

# 香椿與食茱萸苗木疫病

安寶貞<sup>1,\*</sup> 蔡志濃<sup>2</sup> 王姻婷<sup>3</sup>

## 摘要

安寶貞、蔡志濃、王姻婷。2013。香椿與食茱萸苗木疫病。台灣農業研究 62(1):57-70。

2006年起發現多處地區的香椿 (*Cedrela sinensis*) 與食茱萸 (紅刺蔥) (*Zanthoxylum ailanthoides*) 苗木發生嚴重枯萎腐敗現象。香椿的罹病部位包括莖基部與根系；莖基部染病後，基部隘縮，繼而全株枯萎死亡，而在環境潮濕時，罹病部位長出白色霉狀物；根部染病時，根系壞疽且稀少，嚴重時地上部矮化黃葉，甚而全株死亡。食茱萸則全株可被感染，包括根、莖及葉片，被感染葉片初現淡褐色水浸狀圓形斑點，病斑面積迅速擴大轉為暗褐色，並提早落葉；莖部被感染時，新稍與主莖初現褐色病斑，而後擴大環繞莖部，造成頂芽與罹病處以上部位枯死；莖基部與根系的病徵則與香椿受害情形相似。罹病組織經分離，從香椿上獲得兩種疫病菌，分別為 *Phytophthora nicotianae* (*P. parasitica*) 與 *Phytophthora palmivora*，而食茱萸上分離到的疫病菌則全為 *P. nicotianae*。將分離到的疫病菌游走子懸浮液各自噴霧接種於兩種作物一年生幼苗上，2-3 d 後均會造成新稍褐變枯萎、葉片出現褐斑後掉落；接種莖基部時，10-14 d 則可造成組織隘縮與植株死亡；接種根部時，約 20-30 d 則可造成植株死亡；均與田間出現之病徵一致，並且自接種後發病的組織上均可回分到相同的疫病菌，證實香椿與食茱萸的莖、葉及根系腐敗係由疫病菌引起。兩種疫病菌均為典型 (typical type) 疫病菌，*P. nicotianae* 的菌絲生長溫度為 8-36°C，最適溫為 28°C；孢囊球形或橢圓形，具顯著乳突 (papilla) 及不脫落性；*P. palmivora* 的菌絲生長溫度為 12-35°C，最適溫亦為 28°C；孢囊橢圓形、檸檬形或卵圓形，具顯著乳突及脫落性，孢囊柄 (pedicels) 極短，在 5 μm 以下。兩種疫病菌均可形成厚膜孢子 (chlamydospores)。其中香椿分離的 *P. nicotianae* 為 2 株 A<sup>1</sup> 配對型 (mating type)，而 *P. palmivora* 為 3 株 A<sup>2</sup> 配對型；而食茱萸分離的 *P. nicotianae* 包括 7 株 A<sup>1</sup> 與 4 株 A<sup>2</sup> 配對型。利用分子序列特性，包括核糖體內轉錄區間 (ITS) DNA 序列與 β 微管蛋白 (β-tubulin) 部分基因序列分析，序列比對結果亦佐證傳統形態分類的正確性。本研究結果係疫病菌為害香椿與食茱萸的首度報導。

**關鍵詞：**香椿、食茱萸、疫病、*Phytophthora nicotianae*、*Phytophthora palmivora*。

## 前言

香椿 [*Cedrela sinensis*，英名 Chinese mahogany，為楝科 (Meliaceae) 喬木] (Su 2005) 與食茱萸 (紅刺蔥) [*Zanthoxylum ailanthoides*，英名 Alianthus Prickly Ash，屬芸香科 (Rutaceae) 喬木] 均原產中國，目前在台灣零星栽培。該兩種作物被認為屬於保健植物，而其嫩葉可作為香料入菜食用。此兩種作物

的病害紀錄甚少，在 2002 年出版的台灣植物病害名彙 (Tsu *et al.* 2002) 中僅記載香椿罹患灰黴病，食茱萸曾罹患兩種銹病與一種葉斑病。然而 2006 年起在嘉義縣義竹與新北市鶯歌地區發現香椿苗木發生嚴重枯萎死亡的情形，包括田間 3-5 年生的幼年樹與盆栽幼苗。此外，2006 年、2009 年及 2012 年另在彰化縣田尾地區發現食茱萸苗木出現頂稍枯萎與

投稿日期：2012 年 11 月 9 日；接受日期：2013 年 1 月 3 日。

\* 通訊作者：pjann@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

全株落葉的情形。因此，進行病因探討與接種試驗，本文即報告香椿與食茱萸植株枯萎死亡之病因。

## 材料與方法

### 病菌之分離與保存

將罹病香椿與食茱萸植株採回，先將罹病組織洗淨、以舒潔紙巾瀝乾水分。將葉片與莖部上病斑與健康區間之組織切成 7 mm × 7 mm 小塊，新稍與根系組織切成 10 mm 長小片段，經 0.5% NaClO 溶液表面消毒 30 s，再以紙巾吸乾，移置於含有 20 mL 的 2% WA (water agar, 水瓊脂) 之培養皿 (直徑 9 cm) 內，置於 24°C 下，以分離可疑病原菌。因檢視罹病組織時，可以發現有疫病菌孢囊存在，因此同時將罹病組織置於分離疫病菌之 5% CVA (Clarified V-8 juice agar) 半選擇性培養基 (Ko *et al.* 1976) 上。半選擇性培養基的製作為先配製 5% CVA [5% Clarified V-8 juice agar, 將 5% V-8 vegetable juice (Campbell Co., USA) 與 0.2% CaCO<sub>3</sub> 混合後，經 1,500 rpm 低速離心 5 min，取上層液，再加入 2% Bacto agar (Difco Co., USA)]，於滅菌後加入 ampicillin 100 ppm、PCNB (Penta-chloronitrobenzene) 10 ppm 及 mycostatin 50 ppm。經 24 h 後，即可見菌絲陸續自病組織長出。切取前端菌絲，

移殖於新配製之 5% VA (5% V-8 vegetable juice agar, 將 5% V-8 vegetable juice 與 0.02% CaCO<sub>3</sub> 混合後，加入 2% Bacto agar 後滅菌) 上。分離出之疫病菌 (表 1) 經單游孢子分離後，再移殖於 5% VA 上，在 24°C 下無光照培養 3–5 d，切取前端菌絲塊 (10 mm × 5 mm × 5 mm)，保存於 20–24°C 下含無菌水之試管中 (Boesewinkel 1976)，供下列各項試驗用。

### 供試疫病菌菌株

供試菌株之資料列於表 1，包括自香椿莖基部分離之 5 支菌株 (TARI p26269-26270 及 TARI p26319-26321) 與自食茱萸新稍、葉片及根部分離之 10 支菌株 (TARI p26232-26234、TARI p29217-29220 及 TARI p212049-52)。其他菌株包括美國加州大學 Dr. G. A. Zentmyer 早年贈送的標準菌株 *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*Phytophthora parasitica* Dastur) A<sup>1</sup> 菌株 (p991) 與 A<sup>2</sup> 菌株 (p731)。

### 菌落形態觀察

將供試菌株於室溫 (24–28°C) 下培養於含有 5% CVA 與 PDA (馬鈴薯葡萄糖瓊脂，每公升培養基中含有 200 g 煮沸過、切碎、未去皮的馬鈴薯塊莖濾液、20 g glucose、2% Bacto agar) 的培養皿 (直徑 9 cm) 中培養 4–6 d。

表 1. 台灣香椿與食茱萸疫病菌的分離情形。

**Table 1.** *Phytophthora* species isolated from diseased plants of *Cedrela sinensis* and *Zanthoxylum ailanthoides* in Taiwan.

