菌絲磨碎後，離心並吸取上清液。繼而加入 9× 體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)。進行混合後做為 PCR 反應之核酸模板 (Tsai 2005)，以 Phusion High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) 聚合酶鏈鎖反應。ACT 片段所用引子對為 ACT-512F 及 ACT-783R (Carbone & Kohn 1999)，CAL 片段所用引子對為 CL1C 及 CL2C (Weir *et al.* 2012)，CHS 片段所用引子對為 CHS-79F 及 CHS-345R (Carbone & Kohn 1999)，GAPDH 片段所用引子對為 GDF 和 GDR (Templeton *et al.* 1992)。增幅後產物委由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taiwan) 進行定序，定序結果登錄於 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站 GenBank 資料 (表 1)。

由 NCBI 網站 GenBank 資料庫下載共同分析之序列，進行多基因演化分析。各基因先以 ClustalX v. 2.1 軟體 (Larkin *et al.* 2007) 進行序列排列 (alignment) 後，以 jModeltest 進行 DNA 替換模型 (DNA substitution model) 最佳化運算，採用貝氏資訊準則方法 (Bayesian information criterion) 分析得到之 DNA 替換模型，將其應用於演化樹之建構。以 Sequence-Matrix v. 1.7.8 軟體 (Vaidya *et al.* 2011) 將各基因序列相接，並以 MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012) 進行樹型建構。進行 2 次分析，每次分析 1×10^7 個世代 (generations)，每 10,000 個世代取 1 棵分析。為求分析準確，捨棄前 25% 世代。參數的趨同性，以 Tracer 軟體 (Rambaut & Drummond 2007) 進行檢驗。

病原菌形態觀察

將 *C. siamense* 菌株之菌絲塊移植 PDA 平板進行 3–4 d 活化後，切取菌落邊緣至 PDA 上培養，於 12 h 近紫外燈 (TL-D 18W BLB, Philip, Eindhoven, The Netherlands) 光照及 25°C 環境下培養 7 d。以移植環挑取菌落孢子置於載玻片上，以干涉位相差顯微鏡 (differential interference contrast, DIC, Nikon 80i, Tokyo, Japan) 觀察孢子形態並拍照紀錄。

接種源製備

由保存管將 *C. siamense* 菌株之菌絲塊移植 PDA 平板進行活化，於 25°C 無光照之恆溫箱中培養 3–4 d。切取菌絲尖端，繼而移植至 PDA 平板。在 25°C 下以 12 h 近紫外光照射及 12 h 黑暗週期培養 3–5 d。待其產孢後，以無菌水洗下培養皿內產生之分生孢子，並利用血球計數器 (Neubauer Assistant improved Bright-Line hemacytometer, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Germany) 測定孢子濃度，再以無菌水調製濃度為 1×10^6 conidia mL^{-1} 之分生孢子懸浮液供試驗接種用。

葉部病原性測試

接種於行政院農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所荔枝園進行，並於新梢期接種。將 *C. siamense* C-1001 及 C-1133 菌株濃度 1×10^6 conidia mL^{-1} 孢子液以噴霧瓶均勻噴霧於荔枝新梢，隨即以塑膠袋套袋進行保濕 2 d。拆袋換成網袋，持續觀察葉片上病徵進展及記錄針點病發生情形。

表 1. *Colletotrichum siamense* C-997、C-1001 及 C-1133 菌株分離之植物組織、孢子大小及基因序列在 GenBank 資料庫之登錄號碼。

Table 1. The isolated sources, conidial sizes and Genbank accession numbers of *Colletotrichum siamense* isolates C-997, C-1001 and C-1133.

Isolate	Isolated source	Conidial size (μm)	GenBank accession number ²			
			ACT	CAL	CHS	GAPDH
C-997	Leaf	$16.52 \pm 0.18 \times 4.82 \pm 0.06$	MF098593	MF135495	MF098595	MF098597
C-1001	Fruit	$16.08 \pm 0.18 \times 5.44 \pm 0.07$	MF098594	MF135496	MF098596	MF098598
C-1133	Fruit	$15.34 \pm 0.15 \times 5.39 \pm 0.05$	MK863029	MK920228	MK863030	MK863031

² ACT: actin; CAL: calmodulin; CHS: chitin synthetase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

葉片病徵及病兆顯微鏡觀察

C. siamense C-1001 菌株接種「台農 7 號」葉片 30 d 後產生具黃暈之黑色針點病斑，以立體數位顯微鏡 (3D digital microscope, Hirox RH-2000, Tokyo, Japan) 觀察病斑外觀，並以桌上型掃描式電子顯微鏡 (tabletop scanning electron microscope, Hitachi TM-1000, Tokyo, Japan) 觀察葉片上 *C. siamense* C-1001 菌株產孢構造。

溫度對 *C. siamense* 菌絲生長、孢子發芽及附著器產生之影響

將供試菌株 C-997 與 C-1001 活化至 PDA 平板上，於 25°C 定溫箱培養 3 d 後，切取菌落邊緣再移植至 PDA 平板於 25°C 定溫箱培養 4 d 後，以滅菌過之孔徑 0.5 cm 打孔器切取菌落邊緣之菌絲塊供試。將上述直徑 0.5 cm 的菌絲塊菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之 PDA (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 培養基平板中央，分別置於 15、20、25、30、35 及 40°C 之定溫箱中黑暗培養，分別於培養 1、3、5 及 7 d。測量其菌絲生長直徑，每處理 6 重複，本試驗重複進行 2 次。

另將炭疽病菌株 C-997 培養於 PDA 培養基，置於 25°C 之恆溫箱在近紫外燈照射下 (12 h light/12 h dark) 培養 3–7 d，以無菌水洗下分生孢子，配製濃度為 3×10^4 spores mL⁻¹ 分生孢子懸浮液。將分生孢子懸浮液 20 μL 滴於「黑葉」品種荔枝葉片之葉背，每葉片各 4 滴，葉片置於保濕盒後再分別置入 20、25、30 及 35°C 之恆溫箱，並於 4、6 及 12 h 分別取出，以 trypan blue 10 μL 染色鏡檢孢子發芽率及產附著器率。

