

台灣南部地區番石榴園炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 多樣性及對殺菌劑之敏感性

蔡舜隍^{1*} 陳冠姣² 黃健瑞³

摘要

蔡舜隍、陳冠姣、黃健瑞。2021。台灣南部地區番石榴園炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 多樣性及對殺菌劑之敏感性。台灣農業研究 70(2):140–156。

番石榴炭疽病是番石榴果實採收期至採收後其中一種重要病害，本研究主要目的在於瞭解目前發生在番石榴園之炭疽病菌族群的主要種類，以及探討這些炭疽病菌族群對核准用來防治炭疽病殺菌劑之敏感性。本試驗於2019–2020年間至南部番石榴主要產區採集番石榴炭疽病，採集部位包括無病微葉片及已產生病斑之病果，將15分離株分別接種至「珍珠拔」果實。結果顯示，在有傷口的情況下，大部分菌株皆可造成不同程度的果腐病徵，其中分離自果實菌株的致病力普遍比分離自無病微葉片強。為了確認所分離之炭疽病菌種類，將 internal transcribed spacer (ITS)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)、 β -tubulin 2 (*TUB2*)、chitin synthase 1 (*CHS-1*) 及 calmodulin (*CAL*) 5 個基因序列作定序並建構親緣樹。由建構之番石榴炭疽病族群親緣樹顯示，台灣番石榴炭疽病至少包含 *Colletotrichum siamense*、*Colletotrichum fruticola* 與 *Colletotrichum tropicale* 等3種。由藥劑試驗結果顯示，*C. siamense*、*C. fruticola* 對 benzimidazoles 類及 strobilurins 類藥劑普遍呈現不敏感；而 *C. tropicale* 對 benzimidazoles 類藥劑具敏感性，但對 strobilurins 類藥劑呈不敏感，因此 *C. tropicale* 相對於其他兩種炭疽病菌對 benzimidazoles 藥劑具敏感度的差異性。另外，當藥劑濃度 100 mg a.i. L⁻¹ 時，克熱淨及鋅錳乃浦可完全抑制3種炭疽病菌菌絲生長，當藥劑濃度 1 mg a.i. L⁻¹ 時，僅腐絕快得寧及腈硫醃可顯著抑制3種炭疽病菌孢子發芽。由以上藥劑試驗結果，可提供農民在田間綜合防治管理炭疽病的參考。

關鍵詞：番石榴、炭疽病菌、族群親緣分析、藥劑敏感性。

前言

番石榴 (*Psidium guajava* L.) 為桃金娘科 (Myrtaceae) 番石榴屬 (*Psidium*) 之熱帶果樹，在台灣各地廣泛種植，近幾年栽培面積多維持在 7,000 多公頃。根據 2018 年農業統計年報 (<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>)，番石榴栽培面積 7,442 ha，年產量約 176,304 Mg，由栽種面積多寡區分，主要栽培地區依序為高雄市 (2,694 ha)、台南市 (1,467 ha) 及彰化縣 (1,258 ha)。主要栽培品

種有「珍珠拔」、「帝王拔」、少數紅肉品種番石榴及「水晶拔」，其餘品種因產量、栽培管理容易度及市場接受度等問題而僅有零星栽培。

在國外，番石榴病害已知被記載的約有 177 種，其中有 167 種病原菌屬於真菌，因此大多數番石榴病害由真菌所引起，其餘的分別是由線蟲、細菌及寄生性藻類危害 (Misra 2004)。在台灣，根據《台灣植物病害名彙》(第五版) 有記錄的病害約 39 種，真菌及類真菌病害約 15 種，線蟲 24 種 (Tzeng *et al.* 2019)。

投稿日期：2020 年 12 月 18 日；接受日期：2021 年 3 月 8 日。

* 通訊作者：aotatsai@fthes-tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。

² 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系計畫助理。台灣 高雄市。

³ 國立嘉義大學植物醫學系副教授。台灣 嘉義市。

台灣地區番石榴病害，由受害部位區分，全株性感染有 *Nalanthamala psidii* 引起的立枯病，可造成植株死亡；根部病害有立枯病及根瘤線蟲 (*Meloidogyne* sp.)；莖幹及枝條有 *Lasiodiplodia theobromae* 引起的莖潰瘍病及 *Phytophthora nicotianae* 造成的疫病；葉部病害有藻斑病、葉斑病及煤煙病；果實病害有黑星病 (病原 *Phyllosticta psidiicola*)、瘡痂病 (病原 *Pestalotiopsis psidii*)、炭疽病 (病原 *Colletotrichum* sp.)、黑腐病 (病原 *L. theobromae*) 及疫病 (病原 *Phytophthora parasitica*)。

番石榴炭疽病根據早期文獻只記載由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (1882) 單一菌株所引起 (Penzig 1882), Von Arx (1957) 及 Sutton (1980) 曾利用炭疽病菌分生孢子之形狀及大小區分 *C. gloeosporioides*，但其分類之依據以現在來看仍不淺顯易懂。在分子生物工具尚未普及前，炭疽病菌屬 (*Colletotrichum*) 的分類通常依據寄主的不同、分生孢子的形狀與大小、附著器的形狀、有無剛毛 (setae)、在培養基的顏色及生長速度等，但真菌培養在不同培養基、不同溫度之生長條件或是重複繼代下會產生變異，於形態鑑定上會有受限的情形。根據國外文獻指出，*C. gloeosporioides* 為一複合種 (species complex)，對於 *C. gloeosporioides* 這個演化支而言，若單純只以 internal transcribed spacer (ITS) 序列去比對仍不足以將之區分開來，以串連的基因序列進行分析，包括 actin (*ACT*)、calmodulin (*CAL*)、chitin synthase 1 (*CHS-1*)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 及 ITS。利用這些基因比對後所構築出的親緣關係樹，顯示該複合種內可再細分成 22 個種及 1 個亞種 (Weir *et al.* 2012)。

在田間炭疽病的防治，目前仍是以化學防治為主。有鑑於近來農民反應使用現行核准藥劑達不到以往之防治效果，且國內外已有多篇報導炭疽病對不同作用機制殺菌劑之抗藥性已在田間被發現，例如台南芒果炭疽病多數菌株對 benzimidazoles 類殺菌劑 [包括貝芬替 (carbendazim)、免賴得 (benomyl) 及腐絕 (thiabendazole)] 產生不同程度藥劑感受性降低的情形 (Lou *et al.* 2010)；而在國外，*Col-*

letotrichum acutatum 及 *C. gloeosporioides* 引起的蘋果苦腐病 (apple bitter rot) 已對泛醌氧化酶抑制劑 [如亞托敏 (azoxystrobin)、三氟敏 (trifloxystrobin)、克收欣 (kresoxim-methyl)、凡殺同 (famoxadone) 等類] 產生抗藥性 (Chechi *et al.* 2019)。

本研究探討的重點，在於瞭解目前在番石榴植株流行之炭疽病菌種類及其分群，以及測試各個分群之菌株對於現行核准藥劑之敏感性，俾進行抗藥性監測並提供試驗結果作為抗藥性管理之參考。

材料方法

供試菌株分離培養及保存

自屏東縣新園鄉，高雄市燕巢區、大社區、阿蓮區，台南市山上區，分別採集番石榴果實及無病徵之葉片。將具有褐色病徵之果實以滅菌後之解剖刀切取病組織邊緣，病組織以 1% 次氯酸鈉水溶液消毒 3 min，再以 70% 酒精水溶液浸漬 1 min，之後以無菌水漂洗病組織 3 次，移至已滅菌的擦手紙。待病組織水分吸乾後，移至 2% (w/v) 水瓊脂 (water agar; WA) 培養。經於 25°C 培養 3 d 後，切取菌絲尖端移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 培養基培養。待產孢後，將孢子塗布於 3% 水瓊脂平板培養基進行單孢分離，將菌株培養於 PDA 斜面，置於室溫備用。

無病徵葉片之分離，以自來水清洗葉片表面，使用 95% 酒精浸漬 1 min，接著 3% 次氯酸鈉水溶液浸泡 5 min，再以 75% 酒精浸泡 30 s，以無菌水清洗 2 次。最後，以滅菌後的解剖刀切取葉片組織 (Dauanla-Meli *et al.* 2013)，移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 25°C 培養約 7 d，從葉片長出之炭疽病菌落切取至新的 PDA 平板，待產孢後挑取單孢至 PDA 斜面備用。

炭疽病菌以矽膠粒 (silica gel) 進行長期保存，將矽膠粒盛於可密閉之凍菌小管內，矽膠粒約 7–8 分滿即可。高壓滅菌釜滅菌後，以無菌移植環挑取分生孢子堆之孢子移入 400 μ L 7.5% (w/v) 脫脂牛奶，做成真菌孢子濃縮懸浮液。再吸取 350 μ L 懸浮液加入盛有矽膠粒之

