

由 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之百香果果腐病

黃巧雯¹ 張詠婷² 趙若茵² 黃晉興^{3,*}

摘要

黃巧雯、張詠婷、趙若茵、黃晉興。2019。由 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之百香果果腐病。台灣農業研究 68(4):333–340。

2017年7月中旬於南投縣埔里鎮大坪頂地區之百香果果園中發現一種新病害，受害果實出現墨綠色至黑色塊斑而外圍有黃暈，病斑易擴大聯結成大範圍灰黑色並呈現凹陷的塊斑，又於塊斑上出現黑色小點（為病原菌之柄子器）。剖開果實可見果皮內側黑化且易產生黑灰色菌絲，果肉失去原有的風味。本研究自罹病果實穩定分離得到一種真菌，培養於馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar; PDA) 培養基上，該菌絲生長快速，於24°C下培養4 d後，其菌落呈現灰黑色毛絨狀，具有濃密之氣生菌絲。本菌之分生孢子初期呈卵圓形、透明、單室且細胞壁厚，逐漸轉變成褐色，中間有一隔膜且具有明顯縱紋。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子序列鑑定結果，將此菌鑑定為 *Lasiodiplodia theobromae*。經人工接種孢子懸浮液於「台農1號」百香果果實後，發現 *L. theobromae* 對百香果具有病原性，並能再分離得原接種的真菌，完成柯霍氏法測，證明此菌為引起百香果果腐病之病原菌。另外，無傷口者，則不易造成果實發生果腐病。本文由 *L. theobromae* 引起百香果果腐病，為台灣百香果病害新紀錄。

關鍵詞：百香果、果腐病、果腐病菌。

前言

百香果 (passion fruit; *Passiflora edulis* Sims.) 又稱西番果、時計果、雞蛋果，屬西番蓮科 (Passifloraceae) 西番蓮屬 (Genus *Passiflora*)，係多年生蔓性藤本的植物。原產於巴西，台灣於1901–1907年引入紫色種，目前已成為低海拔山區野果。1964年大量引入黃色種，並在彰化縣及南投縣埔里、魚池等地區推廣栽植。1975年行政院農業委員會農業試驗所之鳳山熱帶園藝試驗分所，利用紫色種與黃色種雜交，選育出具有自交親和性之雜交品種，並於1981年正式命名為「台農1號」，成為目前台灣百香果產業主要栽培品種。依行政院農業委員會農業統計資料 (<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx>) 顯示，2018年全台種植百香果面積為750 ha，年產量為25,578 Mg，其中以南投縣之栽培面積最大為559 ha。百香果除鮮食外，亦可加工製成果汁或果凍等產品。

在台灣危害百香果的病原紀錄有由 *Passionfruit woodiness virus* (PWV) 引起的木質化病毒，*Passionfruit mottle virus* (PaMV) 引起的斑紋病毒，*Passionfruit crinkle virus* (PCV) 引起的蓮葉病毒，*Cucumber mosaic virus* (CMV) 引起的胡瓜嵌紋病毒，*Athelia rolfsii* 引起的白絹病，*Botrytis cinerea* 引起的灰黴病，*Cephaleuros virescens* 引起的藻斑病，*Gloeosporium passifloricolum* 引起的黑星葉枯病，*Colltotrichum gloeosporioies* 引起的炭疽病，*Fusarium solani* 引起的頸腐病，*Sclerotinia sclerotiorum* 引起的

投稿日期：2019年4月9日；接受日期：2019年7月16日。

* 通訊作者：jhuang@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 國立中興大學植物病理學系暑期實習生。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