荔枝炭疽病推薦藥劑對 *C. siamense* 菌絲生長之影響

將供試菌株 C-997 與 C-1001 活化至 PDA 平板上於 25°C 定溫箱 3 d，切取菌落邊緣再移植至 PDA 平板於 25°C 定溫箱培養 4 d。以滅菌過之孔徑 0.5 cm 打孔器切取菌落邊緣之菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所使用 13 種藥劑及種類如下：50.0% 三氯敏水分散性粒劑 (water dispersible

granules; WG) (trifloxystrobin, 台灣拜耳股份有限公司, 台灣台北市)、62.5% 賽普護汰寧 WG (cyprodinil + fludioxonil, 台灣先政達股份有限公司, 台灣台北市)、80.0% 免得爛 WG (metiram, 台灣巴斯夫股份有限公司, 台灣台北市)、40.0% 克熱淨可濕性粉劑 (wetable powders; WP) (iminocadine triacetate, 台灣住友商事股份有限公司, 台灣台北市)、53.0% 腐絕快得寧 WP (thiabendazole + oxine-copper, 瑞芳植保股份有限公司, 台灣嘉義縣)、70.0% 甲基多保淨 WP (thiophanate-methyl, 瑞總股份有限公司, 台灣台北市)、70.0% 甲基鋅乃浦 WP (propineb, 台灣拜耳股份有限公司, 台灣台北市)、23.6% 百克敏乳劑 (emulsifiable concentrate; EC) (pyraclostrobin, 台灣巴斯夫股份有限公司, 台灣台北市)、25.9% 得克利水基乳劑 (emulsion, oil in water; EW) (tebuconazole, 台灣拜耳股份有限公司, 台灣台北市)、25.0% 亞托敏水懸劑 (suspension concentrate; SC) (azoxystrobin, 台灣先政達股份有限公司, 台灣台北市)、24.9% 待克利 SC (difenoconazole, 台灣先政達股份有限公司, 台灣台北市)、40.0% 四氯異苯腈 SC (chlorothalonil, 瑞總股份有限公司, 台灣台北市) 及 42.2% 腈硫醯 SC (dithianon, 台灣巴斯夫股份有限公司, 台灣台北市), 配製成含有效成分濃度為 1、10 及 100 mg L⁻¹ 之 PDA 培養基, 另以不添加藥劑之 PDA 平板作為對照。將上述直徑 0.5 cm 的菌絲塊菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之含藥的 PDA 培養基平板中央, 置於 25°C 之定溫箱中黑暗培養。俟對照組菌絲長滿, 測量其菌絲生長直徑, 每處理 6 重複。本試驗重複進行 2 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率: 抑制率 (%) = [(對照組平均生長直徑 - 藥劑處理組平均生長直徑) / 對照組平均生長直徑] × 100%。

不同藥劑處理對 *C. siamense* 孢子 in 葉片上發芽之影響

荔枝炭疽病菌 C-997 菌株於 PDA 培養基 25°C 近紫外燈照射下培養 1 wk 後, 以無菌水洗下製成孢子懸浮液, 經 Miracloth 濾膜 (EMD Millipore Corp., Burlington, MA, USA) 過濾

掉菌絲，以血球計數器計算孢子數。將孢子加無菌水調製為 3×10^4 conidia mL⁻¹，吸取 2 μ L 孢子懸浮液，置於荔枝葉片之葉背上後。再各加入 30 μ L 不同濃度之藥劑，所使用 13 種藥劑及種類如下：62.5% 賽普護汰寧 WG (cyprodinil + fludioxonil，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、40.0% 克熱淨 WP (iminotadine triacetate，台灣住友商事股份有限公司，台灣台北市)、53.0% 腐絕快得寧 WP (thiabendazole + oxine-copper，瑞芳植保股份有限公司，台灣嘉義縣)、25.0% 亞托敏 SC (azoxystrobin，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、42.2% 腈硫醯 SC (dithianon，台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)、32.5% 亞托特克利 SC (azoxystrobin + difenconazole，台灣先政達股份有限公司，台灣台北市)、50.0% 三氟派瑞 SC (fluopyram + trifloxystrobin，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、70.0% 甲基多保淨 WP (thiophanate-methyl，瑞總股份有限公司，台灣台北市)、23.6% 百克敏 EC (pyraclostrobin，台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)、25.9% 得克利水基乳劑 EW (tebuconazole，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、34.5% 貝芬菲克利 WP (carbendazim + hexaconazole，惠光化學股份有限公司，台灣台南市)、80.0% 鋅錳乃浦 WP (mancozeb，安農股份有限公司，台灣新北市)、23.7% 依普同 SC (iprodione，萬得發有限公司，台灣台中市)、9.0% 滅特座 EC (metconazole，立農化學股份有限公司，台灣雲林縣) 配製成含有有效成分濃度為 1、10 及 100 mg L⁻¹，經 16 h 後加入 10 μ L trypan blue 染色後，於顯微鏡下逢機調查 40 個孢子之孢子發芽率，每處理各 5 重複，以無菌水處理做為對照組。

結果

荔枝炭疽病菌 *C. siamense* 培養形態與菌株分子鑑定

荔枝炭疽病菌菌株 C-997、C-1001 及 C-1133 培養於 PDA 上，25°C 培養 7 d，C-997 與 C-1133 菌落表面為灰黑輪紋，可見橘色產孢，背面則

為淺橘色至橘色；C-1001 菌落表面灰黑輪紋，背面亦為灰黑色（圖 2）。三菌株之孢子無色、無隔膜、短桿狀，有時一端稍尖，孢子大小約為 15.34–16.52 μ m $\times$ 4.82–5.39 μ m（表 1）。以 ACT、CAL、CHS 及 GAPDH 序列進行分子類緣關係鑑定，發現 3 菌株與 *C. siamense* 類緣關係最接近（圖 3）。以菌落外觀、孢子形態及類緣關係進行分析 (Weir *et al.* 2012)，確認 3 菌株為 *C. siamense*。另外 3 菌株皆曾經過病原性測試，證明對荔枝具有病原性。