凍菌小管內，並上下搖動凍菌小管使矽膠粒與懸浮液混合均勻，置於 -20°C 保存，7 d 後取少量矽膠粒測試保存之菌有無活力。

炭疽病菌接種及病原性測定

從 PDA 斜面保存管切取一小塊菌絲，置於 PDA 培養基培養約 3 d 後，切取菌絲尖端至 Murashige & Skoog (MS) 平板培養基 (modified Mathur's medium + 0.1% yeast extract + 0.1% Bacto™ peptone + 1% sucrose + 0.25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.27% KH_2PO_4 + 2% agar) (Tu 1985) 培養約 1 wk 等待產孢。再以無菌水洗下孢子，利用血球計數器計算孢子濃度，調整濃度為 1×10^6 conidia mL^{-1} ，作為果實接種源。供試菌株來自屏東縣新園鄉、高雄市燕巢區、大社區等地區之罹病果所分離之炭疽病菌，以市場購得之新鮮「珍珠拔」果實做接種試驗。先以 1% 次氯酸鈉消毒果實表面，再以沾濕無菌水之滅菌擦手紙擦拭乾淨，以消毒之解剖刀切出長、寬與深約 1 mm 的傷口，將 10 μL 孢子懸浮液滴在傷口處，同一個果實做 3 重複，並以無菌水作為對照組。置於 25°C 黑暗培養 1 wk 後，量取果實接種處的病斑直徑，本試驗共重複 2 次。

各菌株之 DNA 萃取及聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)

試驗於 PDA 平板培養 10 d 的菌株，刮下菌絲後，以 genomic DNA extraction kit (Nau-

tia Gene, Taipei, Taiwan) 抽取 DNA，再利用專一性引子對 (表 1) 進行 PCR 反應擴增 ITS (White *et al.* 1990), *GAPDH* (Guerber *et al.* 2003), *CHS-1* (Carbone & Kohn 1999), β -tubulin 2 (*TUB2*) (O'Donnell & Cigelnik 1997) 及 *CAL* (O'Donnell *et al.* 2000) 等 5 個基因片段，並將 PCR 產物送交定序 (Genomics, New Taipei, Taiwan)。獲得的基因片段序列，以 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 的 Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) 功能進行序列比對。

親緣關係樹之建立

將各菌株的序列，與 *C. gloeosporioides* 種群中的各種菌株的 ITS、*GAPDH*、*TUB2*、*CHS-1* 及 *CAL* 基因片段序列，進行多基因序列分析 (Weir *et al.* 2012)，各參考菌株的序列取自 NCBI 基因庫 (Genbank)。以 MEGA 10 軟體進行序列親緣分析，序列先用 ClustalW 軟體進行排併及適當調整後，再以 maximum likelihood 法進行親緣分析，以瞭解供試菌株與已知 *C. gloeosporioides* 種群中的各菌種的親緣性。

炭疽病菌之形態觀察

將單孢培養之供試菌株繼代至 PDA 平板培養基，於 25°C 生長箱 12 h 光照/12 h 黑暗培

表 1. 本研究所使用引子對序列及參考資料來源。

Table 1. The loci and the primers used in this study.

Gene ^z	Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Reference
ITS	ITS1	Forward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> (1990)
<i>GAPDH</i>	GDF	Forward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Guerber <i>et al.</i> (2003)
	GDR	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Guerber <i>et al.</i> (2003)
<i>TUB2</i>	T1	Forward	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	T2	Reverse	TAG TGA CCC TTG GCC CAGT TG	O'Donnell & Cigelnik (1997)
<i>CAL</i>	CL1	Forward	GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC	O'Donnell <i>et al.</i> (2000)
	CL2A	Reverse	TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC	O'Donnell <i>et al.</i> (2000)
<i>CHS-1</i>	CHS-79F	Forward	TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG	Carbone & Kohn (1999)
	CHS-345R	Reverse	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG	Carbone & Kohn (1999)

^z ITS: internal transcribed spacer; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *TUB2*: β -tubulin 2; *CAL*: calmodulin; *CHS-1*: chitin synthase 1.

養，10 d 後拍攝記錄培養皿的正反面。分生孢子的觀察，則是取自各供試菌株於 PDA 培養基上分生孢子盤產生的分生孢子，於光學顯微鏡 [Nomarski differential interference contrast (DIC), BX51, Olympus, Tokyo, Japan] 以量測攝像系統 (metric camera) 測量 50 個各供試菌株分生孢子大小。另以玻片培養技術 (slide culture technique) 觀察附著器的形狀，於切塊之 1 cm² 無菌馬鈴薯葡萄糖瓊脂周圍接種菌絲，並蓋上無菌之蓋玻片。置於室溫培養 14 d 後，取下蓋玻片，置於滴有乳酸的載玻片上觀察附著器。

藥劑對 3 種番石榴炭疽病菌菌絲生長之影響

以目前現有番石榴炭疽病核准藥劑，進行藥劑對菌絲生長抑制的測試。選擇不同作用機制共 13 種核准藥劑 (附錄 1)，分別配製成 3 種濃度：1、10 及 100 mg a.i. L⁻¹，並以未添加藥劑之 PDA 平板培養基作為對照組。將供試菌株 *Colletotrichum siamense* SYCo3、*Colletotrichum fructicola* YCCo5、*Colletotrichum tropicale* ALCo2 從 PDA 斜面移至新鮮的 PDA 培養基，室溫培養約 7 d。以滅菌之打孔器 (孔徑 0.5 cm) 切取菌絲塊，將菌絲塊以面向下的方式移至含不同濃度藥劑之 PDA 平板的中央，置於 25°C 生長箱 12 h 光照/12 h 黑暗培養。待對照組長滿培養皿後，測量對照組及藥劑處理組菌落直徑，並以下列公式計算菌絲生長抑制率 (%)：[(對照組平均生長直徑 - 藥劑處理組平均生長直徑)/對照組平均生長直徑 × 100%。每菌株每藥劑濃度共 4 盤培養皿，本試驗共重複 2 次。

藥劑對 3 種番石榴炭疽病分生孢子發芽之影響

以有效成分 10 mg a.i. L⁻¹ 及 1 mg a.i. L⁻¹ 藥劑濃度，測試對不同種之番石榴炭疽病發芽影響。以無菌微量吸管吸取 25 μL 含不同藥劑之溶液 (濃度 20 mg a.i. L⁻¹)，置於載玻片上，再以無菌微量吸管吸取 25 μL 供試之 *C. siamense* SYCo3、*C. fructicola* YCCo5、*C. tropicale* ALCo2 孢子懸浮液 (1 × 10⁵ conidia mL⁻¹)，

含 0.50 % 葡萄糖，滴於上述含農藥之液滴內，混合均勻，使最終農藥有效成分為 10 mg a.i. L⁻¹，葡萄糖最終濃度 0.25%。另以無菌微量吸管吸取 25 μL 含不同藥劑之溶液 (濃度 2 mg a.i. L⁻¹)，置於載玻片上，再以無菌微量吸管吸取 25 μL 供試之 SYCo3、YCCo5、ALCo2 菌株孢子懸浮液 (1 × 10⁵ conidia mL⁻¹)，含 0.5% 葡萄糖，滴於上述含農藥液滴內，混合均勻，使最終農藥有效成分為 1 mg a.i. L⁻¹，葡萄糖最終濃度 0.25%。供試載玻片置於加有無菌水之玻璃培養皿，將玻璃培養皿置於 25°C 生長箱下黑暗培養，經過 18 h 後於顯微鏡逢機計算 100 個孢子之發芽數，發芽率公式如下：(藥劑處理組孢子發芽個數/對照組孢子發芽個數) × 100%。每個處理 1 皿 3 重複，本試驗重複 2 次，共 6 重複。以含 0.25% 葡萄糖之無菌水處理做為對照組。

統計分析

藥劑試驗數據以 SAS 軟體進行單因子變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，而後於 5% 顯著水準下以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 比較同一處理間平均值之差異。

結果

番石榴炭疽病病徵及分離培養結果

2019–2020 年間，自南部地區 (包括屏東縣新園鄉、高雄市燕巢區、大社區、阿蓮區，以及台南市山上區) 將田間疑似炭疽病菌感染的病果及無病徵葉片作例行性採樣及分離培養，從不同品種番石榴分離的炭疽病菌株共有 15 株 (表 2)。炭疽病菌在果實上的病徵，主要是產生不規則或接近圓形褐色病斑 (圖 1A 紅色箭頭，圖 1B 紅圈處)，在高濕的環境下於病斑中心處會產生鮭魚肉色或是深橘色之分生孢子堆。另外，有時候病斑在一小點時會在周圍產生紅色暈環 (圖 1A 黃色箭頭)，病斑中央則明顯凹陷，於凹陷處產生大量分生孢子，當病斑數量多時會融合在一起。至於採集之無明顯病徵葉片 (圖 1C)，經消毒後，葉片組織於 PDA 培養基上產生不同型態之菌落，炭疽病

表 2. 自無病徵葉片及番石榴果實分離之炭疽病各菌株之病原性及毒力。

Table 2. Pathogenicity and virulence of *Colletotrichum* strains isolated from symptomatic guava fruit and symptomless leaves.

