

# 台灣葡萄晚腐病發生調查及其主要病原 *Colletotrichum viniferum* 之病原性與親緣關係

林筑蘋<sup>1,\*</sup> 王智立<sup>2,3</sup> 蔡志濃<sup>4</sup> 戴裕綸<sup>5</sup> 安寶貞<sup>6</sup> 詹月梅<sup>7</sup> 黃順源<sup>8</sup>

## 摘要

林筑蘋、王智立、蔡志濃、戴裕綸、安寶貞、詹月梅、黃順源。2022。台灣葡萄晚腐病發生調查及其主要病原 *Colletotrichum viniferum* 之病原性與親緣關係。台灣農業研究 71(2):135–157。

由 *Colletotrichum* spp. 引起之葡萄晚腐病 (grape ripe rot) 為影響台灣葡萄產業最重要的病害之一，為更瞭解引發台灣葡萄晚腐病之病原菌的主要種類、親緣關係、病徵及田間感染分布狀況，本研究自 2012–2020 年間於葡萄主要產區採集呈現典型葡萄晚腐病徵之葡萄果實、具壞疽病斑之枝條或葉片，藉由組織分離得 *Colletotrichum* spp. 分離株共 40 株。利用 internal transcribed spacer (ITS)、lyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH)、actin (ACT)、beta-tubulin 2 (TUB2) 以及 chitin synthase 1 (CHS-1) 等 5 個基因建立多重序列親緣關係樹，結果顯示自罹病果實分離之 28 個分離株主要為 *Colletotrichum viniferum*，並可分成兩個次支序群 (subclade)，屬於次支序群 T 菌株分離比例高達 85.7%，屬於次支序群 C 的菌株僅占 3.6%；其他菌株分別為 *Colletotrichum fructicola* (7.1%) 及 *Colletotrichum tropicale* (3.6%)。*C. viniferum* 次支序群 T 菌株分布範圍包括苗栗縣卓蘭鎮、台中市新社區與霧峰區、彰化縣大村鄉以及南投縣信義鄉、國姓鄉、水里鄉與埔里鎮等葡萄主要產地；調查結果也顯示可自田間罹病葉片上分離到 *C. viniferum*。田間葡萄幼果接種試驗結果顯示 *C. viniferum* 次支序群 T 之菌株可自幼果期潛伏感染果實，並於果實轉色初期至成熟時產生典型晚腐病徵；溫室葡萄盆栽接種試驗證明 *C. viniferum* 次支序群 T 之菌株可引起葉片壞疽，病徵多自葉緣一端開始發展，葉片壞疽周圍常伴隨大範圍黃暈，嚴重時造成落葉，部分菌株可引起葉脈褐化。此外，藉人工接種試驗亦觀察到葡萄卷鬚壞疽與花穗壞疽等病徵。從田間調查與病原性試驗結果可確認 *C. viniferum* 次支序群 T 之菌株可於葡萄果實、葉片、卷鬚與花穗等組織造成多型態的病徵。

**關鍵詞：**次支序群、葉部病徵、多基因序列親緣關係、葡萄晚腐病、*Colletotrichum viniferum*。

## 前言

葡萄晚腐病 (grape ripe rot) 為台灣最嚴重之葡萄病害，對產量影響甚鉅，為葡萄產業化生產主要限制因子之一。本病常見的病徵主要

出現在果實，造成果粒軟腐、裂果與流汁，病斑處產生橘色到橘紅色分生孢子堆，乾燥環境下罹病果呈現乾癟狀態；一般認為葡萄晚腐病菌較少感染葉片，但會在葉片上行有限的腐生繁殖 (Kuo & Hseu 2003; Ko 2008)。

投稿日期：2021 年 9 月 3 日；接受日期：2022 年 1 月 27 日。

\* 通訊作者：cplin@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 國立中興大學植物病理學系副教授。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 國立中興大學植物醫學暨安全農業碩士學位學程副教授兼主任。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

<sup>5</sup> 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。

<sup>6</sup> 農委會農業試驗所植物病理組前研究員兼組長。台灣 台中市。

<sup>7</sup> 農委會農業試驗所植物病理組臨時人員。台灣 台中市。

<sup>8</sup> 內政部役政署替代役。台灣 南投縣。

早期真菌鑑定主要根據菌株形態，因此台灣葡萄晚腐病一直被認為是由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. 引起 (Kuo & Hseu 2003; Ko 2008; Tzean *et al.* 2019)。然而，近年的分子親緣研究顯示即便是同一種 *Colletotrichum*，分離株間仍存在許多遺傳差異，無法以形態特徵進行區分，如菌落型態容易隨著培養條件以及菌株培養時間改變，難以作為鑑定依據。此外，由於單一基因在炭疽病菌屬內歧異度有限，無法作為 *Colletotrichum* sp. 菌株鑑定依據，須結合多基因做多重序列親緣關係分析 (multi-gene phylogenetic analysis) 方可將菌種做出較詳盡的劃分 (Cai *et al.* 2009; Prihastuti *et al.* 2009; Weir *et al.* 2012)。藉由多重序列親緣關係分析，以往鑑定為 *C. gloeosporioides* 的菌株其實可再分類成多個種，因此將之稱為『*C. gloeosporioides* 複合種』 (*C. gloeosporioides* species complex) 或『廣義 *C. gloeosporioides*』 (*C. gloeosporioides* sensu lato 或 *C. gloeosporioides* s.l.) (Rojas *et al.* 2010; Weir *et al.* 2012)。

近年的多重序列分析結果顯示引起葡萄晚腐病的病原菌，包括 *Colletotrichum aenigma* (Yan *et al.* 2015)、*Colletotrichum citri* (Lei *et al.* 2016)、*Colletotrichum fructicola* (Peng *et al.* 2013; Echeverrigaray *et al.* 2020; Lim *et al.* 2020)、*Colletotrichum godetiae* (Zapparata *et al.* 2017)、*Colletotrichum hebeiense* (Yan *et al.* 2015)、*Colletotrichum karstii*、*Colletotrichum kahawae*、*Colletotrichum limitticola*、*Colletotrichum nymphaeae* (Echeverrigaray *et al.* 2020)，以及 *Colletotrichum viniferum* (Peng *et al.* 2013; Lei *et al.* 2016; Oo & Oh 2017; Echeverrigaray *et al.* 2020; Gao *et al.* 2020; Yokosawa *et al.* 2020) 等 10 個種，分屬於 *C. gloeosporioides* 複合種、*Colletotrichum acutatum* 複合種以及 *Colletotrichum boninense* 複合種等。另外，intergenic sequence between *Apn2* and *MAT1-2-1* (*ApMat*) 基因之序列被認為亦有助釐清 *Colletotrichum* spp. 之分類 (Silva *et al.* 2012)。根據 *ApMat* 基因序列所進行的分析發現，自日本重要葡萄產區之一的長野縣境內蒐集之葡萄晚腐病菌為 *C. fructicola*、*Colletotrichum per-*

*seae*、*C. viniferum*、*Colletotrichum* spp.，以及另外一群與 *C. viniferum* 親緣關係相當接近之支序群 V (clade V) 族群 (Yokosawa *et al.* 2017, 2020)。

雖然在各地區引發葡萄晚腐病的主要病原菌種類不一，*C. viniferum* 或親緣相近之族群普遍存在於亞洲的中國、韓國和日本，以及南美洲的巴西等地 (Peng *et al.* 2013; Lei *et al.* 2016; Oo & Oh 2017; Echeverrigaray *et al.* 2020; Yokosawa *et al.* 2020)，並為中國與巴西多數葡萄產區主要的葡萄晚腐病菌，且較其他 *Colletotrichum* spp. 對葡萄果實具更高的病原性 (Yan *et al.* 2015; Lei *et al.* 2016; Echeverrigaray *et al.* 2020)；而於日本的研究指出，境內除有少數 *C. viniferum* 菌株外，主要以與 *C. viniferum* 親緣關係相當接近卻又在親緣關係上具差異的支序群 V (clade V) 的分離株，其同樣具備高致病力，為區域內主要的病原菌族群 (Yokosawa *et al.* 2020)，在此稱為『日本支序群 V』。

在台灣，*C. viniferum* 與 *Colletotrichum tropicale* 曾被報導可感染葡萄果實造成葡萄晚腐病 (Duan *et al.* 2018; Lin *et al.* 2019; Duan & Chen 2020)，其中 Duan & Chen (2020) 自台灣中部主要葡萄產區之葡萄晚腐病果實上分離 24 株炭疽病菌，透過分析 internal transcribed spacer (*ITS*)、glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (*GAPDH*)、beta-tubulin 2 (*TUB2*)、actin (*ACT*) 與 *ApMat* 等 5 個基因的核酸序列，並以 *C. viniferum* 菌株代號 GZAAS5.08608 為參考菌株的分析結果顯示其中 22 株與 *C. viniferum* 各基因序列的相同度最高 (98.2–100%)，另 2 株與 *C. tropicale* 基因序列的相同度最高 (97.8–100%)。

為瞭解在台灣葡萄栽植區域引發葡萄晚腐病之病原菌種類與特性，本研究自 2012 年起，陸續前往苗栗、台中、彰化及南投等地區的重要葡萄產地及一處生鮮超市蒐集罹染晚腐病的葡萄果實、出現疑似病斑之枝條芽點、壞疽葉片以及具壞疽斑的園區雜草 (牛筋草，*Eleusine indica*)，分離得 *Colletotrichum* spp. 菌株後以 *ITS*、*GAPDH*、*ACT* 及 *TUB2*、chitin synthase 1 (*CHS-1*) 等基因之核酸序列分析親緣關係，

經由廣泛的調查，釐清引起台灣葡萄晚腐病之主要炭疽病菌種類以及各菌種分布狀況，並透過人工接種試驗，確認主要病原菌 *C. vinfiferum* 在葡萄幼果及葉片與其他組織之病原性及引起之病徵。

## 材料與方法

### 葡萄晚腐病菌菌株分離與保存

罹病植物組織採集地點包括苗栗縣卓蘭鎮、台中市霧峰區、后里區與新社區、彰化縣大村鄉、南投縣埔里鎮、水里鄉與信義鄉等地的葡萄栽培區，收集的樣本包括罹病果實、葉片以及園區內出現褐色水浸狀病徵的雜草(牛筋草)。另外，也自大里區的生鮮超市收集罹病果實。分離菌株時，將待分離之組織用自來水清洗過後，切取新鮮罹病部位約  $7 \times 7 \times 2 \text{ mm}^3$ ，經 0.5% 次氯酸鈉 (NaClO) 表面消毒 30 s，以擦手紙吸乾表面多餘水分後，放置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, PDA; Difco, Lawrence, KS, USA) 平板培養基上，放置於室溫 (24–28°C) 1–2 d 以純化分離菌株。收集葡萄葉片及枝條的真菌分離株後，依下列公式計算各種菌的組織分離率：分離出菌種的組織數量/該園區總分離之組織數量  $\times 100\%$ 。

若有菌落疑似為 *Colletotrichum* spp. 時，選取單一分生孢子移植於新的 PDA，並靜置於室溫以 12 h 光週期培養 7 d，以觀察菌落與分生孢子形態，一旦確認為 *Colletotrichum* spp.，切取菌塊 ( $10 \times 10 \times 0.5 \text{ mm}^3$ )，移置於無菌礦物油 (100% mineral oil, Sigma, Burlington, MA, USA) 中保存。