Name of host (Scientific name)	Infected tissue	<i>Phytophthora</i> species	Isolate no. & mating type	Location	Year of isolation
Chinese mahogany ( <i>C. sinensis</i> )	Basal stem	<i>P. nicotianae</i>	TARI p26269-70 (2A <sup>1</sup> ) <sup>z</sup>	Yijhu, Chiayi	2006
Chinese mahogany ( <i>C. sinensis</i> )	Root & whole plants	<i>P. palmivora</i>	TARI p26319-21 (3A <sup>2</sup> )	Yingge, New Taipei City	2006
Alianthus prickly ash ( <i>Z. ailanthoides</i> )	Young shoot & whole plants	<i>P. nicotianae</i>	TARI p26232-34 (3A <sup>1</sup> )	Tianwei 1, Changhua	2006
Alianthus prickly ash ( <i>Z. ailanthoides</i> )	Basal stem & whole plants	<i>P. nicotianae</i>	TARI p29217-20 (4A <sup>2</sup> )	Tianwei 2, Changhua	2009
Alianthus prickly ash ( <i>Z. ailanthoides</i> )	Leaves & whole plants	<i>P. nicotianae</i>	TARI p212049-52 (4A <sup>1</sup> )	Tianwei 3, Changhua	2012

<sup>z</sup> Data in parenthesis refer to mating type.

## 疫病菌之產孢

**孢囊之產生：**將供試之香椿與食茱萸菌株先在 5% VA 上於 24°C 下培養 3 d，再移至光照定溫箱內 (1,000–2,000 lux, 24°C) 1–4 d，每日鏡檢有無孢囊 (sporangia) 長出，以明瞭供試菌株在固態培養基上是否會產生孢囊；或等菌株生長 3–5 d 時，將先端的菌絲切成 5 mm × 5 mm × 3 mm 小塊，移植於含有 20 mL 無菌水的玻璃培養皿 (直徑 6 cm, Pyrex Co., USA) 中，再經光照處理。量取孢囊大小 (size) 與進行接種試驗時，則依 Hwang *et al.* (1976) 研發的方法，讓供試菌株產生大量孢囊。孢囊長出後，在顯微鏡下觀察與測量其大小，每菌株測量 100 個孢囊。

**游走子釋放 (孢囊間接發芽)：**菌株形成大量孢囊後，每皿加入 20 mL 無菌水，於 15°C 下靜置 30 min，再放回室溫 30 min，大部分成熟之孢囊均會間接發芽釋放游走子 (zoospores)。將游走子懸浮液濃度調節成每毫升含有約  $10^4$  游走子，供接種試驗用。

## 配對型的測定與卵孢子的產生

**配對型 (mating type) 測定：**供試菌株先在新鮮 5% VA 上培養 3–5 d，將先端的菌絲部分切成 2 mm × 2 mm × 2 mm 小塊，移入含有 10 mL 新配製 10% VA 之培養皿 (直徑 6 cm, Pyrex Co., USA) 的中央，每皿放置單一菌株之菌絲塊 3–4 塊，在 24°C 無光照培養 6–10 d。爾後，在顯微鏡下鏡檢有無卵孢子 (oospores) 產生，以判斷供試菌株是否屬同絲型 (homothallic)。如果單一菌株不會形成卵孢子，再依 Ann & Ko (1988) 開發的方法將供試菌株分別與標準菌株 (*P. nicotianae*) p991 ( $A^1$ ) 和 p731 ( $A^2$ ) 對峙培養，測定供試菌株的配對型。可與  $A^1$  配對產生卵孢子者為  $A^2$  型；可與  $A^2$  配對形成卵孢子者為  $A^1$  型。

**卵孢子形成：**利用 Ko 氏發展之夾膜 (nucleopore membrane) 方法，測定供試菌株是否會產生卵孢子及所屬之 Sexuality type (Ko 1978, 1980)。

## 菌絲生長與溫度之關係

配製 5% CVA 平板，每培養皿 (直徑 9 cm) 中含有 20 mL 培養基。供試菌株先在 5% VA 培養 3–5 d，將先端的菌絲部分切成 2 mm × 2 mm × 2 mm 小塊，移入含 5% CVA 培養皿的一端 (約距邊緣 1 cm)。溫度分成 8、12、16、20、24、28、29、30、31、32、35、36°C 等 12 處理，自第 2 天開始每日測量菌絲的直線生長速率，至菌絲長滿培養皿或生長至第 10 天為止。每處理 2 皿，試驗重複一次。

## 病原性測定

**接種源與供試植物：**供試接種植物包括自市場購買之 3 個月至 1 年生左右之香椿 (青骨種) 與食茱萸幼苗。

**接種方法與病害調查：**分為全株接種、莖基部接種及根部接種等三種接種方式。(1) 全株接種：將幼苗以自來水沖洗乾淨後，再噴佈 70% 酒精，等風乾後，全株再噴佈游走子懸浮液，每株 10 mL。接種完畢後，以塑膠袋 (60 cm × 30 cm) 覆蓋植株保濕 48 h，置於溫室中 (24–28°C)。每供試菌株接種兩株幼苗，試驗重複一次。(2) 莖基部接種：將消毒棉纏繞在供試植株幼苗的莖基部，再將 1 mL 游走子懸浮液滴於莖基上部，接種植株同樣置於 24°C 植物生長箱內。每 2 d 調查植株發病情形一次，至 30 d 為止。每供試菌株接種兩株幼苗，試驗重複一次。(3) 根部接種：將 3–6 個月大的扦插幼苗根部土壤輕輕去除後洗淨，浸於含有 200 mL 游走子懸浮液的 500 mL 玻璃燒杯中。玻璃燒杯放置於冰浴中保持游走子活性。24 h 後再將幼苗種回盆鉢中，置於溫室內，觀察病害發生情形。

所有的對照處理均接種蒸餾水。接種植株發病後，並將罹病組織切下，以 0.5% NaClO 溶液表面消毒後放置於分離疫病菌之半選擇性培養基 (Hwang *et al.* 1976) 上分離病原菌，以確定香椿與食茱萸植株發病是否為接種菌株所引起，完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)。

## 核醣體內轉錄區間 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 與部分 $\beta$ -tubulin 基因的 DNA 定序

DNA 備製：供試菌株於 5% VA 生長 3–5 d，切取菌落邊緣之新鮮菌絲塊 (ca. 3 mm × 3 mm × 2 mm)，接種於覆蓋一層玻璃紙的 5% VA 培養皿的中央，在 24°C 培養 5–7 d 後，刮取玻璃紙上的菌絲，經冷凍乾燥後，保存於 -20°C 下備用。將約 20 mg 冷凍乾燥的疫病菌菌絲置於研鉢中，加入少許液態氮 (liquid nitrogen) 後磨成粉末。依照製造商的操作步驟 (the manufacturer's protocol)，利用 Genomic DNA Purification Kit (GeneMark Technology Co., Taichung, Taiwan) 抽取疫病菌的 DNA。

PCR 聚合酶連鎖反應與 DNA 定序 (sequencing)：核醣體內轉錄區間 [ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions] 的 DNA 序列，包括 ITS1 與 ITS2 非轉錄 (non-coding) 區間、5.8S rRNA 基因，及部分 18S rRNA 基因與 28S rRNA 基因序列，以供試菌株 genomic DNA 為模板 (templates)，利用通用引子對 (the universal primers) ITS5 (5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG-3') (正向) 與 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (反向) (White *et al.* 1990) 進行 PCR 反應放大。而分析  $\beta$ -tubulin 區間 (660 bp) 的部分基因序列，則利用 Villa *et al.* (2006) 開發的引子對 BT5 (5'-GTATCATGTGCACGTACTCGG-3') (正向) 與 BT6 (5'-CAAGAAAGCCTTACGACGGA-3') (反向) 進行 PCR 反應。將 PCR 反應後的 DNA 產物直接定序 (direct sequencing)，此部分則委託昕穎生物科技公司 (The Seeing Bioscience Company, Taipei, Taiwan) 進行。定序 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區域時，使用的引子對包括 ITS5、ITS4、5.8S2-1 (5'-TCGCA-CATCGATGAAGAACG-3') (正向) 及 5.8S2-2 (5'-TACGGACACTGATACAGGCAT-3') (反向)；而定序  $\beta$ -tubulin 的部分基因序列時，使用的引子對則為 BT5 與 BT6。

