

由 *Exserohilum rostratum* 引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病

黃巧雯¹ 黃晉興² 蔡志濃² 張立詳³ 謝廷芳^{4,*}

摘要

黃巧雯、黃晉興、蔡志濃、張立詳、謝廷芳。2019。由 *Exserohilum rostratum* 引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病。台灣農業研究 68(1):47-58。

2017年4月於台南地區一處蘭園發現蝴蝶蘭花瓣上產生褐色圓形凹陷病斑，大多數病斑產生後不會繼續擴大，但嚴重影響花卉觀賞品質，依病徵形態將本病稱為蝴蝶蘭花瓣斑點病 (petal spot)。由罹病組織所分離之可疑病原菌，於 Potato dextrose agar (PDA) 平板培養時產生黑灰色茂密菌絲，其分生孢子 (conidia) 為褐色至深褐色長橢圓形，於分生孢子末端突出黑褐色之臍 (hilum)。依據科霍氏法則 (Koch's postulates) 完成病原性測定，並由本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果等將病原菌鑑定為 *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs。本菌最適菌絲生長溫度為 28°C，而最適孢子發芽溫度為 24-36°C。病原菌不僅危害白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3') 外，亦可在粉黃花 (*Phalaenopsis Green Pixie* 'Ever Green') 及桃紅 (*Phalaenopsis Queen Beer* 'Mantefon') 蝴蝶蘭、黃花文心蘭 (*Oncidesa Gower Ramsey* 'Honey Angel')、嘉德麗雅蘭 (*Cattleya Chien Ya* 'Ocean') 及白花萬代蘭 (*Vanda Princess* 'Mikasa White') 花瓣上造成類似病徵。測試殺菌劑對本菌之菌絲生長及孢子發芽之影響，結果顯示快得寧、撲滅寧、待克利及依普同在 10 mg a.i. L⁻¹ 有效濃度下對菌絲生長抑制率均可達 90% 以上，而快得寧、鋅錳乃浦、四氣異苯腈及氮氧化銅在 10 mg a.i. L⁻¹ 有效濃度下則可顯著降低病原菌之孢子發芽率。本文為國內第一篇闡明由 *E. rostratum* 引起蝴蝶蘭花瓣斑點病之報告，並初步篩選防治藥劑供栽培業者參考使用。

關鍵詞：蝴蝶蘭、花瓣斑點病、藥劑篩選。

前言

蝴蝶蘭為蘭科 (Orchidaceae) 蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*)，其名是由希臘文的 phalaina (蝶蛾) 與 opsis (形象) 兩字結合命名而來，主要以其花型有如蝴蝶翩翩飛舞而得名 (Taiwan Orchid Growers Association 2018)。原生地分布於南北緯 23 度之間，蝴蝶蘭屬植物之原生種約 50 幾種，台灣有兩種原生蝴蝶蘭，一為白蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis amabilis* var. *formosana*)，另一為桃紅蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris* Schauer Rchb. F.) (Council of Agriculture, Executive Yuan

2006)，性喜高溫多溼、通風佳、耐旱、耐陰環境。依據行政院農業委員會統計資料顯示，2016 年全台種植蘭花面積為 745 ha，其中蝴蝶蘭種植面積約 250 ha，出口產值逾一億美元，主要銷於歐洲、美國、日本及越南等地區，為台灣四大旗鑑外銷農產品之一。

根據台灣植物病害名彙 (Hsu *et al.* 2002) 及相關研究報告紀錄，在台灣蝴蝶蘭主要病害有由東亞蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CyMV)、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 引起之病毒病；

投稿日期：2018 年 6 月 20 日；接受日期：2018 年 9 月 19 日。

* 通訊作者：TFHsieh@tari.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 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼主任。台灣 雲林縣。

由 *Sclerotium rolfsii* Sacc. 引起之白絹病、由 *Colletotrichum phalaenopsidis* Penzig 引起之炭疽病、由 *Pseudocercospora dendrobii* Goh & Hsieh 引起之石斛蘭葉斑病、由 *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. 引起之灰黴病等真菌性病害；另有由 *Phytophthora parasitica* Dastur、*Phytophthora palmivora* Butler、*Phytophthora multivesiculata* Ilieva, Man in't Veld, Veenbaas-Rijks & Pieters 引起之疫病，以及由 *Acidovorax cattleyae* (Pavarino) Schaad *et al.* 引起之褐斑病、由 *Dickeya dadantii* Samson *et al.* 引起之細菌性軟腐病等細菌性病害。而在 2017 年 4 月中旬，本實驗室從台南地區蘭花園之白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3') 罹病花瓣上，經鏡檢時發現 *Exserohilum* 之孢子。由國外文獻得知，引起蘭花 (石斛蘭，*Dendrobium*) 花器壞疽斑點的原因，不僅只由灰黴病菌 *B. cinerea* 所造成，尚有其他病原如 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.、*Bipolaris setariae* Shoemaker、*Bipolaris urochloae* (Putterill) Shoemaker、*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker、*Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs 及 *Stemphylium* sp. 等，皆於花瓣上產生黑褐色壞疽斑點 (blossom necrotic fleck; blossom flecks and spots) 病徵 (Uchida & Aragaki 1979; Kawate & Sewake 2014)。爾後，將罹病組織經病原分離純化、病原性測定、形態特徵及分子鑑定後，發現是由 *E. rostratum* 引起之病害，並定名為花瓣斑點病 (petal spots)。