Isolate	Location	Part	Symptom	Virulence ²	Cultivar of guava
YCCo1	Yanchao, Kaohsiung	Fruit	Brown rot	+++	'Zhen-zhu Ba'
YCCo2	Yanchao, Kaohsiung	Fruit	Brown rot	+	'Zhen-zhu Ba'
YCCo3	Yanchao, Kaohsiung	Fruit	Brown rot	++	'Zhen-zhu Ba'
YCCo4	Yanchao, Kaohsiung	Fruit	Brown rot	+++	'Zhen-zhu Ba'
YCCo5	Yanchao, Kaohsiung	Leaf	Symptomless	++	Guava 'TNG1'
YCCo6	Yanchao, Kaohsiung	Leaf	Symptomless	++	Guava 'TNG1'
SYCo1	Sinyuan, Pingtung	Fruit	Brown rot	+++	'Shui-jing Ba'
SYCo2	Sinyuan, Pingtung	Fruit	Brown rot	+++	'Shui-jing Ba'
SYCo3	Sinyuan, Pingtung	Fruit	Brown rot	+++	'Shui-jing Ba'
SYCo4	Sinyuan, Pingtung	Fruit	Brown rot	++	'Shui-jing Ba'
ALCo1	Alien, Kaohsiung	Pedicle	Symptomless	++	'Hong Zuan'
ALCo2	Alien, Kaohsiung	Fruit	Brown rot	+++	'Hong Zuan'
ALCo3	Alien, Kaohsiung	Fruit	Brown rot	++	'Hong Zuan'
SSCo1	Shanshang, Tainan	Leaf	Symptomless	+	'Hong Zuan'
DSCo1	Dashe, Kaohsiung	Leaf	Symptomless	+	'Bai Ba'

² The virulence of each isolate is distinguished by the diameter of the lesions. Disease scale bar is as follow: -, 0 mm; +, < 15mm; ++, 15–20 mm; and +++, > 20 mm.

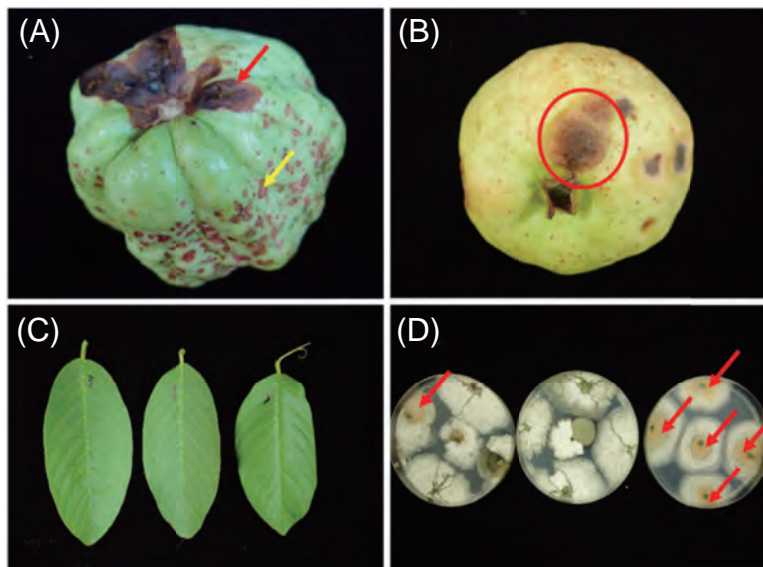


圖 1. (A) 「水晶拔」果實由 *Colletotrichum* sp. 所引起之炭疽病病徵，果頂為不規則之褐色病斑，病斑中央呈黑褐色凹陷（紅色箭頭），果身之小斑點周圍有紅色暈環，中央呈褐色凹陷狀（黃色箭頭）；(B) 「紅鑽」品種果實之炭疽病病徵，呈圓形至不規則形之病斑（紅圈處）；(C) 「珍珠拔」之無病徵葉片；(D) 以嚴苛消毒方法分離培養之炭疽病菌落（紅色箭頭）。

Fig. 1. (A) Symptoms of anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. with irregular brown spots and dark brown sunken lesion at the center of cv. 'Shui-jing Ba' (red arrowed). Sometimes there are small brown sunken spots with red haloes on pericarp. (yellow arrowed). (B) Rounded to irregular lesion (red circle) of anthracnose on the fruit of cv. 'Hong Zuan'. (C) Symptomless leaves of cv. 'Zhen-chu Ba'. (D) Colonies of *Colletotrichum* sp. (red arrowed) isolated from symptomless leaves after strict disinfection.

菌之菌落通常會在中央產生橘色之分生孢子堆(圖 1D 紅色箭頭)。若無孢子,菌落正面通常呈白色毛絨狀,背面會產生淡灰色之色素,但仍有誤判可能,須進一步將之繼代培養至 MS 產孢培養基鏡檢後確認。

炭疽病菌接種及病原性確認

將各地區感染不同番石榴品種及不同組織獲得之炭疽病菌株進行收集保存,為確認其病原性,以「珍珠拔」作為接種供試品種,其結果如表 2 所示。自具病徵果實或無病徵葉片之菌株,皆可造成番石榴產生不同程度的褐色果實腐爛病徵,切開接種處,同樣可觀察到褐色至黑色之果腐病斑,表示這些菌株皆對番石榴具有病原性。經再一次分離後,獲得同樣形態之菌株,完成科霍氏法則。另外,分離自果實之菌株普遍毒力(virulence)較葉片菌株強(表 2),且造成感染的條件需要有傷口,若無傷口則無法進一步感染果實(Tsai, 未發表資料)。

番石榴炭疽病菌親緣分析

將 15 株番石榴炭疽病菌的 ITS 序列以 NCBI GenBank 的 BLASTn 比對,這 15 株菌株與 *C. gloeosporioides* 複合種內菌株之序列具有高於 99% 的相同性,表示這 15 株番石榴炭疽病菌菌株歸屬於 *C. gloeosporioides* 複合種。為了精確鑑定番石榴炭疽病菌,故使用 ITS、*GAPDH*、*TUB2*、*CHS-1* 及 *CAL* 基因片段序列(Weir *et al.* 2012)進行多基因序列分析(附錄 2)。親緣關係圖顯示,15 個菌株中有 10 個菌株與 *C. siamense* ICMP 18578 歸於同一演化分支,3 個菌株(YCCo5, DSCo1, YCCo2)與 *C. fructicola* LF130 歸於同一演化分支,1 個菌株(SSCo1)與 *C. fructicola* ITCC 6270 歸於同一演化分支,另 1 菌株(ALCo2)則與 *C. tropicale* ICMP18653 為同一群。由此知,造成台灣番石榴炭疽病至少包含 *C. gloeosporioides* 複合種中 *C. siamense*、*C. fructicola* 與 *C. tropicale* 等 3 種炭疽病菌(圖 2)。

三種供試菌株菌落、分生孢子及附著器型態

供試之 *C. siamense* SYCo3、*C. tropicale* ALCo2、*C. fructicola* YCCo5 於 25°C 培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 10 d 後,於正面的

菌落中央普遍呈灰白色,菌絲棉質且稠密,邊緣則呈白色。中央部位偶爾可見已泌出鮭魚肉色分生孢子之分生孢子盤,背面也呈灰白色,偶爾可見一些灰黑色色素的沉澱(圖 3)。3 種炭疽病菌之分生孢子均呈透明、無隔、短圓柱形且外壁平滑(圖 4A–4C),*C. siamense* SYCo3 分生孢子長寬約為 11.3–14.4–16.5 μm \times 4.4–5.1–5.9 μm ,*C. tropicale* ALCo2 分生孢子長寬約為 12.1–15.9–18.8 μm \times 4.5–5.2–5.9 μm 、*C. fructicola* YCCo5 分生孢子長寬約為 12.8–15.1–19.2 μm \times 3.7–4.9–5.7 μm 。另外,*C. siamense* SYCo3 及 *C. fructicola* YCCo5 附著器形狀多變化,多呈不規則形凸起,少數邊緣淺裂。*C. tropicale* ALCo2 則多為橄欖形,但也有不規則形(圖 4D–4F)。