### 病原菌分子鑑定

真菌 genomic DNA (gDNA) 抽取：供試菌株以 PDA 於 25°C 培養 10 d 後，刮取菌絲進行研磨至呈粉末狀，其後添加 500  $\mu\text{L}$  CF buffer (農業試驗所配方，未顯示資料) 混合均勻，再用微量吸管將溶液吸取至 1.5 mL 離心管，以  $11,269 \times g$  離心 10 min。吸取 200  $\mu\text{L}$  上清液移至新的 1.5 mL 離心管，並於 100°C 乾浴加熱 10 min 後，將核酸以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋 10 $\times$  後放置於 -20°C 保存備用。

基因序列增幅與定序：將萃取自供試菌株之 gDNA 以特定引子對進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，增幅的序列包括 *ITS* (White *et al.* 1990)、*GAPDH* (Templeton *et al.* 1992)、*CHS-1* (Carbone & Kohn 1999)、*TUB2* (Glass & Donaldson 1995)、*ACT* (Carbone & Kohn 1999) 和 *ApMat* (Silva *et al.* 2012) 等序列片段；所使用之引子對如各文獻所列，惟一例外是用於增幅 *TUB2* 的前置引子 (forward primer) T39 (5'-ATCACAACAAC-GCTTGCGACG-3')，其為本研究自行設計。PCR 反應混合液 (20  $\mu\text{L}$ ) 包含 10  $\mu\text{L}$  耐熱聚合酶預混液 (*Taq* DNA polymerase 2 $\times$  Master Mix RED; Ampliqon, Odense, Denmark)，1  $\mu\text{L}$  gDNA，10  $\mu\text{M}$  引子對各 1  $\mu\text{L}$  以及 7  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 反應流程為：95°C 解旋反應 (denature) 5 min；95°C 解旋反應 30 s、56°C 黏合反應 (annealing) 30 s、72°C 延長反應 (extension) 30 s，進行 35 次循環；最後以 72°C 7 min 進行最終延長反應。以瓊脂膠體電泳確認 PCR 增幅產物為單一明顯條帶後，送交源資國際生物股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 進行定序。

親緣關係樹分析：親緣演化分析共使用 126 株菌株的序列資料，包含本研究分離之 40 株供試菌株和 86 株參考菌株 (reference strain)，參考菌株的序列資料由美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 資料庫取得。將各基因之序列分別透過 MEGA X 軟體 (Kumar *et al.* 2018) 以 Clustal W (Thompson *et al.* 1994) 進行初步排列分析 (alignment)，再透過人工方式進行序列的微調和確認，最終各基因片段用以構築單基因 (*ApMat*) 親緣關係樹或 3 基因 (*ITS* + *GAPDH* + *TUB2*) 和 5 基因 (*ITS* + *GAPDH* + *TUB2* + *CHS-1* + *ACT*) 之多基因親緣關係樹。親緣關係樹利用最大似然法 (maximum likelihood; ML) 和貝葉斯法 (Bayesian inference analysis; BI) 二種演算方法進行構築，最適取代模型透過線上分析軟體 Smart Model Selection (Lefort *et al.* 2017) 和 MEGA X 軟體進行預測，其中最大似然法不分基因區段預測，貝葉斯法則依各基因區段單獨預測，

結果如表 1。最大似然法親緣關係樹之構築透過 MEGA X 軟體執行，並以啟發式 (heuristic method) 方法中 nearest neighbour interchange (NNI) 之方式搜索樹型，最終演化樹分支的支持度以拔靴法 (bootstrap) 進行 1,000 次取樣來檢驗。貝葉斯法之親緣關係樹利用 MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.* 2012) 構築，建構過程採用馬可夫鏈蒙地卡羅 (Markov chain monte carlo; MCMC) 演算法，運行 1,000,000 代，每 1,000 棵樹取樣一次，前 25% 之樹屏除，剩餘之樹用以取得共同樹 (或稱一致樹; consensus tree)，並顯示後驗機率 (posterior probabilities; PP)，表示對此親緣樹分支的支持度，最終親緣關係樹以 FigTree v. 1.4.4 (Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology 2018) 進行繪製。

### 病原性測試

菌株以 PDA 培養並以 12 h 光週期培養 10–14 d，以無菌水搜集分生孢子，並將濃度調成  $1 \times 10^6$  孢子  $\text{mL}^{-1}$  之懸浮液，添加稀釋 10,000 $\times$  展著劑 (加收活展; 興農股份有限公司, 台灣台中市)，製成接種源。以「巨峰」葡萄 ('Kyoho') 為供試植物，並以無菌水取代分生孢子懸浮液作為對照組，以下列方法進行接種。罹病組織隨後再進行組織分離，確認分得相同病原菌以完成柯霍氏法則。

果實接種：2017–2018 年夏季與秋季時於

台中后里區 1 處果園，挑選初結果 1 mo 內之果串，將在樹上持續發育的供試果串全部浸泡入置備好的分生孢子懸浮液中 10 s，再以白色紙袋將果串封緊避免與外界直接接觸並避免雨水流入，持續觀察供試果串生長過程及病徵表現，直至結果 1.5 mo 後果實轉色成熟。每菌株接種 7 串以上。

植株接種：於溫室內，取種植於盆栽中高約 110–150 cm 並經催芽 2 mo 後之植株 (具葉片與嫩梢)，以上述置備好的分生孢子懸浮液噴霧全部植株，包括葉片正面、背面以及嫩梢等，直至水滴滑落，每處理共 5 盆。以透明塑膠袋開口朝下，由上往下將植株套起，套入前以噴霧器噴水使塑膠袋內部表面維持有水珠狀態。靠近植株頂端的塑膠袋角落以剪刀剪出長約 5–7 cm 的開口，每個角落各 2 刀，以使植株能透氣。接種植株置入 28°C、12 h 光週期的走入式生長箱，持續觀察。

### 菌株型態與生長觀察

為觀察 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株型態，以 F217069、F217131、F217133 與 F217141 作為供試菌株，培養在 PDA 平板培養基，以 22–24°C、12 h 光週期方式培養 7–10 d 後觀察菌落型態，並挑取培養基表面的分生孢子記錄。刺激壓器生成方式為將分生孢子以 0.5% V8 做成懸浮液，滴在載玻片上並保濕，以 22–24°C 無光照的方式培養 2 d 後觀察。使用

表 1. 本研究各親緣關係分析所使用的核苷酸替換模型。

Table 1. Nucleotide substitution models used in phylogenetic analyses in this study.

Gene/locus <sup>z</sup>	1 gene phylogenetic tree		3 genes phylogenetic tree		5 genes phylogenetic tree	
	Maximum likelihood	Bayesian inference analysis	Maximum likelihood	Bayesian inference analysis	Maximum likelihood	Bayesian inference analysis
<i>ApMat</i>	K80 <sup>y</sup>	HKY + G	-	-	-	-
<i>ITS</i>	<sup>x</sup>	-	T92 + G	GTR + G	GTR + G	GTR + G
<i>GAPDH</i>	-	-	T92 + G	HKY + G	GTR + G	GTR + G
<i>TUB2</i>	-	-	T92 + G	GTR + G	GTR + G	GTR + G
<i>CHS-1</i>	-	-	-	-	GTR + G	K80 + G
<i>ACT</i>	-	-	-	-	GTR + G	GTR + G

<sup>z</sup> *ApMat*: intergenic sequence between *Apn2* and *MAT1-2-1*; *ITS*: internal transcribed spacer; *GAPDH*: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *TUB2*: beta-tubulin 2; *CHS-1*: chitin synthase; *ACT*: actin.

<sup>y</sup> K80: Kimura 2-parameter; T92: Tamura 3-parameter; GTR: general time reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; G: gamma distribution.

<sup>x</sup> Not used in analysis.

的顯微鏡為 Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japan)，拍照設備為 Canon 50 D (Canon, Tokyo, Japan)。為觀察菌絲生長狀況，菌株在 PDA 上黑暗培養 3–5 d 後，切下菌落邊緣之新鮮菌塊，移植於 PDA 培養基的邊緣，放置於 4–40°C (以 4°C 為間距，共 10 個溫度)，每個溫度下每菌株每次測試 3 皿，即 3 重複，測試不同溫度下菌絲生長速率。每日記錄菌絲直線生長距離，部分溫度下於 10 d 即長滿培養基，故測量 1–9 d 的生長數據，每皿每日生長速率計算方法為 (生長滿 9 d 距離 – 生長滿 1 d 距離) cm/8 d (單位：cm d<sup>-1</sup>)，取 3 重複數之平均值代表該菌株。試驗重複 3 次。

## 結果

### 葡萄晚腐病菌株分離

自 2012–2020 年間，陸續自台灣各地葡萄產區，包括苗栗縣 (卓蘭鎮)、台中市 (新社區、霧峰區及后里區)、彰化縣 (大村鄉)、南投縣 (信義鄉、水里鄉、國姓鄉及埔里鎮) 等地，以及台中市大里區的生鮮超市蒐集出現晚腐病徵之葡萄果實；目標病徵包括果實表面出現針狀黑色凸起物或橘色孢子堆，以及果肉軟腐。鏡檢發現所獲得的菌株之分生孢子皆為透明、中央具明顯油滴、兩端圓鈍之長桿狀孢子，初步鑑定為 *C. gloeosporioides* s.l. (Sutton 1992; Weir *et al.* 2012)。從中挑選 28 株進一步進行核酸序列分析。

另一方面，也到曾發生晚腐病之葡萄果園，於葡萄果實發育過程及採收後，分別採集出現褐化病徵之葡萄葉片 (以下分別稱為『產季罹病葉片』及『採收後罹病葉片』)；並於果實採收後，採集外觀出現疑似壞疽、褐斑之枝條及芽點 (以下稱為『具褐斑的枝條或芽點』)。自這些病組織分離真菌菌株的結果顯示 *Colletotrichum* spp. 之分離率相當高，其他 *Pestalotiopsis* sp.、*Botryosphaeriaceae*、*Alternaria* sp.、*Diaporthe* sp. 以及 *Fusarium* sp. 等真菌亦有一定比例 (表 2)。『產季罹病葉片』、『採收後罹病葉片』及『具褐斑的枝條或芽點』的 *Colletotrichum* 屬菌株分離率分別為 35.9、92.3 及 41.7%，後續各自其中挑選 6、4 及 1 株代表性分離株進行後續分析 (表 2)。

此外，在一個曾發生葡萄晚腐病之果園採集到呈現褐色水浸狀病徵之雜草，組織分離及鏡檢後發現所獲菌株是 *C. gloeosporioides* s.l.，挑選其中 1 株分離株和前述 *Colletotrichum* 屬菌株一併進行親緣關係分析。以上共計 40 株 *Colletotrichum* 菌株，詳細分離來源請見表 3。

### 多重序列親緣關係分析

為鑑定前述 40 個分離株的種類，由已知研究挑選 51 株隸屬於 *Colletotrichum* 屬菌株做為參考菌株 (Weir *et al.* 2012; Peng *et al.* 2013; Yan *et al.* 2015; de Silva *et al.* 2019)，其中包含 31 種模式菌株 (type strain)；為在已知資料庫中尋得更相近於本研究之已知菌種，

表 2. 台灣 2015–2019 年間，各真菌於葡萄不同生長階段或組織之分離比例。

**Table 2.** Isolation percentages of fungi isolated in different stages or diseased tissues of grape during 2015–2019 in Taiwan.

Isolation percentages (%)	Diseased leaves		
	Before fruits were harvested	After fruits were harvested	Shoot or bud <sup>z</sup>
<i>Colletotrichum</i> sp.	35.9	92.3	41.7
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	23.4	76.9	75.0
<i>Botryosphaeriaceae</i>	15.6	15.4	63.2
<i>Alternaria</i> sp.	32.8	19.2	11.8
<i>Phomopsis</i> sp.	12.5	25.0	36.8
<i>Fusarium</i> sp.	15.6	50.0	33.3
Others	70.3	15.4	29.9

<sup>z</sup> Brown spots or lesions on the shoots or buds before sprouting.