E. rostratum 為廣泛分布於亞熱帶及熱帶地區，其寄主範圍廣如玉米、水稻、甘蔗、高粱、番茄、小麥、菸草、單子葉植物之雜草及橡膠樹 (Leonard 1976; Anahosur & Sivanesan 1978; Liu *et al.* 2016; Majeed *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016) 等，其所造成之病徵有葉斑、葉枯及莖腐爛等。本菌分布於非洲 (南非、尼日利亞、毛里求斯、蘇丹)、亞洲 (中國、印度、以色列、巴基斯坦)、中美洲 (波多黎各)、歐洲 (丹麥) 及北美 (美國) 等區域 (Leonard 1976; Anahosur & Sivanesan 1978)；台灣則於 1992 年發現本菌感染玉米葉片引起玉米葉斑

病 (Tsai *et al.* 2001)。然而，在台灣並未見有關由 *E. rostratum* 引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病相關研究，亦無推薦藥劑可資使用。

蘭花屬於高經濟價值之觀賞植物，若花朵上呈現病斑不僅影響觀賞價值，亦減低消費者選購的慾望，尤其是切花產品，將嚴重影響商品價值。為避免未來造成大量經濟損失 (Uchida & Aragaki 1991)，本研究擬探討該病原菌的形態、生理特性、病原性測定及室內防治藥劑篩選，以提供此病害防治上之參考。

材料與方法

供試菌株之分離、培養及保存

將罹患花瓣斑點病之花瓣取下，並以解剖刀切下病斑之病健部組織，以 75% 酒精表面消毒後，置於以 2% (w/v) 水瓊脂 (Water agar; WA) 平板上。待病組織長出菌絲後，以移植針切取菌絲尖端移到馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar; PDA) 上培養。選取分離所得之菌株 EX001 及 EX002 分別置於 PDA 中培養 5 d 後，再挑取菌絲塊移植於含滅菌木麻黃針葉之 2% (w/v) WA 平板上，待其產孢後，進行單孢分離。單孢後分離株，移至 2% (w/v) WA 培養基上培養，並將菌絲塊置入裝無菌水之保存管中，於 24°C 定溫室保存待用。

病原菌形態及分子鑑定

將 EX001 及 EX002 菌株培養於 PDA 培養基上，置於 24°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, LEICA DM 2500, Leica DM, Wetzlar, Germany) 進行孢子型態觀察與拍照，以 NIS-Elements Analysis D 4.51 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，則是將菌株於 24°C 下培養於 PDA 培養基上。經 6 d 後，隨即委託源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taichung, Taiwan) 進行 DNA 萃取與聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 之分子鑑定工作，增幅 internal transcribed spacer

(ITS) 部分片段時所使用之引子對為 ITS4 及 ITS5 (White *et al.* 1990)。定序結果在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫中進行序列分析比對，並將序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

接種源配製及病原性測定

將 EX001 分離株培養於含滅菌後木麻黃針葉之 2% (w/v) WA 平板上，置於 24°C、12 h 光照下培養約 6 d 後，以無菌水洗下培養皿內之分生孢子。利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Miami, FL, USA) 測定孢子濃度，再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^5 spores mL⁻¹)。續將孢子懸浮液分別均勻噴布於白花蝴蝶蘭 (*Phal. Sogo Yukidian* 'V3')、桃紅 (*Phal. Queen Beer* 'Mantefon') 及粉黃蝴蝶蘭 (*Phal. Green Pixie* 'Ever Green')、黃花文心蘭 (*Oncidesa Gower Ramsey* 'Honey Angel')、嘉德麗雅蘭 (*Cattleya Chien Ya* 'Ocean') 及白花萬代蘭 (*Vanda Princess* 'Mikasa White') 等花朵上，並置於 24°C 走入式植物生長箱中光照 12 h。接種後，隨即進行套袋保濕 2 d 後去除塑膠袋，並於接種後每 2 d 調查病勢進展情形。對照組則以無菌水進行接種，每個處理 3 重覆，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 EX001 及 EX002 菌株分別移植於 PDA 培養基平板上，並置於室溫培養 6 d 後，以口徑 0.6 cm 滅菌過之打孔器切取菌絲邊緣，將菌絲塊置於 PDA 平板中央。分別置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40°C 之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 5 天測量其菌絲生長之直徑。每個處理 4 重覆，本試驗重複進行 2 次。另外，將 EX001 及 EX002 菌株分別培養於含木麻黃葉之 WA 上，待其產孢後，以無菌水配製約 10^4 spores mL⁻¹ 之孢子懸浮液，再以無菌微量吸管吸取 20 μ L 供試菌株之孢子懸浮液置於 8 孔載玻片上，並將玻片保濕於塑膠培養皿中。分別置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40°C 之定溫箱中，於 6 h 後取出於顯微鏡計算 100 個孢子之發芽情形。每個處理 4 重覆，本試驗重複進行 2 次。

