

柑橘褐斑病之病原特性及防治藥劑篩選

黃巧雯¹ 吳昭蓉² 楊宏仁³ 賴素玉⁴ 倪蕙芳^{5,*}

摘要

黃巧雯、吳昭蓉、楊宏仁、賴素玉、倪蕙芳。2018。柑橘褐斑病之病原特性及防治藥劑篩選。台灣農業研究 67(4):387-400。

柑橘褐斑病在 2012-2013 年間於台灣之「茂谷柑」、「佛利蒙柑」及「帝王柑」等柑橘園區之春梢期陸續發生。本研究除針對該病原菌進行生理特性調查外，亦對不同柑橘品種之病原性及其防治藥劑進行篩選評估。柑橘褐斑病菌分離株 (*Alternaria alternata* Alt-001) 可在「茂谷柑」、「明尼橘柚」、「桶柑」、「佛利蒙柑」、「晚崙西亞」、「豔陽柑」及「台農天王柑」等柑橘品種之離葉嫩葉傷口接種時，造成褐色病斑，但在粗皮檸檬之嫩葉上則不造成病斑。本病原最適菌絲生長溫度為 25°C，而 25-30°C 為孢子發芽最適溫度。測試殺菌劑對其菌絲生長及孢子發芽影響時，結果顯示快得寧在 10 mg a.i. L⁻¹ 有效濃度下可有效抑制菌絲生長，抑制率達 99.2%；而快得寧、氫氧化銅、鋅錳乃浦及扶吉胺等 4 種藥劑可顯著降低病原菌之孢子發芽，其中植株噴布快得寧、氫氧化銅及鋅錳乃浦藥劑處理 21 d 後，*A. alternata* Alt-001 分離株在其葉片上之孢子發芽率仍顯著低於噴布水之對照組。快得寧、氫氧化銅、鋅錳乃浦及扶吉胺為目前官方推薦柑橘真菌性病害之防治藥劑，從藥效評估結果，上述藥劑可一併作為防治柑橘褐斑病之用藥。

關鍵詞：柑橘、柑橘褐斑病、柑橘褐斑病菌、藥劑篩選。

前言

柑橘 (*Citrus reticulata*) 為芸香科 (Rutaceae) 柑橘屬 (*Citrus* L.) 多年生果樹，原產於中國，種類繁多、型態特性各異，可適應不同地區的氣候，為台灣重要果樹產業之一。目前栽培品種極多，包括「椪柑」、「柳橙」、「桶柑」、「文旦柚」、「白柚」、「檸檬」、「葡萄柚」、「金柑」、「茂谷柑」、「萊姆」、「明尼桔柚」、「晚崙西亞橙」、「臍橙」等。依農業委員會農業統計年報資料 (<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx>) 顯示，2016 年全台柑橘種植面積為 26,210 ha，年產量為 462,638 Mg，其中以「椪柑」之栽培面積最大為 5,572

ha，其次為「柳橙」5,244 ha，「文旦柚」4,286 ha，「桶柑」3,175 ha。柑橘產區分布全台，其中「椪柑」主要栽培地為嘉義縣、台中市、台南市及苗栗縣；「柳橙」則主要分布於台南市、雲林、嘉義縣及南投縣；「桶柑」分布於新竹縣、苗栗縣、台中市；「文旦」則分布於台南市、花蓮縣及苗栗縣；「檸檬」大多種植於屏東縣；「海梨柑」主要產區為新竹縣；「金柑」主要產區為宜蘭縣；「白柚」主要種植於台南市及台東縣。

台灣柑橘病害有由 *Citrus tristeza virus* (CTV) 引起的萎縮病；由 *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) 引起的破葉病；由 *Citrus exocortis viroid* (CEVd) 引起的鱗砧病；由 *Candidatus*

投稿日期：2018 年 4 月 20 日；接受日期：2018 年 6 月 6 日。

* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

² 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。

³ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。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研究助理。台灣 嘉義市。

⁵ 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。

Liberibacter asiaticus 引起的黃龍病；由 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 引起的潰瘍病；由 *Phytophthora parasitica*、*Phytophthora palmivora*、*Phytophthora citrothorae*、*Phytophthora cinnamomi* 及 *Phytophthora citricola* 等疫病菌引起的褐腐病、根腐病、金柑芽葉疫病及果實褐腐病；由 *Guignardia citricarpa* 引起的黑星病；由 *Diaporthe citri* 引起的黑點病；由 *Elsinoe fawcettii* 引起的瘡痂病；由 *Penicillium digitatum* 及 *Penicillium italicum* 引起的綠黴病與青黴病；由 *Botryosphaeria rhodina* 及 *Diaporthe citri* 引起的蒂腐病；由 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的炭疽病；由 *Erythricium salmonicolor* 引起的赤衣病；由 *Mycosphaerella citri* 引起的油斑病；由 *Oidium tingitaninum* 引起的白粉病；另外，亦有由根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 與柑橘線蟲 (*Tylenchulus semipenetrans*) 引起之線蟲病害 (Hsu *et al.* 2002; Tsay *et al.* 2002)。而在 2012 年 4 月中旬分別於台中市東勢區「茂谷柑」(‘Murcott tangor’) 及南投縣中寮鄉「帝王柑」(‘Gonggan’) 與「佛利蒙柑」(‘Fremont’) 之新梢褐化病害樣品上，經病原分離、鏡檢病原形態及依柯霍氏法則 (Koch’s postulates) 進行病原性測定後，確認為由 *Alternaria alternata* 引起之柑橘褐斑病 (*Alternaria brown spot*; ABS) (Ni *et al.* 2015)，為台灣新紀錄病害；且在 2016 及 2017 年之 4 月中下旬，陸續在台中市東勢區不同農友種植之「茂谷柑」春梢上發生本病害，造成嚴重新梢落葉。

柑橘褐斑病最早於 1903 年在澳洲之柑橘 ‘Emperor mandarin’ 品種上發生 (Cobb 1903)，之後在美國佛羅里達之「紅橘」(‘Dancy tangerines’) (Whiteside 1976)，以色列、南非、西班牙、秘魯及希臘等國之「明尼桔柚」(‘Minneola tangelo’) (Solel 1991; Swart *et al.* 1998; Vicent *et al.* 2000; Elena 2006; Marín *et al.* 2006)，以及阿根廷與巴西之「茂谷柑」品種上陸續發現本病害 (Peres *et al.* 2003)。本病害在嫩葉、枝條及果實上造成黑色壞疽病斑，嚴重時導致落葉、落果及枝條枯萎死亡 (Reis *et al.* 2006)，進而影響樹勢生長、減少果實產量及降低果實商品價值 (Timmer *et al.* 2000b)。

目前國外在柑橘褐斑病的防治策略上，已知可透過避免作物過度密植、避免施用過量氮肥及避免過度灌溉等栽培管理方法降低病害發生，而防治藥劑部分，已知施用依普同 (iprodione) 及銅劑 (copper products) 等可有效地控制柑橘褐斑病發生 (Solel *et al.* 1997; Timmer *et al.* 2000b)。惟在國內雖已知 *A. alternata* 為引起柑橘褐斑病之病原菌 (Ni *et al.* 2015)，卻無正式推薦藥劑供農友防治，因此本研究除對柑橘褐斑病菌生理特性及病原性進行瞭解外。另外，就現已推薦防治柑橘其他真菌性病害之藥劑，進行本病害之室內防治藥劑篩選，期藉此能篩選出有效藥劑進行柑橘褐斑病之防治，提供農友防治資訊。