表 3. 本研究分離與蒐集之菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。  
**Table 3.** List of the isolates which were isolated in this study and related information and accession numbers in GenBank.

Species	Isolate <sup>z</sup>	Source	Year	Location	ITS <sup>y</sup>	GAPDH	ACT	TUB2	CHS-1	ApMat
<i>Colletotrichum fructicola</i>	F215089	leaf	2015	Xinshe	MW492596	MW480628	MW480587	MW489256	MW480669	-
	F215147	fruit	2015	Xinshe	MW492597	MW480629	MW480588	MW489257	MW480670	MW835243
	F216037	weed								
<i>(Eleusine indica)</i>			2016	Xinshe	MW492602	MW480634	MW480593	MW489262	MW480675	MW835247
	F217125	leaf	2017	Puli	MW492609	MW480641	MW480600	MW489269	MW480682	-
	F217155	leaf	2017	Xinyi	MW492615	MW480647	MW480606	MW489275	MW480688	-
	F218126	leaf	2018	Xinshe	MW492625	MW480657	MW480616	MW489285	MW480698	-
	t220155	fruit	2020	Xinyi	MW492629	MW480661	MW480620	MW489289	MW480702	-
	F212108	fruit	2012	Dacun	MW492594	MZ128124	MW480585	MW489254	MW480667	MW835240
	F216025	twig	2016	Dacun	MW492599	MW480631	MW480590	MW489259	MW480672	MW835244
	F216082	leaf	2016	Dacun	MW492604	MW480636	MW480595	MW489264	MW480677	-
	F217120	leaf	2017	Dacun	MW492608	MW480640	MW480599	MW489268	MW480681	-
	F218113	leaf	2018	Xinshe	MW492622	MW480654	MW480613	MW489282	MW480695	-
<i>Colletotrichum viniferum</i>	F215071	fruit	2015	Supermarket at Taichung	MW492595	MW480627	MW480586	MW489255	MW480668	MW835242
<i>C. viniferum</i> subclade T	F212083	fruit	2012	Zhuolan	MW492592	MW480624	MW480583	MW489252	MW480665	MW835239
	F212087	fruit	2012	Guoxing	MW492593	MW480625	MW480584	MW489253	MW480666	-
	F215090	fruit	2015	Xinshe	MW930857	MW927709	MW927706	MW927707	MW927708	MW835241
	F215149	fruit	2015	Xinshe	MW492598	MW480630	MW480589	MW489258	MW480671	-
	F216035	fruit	2016	Xinshe	MW492600	MW480632	MW480591	MW489260	MW480673	MW835245
	F216036	leaf	2016	Xinshe	MW492601	MW480633	MW480592	MW489261	MW480674	MW835246
	F216184	fruit	2016	Shuili	MW492605	MW480637	MW480596	MW489265	MW480678	-
	F217069	fruit	2017	Wufeng	MW492606	MW480638	MW480597	MW489266	MW480679	-
	F217115	fruit	2017	Dacun	MW492607	MW480639	MW480598	MW489267	MW480680	-
	F217131	leaf	2017	Puli	MW492610	MW480642	MW480601	MW489270	MW480683	MW835237
	F217133	fruit	2017	Puli	MW492611	MW480643	MW480602	MW489271	MW480684	MW835238
	F217141	leaf	2017	Dacun	MW492612	MW480644	MW480603	MW489272	MW480685	MW835249

表 3. 本研究分離與蒐集之菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)  
**Table 3.** List of the isolates which were isolated in this study and related information and accession numbers in GenBank. (continued)

Species	Isolate <sup>z</sup>	Source	Year	Location	<i>ITS</i> <sup>y</sup>	<i>GAPDH</i>	<i>ACT</i>	<i>TUB2</i>	<i>CHS-1</i>	<i>ApMat</i>
	F217153	fruit	2017	Xinyi	MW492614	MW480646	MW480605	MW489274	MW480687	-
	F217177	fruit	2017	Dacun	MW492616	MW480648	MW480607	MW489276	MW480689	-
	F217179	fruit	2017	Wufeng	MW492617	MW480649	MW480608	MW489277	MW480690	-
	F217209	fruit	2017	Dacun	MW492618	MW480650	MW480609	MW489278	MW480691	-
	F217211	fruit	2017	Dacun	MW492619	MW480651	MW480610	MW489279	MW480692	-
	F218102	fruit	2018	Xinshe	MW492620	MW480652	MW480611	MW489280	MW480693	-
	F218110	fruit	2018	Xinshe	MW492621	MW480653	MW480612	MW489281	MW480694	-
	F218118	fruit	2018	Xinshe	MW492623	MW480655	MW480614	MW489283	MW480696	-
	F218123	fruit	2018	Xinshe	MW492624	MW480656	MW480615	MW489284	MW480697	-
	F218130	fruit	2018	Xinshe	MW492626	MW480658	MW480617	MW489286	MW480699	-
	t220153	fruit	2020	Xinyi	MW492627	MW480659	MW480618	MW489287	MW480700	-
	t220154	fruit	2020	Xinyi	MW492628	MW480660	MW480619	MW489288	MW480701	-
	t220156	fruit	2020	Xinyi	MW492630	MW480662	MW480621	MW489290	MW480703	-
	t220157	fruit	2020	Xinyi	MW492631	MW480663	MW480622	MW489291	MW480704	-
	t220158	fruit	2020	Xinyi	MW492632	MW480664	MW480623	MW489292	MW480705	-

<sup>z</sup> All isolates were isolated from diseased mature fruits which showed typical ripe rot of grape or lesions on leaves or twigs.

<sup>y</sup> *ITS*: internal transcribed spacer; *GAPDH*: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *ACT*: actin; *TUB2*: beta-tubulin 2; *CHS-1*: chitin synthase; *ApMat*: intergenic sequence between *Apn2* and *MAT1-2-1*.

加以用 F215069 之 *GADPH* 和 *TUB2* 基因為代表進行 BLAST 分析搜尋，挑選序列與之最相近的已知菌株各 2 株共 4 株（菌株代號分別為 J11 與 J2-1；CGRS1 與 CGRQ1。已知皆為 *C. viniferum*）一併納入分析；以上共 55 株參考菌株（表 4）。利用 *ITS*、*ACT*、*TUB2*、*GAPDH*、及 *CHS-1* 等 5 個基因的聯合序列針對前述總共 95 株菌建構最大概率親緣關係樹的分析結果顯示（圖 1），本研究的 40 株菌可鑑定為 3 種 *Colletotrichum* sp.，其中 28 株與 *C. viniferum* L. J. Peng, L. Cai, K. D. Hyde & Zi Y. Ying 模式菌株及其他分離自中國的 *C. viniferum* 參考菌株親緣關係較相近，構成一個穩定的 *C. viniferum* 支序群，拔靴法支撐數值 (bootstrap support values) 為 96%，而貝葉斯事後概率數值 (Bayesian posterior probabilities) 為 0.99，可鑑定為 *C. viniferum*；7 株與 *C. fructicola* 的菌株形成一支序群，拔靴法支撐數值為 76%，而貝葉斯事後概率數值為 1，鑑定為 *C. fructicola*；5 株與 *C. tropicale* 的菌株形成一支序群，拔靴法支撐數值為 91%，而貝葉斯事後概率數值為 1，可鑑定為 *C. tropicale*（圖 1）。

親緣關係分析也顯示 *C. viniferum* 支序群明顯包含 2 個次支序群，分別稱為次支序群 T 與次支序群 C。但須注意次支序群 T 的拔靴法支撐數值小於 50% 而貝葉斯事後概率值為 0.74，而次支序群 C 則分別為 67% 與 0.99，數值皆較低，說明這樣的分群方式可能還不是很穩定。

自台灣田間或生鮮超市葡萄果實分離之 28 株菌中，24 株（占全體 85.7%）屬於 *C. viniferum* 次支序群 T，1 株（3.6%）與源自中國的 *C. viniferum* 參考菌株同屬於次支序群 C，而其他 3 個分離株，2 株為 *C. fructicola*（7.1%），1 株為 *C. tropicale*（3.6%）；自「產季罹病葉片」所獲得的 6 個分離株中，1 株為 *C. viniferum* 次支序群 T、3 株為 *C. fructicola*，另 2 株為 *C. tropicale*；『採收後罹病葉片』的 4 個分離株中，2 株為 *C. viniferum* 次支序群 T、1 株為 *C. fructicola*，及 1 株為 *C. tropicale*；自『具褐斑的枝條或芽點』分離到的代表性菌株為 *C. tropicale*；自雜草分離的菌株為 *C. fructicola*（圖 1）。

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。

Species	Isolates	<i>ITS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>ACT</i>	<i>CHS</i>	<i>TUB2</i>	<i>ApMat</i>	Reference
<i>Colletotrichum aenigma</i>	ICMP18608, C1253.4	JX010244	JX010044	JX009443	JX009774	JX010389	-	Weir et al. (2012)
	JZB330025, B1	KF156860	KF377492	KF377529	KF289005	KF288964	-	Yan et al. (2015)
<i>Colletotrichum asianum</i>	ICMP18580, BPD14, C1315.4	FJ972612	JX010053	JX009584	JX009867	JX010406	-	Weir et al. (2012)
	ICMP18696, C1187	JX010192	JX009915	JX009576	JX009753	JX010384	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	ICMP17673, 3-1-3	JX010176	JX009930	JX009483	JX009799	JX010392	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum alatae</i>	ICMP17919, C1275.5	JX010190	JX009990	JX009471	JX009837	JX010383	-	Weir et al. (2012)
	ICMP12071, C824	JX010251	JX010028	JX009572	JX009882	JX010411	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum alienum</i>	ICMP18621, C1194.22	JX010246	JX009959	JX009552	JX009755	JX010386	-	Weir et al. (2012)
	ICMP18537, C1282.4	JX010205	JX010005	JX009564	JX009853	JX010420	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum acaearoa</i>	GMN4268	KX094252	KX094183	KX093982	KX094083	KX094285	-	de Silva et al. (2019)
<i>Colletotrichum chrysophilum</i>	ICMP18658, C1317.1	JX010265	JX009989	JX009537	JX009877	JX010438	-	Weir et al. (2012)

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)  
**Table 4.** List of the reference isolates used in this study and related information and accession numbers. (continued)