殺菌劑對病原菌菌絲生長之影響

將培養於 PDA 平板上 6 d 之 EX001 及 EX002 供試菌株，以滅菌過之打孔器 (孔徑 0.6 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推薦在作物葉斑病真菌性病害防治之藥劑，藥劑種類如下：70.0% 甲基多保淨可濕性粉劑 (wetable powders; WP) (thiophanate methyl, 瑞總股份有限公司, 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)、50% 撲滅寧 WP (procymidone, 台灣住友化學股份有限公司, 台灣台北市)、53.8% 氫氧化銅水分散性粒劑 (water dispersible granules; WG) [copper (II) hydroxide, 安農股份有限公司, 台灣新北市]、80.0% 鋅錳乃浦 WP (mancozeb, 安農股份有限公司, 台灣新北市)、72.0% 波爾多 WP (bordeaux mixture, 台灣龍燈股份有限公司, 台灣台北市)、75% 四氯異苯腈 WP (chlorothalonil, 興農股份有限公司, 台灣台中市)、25% 待克利水懸劑 (suspension concentrates; SC) (difenoconazole, 台灣先正達股份有限公司, 台灣台北市)、23% 亞托敏 SC (azoxystrobin, 台灣先正達股份有限公司, 台灣台北市)、23.7% 依普同 SC (iprodione, 雅飛有限公司, 台灣台北市) 及 39.5% 扶吉胺 SC (fluazinam, 台灣石原產業股份有限公司, 台灣台北市) 等 11 種藥劑。將 PDA 滅菌後，冷卻至 50–70°C，添加上述藥劑種類並配置成含有有效成分濃度為 1、10、100 mg a.i. L⁻¹ 之 PDA 培養基平板。另以不添加藥劑之 PDA 平板作為對照，再將直徑 0.6 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 9 cm 之含藥的 PDA 平板中央，置於 24°C 之定溫箱中黑暗培養。於培養後第 6 天，測量其菌絲生長之直徑。每個處理 5 重覆，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：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{對照組菌落直徑} - \text{藥劑處理組菌落直徑})}{\text{對照組菌落直徑}} \times 100\%$$

藥劑對病原菌孢子發芽之影響

以滅菌微量吸管吸取 20 μL 上述不同藥劑之溶液，置於 8 孔載玻片上，再以無菌微量吸管吸取 1 μL 供試之 EX001 及 EX002 菌株孢子懸浮液 (約 200 spores μL^{-1})，滴於含農藥之載玻片內，並混合均勻，使每孔內混合液之藥劑有效成分濃度分別為 1 mg a.i. L^{-1} 及 10 mg a.i. L^{-1} 。供試載玻片置於加有 5–10 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中，將培養皿置於 24°C 之定溫箱中經 16 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率。每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。以滅菌蒸餾水處理作為對照組。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS Enterprise Guide 7.1 版統計分析體先進行變方分析 (anal-

ysis 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

花瓣斑點病之病徵

本研究於 2017 年 4 月中旬在台南區蘭花園之白花蝴蝶蘭 (*Phal. Sogo Yukidian 'V3'*) 樣品上，觀察到花瓣上出現褐色圓形病斑，有時病斑凹陷，病斑直徑大小約 1 mm 或更小，病斑不易擴大，有時以解剖顯微鏡可在罹病組織上觀察到病兆 (圖 1A)。

花瓣斑點病菌之培養形態與分子鑑定

花瓣斑點病菌 EX001 及 EX002 菌株培養於 PDA 平板，於 24°C 黑暗培養 5–7 d 後，菌



圖 1. 花瓣斑點病在蝴蝶蘭 V3 品種之花瓣上呈現的病徵。於田間自然感染所造成的病徵及罹病組織上之病兆 (紅色圈表示、標尺 = 100 μm) (A)；花瓣斑點病菌 *Exserohilum rostratum* EX-001 接種於 V3 品種花朵上之病徵表現 (B, C)；以無菌水接種之對照組 (D)。

Fig. 1. Symptoms of petal spot of *Phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3'*. Naturally infected petal caused brown small spots symptom and sign (Bar = 100 μm) (A); petal spot symptom caused by *Exserohilum rostratum* EX001 with artificial inoculation (B, C); and water inoculation as control (D).

落為灰黑色至黑色、菌絲茂密生長 (圖 2A)。利用滅菌後之針頭沾取菌落黑色區域，透過光學顯微鏡可觀察到分生孢子形態如圖 2B–2D 所示，為褐色至深褐色、長形、圓柱形、棍棒狀或長橢圓形，直線至稍微彎曲，具有 5–12 隔膜，著生於分生孢子梗上 (conidiophores)。分生孢子著生端產生突出之黑褐色臍 (hilum)，EX001 及 EX002 之孢子 (conidia) 大小分別為長寬 $43.5\text{--}120.5\ \mu\text{m} \times 11.5\text{--}18.5\ \mu\text{m}$ 及 $57.0\text{--}153.5\ \mu\text{m} \times 10.5\text{--}18.5\ \mu\text{m}$ ；分生孢子梗呈屈膝狀彎曲 (geniculate)，有隔膜，表現光

滑，呈灰褐色，以合軸式 (sympodial) 產孢等特性，依據 Leonard & Suggs (1974) 之形態學鑑定為 *E. rostratum*。為進一步確認菌株鑑定，將 EX001 及 EX002 分離株之 ITS (accession No. 分別為 MF186190 及 MH107245) 與 NCBI 基因資料庫進行分析比對，結果供試菌株均與 UPM1150 strain 之 ITS (KP340092) (Kusai *et al.* 2016) 之序列相似度高達 100%。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果，將造成花瓣斑點病之病原菌鑑定為 *E. rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs



圖 2. 花瓣斑點病菌之菌落及形態特徵。(A) 花瓣斑點病菌於 potato dextrose agar (PDA) 培養基上於 24°C 培養 6 d 後的菌落形態；(B) 分生孢子梗形態；(C) 分生孢子產生於分生孢子梗上；(D) 分生孢子為褐色、長形、圓柱形、棍棒狀或長橢圓形，具有 5–12 隔膜。標尺 = 10 μm 。

Fig. 2. Colony and morphological characteristics of *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs. Colony morphology of *E. rostratum* cultured on potato dextrose agar (PDA) at 24°C for 6 days (A); conidiophores (B); conidia with conidiophores (C); and conidia are brown, long, cylindrical, stick-like or ellipsoidal with 5–12 septa (D). Bar = 10 μm .