C. siamense 對荔枝「台農 7 號」葉片的病原性

已知 *C. siamense* 可在「糯米糍」品種上造成針點病，為瞭解該病原菌在其他品種上是否可造成發病，於「台農 7 號」荔枝品種之葉片上進行病原性測試。*C. siamense* C-1001 菌株之孢子懸浮液接種於荔枝葉片上，結果於接種後 7 d 出現針點狀典型病斑（圖 4A），隨著接種時間的增加，其病斑數逐漸增加。接種後 21 d 病斑發展為具黃暈之褐色小點（圖 4B），其後無明顯繼續擴大的現象，僅維持針點狀，接種後 30 d 之病徵如圖 4C，病斑大小約為 268.36 μ m $\times$ 213.68 μ m 至 522.51 μ m $\times$ 507.75 μ m。將病組織以桌上型掃描式電子顯微鏡觀察後，結果可以發現病斑感染點確實有炭疽病菌孢子增殖泌出之情形（圖 4D）。以 *C. siamense* C-1133 菌株接種後 50 d，「台農 7 號」葉片上病斑外觀為中央灰白色或淺黃色木栓化，周緣褐色（圖 4E–4F）。為瞭解病斑內病原菌之存活情形，本研究每月對病斑進行組織分離，結果顯示於接種後 9 個月後仍可分離到炭疽病菌，且分離比率仍高達 80%。

溫度對 *C. siamense* 菌絲生長與孢子發芽之影響

以 *C. siamense* C-997 與 C-1001 菌株進行溫度對菌絲生長影響試驗（圖 5），結果顯示兩菌株於 25°C 及 30°C 生長最好，於培養 7 d 時生長直徑可達 7 cm 以上。其次為 20°C，培養 7 d 的生長直徑約 5–6 cm。15°C 時生長較遲緩，C-997、C-1001 在 7 d 之生長直徑僅分別為 3.8 cm、4.38 cm。35°C 時菌絲生長極為緩慢，

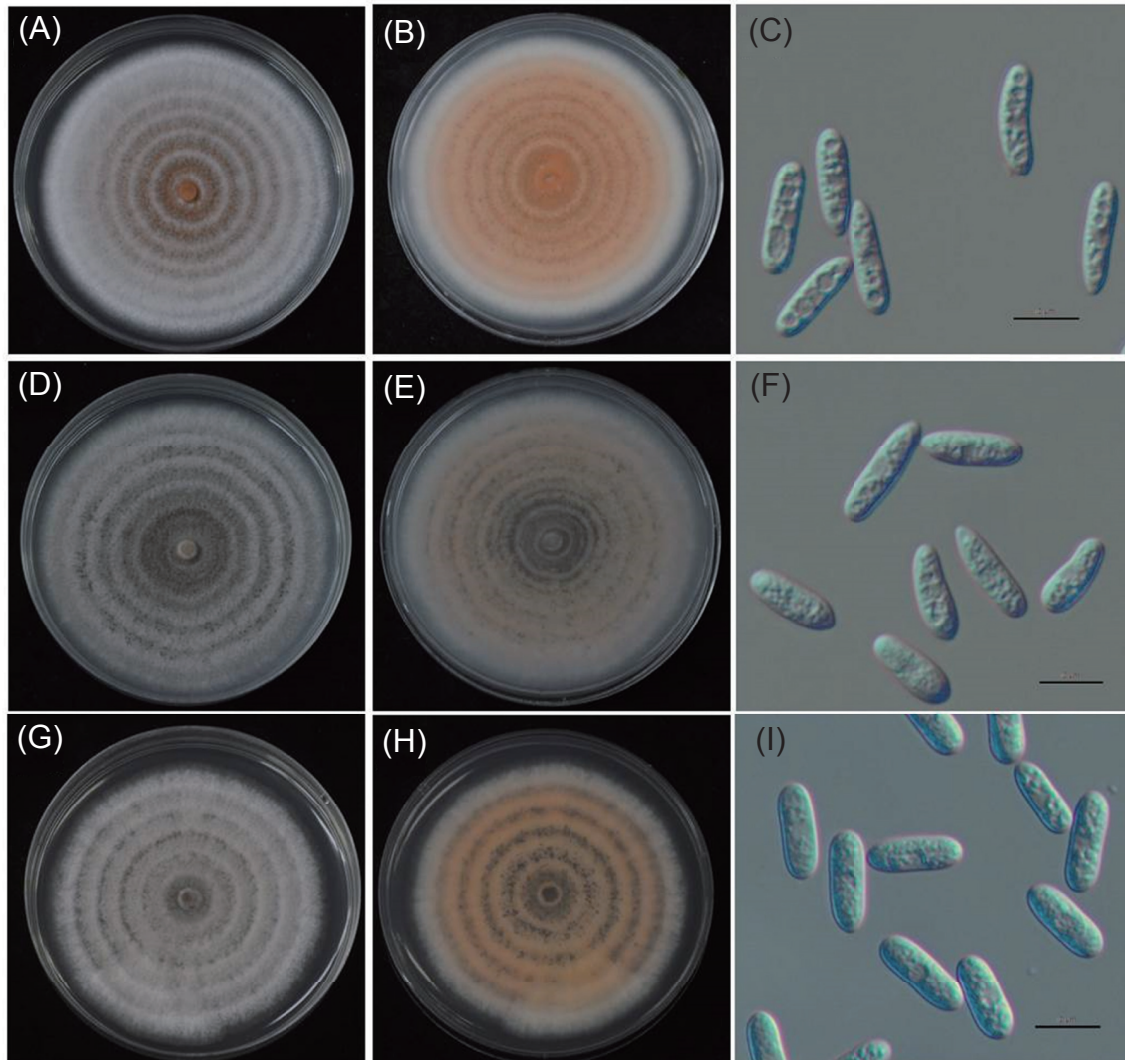


圖 2. *Colletotrichum siamense* C-997 菌株在 potato dextrose agar (PDA) 培養基之菌落 (A) 正面、(B) 反面以及 (C) 孢子形態；*C. siamense* C-1001 菌株在 PDA 培養基之菌落 (D) 正面、(E) 反面以及 (F) 孢子形態；*C. siamense* C-1133 菌株在 PDA 培養基之菌落 (G) 正面、(H) 反面以及 (I) 孢子形態。標尺 = 10 μm 。

Fig. 2. (A) The upper side and (B) lower side of *Colletotrichum siamense* isolate C-997 colony on potato dextrose agar (PDA) plate and (C) its spores; (D) the upper side and (E) lower side of *C. siamense* isolate C-1001 colony on PDA plate and (F) its spores; (G) the upper side and (H) lower side of *C. siamense* isolate C-1133 colony on PDA plate and (I) its spores. Bar = 10 μm .