菌核病，以及 *Phytophthora nicotianae* 引起的疫病。另外，亦有由 *Meloidogyne incongita* 引起的根瘤線蟲 (Hsu *et al.* 2002)。而在 2017 年 7 月中旬，於南投縣埔里鎮大坪頂之腐爛果實病害樣品上，發現在罹病果實表皮上產生黑色點狀之柄子殼 (pycnidia)，經鏡檢時發現疑似 *Lasiodiplodia* 病原之孢子。爾後，將罹病組織經病原分離純化、鏡檢病原形態特徵及依柯霍氏法則 (Koch's postulates) 進行病原性測定後，確認為由 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之百香果果腐病 (fruit rot)，亦可稱黑腐病 (black rot)。本文即為此試驗報告。

材料與方法

將田間罹患果腐病之百香果果實攜回實驗室，以解剖刀切下罹病病斑之病健部組織，以 0.5% 次氯酸鈉 (NaClO) 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，置於以 2% (w/v) 水瓊脂 (water agar; WA) 平板上，待病組織長出菌絲後，以解剖刀切取菌絲尖端移到馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar; PDA) 上。經純化後，待其產孢再進行單孢分離，並將分離株 (Un-140, Un-143) 保存於 PDA 斜面培養基及無菌水中，置於 10°C 備用。

將 Un-140 及 Un-143 菌株培養於 PDA 培養基上，觀察菌落等外觀形態。並將分離株培養於表面置有木麻黃針葉之 2% WA 培養基上 (Ni *et al.* 2011)，以 24°C 定溫培養約 7 d，待其產孢後，以滅菌之針頭挑取分生孢子置於載玻片上。以光學顯微鏡 (differential interference contrast; DIC, LEICA DM 2500, Wetzlar, Germany) 進行孢子形態觀察，並以 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。分子鑑定方面，則是將分離菌株單孢培養於 PDA 培養基平板上 7 d 後，委託源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taichung, Taiwan) 進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 與 DNA 定序，使用之引子對為 ITS4 及 ITS5、EF1-688F 及 EF1-1251R (White *et al.* 1990; Alves *et al.* 2008)，分別增幅 internal transcribed

spacer (ITS) 及 translation elongation factor 1-alpha (TEF-1 α) 序列進行核酸定序。定序後序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫中進行序列分析比對，並將該序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

將分離株培養於含滅菌後木麻黃針葉之 2% WA 平板上，置於 24°C、12 h 光照下培養 7 d 後，以無菌水洗下培養皿內之分生孢子 (conidia)，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Horsham, PA) 測定孢子濃度。再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^5 spores mL⁻¹)，供接種試驗用。接種方法分別為離體 (摘下來) 及植體上之未熟果與熟果接種方式：(1) 離體之未熟果、熟果接種：購買自南投縣埔里鎮大坪頂之「台農 1 號」果實，選取未熟果及熟果果實後，先以 75% 酒精進行果實表皮消毒。接種模式分為無傷口及有傷口處理，有傷口部分以無菌之針頭在接種處上針刺製造傷口。以微量滴管吸取 Un-140 分離株之孢子懸浮液 10 μ L (約 1,000 個孢子)，分別滴於未熟果及熟果果實之無傷口及有傷口接種處。再滴上 10 μ L 已降溫但尚未凝固之 2% WA，以便將孢子懸浮液固定於接種處，每顆果實僅做一個接種點。接種後果實置於塑膠盒中保濕，並放置於室溫下 (25–30°C)，逐日觀察並記錄病徵出現之情形。每處理 10 重覆，本試驗重複進行 2 次。(2) 植體上未熟果、熟果接種：於行政院農業委員會農業試驗所溫室內種植之「台農 1 號」百香果進行植體果實接種試驗，接種模式分為無傷口及有傷口處理。接種方式如上述，並以透氣膠帶將 WA 固定於果實表面，接種後果實隨即進行套袋，以避免後續自然狀態下其他病原之感染，每處理 10 重覆。接種後每週觀察及記錄接種點之果腐病發生情形，本試驗重複進行 2 次。所有對照組均接種無菌水。接種果實發病後，將罹病組織切下以 0.5% NaClO 溶液漂洗消毒後，再以 70% 酒精消毒約 30 s，最後以無菌水漂洗 2 次。自然風乾後，再放置於 2% WA 培養基上，以確定罹病果實是否為原接種病原菌所引起，以完成柯霍氏法則。

