

台灣枇杷枝枯病菌的鑑定

蔡宜儒¹ 陳本源² 黃振文^{1,3}

¹ 台中市國光路 250 號 國立中興大學 植物病理學系

² 台中市國光路 250 號 國立中興大學 農業推廣中心

³ 聯絡作者，電子郵件：jwhuang@dragon.nchu.edu.tw

接受日期：中華民國 101 年 4 月 28 日

摘 要

蔡宜儒、陳本源、黃振文. 2012. 台灣枇杷枝枯病菌的鑑定. 植病會刊 21: 79-89.

西元 2008 與 2009 年間，台灣中部枇杷園發現枇杷植株葉片呈現失水、萎凋下垂及黃化之病徵。由罹病植株分離獲得 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 三菌株按柯霍氏法則逐一進行病原性測試，結果證實可引起枇杷枝枯病，且病徵與田間原罹病株相仿。依據它們的形態特徵及 ITS 與 D1/D2 區域核醣體去氧核醣核酸序列分析，將 Lsc-01 與 Lsc-02 的學名鑑定為 *Cylindrocladiella peruviana*；至於 Lscy-01 菌株則鑑定為 *Cylindrocladium reteaudii*。Lsc-01 與 Lsc-02 菌株菌絲生長與孢子發芽最適溫度均介於 24~28 °C，最適產孢溫度為 28 °C；而 Lscy-01 菌株最適菌絲生長與孢子發芽溫度介於 24~28 °C，最適產孢溫度為 16 °C。

關鍵詞： *Cylindrocladiella peruviana*、*Cylindrocladium reteaudii*、枇杷、枇杷枝枯病

緒 言

枇杷歸屬薔薇科常綠小喬木植物，英名 Loquat，學名 *Eriobotrya japonica* Lindl.，原生種分佈於東亞溫帶南部及亞熱帶。西元 2008 年 9 月至 2009 年 10 月間，台灣中部地區多處枇杷園，發現枇杷植株葉片呈現失水、萎凋下垂，及葉片黃化的現象，罹病後期整個植株出現乾枯死亡（圖一），將其罹病枝條帶回實驗室進行解剖觀察，發現罹病枝條之橫切處，其外層的維管束組織呈現褐化之病徵，由罹病枝條表面縱切處，可觀察到罹病與健康部位間有明顯交界處，且罹病部位呈現褐化的病徵。筆者將罹病株採集回實驗室進行分離與病原性測定，初步結果證明引起枇杷枝枯病的病原菌歸屬於 *Cylindrocladium* 與 *Cylindrocladiella* 等二屬的真菌。

Cylindrocladium 與 *Cylindrocladiella* 兩屬廣泛分布於世界各地，在高濕環境下可引起裸子與被子植物的

病害⁽³⁾，尤其會引起桉樹苗床與桉屬植物猝倒（Damping-off）、根腐（Root rot）、苗枯（Seedling blight）、扦插苗腐（Cutting rot）、及葉斑（Leaf spot）等病害問題，危害寄主範圍可多達 100 餘種觀賞植物⁽⁵⁾。其中 *Cylindrocladium reteaudii* (Bugn.) Boesew. 可感染桉樹、丁香、番石榴、及柑橘等多種植物⁽⁷⁾。至於 *Cylindrocladiella camelliae* (Venkataram. & Ram) Boesew. 可造成桉樹扦插苗的苗腐；*Cylindrocladiella peruviana* (Bezerra & Herrera) Boesew. 則會造成黑荊、桉樹及葡萄等植物根腐與扦插苗的苗腐等病徵⁽²⁾。*Ce. peruviana* 可以不必經由傷口接種，就能直接感染一年生的葡萄苗，並引起葡萄苗枝條枯萎與葉片褪綠黃化等病徵⁽⁸⁾。

在國內外未曾有資料報導 *Cylindrocladium* 與 *Cylindrocladiella* 兩屬引起枇杷枝枯病，因此本文主要

目的在於探討台灣枇杷枝枯病之病原菌形態、病原性及生物特性，祈有助於進一步更深入的研究。

材料方法

供試菌株與植株來源

自台中縣新社鄉枇杷園區採集枇杷罹病植株，以無菌水沖洗植株表面後，將多餘水分吸乾，以消毒過之小刀切取枝條內部褐變的維管束組織，經 1% (V/V) 次氯酸鈉水溶液進行表面消毒 30 sec，取出後以無菌水漂洗 3 次，隨即將消毒過組織置於 2% (W/V) 水瓊脂 (Water agar, WA) 培養基平板中，待長出菌絲後，在光

學顯微鏡下，以移植針切取菌絲尖端，並移植至麥芽糖抽出物瓊脂 (Malt extract agar, MEA) 培養基平板上培養，一星期後，刮取孢子進行單孢分離培養，共獲得 *Cylindrocladium*、*Cylindrocladiella* 及 *Lasiodiplodia* 等三屬 13 菌株。初步試驗發現 *Lasiodiplodia* 屬引起枇杷枝枯病之病徵與田間原採集之病徵不同，故本研究以 *Cylindrocladium* 屬 Lscy-01 與 *Cylindrocladiella* 屬之 Lsc-01 及 Lsc-02 等三菌株作為供試菌株。依據柯霍氏法則逐步測試，以確定三菌株之病原性。本試驗之供試植株係購自櫻都園藝中心 (彰化縣田尾鄉睦宜村興農巷 291 號) 之株齡約一年半的枇杷茂木品種實生苗。



圖一、田間枇杷枝條發生葉片下垂、失水萎凋 (A) 及全株枯萎死亡 (B) 的情形。

Fig. 1. The symptoms of loquat blight were observed in the field. (A: leaf showed drooping; B: whole plant wilted and died).