而 40°C 時菌絲則完全不生長。以 *C. siamense* C-997 菌株進行溫度對孢子發芽試驗 (表 2)，在 20–30°C 溫度下，孢子於葉片上 12 h 可達到 85% 以上發芽率，發芽孢子產生附著器的比例皆超過 95%；而 35°C 時孢子於 12 h 發芽率仍可達到 79.2%，但在此發芽率下，附著器產生比例僅有 27.5%，顯示高溫不利於附著器的產生。

藥劑對 *C. siamense* 之菌絲生長與孢子發芽的影響

本研究共測試 13 種目前推薦在炭疽病上之化學藥劑對 *C. siamense* 之菌絲生長及孢子發芽之影響，結果分別如表 3 與表 4 所示。以菌絲生長之抑制率而言，在 1 mg L⁻¹ 有效濃

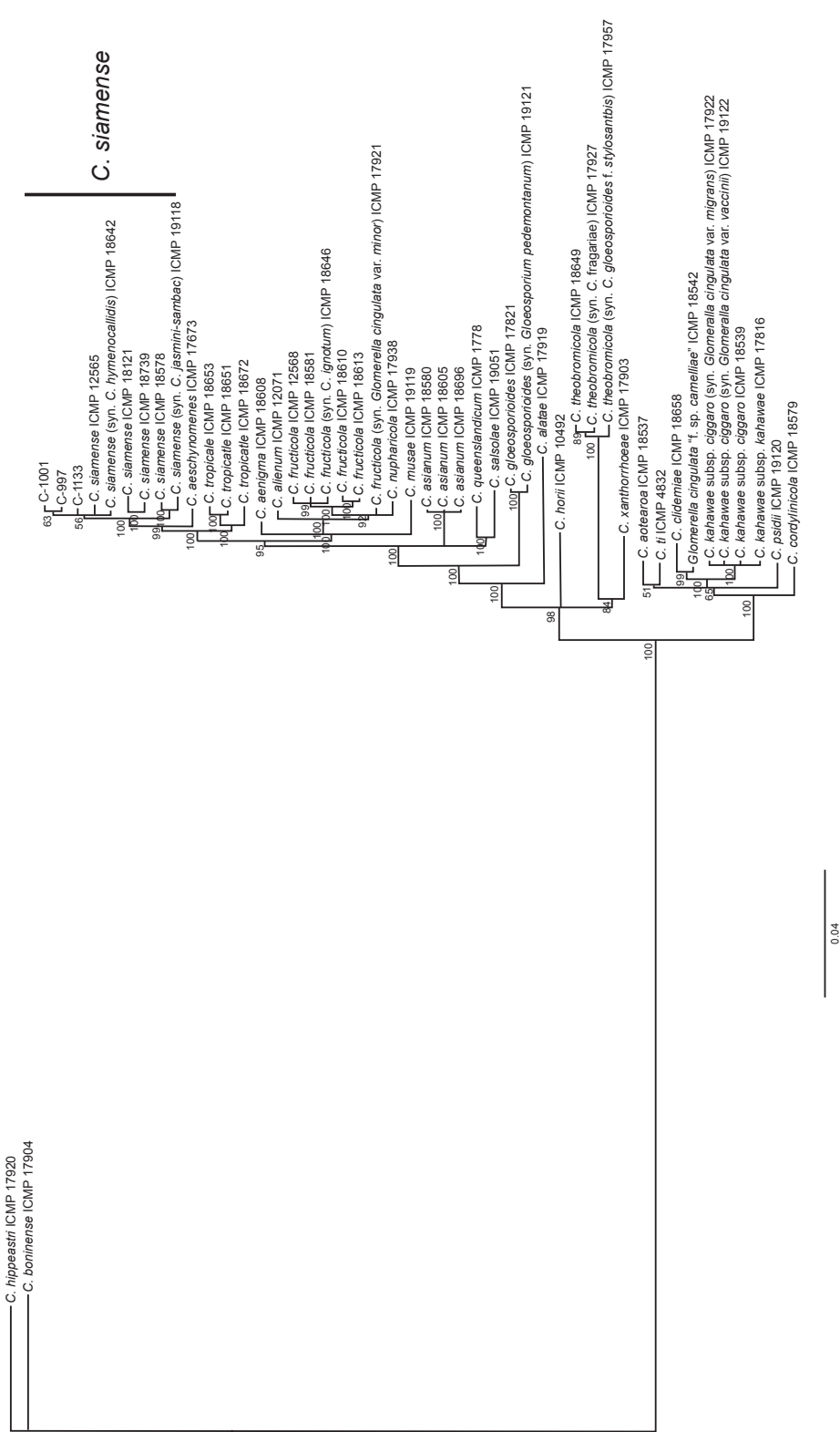


圖 3. 利用 Bayesian inference 演算法分析 actin (ACT)、calmodulin (CAL)、chitin synthase (CHS) 及 glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 以進行 *Colletotrichum gloeosporioides* complex 與 *Colletotrichum siamense* C-997、C-1001 及 C-1133 菌株類緣演化樹之建構。