番石榴炭疽病核准藥劑對供試菌株菌絲生長的影響

核准藥劑對不同種炭疽病菌菌絲生長的影響,結果如表 3 所示。當藥劑濃度 1 mg a.i. L⁻¹ 時,僅扶吉胺可分別抑制 *C. siamense* SYCo3、*C. tropicale* ALCo2 及 *C. fructicola* YCCo5 的菌絲生長達 68.8、90.6 及 81.1%。當藥劑有效成分濃度為 10 mg a.i. L⁻¹ 時,僅克熱淨及扶吉胺可使 3 種炭疽病菌菌絲生長抑制率同時達到 80% 以上。以克熱淨為例,3 株菌 *C. siamense* SYCo3、*C. tropicale* ALCo2 及 *C. fructicola* YCCo5 的菌絲生長抑制率分別為 100.0、87.6 及 99.4%。當藥劑有效成分濃度達到 100 mg a.i. L⁻¹ 時,僅克熱淨及鋅錳乃浦對 3 種炭疽病菌的菌絲生長抑制率均達到 100%,而甲基多保淨(thiophanate-methyl)則僅對 *C. tropicale* ALCo2 的菌絲生長抑制率達到 100%。另外,2 種炭疽病菌則對甲基多保淨不敏感,而賽普護汰寧、得克利及扶吉胺均可抑制 3 種炭疽病菌菌絲生長達 80% 以上。亞托敏、克收欣、三氟派瑞(trifloxystrobin + fluopyram)等 strobilurins 類藥劑普遍對 3 種炭疽病菌無明顯之菌絲生長抑制效果,菌絲生長抑制率均在 25% 以下。

番石榴炭疽病核准藥劑對供試菌株孢子發芽的影響

藥劑濃度為 10 mg a.i. L⁻¹ 時,賽普護汰寧、扶吉胺、得克利、免得爛、腐絕快得寧及腓疏

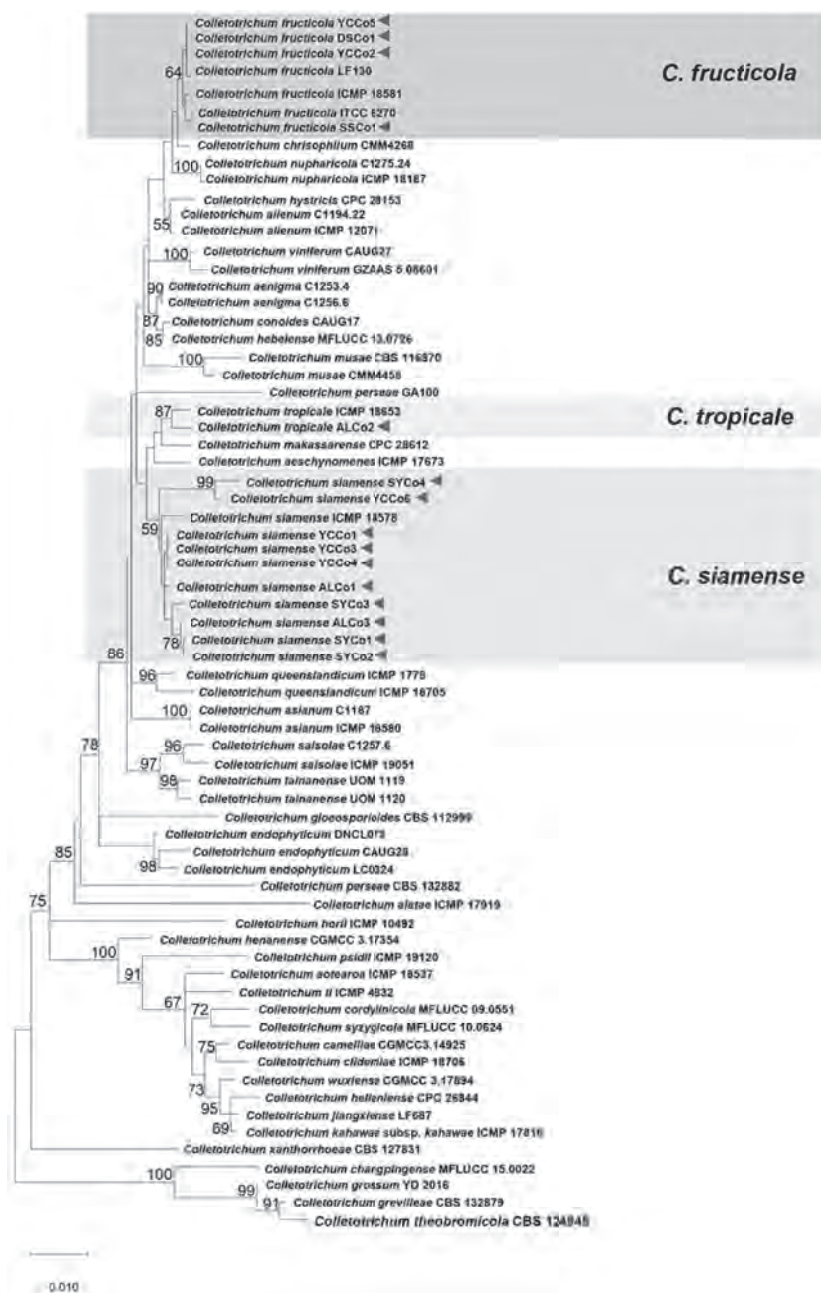


圖 2. 以多基因串連序列 (ITS, *GAPDH*, *TUB2*, *CHS-1* 及 *CAL*) 藉由最大似然法分析本研究之 15 菌株與 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種之 54 菌株比對所建構之親緣樹。15 菌株有 10 菌株歸類在 *Colletotrichum siamense*，4 菌株歸類在 *Colletotrichum fructicola*，1 菌株在 *Colletotrichum tropicale* (箭頭所示)。節點上的數值代表分析 1,000 次重複之 bootstrap value，比例尺代表預估之核苷酸置換率。

Fig. 2. Phylogenetic tree of 15 *Colletotrichum* isolates collected in this study (arrowed) and 54 isolates within *C. gloeosporioides* complex. The tree was built using concatenated sequences of the internal transcribed spacer (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -tubulin 2 (*TUB2*), chitin synthase 1 (*CHS-1*) and calmodulin (*CAL*) genes and analyzed by maximum likelihood method. Of the 15 isolates, 10 isolates are classified as *C. siamense*, 4 isolates are classified as *C. fructicola* while 1 isolate is classified as *C. tropicale*. Numbers above the nodes represent the bootstrap values (1,000 replicates). Scale bar indicates the number of expected changes per nucleotide.

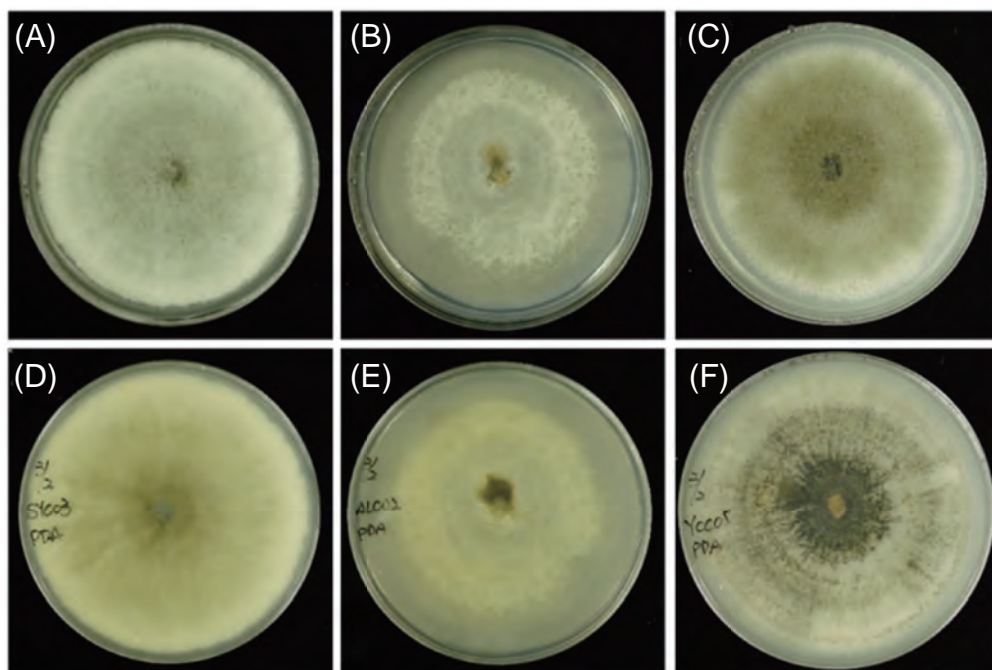


圖 3. 供試之 (A、D) *Colletotrichum siamense* isolate SYCo3；(B、E) *Colletotrichum tropicale* ALCo2；(C、F) *Colletotrichum fructicola* isolate YCCo5 培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 10 d (25°C) 後之菌落 (A–C，正面；D–F，背面)。

Fig. 3. Colonies of (A, D) *C. siamense* isolate SYCo3, (B, E) *C. tropicale* ALCo2 and (C, F) *C. fructicola* isolate YCCo5 cultivated on potato dextrose agar at 25°C for 10 d (A–C, above side; D–F, below side).