供試菌株之培養

將供試菌株之分生孢子塗佈於玉米粉瓊脂 (Corn meal agar, CMA) 培養基平板上, 以玻璃針進行單孢分離, 待 12 小時後, 將發芽的分生孢子移出至 MEA 斜面上, 並置於 24 °C 定溫箱 (光照 12 小時) 培養。

病原菌接種測試

將 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 培養在 MEA 培養基上, 一星期後, 切取成 0.7 cm³ 菌絲塊備用。將一年半生枇杷實生苗之枝條以沾有 75 % 酒精之棉花棒擦拭消毒, 並以消毒過之解剖刀於枝條上製造傷口, 分別將前述各病原菌之菌絲塊貼附於傷口上, 並以潮溼之消毒脫脂棉花球覆蓋保溼, 外層以一層保鮮膜包裹後, 置於溫室中 3 天後觀察並記錄其罹病率; 並以 MEA 培養基裹覆傷口作為對照組, 每處理接種 3 棵枇杷, 各有 4 重複。

病原菌之分生孢子大小與形態之觀察

將 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 三菌株單孢置後於 MEA 培養基平板上, 經 24 °C、每日光照 12 小時, 培養一個星期後, 觀察各菌株之菌落形態, 並以無菌水將分生孢子洗下, 在光學顯微鏡下, 量取分生孢子的大小, 每菌株各取 50 個孢子, 各有 4 重複。此外, 以移植針切取一小塊菌絲塊放置於玻片上, 再以光學顯微鏡觀察枇杷枝枯病菌之產孢構造、厚膜孢子及微菌核等。

DNA 萃取

為進一步確認本試驗中所分離之菌株種類, 係以核醣體核酸內轉錄間隔區序列進行分子生物的鑑定工作; 所使用之材料方法係參照 Goodwin & Lee⁽⁴⁾ 所發表之抽取總量去氧核醣核酸之方法, 並經測試改良後進行之。

於不同 1.5 ml 微量離心管 (Eppendorff) 中預先添加 50 µl 之溶菌緩衝 (Lysis buffer: 16.7 ml 10 % SDS, 2.5 ml 1M pH 8.0 Tris buffer, 2.5 ml 0.5 M EDTA, 再加入 ddH₂O 至 50 ml), 刮取培養皿上適量 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 之菌絲, 分別置入微量離心管內, 並使菌絲均勻分佈於管內, 再將微量離心管放入乾浴加熱器內, 於 65 °C 處理 1 小時後, 加入以 65 °C 預熱處理之萃取緩衝

液 (Extraction buffer: 0.5 ml 1M pH 8.0 Tris buffer, 0.1 ml 0.5 M EDTA, 2.04 g NaOAc, 再加入 ddH₂O 至 50 ml), 震盪 30 sec 以上。將震盪均勻後的溶液再加入等體積 1:1 酚 (Phenol) / 氯仿 (Chlorophorm) 溶液, 緩慢搖晃液體至乳白色混濁狀後, 以 14,000 g 離心 10 min。離心後之溶液取其上清液至新的 1.5 ml 微量離心管內, 加入相當於上清液體積 0.6 倍的異丙醇 (Isopropanol) 溶劑後, 放置於 4 °C 下冷藏隔夜反應。將反應後之微量離心管再以 14,000 g 離心 5 min, 除去異丙醇加入 70 % 預冷的酒精 0.5 ml 清洗, 然後以 14,000 g 離心 2 min, 重複 2 次, 放置烘箱 (50 °C) 約 5 min, 確定管內酒精已全部揮發, 將成功萃取出之 DNA 產物回溶於 60 °C 中二次去離子水內, 置於 -20 °C 冰箱內備用。

聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 之方法, 是依據 Okane 等人⁽⁶⁾ 所發表之核醣體核酸內轉錄間隔區序列分析方法, 將萃取之三菌株之總量 DNA 進行 ITS 和 LSU D1/D2 區域之聚合酶連鎖反應進行序列增幅。於反應溶液分別添加 10 µ 通用引子對 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') - ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 或 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') - NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 分別各 0.5 µl、18 µl 二次去離子水、5 µl 聚合酶鏈反應試劑組合 (PCR mater mix kit: 1.25 µl polymerase, 1.25 µl reaction buffer, 1.25 µl 1.75 mM CaCl₂, 1.25 µl 200 µM dNTP, GeneMark) 及 1 µl DNA 模板, 總體積為 25 µl。將上述反應液放入自動溫度循環控制反應儀 (Block of Thermal cycler, TC-96-G, Infinigen Biotechnology Inc. U.S.A.) 中進行反應, 反應條件為 95 °C, 2 min; 95 °C, 30 sec、55 °C, 30 sec、72 °C, 2 min, 共 35 個循環; 72 °C, 5 min。