結果與討論

本研究於 2017 年 7 月中旬於南投縣埔里鎮大坪頂之「台農 1 號」百香果之罹病果實上，觀察到果實外觀呈現腐爛、凹陷狀、出現綠黑色至黑化塊斑，病斑邊緣為淡黃褐色，但無汁液流出，無果香且果皮軟。後期病斑乾扁呈黑灰色 (圖 1A)，且在病斑上形成黑色點狀之柄子殼 (圖 1B)。若潮濕環境下，在罹病果皮上長出灰黑色黴狀物，造成果實快速腐爛。縱剖果實可見果肉內呈現黑灰色，果肉依附之膜易與果皮分離，嚴重是果肉內長出灰白色菌絲 (圖 1C-E)。

百香果果腐病菌培養於 PDA 培養基上，經 24°C 黑暗培養 4 d 後，其菌落呈現灰白色，

後期顏色漸深至灰黑色，且有濃密之氣生菌絲 (圖 2A)。由柄子殼產生之分生孢子，初期呈卵圓形、透明無色單室且細胞壁厚，為未成熟孢子 (immature conidia) (圖 2B)；後期轉為褐色、卵圓形，中間有隔，孢子具有縱紋，為成熟孢子 (mature conidia) (圖 2C)。本研究所分離菌株之未成熟孢子及成熟孢子，其大小分別為長寬 $(24.81 \pm 1.30) \mu\text{m} \times (13.39 \pm 0.73) \mu\text{m}$ 及 $(22.58 \pm 1.58) \mu\text{m} \times (12.59 \pm 0.89) \mu\text{m}$ ，長寬比平均分為 1.85 及 1.79 。為進一步確認菌株種的鑑定，將兩分離株 (Un-140、Un-143) 之 ITS (Accession No. 分別為 MG814039 及 MG814040) 及 TEF-1 α (MN114119 及 MN114120) 與 NCBI 基因資料庫進行分析比對，發現供試菌株均與 GenBank 上所登錄 Lyc8 strain 之