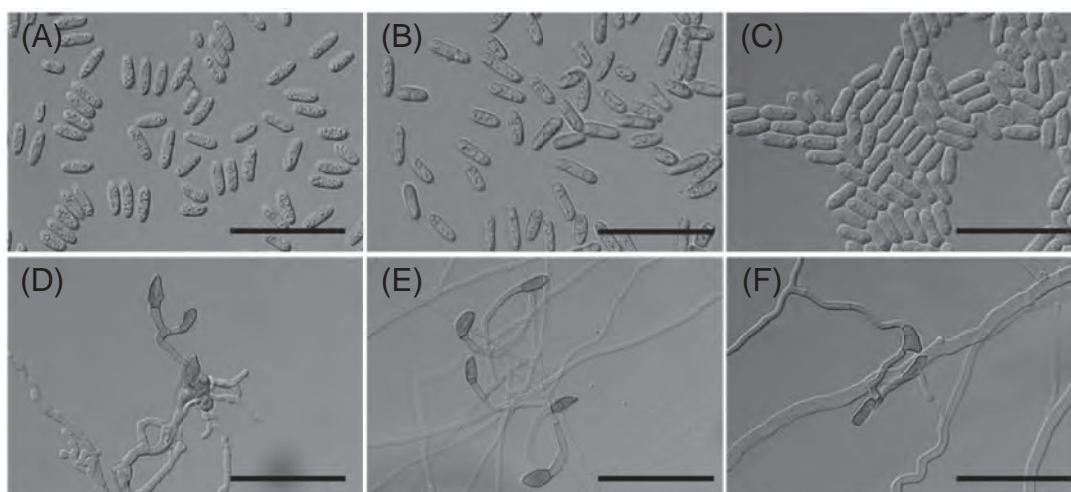


圖 4. 供試之 (A、D) *Colletotrichum siamense* isolate SYCo3；(B、E) *Colletotrichum tropicale* ALCo2；(C、F) *Colletotrichum fructicola* isolate YCCo5 菌株分生孢子及附著器型態觀察 (A–C，分生孢子；D–F，附著器；比例尺 = 50 μm)。

Fig. 4. Conidia and appresoria of (A, D) *C. siamense* isolate SYCo3, (B, E) *C. tropicale* ALCo2 and (C, F) *C. fructicola* isolate YCCo5 (A–C, conidia; D–F, appresoria; scale bar = 50 μm).

表 3. 番石榴炭疽病核准藥劑對不同炭疽菌菌株菌絲生長的影響。
Table 3. Effect of approved fungicides for guava anthracnose on mycelial growth of different *Colletotrichum* sp. isolates.

Fungicide	Inhibition (%) ^z											
	1 mg a.i. L ⁻¹				10 mg a.i. L ⁻¹				100 mg a.i. L ⁻¹			
	SYCo3 ^y	ALCo2 ^x	YCCo5 ^w	SYCo3	ALCo2	YCCo5	SYCo3	ALCo2	YCCo5	SYCo3	ALCo2	YCCo5
Cyprodinil + fludioxonil	38.2 ± 1.2 c ^v	48.3 ± 1.2 c	18.0 ± 1.4 c	78.8 ± 0.5 c	49.3 ± 2.7 e	65.1 ± 1.9 d	93.0 ± 0.2 b	83.9 ± 0.3 e	97.1 ± 1.4 b			
Kresoxim-methyl	0.0 ± 0.0 e	15.1 ± 0.2 d	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 g	15.1 ± 0.4 h	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 f	15.8 ± 1.0 g	0.0 ± 0.0 g			
Iminoctadine	61.3 ± 1.4 b	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 f	100.0 ± 0.0 a	87.6 ± 1.3 ab	99.4 ± 0.6 a	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a			
Azoxystrobin	0.0 ± 0.0 e	0.6 ± 0.6 e	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 g	2.0 ± 1.0 i	0.6 ± 0.4 h	0.0 ± 0.0 f	23.3 ± 1.1 f	0.0 ± 0.0 g			
Fluazinam	68.8 ± 1.3 a	90.6 ± 0.9 a	81.1 ± 1.1 a	82.4 ± 0.3 b	90.1 ± 0.4 a	82.6 ± 2.6 b	89.5 ± 0.5 c	93.3 ± 0.6 b	89.5 ± 2.6 c			
Tebuconazole	25.8 ± 1.3 d	50.0 ± 1.1 c	29.0 ± 0.7 b	72.0 ± 0.7 d	69.9 ± 0.4 c	69.5 ± 0.5 c	87.5 ± 1.5 c	91.9 ± 0.5 b	94.9 ± 1.2 b			
Thiophanate-methyl	0.0 ± 0.0 e	61.9 ± 0.7 b	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 g	86.1 ± 1.3 b	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 f	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 g			
Metiram	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 f	0.5 ± 0.5 g	0.0 ± 0.0 i	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 i	0.0 ± 0.0 g			
Iprodione	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 f	56.5 ± 0.8 e	62.8 ± 0.7 d	56.1 ± 1.6 e	77.5 ± 0.2 d	83.4 ± 0.7 e	84.3 ± 0.4 d			
Thiabendazole + oxine copper	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	14.0 ± 1.0 d	23.0 ± 1.0 f	87.8 ± 1.3 ab	46.9 ± 2.2 f	50.8 ± 2.2 e	89.3 ± 1.7 c	58.6 ± 0.9 e			
Dithianon	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 g	0.0 ± 0.0 i	0.0 ± 0.0 h	1.8 ± 0.7 f	8.0 ± 1.0 h	0.9 ± 0.5 g			
Mancozeb	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 f	24.5 ± 1.6 f	27.6 ± 0.7 f	0.0 ± 0.0 h	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a			
Trifloxystrobin + fluopyram	0.0 ± 0.0 e	14.4 ± 1.7 d	3.6 ± 0.4 e	0.0 ± 0.0 g	22.1 ± 0.6 g	8.9 ± 0.4 g	0.0 ± 0.0 f	24.5 ± 1.0 f	6.3 ± 1.0 f			

^z Inhibition rate = [(Mean of mycelial growth of the control - Mean of mycelial growth of the treatment)]/mean of mycelial growth of the control × 100%.

^y *Colletotrichum siamense* isolate.

^x *Colletotrichum tropicale* isolate.

^w *Colletotrichum fructicola* isolate.

^v Mean ± standard error ($n = 8$). Means within a column followed by the same letters are not significantly different at $P = 0.05$ based on least significant difference (LSD) test.

醃處理組皆可有效抑制 *C. siamense* SYCo3、*C. tropicale* ALCo2 及 *C. fructicola* YCCo53 種炭疽病菌孢子發芽 (表 4)；當藥劑濃度降低至 1 mg a.i. L⁻¹ 時，僅扶吉胺、腐絕快得寧及腓硫醃處理組可抑制 SYCo3、ALCo2 及 YCCo5 三種炭疽病菌孢子發芽率至 1% 以下。

討論

Colletotrichum spp. 引起的植物炭疽病 (anthracnose) 為造成果實採收前及採收後重要的病害，係果實生產及外銷的限制因子之一 (Hindorf 2000; Hyde *et al.* 2009; Ismail *et al.* 2015)。本屬真菌寄主範圍廣泛，可感染多種熱帶及溫帶果樹，例如柑橘、香蕉、火龍果、芒果、木瓜、草莓……等 (Phoulivong *et al.* 2010)，番石榴也是炭疽病菌寄主之一 (Hindorf 2000)。本研究自南部地區收集不同品種番石榴果實上獲得的炭疽病菌，所產生的病徵多為濕潤棕褐色腐爛圓形至不規則狀病斑，果表在高濕環境下易產生橘紅色分生孢子堆。由

於炭疽病菌亦為陸生熱帶植物內常見的內生真菌，據估計有大約 2,200 種植物有紀錄到此菌 (Rodrigues & Petrini 1997; Vieira *et al.* 2014; Guarnaccia *et al.* 2019)，內生真菌可在活植物組織內蔓延生長而不會造成病徵 (Petrini 1991)，故本研究另外針對無病徵葉片進行採樣，以嚴謹之消毒方法進行分離。結果顯示，葉片內有多種真菌甚至細菌存在，包括 *Phomopsis* sp.、*Phyllosticta* sp.、*Colletotrichum* sp.、*Alternaria* sp.……等，其中以擬莖點霉屬 (*Phomopsis* sp.) 出現頻率最高 (Tsai, 未發表資料)。這些真菌皆為常見之內生真菌，多具潛伏感染特性。Prusky (1996) 研究指出，潛伏感染多發生在營養生長期、花期及果實成熟前期，但明顯的病徵表現則發生在採收後期。為了確定從葉片及果實分離之炭疽病菌株是否有病原性，以果實進行接種測試。若果實表面有傷口的狀況下，所有分離自果實或無病徵葉片炭疽病菌株皆有病原性 (pathogenicity)，但無病徵葉片菌株的毒力 (virulence) 普遍低於具病徵果實的菌株 (表 2)。雖然如此，此結果仍

表 4. 番石榴炭疽病核准藥劑對不同炭疽菌孢子發芽的影響。

Table 4. Effect of approved fungicides for guava anthracnose on spore germination of different *Colletotrichum* sp. isolates.