(Teleomorph: *Setosphaeria rostrata*) (Leonard & Suggs 1974; Uchida & Aragaki 1979, 1991; Kawate & Sewake 2014; Kusai *et al.* 2016)。

病原性測定

為進一步證明 *E. rostratum* 於蝴蝶蘭花瓣上之病原性，本研究將 EX001 分離株之孢子懸浮液直接噴布於蝴蝶蘭 V3 品種之白花上。於接種 3 d 後，白花花瓣開始出現淡褐色斑點病斑，於接種 5 d 後，病斑逐漸明顯並呈褐色圓形病斑 (圖 1B–1C)。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，完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)，證實 *E. rostratum* 對白花 V3 蝴蝶蘭具有病原性。另以 EX001 分離株之孢子懸浮液直接噴布於桃紅色蝴蝶蘭、黃色蝴蝶蘭、黃花文心蘭、白色萬代蘭及嘉得麗雅蘭等不同

種類的蘭花上，於接種 5 d 後，可在花瓣上產生淡褐色至褐色圓形病斑 (圖 3A–3E)，且在嘉得麗雅蘭花苞上有圓形、不規則形紅粉色病斑產生 (圖 3D)。而以無菌水作為對照組時，白花萬代蘭蘭花上皆未產生病斑 (圖 3F)，之後分別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。亦證實 *E. rostratum* 不僅對白花蝴蝶蘭具有病原性外，亦對桃紅色蝴蝶蘭、黃色蝴蝶蘭、黃花文心蘭、嘉得麗雅蘭及白色萬代蘭等不同蘭花具有病原性。

溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將供試的 2 株花瓣斑點病菌之菌絲塊培養於不同溫度之培養箱中，其生長結果如圖 4 所示。於 28°C 培養時，病原之生長最為快速，

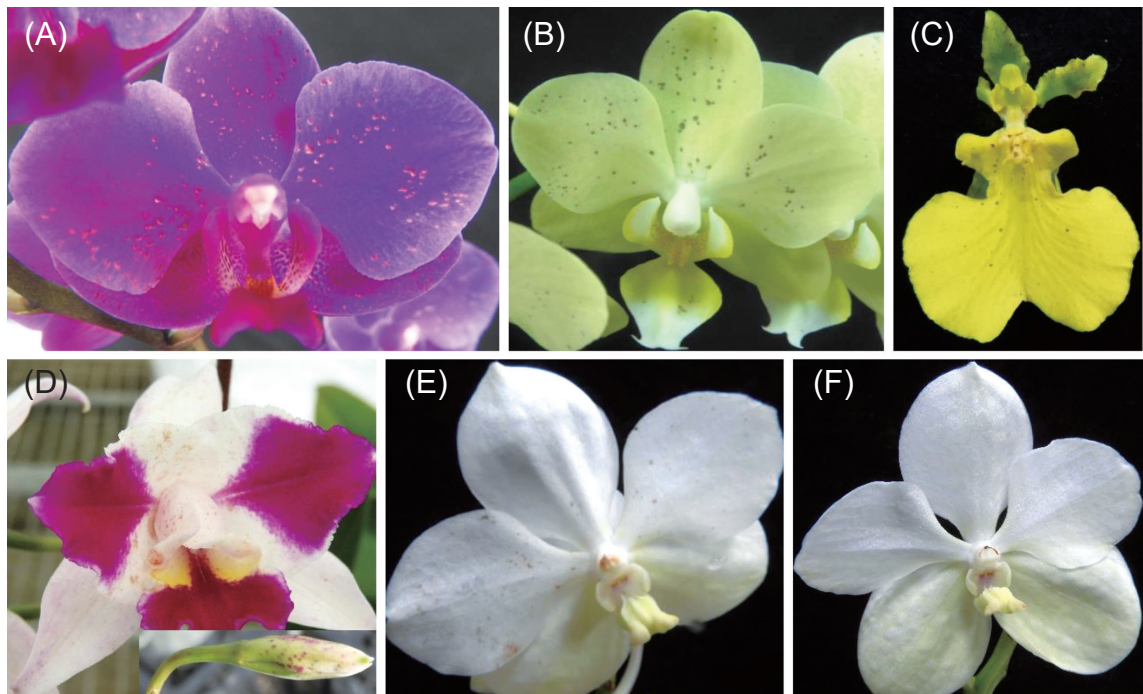


圖 3. 花瓣斑點病菌 (*Exserohilum rostratum* EX001) 分別接種於桃紅蝴蝶蘭 (A)；粉黃蝴蝶蘭 (B)；黃花文心蘭 (檸檬綠) (C)；嘉得麗雅蘭 (D) 及白花萬代蘭 (E)；花朵上 5 d 後之病徵表現，以無菌水接種為對照組 (F：白花萬代蘭)。

Fig. 3. Petal spot symptoms of *Phalaenopsis* Queen Beer 'Mantefon' (A); *Phalaenopsis* Green Pixie 'Ever Green' (B); *Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel' (C); *Cattleya* Chien Ya 'Ocean' (D); and *Vanda* Princess 'Mikasa White' (E); 5 d after inoculation with *Exserohilum rostratum* EX001, and blossom of *Vanda* inoculated with water as control (F).

