

以半巢式 PCR 偵測樹枝與預採果實中的 檬果蒂腐菌

林玉儒¹ 王嫻婷² 楊宏仁³ 汪碧涵^{4,5}

¹東吳大學微生物學系 台北市

²振興醫院教學研究部 台北市

³行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所 嘉義市

⁴東海大學生命科學系 台中市

⁵聯絡作者：電子郵件 phwang@thu.edu.tw，傳真：+886-4-2359-0296

接受日期：中華民國 99 年 1 月 20 日

摘 要

林玉儒、王嫻婷、楊宏仁、汪碧涵. 2009. 以半巢式 PCR 偵測樹枝與預採果實中的檬果蒂腐菌. 植病會刊 18: 225-235.

本研究由檬果罹病果實上分得 55 株菌株，經鑑定為 *Botryosphaeria dothidea*, *B. ribis*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*，其中 6 株以形態與核酸序列鑑定為檬果蒂腐菌 *Lasiodiplodia theobromae* Griffon & Maubl.。由 *L. theobromae* 核糖體 DNA 的 ITS 區域設計種專一性引子 Lth1，與廣效性引子 ITS4 配對，以最適煉合溫度 58°C 增幅得到一約 420 bp 的產物，上述其他菌種不會形成產物。為提升偵測靈敏度，建立半巢式 PCR：第一段以 ITS5/ITS4 廣效性引子對增幅，第二段續以 Lth1/ITS4 增幅，可使偵測靈敏度達 125 fg *L. theobromae* 全量 DNA。2004 至 2005 年間，將半巢式 PCR 偵測技術應用於田間愛文檬果枝條帶菌調查與預採果實檢測。結果發現，三月至五月，病原菌由舊枝侵入當年度新枝，進入果梗，舊枝中棲息的蒂腐菌為重要的果實採收後蒂腐病的感染源。當年度新枝基部偵測率可達 45.5%，新舊枝交接處 (63.3%) 與老枝頂端 (72.7%) 的偵測率最高，老枝 15 公分處仍能測得蒂腐菌。由屏東、台南和嘉義等檬果主要產區的七個果園，於採收前 1-1.5 個月收集預採果實，萃取果蒂及其周圍果皮組織 DNA，再將預採果實浸潤生長素益收 (ethylene) 以催熟，調查罹病率。2004 年，檬果果實蒂腐病罹病率在 0%~82%，半巢式 PCR 偵測率則在 6.3%~76% 之間；2005 年果實罹病率約為 20%~92.9%，半巢式 PCR 偵測率則約 29.2%~81%。雖然各果園半巢式 PCR 偵測率與預採果實罹病率不盡相符，但罹病率超過 10% 的樣本，半巢式 PCR 偵測率皆超過 10%。依據政府『貯藏期果實病害預測方法』，訂定凡經預測之果園，蒂腐病罹病果實率在 10% 以下，得選為日本外銷果園。半巢式 PCR 偵測以其靈敏與快速的優點，適宜開發成監測與偵測的技術。

關鍵詞：檬果蒂腐病、黑色蒂腐菌、半巢式 PCR、監測技術

緒 言

檬果 (mango) 為重要熱帶果樹，依據聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization, FAO) 估計，2005 年全世界檬果種植面積達約 400 萬公頃，年產量約 3,125 萬噸，居世界水果總產量第五；檬果亦是

臺灣重要經濟果樹，據國內行政院農糧署推估，民國 94 年檬果年產量約 15 萬噸。檬果蒂腐病 (Stem end rot) 為檬果果實採收後及儲運期之嚴重病害，1991 年 Johnson 等人⁽¹⁾ 發現，檬果蒂腐病菌可能是在檬果開花期經由傷口侵入成為內生菌後，透過枝條的生長開花