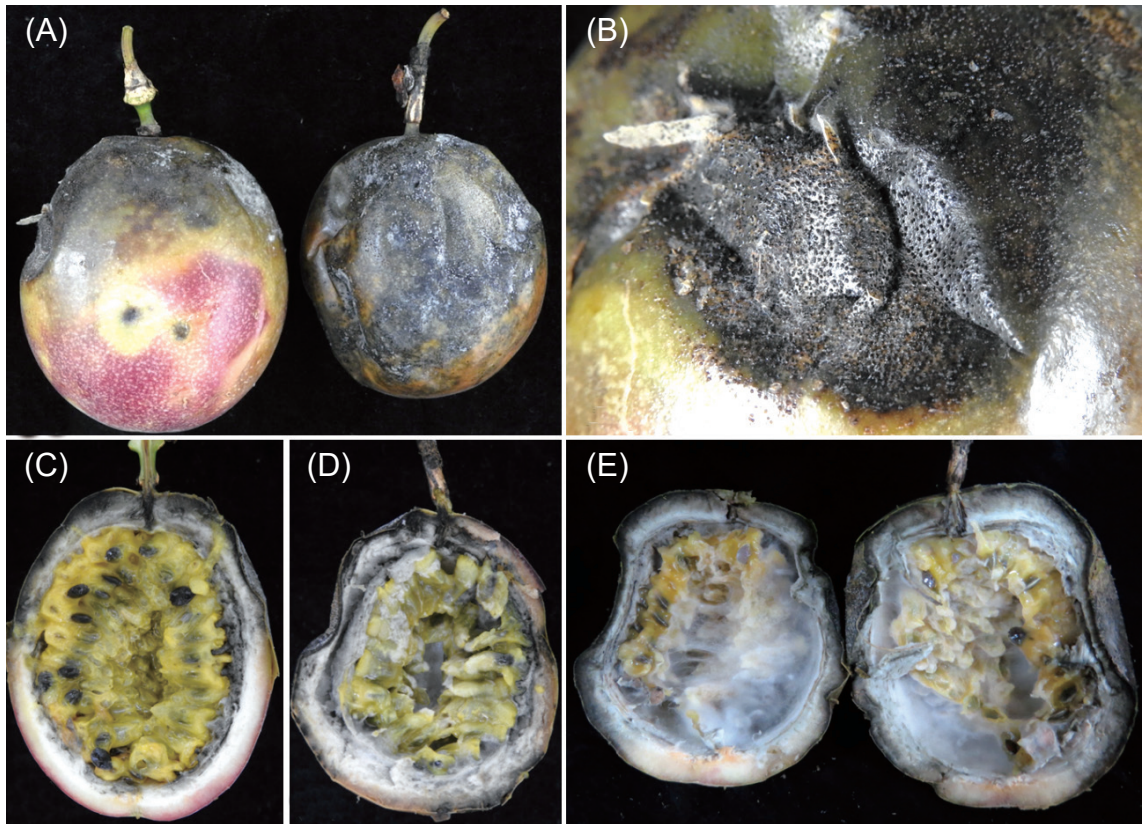


圖 1. 百香果果腐病病徵。(A) 黑色塊斑而外圍有黃暈及大面積的壞疽，(B) 於罹病果實表皮上產生點狀之黑色柄子殼 (pycnidia) 構造，(C、D) 罹病果實內部果肉黑化，並常有 (E) 灰色菌絲產生。

Fig. 1. Fruit rot symptoms of passion fruit. (A) Black spot with yellow halo and necrosis, (B) dark pycnidia on infected fruit surface, and (C, D) blackened flesh inside the infected fruit with (E) an abundance of gray mycelia.

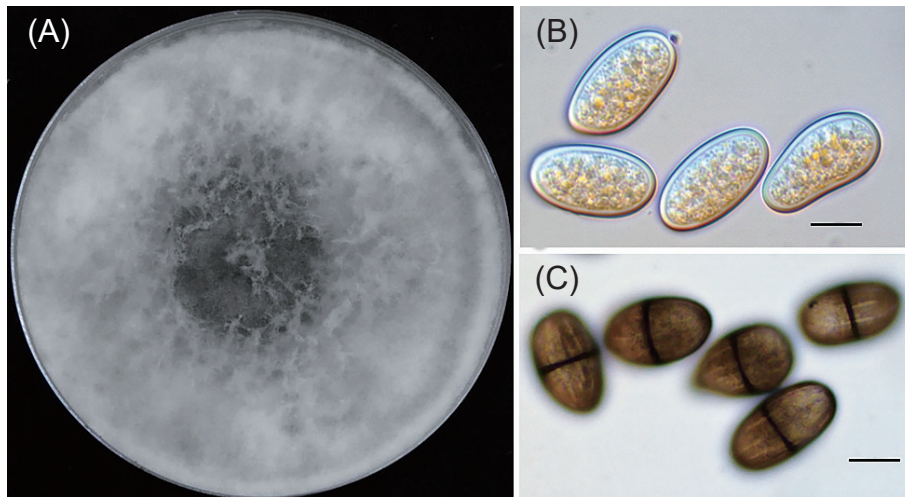


圖 2. 百香果果腐病菌之菌落及分生孢子形態。(A) 百香果果腐病菌於 PDA 培養基上於 24°C 培養 4 d 後的菌落形態；(B) 透明未成熟孢子；(C) 內具橫格及縱格之褐色成熟孢子。標尺 = 10 μm 。

Fig. 2. Colony and conidial morphology of *Lasiodiplodia theobromae*. (A) Colony of *L. theobromae* on PDA at 24°C after cultured for 4 d; (B) hyaline immature conidia; and (C) brown mature conidia with septa. Bars denote 10 μm .