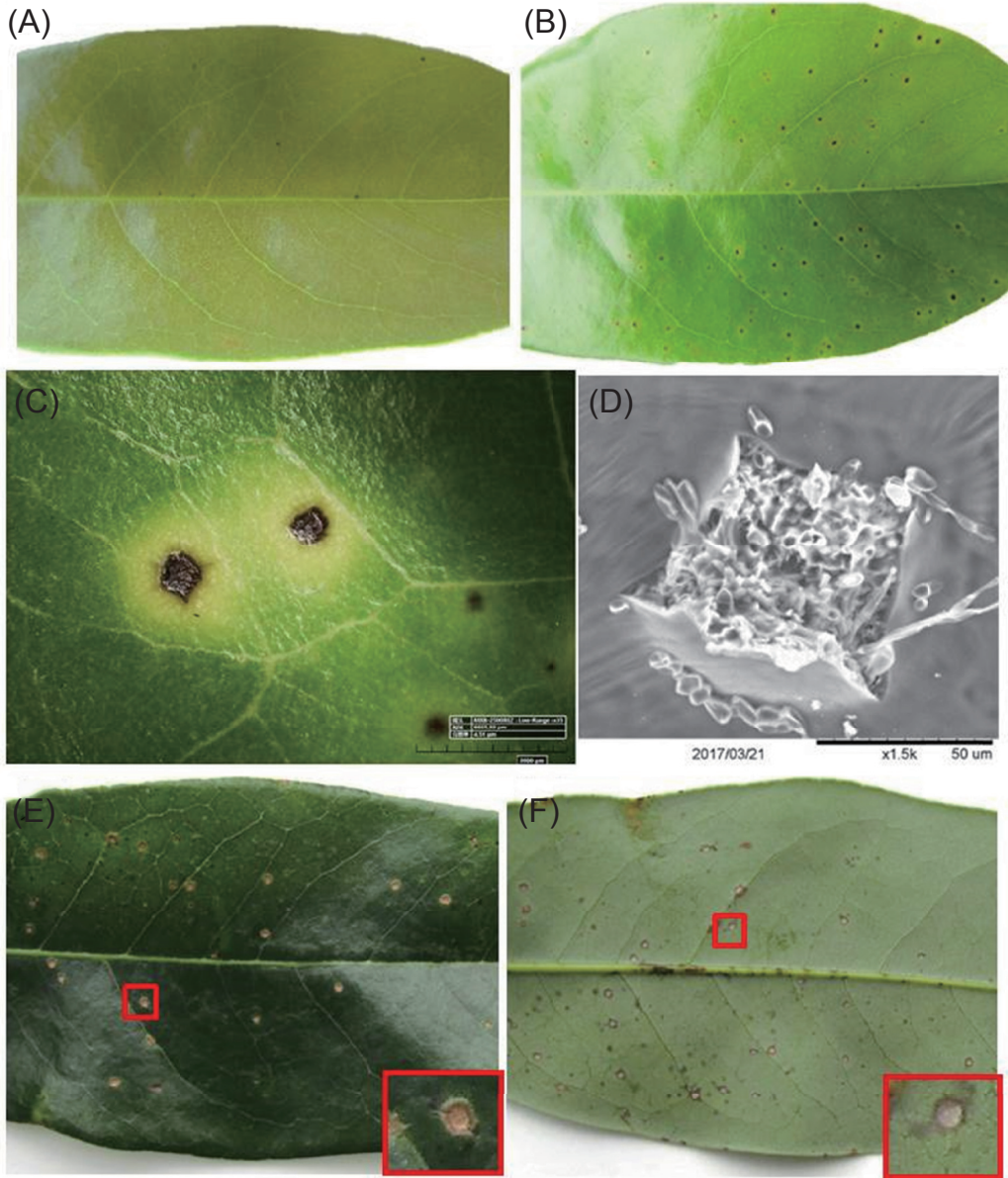


圖 4. *Colletotrichum siamense* C-1001 菌株孢子懸浮液噴霧接種於荔枝「台農 7 號」嫩梢後 (A) 7 d 及 (B) 21 d 時發病情形，接種後 30 d (C) 病斑近觀及 (D) 掃描式電子顯微鏡拍攝之產孢構造，以及以 *C. siamense* C-1133 菌株接種後 50 d 葉片 (E) 正面及 (F) 反面。

Fig. 4. The pepper spot symptom on lychee 'TN7' leaves (A) 7 d and (B) 21 d post *Colletotrichum siamense* isolate C-1001 inoculation and (C) a detailed appearance of the spot and (D) sporulation structure of the pathogen under scanning electron microscope 30 d post inoculation. The pepper spot symptom on (E) upper and (F) lower surface of lychee 'TN7' leaf 50 d post *C. siamense* isolate C-1133 inoculation.

度藥劑作用下，除了克熱淨對兩測試菌株之生長抑制率可達 70% 以上之外，其餘藥劑對菌絲生長抑制之效果均不佳。當藥劑有效濃度為 10 mg L^{-1} 時，腐絕快得寧及甲基多保淨抑制率可達 80% 以上，得克利對 C-997 抑制率

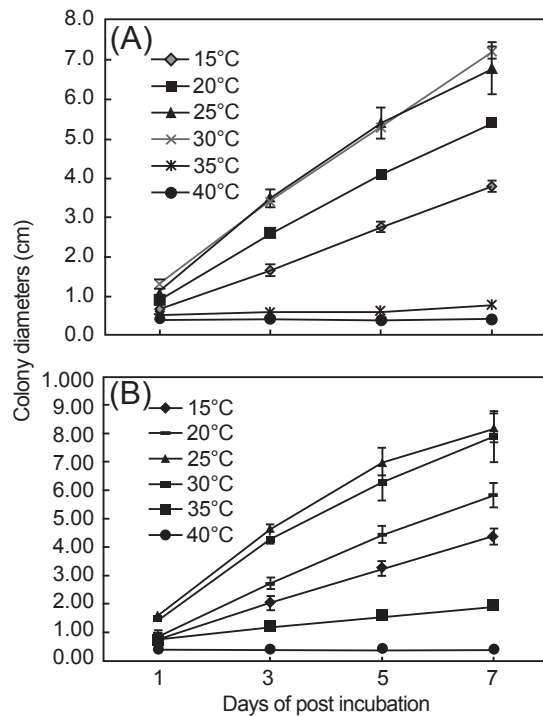


圖 5. 溫度對 (A) *Colletotrichum siamense* C-997 及 (B) C-1001 菌株菌絲生長之影響。

Fig. 5. Mycelial growth of (A) *Colletotrichum siamense* isolates C-997 and (B) C-1001 under different temperatures.

83.9%，克熱淨對 C-1001 的抑制率 82.4%，效果較佳。在 100 mg L^{-1} 作用濃度下，則腐絕快得寧、甲基多保淨、得克利對兩菌株有 90% 以上抑制率，克熱淨對 C-1001 抑制率達 100%，待克利對 C-997 亦有 94.0% 之抑制率。就藥劑對孢子發芽之影響而言，以 *C. siamense* C-997 菌株進行試驗，在 1 mg L^{-1} 有效藥劑濃度處理下，腐絕快得寧、腓硫醃及百克敏具有 100% 抑制孢子發芽之效果，當濃度提升至 10 mg L^{-1} 有效濃度作用下時，則除了腐絕快得寧、腓硫醃及百克敏外，亞托待克利、得克利亦有 90% 以上之孢子發芽抑制率，而鋅錳乃浦的發芽抑制率則為 88.1%。當藥劑濃度高達 100 mg L^{-1} 有效濃度時，腐絕快得寧、腓硫醃、百克敏、亞托待克利、得克利、鋅錳乃浦及滅特座對孢子發芽的抑制率均為 100%，賽普護汰寧則有 88% 的孢子發芽抑制率。