增幅片段之定序與比對

將增幅完成之 DNA 片段與染劑 (6 X Loading dye, GeneMark) 以 3:1 體積比例進行混和後, 載入 1.5% (W/V) TAE (40 mM Tris, 20 mM Sodium acetate, 1 mM pH 7.5 EDTA) 瓊脂凝膠 (Agarose, Bio Basic Inc. Canada) 膠片內, 以 100 伏特電壓進行電泳分析 25 min, 待電

泳結束後以溴化乙啶 (Ethidium bromide, EtBr) 染色 10 min, 接著以去離子水退去膠片上之染劑 5 min, 置於紫外燈照相系統觀察增幅結果。確認增幅成功後將其 PCR 產物送往源資生物科技股份有限公司 (台灣, 台中) 定序, 最後將成功定序之 DNA 片段利用美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 網站內基因資料庫所登錄之序列進行查詢與比對。

溫度對病原菌菌絲生長的影響

將 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 等三菌株移植於 2% 水瓊脂培養基 (WA) 上, 待菌絲生長 5 天後, 用 3 號打孔器 (直徑 0.7 cm) 於菌落邊緣切取菌絲塊, 分別移植於 MEA 培養基平板中央處, 隨後分別置於 4、8、12、16、20、24、28 及 32 °C 等不同溫度之無光照生長箱中, 培養 7 天後, 記錄菌落之大小。每處理各有 4 重複。

溫度對病原菌產孢量之影響

將 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 三菌株移植於 2% WA 上, 待菌絲生長 5 天後, 用 3 號打孔器 (直徑 0.7 cm) 於菌落邊緣切取菌絲塊, 分別移植於 MEA 培養基平板中央處, 隨後分別置於 4、8、12、16、20、24、28 及 32 °C 等不同溫度之無光照生長箱中, 培養 7 天後, 在每一個 9 cm 培養皿滴入 10 ml 的無菌水, 以 L 形玻璃棒刮洗下分生孢子, 隨後吸取 10 µl 分別滴於三凹槽之玻片上, 計算各處理的孢子數, 進而推算各培養皿的產孢量, 每一處理各有 4 重複。

溫度對病原菌孢子發芽的影響

培養於 MEA 斜面上生長 7 天之 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 菌株, 每一試管加入 5 ml 無菌水, 以無菌移植環刮取菌落, 經振盪器震盪均勻, 用雙層紗布過濾後, 取得孢子懸浮液, 再以無菌水稀釋使每毫升含有 10^4 個孢子濃度, 各吸取 10 µl, 分別滴於三凹槽之玻片上, 將玻片放於以三角玻璃環支撐、直徑 9 cm 之培養皿內, 加水保溼, 分別置於 4、8、12、16、20、24、28 及 32 °C 等不同溫度之無光照生長箱中, 經 6 hr 與 12 hr 後, 於光學顯微鏡下, 每一溫度處理隨機選取 100 個分生孢

子, 各 4 重複, 計算其孢子之發芽率。

結 果

菌株之病原性

將 Lsc-01、Lsc-02 與 Lscy-01 等三菌株之菌絲塊分別貼附接種於枇杷實生苗 (茂木品種) 之傷口處, 3 天後觀察發現三菌株均具有病原性, 且可引起與田間罹病株相同的病徵, 罹病率為 100% (圖二)。

菌株之形態

Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 三菌株在 MEA 培養基平板上, 經 24 °C、每日光照 12 小時, 一星期後切取菌絲塊與以無菌水洗下分生孢子, 在光學顯微鏡下觀察, 發現三菌株中具有兩種不同形態特徵, 其中 Lsc-01 與 Lsc-02 的分生孢子柄 (Conidiophore) 透明無色呈帚狀或是輪傘狀, 具有一至二次連續排列整齊的瓶狀枝 (Phialides), 且有一長絲狀不孕性長梗, 長梗頂端著生一個茅尖狀之囊狀細胞 (Vesicles), 寬度約 4~5 µm, 長度約為長梗的 1/3 倍長。分生孢子大小 $(8 - 13) \times (2 - 3) \mu\text{m}$ (mean, $10.34 \times 2.25 \mu\text{m}$, $n=50$), 有一隔膜, 著生於瓶狀枝上, 單生或群聚呈束狀; 在 MEA 培養基平板上, 菌落顏色呈現淡黃色。Lscy-01 的分生孢子柄直立透明無色, 形態具帚狀或是輪傘狀, 有二至三次連續排列整齊瓶狀枝, 且有一不孕性長梗, 長梗頂端有一細長之棍棒形的囊狀細胞, 寬度約 6~7 µm。分生孢子大小 $(33 - 49) \times (2 - 5) \mu\text{m}$ (mean, $40.66 \times 3.52 \mu\text{m}$, $n=50$), 有一隔膜, 著生於瓶狀枝上, 單生或群聚呈束狀, 在 MEA 培養基平板上, 菌落顏色呈現暗褐色。根據 Crous⁽²⁾ 之 Taxonomy and Pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and Allied Genera, 筆者將 Lsc-01 與 Lsc-02 鑑定為 *Cylindrocladiella peruviana* (Bezerra & Herrera) Boesew.; 而 Lscy-01 則鑑定為 *Cylindrocladium reteaudii* (Bugn.) Boesew. (表一, 圖三)。