DNA 序列的接合 (assembly) 與 GenBank 資料庫搜尋：利用 Vector NTI 軟體 (Vector

NTI software v. 10.0, InforMax Inc., USA) 工具將上述獲得的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區間與部分  $\beta$ -tubulin 基因序列分別經由接合 (contingent) 與修剪 (trimming) 後獲得完整序列，而多型部位 (polymorphic portions) 則依照 IUPAC ambiguity codes 予以標示。定序後的疫病菌 DNA 序列則直接上載到 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 網站，利用 BLAST 軟體從 GenBank database 資料庫中尋找最相近的疫病菌 (species) 與菌株。此外，並將具代表性的疫病菌 DNA 序列登錄在 GenBank database 資料庫中。

## 疫病菌之鑑定

形態、生理特性比較：依據供試菌株之菌落形態、孢囊與卵孢子之形成條件、孢囊與卵孢子之形態與大小、厚膜孢子 (chlamydospores) 形成與否與大小、菌絲生長所需的溫度條件，再依疫病菌之分類文獻 (Waterhouse 1963, 1970; Stamp *et al.* 1990)，予以鑑定之。同時上 NCBI 網站，比對核醣體內轉錄區間 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) 與部分  $\beta$ -tubulin 基因的 DNA 序列，尋找最相近的疫病菌與菌株。

## 結果

### 罹病香椿之病徵、可疑病菌的分離及形態與生理特性之測定

2006 年嘉義縣義竹地區 3–5 年生香椿苗木出現地際部隘縮與植株嚴重枯萎腐敗現象 (圖 1A)，樹葉黃化掉落，削開地際部樹皮，可見組織褐變；從罹病莖基部共分得 2 株疫病菌 (表 1)。而新北市鶯歌地區的育苗場，一年生盆栽香椿幼苗則出現生長衰弱、葉片黃化的情形 (圖 1B)。嚴重罹病者，挖開土壤，可見根系壞疽且稀少。從罹病根系上共分得 3 株疫病菌 (表 1)。

依分離菌株的形態與生理特性的差異，可將香椿分離之 5 株疫病菌區別成兩類，其中從嘉義縣義竹分離的 2 個菌株 (p26269–70)

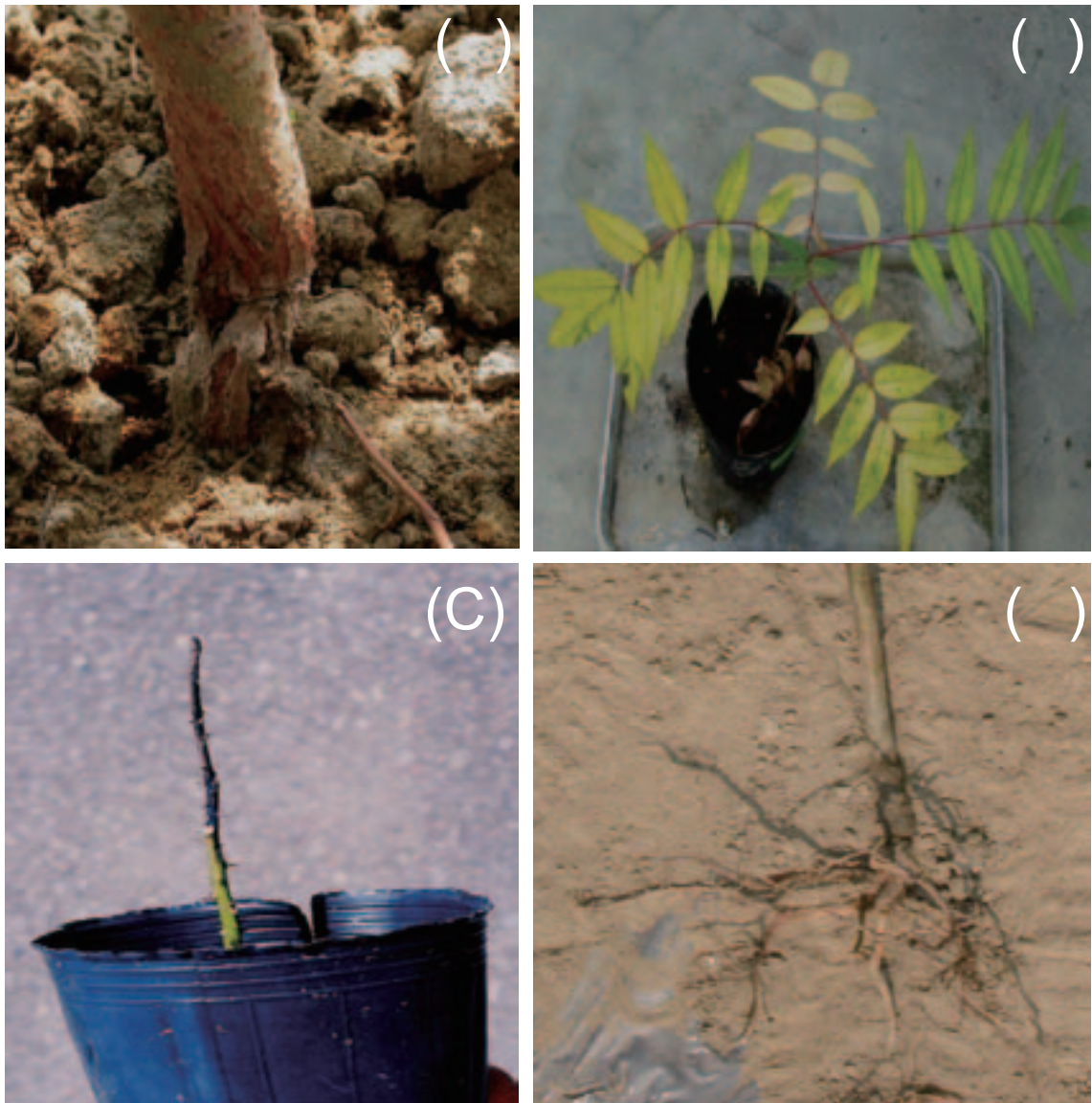


圖 1. 香椿與食茱萸罹患疫病的病徵。*Phytophthora nicotianae* 為害香椿莖基部，造成莖基部隘縮 (A)；*Phytophthora palmivora* 為害香椿根系，造成地上部葉片黃化，生長不良 (B)；*P. nicotianae* 為害食茱萸地上部葉片與新梢，造成新梢枯萎與完全落葉 (C)；及 *P. nicotianae* 為害食茱萸根系，造成嚴重根腐 (D)。

**Fig. 1.** Symptoms of *Phytophthora* diseases of *Cedrela sinensis* (A, B) and *Zanthoxylum ailanthoides* (C, D). Note *Phytophthora nicotianae* caused basal stem rot of *C. sinensis* (A) and *Phytophthora palmivora* attacked the root system of *C. sinensis*, causing leaf yellowing and drooping (B). *P. nicotianae* attacked the young shoots and leaves of *Z. ailanthoides*, causing shoot blight and leaf falling prematurely (C), and it attacked root system, causing root rot and necrosis (D).