ITS (KX013185) 及 CMM 0499 strain 之 TEF-1 α (MH632293) 之序列具有 100% 之相同度。

為了進一步測定其病原性，本研究將 *L. theobromae* Un-140 分離株之孢子懸浮液分別接種於離體及植體上之未熟果與熟果。結果顯示，分離株以孢子懸浮液接種於以針刺製造傷口處理之離體之未熟果，接種 3 d 後，果實果色開始慢慢轉為淡紫色，但還未見病徵產生。接種 7 d 後，未熟果之青綠色果實已轉色為熟果實果色，在果實接種點開始出現黑褐色病斑，以手指按壓果實，果皮軟化腐爛現象，剖開果實可見果皮內側產生灰黑色病斑。而在離體之熟果有傷口處理下，於接種 2 d 後，果實於接種點開始產生水浸狀病斑。爾後病斑逐日擴大，約 7 d 整個果實完全腐爛，剖開果實可見果皮內側產生一圈灰黑色病斑 (圖 3)。另外，於植體上接種方式下，*L. theobromae* Un-140 以孢子懸浮液接種於以針刺製造傷口處理之未熟果與熟果果實上，分別於接種後約 7–14 d 及 5–7 d 果實逐漸掉落。其中，發現未熟果果實逐漸轉色，但未觀察到病徵產生。將掉落果實採收，置於室溫約 2 wk 後，不僅未熟果

轉色為熟果或是原本熟果之傷口處理下，皆可在果實上接種點開始出現水浸狀、果皮軟化現象，黑灰色病斑出現。爾後病斑逐漸擴大，果實表皮會皺縮，導致果實完全腐爛。縱剖罹病果實，可見果皮內側產生明顯灰黑色、毛絨狀菌絲，果肉與種子明顯分離、不飽滿，聞起來略帶酸腐味道 (圖 4A–4B、圖 4E–4F)。對照組則是以無菌水處理之未熟果及熟果上，均未見病斑產生 (圖 4C–4D、圖 4G–4H)。另外，無傷口處理下之離體或植體果實，皆未觀察到果實上有病斑產生。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，並完成柯霍氏法則，證實本研究所分離之 *L. theobromae* 對百香果果實具有病原性。

L. theobromae (Pat.) Griffon & Maubl. 有性世代為 *Botryosphaeria rhodina* (Cooke) Arx.，其寄主植物種類繁多，可感染熱帶及亞熱帶之木本植物與果樹，如酪梨、香蕉、櫻桃、腰果、柑橘、木瓜、番石榴、椰子樹等 (Ismail *et al.* 2012; Marquest *et al.* 2013)，所造成之病徵有頸腐 (collar rot)、梢枯 (die-back)、蒂