Species	Isolates	ITS	GAPDH	ACT	CHS	TUB2	ApMat	Reference
<i>Colletotrichum cordylinicola</i>	ICMP18579, LC0955, C1315.1	JX010226	JX009975	HM470235	JX009864	JX010440	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum conoideis</i>	CAUG17	KP890168	KP890162	KP890144	KP890156	KP890174	-	Diao et al. (2017)
<i>Colletotrichum endophyiticum</i>	UOM1137, F5-2D	MH728809	MH707467	MH781483	MH805853	MH846566	-	de Silva et al. (2019)
<i>Colletotrichum fructicola</i>	CAUG28	KP145441	KP145413	KP145329	KP145385	KP145469	-	Diao et al. (2017)
	CBS130416, ICMP18581, C1315.3, LC0033	JX010165	JX010033	JX009501	JX009866	JX010405	JQ807838	Weir et al. (2012) Yokosawa et al. (2020)
	CBS125397, C1316.21	JX010173	JX010032	JX009581	JX009874	JX010409	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum grevilleae</i>	ICMP18613, C1253.2	JX010167	JX009998	JX009491	JX009772	JX010388	-	Weir et al. (2012)
	CBS132879	KC297078	KC297010	KC296941	KC296987	KC297102	-	Yan et al. (2015)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CBS112999, ICMP17821	JQ005152	JQ005239	JQ005500	JQ005326	JQ005587	-	Weir et al. (2012)
	CORCG5	HM034809	HM034807	HM034801	HM034805	HM034811	-	Diao et al. (2017)
<i>Colletotrichum hebeense</i>	JZB330028, K3	KF156863	KF377495	KF377532	KF289008	KF288975	-	Yan et al. (2015)
<i>Colletotrichum lysitricis</i>	CBS142411, CPC 28153	KY856450	KY856274	KY856023	KY856190	KY856532	-	de Silva et al. (2019)
<i>Colletotrichum horri</i>	ICMP10492, C1180.1	GQ329690	GQ329681	JX009438	JX009752	JX010450	-	Yan et al. (2015)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	ICMP17816, C1266.1	JX010231	JX010012	JX009452	JX009813	JX010444	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum makassarensense</i>	CBS143664, CPC28612	MH728812	MH728820	MH781480	MH805850	MH846563	-	de Silva et al. (2019)
	CPC28556	MH728815	MH728821	MH781478	MH805848	MH846561	-	de Silva et al. (2019)
<i>Colletotrichum musae</i>	CBS116870, ICMP19119	JX010146	JX010050	JX009433	JX009896	HQ596280	-	Weir et al. (2012)
	ICMP17817, C1266.11, IM52264	JX010142	JX010015	JX009432	JX009815	JX010395	-	Diao et al. (2017)
<i>Colletotrichum nupharicola</i>	CBS470.96, ICMP18187, C1275.25	JX010187	JX009972	JX009437	JX009835	JX010398	-	Weir et al. (2012)
	CBS472.96, C1275.26, ICMP17940	JX010188	JX010031	JX009582	JX009836	JX010399	-	Diao et al. (2017)
<i>Colletotrichum psidii</i>	CBS145.29	JX010219	JX009967	JX009515	JX009901	JX010443	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum queenslandicum</i>	ICMP1778	JX010276	JX009934	JX009447	JX009899	JX010414	-	Weir et al. (2012)
	ICMP18705, C956.1	JX010185	JX010036	JX009490	JX009890	JX010412	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum salsolae</i>	ICMP19051, C1314	JX010242	JX009916	JX009562	JX009863	JX010403	-	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum siamense</i>	ICMP18578, C1315.2	JX010171	JX009924	JX009518	JX009865	JX010404	-	Weir et al. (2012)

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)  
 Table 4. List of the reference isolates used in this study and related information and accession numbers. (continued)

Species	Isolates	ITS	GAPDH	ACT	CHS	TUB2	ApMat	Reference
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	CMM3814	KC702994	KC702955	KC702922	KC598113	KM404170	-	de Silva <i>et al.</i> (2019)
	CBS130420, LC921, LLTA01	HM131511	HM131497	HM131507	JX009895	JX010415	-	Weir <i>et al.</i> (2012)
	ICMP18649, CBS124945, CI3.16.13	JX010294	JX010006	JX009444	JX009869	JX010447	-	Weir <i>et al.</i> (2012)
	ICMP4832	JX010269	JX009952	JX009520	JX009898	JX010442	-	Weir <i>et al.</i> (2012)
<i>Colletotrichum tropicale</i>	ICMP18653, CBS124949, 5101	JX010264	JX010007	JX009489	JX009870	JX010407	-	Weir <i>et al.</i> (2012)
	CPC28607	MH728814	MH707464	MH781479	MH805849	MH846562	-	de Silva <i>et al.</i> (2019)
<i>Colletotrichum tainanense</i>	CBS143666, UOM1298T, CPC30245	MH728818	MH728823	MH781475	MH805845	MH846558	-	de Silva <i>et al.</i> (2019)
	UOM1290	MH728805	MH728819	MH781487	MH805857	MH846570	-	de Silva <i>et al.</i> (2019)
<i>Colletotrichum viniferum</i>	CI026	MN758919	MN785021	-	-	MN785082	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	CI036	MN758928	MN785030	-	-	MN785091	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	CA041	MN758932	MN785034	-	-	MN785095	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	CA043	MN758934	MN785036	-	-	MN785097	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	CA044	MN758935	MN785037	-	-	MN785098	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	LMF18-1	MN758936	MN785038	-	-	MN785099	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	LMF18-2	MN758937	MN785039	-	-	MN785100	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	LMF18-6	MN758940	MN785042	-	-	MN785103	-	Echeverrigaray <i>et al.</i> (2020)
	CNU171001	MG182340	MG182341	-	-	MG182342	-	Oo & Oh (2017)
	GZAAS5.08601, yg1	JN412804	JN412798	JN412795	-	-	JN412813	-
<i>C. viniferum</i> subclade C	JZB330008, G12-1	KF156846	KF377476	KF377513	KF288989	KF288962	-	Yan <i>et al.</i> (2015)
	JZB330017, PTT3-1	KF156854	KF377485	KF377522	KF288998	KF288963	-	Yan <i>et al.</i> (2015)
	CAUG27	KP145440	KP145412	KP145328	KP145384	KP145468	-	de Silva <i>et al.</i> (2019)
	GZAAS5.08608, gg4	JN412802	JN412800	JN412793	-	-	JN412811	KJ623242
	J11	KF156868	KF377500	KF377537	KF289012	KF288979	-	Peng <i>et al.</i> (2013); Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	J2-1	KF156867	KF377498	KF377536	KF289011	KF288978	-	
CGRS1	KJ534683	KJ534750	KJ534740	KJ534709	KJ534675	-		
CGRQ1	KJ534682	KJ534749	KJ534739	KJ534708	KJ534676	-		

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)  
**Table 4.** List of the reference isolates used in this study and related information and accession numbers. (continued)

Species	Isolates	ITS	GAPDH	ACT	CHS	TUB2	ApMat	Reference
<i>Colletotrichum xanthorrhoeae</i>	ICMP17903, BRIP45094, C1271	JX010261	JX009927	JX009478	JX009823	JX010448	-	Weir <i>et al.</i> (2012)
Clade V								
	16-15	-	-	-	-	-	LC466510	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	16-16	-	-	-	-	-	LC466511	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	17-18-3	-	-	-	-	-	LC466540	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	17-25-1	-	-	-	-	-	LC466518	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	17-25-2	-	-	-	-	-	LC466519	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	16-13	-	-	-	-	-	LC466509	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	16-37	-	-	-	-	-	LC466507	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	16-103	-	-	-	-	-	LC466482	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	16-106	-	-	-	-	-	LC466483	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	16-107	-	-	-	-	-	LC466484	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	16-108	-	-	-	-	-	LC466485	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	17-17-1	-	-	-	-	-	LC466536	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	17-17-2	-	-	-	-	-	LC466537	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	17-33-2	-	-	-	-	-	LC466547	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
	17-47-2	-	-	-	-	-	LC466531	Yokosawa <i>et al.</i> (2020)
outgroup <i>Colletotrichum boninense</i>	CBS123755	JQ005153	JQ005240	JQ005501	JQ005327	JQ005588	-	Weir <i>et al.</i> (2012)

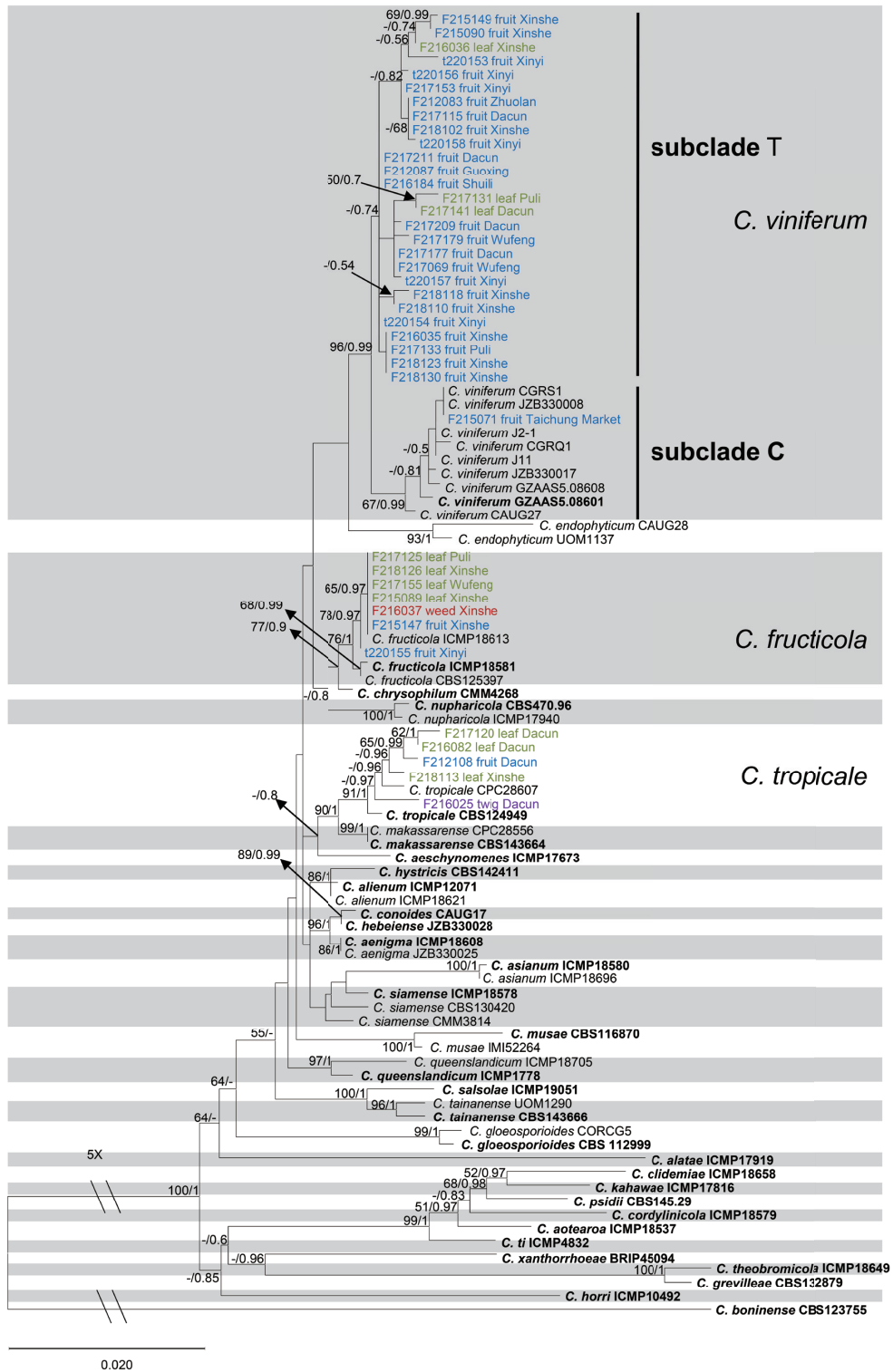


圖 1. 以 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種共 95 個菌株建構之最大概率親緣關係樹，以 *ITS*、*GAPDH*、*TUB2*、*ACT* 及 *CHS-1* genes 等 5 基因建構之。

**Fig. 1.** A maximum likelihood phylogenetic tree based on 95 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. The tree was generated using concatenated sequences of genes encoding the ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), beta-tubulin 2 (*TUB2*), actin (*ACT*) and chitin synthase 1 (*CHS-1*). The bootstrap support values ( $\geq 50\%$ ) and Bayesian posterior probabilities ( $PP \geq 0.5$ ) are displayed at the nodes. The tree was rooted to *Colletotrichum boninense* (CBS 123755). The bar indicates 0.02 expected changes per site. Type strains are displayed in bold. Isolates of this study which isolated from different tissues are indicated by colors: leaves in green, fruits in blue, twigs in purple, and weeds in red.