屬一類，而從新北市鶯歌分離的 3 個菌株 (p26319–21) 屬另一類。義竹菌株於室溫下 (24–28°C) 在 5% CVA 上生長形成嵌紋狀花紋，氣生菌絲稀少 (圖 2A)。該類菌在 5% VA

上偶而會形成少數孢囊；但將新鮮菌絲塊切下置於無菌水中光照，或以礦物鹽液漂洗處理後 (Hwang *et al.* 1976)，則可形成大量孢囊。孢囊在孢囊梗上的著生方式為單假軸式

(simple sympodium)，每一孢囊梗 (sporangiophore) 可著生 3–8 個孢囊。孢囊成球形、橄欖形或檸檬形 (圖 2C、D)，兩側不對稱；孢囊具顯著半球型乳突 (papilla) (圖 2D)，有 5–10% 孢囊有 2 個乳突，偶而亦有 3 個乳突者。孢囊不具脫落性。供試菌株 p26269 的孢囊大小平均為 45-(54.0)-65  $\mu\text{m}$   $\times$  40-(43.6)-50  $\mu\text{m}$ ，孢囊長寬比平均為 1.1-(1.24)-1.38 (表 2)。該類菌可產生厚膜孢子，孢子大小 25-(37.0)-50  $\mu\text{m}$ 。該類菌株在單獨培養時不形成卵孢子，但與 *P. nicotianae* A<sup>2</sup> 菌株 P731 對峙培養後會產生卵孢子，因此均為 A<sup>1</sup> 配對型。當利用夾膜法 (Ko 1978)，將義竹菌株與 A<sup>2</sup> 配對型之標準菌株對峙培養後，被測試菌株均會自己

產生卵孢子 (selfing oospores)。因此供試菌株屬 sexuality type S<sup>1</sup> (可刺激 A<sup>2</sup> 菌株，及被 A<sup>2</sup> 菌株刺激以形成卵孢子) (Ko 1980)。義竹菌株的藏卵器 (oogonia) 表面平滑，卵孢子為非充實性，藏精器 (antheridia) 單生單室底著，供試菌株 p26269 的藏卵器大小為 22.5-(27.0)-30  $\mu\text{m}$ ；卵孢子大小為 20-(23.2)-27.5  $\mu\text{m}$ ；藏精器大小為 10-(11.63)-15  $\mu\text{m}$   $\times$  11.3-(13.1)-15  $\mu\text{m}$  (圖 2E) (表 3)。菌絲可在 8–36°C 生長，最適生長溫度為 28°C (圖 3)。

從鶯歌分離的 3 株疫病菌在 5% CVA 上菌落形態略具放射狀，在 PDA 上則呈現不明顯花紋，有少許氣生菌絲 (圖 2B)。該類菌在 5% VA 上會形成孢囊，與義竹菌株相比，產

表 2. 台灣香椿與食茱萸疫病菌的孢囊與厚膜孢子大小。

Table 2. Size of sporangia and chlamydospores of the *Phytophthora* isolates from *Cedrela sinensis* and *Zanthoxylum ailanthoides* in Taiwan.

<i>Phytophthora</i> species & isolate	Host	Sporangia		Pedicel ( $\mu\text{m}$ )	Chlamydospore ( $\mu\text{m}$ )
		Length $\times$ Width ( $\mu\text{m}$ )	Length/Width (ratio)		
<i>P. nicotianae</i> , p26269	<i>C. sinensis</i>	45-(54.0) <sup>z</sup> -65 $\times$ 40-(43.6)-50	1.1-(1.24)-1.38	No <sup>y</sup>	25-(37.0)-50
<i>P. palmivora</i> , p26320	<i>C. sinensis</i>	50-(59.4)-70 $\times$ 30-(35.2)-40	1.5-(1.63)-1.86	0.5-(1.2)-3.5	30-(40.0)-50
<i>P. nicotianae</i> , p26232	<i>Z. ailanthoides</i>	40-(47.0)-55 $\times$ 35-(38.3)-45	1.13-(1.23)-1.43	No	30-(38.5)-50
<i>P. nicotianae</i> , p29217	<i>Z. ailanthoides</i>	42.5-(51.8)-60 $\times$ 35-(39.3)-45	1.21-(1.31)-1.5	No	32.5-(41.0)-50

<sup>z</sup> Data in parenthesis refer to means.

<sup>y</sup> No: sporangia are non-deciduous.

表 3. 台灣香椿與食茱萸疫病菌的有性世代器官的大小。

Table 3. Size of sexual organs of the *Phytophthora* isolates obtained from *Cedrela sinensis* and *Zanthoxylum ailanthoides* in Taiwan.

<i>Phytophthora</i> species & isolate	Host	Diameter ( $\mu\text{m}$ )		Antheridia
		Oogonia	Oospore	Length $\times$ Width ( $\mu\text{m}$ )
<i>P. nicotianae</i> , p26269	<i>C. sinensis</i>	22.5-(27.0) <sup>z</sup> -30	20-(23.2)-27.5	10-(11.6)-15 $\times$ 11.3-(13.1)-15
<i>P. palmivora</i> , p26320	<i>C. sinensis</i>	25-(28.8)-32.5	22.5-(24.3)-27.5	10-(15.3)-20 $\times$ 12.5-(13.5)-17.5
<i>P. nicotianae</i> , p26232	<i>Z. ailanthoides</i>	22.5-(28.3)-33	18.8-(24.3)-28.8	7.3-(11.3)-15 $\times$ 11.3-(13.8)-15
<i>P. nicotianae</i> , p29217	<i>Z. ailanthoides</i>	23.8-(29.5)-35	21.3-(25.5)-30	6.3-(9.8)-15 $\times$ 10-(13.8)-17.5

<sup>z</sup> Data in parenthesis refer to means.