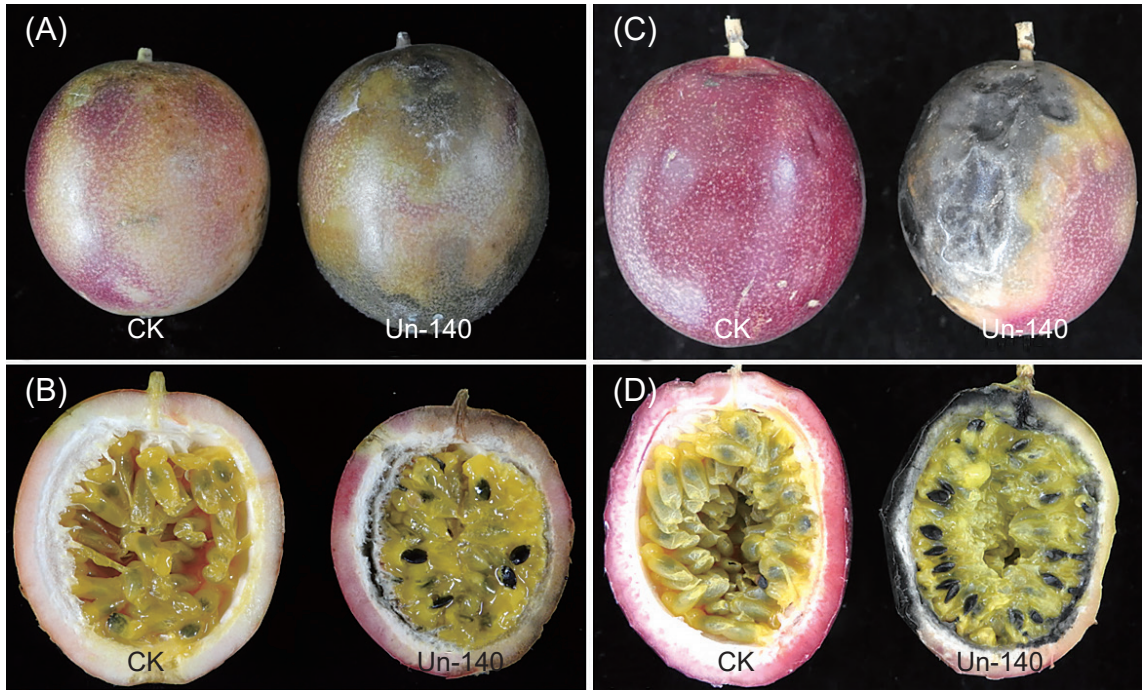


圖 3. 百香果果腐病菌 (*Lasiodiplodia theobromae* Un-140) 分別接種於離體 (摘離植株) 的 (A、B) 未熟及 (C、D) 熟果上所呈現之病徵。

Fig. 3. Symptoms of light brown or dark brown lesions on fruit after inoculating with conidia suspension of *Lasiodiplodia theobromae* Un-140 through wounds on detached (A, B) immature fruit and (C, D) mature fruits.

腐病 (stem end rot)、果腐、根腐 (root rot) 及流膠 (gummosis) 等 (Punithalingam 1976)。在台灣，已知 *L. theobromae* 是木瓜蒂腐病、酪梨蒂腐病、椪果果腐病、香蕉黑腐病、番石榴果腐病之病原菌 (Hsu *et al.* 2002; Wang *et al.* 2007; Ni *et al.* 2011; Ni *et al.* 2012)，本研究顯示亦為百香果果腐病之病原菌。另外，本研究將 *L. theobromae* 之孢子懸浮液接種於離體或植體之未成熟及熟果實上，結果得知在果實成熟後，有傷口處理下其分生孢子接種點確實造成黑綠色病斑、果實腐爛凹陷狀之發生；然而，在無傷口處理下，雖然有分生孢子的存在仍無法感染熟果實，顯示傷口是造成果實發生果腐病主要原因。因此，若要降低田間果腐病病害發生，於田間管理作業及採收運輸過程，應避免傷口的產生是防治本病害發生之重要策略之一。

綜合言之，*L. theobromae* 會造成百香果果實果腐病發生，傷口是造成果實發生果腐病主要原因，應避免在田間管理作業及採收運輸過程造成果實傷口產生。未來可進一步篩選適當的防治藥劑，並進行百香果果腐病原之流行病學研究，以期降低本病害對台灣百香果產業之威脅性。