討論

本文為國內首篇詳細介紹由 *C. siamense* 引起之荔枝葉部針點病之報告，報導該病原菌形態特性與類緣關係、病原菌生長溫度及有效藥劑篩選。綜觀國內外 *Colletotrichum* spp. 引起荔枝病害相關研究，該屬病原菌可在荔枝上造成不同外觀之病徵，包括在葉片上造成針點斑，或在果實引起密集針點斑、小塊黑斑以及黑褐色邊緣不明顯之大形圓斑，偶爾造成蒂腐，也會於採收後果實上造成褐斑 (Coates *et al.* 2005)。以往國內外皆認為此類炭疽病是由

表 2. *Colletotrichum siamense* C-997 菌株於不同溫度下在荔枝葉片上之孢子發芽率與附著器產生率。

Table 2. Spore germination and appressoria formation rate of *Colletotrichum siamense* isolate C-997 on leaf tissue under different temperatures.

Time	Temperature (°C)							
	20		25		30		35	
	Spore germination (%) ^z	Appressoria formation (%) ^y	Spore germination (%)	Appressoria formation (%)	Spore germination (%)	Appressoria formation (%)	Spore germination (%)	Appressoria formation (%)
4 h	15.8	98.5	59.2	99.2	69.6	99.2	5.0	25.6
6 h	80.4	96.4	87.5	96.7	79.2	96.7	54.6	39.1
12 h	94.6	99.2	86.7	99.6	95.0	99.6	79.2	27.5

^z Spore germination (%) = (numbers of germinated spores/total spores investigated) × 100%.

^y Appressorial formation (%) = (numbers of germinated spores with appressoria/numbers of germinated spores) × 100%.

表 3. 不同殺菌劑對 *Colletotrichum siamense* C-997 與 C-1001 菌株菌絲生長之影響。Table 3. Fungicide sensitivity of *Colletotrichum siamense* isolates C-997 and C-1001 rating by mycelial growth.

Fungicide	Inhibition (%) ^z					
	C-997			C-1001		
	1 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
50.0% Trifloxystrobin WG ^y	29.0 e ^x	29.1 g	33.4 f	23.0 c	33.3 d	23.9 e
62.5% Cyprodinil + fludioxonil WG	44.4 c	44.9 f	64.9 e	43.7 b	53.7 c	73.8 c
80.0% Metiram WG	0.0 h	0.0 j	2.9 h	1.5 de	0.0 e	1.8 g
40.0% Iminoctadine triacetate WP	72.4 a	79.4 c	86.1 c	74.3 a	79.3 a	100.0 a
53.0% Thiabendazole + oxine-copper WP	1.1 h	91.9 a	95.4 ab	0.0 e	82.4 a	93.7 a
70.0% Thiophanate-methyl WP	8.4 g	87.0 ab	99.1 ab	26.9 c	81.3 a	100.0 a
70.0% Propineb WP	0.0 h	0.0 j	4.0 h	2.6 de	0.0 e	1.5 g
23.6% Pyraclostrobin EC	38.3 d	51.2 e	76.4 d	39.7 b	57.6 c	73.3 c
25.9% Tebuconazole EW	46.9 c	83.9 bc	100.0 a	40.0 b	72.4 b	99.8 a
25.0% Azoxystrobin SC	22.1 f	30.7 g	32.8 f	29.2 c	27.9 d	33.1 d
24.9% Difenoconazole SC	50.2 b	70.4 d	94.0 b	41.5 b	73.4 b	81.5 b
40.0% Chlorothalonil SC	0.0 h	15.9 h	34.1 f	8.9 d	29.5 d	36.3 d
42.2% Dithianon SC	0.8 h	9.9 i	19.8 g	0.0 e	0.0 e	12.0 f
LSD ($P = 0.05$)	2.7	5.7	5.3	7.7	5.8	6.4

^z Inhibition (%) = [(Diameter of mycelial growth on PDA without fungicide – diameter of mycelial growth on PDA with fungicides)/diameter of mycelial growth on PDA without fungicide] × 100%.

^y WG: water dispersible granules; WP: wettable powders; EC: emulsifiable concentrate; EW: emulsion, oil in water; SC: suspension concentrate.

^x Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 4. 殺菌劑抑制 *Colletotrichum siamense* C-997 菌株孢子發芽之效果。Table 4. Fungicide inhibition ability on spore germination of *Colletotrichum siamense* isolate C-997.

Fungicide	Spore germination inhibition (%) ^z		
	1 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
62.5% Cyprodinil + fludioxonil WG ^y	52.5 b ^x	72.7 c	88.0 b
40.0% Iminoctadine triacetate WP	8.4 f	32.2 e	53.0 d
53.0% Thiabendazole + oxine-copper WP	100.0 a	100.0 a	100.0 a
25.0% Azoxystrobin SC	15.3 def	17.0 f	15.3 f
42.2% Dithianon SC	100.0 a	100.0 a	100.0 a
32.5% Azoxystrobin + difenoconazole SC	18.8 de	100.0 a	100.0 a
50.0% Fluopyram + trifloxystrobin SC	9.5 ef	18.0 f	23.5 e
70.0% Thiophanate-methyl WP	45.8 bc	46.3 d	49.7 d
23.6% Pyraclostrobin EC	100.0 a	100.0 a	100.0 a
25.9% Tebuconazole EW	37.9 c	92.7 ab	100.0 a
34.5% Carbendazim + hexaconazole WP	46.9 bc	54.2 d	53.1 d
80.0% Mancozeb WP	23.2 d	88.1 b	100.0 a
23.7% Iprodione SC	37.3 c	76.8 c	74.0 c
9.0% Metconazole EC	15.3 def	48.6 d	100.0 a

^z Spore germination inhibition (%) = (numbers of ungerminated spores/numbers of total spores investigated) × 100%.

^y WG: water dispersible granules; WP: wettable powders; SC: suspension concentrate; EC: emulsifiable concentrate; EW: emulsion, oil in water.