材料與方法

病原菌分離與保存

將田間罹患褐斑病之柑橘葉片病斑攜回實驗室，以解剖顯微鏡 (SMZ1500, Nikon, Tokyo, Japan) 觀察，若發現病斑上有黑褐色孢子及菌絲等病兆者，則直接挑取病原置於以乳酸 (lactic acid) 酸化馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 之平板上。此酸化馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (acidified PDA; APDA) 酸鹼值 3.8，配製方法為以 750 μ L 50% (v/v) 乳酸溶液加入 300 mL PDA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)。若無病兆者，則直接將罹病之病斑組織，以 0.5% 次氯酸鈉漂洗消毒 30 s，繼而以 70% 酒精消毒 30 s，最後再以無菌水漂洗 2 次。自然風乾後，利用滅菌過之解剖刀切取病健部相鄰組織，置於 APDA 培養基上分離。其分離所得之菌株置於 PDA 中純化後，待其產孢再進行單孢分離，並將分離株保存於 PDA 斜面培養基及無菌水中，置於 10°C 備用。本研究使用之 Alt-001 及 Alt-008 菌株，分別由南投縣中寮鄉「佛利蒙柑」及台中市東勢區「茂谷柑」之罹病葉片所分離之 *A. alternata* 菌株。

病原菌型態及分子鑑定

將 Alt-001 及 Alt-008 菌株培養於 PDA 培養基上，置於 25°C 培養約 7 d 後觀察菌落生長

型態。待其產孢後，以滅菌之針頭挑取培養基上之分生孢子置於載玻片上，並以干涉位相差顯微鏡 (differential interference contrast; DIC; Nikon 80i, Nikon, Tokyo, Japan) 進行孢子型態觀察，再以 NIS-Elements BR 3.0 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 測量 50 個以上分生孢子之長度及寬度。分子鑑定方式，則是刮取菌絲置於微量離心管中，加入 0.5 N NaOH 溶液，將菌絲磨碎後，以 $13,800\times g$ 離心 (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 5 min。吸取上清液，與 9 倍體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 混合，直接吸取混合後之溶液，以 Taq DNA Poly (Protech) 聚合酶鏈鎖反應，增幅 endopolygalacturanase (*endoPG*) 片段時所使用之引子對為 5'-TGTGCTACCATGGTTCTTCC-3' 及 5'-TGTAACCTTAGCGCCATCA-3' (Peever *et al.* 2005)；增幅 internal transcribed spacer (ITS) 片段時所使用之引子對為 ITS1 及 ITS4 (White *et al.* 1990)，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.) 進行定序。親緣樹狀圖建構方式參照 Garganese *et al.* (2016) 並略加修改，除 Alt-001 及 Alt-008 兩菌株序列為自行增幅外，演化樹中其他菌株的序列資料由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 網站依其不同菌株編號查詢後獲得。將同一菌株的 *endoPG* 及 ITS 片段頭尾相連後，所有菌株序列使用 MEGA7 軟體中的 ClustalW 功能按預設參數進行並列排序 (alignment)，並以 Maximum Likelihood 演算法及 Tamura-Nei model 進行類緣關係分析，建構演化樹，bootstrap 重複數皆設定為 1,000。

柑橘褐斑病分離株對不同柑橘品種之病原性測定

供試柑橘品種計有「晚崙西亞」、「佛利蒙柑」、「桶柑」、「明尼橘柚」、「茂谷柑」、「豔陽柑」、「台農天王柑」及「粗皮檸檬」等 8 種不同柑橘品種，其中「茂谷柑」和「明尼橘柚」兩品種除進行離葉接種外，亦進行植株上之接種試驗。

植株上接種方式如下：將 Alt-001 分離株培養於 PDA 7 d 後，以無菌水洗下培養皿內之分生孢子，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Miami, FL, USA) 計算孢子濃度，再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^5 spores mL^{-1})。續將孢子懸浮液均勻噴布於植株嫩葉上，接種後之嫩葉隨即進行套袋保濕 2 d 後去除塑膠袋，接種後每週調查病勢進展情形，對照組則以無菌水進行接種。

另外，離葉接種方式如下：將不同柑橘品種健康嫩葉由植株取下後，以滅菌 3 號蟲針在嫩葉葉背上製造傷口。將上述以無菌水配製孢子懸浮液 (10^5 spores mL^{-1})，取 20 μL 滴於傷口上，每片葉片於左右兩側各處理一點，每種柑橘品種處理 5 片離葉，並以無菌水作為對照組。再將接種後葉片保濕於密封塑膠盒中，分別放置於 25°C 黑暗之定溫箱中，逐日觀察病斑進展情形，本試驗重複進行 2 次。

溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將 Alt-001 及 Alt-008 菌株分別移植於 PDA 培養基，置於室溫培養 7 d 後，以直徑 0.5 cm 滅菌過之打孔器切取菌絲邊緣，置於 PDA 平板中央。分別置於 10、15、20、25、30、35 及 40°C 之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 9 天測量其菌絲生長之直徑，每個處理 5 重複，本試驗重複進行 2 次。另外，將 Alt-001 及 Alt-008 菌株分別培養於 PDA，培養約 7 d 待其產孢後，以無菌水配製約 200 spores/50 μL 之孢子懸浮液，置於 3 凹載玻片上，並將玻片保濕於塑膠培養皿中，分別置於 10、15、20、25、30、35 及 40°C 之定溫箱中，6 h 後取出於顯微鏡計算孢子之發芽情形，每個處理 6 重複，本試驗重複進行 2 次。

化學藥劑對 *A. alternata* 分離株菌絲生長之影響

將供試菌株 Alt-001 及 Alt-008 分別移植至 PDA 培養基，室溫培養 7 d 後，以滅菌過之打孔器 (孔徑 0.5 cm) 切取菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所測試的藥劑為目前官方推薦在柑橘真菌性病

害防治之藥劑，藥劑種類如下：15.0% 易胺座可濕性粉劑 (wetable powders; WP) (imibenconazole, 大勝化學工業股份有限公司, 台灣台北市)、40.0% 快得寧 WP (oxine-copper, 嘉泰企業股份有限公司, 台灣桃園市)、70.0% 甲基多保淨 WP (thiophanate methyl, 瑞德股份有限公司, 台灣台北市)、72.0% 波爾多 WP (bordeaux mixture, 台灣龍燈股份有限公司, 台灣台北市)、80.0% 鋅錳乃浦 WP (mancozeb, 安農股份有限公司, 台灣新北市)、81.3% 嘉賜銅 WP (kasugamycin + copper oxychloride, 大勝化學工業股份有限公司, 台灣台北市)、25.0% 亞托敏水懸劑 (suspension concentrates; SC) (azoxystrobin, 台灣先正達股份有限公司, 台灣台北市)、39.5% 扶吉胺 SC (fluazinam, 台灣石原產業股份有限公司, 台灣台北市)、77.0% 氫氧化銅 WP [copper(II) hydroxide, 瑞芳植物保護股份有限公司, 台灣嘉義縣]、27.1% 三元硫酸銅 SC (tribasic copper sulfate, 日星實業股份有限公司, 台灣台北市) 等 10 種藥劑，配置成含有有效成分濃度為 1 mg a.i. L⁻¹、10 mg a.i. L⁻¹、100 mg a.i. L⁻¹ 之 PDA 培養基。另以不添加藥劑之 PDA 培養基作為對照，再將直徑 0.5 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 9 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。培養後第 8 天，測量其菌絲生長之直徑，每個處理 5 重複，本試驗重複進行 3 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 (%) = {[對照組生長直徑 (cm) - 藥劑處理組生長直徑 (cm)] / 對照組生長直徑 (cm)} × 100%。