結果等時期，經由果梗感染果實，可造成椪果蒂腐病的病原菌包含 *Lasiodiplodia theobromae* Griffon & Maubl.、*Botryosphaeria* spp.⁽²⁾ *Dothioella dominicana* 和 *Phomopsis mangifera* 等。此外，亦可藉成熟的分生孢子由受傷的果蒂，果皮或是剩餘的開花組織侵入而感染^(3, 4, 5)。病徵有樹枝萎凋 (die back)、嫩枝枯萎 (twig blight)、葉片及花器枯萎 (leaf and blossom blight) 及果腐 (fruit rot)⁽⁶⁾ 等。

椪果蒂腐病病原菌的種類具地理差異，台灣椪果蒂腐病的主要病原是 *Lasiodiplodia theobromae*，澳洲則主要由 *D. dominicana* 所引起⁽⁷⁾。*L. theobromae* 廣泛分部於熱帶與亞熱帶地區，寄主廣泛⁽⁸⁾，以木本植物為主要寄主，包括椪果、桃樹、奇異果與尤加利樹等。以分子標記分析顯示有種內變異，但沒有證據顯示菌株有寄主專化現象⁽⁹⁾。

蒂腐病是台灣椪果的重要潛伏病害之一，病徵在椪果催熟後產生，對台灣椪果外銷產業影響甚鉅。引起台灣蒂腐病的 *L. theobromae* 由果梗之傷口侵入⁽¹⁰⁾，椪果從結花穗至採收前都可能受到感染，病原侵犯嫩枝表皮，造成黑褐色斑點並落葉，在老枝則侵犯至木質部使得枝幹乾枯木乃伊化⁽¹²⁾。楊等人⁽¹³⁾ 觀察台灣椪果枝條和果實病徵後發現，受感染的枝條和果梗，初期會呈現不整形的小斑點，後在果蒂周遭出現病徵呈淡褐色，之後迅速擴散，3-4 天即蔓延整個果實^(10, 11, 14, 15, 16)，感染後期病斑顏色較深，軟腐區域有白色菌絲生長於表面⁽¹⁷⁾，而果實呈現水浸狀，果皮破裂流汁具有酸味。

該菌生活史中以無性世代菌絲及分生孢子為主，有性世代則仍不清楚。初期菌絲生長為白色，產生粉紅色素，成熟後呈深灰綠色。氣生菌絲 (aerial mycelium) 叢聚後，頂端生成單生或是叢生分生孢子果 (conidiomata)⁽¹⁸⁾，內含分生孢子柄 (conidiophores) (189-886 × 154-704 μm)，之後形成分生孢子母細胞 (conidiogenous cells)，頂端膨大成形成分生孢子 (conidia)，初期呈透明卵圓形或橢圓形 (21-26 × 10-12 μm)；成熟後轉為棕褐色，表面有縱紋，中間具橫隔 (22-29 × 12-14 μm)^(19, 20)，為鑑定的依據。

在椪果生長時期，病原菌檢測及病勢發展監測都是採用病原菌分離鑑定及病徵調查^(21, 22) 為主要方法。炭疽病與蒂腐病同樣是重要的椪果採收後病害，在果實成熟前，兩種病原菌在果實上都保持靜止狀態，不出現病斑，待椪果成熟後，方開始發病，兩者都是造成重大損失的病害。Jitarreerat 等人⁽²³⁾ 為偵測感染在未成熟椪果上的極少量病原菌，建立炭疽病專一性聚合酶鏈鎖反應偵測方法，可用於青椪果的炭疽菌偵測與

帶菌率檢測，或熟椪果蒂腐病的診斷。

本研究建立椪果蒂腐菌 *L. theobromae* 半巢式 PCR 偵測方法，與病原菌分離方法，調查偵測在椪果園中，潛存或感染椪果枝條的蒂腐菌，了解其在果樹上的生態，同時，調查施用防治藥劑滅普護汰寧後，蒂腐菌在枝條中的存活情形。依據政府『貯藏期果實病害預測方法』，訂定凡經預測之果園，蒂腐病罹病果實率在 10% 以下，得選為日本外銷果園⁽²⁴⁾，因此，本研究以半巢式 PCR 方法測試供試果園逢機採集預採果實樣本的偵測率，與樣本催熟後的發病率比較。