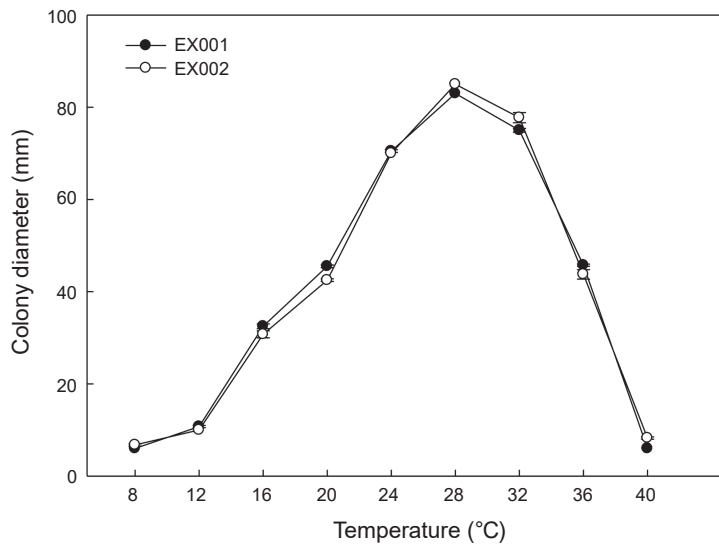


圖 4. 溫度對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株菌絲生長之影響 [potato dextrose agar (PDA) 平板培養 5 d]。

Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates cultured on potato dextrose agar (PDA) plates for 5 d.

於培養後 5 d 時 EX001 及 EX002 之平均生長直徑分別為 8.3 cm 及 8.5 cm；於 32°C 培養時其平均生長直徑為 7.6 cm，於 24°C 培養時其平均生長直徑為 7.0 cm，而於 20°C 及 36°C 培養時其平均生長直徑皆約為 4.5 cm 左右，於 16°C 培養時其平均生長直徑約 3.1 cm，於 12°C 培養時其平均生長直徑則僅有 1.0 cm 左右，

而 8°C 及 40°C 培養時病原菌幾乎完全不生長。另外，溫度對本菌孢子發芽之影響結果，則如圖 5 所示。在 24–36°C 下，於無菌水中 6 h，EX001 及 EX002 菌株之分生孢子發芽率皆達 90% 以上；於 16°C 及 20°C 時其孢子發芽率介於 73–89% 之間；40°C 下 EX001 及 EX002 菌株之孢子發芽率分別為 68.3% 及 73.8%；而

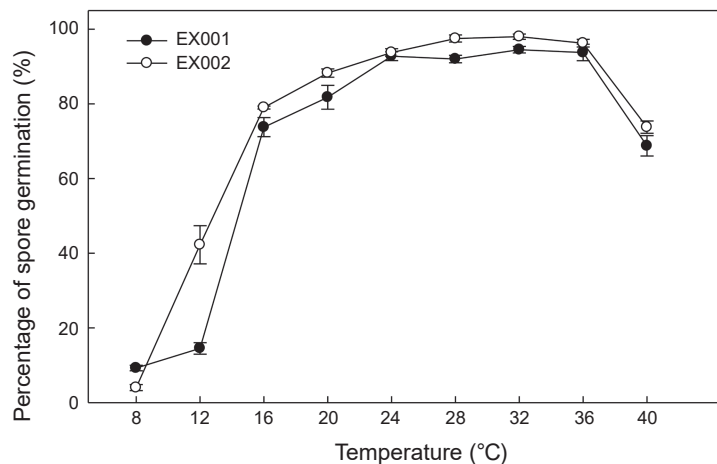


圖 5. 溫度對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株孢子發芽之影響。

Fig. 5. Effect of temperature on spore germination of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates.

12°C不利孢子發芽，EX001 菌株之發芽率為 14.5%，EX002 菌株則為 42.3%；於 8°C下兩菌株孢子則幾乎不發芽。

藥劑對花瓣斑點病菌菌絲生長之影響

將供試藥劑添加於 PDA 培養基，測試各藥劑對花瓣斑點病菌菌絲生長之抑制效果，結果如表 1 所示。*E. rostratum* EX001 及 EX002 分離株於 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分藥劑濃度下，撲滅寧、依普同、待克利及快得寧對其菌絲生長抑制率皆達 91% 以上。其次為扶吉胺，其對 EX001 及 EX002 菌絲生長之抑制率分別為 84.5% 及 87.8%，而甲基多保淨及波爾多對 EX001 及 EX002 菌絲生長效果差，其抑制率皆為 1% 以下。若有效成分濃度提高至 100 mg a.i. L⁻¹ 時，則依普同對 EX001 菌株之菌絲生長抑制率可達到 100%，其次為撲滅寧及待克利的 99.4% 及 99.2%；在 EX002 菌株，則快得寧及待克利之菌絲生長抑制率皆為 100%，而撲滅寧次之，達 97.9% 之生長抑制率。

表 1. 不同藥劑對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株菌絲生長之影響。

Table 1. Effects of different fungicides on mycelial growth of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates by culture plate method.

Fungicide	Inhibition (%) ^z					
	EX001			EX002		
	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
70.0% Thiophanate methyl (WP) ^y	0.0 h ^x	0.8 g	40.3 f	0.0 f	0.0 e	9.7 f
40.0% Oxine-copper (WP)	27.9 f	91.3 b	96.2 b	25.8 d	91.6 bc	100.0 a
50.0% Procymidone (WP)	77.5 c	98.6 a	99.4 a	29.6 d	97.0 ab	97.9 a
53.8% Copper (II) hydroxide (WG)	0.0 h	0.0 g	33.9 g	0.0 f	4.6 e	36.2 d
80.0% Mancozeb (WP)	49.3 e	45.5 e	80.2 d	0.0 f	18.0 d	87.3 c
72.0% Bordeaux mixture (WP)	0.0 h	0.0 g	16.5 i	0.0 f	0.0 e	18.0 e
75.0% Chlorothalonil (WP)	60.9 d	67.2 d	68.5 e	2.1 f	22.0 d	20.7 e
25.0% Difenoconazole (SC)	91.6 a	93.0 b	99.2 a	93.8 a	100.0 a	100.0 a
23.0% Azoxystrobin (SC)	19.7 g	12.5 f	24.9 h	15.0 e	22.6 d	20.1 e
23.7% Iprodione (SC)	76.4 c	97.5 a	100.0 a	57.3 c	94.0 abc	94.7 ab
39.5% Fluazinam (SC)	79.9 b	84.5 c	88.1 c	84.2 b	87.8 c	91.2 bc
LSD (<i>P</i> = 0.05)	2.3	3.4	2.1	6.7	6.7	5.9

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

^y WP: wettable powders; WG: water dispersible granules; SC: suspension concentrates.