化學藥劑對 *A. alternata* 分離株孢子發芽之影響

以滅菌微量吸管吸取 30 μL 上述不同藥劑之溶液，置於 3 凹載玻片之凹槽內，再以無菌微量吸管吸取 2 μL 供試之 Alt-001 及 Alt-008 菌株孢子懸浮液 (約 200 spores μL⁻¹)，滴於含農藥 (嘉賜銅、鋅錳乃浦、氫氧化銅、波爾多、甲基多保淨、快得寧及扶吉胺等 7 種藥劑) 之載玻片凹槽內，並混合均勻，使凹槽內混合液之藥劑有效成分濃度為分別為 1 mg a.i. L⁻¹、10 mg a.i. L⁻¹ 及 100 mg a.i. L⁻¹。供試載玻片並

置於加有 1–5 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中保濕，將培養皿置於 25°C 之定溫箱中經 6 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率，每個處理 2 皿，6 重複，本試驗重複進行 2 次。以滅菌逆滲透水處理作為對照組。

化學藥劑噴施於柑橘葉片不同時間後對 *A. alternata* Alt-001 菌株孢子發芽之影響

本試驗使用之植物材料為盆植於溫室之「茂谷柑」。所使用之藥劑濃度均按植物保護手冊推薦，分別為 40.0% 快得寧可濕性粉劑稀釋 500×、72.0% 波爾多可濕性粉劑稀釋 500×、70.0% 甲基多保淨可濕性粉劑稀釋 1,000×、80.0% 鋅錳乃浦可濕性粉劑稀釋 500×、77.0% 氫氧化銅可濕性粉劑稀釋 800× 及 39.5% 扶吉胺水懸劑稀釋 2,000× 等 6 種藥劑。將上述藥劑分別噴布於「茂谷柑」植株嫩葉上，於噴藥後 3、5、7、14 及 21 d 分別採集葉片，並將已配製好 Alt-001 菌株之孢子懸浮液 (約 200 spores 20 μL⁻¹)，以無菌微量吸管吸取 20 μL 之孢子懸浮液滴於含藥劑之葉面上左右兩側，每處理 8 重複。置於室溫下 6 h 後，取出並以 0.05% trypan blue 進行孢子染色，於顯微鏡下計算每 100 個孢子之發芽率。植株噴布水之葉片為對照組，本試驗重複進行 2 次。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS Enterprise Guide 7.1 版統計分析先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

結果

柑橘褐斑病之病徵

本研究於栽植「佛利蒙柑」、「茂谷柑」及「帝王柑」品種之柑橘園區陸續調查到褐斑病 (alternaria brown spot) 的發生，柑橘褐斑病主要危害嫩葉。罹病時，發病初期葉片呈現褐色至深褐色水浸狀小斑點，病斑逐漸擴大成圓形、不整圓形或輪紋狀褐色病斑，有時病斑外圍會沿著葉脈呈細長條狀網紋斑，病斑周圍具

有明顯的黃色暈環 (圖 1A–1C)。有時在罹病葉片上可觀察到病兆 (圖 1D)，於解剖顯微鏡下其病兆範圍內可明顯觀察到黑色分生孢子鏈產生，葉片被害嚴重時會導致大量落葉。

柑橘褐斑病菌之培養形態與分子鑑定

柑橘褐斑病菌培養於 PDA 平板於 25°C 黑暗培養 8 d 後，菌落為深墨綠色、菌絲茂密生長 (圖 2A)，利用滅菌後之針頭沾取菌落中央黑綠色區域，透過光學顯微鏡可觀察到分生孢子形態如圖 2B 所示，為褐色、棍棒狀或長橢圓形、鏈生於分生孢子柄頂。分生孢子內具橫格及縱格，Alt-001 及 Alt-008 之孢子大小分別為長寬 $20.15 \pm 0.75 \mu\text{m} \times 10.65 \pm 0.29 \mu\text{m}$ 及 18.42

$\pm 0.66 \mu\text{m} \times 9.41 \pm 0.18 \mu\text{m}$ ，長寬比平均為 1.97 及 1.95。為進一步進行菌株種的鑑定，將 Alt-001 及 Alt-008 分離株之 ITS (accession No. 分別為 KR336547 及 MG827243) 序列及 *endoPG* 基因部分序列 (accession No. 分別為 KR493348 及 MG859905)，依據 Maximum likelihood 進行類緣關係分析，結果顯示 Alt-001 及 Alt-008 均屬於 *A. alternata* (圖 3)。

A. alternata 在不同品種柑橘之病原性

為進一步瞭解 *A. alternata* 於不同柑橘品種上之病原性，本研究將 Alt-001 分離株之孢子懸浮液直接噴布於「茂谷柑」及「明尼橘柚」之嫩葉上，於接種 2 d 後，「茂谷柑」嫩葉開

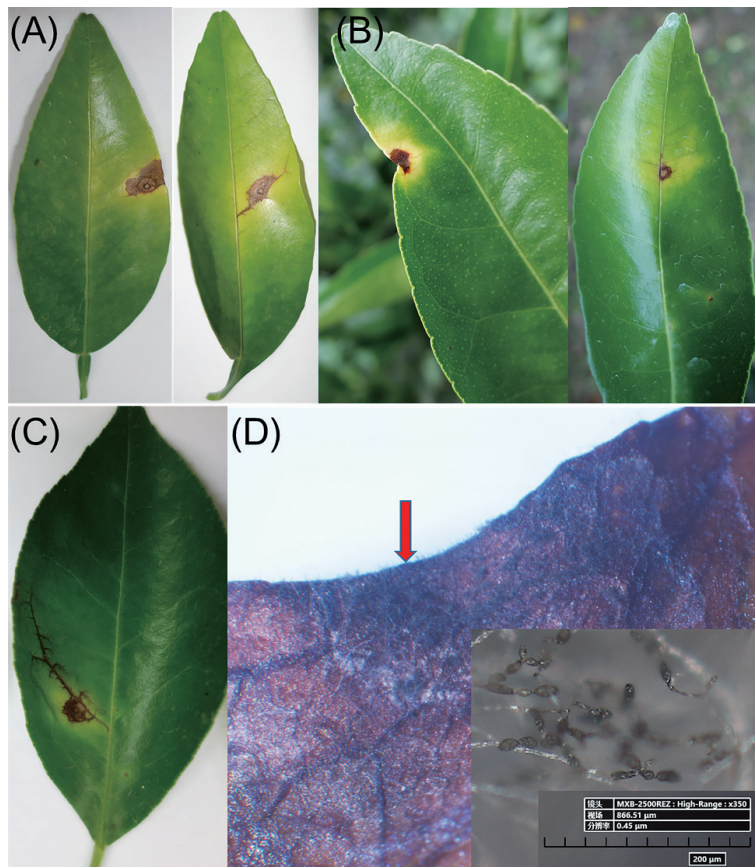


圖 1. 柑橘褐斑病在葉片上病徵。(A)「佛利蒙柑」；(B)「茂谷柑」；(C)「帝王柑」；(D) 罹病葉片上產孢情形 (紅色箭頭表示、150×)。

Fig. 1. Brown spot symptoms appeared on leaves of 'Fremont' (A), 'Murcott tangor' (B), 'Gonggan' (C), and the sporulation on infected leaf (D) (150×).