誌謝

本研究工作承行政院農業委員會農業試驗所農場管理組吳錫家副研究員提供「台農 1 號」百香果果實給予接種試驗，張立詳小姐與曾淑瓊小姐協助試驗進行，特此致謝。

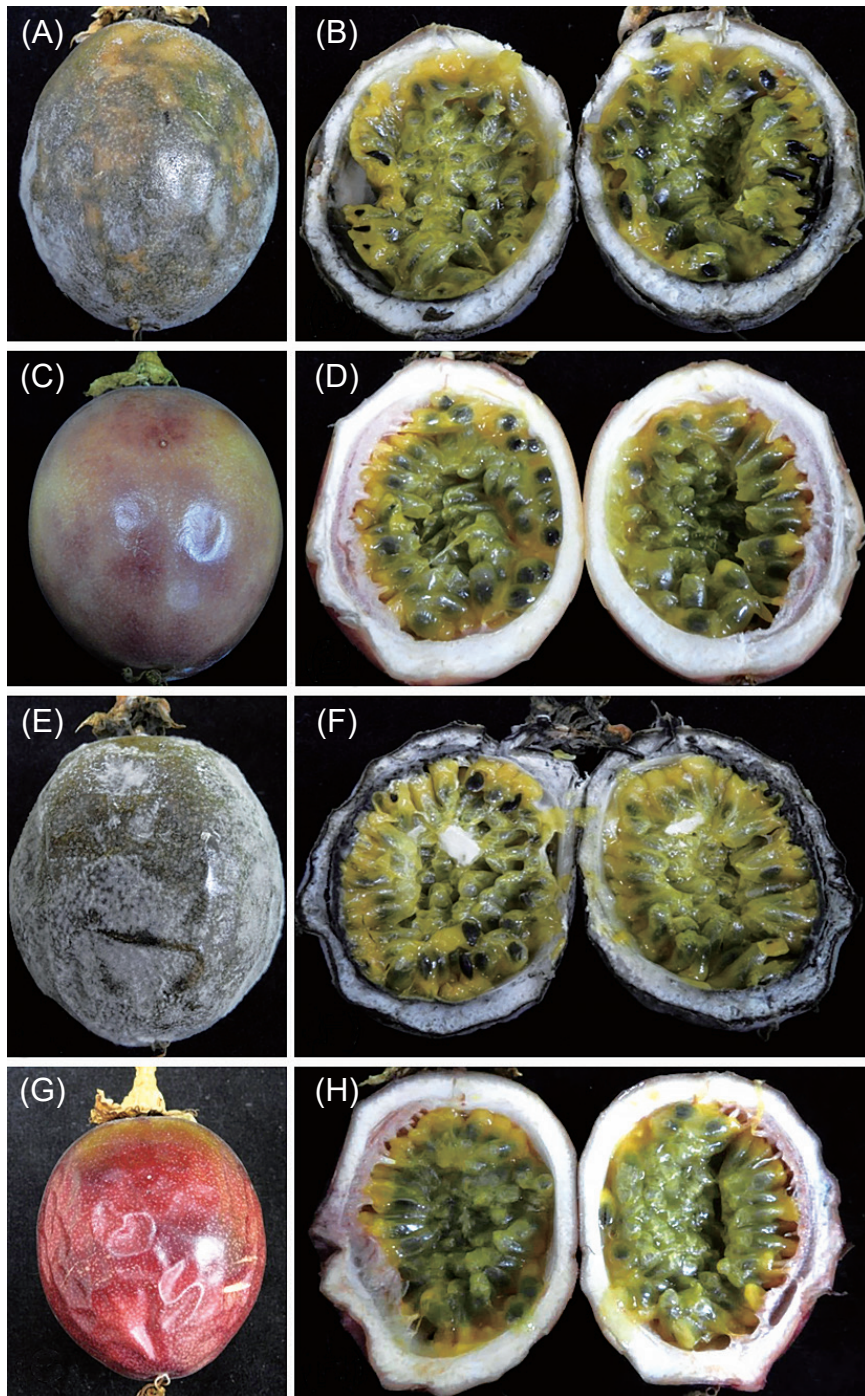


圖 4. 百香果果腐病菌 (*Lasiodiplodia theobromae* Un-140) 分別接種於植體上 (A、B) 未熟果及 (E、F) 熟果果實上之病徵表現，以無菌水接種為對照組之 (C、D) 未熟果及 (G、H) 熟果。

Fig. 4. Fruit rot symptoms appeared on fruits which still grew on plants after inoculation of *Lasiodiplodia theobromae* Un-140. Symptoms of light-brown, dark brown or grey to black lesions on (A, B) immature fruit and (E, F) mature fruit after inoculation with conidia suspension of *L. theobromae* with wound treatment. Treatments inoculated with water on (C, D) immature fruit with (G, H) mature fruit as control.