利用分子生物技術分析佐證

以 ITS 和 D1/D2 區域之聚合酶連鎖反應進行序列增幅, 得到 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 之核糖體去氧核糖核酸片段後, 經生技公司定序, 利用 BioEdit 序列

分析軟體進行分析，並以 NCBI 資料庫進行基因序列比對，結果顯示 Lsc-01 與 Lsc-02 與 *Ce. peruviana* 序列最相似，相似度達 99 %；Lscy-01 與 *Cy. reteaudii* 序列最相似，相似度達 99 %（表二）。

溫度對病原菌菌絲生長之影響

觀察 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 三菌株生長於 4

~32 °C 等不同溫度下，發現 *Ce. peruviana* 之 Lsc-01 與 Lsc-02 兩菌株的菌絲生長趨勢相似，4~8 °C 溫度下菌絲不生長，在 12 與 24 °C 間，兩菌之生長速度隨著溫度升高而漸增；最適菌絲生長溫度介於 24~28 °C 之間。另外 *Cy. reteaudii* Lscy-01 菌株的生長趨勢與前兩菌株相類似，其最適菌絲生長溫度亦介於 24~28 °C 之間（圖四）。



圖二、枇杷枝枯病菌 (A) Lsc-01、(B) Lsc-02 及(C) Lscy-01 菌絲塊分別接種於枇杷嫩枝上的病徵與(D)對照未接種者。
Fig. 2. Symptom of loquat young twig which was respectively inoculated with mycelial disk of *Cylindrocladiella peruviana* isolates (A) Lsc-01, (B) Lsc-02 and (C) *Cylindrocladium reteaudii* isolate Lscy-01 and (D) noninoculated as a control.

表一、本研究採用之 *Cylindrocladiella peruvian* Lsc-01 & Lsc-02 及 *Cylindrocladium reteaudii* Lscy-01 菌株之形態比較
Table. 1. Comparison between *Cylindrocladiella peruviana* isolates Lsc-01 & Lsc-02 and *Cylindrocladium reteaudii* isolate Lscy-01 from Taiwan

Morphology	<i>Ce. peruviana</i>		<i>Cy. reteaudii</i>	<i>Ce. peruviana</i> ¹	<i>Cy. reteaudii</i> ¹
	Lsc-01	Lsc-02	Lscy-01		
Conidiophores	Hyaline	Hyaline	Hyaline	Hyaline	Hyaline
Vesicles	Ellipsoid to lanceolate- shaped	Ellipsoid to lanceolate- haped	Clavate	Ellipsoid to lanceolate- shaped	Clavate
Conidial septate	1	1	1	1	1
Chlamydo spores	Buff yellow	Buff yellow	Red-brown	Buff yellow	Red-brown
Conidia	8-13 × 2-3 μm (9.98 × 2.26 μm)	8-13 × 2-3 μm (10.7 × 2.24 μm)	33-49 × 2-5 μm (40.66 × 3.52 μm)	(9-)11-13(-15) × 2-2.5 (-3) μm(12.5 × 2 μm)	(20-)30-45(-50) × 2.5 (-3(-5) μm(30 × 3 μm)

¹Crous, 2002

溫度對病原菌孢子發芽之影響

觀察 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 等三菌株生長於 4 ~ 32 °C 不同溫度下，發現 Lsc-01 與 Lsc-02 兩菌株之孢子發芽的生長趨勢相似，4 ~ 8 °C 溫度下孢子不發芽，在 12 與 28 °C 間，兩菌之孢子發芽率隨著溫度升高而漸增；

從 28 至 32 °C，孢子發芽率則隨溫度升高而下降，最適孢子發芽生長溫度介於 24 ~ 28 °C 之間。另外 Lscy-01 菌株的孢子發芽溫度與前兩菌株相類似，其最適孢子發芽生長溫度亦介於 24 ~ 28 之間 (圖五)。