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

藥劑對花瓣斑點病菌孢子發芽之影響

測試藥劑對花瓣斑點病菌分生孢子發芽之影響，結果如表 2 所示。EX001 菌株於 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度之快得寧及鋅錳乃浦處理下，其分生孢子之發芽率皆為 0，對孢子發芽具有極佳的抑制性；其次，在 10 mg a.i. L⁻¹ 氫氧化銅及四氯異苯腈處理下，其孢子發芽率分別為 1.3% 及 6.0%。EX002 菌株於 1 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度之快得寧及鋅錳乃浦處理下，其分生孢子之發芽率為 1–5.5% 之間，對孢子發芽具有極佳的抑制性；而 10 mg a.i. L⁻¹ 快得寧、鋅錳乃浦及四氯異苯腈處理下，分生孢子發芽率為 9% 以下；其次，在 10 mg a.i. L⁻¹ 氫氧化銅處理下其孢子發芽率為 17.0%。

討論

根據 Anahosur & Sivanesan (1978) 指出，*Exserohilum rostratum* 病原菌之寄主範圍廣，如禾本科植物 (*graminicolus*)、孤挺花屬 (*Amaryllis*)、木瓜屬 (*Carica*)、香瓜屬 (*Cucumis*)、

表 2. 不同藥劑對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株孢子發芽之影響。**Table 2.** Effects of different fungicides on spore germination of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates by glass slide method.

Fungicide	Spore germination (%) ^z			
	EX001		EX002	
	1 mg a.i. L ⁻¹	10 mg a.i. L ⁻¹	1 mg a.i. L ⁻¹	10 mg a.i. L ⁻¹
70.0% Thiophanate methyl (WP) ^y	100.0 a ^x	98.8 a	98.5 a	99.5 a
40.0% Oxine-copper (WP)	0.0 d	0.0 e	1.5 d	0.0 e
50.0% Procymidone (WP)	99.3 a	99.3 a	99.0 a	94.5 b
53.8% Copper (II) hydroxide (WG)	99.5 a	1.3 e	40.2 b	17.0 c
80.0% Mancozeb (WP)	75.5 b	0.0 e	5.5 d	0.5 e
72.0% Bordeaux mixture (WP)	99.8 a	92.3 c	96.8 a	97.8 ab
75.0% Chlorothalonil (WP)	62.8 c	6.0 d	20.0 c	8.7 d
25.0% Difenoconazole (SC)	100.0 a	99.7 a	100.0 a	96.1 ab
23.0% Azoxystrobin (SC)	99.7 a	99.0 a	100.0 a	99.7 a
23.7% Iprodione (SC)	100.0 a	99.8 a	99.5 a	99.5 a
39.5% Fluazinam (SC)	98.3 a	95.0 b	97.5 a	97.8 ab
LSD (<i>P</i> = 0.05)	11.3	2.7	6.7	3.8

^z Spore germination (%) = (No. of germinated spores/total No. of spores observed) × 100%.

^y WP: wettable powders; WG: water dispersible granules; SC: suspension concentrates.

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

素馨屬 (*Jaminum*)、菸草屬 (*Nicotiana*) 等，包含許多重要經濟作物如玉米、水稻、甘蔗、高粱、番茄及小麥 (Luan *et al.* 2004; Cardona & González 2007; Ahmadpour *et al.* 2013)，亦造成人類疾病發生 (Gauthier & Keller 2013; Sharma *et al.* 2014)。此菌在蘭花上，僅有引起石斛蘭 (*Dendrobium*) 花朵壞疽病斑 (blossom necrotic fleck) (Uchida & Aragaki 1979) 之報導。在台灣，*E. rostratum* 造成玉米葉斑病 (Tsai *et al.* 2001) 及孔雀竹芋 (*Calathea picturata*) 葉枯病 (Chern *et al.* 2011)，但並未見此菌在蘭花上相關報導。然而，本研究於 2017 年從台南某一蘭花園之白花蝴蝶蘭 (*Phal. Sogo Yukidian 'V3'*) 罹患褐色斑點病花瓣樣品上，經鏡檢、病組織分離、菌株純化、病原性測定、形態特徵及分子鑑定後，發現是由 *E. rostratum* 引起之花瓣斑點病。另外，因 *Exserohilum* sp. 可直接感染草生植物，造成葉斑及葉片腐爛，爾後藉由風進行傳播至石斛蘭園內，停留在芽及花瓣上。若蘭園區濕度高，則有利該病原菌孢子發芽，造成花瓣上產生病斑，進

而影響花卉品質 (Kawate & Sewake 2014)。之後，本研究仍持續監測發生本病害之蘭園及調查其他蝴蝶蘭園，並未發現類似之病害有發生現象。據此，推測本病害為偶發性，本病害發生可能與蘭園管理包含環境衛生、清潔工作等有密切關係。