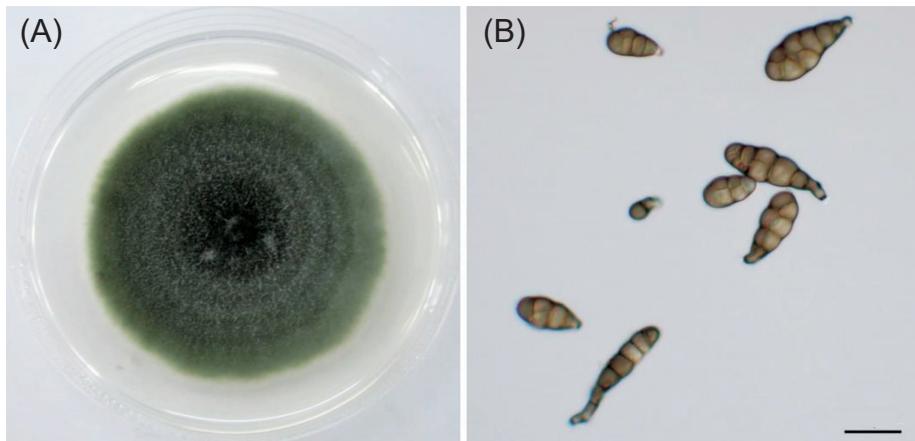


圖 2. 柑橘褐斑病菌之菌落及分生孢子形態。(A) 柑橘褐斑病菌於 PDA 培養基上於 25°C 培養 8 d 後的菌落形態；(B) 分生孢子呈褐色、棍棒狀或長橢圓形，內具橫格及縱格。標尺 = 20 μm 。

Fig. 2. Colony and conidia of *Alternaria alternata*. Colony of *A. alternata* on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 8 d (A). Conidia were brown, clavate or oval, with transverse and longitudinal septa (B). Bar = 20 μm .

始出現黑褐色斑點病斑 (圖 4A)。接種 7 d 後，病斑逐漸擴大為似圓形褐色病斑 (圖 4B)。而當接種於「明尼橘柚」嫩葉上，則於接種 5 d 後出現黑褐色病斑 (圖 4C)，之後再進行罹病組織分離。結果顯示，所得菌株與接種病原菌菌株，其形態特徵皆相同。另將 Alt-001 分離株之孢子懸浮液，以傷口接種於「晚崙西亞」、「佛利蒙柑」、「桶柑」、「明尼橘柚」、「豔陽柑」、「茂谷柑」、「台農天王柑」及「粗皮檸檬」等 8 種不同柑橘品種離葉嫩葉葉背上，於接種 4 d 後，可在於「晚崙西亞」、「佛利蒙柑」、「桶柑」、「明尼橘柚」、「豔陽柑」、「茂谷柑」及「台農天王柑」等 7 種柑橘之葉背片上產生近圓形褐色病斑 (圖 5)，有時在病斑上可見病原菌之墨綠色菌絲 (圖 5G–5H)。但在「粗皮檸檬」嫩葉及以無菌水處理之對照葉片上，則未見病斑產生 (圖 5I、5F)。

溫度對 *A. alternata* 菌絲生長及孢子發芽之影響

Alt-001 及 Alt-008 於 10–25°C 培養時，其菌絲生長隨著溫度升高而增快，於 25°C 培養時，對菌絲生長最為有利，於培養後 9 d 時其平均生長直徑分別為 7.8 cm 及 6.2 cm；Alt-001 菌株於 25–35°C 下生長速率遞減，至 40°C 時完全不生長。Alt-008 菌株則在 30–35°C 間

培養時，其平均生長直徑並無顯著差異，但至 40°C 培養時病原菌菌絲則完全不生長 (圖 6)。而就溫度對孢子之發芽影響而言，由圖 7 顯示，兩菌株在 25–35°C 之發芽率並無顯著差異。在 25°C 下，Alt-001 及 Alt-008 菌株之孢子發芽率分別為 92% 及 81%，而 10°C 及 40°C 下孢子則完全不發芽。

化學藥劑對柑橘褐斑病菌菌絲生長之影響

將 10 種供試藥劑添加於 PDA 培養基，測試各藥劑對 *A. alternata* 菌絲生長之抑制情形，結果如表 1 所示。對 Alt-001 菌株而言，於 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分藥劑濃度下，快得寧對其菌絲生長抑制效果最佳，可達 99.2% 抑制率，其次為易胺座及扶吉胺，其對菌絲生長抑制率分別為 68.3% 及 65.8%。當藥劑濃度提高至 100 mg a.i. L⁻¹ 時，仍以此 3 個藥劑對菌絲生長有較明顯抑制作用，其他測試藥劑對 Alt-001 菌絲生長抑制率均在 50% 以下。而就 Alt-008 而言，於 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分藥劑濃度下，則以快得寧及扶吉胺對其菌絲生長抑制效果最佳，其菌絲生長抑制率分別為 76.7% 及 73.9%，其次為易胺座 61.6%。當藥劑濃度提高至 100 mg a.i. L⁻¹ 時，仍以此 3 個藥劑對菌絲生長有較明顯抑制作用，其他測試藥劑對

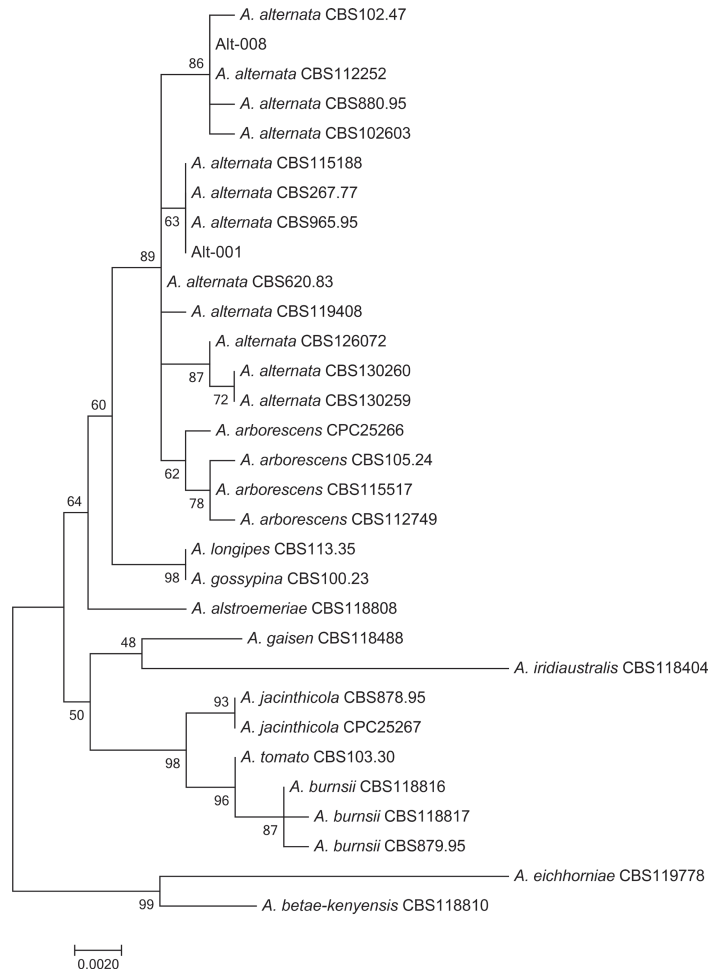


圖 3. 利用 Maximum likelihood 的方法分析 internal transcribed spacer (ITS) 及 endopolygalacturonase (*endoPG*) 序列，以進行建構 *Alternaria* spp. 類緣關係之系統樹。

Fig. 3. Phylogenetic tree based on the internal transcribed spacer (ITS) and endopolygalacturonase (*endoPG*) genes sequences of 12 species, 31 isolates of *Alternaria* spp.