### *C. viniferum* 次支序群 T 與其他 *C. viniferum* 菌株的親緣關係

為瞭解 *C. viniferum* 次支序群 T 與其他地域 *C. viniferum* 菌株的親緣關係，本研究收集目前已發表之 *C. viniferum* 核酸序列資料進行分析，但由於各研究團隊用以分析的核酸序列種類未必相同，以下親緣分析分為二個部分進行。Echeverrigaray *et al.* (2020) 與 Oo & Oh (2017) 個別發表自巴西 (8 株) 與韓國 (1 株) 收集的 *C. viniferum* 菌株，因 Oo & Oh (2017) 僅公布並分析 *ITS*、*GAPDH* 與 *TUB2* 等基因的核酸序列 (表 4)，因此第一部分分析也採取相同策略，納入分析的菌株包括本研究分離的 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株 8 株與次支序群 C 菌株 1 株、源自中國的次支序群 C 菌株 9 株，以及外群菌株 1 株，共 28 株菌，根據上述 3 基因的序列作親緣關係分析 (圖 2)，結果顯示所有 *C. viniferum* 分離株初步細分成 3 個分群，並與分離地區具相關性，其中巴西分群的 8 菌株可再分成關係相近的 2 小群。原屬於 *C. viniferum* 次支序群 T 之台灣菌株與巴西菌群的親緣關係較近，原屬於 *C. viniferum* 次支序群 C 的台灣菌株 F215071 與韓國 1 菌株則與中國菌群較接近。

第二部分分析聚焦於探討台灣 *C. viniferum* 次支序群 T 與跟 *C. viniferum* 具高度親緣關係之日本支序群 V 菌株 (Yokosawa *et al.* 2020) 的親緣關係；Yokosawa *et al.* (2020) 以 *ApMat* 基因序列建構親緣關係樹，因此本研究也採取相同策略，納入分析的菌株包括本研究分離之 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株 8 株、*C. viniferum* 次支序群 C 菌株 1 株，以及參考菌株 17 株 (表 4)，共 26 株菌 (圖 3)。分析結果顯示，台灣的次支序群 T 及中國的次支序群 C 較相近，日本分群 V 之菌株自成一支序群，支序群的拔靴法支撐數值為 86% 而貝葉

斯事後概率數值為 0.97，與台灣的次支序群 T 及中國的次支序群 C 可明顯區別。分離自生鮮超市果實的 F215071 菌株與次支序群 C 之 *C. viniferum* 模式菌株 (GZAAS5.08601) 分屬於同一支序群。*ApMat* 序列構築的親緣關係結果與前述分析 5 個基因之序列所獲結論一致。

### *C. viniferum* 次支序群 T 的菌株特性描述及在葡萄造成之病徵

本研究自罹病葡萄葉片與果實分離的菌株主要屬於 *C. viniferum* 次支序群 T，以 F217069 為代表性菌株，描述其特徵如下：菌落為灰色到灰綠色，氣生菌絲生長平鋪至微蓬鬆；分生孢子透明，長橢圓形 (cylindrical)，兩端圓鈍或偶有一端稍微尖起，具明顯液胞；長度為 12.4-14.0-16.0  $\mu\text{m}$  (min.-avg.-max.)，寬度為 4.8-5.3-6.0  $\mu\text{m}$ ，長寬比為 2.2-2.6-3.3 (表 5、圖 4)。壓器 (appressorium) 為灰綠色到褐棕色之間，多數為不規則的卵狀 (irregular ovoid) 或棍棒狀 (clavate)，邊緣為圓鋸齒狀 (crenate)，偶而出現不規則裂瓣 (lobed)；長度為 8.0-10.9-15.6  $\mu\text{m}$ ，寬度為 4.4-6.8-10.0  $\mu\text{m}$  (表 5、圖 4)。菌絲最適生長溫度為 28°C，4°C 以下以及 40°C 以上無法生長。另針對菌株 F217131、F217133 與 F217141 所進行的分析顯示，其壓器與分生孢子之形態均與 F217069 相似，最適生長溫度也是 28°C，但菌株生長速度與菌落特徵呈現些微差異：F217131 的菌落型態與 F217069 相似，F217133 與 F2171413 的菌落為深墨綠色至灰白色，帶淡黃色。

*C. viniferum* 次支序群 T 菌株在田間栽植葡萄所引起的病徵主要包括：罹病葡萄葉片出現葉緣局部或大面積壞疽，並且伴隨明顯大範圍的黃暈 (圖 5A-C)；若果實罹病，成熟葡萄果粒腐爛、皺縮，表面出現黑色、顆粒、輪紋排列的分生孢子盤，濕度高時出現橘色菌泥 (圖 5D、E)。

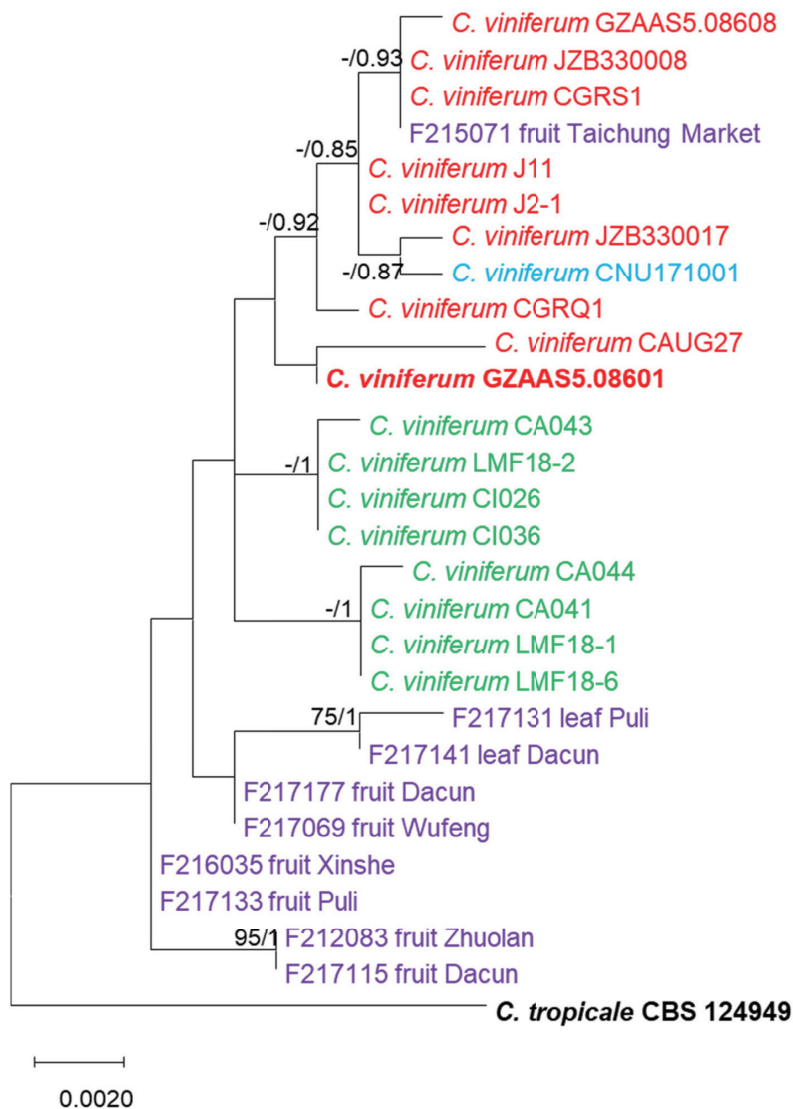


圖 2. 以 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種共 28 菌株以 *ITS*、*GAPDH* 及 *TUB2* 等 3 基因建構之最大概率親緣關係樹。

**Fig. 2.** A maximum likelihood phylogenetic tree of 28 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. The tree was generated using concatenated sequences of internal transcribed spacer (*ITS*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and beta-tubulin 2 (*TUB2*) genes. The tree was rooted to *Colletotrichum tropicale* (CBS 124949). The bar indicates 0.002 expected changes per site. Type strains are displayed in bold. *Colletotrichum viniferum* isolates from different countries are indicated by colors: China in red, Taiwan in purple, South Korea in blue, and Brazil in green.

### *C. viniferum* 次支序群 T 菌株之病原性測試

為瞭解 *C. viniferum* 次支序群 T 的病原性，選擇不同組織來源的 *C. viniferum* 次支序

群 T 菌株進行病原性測試，供試菌株包括分離自罹病果實的菌株 F217069 與 F217133，及分離自罹病葉片的菌株 F217141 與 F217131，以葡萄園植株幼果或生長箱盆栽植株所進行的接種試驗顯示：(1) 果實接種：以 F217069、

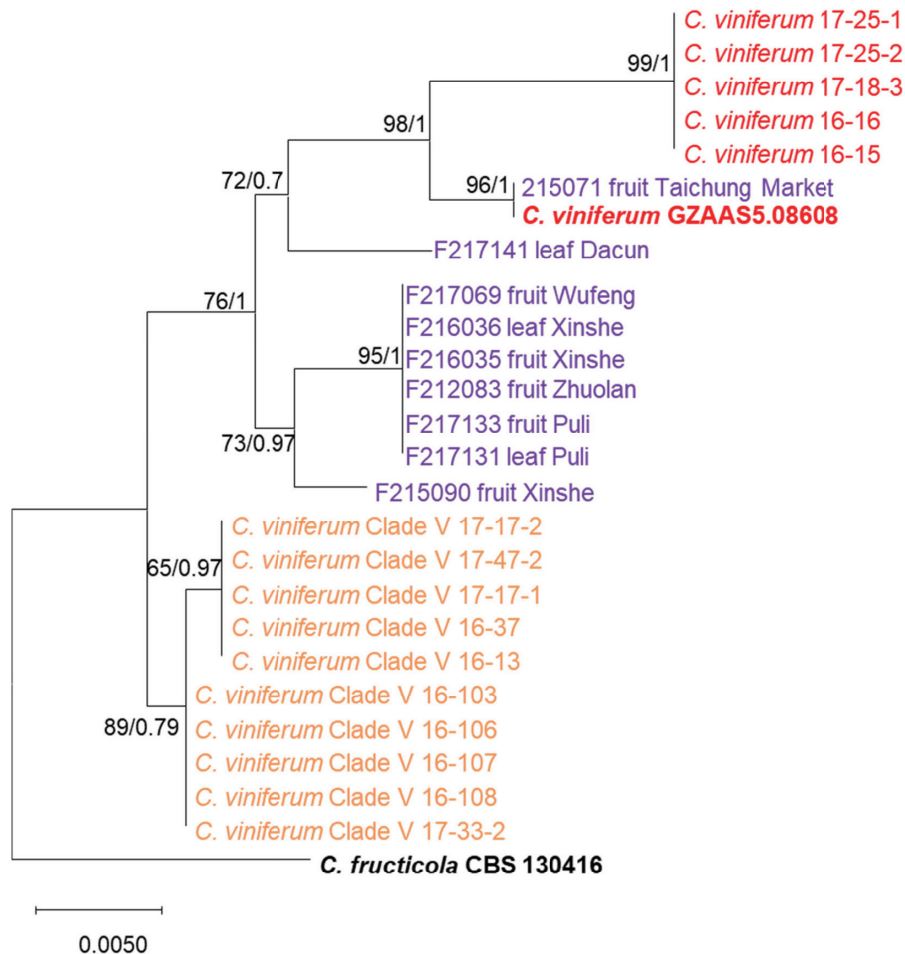


圖 3. 以 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種共 26 菌株之 *ApMat* 基因建構之最大概率親緣關係樹。

**Fig. 3.** A maximum likelihood phylogenetic tree of 26 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. The tree was generated using intergenic sequence between *Apn2* and *MAT1-2-1* (*ApMat*) partial sequence. The bootstrap support values ( $\geq 50\%$ ) and Bayesian posterior probabilities ( $\geq 0.5$ ) are displayed at the nodes. The tree is rooted to *Colletotrichum fructicola* (CBS 130416). The bar indicates 0.005 expected changes per site. Type strains are displayed in bold. *Colletotrichum viniferum* isolates from different countries or Japanese clade V are indicated by colors: China in red, Taiwan in purple, and Japanese clade V in orange.