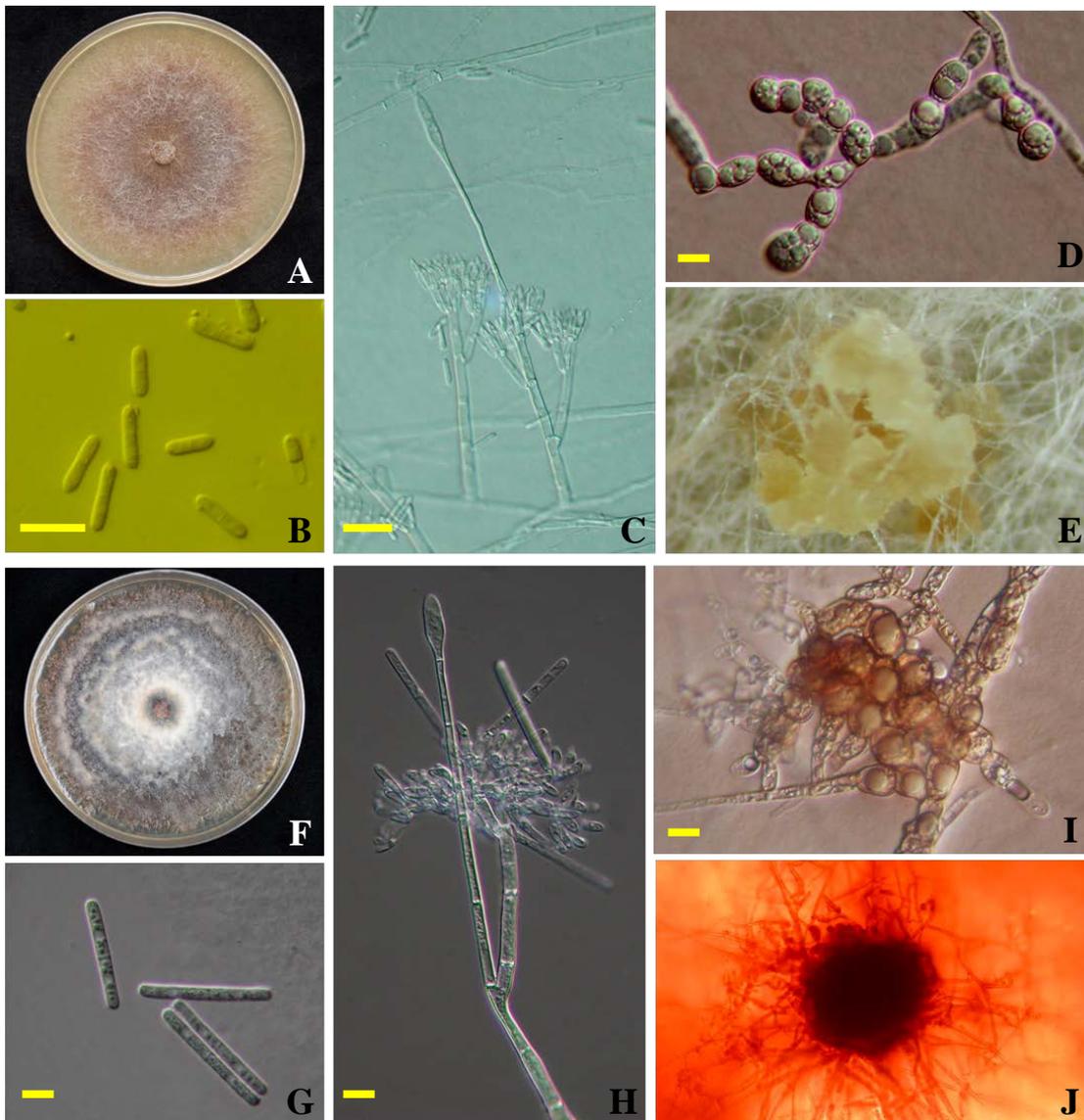
表二、利用核糖體去氧核糖核酸 (ribosomal DNA, rDNA) 鑑定本病原菌之三分離菌株及其 NCBI 資料庫之序號
Table. 2. Identification for three isolates of the pathogens based on ribosomal DNA and their NCBI accession numbers

Isolates	ITS region			D1/D2 region		
	Fungal name	Accession number	Homology (%)	Fungal name	Accession number	Homology (%)
Lsc-01	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	GU929194	99	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	AY793434	99
Lsc-02	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	GU929194	99	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	AY793434	99
Lscy-01	<i>Cylindrocladium reteaudii</i>	FJ601695	99	<i>Cylindrocladium reteaudii</i>	AY793436	99

溫度對病原菌產孢量之影響

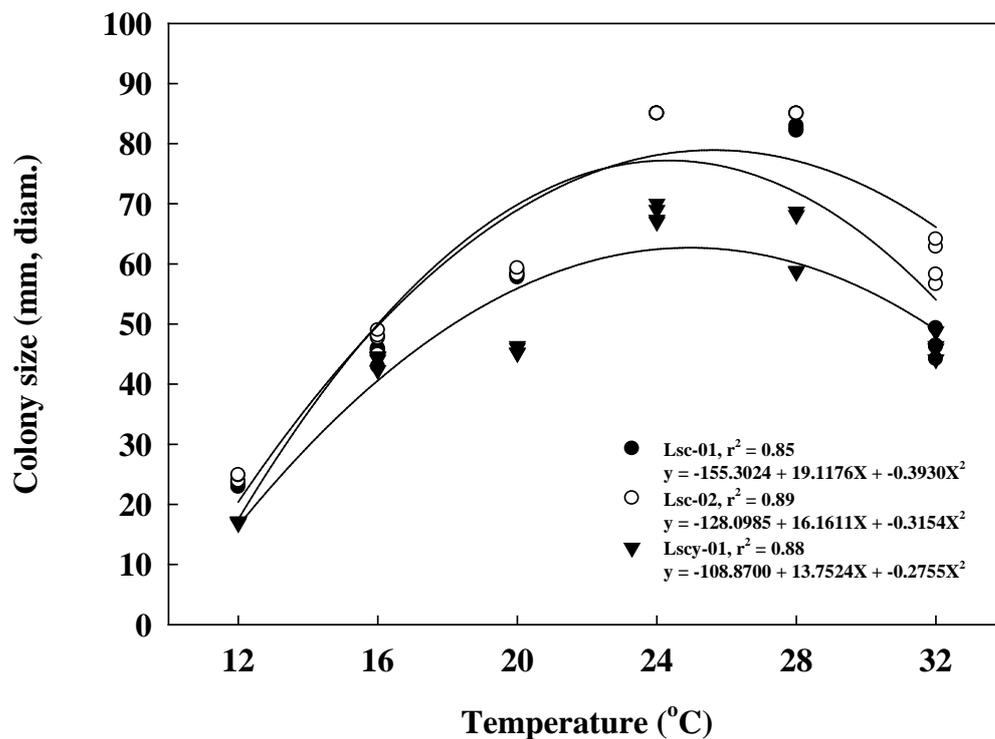
觀察 Lsc-01、Lsc-02 與 Lscy-01 等三菌株生長於 4~32 °C 不同溫度下之產孢量，可發現 Lsc-01 與 Lsc-02 兩菌株之產孢量，4~8 °C 溫度下不易產孢，在 12~28 °C 間，產孢量隨著溫度升高而產孢量提高，尤其以 28 °C 的