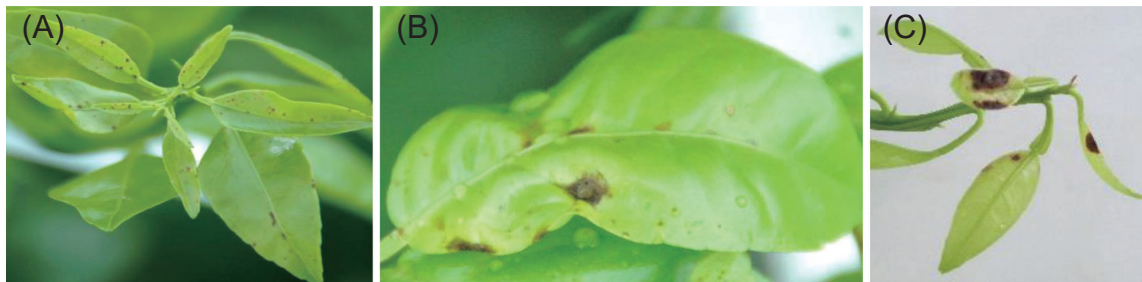


圖 4. 柑橘褐斑病原菌 (*Alternaria alternata* Alt-001) 分別接種於 (A、B) 「茂谷柑」及 (C) 「明尼橘柚」葉片上之病徵表現。

Fig. 4. Brown spot symptoms appeared on leaves after inoculation of *Alternaria alternata* Alt-001. Symptoms of dotted to elongated dark brown spots were observed on 'Murcott tangor' 2 d (A) and 7 d (B) post inoculation (dpi), respectively. Symptoms of elongated dark brown spots were observed on 'Minneola' 5 dpi (C).

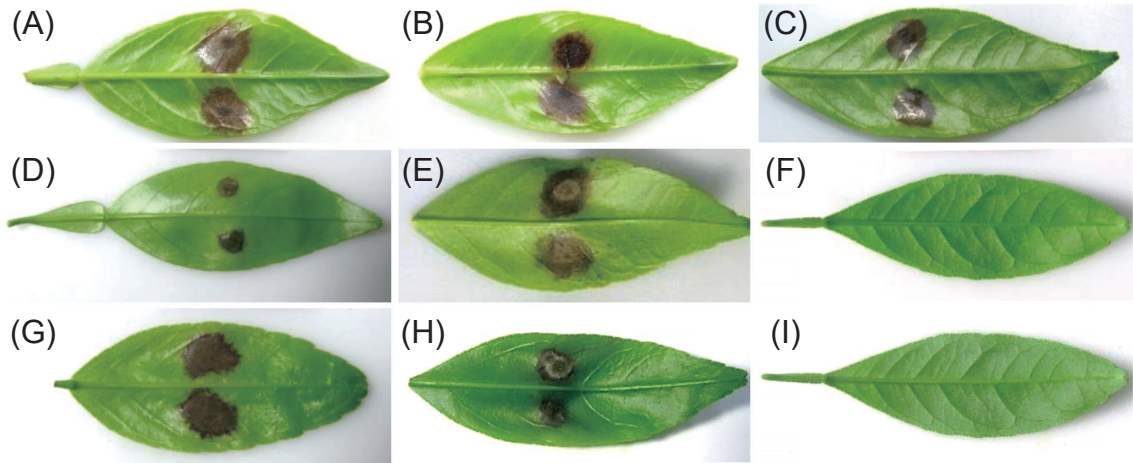


圖 5. 柑橘褐斑病原菌 (*Alternaria alternata* Alt-001) 分別接種於 (A) 「晚崙西亞」、(B) 「佛利蒙柑」、(C) 「桶柑」、(D) 「明尼橘柚」、(E) 「豔陽柑」、(F) 「粗皮檸檬」、(G) 「茂谷柑」及 (H) 「台農天王柑」離葉嫩葉葉片上之病徵表現，以無菌水接種為 (I) 對照組「粗皮檸檬」。

Fig. 5. Brown spot symptoms caused by inoculating *Alternaria alternata* Alt-001 through wounds on detached young leaves of 'Valencia Orange' (A), *Citrus reticulata* Blanco, 'Fremont' (B), 'Tankan' (C), 'Minneola tangor' (D), 'Sunburst' (E), 'Rough lemon' (F), 'Murcott tangor' (G), or 'Tainung Giant' (H) 4 dpi, and leaf of 'Rough lemon' inoculated with water as control (I).

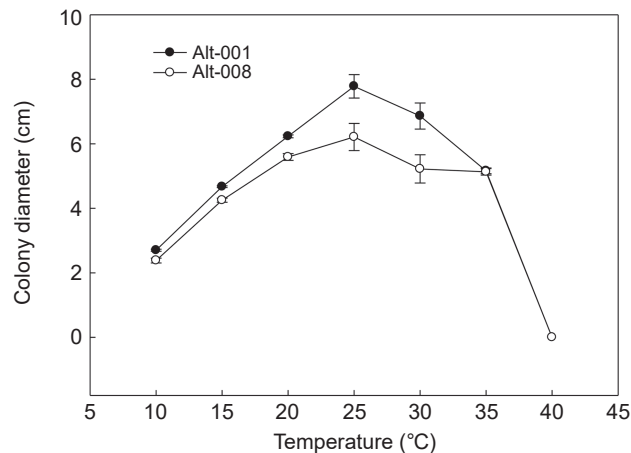


圖 6. 不同溫度對柑橘褐斑病菌 *Alternaria alternata* Alt-001 及 Alt-008 分離株病原菌菌絲生長之影響 [在 potato dextrose agar (PDA) 平板培養 9 d]。

Fig. 6. Effect of temperature on the mycelial growth of *Alternaria alternata* Alt-001 and Alt-008 isolates cultured on potato dextrose agar (PDA) plates for 9 d.

Alt-008 菌絲生長抑制率均在 50% 以下。

化學藥劑對柑橘褐斑病菌孢子發芽之影響

測試 7 種藥劑對 *A. alternata* 病原菌孢子

發芽之影響，結果如表 2 所示，快得寧及扶吉胺於 1 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度處理時，Alt-001 及 Alt-008 菌株之孢子發芽率均在 5.0% 或以下，對於孢子發芽具有極佳的抑制性。當濃度提高至 $100 \text{ mg a.i. L}^{-1}$ 有效成分濃

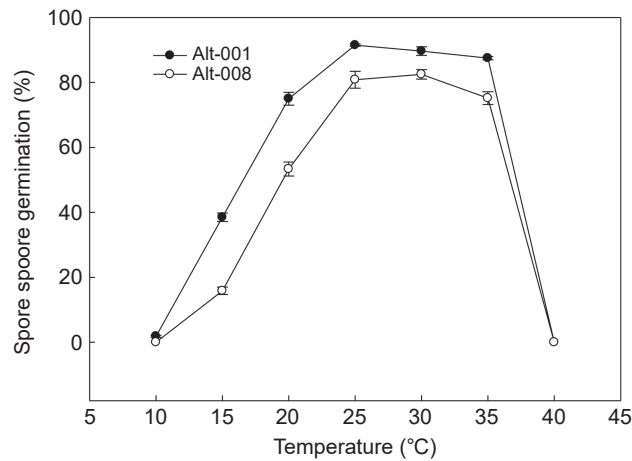


圖 7. 不同溫度對柑橘褐斑病菌 *Alternaria alternata* Alt-001 及 Alt-008 分離株孢子發芽之影響 [在 potato dextrose agar (PDA) 平板培養 7d]。

Fig. 7. Effect of temperature on spore germination of *Alternaria alternata* Alt-001 and Alt-008 isolates cultured on potato dextrose agar (PDA) plates for 7 d.

表 1. 不同藥劑對 *Alternaria alternata* Alt-001 及 Alt-008 分離株菌絲生長之影響。

Table 1. Effects of different fungicides on mycelial growth of *Alternaria alternata* Alt-001 and Alt-008 isolates.