F217133、F217141 及 F217131 等菌株之孢子懸浮液個別接種於葡萄幼果 5 wk 後，接種果實皆出現點狀、塊狀或網狀紫褐色病斑；果實開始轉色前，病斑逐漸擴大並出現紫紅色暈圈；果實轉色後至成熟期間，病斑褐化，果實凹陷、果肉軟爛，果粒逐漸皺縮，表面出現黑色點狀同心圓排列的病兆，環境適合下產生橘色菌泥；接種無菌水的對照組則無病徵出現（圖 6）。以上 4 個菌株分別接種葡萄幼果所造成的病徵與在田間觀察到的葡萄晚腐病徵相同，且

可分離得相同病原菌，故依柯霍氏法則確認其病原性。(2) 盆栽植株接種：於生長箱內，以孢子懸浮液噴布葡萄盆栽植株，感染 3–5 d 後，上述 4 個供試菌株皆可造成葉片壞疽腐爛（圖 7A、B）；感染 10–14 d 後，接種葉片皆出現壞疽、黃化、落葉，但個別菌株造成的病徵稍有不同：F217069 與 F217133 引發葉脈褐化（圖 7C），F217133 與 F217131 造成葉片斑點病徵（圖 7D）。此外，4 個菌株皆可造成卷鬚與花穗褐化壞疽（圖 7E、F）。相對的，處理無菌水的

表 5. *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 型態與生理特徵。Table 5. Synopsis of morphological and physical data of the *Colletotrichum viniferum* subclade T isolates in Taiwan.

Isolate no.	Conidia length × width min.-avg.-max (μm)	Appressorium length × width min.-avg.-max (μm)	Length width ratio	Optimum temp. for mycelium growth	Mycelium growth rate at optimum temp. (mm d <sup>-1</sup> )
F217069	12.4-14.0-16.0 × 4.8-5.3-6.0	8.0-10.9-15.6 × 4.4-6.8-10.0	2.2-2.6-3.3	28°C	5.4
F217131	12.0-13.6-15.6 × 4.8-5.4-6	9.0-12.6-17.0 × 6.0-6.7-9.0	2.0-2.5-3.1	28°C	5.0
F217133	12.8-14.9-16.4 × 4.4-4.8-5.6	7.6-8.7-10.4 × 3.6-4.4-6.0	2.46-3.1-3.7	28°C	4.6
F217141	11.6-13.1-14.8 × 4.4-4.7-5.2	8.0-10.7-20.0 × 4.8-5.8-8.8	2.4-2.8-3.3	28°C	3.9

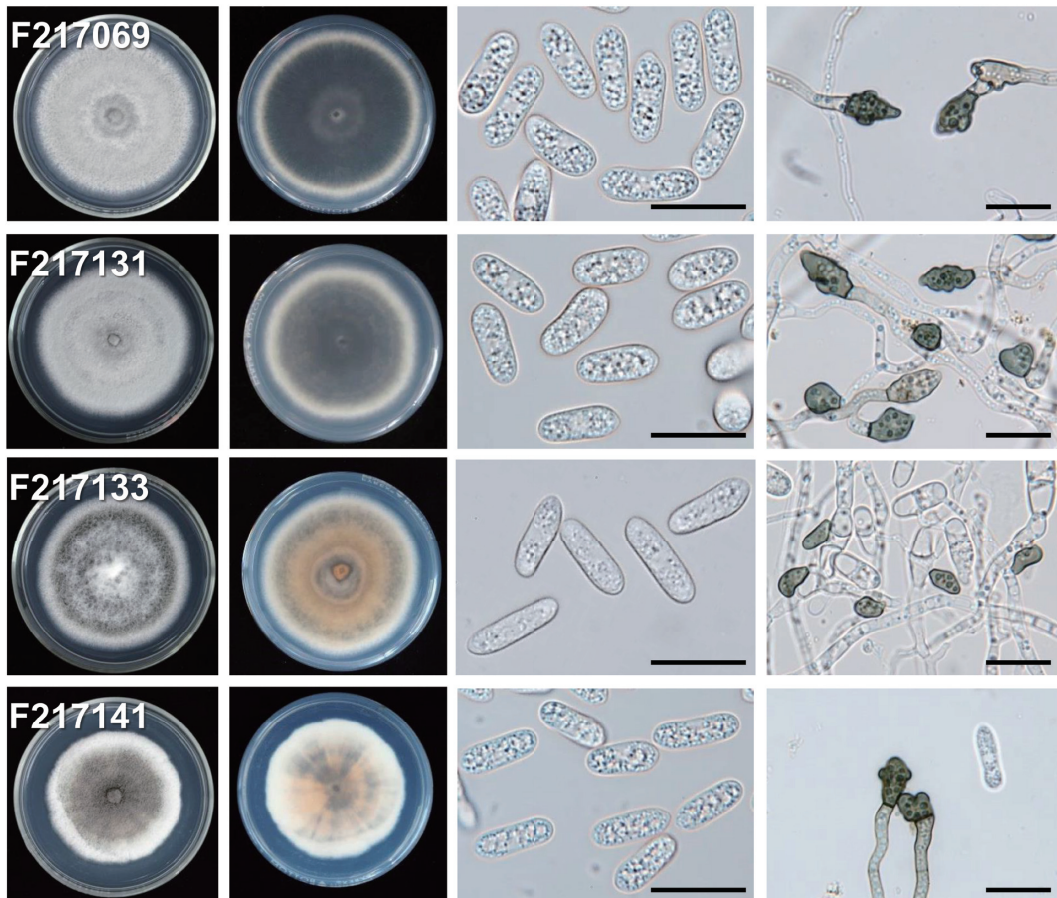
圖 4. *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 菌株型態特徵。由左至右，正面菌落、背面菌落、分生孢子、壓器。

Fig. 4. Morphological features of isolates of *Colletotrichum viniferum* subclade T. The top and reverse views of a colony, conidia, and appressoria of each isolate were illustrated in one row from left to right. Cultures were grown on PDA at 22–24°C under 12 h light period for 7 to 9 d. Conidia were from 7-day PDA cultures. Appressoria formed on glass slides and developed from conidia suspended in 0.25–0.5% V8 juice for 24 h. Bar = 10 μm.

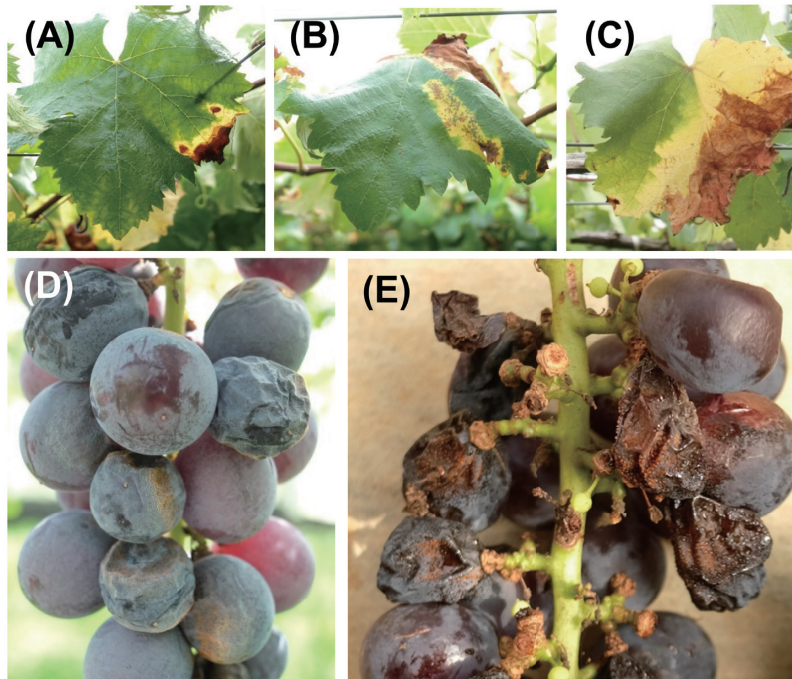


圖 5. *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 在田間引起之 (A–C) 葡萄葉片與 (D、E) 果實病徵。

**Fig. 5.** The typical field symptoms caused by *Colletotrichum viniferum* subclade T, including (A–C) diseased leaves and (D, E) fruits.

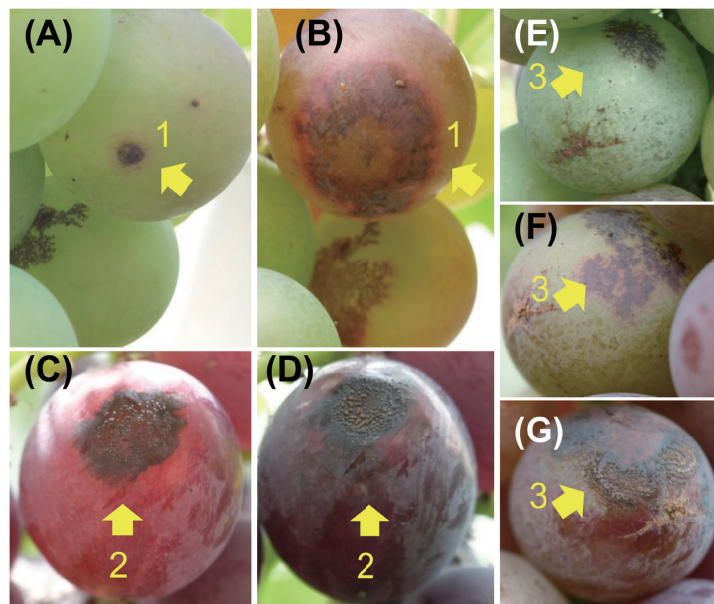


圖 6. 田間幼果人工接種 *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 菌株 F217069 在果實成熟後形成之病徵。

**Fig. 6.** Symptoms of grape fruits (cultivar: 'Kyoho') inoculated by the isolate F217069 of *Colletotrichum viniferum* subclade T. These 1-month-old fruits in the orchard were inoculated *in planta* with the conidia spore suspension ( $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>) of the isolate. The typical symptoms of grape ripe rot appeared after veraison.