產孢量最高，每個直徑 9 cm 培養皿約可產生 6.38×10^7 個孢子；而 Lscy-01 產孢量的結果，顯示在 12~32 °C 間，產孢量會隨著溫度升高而下降，尤其以 16 °C 的產孢量最高，每個直徑 9 cm 培養皿約可產生 1.46×10^6 個孢子（圖六）。



圖三、枇杷枝枯病菌之形態。 *Cylindrocladiella peruviana* Lsc-01：(A) 培養在 MEA 培養基上之菌落形態；(B) 分生孢子；(C) 分生孢子、孢子梗及囊狀細胞；(D) 厚膜孢子；(E) 長有厚膜孢子之菌絲相互纏繞成微菌核。
Cylindrocladium reteaudii Lscy-01：(F) 培養在 MEA 培養基上之菌落形態；(G) 分生孢子；(H) 分生孢子、孢子梗及囊狀細胞；(I) 厚膜孢子；(J) 長有厚膜孢子之菌絲相互纏繞成微菌核。

Fig. 3. Morphologies of the pathogens of loquat twig blight. *Cylindrocladiella peruviana* Lsc-01: (A) Colony on MEA; (B) Conidia; (C) Conidiophores and vesicle; (D) Chlamydospores (E) Microsclerotium was formed from aggregation of mycelia with chlamydospores. *Cylindrocladium reteaudii* Lscy-01: (F) Colony on MEA; (G) Conidia; (H) Conidiophores and vesicle; (I) Chlamydospores (J) Microsclerotium was formed from aggregation of mycelia with chlamydospores. (Bar = 10 μm)



圖四、溫度對枇杷枝枯病菌 Lsc-01、Lsc-02 及 Lscy-01 三菌株之菌絲生長的影響（7 天生長的結果）。

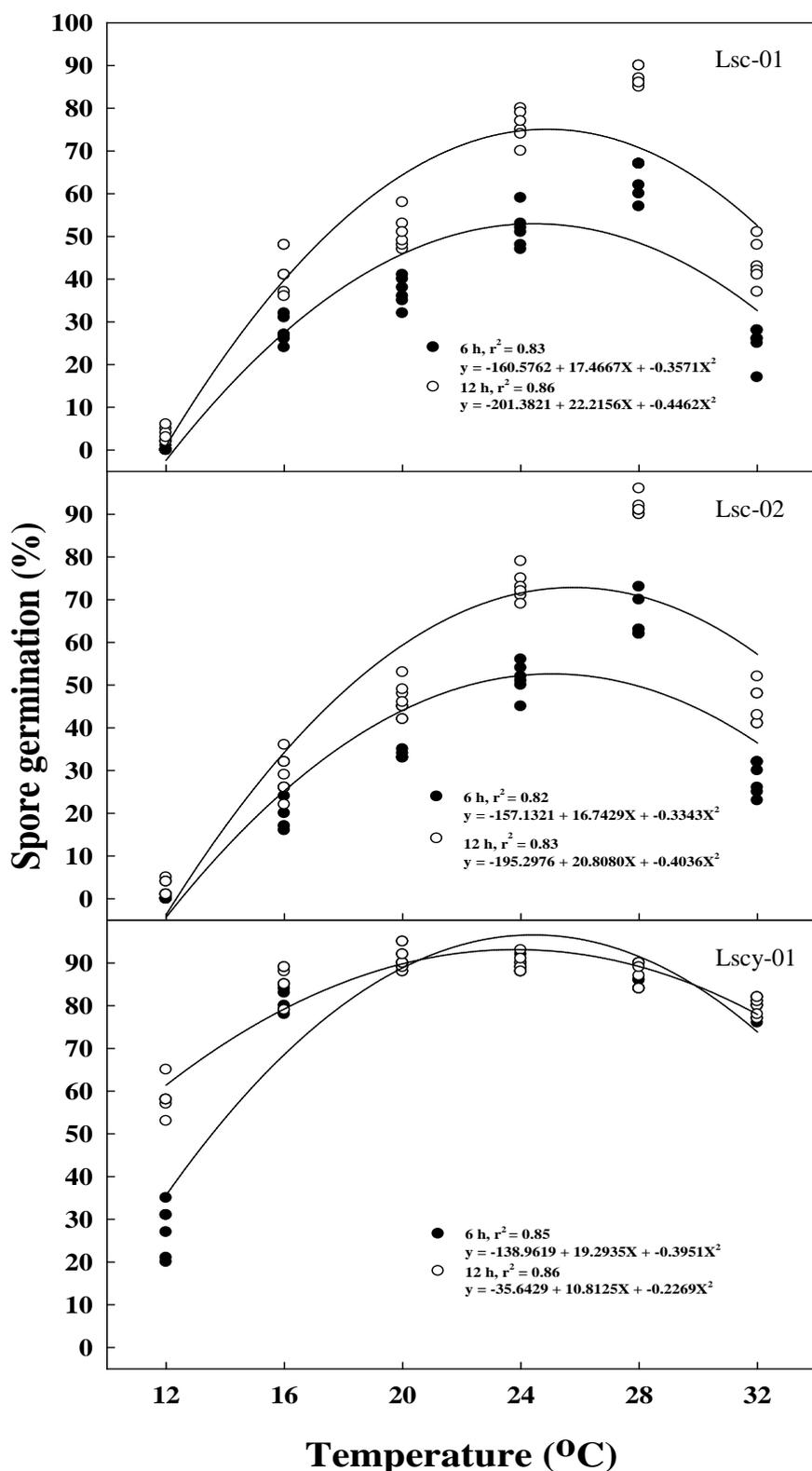
Fig. 4. Effect of temperatures on mycelial growth of *Cylindrocladiella peruviana* isolates Lsc-01 and Lsc-02 and *Cylindrocladium reteaudii* isolate Lscy-01 for 7 days.