測定本病原菌之寄主範圍，由接種試驗結果顯示，*E. rostratum* 不僅可危害白花、桃紅花及粉黃花蝴蝶蘭外，亦造成黃花文心蘭 (檸檬綠)、嘉德麗雅蘭及白花萬代蘭花朵上產生斑點病徵。由文獻得知，造成蘭花花朵上出現斑點病徵的病原菌除 *E. rostratum* 之外，尚有 *A. alternata*、*B. setariae*、*B. urochloae*、*B. sorokiniana*、*Bipolaris hawaiiensis*、*Curvularia* sp.、*Stemphylium* sp.、*Phyllostictina* sp.、*Nigrospora* sp. 及 *Pestalotia* sp. 等，均可造成蘭花花瓣上產生黑褐色壞疽斑點 (Blossom necrotic fleck) (Uchida & Aragaki 1979)；而其中的 *B. setariae* 不僅危害蘭花，亦可感染菊花、康乃馨、玫瑰花、天竺葵及金魚草 (Engelhard 1976a, 1976b)。在 Hsieh *et al.* (2000) 報導指出，栽培

於茭白筍田周邊的文心蘭花，會受到茭白筍胡麻葉枯病菌 (*Bipolaris zizaniae*) 危害而引起文心蘭花瓣斑點病。至於台灣地區之蘭花或其他作物之花朵上，是否受到上述病原菌之危害，或病原菌間對寄主是否有交叉感染等問題，仍有待未來持續調查釐清。另外，本研究發現本菌之分生孢子直接噴布於蝴蝶蘭老葉及嫩葉上，均不會造成任何病徵，但只要葉片上有傷口，不論是老葉或嫩葉，均會出現褐色圓形病斑，顯示傷口為本病原菌的感染途徑之一 (資料未顯示)。

本研究另測試溫度對 *E. rostratum* 菌絲菌絲生長及孢子發芽之影響，結果發現 24–32°C 為本菌菌絲可生長之溫度。其中，又以在 28°C 培養下生長較為快速，12°C 以下及 40°C 之溫度，菌絲幾乎停止生長。另外，發現在 24–36°C 無菌水存在 6 h 之情形下，所測試的兩菌株之分生孢子發芽率均可達 90% 以上，而在 20°C 及 40°C 處理下，分生孢子亦分別有 80% 以上及 65% 以上之發芽率，顯示台灣的溫暖氣候下有利於本病原菌之發芽與侵入感染。根據 Honda & Aragaki (1978) 報告指出，*E. rostratum* 於黑暗培養下，最適產孢溫度為 28–34°C。以目前在台灣蘭園中，蘭花開花期間若遇到低溫高濕環境時須注意灰黴病發生外，於高溫高濕條件下則應注意本病害之發生。

有關蝴蝶蘭花瓣斑點病的防治，目前在國內並無推薦藥劑，本研究選取目前推薦在作物真菌性葉斑病防治之藥劑，測試其對蝴蝶蘭花瓣斑點病菌菌絲生長及孢子發芽之影響。試驗結果顯示，10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度之快得寧、撲滅寧、待克利及依普同，可有效抑制 *E. rostratum* 菌絲生長，而快得寧、鋅錳乃浦、氫氧化銅及四氯異苯腈可顯著降低病原菌之孢子發芽。值得注意的是，若開花期進行藥劑防治時，應選擇透明無色之藥劑溶液進行噴灑，藥劑施用前，藥液應先行在花朵上測試，可避免於花朵上產生藥斑。

由本研究結果顯示，蝴蝶蘭花瓣斑點病之病原菌 *E. rostratum* 適合於台灣氣候條件下生長及侵染，而所栽種之蘭花品種中有許多亦屬

於感病品種，如白花、粉黃花及桃紅蝴蝶蘭、黃花文心蘭、白花萬代蘭及嘉德麗雅蘭等。因此，在蘭花進入開花期時尤應注意氣候變化，並加以預防，避免花卉品質降低。同時應避免於葉片上造成傷口，並加強蘭園區管理包含環境衛生管理及植床、栽培工具清潔等，以降低園區病原菌密度。另外，花期為本病原較易感染時期，若開花期間遇到蘭園內日夜溫度在 25°C 以上且又潮濕環境下，應加強藥劑防治，以降低園區病原菌之侵染，以達到防治本病害之目地。

誌謝

本研究承農業試驗所花卉中心戴廷恩主任提供 *Phal. Sogo Yukidian 'V3'* 品種植株；黎貴枝小姐、陳家玟小姐、陳姿瑜小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Ahmadpour, A., S. Karami, Z. Heidarian, and M. Javan-Nikkhah. 2013. *Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in Iran. *Australas. Plant Dis. Notes* 8:97–99.
- Anahosur, K. H. and A. Sivanesan. 1978. *Setosphaeria rostrata*. *CMI Descr. Pathog. Fungi Bact.* 59:587.
- Cardona, R. and M. S. González. 2007. First report of *Exserohilum rostratum* associated with rice seed in Venezuela. *Plant Dis.* 91:226.
- Chern, L. L., L. S. Jie, C. T. Feng, and W. C. Ho. 2011. First report of leaf blight on *Calathea picturata* caused by *Exserohilum rostratum* in Taiwan. *Plant Dis.* 95:1033.
- Council of Agriculture, Executive Yuan. 2006. Taiwan native butterfly orchid introduction. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan. <https://kmweb.coa.gov.tw/subject/ct.asp?xItem=6742&ctNode=1482&mp=1&kpi=0&hashid=> (visit on 6/29/2018) (in Chinese)
- Engelhard, A. W. 1976a. Pathogenicity of *Bipolaris (Helminthosporium) setariae* and *Bipolaris maydis* races T and O to carnation, geranium and snapdragon. *Plant Dis. Rep.* 60:402–405.
- Engelhard, A. W. 1976b. Pathogenicity and conditions for infection of chrysanthemum and rose flowers by *Bipolaris (Helminthosporium) setariae*. *Phytopathology* 66:389–391.