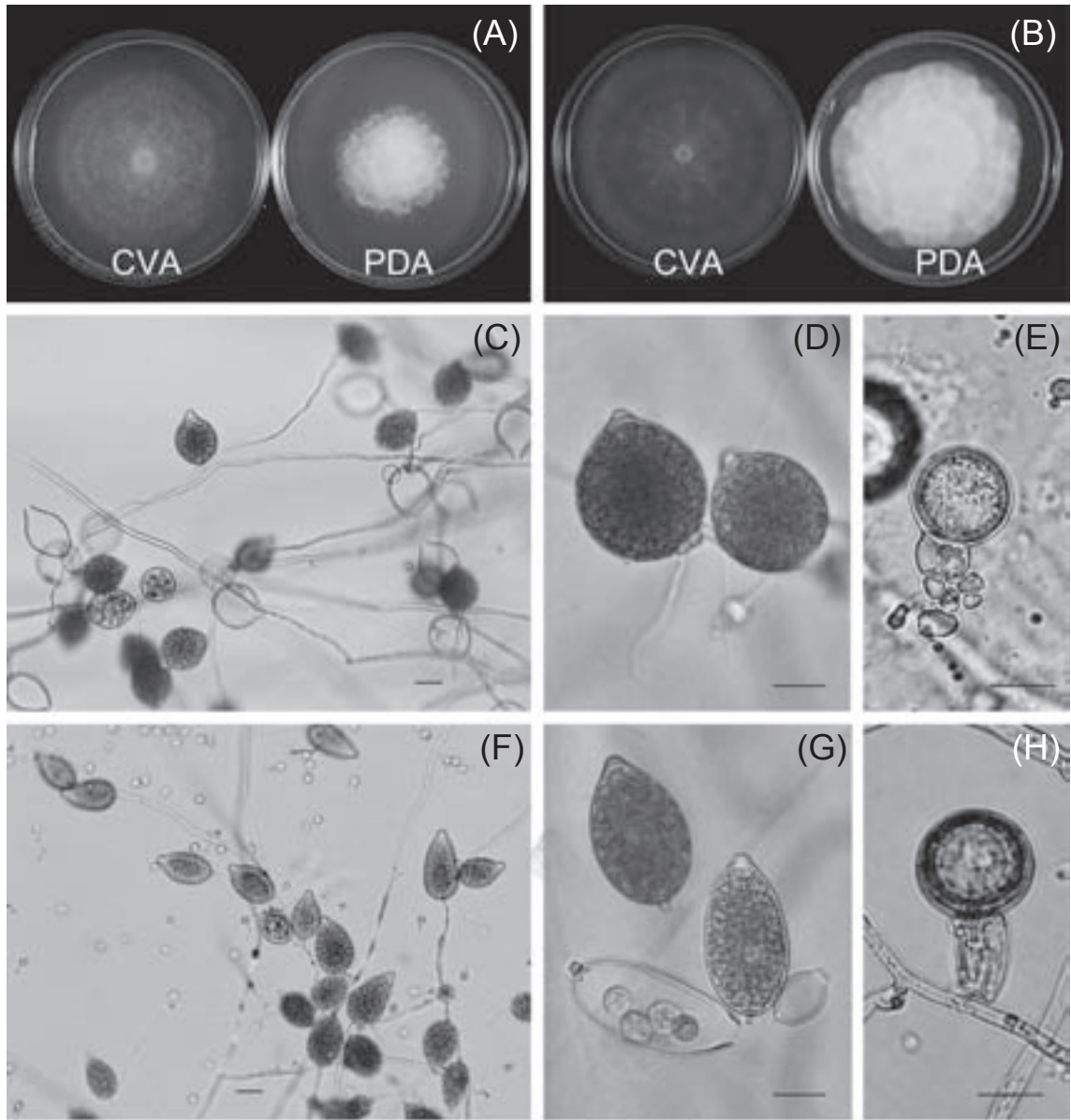


圖 2. 為害香椿的疫病菌 *Phytophthora nicotianae* p26269 (A、C、D、E) 與 *Phytophthora palmivora* p26320 (B、F、G、H) 之形態特性。在 24°C 下生長 5 d 的菌落形態 (A、B)；孢囊 (C、F)、孢囊近照 (D、G) 及卵孢子、藏卵器及藏精器 (E、H)。

**Fig. 2.** *Phytophthora nicotianae* isolate p26269 (A, C, D, E) and *Phytophthora palmivora* isolate p26320 (B, F, G, H) from infected *Cedrela sinensis*. Colony morphology of *P. nicotianae* on CVA (A, left dish) and PDA (A, right dish) and *P. palmivora* on CVA (B, left dish) and PDA (B, right dish). Cultures were incubated at 24°C for 5 d. Note morphology of sporangia (C, D) and oospore (E) of *P. nicotianae* and sporangia (F, G) and oospore (H) of *P. palmivora*. Bar = 20 μm.

孢相對較多；但菌絲塊在無菌水中光照時或以礦物鹽液漂洗處理後 (Hwang *et al.* 1976)，則可形成更大量孢囊。孢囊著生為單假軸式，

每一孢囊梗可著生 5–12 個孢囊 (圖 2F)。孢囊為橢圓形、橄欖形或檸檬形，兩側大致對稱 (圖 2G)；孢囊亦具顯著的半球型乳突 (圖

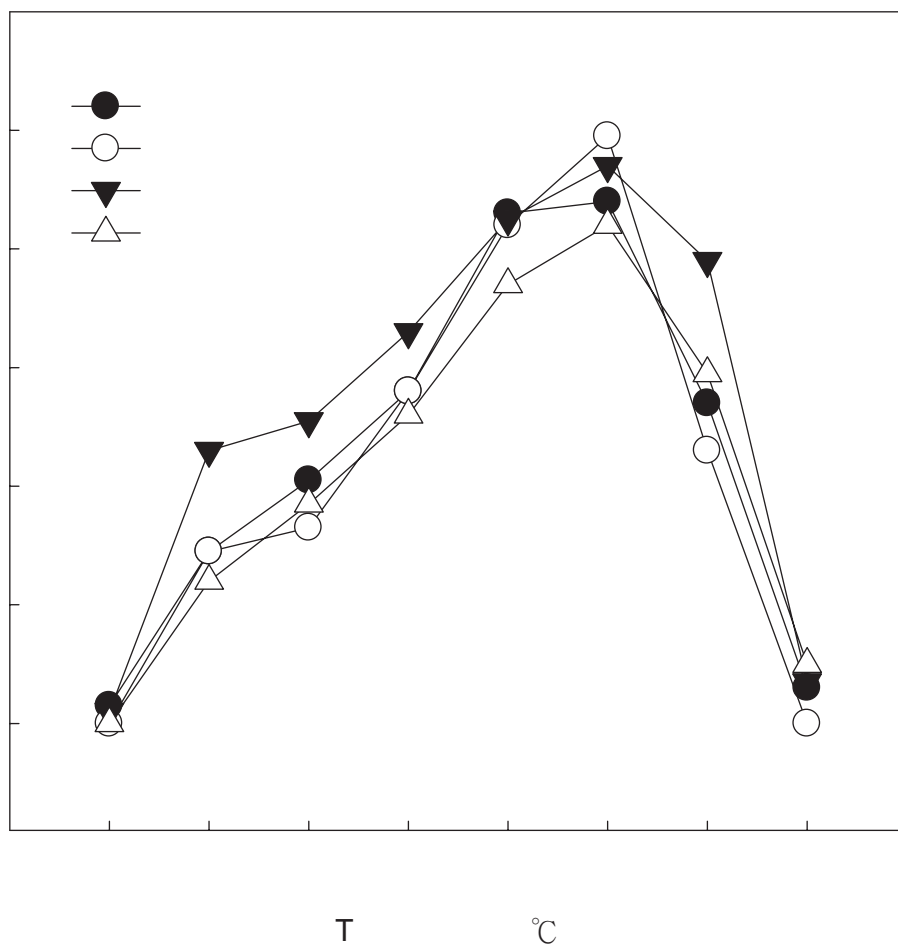


圖 3. 香椿與食茱萸疫病菌菌絲在不同溫度下之直線生長情形。供試疫病菌：香椿菌株 *Phytophthora nicotianae* p26269 與 *Phytophthora palmivora* p26320；食茱萸菌株：*P. nicotianae* p26232 (A<sup>1</sup>) 與 p29217 (A<sup>2</sup>)。

Fig. 3. Effect of temperature on mycelial growth of *Phytophthora nicotianae* p26269 and *P. palmivora* p26320 from *Cedrela sinensis* and *P. nicotianae* p26232 (A<sup>1</sup>) and p29217 (A<sup>2</sup>) from *Zanthoxylum ailanthoides*. Cultures were grown on 5% cleared V-8 juice agar in Petri dishes for 5–10 d.

2G)。孢囊脫落性，脫落率 100%，脫落的孢囊具甚短的孢囊柄 (pedicels)，長度 0.5-(1.2)-3.5  $\mu\text{m}$ 。供試菌株 p26320 的孢囊大小為 50-(59.4)-70  $\mu\text{m} \times$  30-(35.2)-40  $\mu\text{m}$ ，孢囊長寬比平均為 1.5-(1.63)-1.86 (表 2)。鶯歌菌株可產生厚膜孢子，孢子大小 30-(40.0)-50  $\mu\text{m}$ 。鶯歌菌株在單獨培養時亦不形成卵孢子，但與 *P. nicotianae* A<sup>1</sup> 菌株 P991 對峙培養後會產生卵孢子，因此均為 A<sup>2</sup> 配對型。當利用夾膜法 (Ko 1978)，將義竹菌株與 A<sup>1</sup> 配對型之標準菌

株對峙培養後，測試菌株均會產生卵孢子。因此供試菌株 p26320 屬 sexuality type S<sup>4</sup> (可刺激 A<sup>1</sup> 菌株，及被 A<sup>1</sup> 菌株刺激以形成卵孢子) (Ko 1980)。鶯歌菌株 p26320 的藏卵器表面平滑，卵孢子為非充實性，藏精器單生單室底著，供試菌株 p26320 的藏卵器大小為 25-(28.8)-32.5  $\mu\text{m}$ ；卵孢子大小為 22.5-(24.3)-27.5  $\mu\text{m}$ ；藏精器大小為 10-(15.3)-20  $\mu\text{m} \times$  12.5-(13.5)-17.5  $\mu\text{m}$  (圖 2H) (表 3)。菌絲可在 12–35°C 生長，最適生長溫度為 28°C (圖 3)。