討 論

在國外已有多種植物遭受 *Cylindrocladiella* (Ce) 與 *Cylindrocladium* (Cy) 兩屬菌種危害的記錄⁽²⁾，然在台灣有關此兩屬相關之研究較為缺乏，其中以 *Cylindrocladiella* 引起病害之研究尤為少見。本研究證明中部地區多處枇杷園之枇杷枝枯病係由 *Ce. peruviana* 與 *Cy. reteaudii* 所引起，且為台灣的新病害記錄。

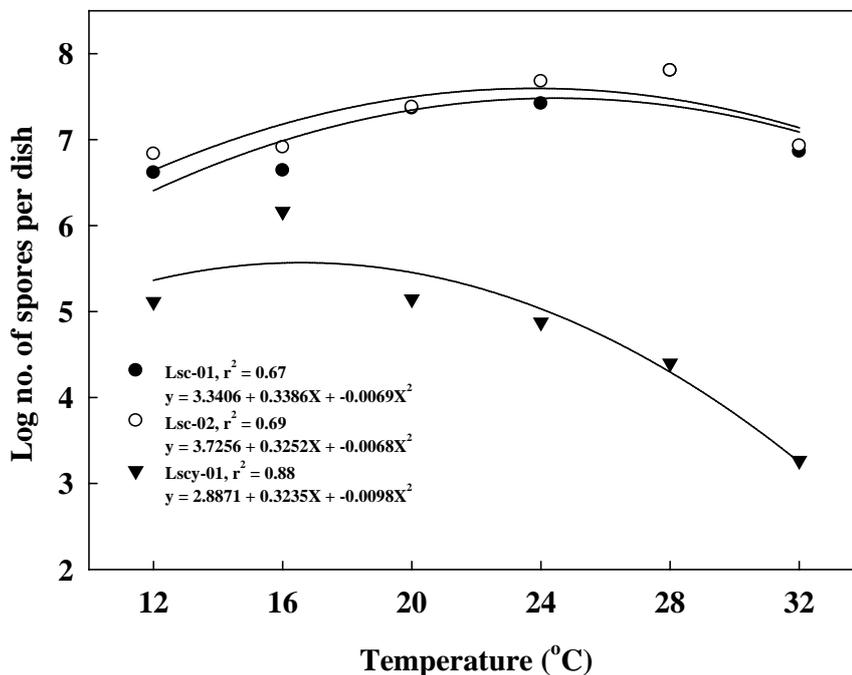
以形態鑑定 *Cylindrocladiella* 與 *Cylindrocladium* 兩屬有其困難度，1982 年 Boesewinkel⁽¹⁾ 依照分生孢子的大小與不孕性長梗的形態，將部份 *Cylindrocladium* 屬的種類移至 *Cylindrocladiella* 新屬內；兩屬間主要的區分方法如下：(1) *Cylindrocladium* 之有性世代為 *Calonectria* De Not.，而 *Cylindrocladiella* 之有性世代為

Nectricladiella Crous & Schoch；(2) *Cylindrocladium* 之不孕性長梗具隔膜，而 *Cylindrocladiella* 則無隔膜；(3) *Cylindrocladium* 培養在麥芽抽出物瓊脂 (MEA) 培養基平板上，其菌絲與厚膜孢子會相互纏繞形成微菌核；而 *Cylindrocladiella* 培養在 MEA 培養基平板上，菌落呈現黏滑狀，微菌核並不常見；(4) *Cylindrocladiella* 之瓶狀枝開口處為內翻之領狀構造 (convergent collarettes)，而 *Cylindrocladium* 則為外翻之領狀構造 (flaring collarettes)；(5) *Cylindrocladiella* 的分生孢子較 *Cylindrocladium* 小且僅有一隔膜；(6) *Cylindrocladium* 之子囊殼外壁有疣狀突起構造，而 *Cylindrocladiella* 之子囊殼外壁呈平滑型。



圖五、溫度對枇杷枝枯病菌孢子發芽的影響。

Fig. 5. Effect of temperatures on spore germination of *Cylindrocladiella peruviana* isolates Lsc-01 and Lsc-02 and *Cylindrocladium reteaudii* isolate Lscy-01 for 6 and 12 hrs.