材料與方法

菌株的分離、培養與保存

植物組織樣本以 1.05% 次氯酸鈉表面消毒 30 秒、無菌水漂洗 1 分鐘後吸乾水分，置於分離培養基上，配方為表面添加 40 μg/ml streptomycin sulphate (Sigma, USA) 的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA, Difco, USA)，12 小時照光，28°C 培養 7 天，待菌絲長出後，切取菌絲尖端純化，移植於 PDA，28°C 下培養 7 天^(22, 25)。觀察菌絲及產孢構造，切取活化的菌絲尖端移至 PDA⁽²¹⁾，相同溫度下培養 7-10 天後以顯微鏡觀察。保存菌株，取含有活化菌絲的 PDA 小塊，置入無菌水中，室溫長期保存⁽²⁰⁾，或培養在 PDA 斜面上，室溫下短期保存。

萃取 DNA

修改 Doyle and Doyle 的方法⁽²⁶⁾ 抽取菌絲或植物組織的 DNA。取純菌於 PDA 平板培養基上以 25°C 培養 7-10 天，取適量菌落，加入 500 μl CTAB 緩衝液 (100 ml 10% cetyl trimethylammonium bromide, 140 ml 5 M NaCl, 20 ml 0.5 M EDTA, 10 g PVP-40, 50 ml 1 M Tris-HCl (pH8.0))，加入去離子水至 500 ml，熱水浴加熱 95°C、30 分鐘，65°C、10 分鐘以打破細胞壁後，加入 500 μl 之 dichloromethane/isoamyl alcohol (24:1) 混合，使蛋白質沈澱，14,000 xg 離心 2 分鐘，上清液加入 300 μl isopropanol，沈澱 DNA，離心 2 分鐘後去除上清液，再加入 500 μl 沖洗緩衝液 (380 ml 76% ethanol, 5 ml 1 M ammonium acetate，加入去離子水至 500 ml)，靜置 2 分鐘後，離心 2 分鐘，去除上清液並風乾，加入適量的無菌水，以 37°C 水浴 30 分鐘溶解 DNA 後，以核酸計算儀定量 (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, UK) 並調整濃度至 5 ng/μl，保存於 -20°C。

聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

選用廣效性引子對 ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') 與 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TCA TTG ATA TGC-3') 進行 PCR，增幅 rDNA ITS (Internal transcribed spacer) 區域之片段⁽²⁷⁾。每 25 μ l 反應中，含有 2.5 μ l 10 \times PCR buffer、1.5 mM MgCl₂ 1.5 μ l、50 μ M dNTPs 0.25 μ l、引子 ITS5 與 ITS4 各 0.1 μ M 0.25 μ l，Taq polymerase 1 U 0.2 μ l (MBI Fermentas, Lithuania) 及 12.5 ng 模板 DNA，以溫度循環控制器 (OmniGene, Hybaid) 進行 PCR，反應條件如下：94 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘使 DNA 變性，引子黏合溫度 58 $^{\circ}$ C，20 秒，聚合溫度 72 $^{\circ}$ C，20 秒，進行 1 個循環；94 $^{\circ}$ C、1 分鐘，58 $^{\circ}$ C、20 秒，72 $^{\circ}$ C、3 秒，40 個循環；94 $^{\circ}$ C、1 分鐘，58 $^{\circ}$ C、20 秒，72 $^{\circ}$ C、5 秒，1 個循環。