## 罹病食茱萸之病徵、可疑病菌的分離及形態特性之測定

在彰化縣田尾分別於 2006、2009 及 2012 年在 3 處不同的苗圃觀察到食茱萸罹病情形，罹病部位包括根、莖及葉片，葉片初現淡褐色水浸狀圓形斑點，病斑面積迅速擴大轉為暗褐色，並提早落葉；莖部包括新梢、主莖及莖基部均可被感染，初現褐色病斑，而後擴大環繞莖部，造成頂芽與染病處以上部位枯死 (圖 1C)；莖基部染病後，基部隘縮，繼而全株枯萎死亡；環境潮濕時，罹病部位會長出白色霉狀物；根部染病時，根系壞疽且稀少 (圖 1D)，嚴重時地上部矮化黃葉，甚而全株死亡。自罹病組織共分離到 11 株疫病菌，包括 p26232-34、p29217-20 及 p212049-52 (表 1)。

所有自食茱萸分離的疫病菌均為同一類型，其形態與生理特性與嘉義縣義竹香椿上分離的疫病菌相似。所有菌株於室溫下在 5% CVA 上生長形成之菌落均具有嵌紋狀花紋，氣生菌絲非常稀少。在 5% VA 上會形成少數孢囊，但菌絲塊在水中或經礦物鹽液漂洗後 (Hwang *et al.* 1976) 可形成大量孢囊。孢囊單假軸式著生，形態球形、橄欖形或檸檬形，兩側不對稱；孢囊具顯著半球型乳突，部分孢囊有 2 個乳突，偶而亦有 3 個乳突者。孢囊不具脫落性。供試菌株 p26232 的孢囊大小為 40-(47.0)-55  $\mu\text{m}$   $\times$  35-(38.3)-45  $\mu\text{m}$ ，孢囊長寬比為 1.13-(1.23)-1.43 (表 2)。該類菌可產生厚膜孢子，孢子大小 30-(38.5)-50  $\mu\text{m}$  (表 2)。食茱萸菌株在單獨培養時不形成卵孢子，但有 7 菌株與 *P. nicotianae* A<sup>2</sup> 菌株 P731 對峙培養後會產生卵孢子，為 A<sup>1</sup> 配對型；而有 4 菌株與 P991 (A<sup>1</sup> 菌株) 配對時會形成卵孢子，為 A<sup>2</sup> 配對型。當利用夾膜法 (Ko 1978)，將 A<sup>1</sup> 菌株 p26232 與 A<sup>2</sup> 配對型之標準菌株對峙培養，或 A<sup>2</sup> 菌株 p29217 與 A<sup>1</sup> 配對型之標準菌株配對後，測試菌株均會自己產生卵孢子。因此供試菌株 p26232 (A<sup>1</sup>) 屬 sexuality type S<sup>1</sup> (可刺激 A<sup>2</sup> 菌株，及被 A<sup>2</sup> 菌株刺激以形成卵孢子)，而供試菌株 p29217 (A<sup>2</sup>) 屬 sexuality

type S<sup>4</sup> (可刺激 A<sup>1</sup> 菌株，及被 A<sup>1</sup> 菌株刺激以形成卵孢子) (Ko 1980)。所有供試菌株產生的藏卵器表面平滑，卵孢子為非充實性，藏精器單生單室底著，供試菌株 p26232 (A<sup>1</sup>) 與 p29217 (A<sup>2</sup>) 的藏卵器大小分別為 22.5-(28.3)-33  $\mu\text{m}$  (A<sup>1</sup>) 與 23.8-(29.5)-35  $\mu\text{m}$  (A<sup>2</sup>)；卵孢子大小分別為 18.8-(24.3)-28.8  $\mu\text{m}$  (A<sup>1</sup>) 與 21.3-(25.5)-30.0  $\mu\text{m}$  (A<sup>2</sup>)；藏精器大小分別為 7.3-(11.3)-15  $\mu\text{m}$   $\times$  11.3-(13.8)-15.0  $\mu\text{m}$  (A<sup>1</sup>) 與 6.3-(9.8)-15.0  $\mu\text{m}$   $\times$  10.0-(13.8)-17.5  $\mu\text{m}$  (A<sup>2</sup>) (表 3)。菌絲可在 8–36°C 生長，最適生長溫度為 28°C (圖 3)。

## 疫病菌之病原性測定

將自義竹香椿分離到的供試疫病菌菌株 p26269 的游走子懸浮液 (每 mL 約含 10<sup>4</sup> zoospores) 接種於一年生香椿幼苗莖基部時，約 10–14 d 後植株開始出現萎凋病徵，接種處的組織褐變隘縮，與田間出現的病徵相同；而鶯歌菌株 p26320 接種於根系時，約 20–30 d 後可以造成植株萎凋與葉片黃化掉落，亦與田間病徵相同。相同的疫病菌可自發病的莖基部與根系分離得到，而對照處理於試驗期間並無腐敗情形發生，證實香椿苗木病害係因感染該兩種疫病菌所致。此外，以噴霧法接種游走子懸浮液於香椿幼苗時，兩種疫病菌均可造成葉片與莖部出現褐色斑點，罹病葉片在 3–5 d 內黃化後掉落。

將自食茱萸分離的到的疫病菌菌株 p26232 與 p29217 以噴霧接種法接種於一年生食茱萸幼苗後，約 2 d 後葉片與莖部開始出現病斑，與田間出現之病徵完全相同。當接種於莖基部時，約 7–10 d 後莖基部開始褐變與隘縮，10–14 d 後植株開始黃化落葉，20–30 d 後全株死亡。無論 A<sup>1</sup> 或 A<sup>2</sup> 菌株均可誘發病害。將接種後發病之病斑切下消毒後，可以分離獲得相同的接種病菌，證實食茱萸苗木病害係因罹患疫病所致。

此外，自香椿分離的疫病菌菌株 p26269 可以感染食茱萸，而為害食茱萸的疫病菌 p26232 亦可為害香椿，造成葉片枯萎與植株死亡 (資料未顯示)。

## 引起香椿與食茱萸 *Phytophthora* 之傳統鑑定

經比對 Waterhouse (1963, 1970)、Stamp *et al.* (1990) 的分類文獻，由菌落形態，孢囊著生方式與形態，及孢囊脫落性等特徵，顯示自香椿分離的義竹疫病菌 p26269-70 屬於 group II，鑑定為 *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan；自新北市鶯歌分離的香椿疫病菌 p26319-21 亦屬於 group II，鑑定為 *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler。而自食茱萸分離得到的所有 14 株疫病菌均為 *P. nicotianae*。

## 核糖體內轉錄區間 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 與部分 $\beta$ -tubulin 基因的 DNA 定序

從台灣香椿與食茱萸分離得到的 4 個代表性的疫病菌菌株 [香椿菌株 *P. nicotianae* p26269 (A<sup>1</sup>) 與 *P. palmivora* p26320 (A<sup>2</sup>)，及食茱萸菌株 *P. nicotianae* p26232 (A<sup>1</sup>) 與 p29217 (A<sup>2</sup>)] 進行 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (簡稱 ITS) 與部