Fungicide	Germination rate (%) ^z					
	1 mg a.i. L ⁻¹			10 mg a.i. L ⁻¹		
	SYCo3	ALCo2	YCCo5	SYCo3	ALCo2	YCCo5
Cyprodinil + fludioxonil	0.0 ± 0.0 e ^y	12.4 ± 1.9 e	13.0 ± 2.2 e	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d
Kresoxim-methyl	70.1 ± 3.2 c	38.4 ± 2.6 cd	86.4 ± 1.8 b	25.7 ± 1.8 d	28.1 ± 9.6 a	72.9 ± 6.1 b
Iminoctadine	81.2 ± 3.7 b	39.4 ± 5.8 bcd	76.9 ± 1.6 c	48.4 ± 2.0 b	27.2 ± 6.4 a	75.8 ± 3.6 b
Azoxystrobin	62.2 ± 4.5 c	41.6 ± 5.1 bc	95.8 ± 1.1 a	22.6 ± 3.0 d	36.5 ± 2.6 a	85.4 ± 5.2 a
Fluazinam	0.0 ± 0.0 e	0.2 ± 0.2 f	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d
Tebuconazole	92.9 ± 1.1 a	88.0 ± 3.0 a	77.2 ± 3.3 cd	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d
Thiophanate-methyl	93.5 ± 1.9 a	39.1 ± 3.7 bcd	78.2 ± 2.1 cd	83.7 ± 2.4 a	30.7 ± 4.3 a	62.9 ± 5.7 c
Metiram	91.5 ± 2.0 a	0.8 ± 0.5 f	79.7 ± 3.3 c	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d
Iprodione	38.4 ± 4.9 d	32.5 ± 1.7 d	73.5 ± 1.4 cd	12.5 ± 2.1 e	28.9 ± 3.3 a	70.8 ± 3.1 bc
Thiabendazole + oxine copper	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d
Dithianon	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d
Mancozeb	69.2 ± 6.2 c	0.0 ± 0.0 f	72.1 ± 3.9 d	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 c	4.1 ± 2.8 d
Trifloxystrobin + fluopyram	67.7 ± 1.4 c	44.2 ± 6.0 b	92.7 ± 1.8 ab	36.6 ± 2.8 c	16.4 ± 1.8 b	89.9 ± 3.1 a

^z Spore germination rate = (No. of germinated spores in 0.25% glucose solution with fungicide/No. of germinated spores in 0.25% glucose solution without fungicide) × 100%.

^y Mean ± standard error ($n = 6$). Means within a column followed by the same letters are not significantly different at $P = 0.05$ based on least significant difference (LSD) test.

無法說明內生性炭疽病菌實際的致病力 (virulence potential)，因為本研究是在人工環境以人工接種的方式評估，實際上在自然環境下的致病力仍未知。狹義上來說，內生真菌是指該真菌纏聚在植物體內而不會表現肉眼可見的病徵 (Petrini 1991)，但炭疽菌屬可能是具有內生生活史的伺機性病原菌 (Wilson 1995)。

造成果腐的炭疽病菌以往均認為是由單一菌株 *C. gloeosporioides* Penz. 所引起，但越來越多研究顯示，該菌其實是一個複合種 (Phoulivong *et al.* 2010; Weir *et al.* 2012)。以 ITS 基因片段分析 15 菌株，其基因序列超過 99% 相似性，為更準確區分複合種內的各種炭疽病菌，使用 ITS、*GAPDH*、*TUB2*、*CHS-1* 及 *CAL* 基因片段序列進行多基因序列分析 (Weir *et al.* 2012)。結果顯示，目前台灣番石榴炭疽病在 *C. gloeosporioides* 複合種，包含 *C. siamense*、*C. fructicola* 與 *C. tropicale* 等至少 3 種炭疽病菌，其中 *C. siamense* 占大多數，10 個菌株歸於此演化支，另有 4 個菌株屬於 *C. fructicola*，*C. tropicale* 則僅 1 個菌株 (圖 2)。*C. siamense* 最初是從泰國的咖啡果實炭疽病分離獲得 (Prihastuti *et al.* 2009)，原本有報導指出 *C. siamense* 為一複合種 (Sharma *et al.* 2015)，但之後有學者否定這說法，並以譜系一致的系統發育學種識別法 (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition; GCPSR) 確認該種非複合種。因此，後續雖有許多炭疽病新種被發表，例如 *Colletotrichum communis*、*Colletotrichum dianesei*、*Colletotrichum endomangiferae*、*Colletotrichum hymenocallidis*、*Colletotrichum jasmini-sambac*、*Colletotrichum melanocaulon* 及 *Colletotrichum murrayae*，但被證實這些都是 *C. siamense* 的同物異名 (Liu *et al.* 2016)。該菌寄主極為廣泛，許多熱帶、溫帶果樹及蔬菜等園藝作物均可被感染，於芒果、釋迦、木瓜、無花果、辣椒、茶樹、柿子等作物均有被報導 (Udayanga *et al.* 2013; Hassan *et al.* 2018)。與 *C. siamense* 一樣，*C. fructicola* 也是從咖啡果實分離獲得的新種炭疽病菌 (Prihastuti *et al.* 2009)，該菌寄主廣泛，包括草莓、芒果、茶樹等等，並曾被記載為植物內生真菌 (Jayawardena *et al.* 2016)。

C. tropicale 第一次被報導是在熱帶美洲的刺果番荔枝 (*Annona muricata*) 等熱帶植物被發現，並在可可樹 (*Theobroma cacao*) 葉肉組織內分離到該菌 (Rojas *et al.* 2010)。這 3 種炭疽病菌均隸屬於 *C. gloeosporioides* 複合種，在研究比較透徹的芒果炭疽病，國外正式被記錄的有 20 種 (Fuentes-Aragón *et al.* 2020)，而國內至少有 5 種芒果炭疽病菌被明確記錄，種類包括 *Colletotrichum asianum*、*C. siamense*、*C. fructicola*、*C. tropicale*、*Colletotrichum scovillei*，其中 *C. asianum* 被分離的頻率最高 (Wu *et al.* 2020)。至於番石榴炭疽病，以目前可搜尋到的國內外文獻報告，均沒有明確研究番石榴炭疽病族群多樣性的研究報告，許多都是零星記錄。本篇研究是國內第一次初步記錄南部地區番石榴炭疽病族群類型的報告。

番石榴炭疽病的防治目前仍著重於化學防治，但長期使用慣行農法的農民漸漸反應部分藥劑不如以往有效，為瞭解這個現象的原因，本研究收集與觀察田間番石榴炭疽病族群對目前核准藥劑的敏感性。以建構好之炭疽病族群親緣樹為依據，將 3 種炭疽病菌中各挑選一株毒力較強的菌株作藥劑敏感測試。結果顯示，藥劑濃度 100 mg a.i. L⁻¹ 時，克熱淨及鋅錳乃浦可完全抑制 3 種炭疽病菌菌絲生長；藥劑濃度 10 mg a.i. L⁻¹ 時，賽浦護汰寧、扶吉胺、得克利、免得爛、腐絕快得寧及腓硫醌可完全抑制 3 種炭疽病菌孢子發芽；當藥劑濃度 1 mg a.i. L⁻¹ 時，則只有腐絕快得寧及腓硫醌可完全抑制 3 種炭疽病菌孢子發芽。惟以上藥劑，對 3 種炭疽病菌的抑制效果均無明顯差異性。

另一方面，3 種炭疽病菌對部分核准藥劑的敏感度存在差異性，例如在甲基多保淨藥劑濃度 100 mg a.i. L⁻¹ 時，對於 *C. tropicale* ALCo2 可 100% 抑制其菌絲生長，而孢子發芽抑制試驗在藥劑濃度 10 mg a.i. L⁻¹ 時，發芽率 30.7%；而 *C. siamense* SYCo3 及 *C. fructicola* YCCo5 在甲基多保淨濃度 100 mg a.i. L⁻¹ 時，菌絲生長抑制率均為 0%，藥劑濃度為 10 mg a.i. L⁻¹ 時孢子發芽率則分別為 83.7% 及 62.9%，顯示相對於 *C. siamense* 及 *C. fructicola*，*C. tropicale* 對甲基多保淨呈現不同的敏感性或耐受程度。

甲基多保淨與貝芬替、免賴得及腐絕快得寧皆為 methyl benzimidazole carbamate (MBC) 殺菌劑，作用機制皆為抑制有絲分裂過程 β -微管素 (β -tubulin) 的組合。已知抗藥性與 β -tubulin 2 基因上兩處點突變 (E198A/G/K 及 F200Y) 有關 (Young *et al.* 2010)，炭疽病菌株對此類藥劑呈現抗藥性的現象國外也有研究證實 (Ramdial *et al.* 2016)，且 benzimidazole 類藥劑相較於其他種藥劑有更高的抗藥性風險 (Cao *et al.* 2017)。在墨西哥，有報導指出造成芒果炭疽病的其中 1 種炭疽病菌 (*C. siamense*) 對 benzimidazole 類藥劑有高度抗藥性，即使甲基多保淨藥劑濃度達到 $1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ，該菌仍可於平板培養生長 (Fuentes-Aragón *et al.* 2020)。除此之外，本研究亦發現 *C. fructicola* 在藥劑濃度 $100 \text{ mg a.i. L}^{-1}$ 時，對甲基多保淨不敏感，在其他報告中，自草莓及山藥分離的 *C. fructicola* 也有同樣的結論 (Han *et al.* 2018)。顯示部分炭疽病菌種類可能已對 benzimidazoles 類藥劑產生不同程度的抗藥性，在抗藥性管理策略的擬定上需要注意。