^x Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

C. gloeosporioides 或是 *C. acutatum* 所引起 (Ann *et al.* 2004; Anderson & Coates 2009), 然而隨著炭疽病菌多基因類緣分析方法發展, 越來越多的證據顯示 *Colletotrichum gloeosporioides sensu stricto* 並非真正作物上常見的病原菌 (Phoulivong *et al.* 2010)。Ni *et al.* (2017) 首次指出在台灣發生之荔枝葉片針點病由 *C. siamense* 所造成, 本篇則進一步針對此引起荔枝針點病之病原菌, 進行外觀形態、生長溫度條件及藥劑感受性試驗。

目前對於荔枝針點病病原菌生活史仍未完全明瞭, 本研究在其生活史中殘存、越冬的部分可增進一些瞭解。本研究調查炭疽病菌在葉片中殘存情形, 發現炭疽病菌在葉片內殘存達 9 個月的時間後仍具有活性, 且本菌在 15°C 時菌絲仍可生長。而以荔枝產區高雄、台南、嘉義、台中等地為例, 月均溫最低之 12 月都有 16°C 以上, 顯示炭疽病菌在此氣候條件下仍可越冬殘存。另外, 經由溫度試驗發現, 本菌菌絲生長的最佳溫度為 25–30°C, 且孢子在 20–30°C 間皆可萌芽並產生附著器 (appresorium)。由前述事實可推測本菌可殘存於枯葉之病斑上越冬, 於來春氣溫較高時產生初次感染源, 並於適當環境條件下進行傳播及侵染。

在藥劑施用的部分, 由試驗結果可知, 對菌絲生長及孢子發芽有抑制效果的藥劑種類不盡相同, 在使用上應注意作用機制及施用時機的問題。對菌絲生長抑制效果最佳的藥劑為腐絕快得寧及甲基多保淨, 次佳者為克熱淨及得克利; 抑制孢子發芽的藥劑, 則以腐絕快得寧、百克敏、腈硫醃效果最佳, 亞托待克利、得克利為次佳者。綜合而論, 對孢子發芽與菌絲生長都有良好抑制效果者為腐絕快得寧, 其次為得克利。在藥劑選用上, 腐絕與甲基多保淨作用機制相同, 得克利、待克利作用機制相同, 亞托敏、百克敏作用機制相同, 輪用藥劑時應避免使用作用機制重複的藥劑, 減少不必要的浪費。此外, 百克敏、腈硫醃對孢子發芽有良好抑制效果, 對於菌絲生長卻沒有明顯抑制效果, 在田間施用時應注意其使用時機, 在病害發展及傳播初期施用有良好抑制效果, 對於孢子已萌芽且入侵植物組織的感染狀態則可能效果有限。

本研究中, 腐絕快得寧對菌絲生長與孢子發芽皆有良好抑制效果, 然而在田間使用上必須注意發生抗藥性的問題。腐絕快得寧為混合型的藥劑, 其中腐絕的成分, 與甲基多保淨的作用機制相同, 皆為影響有絲分裂微管蛋白 (β -tubulin) 聚合。由前人的報導已知 *Colletotrichum* spp. 會對腐絕或其他苯併咪唑類 (benzimidazoles) 的農藥產生抗藥性, 且其抗藥性源自於 *Colletotrichum* spp. 在微管蛋白上第 198 個胺基酸的位置, 由原本的麩胺酸 (glutamic acid) 轉為丙胺酸 (alanine), 或是第 200 個胺基酸的位置由原本的苯丙胺酸 (phenylalanine) 轉為酪胺酸 (tyrosine) (Chung *et al.* 2010; Torres-Calzada *et al.* 2015)。在台灣, 部分由台南市楠西區荔枝上分離得到的 *Colletotrichum* spp. 在微管蛋白第 198 個胺基酸的位置偵測到丙胺酸抗藥性基因突變, 同時菌株對甲基多保淨及腐絕快得寧藥劑敏感性皆已大幅下降, 暗示交叉抗藥性可能已經發生 (未發表資料)。由以上資料及結果, 在台灣的荔枝上施用腐絕及甲基多保淨防治炭疽病時, 為降低或延緩抗藥性的產生, 應降低苯併咪唑類藥劑使用頻度, 或謹慎施用。

荔枝葉片針點病目前在台灣各處果園發生並不嚴重, 如能採行適當防治策略, 則可完善控制。在田間衛生方面, 因病原菌可殘存於田間枯葉而成為來年初次感染源, 應進行清園以降低田間病原菌數量, 此外適當修剪枝條以促進通風亦有助於降低病害發生機率。在藥劑施用上, 除了注意抗藥性發生和輪用不同作用機制的藥劑外, 也要注意藥劑施用時機。炭疽病菌具有潛伏感染特性, 且可能在花期入侵, 並在結果後造成病徵, 此現象已在其他作物上有許多報導 (Binyamini & Schiffmann-Nadel 1972; Lima *et al.* 2011)。本研究中, 由於針點病可感染新葉及嫩梢, 於荔枝新梢期觀察新葉發病狀況, 或可略窺病原菌在田間族群變化, 依葉片上針點病發生情形決定施藥次數與時機, 及早進行防治。

本研究報導荔枝葉片針點病之外觀形態、生長適溫及藥劑敏感性等資料, 可作為將來病害鑑定及防治時之參考。另一方面, *Colletotrichum* spp. 在荔枝上可造成不同病

徵，除針點外，亦造成黑斑、黑腐病徵 (Ann *et al.* 2004)，同時也會造成荔枝採後病害的發生 (Johnson *et al.* 2002)，降低其儲架壽命。隨著多基因分子類緣關係分析方法的發展，可衍生出許多值得探討的問題。例如，在荔枝上造成不同病徵的炭疽病菌，是否為同一親緣種；又或者造成荔枝針點病的炭疽病菌，除 *C. siamense* 之外，是否還有其他種類，若荔枝炭疽病菌可歸於不同的種類，又其發病生態、生長適溫及藥劑敏感性是否有所差異。前述問題皆可於將來進行進一步探討，除可得到荔枝炭疽病菌病原族群的組成與田間分布的資料之外，也有助於將來防治策略的擬定，並瞭解與掌握田間抗藥性發生的情形和演變。