Fungicide	Inhibition (%) ^z					
	Alt-001			Alt-008		
	1 mg a.i. L ⁻¹	10 mg a.i. L ⁻¹	100 mg a.i. L ⁻¹	1 mg a.i. L ⁻¹	10 mg a.i. L ⁻¹	100 mg a.i. L ⁻¹
15.0% Imibenconazole (WP) ^y	24.2 b ^x	68.3 b	81.9 b	56.1 a	61.6 b	66.2 b
33.5% Oxine-copper (SC)	7.5 de	99.2 a	99.2 a	16.4 d	76.7 a	89.3 a
70.0% Thiophanate methyl (WP)	0.0 e	0.0 e	3.3 i	0.0 e	0.0 e	3.8 ef
72.0% Bordeaux mixture (WP)	6.9 e	2.2 e	0.0 i	1.7 e	2.7 e	0.0 f
33.0% Mancozeb (SC)	5.8 e	36.9 c	36.4 d	0.2 e	10.4 d	48.1 c
81.3% Kasugamycin + copper oxychloride (WP)	16.1 c	14.7 d	15.0 h	1.7 e	7.2 de	4.6 ef
25.0% Azoxystrobin (SC)	15.0 cd	6.1 e	20.8 gh	34.7 c	30.4 c	34.0 d
39.5% Fluazinam (SC)	48.1 a	65.8 b	73.1 c	50.0 b	73.9 a	85.3 a
61.4% Copper (II) Hydroxide (WG)	14.6 cd	14.6 d	25.0 fg	0.0 e	4.5 de	0.2 f
27.1% Tribasic copper sulfate (SC)	20.8 bc	32.6 c	42.8 d	0.0 e	0.0 e	6.9 e
LSD (<i>P</i> = 0.05)	7.6	7.7	4.2	4.1	7.5	5.6

^zInhibition (%) = [(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%. PDA: potato dextrose agar.

^y WP: wettable powders; SC: suspension concentrates.

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

度時，則鋅錳乃浦可完全抑制兩菌株之孢子發芽，而氫氧化銅僅能抑制 Alt-001 之孢子發芽，Alt-008 則仍有 73.5% 發芽率，其他測試藥劑在 100 mg a.i. L⁻¹ 有效成分藥劑濃度處理下對 Alt-001 及 Alt-008 之孢子發芽率影響均不顯著。

藥劑於柑橘葉片施用不同時間後對 *A. alternata* 分離株孢子發芽之影響

將測試藥劑噴布於溫室內「茂谷柑」葉片後，於不同施用時間後將葉片採回實驗室，再

表 2. 殺菌劑對 *Alternaria alternata* Alt-001 及 Alt-008 分離株孢子發芽之影響。Table 2. Effects of fungicides on spore germination of *Alternaria alternata* Alt-001 and Alt-008 isolates.

Fungicide	Spore germination (%) ^z					
	1 mg a.i. L ⁻¹		10 mg a.i. L ⁻¹		100 mg a.i. L ⁻¹	
	Alt-001	Alt-008	Alt-001	Alt-008	Alt-001	Alt-008
81.3% Kasugamycin + copper oxychloride (WP) ^y	96.7 a ^x	95.5 a	96.8 a	95.3 a	97.5 a	96.5 a
80% Mancozeb (WP)	93.8 b	63.0 c	44.7 d	16.0 c	0.0 c	0.0 e
77% Copper (II) Hydroxide (WP)	96.5 a	91.3 b	76.5 c	84.3 b	0.0 c	73.5 d
72% Bordeaux mixture (WP)	96.3 a	96.0 a	83.2 b	94.8 a	45.0 b	86.5 c
70% Thiophanate methyl (WP)	96.8 a	94.8 a	96.5 a	94.0 a	97.0 a	94.0 b
40% Oxine-copper (WP)	0.0 d	0.0 e	0.0 e	0.0 d	0.0 c	0.0 e
39.5% Fluazinam (SC)	3.3 c	5.0 d	1.3 e	0.0 d	0.0 c	0.0 e
LSD	1.3	3.4	3.2	5.0	2.0	2.2

^z Spore germination (%) = [(No. of spore germinate on water with fungicide/No. of spore germinate on water without fungicide)] × 100%.

^y WP: wettable powders; SC: suspension concentrates.

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

將 Alt-001 菌株之孢子懸浮液直接滴在葉片上，並進行孢子發芽率之計算，結果如表 3 所示。Alt-001 孢子懸浮液在鋅錳乃浦、氫氧化銅、快得寧及波爾多液噴布處理後 3 d 之葉片上，其孢子發芽率分別為 7.1、7.5、8.0 及 15.5%，與在對照處理水的葉片 99.3% 的發芽率均有顯著性差異，而測試之孢子若在噴布甲基多保淨之葉片上，則仍有高達 99.3% 的孢子發芽率，與對照無差異性。當藥劑處理後 21 d 再將葉

片採回測試其藥效時，結果顯示，Alt-001 分離株孢子在快得寧、鋅錳乃浦、波爾多液及氫氧化銅等 4 種藥劑處理的葉片上皆僅有 16.0% 以下的發芽率，對於其孢子之發芽具有極長時間的抑制性。

討論

Alternaria spp. 可為腐生、內生或具有病原性的寄生菌，寄主範圍極廣 (Chung 2012)，

表 3. 施用藥劑後於不同時間下對 *Alternaria alternata* Alt-001 分離株孢子發芽之影響。Table 3. Effects of fungicides on spore germination of *Alternaria alternata* Alt-001 in different period of time after treatment.

Fungicide	Spore germination (%) ^z				
	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
33.5% Oxine-copper (SC) ^y 500×	8.0 c ^x	4.0 c	6.0 c	4.4 d	4.9 d
72.0% Bordeaux mixture (WP) 500×	17.4 b	4.8 c	34.1 b	12.6 c	15.3 c
70.0% Thiophanate methyl (WP) 1,000×	99.3 a	99.6 a	99.5 a	99.7 a	99.0 a
33.0% Mancozeb (SC) 500×	7.1 c	5.1 c	9.4 c	10.4 cd	6.9 d
61.4% Copper(II) hydroxide (WP) 800×	7.5 c	6.4 c	6.4 c	5.1 d	5.6 d
39.5% Fluazinam (SC) 2,000×	15.5 b	32.3 b	35.3 b	67.1 b	48.9 b
Control	99.3 a	99.5 a	99.4 a	99.8 a	99.8 a
LSD (<i>P</i> = 0.05)	3.5	4.1	5.9	6.2	6.8

^z Spore germination (%) = [(No. of spore germinate on water with fungicide/No. of spore germinate on water without fungicide)] × 100%.

^y SC: suspension concentrates; WP: wettable powders.

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

在台灣已知寄主有馬鈴薯、番茄、甘藍、蘿蔔、辣椒、煙草等 (Hsu *et al.* 2002)。以 *A. alternata* 而言，寄主作物可達 100 種以上，其可產生寄主專一性毒質，其毒質結構從簡單的低分子量化合物至環狀肽均有 (Ohtani *et al.* 2009)。由 *A. alternata* 引起柑橘褐斑病主要有兩個病原型，一為 tangerine pathotype (雜柑型)，影響 tangerine cultivars 及其雜交種 (hybrids)，另一為粗皮檸檬型 (rough lemon pathotype)，影響「粗皮檸檬」及「廣東檸檬」。Tangerine pathotype 及 rough lemon pathotype 在寄主上產生之毒質不同，分別為 ACT 毒質及 ACRL 毒質 (Kohmoto *et al.* 1979; Nishimura & Kohmoto 1983; Kohmoto *et al.* 1991)。由前人研究指出，幾乎所有的 tangerine cultivars 及其雜交種 (hybrids) 包含「明尼橘柚」(‘Minneola’)、「奧蘭多橘柚」(‘Orlando’, *Citrus paradisi* × *C. reticulata*)、「茂谷柑」(‘Murcott tangor’, *C. reticulata* × *Citrus sinensis*)、雜交柑「新星」(‘Nova’)、‘Page’、‘Farchild’、‘Fortune’ 與「豔陽柑」(‘Sunburst’) 等對 tangerine pathotype (雜柑型) 均為感病品種 (susceptible cultivars) (Solel & Kimchi 1997; Peever *et al.* 2000; Timmer *et al.* 2000b; Reis *et al.* 2007)；而「溫州蜜柑」(‘Satsuma mandarin’, *Citrus unshiu*)、「克里曼丁桔」(‘Clementine’, *Citrus clementina*)、「橙」(*C. sinensis*)、「檸檬」(*Citrus limon*) 及「金棗」(*Citrus margarita*) 等品種對 *A. alternata* Tangerine pathotype 較具有抗性 (resistance) (Kohmoto *et al.* 1991; Reis *et al.* 2007; Khanchouch *et al.* 2017)。本研究所分離的 Alt-001 菌株，在進行病原性接種時發現對「茂谷柑」、「明尼橘柚」、「豔陽柑」、「晚崙西亞」、「桶柑」、「佛利蒙柑」及「台農天王柑」均有病原性，但在粗皮檸檬上則不具有病原性。且以病勢進展看來，又以對「豔陽柑」、「茂谷柑」及「台農天王柑」之病原性較強。顯示本研究所分離的 *A. alternata* 菌株應為產生 ACT 毒質的 tangerine type，對台灣目前主要高單價柑橘栽培品種如「茂谷柑」及新興品種「天王柑」等具有威脅性，應注意防治。