引用文獻

- Alves, A., P. W. Crous, A. Correia, and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers.* 28:1–13.
- 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)
- Ismail, A. M., G. Cirvilleri, G. Polizzi, P. W. Crous, J. Z. Groenewald, and L. Lombard. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australas. Plant Pathol.* 41:649–660.
- Marquest, M. W., N. B. Lima, M. A. de Morais Jr, M. A. G. Barbosa, B. O. Souza, S. J. Michereff, A. J. L. Phillips, and M. P. S. Câmara. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Divers.* 61:181–193.
- Ni, H. F., M. F. Chuang, S. L. Hsu, S. Y. Lai, and H. R. Yang. 2011. Survey of *Botryosphaeria* spp., causal agents of postharvest disease of avocado, in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 60:157–166. (in Chinese with English abstract)
- Ni, H. F., H. R. Yang, R. S. Chen, R. F. Liou, and T. H. Hung. 2012. New *Botryosphaeriaceae* fruit rot of mango in Taiwan: Identification and pathogenicity. *Bot. Stud.* 53:467–478.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. *CMI Descr. Pathog. Fungi Bact.* 519:1–2.
- Wang, H. L., P. H. Chen, H. F. Ni, and R. S. Chen. 2007. Physiological characterization and screen of control chemicals for *Lasiodiplodia theobromae* of papaya. *Plant Pathol. Bull.* 16:71–77.
- 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. Snirsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp.

Fruit Rot of Passion Fruit Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan

Chiao-Wen Huang¹, Yu-Ting Chang², Je-Yin Chao², and Jin-Hsing Huang^{3,*}

Abstract

Huang, C. W., Y. T. Chang, J. Y. Chao, and J. H. Huang. 2019. Fruit rot of passion fruit caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(4):333–340.

A new disease caused by fruit rot of passion fruit (*Passiflora edulis*) was found in major passion fruit production areas at Puli Township, Nantou County of Taiwan in 2017. The infected fruits showed dark green to black patches with yellow halo. The lesions usually enlarged and joined into a large black and sunken patch with the appearance of black dots (the pycnidia of the pathogen). The flesh inside was blackened with soar flavor and easy to produce black gray hyphae. A kind of fungus was consistently isolated from the diseased tissue. The mycelium of the fungus grew rapidly on potato dextrose agar and formed a grayish-black fluffy colony with dense aerial hyphae at 24°C after being cultured for 4 d. The conidia of the fungus were initially oval, hyaline, unicellular and had thick cell wall, but days later showed dark-brown color and developed one septum with longitudinal lines. The causative fungus was identified as *Lasiodiplodia theobromae* based on morphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) rDNA sequence blasting on National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database. The identified *L. theobromae* could cause similar symptoms on the fruits on trees and the detached fruits by inoculating the tested fruits with conidia suspension through wound treatment, and the same pathogen could be re-isolated from the diseased fruit tissue to fulfill the Koch's rules. Immature and mature passion fruit could show disease symptoms when inoculated with *L. theobromae* through wound treatment but no symptom was found to those without wound treatment. This study is the first report about fruit rot of passion fruit caused by *L. theobromae* in Taiwan.

Key words: Passion fruit, Fruit rot, *Lasiodiplodia theobromae*.

Received: April 9, 2019; Accepted: July 16, 2019.

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

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

² Summer Internship Students, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

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