本研究於生體外 (*in vitro*) 所測試的 strobilurins 類藥劑，包括單劑之克收欣、亞托敏及混合劑之三氟派瑞，結果顯示菌絲生長抑制率對 3 種炭疽病菌均不佳，皆在 25% 以下，且這些藥劑皆無法完全抑制供試菌株孢子發芽。探究其可能原因，國外有研究顯示在真菌粒線體細胞膜上的替代氧化酵素 (alternative oxidase; AOX) 可使真菌在生體外避開 strobilurins 類藥劑產生的致毒作用，造成在生體外測試時產生藥效不佳的現象。另一方面，真菌在生體內 (*in vivo*) 感染植體時，推測 AOX 會被植物的次級代謝物抑制，進而使藥劑發揮藥效 (Wood & Hollomon 2003; Kaneko & Ishii 2009)。

本研究所收集的炭疽病菌株大部分皆來自施行慣行農法的果園，據筆者詢問於燕巢地區施行慣行農法的農民表示，亞托敏、甲基多保淨及腐絕快得寧皆是常用的藥劑。由於田間環境因子複雜，且每一位農民的田間管理 (施藥方法、施藥種類、使用之肥料、水分管理) 皆不同，要真正判斷炭疽病菌株是否對 strobilurins 類藥劑產生抗藥性，仍需於後續研究實

際在田間施用 strobilurins 類藥劑，才能真正測試真菌對該類藥劑的敏感性。

綜上所述，番石榴炭疽病菌不只存在於肉眼可見病徵的果實，尚還存活於無病徵之健康葉片，以果實接種兩種不同分離部位的炭疽病菌證實均有病原性，但各菌株之間存在不同程度的致病力。因此，田間管理的首務仍須著重清園，將落葉及落果撿拾集中清理，以降低田間殘存的病原菌密度。另外，由建構之番石榴炭疽病族群親緣樹顯示，可知台灣番石榴炭疽病至少包含 *C. siamense*、*C. fructicola* 與 *C. tropicale* 等 3 種。由藥劑試驗結果顯示，*C. siamense*、*C. fructicola* 對 benzimidazoles 類及 strobilurins 類藥劑普遍呈現不敏感，而 *C. tropicale* 對 benzimidazoles 類藥劑具敏感性，但對 strobilurins 類藥劑呈不敏感。由於 *C. siamense* 是番石榴炭疽病菌優勢族群，在藥劑的使用上應針對此類炭疽病菌，輪用不同作用機制藥劑，以降低該菌種於田間的族群數量。

誌謝

本研究承蒙謝鴻業副研究員協助介紹番石榴農民使採樣順利進行，以及感謝賴信順助理研究員、陳薪曉助理研究員協助試驗數據的統計分析。

引用文獻

- Cao, X., X. Xu, H. Che, J. S. West, and D. Luo. 2017. Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species complexes from rubber tree in Hainan, China. *Plant Dis.* 101:1774–1780. doi:10.1094/PDIS-03-17-0352-RE
- Carbone, I. and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556. doi:10.2307/3761358
- Chechi, A., J. Stahlecker, M. E. Dowling, and G. Schnabel. 2019. Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. *Pestic. Biochem. Physiol.* 158:18–24. doi:10.1016/j.pestbp.2019.04.002
- Dauanla-Meli, C., E. Langer, and F. T. Mouafo. 2013. Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of *Citrus limon*. *Fungal Ecol.* 6:212–222. doi:10.1016/j.funeco

- co.2013.01.004
- Fuentes-Aragón, D., V. Guarnaccia, A. Rebollar-Alviter, S. B. Juárez-Vázquez, F. Aguirre-Rayó, H. V. Silva-Rojas. 2020. Multilocus identification and thiophanate-methyl sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex associated with fruit with symptoms and symptomless leaves of mango. *Plant Pathol.* 69:1125–1138. doi:10.1111/ppa.13195
- Guarnaccia, V., G. Gilardi, I. Martino, A. Garibaldi, and M. L. Gullino. 2019. Species diversity in *Colletotrichum* causing anthracnose of aromatic and ornamental Lamiaceae in Italy. *Agronomy* 9:613. doi:10.3390/agronomy9100613
- Guerber, J. C., B. Liu, J. C. Correll, and P. R. Johnston. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95:872–895. doi:10.2307/3762016
- Han, Y. C., X. G. Zeng, F. Y. Xiang, Q. H. Zhang, C. Guo, F. Y. Chen, and Y. C. Gu. 2018. Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *J. Integr. Agric.* 17:1391–1400. doi:10.1016/S2095-3119(17)61854-9
- Hassan, O., J. Y. Jeon, T. Chang, J. S. Shin, N. K. Oh, and Y. S. Lee. 2018. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. *Plant Dis.* 102:1015–1024. doi:10.1094/PDIS-10-17-1564-RE
- Hindorf, H. 2000. *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of tropical crops. *Plant Pathol.* 53:275–282. doi:10.17660/ActaHortic.2000.531.46
- Hyde, K. D., L. Cai, P. F. Cannon, J. A. Crouch, P. W. Crous, U. Damm, P. H. Goodwin, H. Chen, P. R. Johnston, E. B. G. Jones, Z. Y. Liu, E. H. C. McKenzie, J. Moriwaki, P. Noireung, S. R. Pennycook, L. H. Pfennig, H. Prihastuti, T. Sato, R. G. Shivas, Y. P. Tan, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, Y. L. Yang, and J. Z. Zhang. 2009. *Colletotrichum*- Names in current use. *Fung. Divers.* 39:147–182.
- Ismail, A. M., G. Cirvilleri, T. Yaseen, F. Epifani, G. Perrone, and G. Polizzi. 2015. Characterisation of *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of mango in Italy. *J. Plant Pathol.* 97:167–171.
- Jayawardena, R. S., K. D. Hyde, U. Damm, L. Cai, M. Liu, X. H. Li, W. Zhang, W. S. Zhao, and J. Y. Yan. 2016. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7:1192–1260. doi:10.5943/mycosphere/si/2c/9
- Kaneko, I. and H. Ishii. 2009. Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:388–398. doi:10.1007/s10327-009-0178-9
- Liu, F., M. Wang, U. Damm, P. W. Crous, and L. Cai. 2016. Species boundaries in plant pathogenic fungi: A *Colletotrichum* case study. *BMC Evol. Biol.* 16:article 81. doi:10.1186/s12862-016-0649-5
- Lou, P. S., Y. J. Huang, W. C. Chung, A. S. Cheng, and W. H. Chung. 2010. Application of PCR-RFLP in detecting benzimidazoles-resistant isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from mango in Tainan area. *Plant Pathol. Bull.* 19:255–260. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.201012_19(4).0004
- Misra, A. K. 2004. Guava diseases- Their symptoms, causes and management. p.81–119. *in: Diseases of Fruits and Vegetables. Vol. II.* (Naqvi, S. A. M. H., ed.) Springer. Dordrecht, The Netherlands. 686 pp. doi:10.1007/1-4020-2607-2_4
- O'Donnell, K. and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogen. Evol.* 7:103–116. doi:10.1006/mpev.1996.0376
- O'Donnell, K., H. I. Nirenberg, T. Aoki, and E. Cigelnik. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61–78. doi:10.1007/BF02464387
- Penzig, A. G. O. 1882. Fungi agrumicoli. Contribuzione allo studio dei funghi parassiti degli agrumi. *Michelia* 2:385–508. (in Latin)
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. p.179–197. *in: Microbial Ecology of Leaves.* (Andrews, J. H. and S. S. Hirano, eds.) Springer-Verlag, New York, NY. 499 pp. doi:10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Phoulivong, S., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, K. Abdelsalam, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fung. Divers.* 44:33–43. doi:10.1007/s13225-010-0046-0
- Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, and K. D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fung. Divers.* 39:89–109.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:413–434. doi:10.1146/annurev.phyto.34.1.413
- Ramdial, H., F. N. Hosein, and S. N. Rampersad. 2016.