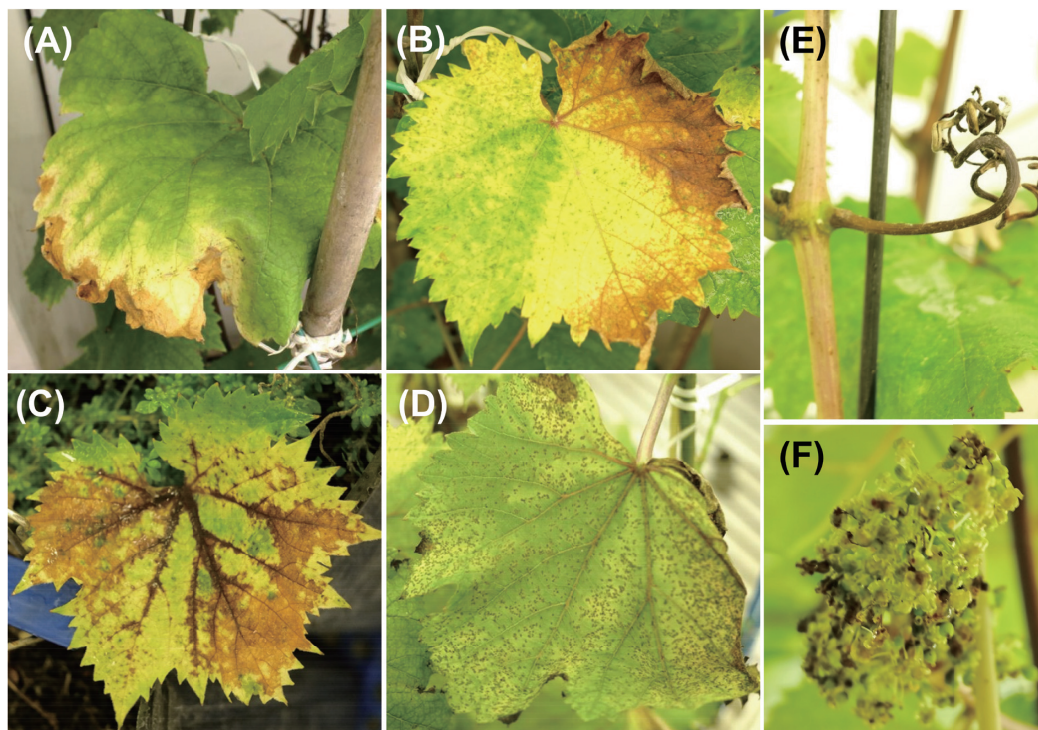


圖 7. 溫室植株人工接種 *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 菌株 (A–C, E, F) F217069 或 (D) F217133 後在葉片、卷鬚或花上形成之病徵。

**Fig. 7.** Symptoms of grape leaves (cultivar: 'Kyoho'), young shoots and blossom inoculated by the isolate (A–C, E, F) F217069 or (D) F217133 of *Colletotrichum viniferum* subclade T in greenhouse assays. The potted plants were inoculated with the conidia spore suspension ( $1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) and then were kept in  $28^\circ\text{C}$  and high humidity condition (relative humidity; RH > 85%).

對照組完全無病徵。自上述呈現病徵的部位均可再分離得相同病原菌，完成柯霍氏法則。

## 討論

### *C. viniferum* 次支序群 T 為台灣主要葡萄晚腐病菌

為釐清台灣葡萄晚腐病菌種類與病原田間分布狀況，本研究於 2012–2020 年自苗栗、台中市、彰化，以及南投等地的葡萄產區，共逾 35 場次之葡萄園蒐集可疑病害組織。從分生孢子形態初判，自葡萄果實分離的 *Colletotrichum* 分離株皆為 *C. gloeosporioides* s. l.，隨機挑選其中 28 株進行多重序列親緣關係分析，發現 25 株為 *C. viniferum* (89.4%)，2 株為 *C. fructico-*

*la* (7.1%)，1 株為 *C. tropicale* (3.6%)。鑑定為 *C. viniferum* 的菌株中，計有 24 株屬於 *C. viniferum* 次支分群 T，分離比例高達 85.7%，另 1 株 (3.6%) 與 *C. viniferum* GZAAS5.08601 (模式菌株) 和 GZAAS5.08608 等菌株同屬於 *C. viniferum* 次支序群 C。

這些結果顯示 *C. viniferum* 次支分群 T 為台灣葡萄果實晚腐病菌的主要病原族群，先前的研究也支持 *C. viniferum* 為台灣葡萄果實晚腐病菌的結論 (Duan & Chen 2020)，但這些分離株究竟屬於 *C. viniferum* 次支序群 T 或次支序群 C 仍待進一步分析。

特別一提的是，本研究之次支序群 T 的菌株型態與屬於次支序群 C 的 *C. viniferum* 標準株 (Peng et al. 2013) 相似，但本研究之次支

序群 T 菌株菌絲最適生長溫度為 28°C，較標準株的 25°C 稍高。

### *C. viniferum* 次支序群具地域相關性

藉由建構 *ACT*、*CHS-1*、*GAPDH*、*TUB2* 以及 *ITS* 的多序列親緣關係樹，*C. viniferum* 在中國大陸首次被記錄 (Peng *et al.* 2013)。特別的是，再經 Yan *et al.* (2015) 的研究發現即便都是分離自中國的 *C. viniferum* 菌株仍顯現遺傳歧異度，似可再區分為不同支序群或甚至分種。本研究參考 Yan *et al.* (2015) 自 *C. viniferum* 各支序群選擇代表菌株做為「*C. viniferum* 參考菌株」，這些菌株與 *C. viniferum* 次支序群 T 明顯區隔，和 F215071 同被歸納於 *C. viniferum* 次支序群 C (圖 1)；不過，次支序群 T 與次支序群 C 的拔靴法支撐數值及貝葉斯事後概率數值皆不高，其分群穩定度仍待進一步驗證。另透過 *ITS*、*GAPDH* 與 *TUB2* 等基因的親緣關係分析，*C. viniferum* 次支序群 T、次支序群 C 及巴西菌株明顯依來源區域分屬於不同的支序群，而韓國菌株與 *C. viniferum* 次支序群 C 屬於相同分群 (圖 2)，顯示地理區隔在菌群分化的重要角色。

Yokosawa *et al.* (2020) 利用 *ApMat* 基因分析日本長野縣葡萄晚腐病菌，親緣關係分析結果顯示，該地區葡萄晚腐病主要病原為「分群 V」菌株群，其與 *C. viniferum* 模式菌株親緣關係相近，雖有差異，但未達另立新種的程度。本研究參考 Yokosawa *et al.* (2020) 的分析方法，同樣利用 *ApMat* 基因進行分析的結果發現日本的分群 V 的菌株可與 *C. viniferum* 次支序群 T 及次支序群 C 的菌株有明顯區隔，顯示 *ApMat* 基因可以明顯區分不同地域來源的菌株 (圖 3)。事實上，以 *ApMat* 基因序列進行分析時，F215071 菌株與源自中國的次支序群 C 菌株 GZAAS5.08601 (*C. viniferum* 模式菌株) 分屬於同一支序群，與前述分析 5 個基因之序列所獲結論一致。F215071 菌株係分離自台中生鮮超市葡萄果實，雖然欠缺果實種植來源記錄，根據序列資料，很難排除其自國外移入的可能性，未來仍需更多的證據才能確認。

### *C. viniferum* 次支序群 T 亦可感染田間葡萄葉片

除了葡萄果實，本研究也在其他組織發現 *Colletotrichum* spp. 具高分離比例。尤其『產季罹病葉片』到『採收後乾枯葉片』，*Colletotrichum* 屬菌株的分離率由 35.9% 提高到 92.3%。分別自『產季罹病葉片』菌株隨機取樣 6 株、『採收後乾枯葉片』菌株隨機取樣 4 株，親緣分析結果顯示其分別有 1 與 2 株菌株屬 *C. viniferum* 次支序群 T (表 2、圖 1)。

自 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株中選取 4 株代表菌株進行接種試驗，自罹病葉片分離得的 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株 (F217133 與 F217147) 可感染果實引起典型晚腐病徵；反之由罹病果實分離得的菌株 (F217069 與 F217131) 亦可感染葉片引起葉片壞疽。各菌株在果實或植株造成之病徵雖有些微差異但大致相似：接種 1 mo 後直至果實轉色前才出現病徵，顯示潛伏感染的可能性 (圖 6)。盆栽植株接種試驗中，除可感染葉片外，亦可感染嫩梢與花穗 (圖 7E、F)。本研究的調查與試驗說明 *C. viniferum* 次支序群 T 的菌株在田間可交互感染葉片與果實，且試驗結果顯示菌株對嫩梢與花穗等具高病原性。在相同接種條件下，部分菌株出現葉片病徵不盡相同的狀況，推測可能是因為菌株病原性之差異或葉片生理狀態不同所造成，Yan *et al.* (2015) 的研究也顯示 *C. viniferum* 不同分離株對葡萄的致病力的確存在由低到高的廣泛變異，確切決定因素仍需要未來驗證。

### 其他 *Colletotrichum* 菌種分離狀況與病原性

部分 *Colletotrichum* 屬親緣種如 *Colletotrichum capsici* (Sawant *et al.* 2012; Pan *et al.* 2016)、*C. godetiae* (Baroncelli *et al.* 2014) 以及 *C. nymphaeae* (Liu *et al.* 2016) 等可感染葡萄枝條引起葡萄植株炭疽病 (grapevine anthracnose)。此外，*C. capsici* 雖可在田間感染葡萄葉片，但未有感染葡萄果實的紀錄；不過，溫室試驗證實其可感染葡萄果實，因此也可能具備在田間引發晚腐病的潛力 (Pan *et al.* 2016)；然而，並非所有

存在於葡萄枝條的 *Colletotrichum* spp. 皆會感染葡萄造成損失，例如分離自葡萄枝條上的 *C. dematium* 與 *C. siamense*，係以腐生方式存在於枝條表面 (Jayawardena *et al.* 2018)。本研究在『葡萄果實晚腐病』、『採收後焦枯之葡萄葉』和『產季間果園內雜草』等組織分離得 *C. viniferum*、*C. fructicola*，以及 *C. tropicale* 等，另在葡萄園罹病雜草也分離得 *C. fructicola*，這些菌株對葡萄果實的病原性與致病力仍有待未來釐清。除了 *Colletotrichum* 屬之外，自『產季罹病葉片』、『採收後乾枯葉片』以及『枝條或芽點壞疽斑』還可分離 *Pestalotiopsis*、*Botryosphaeriaceae*、*Alternaria* sp.、*Phomopsis* sp. 和 *Fusarium* sp. 等多種真菌，其病原性也有待確認。

### 台灣晚腐病調查結論

總結以上，本研究發現在台灣引發葡萄晚腐病菌主要的菌群為 *C. viniferum* 次支序群 T，且根據菌株分離結果最早於 2012 年即記錄得其存在，可知次支序群 T 至少從 2012 年開始即存在於田區，分布範圍包括台灣主要及次要葡萄產地。次支序群 T 可感染葡萄果實、葉片、嫩梢、花穗，並於葉片上造成壞疽、黃化、斑點及葉脈褐化等病徵。田間生態方面，在葡萄果實採收後，*C. viniferum* 次支序群 T 仍持續殘存在葉片上，可成為下季感染來源；在葡萄萌芽期，若遇環境條件適合，藏匿於枝條病斑、殘存之罹病葉片或落葉的病原菌可在短時間內產生大量分生孢子，藉由雨水噴濺到新生葉片上 (圖 5A–C；圖 7A–D)，也可能藉由噴濺感染田間嫩梢或花穗 (圖 7E、F)。至結果期，*C. viniferum* 再從葉片伺機感染幼果，並以『潛伏感染』的方式蟄伏至果實轉色後才顯現病徵 (圖 5D、E、圖 6)。因此，葉片甚至花穗與嫩梢皆可能成為果實晚腐病的重要感染源，要做好葡萄晚腐病防治，得在萌芽期起即密切注意葉片與花穗等是否出現疑似病徵；此外，由於花穗病徵與露菌病造成的徵狀相近，必須小心區分，以避免因誤診導致誤用，錯失關鍵防治時機。

### 誌謝

本文承蒙行政院農業委員會農業試驗所 104 農科-10.6.3-農-C1(8)、105 農科-10.5.3-農-C1(7)、106 農科-9.5.2-農-C1(2)，以及 107 農科-8.4.2-農-C1(8) 計畫經費支持，農業試驗所陸明德助理研究員提供植株供試，陳品儒、黃麟婷與林建毅等助理協助調查與進行試驗。