圖六、溫度對枇杷枝枯病菌產孢量的影響。

Fig. 6. Effect of temperatures on sporulation of *Cylindrocladiella peruviana* isolates Lsc-01 and Lsc-02 and *Cylindrocladium reteaudii* isolate Lscy-01 for 7 days.

本研究發現罹患枇杷枝枯病時，其病原菌可區分為黃色菌落與灰黑色菌落兩群真菌，經由傳統形態比較與分子生物 DNA 序列鑑定，結果顯示黃色菌落真菌為 *Ce. peruviana* 與 *Cy. reteaudii*，而另一群灰黑色菌落真菌則為 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.。兩群真菌在培養基培養時期極易區分，初期兩群真菌在培養基表面之菌絲皆為白色氣生菌絲，隨後色素會慢慢沉澱形成特殊之菌落顏色，黑色菌落之 *L. theobromae* 菌絲長滿 9 cm 培養皿約需 5 天，較黃色菌落之 *Ce. peruviana* 與 *Cy. reteaudii* 生長速度快兩天，且會在培養基表面突出形成黑色小點之柄子器，內含有未成熟之單室無色孢子與成熟之雙室暗色孢子兩型分生孢子。筆者也仔細觀察到枇杷病田間存在兩種不同枇杷枝枯病菌危害之病徵，其中 *Lasiodiplodia* 屬所引起的病徵為枇杷植株葉片呈現失水、萎凋下垂，初期葉片會呈現葉脈黃化的情形，後期會導致葉片褐化且落葉，而枝條感染部位，有維管束褐化現象但不會持續擴展其病斑；而

Cylindrocladiella 及 *Cylindrocladium* 兩屬所引起的病徵則為枇杷植株葉片初期呈現失水、萎凋下垂，後期會導致葉片枯萎褐化但不落葉，而枝條感染部位會有維管束褐化現象外，尚會持續擴展其危害之病斑面積，最後全株死亡，其中尤以枇杷實生幼苗受害情形更為嚴重，值得農政單位關注，並加強追蹤後續的防治管理工作。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Boesewinkel, H. J. 1982. *Cylindrocladiella*, a new genus to accommodate *Cylindrocladium parvum* and other small-spored species of *Cylindrocladium*. Can. J. Bot. 60: 183-185.
2. Crous, P. W. 2002. Taxonomy and Pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and Allied Genera. APS Press. Minnesota. 278 pp.
3. Crous, P. W., Phillips, A. J. L., and Wingfield, M. J. 1991.

- The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* in South Africa, with special references to forest nurseries. S. Afr. J. For. 157: 69-85.
4. Goodwin, D., and Lee, S. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. Biotechniques 15: 438.
 5. McRitchie, J. J. 1982. *Cylindrocladium* disease. Page 23 in: Diseases of Woody Ornamental Plants and Their Control in Nurseries. R. K. Jone and R. C. Lambs (eds). North Carolina Agr. Ext. Serv., North Carolina State Univ., Raleigh.
 6. Okane, I., Srikitikulchai, P., Toyama, K., Lassoe, T., Sivichai, S., Hywel-Jones, N., Nakagiri, A., Potacharoen, W., and Suzuki, K. 2008. Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. Mycoscience 49: 359-372.
 7. Sulochana, K. K., Wilson, K. I., and Nair, M. C. 1982. Some new host records for *Cylindrocladium quinquesseptatum* from India. Agric. Res. 20: 106-108.
 8. Van Coller, G. J., Denman, S., Groenewald, J. Z., Lamprecht, S. C., Crous, P. W. 2005. Characterisation and pathogenicity of *Cylindrocladiella* spp. associated with root and cutting rot symptoms of grapevines in nurseries. Aust. Plant Pathol. 34: 489-498.

ABSTRACT

Tsai, Y. J.¹, Chen, B. Y.², and Huang, J. W.^{1,3} 2012. Identification for the Causal Agent of Loquat Twig Blight in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21: 79-89. (¹Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, 250 Kuo Kuang Rd., Taichung 402, Taiwan R.O.C.; ²National Chung Hsing University Agricultural Extension Center, 250 Kuo Kuang Rd., Taichung 402, Taiwan R.O.C.; ³Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw)

A new disease, loquat twig blight has occurred in central Taiwan since 2008. *Cylindrocladiella* isolates Lsc-01 and Lsc-02 and *Cylindrocladium* isolate Lscy-01 were isolated from diseased loquat twigs. The pathogenicity was confirmed by inoculating loquat seedlings, which showed the same symptoms as diseased plants in the fields. Based on morphological characteristics, ITS and D1/D2 sequences analyses, three isolates were respectively identified as *Cylindrocladiella peruviana* isolates Lsc-01 and Lsc-02 and *Cylindrocladium reteaudii* isolate Lscy-01. The optimal temperatures for mycelial growth and conidial germination of *Ce. peruviana* isolates Lsc-01 and Lsc-02 was at 24-28 °C, and *Cy. reteaudii* isolate Lscy-01 also was at 24-28 °C. The optimal temperature for sporulations of Lsc-01 and Lsc-02 was at 28 °C, and isolate Lscy-01 was at 16 °C.

Key word: loquat, loquat twig blight, *Cylindrocladiella peruviana*, *Cylindrocladium reteaudii*