分  $\beta$ -tubulin 基因的 DNA 序列定序與分析。結果這 4 個疫病菌的 ITS 全長 DNA 序列分別為 803 bp、786 bp、803 bp 及 803 bp (表 4)，其中 p26269、p26232 及 p29217 三菌株依傳統分類鑑定為 *P. nicotianae* 的 ITS 序列完全相同。此外，將不相同的基因序列均上傳到 NCBI 網站，利用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 搜尋軟體與 GenBank 資訊庫收錄的 DNA 序列進行比對，所獲得最接近序列的登錄號列於表 4 中。結果顯示，其中 p26269 (A<sup>1</sup>)、p26232 (A<sup>1</sup>) 及 p29217 (A<sup>2</sup>) 最相近的菌種為 *P. nicotianae*，相似度達 100%；而 p26320 (A<sup>2</sup>) 最相近的菌則為 *P. palmivora*，相似度亦達 100%。而利用 BT5 與 BT6 這一組引子對分析 4 個疫病菌菌株的部分  $\beta$ -tubulin 基因序列長度均為 660 bp (表 4)。BLAST 搜尋結果顯示，供試菌株無論是 *P. nicotianae* 或 *P. palmivora* 均與 GenBank 資訊庫中收錄最接近疫病菌菌株的部分  $\beta$ -tubulin 基因的 DNA 序列相近度 (identities) 分別高達

表 4. 台灣香椿與食茱萸疫病菌 ITS1-5.8 S rDNA-ITS2 區間與部分  $\beta$ -tubulin 基因之 DNA 序列在 GenBank 登錄與資訊庫搜尋比對情形。

**Table 4.** The GenBank accession number and BLAST searching results of nucleotide sequence of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (ITS) region and partial  $\beta$ -tubulin gene of *Phytophthora* isolates from *Cedrela sinensis* and *Zanthoxylum ailanthoides* in Taiwan <sup>z</sup>.

<i>Phytophthora</i> species, isolate & host	DNA sequence	Length (bp)	GenBank accession no.	BLAST searching <sup>y</sup>	
				GenBank best hits (accession no. and species)	Identity (%) (identical bp no./ total bp no.)
<i>P. nicotianae</i> , p26269, <i>C. sinensis</i>	ITS	803	JX465721	JF79254.1, <i>P. nicotianae</i>	100 (803/803)
<i>P. palmivora</i> , p26320, <i>C. sinensis</i>	ITS	786	Gu111655.1	HE580280.1, <i>P. palmivora</i>	100 (786/786)
<i>P. nicotianae</i> , p26232, <i>Z. ailanthoides</i>	ITS	803	Identical to p26269		
<i>P. nicotianae</i> , p29217, <i>Z. ailanthoides</i>	ITS	803	Identical to p26269		
<i>P. nicotianae</i> , p26269, <i>C. sinensis</i>	Partial $\beta$ -tubulin	660	JX465719	GU931703.1, <i>P. nicotianae</i>	100 (660/660)
<i>P. palmivora</i> , p26320, <i>C. sinensis</i>	Partial $\beta$ -tubulin	660	JX465720	EU080465, <i>P. palmivora</i>	98.94-99.85 (653-659/660)

<sup>z</sup> The sequences of the partial  $\beta$ -tubulin gene of *Phytophthora* were amplified by the forward primer BT5 and the reverse primer BT6 developed by Villa *et al.* (2006).

<sup>y</sup> The sequences were uploaded directly to NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and compared with sequences in GenBank databases using BLAST software.

100% 與 98.94% 以上 (表 4)。其中 p26269 (A<sup>1</sup>) 最相近的菌為 *P. nicotianae*；而 p26320 (A<sup>2</sup>) 最相近的菌則為 *P. palmivora*。此外，將不同 ITS 與部分  $\beta$ -tubulin 基因序列的資訊登錄於 GenBank 資料庫中，並將登錄號列於表四中。本試驗結果顯示 *P. nicotianae* 與 *P. palmivora* 基因序列的比對結果支持形態鑑定的可信度。

## 討論

搜尋國內外文獻，並無疫病菌為害香椿或食茱萸的記錄，本文為首度正式報告香椿與食茱萸罹患疫病，其中 *P. nicotianae* (*P. parasitica*) 與 *P. palmivora* 為害香椿，而 *P. nicotianae* 為害食茱萸。在國際間，*P. nicotianae* 與 *P. palmivora* 為非常重要的疫病菌 (Erwin & Ribeiro 1996)，依據 “Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory” (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm>) 記錄，前者的寄主植物目前有 890 種之多，而後者亦涵括 374 種植物。在台灣，*P. nicotianae* 與 *P. palmivora* 為最常見的兩種疫病菌 (Ho *et al.* 1995)，依據作者的分離與目前統計資料，*P. nicotianae* 的寄主範圍包括 93 屬 (genus) 113 種 (species) 植物 (Ann unpublished data)，它主要為害果樹 (柑橘、鳳梨、百香果、落神葵)、蔬菜 (洋蔥、青蔥、茄子果實) 及花卉 (日日春、蘭花、百合、康乃馨、滿天星、椒草、口紅花、白鶴芋及多種草花) (Ho *et al.* 1995; Tsu *et al.* 2002; Ann unpublished data)；而 *P. palmivora* 為害 33 屬 46 種植物 (Ann unpublished data)，主要的寄主包括果樹 (柑橘、木瓜) 與花卉 (蘭花、常春藤、馬拉巴栗) (Ho *et al.* 1995; Tsu *et al.* 2002; Ann unpublished data)，對作物的經濟為害非常大。

比較 *P. nicotianae* 與 *P. palmivora* 兩種疫病菌的形態與生理特性，顯示兩者相似與重疊之處甚多，區別不易。兩種疫病菌均屬 Waterhouse (1963) 分類系統中之 group II [包括 Stamp *et al.* (1990) 之分類系統]，兩者的

孢囊均具有半球形的明顯乳突，均會形成厚膜孢子；兩者如果形成有性世代，藏精器均為單生單室底著，且藏卵器、卵孢子及藏精器的大小亦相近，單以有性世代器官無法區分該兩菌。此外，兩者均屬於高溫菌，*P. nicotianae* 的菌絲生長溫度的最低、最高與最適值分別為 8–12°C、36–37°C 與 28–32°C；而 *P. palmivora* 則為 8–12°C、35°C 與 28–32°C，兩者之重疊性非常高。但該兩菌亦有相異之處，可用於種間 (interspecies) 的區別，主要差別則為：(1) 孢囊的脫落性：典型 (typical) *P. palmivora* 的孢囊脫落性為 100%，脫落的孢囊具有極短的孢囊梗，長度在 5  $\mu\text{m}$  以下，鶯歌香椿疫病菌的孢囊具脫落性；而典型 *P. nicotianae* 的孢囊甚少脫落或完全不脫落，義竹香椿疫病菌與食茱萸疫病菌的孢囊不具脫落性。因而，本試驗分離的兩種疫病菌可以該特徵予以區別。(2) 孢囊長寬比值 (L/B)：典型 *P. palmivora* 的孢囊橢圓形，兩側對稱，孢囊為較狹長，L/B 值大於 1.4，鶯歌香椿疫病菌的 L/B 平均值為 1.63；而典型 *P. nicotianae* 的孢囊近似球形，兩側不對稱，孢囊較寬，L/B 值小於 1.4，一般為 1.2–1.3，義竹香椿與食茱萸疫病菌的 L/B 平均值為 1.23–1.31，兩者亦容易區別。但該特性有時亦有重疊的情形發生，不能單憑該特性來區分該兩種疫病菌。(3) 菌落形態：兩種疫病菌之菌落形態亦有明顯差異，典型 *P. nicotianae* 培養在 5% CVA 上時，其形成之菌落均具有嵌紋狀花紋 (mosaic pattern)，而 *P. palmivora* 或其他疫病菌則無此種特性。比較自台灣分離的香椿疫病菌或食茱萸疫病菌，均為典型的 *P. nicotianae* 與 *P. palmivora*，因此可藉由上述三種特性予以區分。

疫病菌的分類鑑定，原以傳統的形態特性為主要分種的依據 (Waterhouse 1963, 1970; Stamp *et al.* 1990)，但近年來開發的分子生物特性亦為經常用於分類鑑定的輔助依據，更由於 DNA 基因定序技術的突飛猛進，疫病菌的有效種已由 Erwin & Ribeiro (1996) 時代的 64 種 (species) 增加到目前的 100 餘種