有關柑橘褐斑病感染之條件，根據 Timmer *et al.* (1998, 2000a) 研究指出，*A. alternata*

褐斑病菌分生孢子為 air-borne，當相對濕度大於 85% 以上，本菌之分生孢子即有可能在樹上罹病組織或是地上罹病落葉產生，再藉由風或雨水傳播。由田間試驗研究報告顯示，有以下幾個指標可做為 *A. alternata* 褐斑病菌可能發生之判斷因子：(1) 日降雨量大於 2.5 mm；(2) 葉面游離水持續維持 10 h 以上；(3) 日平均溫度介於 20–28°C (Timmer *et al.* 2000a)。本研究所分離的 *A. alternata* Alt-001 及 Alt-008 分離株，20–35°C 均可生長，25°C 為其菌絲最適生長溫度，25–30°C 為孢子發芽最適溫度；以 2015 年 3 月及 4 月台中的氣象站之資料 (http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/agri/agri_month.htm) 顯示，其溫度範圍分別為 13.0–34.7°C (月平均 20.7°C) 及 12.4–34.1°C (月平均 24.4°C)；每日降雨量範圍分別為 0–7.4 mm 及 0–25.3 mm；2016 年 3 月及 4 月其溫度範圍分別為 9.4–28.9°C (月平均 18.3°C) 及 17.3–33.2°C (月平均 24.9°C)、每日降雨量範圍分別為 0–50 mm 及 0–38 mm；2017 年 3 月及 4 月其溫度範圍分別為 12.9–30.2°C (月平均 20.2°C) 及 11.9–33.7°C (月平均 23.2°C)、每日降雨量範圍分別為 0–11 mm 及 0–27.5 mm，以上 3 年資料顯示，由於 3–4 月平均溫度 20°C 以上，而單日最高降雨量有時高達 50 mm，導致游離水在葉片上的存留時間拉長，適合病原菌之侵染，導致本病害之發生。因此，台灣栽培柑橘之農友仍應特別注意春天萌芽時期褐斑病之防治。

有關柑橘褐斑病的防治，目前在國內並無推薦藥劑，本研究以推薦在柑橘其他真菌性病害之藥劑，進行柑橘褐斑病菌絲生長及孢子發芽之影響測試。試驗結果顯示，快得寧或扶吉胺於 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度可有效抑制 *A. alternata* 菌絲生長及孢子發芽，但在溫室試驗中可發現快得寧的保護效果及保護時間更優於扶吉胺；在室內孢子藥劑試驗中，鋅錳乃浦在 100 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度下對 *A. alternata* 之孢子發芽具有良好抑制效果，在溫室試驗中亦與快得寧相同呈現極佳的保護力。氫氧化銅對 *A. alternata* Alt-001 分離株之孢子發芽具有極佳抑制效果，但對 *A. alternata* Alt-008 分離株之孢子發芽抑制效果不佳，或與菌株間對藥

劑忍受性不同有關，此仍有待收集更多的菌株後再做證明，但此銅劑在溫室試驗中與快得寧及鋅錳乃浦均呈現極佳保護力，三者之間無顯著性差異。另外，市售波爾多液於 100 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度下對 *A. alternata* Alt-001 及 Alt-008 分離株之孢子發芽抑制效果不佳，但在溫室試驗中，葉片噴布波爾多液 21 d 後，*A. alternata* 孢子在葉片上之發芽率仍相當低，具有很好的保護效果，兩試驗結果迥然不同之原因在於有效濃度的差異性。由於進行室內藥劑試驗時，超過 100 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度之波爾多液因藥劑內顆粒太多，導致無法觀察孢子發芽，因此在進行室內藥劑試驗時僅能做到 100 mg a.i. L⁻¹，然在進行溫室試驗時，依推薦倍數進行稀釋，其噴布有效成分濃度為 1,440 mg a.i. L⁻¹，與室內藥劑試驗所使用之濃度高出 10 倍以上，故具有良好抑制孢子發芽效果。上述快得寧、氫氧化銅及波爾多液皆為銅劑，其作用機制為銅鹽可使細胞原生質凝固或銅離子 (Cu²⁺) 被吸附於細胞表面後，與細胞壁或細胞膜之幾丁質 (或蛋白質) 的 H⁺、Mg²⁺、K⁺ 等離子置換，導致細胞過度氧化及破壞酵素系統，阻礙細胞之正常生理作用，而使孢子死亡或抑制發芽 (Tzeng 2015)。而鋅錳乃浦屬於有機硫磺劑，其作用機制為可與多種酵素之 SH 基作用，破壞脂質代謝、呼吸作用與 adenosine triphosphate (ATP) 產生 (Tzeng 2015)，均為保護性藥劑，惟因本病害只感染嫩葉，故建議於新梢抽出 1/2 前即應噴藥保護，並於完全抽出後應再噴藥保護一次，避免因新梢長大，葉面上藥劑覆蓋率不佳，導致防治效率減低。扶吉胺雖同時可抑制菌絲生長及孢子發芽，但在本研究中顯示其噴布在葉片後，對 *A. alternata* 孢子發芽抑制之藥效期較短，在使用上可著重於抑制病原菌菌絲生長期使用。此外，國外研究 (Azevedo *et al.* 2015) 顯示潛葉蛾造成之傷口亦會助長褐斑病菌之侵染，因此在新梢期應一併進行潛葉蛾之防治。

由本研究結果顯示，台灣氣候條件適合 *A. alternata* 柑橘褐斑病菌之侵染，而所種植的栽培品種有許多亦屬於感病品種，如「茂谷柑」、「帝王柑」、「佛利蒙柑」及「天王柑」等。爰在

柑橘春梢期尤應注意防治，避免產量損失。同時避免施用過量氮肥產生過多新梢、避免過度灌溉以及加強修剪促進通風，以免游離水存在之時間過久，有助於孢子發芽侵染。另外，應於下雨前選擇使用抑制病原孢子發芽較佳之藥劑如快得寧、氫氧化銅及波爾多液等銅劑進行春梢期保護措施，雨季後宜選擇抑制菌絲生長較為有效之藥劑如扶吉胺或快得寧，俾降低田間病原菌密度，以達到本病害防治目的。