- Gauthier, G. M. and N. P. Keller. 2013. Crossover fungal pathogens: The biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans. *Fungal Genet. Biol.* 61:146–157.
- Honda, Y. and M. Aragaki. 1978. Photosporogenesis in *Exserohilum rostratum*: Temperature effects on sporulation and spore morphology. *Mycologia* 70:343–354.
- Hsieh, T. F., Y. C. Chang, and C. C. Tu. 2000. Petal spot of *Oncidium* hybridium caused by *Bipolaria zianiae*. *Plant Pathol. Bull.* 9:75–78. (in Chinese with English abstract)
- 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)
- Kawate, M. and K. T. Sewake. 2014. Pest management strategic plan for potted orchid production in Hawaii. University of Hawai'i at Mānoa, Honolulu, HI. https://ipmdata.ipmcenters.org/documents/pmsps/HI_orchid_PMSP.pdf (visit on 4/12/2018)
- Kusai, N. A., M. M. Z. Azmi, N. A. I. M. Zainudin, M. T. Yusof, and A. A. Razak. 2016. Morphological and molecular characterization, sexual reproduction, and pathogenicity of *Setosphaeria rostrata* isolates from rice leaf spot. *Mycologia* 108:905–914.
- Leonard, K. L. and E. G. Suggs. 1974. *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. *Mycologia* 66:281–297.
- Leonard, K. J. 1976. Synonymy of *exserohilum halodes* with *E. Rostratum*, and induction of the ascigerous state, *Setosphaeria rostrata*. *Mycologia* 68:402–411.
- Liu, Y. X., Y. P. Shi, and Z. Y. Cai. 2016. A first report of rubber tree leaf spot caused by *Exserohilum rostratum* in China. *Plant Dis.* 100:2167.
- Luan, F. G., S. Qiang, D. Y. Ma, and Riziwangguli. 2004. The primary studies on isolation and identification of wheat black embryo in Xinjiang. *Xinjiang Agric. Sci.* 41:357–360. (in Chinese with English abstract)
- Majeed, R. A., A. A. Shahid, G. A. Liaqat, K. Saleem, M. Asif, M. Shafiq, M. S. Haider, and M. Noreen. 2016. First report of *Setosphaeria rostrata* causing brown leaf spot of rice in Pakistan. *Plant Dis.* 100:2162.
- Sharma, K., E. M. Goss, E. R. Dickstein, M. E. Smith, J. A. Johnson, F. S. Southwick, and A. H. C. van Bruggen. 2014. *Exserohilum rostratum*: Characterization of a cross-kingdom pathogen of plants and humans. *PLOS One* 9:e108691.
- Taiwan Orchid Growers Association. 2018. *Phalaenopsis*. Taiwan Orchid Growers Association, Tainan, Taiwan. <https://www.toga.org.tw/info/1/8> (visit on 6/29/2018) (in Chinese)
- Tsai, J. N., W. H. Tsai, and J. L. Chen. 2001. Pathogenicity of *Exserohilum rostratum* on corn and weeds in the corn fields. *Plant Pathol. Bull.* 10:181–186. (in Chinese with English abstract)
- Uchida, J. Y. and M. Aragaki. 1979. Etiology of necrotic flecks on *Dendrobium* blossoms. *Phytopathology* 69:1115–1117.
- Uchida, J. Y. and M. Aragaki. 1991. Fungal Diseases of *Dendrobium* Flowers. University of Hawaii. Honolulu, HI. 7 pp.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. 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.
- Zhang, W., J. X. Liu, P. H. Huo, and T. Zhang. 2016. *Exserohilum rostratum* causes a leaf spot on hybrid bermudagrass (*Cynodon dactylon* × *C. transvaalensis*) in China. *Plant Dis.* 100:1504.

Petal Spot of *Phalaenopsis* Caused by *Exserohilum rostratum*

Chiao-Wen Huang¹, Jin-Hsing Huang², Jhih-Nung Tsai², Li-Hsiang Chung³, and Ting-Fang Hsieh^{4,*}

Abstract

Huang, C. W., J. H. Huang, J. N. Tsai, L. H. Chung, and T. F. Hsieh. 2019. Petal spot of *Phalaenopsis* caused by *Exserohilum rostratum*. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(1):47–58.

In April 2017, flower diseases of *Phalaenopsis* (Sogo Yukidian 'V3') occurred in Tainan area with the symptoms showed brown small spots on petal, sometimes sunken, and about 1 mm or less in diameter without expanding. It seriously affected quality of ornamental flowers and cut flowers. The pathogen isolated from the diseased tissue produced dark grey mycelium on potato dextrose agar (PDA). Conidium is ellipsoidal to fusiform, dark brown, and with hilum. The causative fungus was identified as *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs based on symptoms, morphological characteristics and ITS rDNA sequence. The pathogen not only harmed the white flowers of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3', but also caused symptoms on the petals of *Phalaenopsis* Queen Beer 'Mantefon', *Phalaenopsis* Green Pixie 'Ever Green', *Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel', *Cattleya* Chien Ya 'Ocean' and *Vanda* Princess 'Mikasa White'. The optimal temperature was 28°C for mycelial growth of *Exserohilum rostratum* and 24–36°C for spore germination. Mycelial growth of the pathogen was effectively inhibited more than 90% by oxine-copper, procymidone, difenoconazole and Iprodione with the concentration at 10 mg a.i. L⁻¹. Spore germination of pathogen was inhibited by oxine-copper, copper (II) hydroxide, mancozeb and chlorothalonil with the concentration at 10 mg a.i. L⁻¹. This is the first report of *Phalaenopsis* petal spot disease caused by *E. rostratum* in Taiwan.

Key words: *Phalaenopsis*, Petal spot, Fungicide screening.

Received: June 20, 2018; Accepted: September 19, 2018.

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

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

² Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow and Director, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.