(Hansen *et al.* 2012)，而且新種仍在不斷增加中。在 *Phytophthora* 的分子分類上，Cooke & Duncan (1997) 發現核醣體內轉錄區間的非轉錄區域 (non-coding internal transcribed spacer regions) ITS1 與 ITS2 在種內 (intra-species) 具有相當的保守性 (conserved)，而在大部分種間 (inter-species) 具有相對較高的變異性，因此可以用於分種依據的參考。而 Cooke *et al.* (2000) 也認為分析 ITS 區間的 DNA 序列為研究疫病菌種間差異的有效工具之一。此外在疫病菌分子分類分析上， $\beta$ -微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin) 的基因序列亦具有相當的保守性，因此利用引子對 BT5 與 BT6 來放大  $\beta$ -微管蛋白的部分基因序列，亦可用於腐霉菌 (*Pythium*) 與 *Phytophthora* 屬間與種間的親緣關係 (phylogenetic relationships) 分析 (Villa *et al.* 2006)。目前，NCBI 網站的 GenBank 資料庫 (database) 已經收錄相當豐富的疫病菌分子生物資料，尤其是 ITS 區域可以有效的協助部分疫病菌的分類鑑定。在本試驗中，從香椿與食茱萸分離的 *P. nicotianae* 與 *P. palmivora* 無論在傳統的形態特性分類上，或利用 ITS 區域與部分  $\beta$ -tubulin 基因 DNA 序列的分子生物特性上，兩者的分類結果均非常一致。而且吾人試驗菌株的 DNA 序列 (包括 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區域或是部分  $\beta$ -tubulin 基因) (表 4) 與 GenBank 資料庫中搜尋的最靠近疫病菌株的 DNA 序列的近似度 (identities) 均達到 98.9–100%。本試驗結果顯示，ITS 區域與部分  $\beta$ -tubulin 基因的 DNA 序列可以有效的輔助鑑定 *P. nicotianae* 與 *P. palmivora* 兩種疫病菌。

## 誌謝

本文承蒙行政院農業委員會科技計畫 [95 農科 -13.2.1- 農 -C5(1)] 補助試驗經費及黃鴻章教授修正英文，謹此誌謝。

## 引用文獻

Ann, P. J. and W. H. Ko. 1988. Hormonal heterothallism in *Phytophthora parasitica*: a novel mode of sexu-

- al reproduction? *J. Gen. Microbiol.* 134:2985–2992.
- Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66:183–185.
- Cooke, D. E. L., A. Drenth, J. M. Duncan, G. Wagels, and C. M. Brasier. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Gen. Biol.* 30:17–32.
- Cooke, D. E. L. and J. M. Duncan. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA repeat. *Mycol. Res.* 101:667–677.
- Erwin, D. and O. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. Minnesota. 562 pp.
- Hansen, E. M., P. W. Reeser, and W. Sutton. 2012. *Phytophthora* beyond agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:359–378.
- Ho, H. H., P. J. Ann, and H. S. Chang. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. *Acad. Sin. Mon. Ser.* 15. Taipei. 86 pp.
- Hwang, S. C., W. H. Ko, and M. Aragaki. 1976. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 68:1233–1234.
- Ko, W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *J. Gen. Microbiol.* 107:15–18.
- Ko, W. H. 1980. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. *J. Gen. Microbiol.* 116:459–461.
- Ko, W. H., H. S. Chang, and H. J. Su. 1976. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72:353–358.
- Stamp, D. J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook, and G. S. Hall. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. *Mycol. Pap.* 162. CAB Int. Mycol. Ins. Kew. 28 pp.
- Su, P. D. 2005. Special crops: Chinese mahogany. p.91. *in: Taiwan Agricultural Encyclopedia: Crop Edition 1. 3rd ed.* (Wong, C. I. and J. Chu, eds.) Council of Agriculture, Executive Yuan, R.O.C. Pub. Taipei. 582 pp. (in Chinese)
- Tsu, S. T., T. C. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub. Taichung. 386 pp. (in Chinese)
- Villa, N. O., K. Kageyama, T. Asano, and H. Suga. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ -tubulin gene sequences. *Mycologia* 98:410–422.

- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 92. CMI. Kew. 25 pp.
- Waterhouse, G. M. 1970. The Genus *Phytophthora* de Bary: Diagnoses (or Descriptions) and Figures from the Original Papers. Mycol. Pap. 122. CMI. Kew. 59 pp.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Snirsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego. 482 pp.

## Phytophthora Diseases of *Cedrela sinensis* and *Zanthoxylum ailanthoides*

Pao-Jen Ann<sup>1,3</sup>, Jyh-Nong Tsai<sup>2</sup>, and Ien-Tien Wang<sup>3</sup>

### Abstract

Ann, P. J., J. N. Tsai, and I. T. Wang. 2013. Phytophthora Diseases of *Cedrela sinensis* and *Zanthoxylum ailanthoides*. *J. Taiwan Agric. Res.* 62(1):57–70.

Serious Phytophthora diseases of *Cedrela sinensis* and *Zanthoxylum ailanthoides* were found in the fields in Taiwan during the investigation of diseases of medicinal herb plants from 2006 to 2012. Diseased plants of *C. sinensis* showed symptoms of browning on basal stems which were shrunken within a few days, and the plants were droopy. Severely infected plants were leaf yellowing, stunted and killed due to root rotting. Diseased plants of *Z. ailanthoides* showed symptoms of water-soaked lesions on leaves, buds and stems, which enlarged in size and turned dark brown quickly. Eventually, the infected leaves turned yellow and fell prematurely, and the buds and stems rotted and collapsed. Diseased plants also showed symptoms of basal stem rot and root rot. Two species of *Phytophthora*, including *P. nicotianae* (*P. parasitica*) (2 A<sup>1</sup> isolates) and *P. palmivora* (3 A<sup>2</sup> isolates) were isolated from *C. sinensis* and one species of *Phytophthora* (*P. nicotianae*, 7 A<sup>1</sup> and 4 A<sup>2</sup> isolates) was isolated from *Z. ailanthoides*. Results of pathogenicity tests by artificial inoculations showed that both *P. nicotianae* and *P. palmivora* were the pathogens of *C. sinensis* and *P. nicotianae* was the pathogen of *Z. ailanthoides*, with disease symptoms identical to the diseased plants observed in the fields. Each *Phytophthora* isolate was re-isolated from the infected tissues of the inoculated plants. All the isolates of *Phytophthora* obtained from *C. sinensis* and *Z. ailanthoides* belonged to the typical types of *P. nicotianae* or *P. palmivora*. The range of temperature for mycelial growth of *P. nicotianae* isolates were 8–36°C with optimal temperature at 28°C, while the range for *P. palmivora* was 12–35°C with optimal temperature at 28°C. Sporangia of *P. nicotianae* isolates were spherical or sub-spherical, unsymmetrical, with semi-spherical papilla, and non-deciduous, whereas sporangia of *P. palmivora* were spherical, ovoid or elliptical, symmetrical, with semi-spherical papilla, and deciduous with very short pedicels (< 5 µm). Both *Phytophthora* species produced chlamydospores on agar media. DNA sequences of the internal transcribed spacers (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) region and the partial  $\beta$ -tubulin gene also support the morphological classification of *P. nicotianae* and *P. palmivora*. This is the first record of Phytophthora diseases of *C. sinensis* caused by *P. nicotianae* and *P. palmivora* and *Z. ailanthoides* caused by *P. nicotianae* in Taiwan and in the world.

**Key words:** *Cedrela sinensis*, *Zanthoxylum ailanthoides*, Phytophthora diseases, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora palmivora*.

---

Received: November 9, 2012; Accepted: January 3, 2013.

\* Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.