### 引用文獻

- Baroncelli, R., S. Sreenivasaprasad, C. R. Lane, M. R. Thon, and S. A. Sukno. 2014. First report of *Colletotrichum acutatum sensu lato* (*Colletotrichum godetiae*) causing anthracnose on grapevine (*Vitis vinifera*) in the United Kingdom. *New Dis. Rep.* 29:26. doi:10.5197/j.2044-0588.2014.029.026
- Cai, L., K. D. Hyde, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, J. M. Waller, M. M. Abang, J. Z. Zhang, Y. L. Yang, S. Phoulivong, Z. Y. Liu, H. Prihastuti, R. G. Shivas, E. H. C. McKenzie, and P. R. Johnston. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers.* 39:183–204.
- 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
- de Silva, D. D., J. Z. Groenewald, P. W. Crous, P. K. Ades, A. Nasruddin, O. Mongkolporm, and P. W. J. Taylor. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. *IMA fungus* 10:8. doi:10.1186/s43008-019-0001-y
- Diao, Y. Z., C. Zhang, F. Liu, W. Z. Wang, L. Liu, L. Cai, and X. L. Liu. 2017. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. *Persoonia* 38:20–37. doi:10.3767/003158517X692788
- Duan, C. H., H. R. Pan, and C. C. Wang. 2018. Identification, pathogenicity and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from five fruit crops in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 5:91–111. (in Chinese with English abstract) doi:10.6671/TPS.201812\_(5).06
- Duan, C. H. and G. Y. Chen. 2020. Molecular identification and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from grape in Taiwan. *J. Plant Med.* 62(4):23–32. (in Chinese with English abstract) doi:10.6716/JPM.202012\_62(4).0003
- Echeverrigaray, S., F. J. Scariot, G. Fontanella, F. Favaron, L. Sella, M. C. Santos, J. Schwambach, C. Pedrotti, and A. P. L. Delamare. 2020. *Colle-*

- totrichum* species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. *Plant Pathol.* 69:1504–1512. doi:10.1111/ppa.13240
- Gao, H., X. Yin, X. Jiang, H. Shi, Y. Yang, C. Wang, X. Dai, Y. Chen, and X. Wu. 2020. Diversity and spoilage potential of microbial communities associated with grape sour rot in eastern coastal areas of China. *PeerJ* 8:e9376. doi:10.7717/peerj.9376
- Glass, N. L. and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323–1330. doi:10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995
- Jayawardena, R. S., K. D. Hyde, K. W. T. Chethana, D. A. Daranagama, A. J. Dissanayake, I. D. Goonasekara, I. S. Manawasinghe, A. Mapook, S. C. Jayasiri, A. Karunarathna, C. G. Li, C. Phukhamsakda, I. C. Senanayake, D. N. Wanasinghe, E. Camporesi, T. S. Bulgakov, X. H. Li, M. Liu, W. Zhang, and J. Y. Yan. 2018. *Mycosphere* notes 102–168: Saprotrophic fungi on *Vitis* in China, Italy, Russia and Thailand. *Mycosphere* 9:1–114. doi:10.5943/MY-COSPHERE/9/1/1
- Ko, Y. 2008. *Illustrated Book of Plant Diseases of Economic Fruit Trees in Taiwan*. Yi Hsien Publishing Co. Ltd. New Taipei, Taiwan. 431 pp. (in Chinese)
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Kuo, K. C. and S. H. Hseu. 2003. Ripe rot of grape. p.115–119. *in*: *Compendium of Grape Diseases and Pests*. (Wang, C. L., P. J. Ann, H. L. Lin, C. I. Yuan, C. P. Chang, K. C. Kuo, S. H. Hseu, Y. S. Yang, T. C. Yang, M. Y. Chiang, and T. T. Tsay) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. Taipei, Taiwan. 250 pp. (in Chinese)
- Lefort, V., J. E. Longueville, and O. Gascuel. 2017. SMS: Smart model selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* 34:2422–2424. doi:10.1093/molbev/msx149
- Lei, Y., X. B. Tang, R. S. Jayawardena, J. Y. Yan, X. D. Wang, M. Liu, T. Chen, X. M. Liu, J. C. Wang, and Q. X. Chen. 2016. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in southern China. *Mycosphere* 7:1177–1191. doi:10.5943/mycosphere/si/2c/8
- Lim, Y. S., O. Hassan, and T. Chang. 2020. First report of anthracnose of shine muscat caused by *Colletotrichum fruticola* in Korea. *Mycobiology* 48:75–79. doi:10.1080/12298093.2019.1697190
- Lin, C. P., J. N. Tsai, and P. J. Ann. 2019. Preliminary report of *Colletotrichum viniferum* and other new species of *Colletotrichum* sp. As Grape Ripe Rot Causing Pathogens in Taiwan. *J. Plant Med.* 61(2–3):74. (in Chinese) doi:10.6716/JPM.201909\_61(2\_3).0006
- Liu, M., W. Zhang, Y. Zhou, Y. Liu, J. Y. Yan, X. H. Li, R. S. Jayawardena, and K. D. Hyde. 2016. First report of twig anthracnose on grapevine caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. *Plan Dis.* 100:2530. doi:10.1094/PDIS-05-16-0632-PDN
- Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. 2018. Figtree v1.4.4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology, Edinburgh, Scotland. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (visit on 08/04/2021)
- Oo, M. M. and S. K. Oh. 2017. Identification and characterization of new record of grape ripe rot disease caused by *Colletotrichum viniferum* in Korea. *Mycobiology* 45:421–425. doi:10.5941/MYCO.2017.45.4.421
- Pan, F. Y., Y. Huang, L. Lin, Y. M. Zhou, R. F. Wei, W. F. Guo, L. Yin, and J. Lu. 2016. First report of *Colletotrichum capsici* causing grape ripe rot in Guangxi, China. *Plant Dis.* 100:2531. doi:10.1094/PDIS-05-16-0691-PDN
- Peng, L. J., T. Sun, Y. L. Yang, L. Cai, K. D. Hyde, A. H. Bahkali, and Z. Y. Liu. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience* 54:29–41. doi:10.1016/j.myc.2012.07.006
- 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. *Fungal Divers.* 39:89–109.
- 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 Panama: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102:1318–1338. doi:10.3852/09-244
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61:539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Sawant, I. S., S. P. Narkar, D. S. Shetty, A. Upadhyay, and S. D. Sawant. 2012. First report of *Colletotrichum*

- capsici* causing anthracnose on grapes in Maharashtra, India. New Dis. Rep. 25:2. doi:10.5197/j.2044-0588.2012.025.002
- Silva, D. N., P. Talhinhos, V. Várzea, L. Cai, O. S. Paulo, and D. Batista. 2012. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. Mycologia 104:396–409. doi:10.3852/11-145
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. p.1–26. in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. (Bailey, J. A. and M. J. Jeger, eds.) C. A. B. International. Wallingford, UK. 388 pp.
- Templeton, M. D., E. H. A. Rikkerink, S. L. Solon, and R. N. Crowhurst. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122:225–230. doi:10.1016/0378-1119(92)90055-T
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Tzean, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5<sup>th</sup> ed. Taiwan Phytopathological Society Press. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)
- 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. London, Britain. 482 pp.
- Yan, J. Y., M. M. R. S. Jayawardena, I. D. Goonasekara, Y. Wang, W. Zhang, M. Liu, J. B. Huang, Z. Y. Wang, J. J. Shang, Y. L. Peng, A. Bahkali, K. D. Hyde, and X. H. Li. 2015. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. Fungal Divers. 71:233–246. doi:10.1007/s13225-014-0310-9
- Yokosawa, S., N. Eguchi, K. I. Kondo, and T. Sato. 2017. Phylogenetic relationship and fungicide sensitivity of members of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex from apple. J. Gen. Plant Pathol. 83:291–298. doi:10.1007/s10327-017-0732-9
- Yokosawa, S., N. Eguchi, and T. Sato. 2020. Characterization of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing grape ripe rot in Nagano Prefecture, Japan. J. Gen. Plant Pathol. 86:163–172. doi:10.1007/s10327-020-00907-5
- Zapparata, A., D. D. Lio, S. Sarrocco, G. Vannacci, and R. Baroncelli. 2017. First report of *Colletotrichum godetiae* causing grape (*Vitis vinifera*) berry rot in Italy. Plant Dis. 101:1051. doi:10.1094/PDIS-12-16-1764-PDN

# Occurrence of Grape Ripe Rot in Taiwan and the Pathogenicity and Phylogenetic Relationship of Its Primary Causal Agent *Colletotrichum viniferum*

Chu-Ping Lin<sup>1,\*</sup>, Chih-Li Wang<sup>2,3</sup>, Jyh-Nong Tsai<sup>4</sup>, Yu-Lun Dai<sup>5</sup>, Pao-Jan Ann<sup>6</sup>, Yue-Mei Zhan<sup>7</sup>, and Shun-Yuan Huang<sup>8</sup>

## Abstract

Lin, C. P., C. L. Wang, J. N. Tsai, Y. L. Dai, P. J. Ann, Y. M. Zhan, and S.Y. Huang. 2022. Occurrence of grape ripe rot in Taiwan and the pathogenicity and phylogenetic relationship of its primary causal agent *Colletotrichum viniferum*. J. Taiwan Agric. Res. 71(2):135–157.

Grape ripe rot caused by *Colletotrichum* spp. is one of the most devastating diseases for grape production in Taiwan. To reveal population structures, phylogenetic relationships, symptoms, and geographic distribution of the causal organisms in the field, grape samples with the typical ripe rot symptoms on fruits, and necrotic lesions on twigs and leaves were collected and investigated. Moreover, symptoms from field samples and inoculated plants were also recorded. From 2012 to 2020, a total of 40 *Colletotrichum* isolates were isolated and identified with the phylogenetic analysis based on the concatenated sequences of internal transcribed spacer (*ITS*), lyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (*GAPDH*), actin (*ACT*), beta-tubulin 2 (*TUB2*), and chitin synthase 1 (*CHS-1*) genes. The phylogenetic tree showed that grape ripe rot in Taiwan was mainly caused by *Colletotrichum viniferum*, which was divided into two subclades, subclade T and subclade C. Among 28 isolates that were isolated from diseased fruits of grape ripe rot, 85.7% of these isolates belonged to *C. viniferum* subclade T, 3.6% to *C. viniferum* subclade C, 7.1% to *Colletotrichum fruticola*, and 3.6% to *Colletotrichum tropicale*. The results also showed that *C. viniferum* subclade T could be isolated not only from diseased fruits but also from symptomatic leaves. The pathogens are distributed in most major grape-growing areas, including Zhuolan in Miaoli County, Xinshe and Wufeng in Taichung City, Dacun in Changhua County, and Xinyi, Guoxing, Shuili and Puli in Nantou County. When inoculated on young fruits *in planta* in the field, the isolates of *C. viniferum* subclade T induced the typical ripe rot symptoms on grapefruits after veraison, suggesting that the pathogens were able to establish a latent infection. When inoculated on whole potted plants in a greenhouse, isolates of *C. viniferum* subclade T caused various symptoms on leaf, such as necrotic lesions with a large area of yellow halo on the leaf margin, defoliation, and browning leaf veins. Furthermore, necrosis on shoots and blossoms was also observed. The results from field investigations and artificial inoculations indicate that the isolates of *C. viniferum* subclade T could cause various symptoms on fruits, leaves, shoots, and blossoms of grapes.

**Key words:** Subclade, Foliar symptoms, Multilocus phylogeny.

---

Received: September 3, 2021; Accepted: January 27, 2022.

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

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

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Associate Professor and Program Director, Master Program for Plant Medicine and Good Agricultural Practice, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>5</sup> Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>6</sup> Former Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>7</sup> Temporary Worker, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>8</sup> Substitute Services Drafter, National Conscription Agency Ministry of the Interior, Nantou County, Taiwan, ROC.