誌謝

本研究之進行承蒙嘉義農業試驗分所園藝系陳祈男助理研究員提供不同品種柑橘葉片進行病原性接種，使得試驗順利完成，在此一併致謝。

引用文獻

- Azevedo, F. A., I. B. Martelli, D. A. Polydoro, C. A. Pacheco, E. H. Schinor, and M. Batianel. 2015. Positive relationship between citrus leaf miner and alternaria brown spot. *Cienc. Rural* 45:1160–1163.
- Chung, K. R. 2012. Stress response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica* 2012:635431. doi:10.6064/2012/635431
- Cobb, N. A. 1903. Letters on the diseases of plants—*Alternaria* of the citrus tribe. *Agric. gaz. N.S.W.* 14:955–986.
- Elena, K. 2006. Alternaria brown spot of Minneola in Greece; evaluation of citrus species susceptibility. *Eur. J. Plant Pathol.* 115:259–262.
- Garganese, F., L. Schena, I. Siciliano, M. I. Prigigallo, D. Spadaro, A. De Grassi, A. Ippolito, and S. M. Sanzani. 2016. Characterization of citrus-associated *Alternaria* species in Mediterranean areas. *PLOS ONE* 11(9):e0163255. doi:10.1371/journal.pone.0163255
- Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
- Khanchouch, K., A. Pane, A. Chriki, and S. O. Cacciola. 2017. Major and emerging fungal diseases of citrus in the mediterranean region. p.3–29. *in: Citrus Pathology*. (Harsimran, G. and G. Harsh, eds.) IntechOpen. Rikeja, Croatia. 220 pp.

- Kohmoto, K., K. Akimitsu, and H. Otani. 1991. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. *Phytopathology* 81:719–722.
- Kohmoto, K., R. P. Scheffer, and J. O. Whiteside. 1979. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. *Phytopathology* 69:667–671.
- Marín, J. E., H. S. Fernández, N. A. Peres, M. Andrew, T. L. Peever, and L. W. Timmer. 2006. First report of alternaria brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. *Plant Dis.* 90:686.
- Ni, H. F., C. W. Huang, and H. R. Yang. 2015. First report of citrus alternaria brown spot caused by *Alternaria alternata* in Taiwan. *Plant Dis.* 99:1864.
- Nishimura, S. and K. Kohmoto. 1983. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21:87–116.
- Ohtani, K., T. Fukumoto, S. Nishimura, Y. Miyamoto, K. Gomi, and K. Akimitsu. 2009. Alternaria pathosystems for study of citrus diseases. *Tree For. Sci. Biotechnol.* 3:108–115.
- Peever, T. L., L. Olsen, A. Ibañez, and L. W. Timmer. 2000. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine × grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology* 90:407–414.
- Peever, T. L., L. Carpenter-Boggs, L. W. Timmer, L. M. Carris, and A. Bhatia. 2005. Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 95:512–518.
- Peres, N. A. R., J. P. Agostini, and L. W. Timmer. 2003. Outbreaks of alternaria brown spot of citrus in Brazil and Argentina. *Plant Dis.* 87:750.
- Reis, R. F., T. F. de Almeida, E. S. Stuchi, and A. de Goes. 2007. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the alternaria brown spot. *Sci. Hortic.* 113:336–342.
- Reis, R. F., A. de Goes, S. N. Mondal, T. Shilts, F. C. Brentu, and L. W. Timmer. 2006. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant Dis.* 90:1051–1054.
- Solel, Z. 1991. Alternaria brown spot on Minneola tangelos in Israel. *Plant Pathol.* 40:145–147.
- Solel, Z. and M. Kimchi. 1997. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. *J. Phytopathol.* 145:389–391.
- Solel, Z., Y. Oren, and M. Kimchi. 1997. Control of alternaria brown spot of Minneola tangelo with fungicides. *Crop Prot.* 16:659–664.
- Swart, S. H., M. J. Wingfield, W. J. Swart, and G. C. Schutte. 1998. Chemical control of alternaria brown spot on Minneola tangelo in South Africa. *Ann. Appl. Biol.* 133:17–30.
- Timmer, L. W., Z. Solel, T. R. Gottwald, A. M. Ibañez, and S. E. Zitko. 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology* 88:1218–1223.
- Timmer, L. W., H. M. Darhower, S. E. Zitko, T. L. Peever, A. M. Ibañez, and P. M. Bushong. 2000a. Environmental factors affecting the severity of Alternaria brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. *Plant Dis.* 84:638–643.
- Timmer, L. W., Z. Solel, and M. Orozco-Santos. 2000b. Alternaria brown spot of mandarins. p.19–20. *in*: Compendium of Citrus Diseases. 2nd ed. (Timmer, L. W., S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds.) American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 92 pp.
- Tsay, Y. P., B. K. Tong, B. J. An, A. S. Jheng, H. J. Su, T. C. Deng, and T. T. Tsay. 2002. Citrus disease. p. 176–280. *in*: Plant Protection 9-Compendium of Citrus Diseases and Pests. (Zou, H. J., C. F. Yan, and M. J. Jheng, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. Taipei, Taiwan. 378 pp. (in Chinese)
- Tzeng, D. S. 2015. Pharmacology and application of pesticides-fungicide. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 166 pp. (in Chinese)
- Vicent, A., J. Armengol, R. Sales, J. Garcia-Jiménez, and F. Alfaro-Lassala. 2000. First report of alternaria brown spot of citrus in Spain. *Plant Dis.* 84:1044.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal 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. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press, San Diego, CA. 482 pp.
- Whiteside, J. 1976. A newly recorded Alternaria-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. *Plant Dis. Rep.* 60:326–329.

Physiological Characteristics, Pathogenicity and Fungicide Screening of Citrus *Alternaria* Brown Spot Disease Caused by *Alternaria alternata*

Chiao-Wen Huang¹, Chao-Jung Wu², Hong-Ren Yang³, Su-Yu Lai⁴, and Hui-Fang Ni^{5*}

Abstract

Huang, C. W., C. J. Wu, H. R. Yang, S. Y. Lai, and H. F. Ni. 2018. Physiological characteristics, pathogenicity and fungicide screening of citrus *alternaria* brown spot disease caused by *Alternaria alternata*. J. Taiwan Agric. Res. 67(4):387–400.

Alternaria brown spot of citrus (*Citrus reticulata*) was found in orchards of ‘Murcott’, ‘Fremont’, and ‘Gonggan’ citrus in Taiwan during 2012–2013. This disease seriously affected the growth of citrus in spring shoot period. The objective of this study is to investigate the physiological characteristics and pathogenicity of *Alternaria alternata*, the causal agent of the brown spot disease, and further screen the effectiveness of fungicides. Seven cultivars included ‘Murcott’, ‘Minneola’, ‘Tankan’, ‘Fremont’, ‘Valencia’, ‘Sunburst’, and ‘Tainung Giant’. Results showed that brown-to-black lesions appeared on the detached young leaves inoculated through wounds, but no symptom appeared on rough lemon after wound inoculation. The optimal temperature for mycelial growth and spore germination of *A. alternata* strain Alt-001 and Alt-008 was 25°C and 25–30°C, respectively. Mycelial growth was effectively inhibited by 10 mg a.i. L⁻¹ oxine-copper, the inhibition rate of 99.2% was measured by screening. Spore germination of *A. alternata* was inhibited by oxine-copper, copper(II) hydroxide, mancozeb, and fluazinam *in vitro*. Furthermore, spore germination of *A. alternata* was continuously inhibited by oxine-copper, copper(II) hydroxide, and mancozeb in greenhouse 21 d after fungicide treatment. These fungicides have been recommended to control other fungal diseases of citrus. Therefore, it is suggested that they could also be used to control *Alternaria* brown spot of citrus in term of efficacy.

Key words: Citrus (*Citrus reticulata*), *Alternaria* brown spot, *Alternaria alternata*, Fungicides screening.

Received: April 20, 2018; Accepted: June 6, 2018.

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

¹ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁴ Research Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁵ Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.