誌謝

本研究承陳幸葵小姐、許淑麗小姐、楊麗子小姐、蔡佳達先生及賴素玉小姐協助試驗進行，特此誌謝。

引用文獻

- Anderson, J. and L. Coates. 2009. Lychee. p.145–148. in: Diseases of Fruit Crops in Australia. (Cooke, T., D. Persley, and S. House, eds.) CSIRO Publ. Victoria, Australia. 288 pp.
- Ann, P. J. and W. H. Ko. 1984. Blossom blight of litchi in Taiwan caused by *Peronophythora litchi*. Plant Dis. 68:826.
- Ann, P. J., H. L. Lee, and T. C. Huang. 1999. Brown root rot of 10 species of fruit trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Dis. 83:746–750.
- Ann, P. J., J. N. Tsai, I. T. Wang, and H. J. Young. 2004. Litchi fruit anthracnose and the cause of black skin. Plant Pathol. Bull. 13:299–308. (in Chinese with English abstract)
- Binyamini, N. and M. Schiffmann-Nadel. 1972. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 62:592–594.
- Carbone, I. and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553–556.
- Chung, W. H., W. C. Chung, M. T. Peng, H. R. Yang, and J. W. Huang. 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. New Biotechnol. 27:17–24.
- Coates, L., E. Zhou, and C. Sittigul. 2005. Diseases. p.261–272. in: Litchi and Longan: Botany, Production and Uses. (Menzel, C. M. and G. K. Waite, eds.) CABI Publ. Wallingford, UK. 336 pp.
- Cooke, A. W. and L. M. Coates. 2002. Pepper spot: A pre-harvest disease of lychee caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Australas. Plant Pathol. 31:303–304.
- Drew, H. and J. Drew. 2001. Lychee Pepper Spot in Australia (Its Impact And Control). RIRDC Publi. Barton, Australia. 28 pp.
- Johnson, G. I., A. W. Cooke, and U. Sardsud. 2002. Postharvest disease control in lychee. Acta Hort. 575:705–715.
- Kao, C. W. and L. S. Leu. 1980. Sporangium germination of *Peronophythora litchii*, the causal organism of litchi downy blight. Mycologia 72:737–748.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948.
- Lima, W. G., M. B. Spósito, L. Amorim, F. P. Gonçalves, and P. A. M. de Filho. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. Eur. J. Plant Pathol. 131:157–165.
- Ni, H. F., C. W. Huang, C. J. Wu, H. R. Yang, C. Y. Lin, J. Y. Chang, and J. W. Chang. 2017. First report of pepper spot disease of lychee caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. J. Plant Pathol. 99:808.
- Phoulivong, S., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, K. Abdelsalam, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal Divers. 44:33–43.
- Rambaut, A. and A. J. Drummond. 2007. Tracer v. 1.4. <http://beast.community/Tracer> (visit on 08/20/2018)
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539–542.
- Schoeman, M. H. and B. Q. Manicom. 2000. Report on the epidemiology of pepper spot on Hass avocado. SAAGA Yearbook 23:95–97.
- Templeton, M. D., E. H. A. Rikkerink, S. L. Solon, and R. N. Crowhurst. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the

- plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122:225–230.
- Torres-Calzada, C., R. Tapia-Tussell, I. Higuera-Ciapara, R. Martin-Mex, A. Nexticapan-Garcez, and D. Perez-Brito. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. Plant Dis. 99:1590–1595.
- Tsai, H. L. 2005. Development of techniques for detection of latent infection and molecular identification of mango anthracnose fungi. Master Thesis, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 92 pp. (in Chinese with English abstract)
- Tsai, J. N. and W. H. Hsieh. 1998. Occurrence of litchi sour rot and characteristics of the pathogens *Geotrichum candidum* and *G. ludwigii*. Plant Pathol. Bull. 7:10–18. (in Chinese with English abstract)
- Tzean, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 311 pp. (in Chinese)
- Vaidya, G., D. J. Lohman, and R. Meier. 2011. Sequence-Matrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics 27:171–180.
- Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud. Mycol. 73:115–180.
- Willingham, S. L., A. W. Cooke, L. M. Coates, and K. G. Pegg. 2000. Pepper spot: A new preharvest *Colletotrichum* disease of avocado cv. Hass. Australas. Plant Pathol. 29:151.
- Yang, H. C. 1990. Plant anthracnose caused by *Colletotrichum* species in Taiwan. Ph.D. Dissertation, Faculty of Agriculture, Hokkaido University. Hokkaido, Japan. 190 pp.

Physiological Characteristics, Pathogenicity and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum siamense* Causing Lychee Pepper Spot Disease

Chao-Jung Wu¹, Chiao-Wen Huang², Jer-Way Chang³, and Hui-Fang Ni^{4,*}

Abstract

Wu, C. J., C. W. Huang, J. W. Chang, and H. F. Ni. 2020. Physiological characteristics, pathogenicity and fungicide sensitivity of *Colletotrichum siamense* causing lychee pepper spot disease. J. Taiwan Agric. Res. 69(1):11–24.

The causal agent of lychee pepper spot disease is *Colletotrichum siamense*. The symptom shows black needle-like spots on leaf, fruit, petiole and pedicle. In this study, many isolates of *Colletotrichum* spp. were isolated from needle-like spots on lychee ‘Gue Wei’ and ‘No Mi Ci’ and all of them were identified as *C. siamense* based on morphology and molecular phylogenetic analysis. In our previous study, the pathogenicity of *C. siamense* on lychee has been validated on lychee ‘No Mi Ci’. In this study, pathogenicity test was conducted on lychee ‘TN 7’ to confirm that the pathogen causes symptoms on other variety in addition to ‘No Mi Ci’. The temperature effect on *C. siamense* mycelial growth and spore germination was investigated. It was found that the optimal temperature for mycelial growth was 25–30°C, and mycelia growth of *C. siamense* kept viable under 15°C. In addition, spores germinated and produced appressoria on lychee leaves under 20–30°C. The result of fungicide sensitivity test indicated that thiabendazole + oxine-copper and thiophanate-methyl are the most suppressive on mycelial growth of *C. siamense*, followed by iminoctadine triacetate and tebuconazole. In addition, thiabendazole + oxine-copper, dithianon and pyraclostrobin had best suppression on spore germination, followed by azoxystrobin + difenoconazole and tebuconazole. The results of this study provide information for fungicide selection and control strategy on lychee pepper spot disease in the field.

Key words: Lychee, Pepper spot disease, Fungicide sensitivity.

Received: June 3, 2019; Accepted: September 22, 2019.

* Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow and Head, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁴ Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.