- Detection and molecular characterization of benzimidazole resistance among *Colletotrichum truncatum* isolates infecting bell pepper in Trinidad. *Plant Dis.* 100:1146–1152. doi:10.1094/PDIS-09-15-0995-RE
- Rodrigues, K. F. and O. Petrini. 1997. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. p.57–70. *in: Biodiversity of Tropical Microfungi.* (Hyde, K. D., ed.) Hong Kong Univ. Press. Hong Kong. 421 pp.
- Rojas, E. I., S. A. Rehner, G. J. Samuels, S. A. Van Bael, E. A. Herre, P. Cannon, R. Chen, J. Pang, R. Wang, Y. Zhang, Y. Q. Peng, and T. Sha. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102:1318–1338. doi:10.3852/09-244
- Sharma, G., A. Kumar-Pinnaka, and B. D. Shenoy. 2015. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using *ApMat* marker. *Fung. Divers.* 71:247–264. doi:10.1007/s13225-014-0312-7
- Sutton, B. C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli, and Stromata.* Commonwealth Mycological Institute Press. Kew, UK. 696 pp.
- Tu, J. C. 1985. Improved Mathur's medium for growth, sporulation, and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Microbiosis* 44:87–93.
- Tzeng, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and H. F. Yen. 2019. *List of Plant Diseases in Taiwan.* 5th ed. Taiwan Phytopathological Society Press. Taichung, Taiwan. 320 pp. (in Chinese)
- Vieira, W. A. S., Michereff, S. J., de Moraes, M. A., Jr., D. K. Hyde, and M. P. S. Câmara. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fung. Divers.* 67:181–202. doi:10.1007/s13225-014-0293-6
- Von Arx, J. A. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathol. Z.* 29:413–468.
- Udayanga, D., D. S. Manamgoda, X. Liu., E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fung. Divers.* 61:165–179. doi:10.1007/s13225-013-0257-2
- Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73:115–180. doi:10.3114/sim0011
- 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. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Wilson, D. 1995. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73:274–276. doi:10.2307/3545919
- Wood, P. M. and D. W. Hollomon. 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q_o site of Complex III. *Pest Manag. Sci.* 59:499–511. doi:10.1002/ps.655
- Wu, C. J., H. K. Chen, and H. F. Ni. 2020. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Taiwan. *Eur. J. Plant Pathol.* 157:1–15. doi:10.1007/s10658-020-01964-4
- Young, J. R., M. Tomaso-Peterson, K. de la Cerda, and F. P. Wong. 2010. Two mutations in β -tubulin 2 gene associated with thiophanate-methyl resistance in *Colletotrichum cereale* isolates from creeping bentgrass in Mississippi and Alabama. *Plant Dis.* 94:207–212. doi:10.1094/PDIS-94-2-0207

附錄 1. 植物保護資訊系統核准之番石榴炭疽病防治藥劑。

Appendix 1. Fungicides of guava anthracnose approved in plant protection information system.

Fungicide in Chinese	Fungicide in English	AI ^z (%)	FRAC ^y code	Formulation	Manufacturer
賽普諾汰寧	Cyprodinil + fludioxonil	62.5	D1, E2	Water dispersible granules	Syngenta Taiwan Ltd., Taipei, Taiwan
克收欣	Kresoxim-methyl	44.2	C3	Water dispersible granules	BASF Taiwan Ltd., Taipei, Taiwan
克熱淨	Iminoctadine	40.0	M7	Wettable powder	Nippon Soda Co., Ltd., Toyama, Japan
亞托敏	Azoxystrobin	25.0	C3	Suspension concentrate	Syngenta Taiwan Ltd., Taipei, Taiwan
扶吉胺	Fluazinam	39.5	C5	Suspension concentrate	ISK Taiwan Co., Ltd., Taipei, Taiwan
得克利	Tebuconazole	25.9	G1	Emulsion, oil in water	Huikwang Co., Ltd., Tainan, Taiwan
甲基多保淨	Thiophanate-methyl	70.0	B1	Wettable powder	Ihara Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan
免得爛	Metiram	80.0	M3	Water dispersible granules	BASF Taiwan Ltd., Taipei, Taiwan
依普同	Iprodione	23.7	E3	Suspension concentrate	Bayer Taiwan Ltd., Taipei, Taiwan
腐絕快得寧	Thiabendazole + oxine copper	53.0	B1, M1	Wettable powder	Kuang Hwa Chemical Co., Ltd., Hsinchu, Taiwan
腓硫醌	Dithianon	42.2	M9	Suspension concentrate	BASF Taiwan Ltd., Taipei, Taiwan
鋅錳乃浦	Mancozeb	80.0	M3	Wettable powder	Huikwang Co., Ltd., Tainan, Taiwan
三氟派瑞	Trifloxystrobin + fluopyram	50.0	C3, C2	Suspension concentrate	Bayer Taiwan Ltd., Taipei, Taiwan

^z AI: active ingredients.^y FRAC: Fungicide Resistance Action Committee.

附錄 2. 2019–2020 年間自番石榴園調查所收集番石榴炭疽病分離株之基因庫序列。

Appendix 2. GenBank accession numbers of *Colletotrichum isolates* collected in guava field surveys from 2019–2020.

Species	Isolate	GenBank accession number ²				
		ITS	<i>GAPDH</i>	<i>TUB2</i>	<i>CAL</i>	<i>CHS-1</i>
<i>C. siamense</i>	ALCo1	MW541841	MW583606	MW583634	MW627457	MW583619
<i>C. tropicale</i>	ALCo2	MW541842	MW583607	MW583635	MW627458	MW583620
<i>C. siamense</i>	ALCo3	MW541843	MW583608	MW583636	MW627459	MW583621
<i>C. fructicola</i>	DSCo1	MW541844	MW583609	-	MW627460	MW583622
<i>C. fructicola</i>	SSCo1	MW541845	MW583610	-	MW627461	MW583623
<i>C. siamense</i>	SYCo1	MW541846	MW583611	MW583637	MW627462	MW583624
<i>C. siamense</i>	SYCo2	MW541847	MW583612	MW583638	MW627463	MW583625
<i>C. siamense</i>	SYCo3	MW541848	MW583613	MW583639	MW627464	MW583626
<i>C. siamense</i>	SYCo4	MW541849	MW627455	-	MW627465	MW583627
<i>C. siamense</i>	YCCo1	MW541850	MW583614	MW583640	MW627466	MW583628
<i>C. fructicola</i>	YCCo2	MW541851	MW583615	-	MW627467	MW583629
<i>C. siamense</i>	YCCo3	MW541852	MW583616	MW583641	MW627468	MW583630
<i>C. siamense</i>	YCCo4	MW541853	MW583617	MW583642	MW627469	MW583631
<i>C. fructicola</i>	YCCo5	MW541854	MW583618	-	MW627470	MW583632
<i>C. siamense</i>	YCCo6	MW541855	MW627456	-	MW627471	MW583633

² ITS: Internal transcribed spacer; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *TUB2*: β -tubulin 2; *CAL*: calmodulin; *CHS-1*: chitin synthase 1.

Genetic Diversity and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* spp. Isolated from Guava Fields in Southern Taiwan

Shuen-Huang Tsai^{1,*}, Kuan-Wen Chen², and Chien-Jui Huang³

Abstract

Tsai, S. H., K. W. Chen, and C. J. Huang. 2021. Genetic diversity and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. isolated from guava fields in southern Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 70(2):140–156.

Guava anthracnose is one of the important diseases of guava fruit from harvest to post-harvest. The aim of this study is to understand the main species of *Colletotrichum* that currently occur in guava orchards, and to investigate the sensitivity of these *Colletotrichum* spp. to the approved fungicides registered for anthracnose management. From 2019 to 2020, symptomless leaves and diseased fruits of guava anthracnose were collected from the main production areas in southern Taiwan. Fifteen isolates were obtained and inoculated on ‘Zhen-chu Ba’, respectively. The results showed that wounds are needed for most isolates to cause fruit rot symptoms, and the isolates obtained from diseased fruit is generally more virulent than the isolates obtained from symptomless leaves. To identify the species of collected *Colletotrichum* isolates, five genes including internal transcribed spacer (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -tubulin 2 (*TUB2*), chitin synthase 1 (*CHS-1*) and calmodulin (*CAL*) were sequenced and a phylogenetic tree was constructed. The constructed phylogenetic tree indicated that guava anthracnose in Taiwan includes at least three species, namely, *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum tropicale*. The fungicide tests show that *C. siamense* and *C. fructicola* are generally insensitive to benzimidazoles and strobilurins, while *C. tropicale* is sensitive to benzimidazoles but it is not sensitive to strobilurins. Comparing with the other two *Colletotrichum* spp., *C. tropicale* has a different sensitivity to benzimidazoles. In addition, at concentration of 100 mg active ingredient per liter, iminoctadine and mancozeb can completely inhibit the mycelial growth of the three *Colletotrichum* spp. thiabendazole + oxine copper and dithianon can significantly inhibit the germination of the spores among three *Colletotrichum* spp. The above results can provide farmers a reference for integrated pest management of anthracnose in the field.

Key words: Guava (*Psidium guajava* L.), *Colletotrichum* spp., Phylogenetic analyses, Fungicides sensitivity test.

Received: Decemae 18, 2020; Accepted: March 8, 2021.

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

¹ Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

² Project Assistant, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

³ Associate Professor, Department of Plant Medicine, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.