半巢式 PCR 的第一次增幅反應，使用引子對 ITS5/ITS4，反應物的組成與上述 PCR 相同。反應條件：94 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘使 DNA 變性，引子黏合溫度 58 $^{\circ}$ C，20 秒，聚合溫度 72 $^{\circ}$ C，20 秒，進行 1 個循環；94 $^{\circ}$ C、1 分鐘，58 $^{\circ}$ C、20 秒，72 $^{\circ}$ C、3 秒，20 個循環；最後，94 $^{\circ}$ C、1 分鐘，58 $^{\circ}$ C、20 秒，72 $^{\circ}$ C、5 秒，1 個循環。第二次 PCR 反應取 2.5 μ l 第一次 PCR 產物作為模版，10 \times PCR buffer 2.5 μ l、1.5 mM MgCl₂ 1.5 μ l、50 μ M dNTP 0.25 μ l、兩端引子 Lth1，ITS4 各 0.1 mM 0.25 μ l、Taq DNA polymerase 1 U 0.2 μ l，總體積 25 μ l。第二次 PCR 反應條件為：變性溫度 94 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘；煉合溫度 58 $^{\circ}$ C，20 秒；聚合溫度 72 $^{\circ}$ C，3 秒，進行 1 個循環；94 $^{\circ}$ C、1 分鐘，58 $^{\circ}$ C、20 秒，72 $^{\circ}$ C、3 秒，20 個循環，再一個循環 94 $^{\circ}$ C、1 分鐘，58 $^{\circ}$ C、20 秒，72 $^{\circ}$ C、5 秒；最後終止溫度 4 $^{\circ}$ C。

取 5 μ l PCR 產物以 1.2% 膠體 (Agarose ITM, Amresco) 置於水平式電泳槽 (Mupid, Advance)，加入 0.5 倍的 TBE 緩衝液 (5 \times TBE 500 ml：Tris base 27 g，boric acid 13.5 g，10 ml 0.5 M EDTA，pH 8.0)，以 100 V 電泳，產物以 100 bp 分子記號 (MBI Fermentas, Lithuania) 標示大小，電泳膠體上的 DNA 以 ethidium bromide (Sigma, USA) 染色後觀察，以 UVP ImageStore 7500 (UVP, California) 照相。

解序與設計 *L. theobromae* 專一性引子

以引子對 ITS5 和 ITS4⁽²⁷⁾ 進行 PCR 增幅供試菌株 ITS 區域後，將產物解序 (明欣生物科技有限公司，台北)。所得序列與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GenBank 資料庫比對 (blast)，選擇序列相近的菌株比

較，以序列間的差異，選取 *L. theobromae* 特殊的 DNA 片段設計為引子，進行 PCR 最佳化測試。最適煉合溫度測試：使用引子對 Lth1/ITS4 以前述的 PCR 條件進行增幅，測試 60 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C 和 50 $^{\circ}$ C 等煉合溫度的反應產物量，取結果最佳的溫度進行專一性測試。PCR 專一性測試：使用引子對 Lth1/ITS4 進行 PCR 反應，增幅 *L. theobromae*、*B. ribis*、*Colletotrichum acutatum*、*C. gloeosporioides*、*Pestalotiopsis* sp. 與 *Phomopsis* sp. 的 DNA，測試引子是否產生非專一性反應產物。

半巢式 PCR 靈敏度測試：測試半巢式 PCR 靈敏度，以 12.5 ng 到 12.5 fg 的 *L. theobromae* DNA 為模板，經第一段 ITS5/ITS4 廣效性引子對增幅後，第二段使用引子對 Lth1/ITS4 增幅，PCR 條件如前所述。

田間樣本檢測

枝條樣本：試驗檬果園位於農業試驗所嘉義分所，該果園中的愛文檬果於 2003 年嚴重發生蒂腐病。2004 年試驗果園分為以賽普護汰寧保護處理與未用藥的對照組，分別於 2004 年的 3 月中旬 (開花期)、4 月上旬 (幼果期)、5 月上旬 (果實肥大期) 及 2005 年 1 月、3 月、5 月，隨機選取兩個處理的果樹，剪取檬果植株枝條樣本，每個樣本包括老枝、新枝、花序或小果。此外，2005 年 5 月，由台南官田檬果園採集一批枝條樣本。

枝條表面消毒後以新舊枝交界為起點，向上、向下每 1 公分切小段，縱剖一半移置於分離培養基上⁽¹⁾，12 小時照光，28 $^{\circ}$ C 培養 7 天，待菌絲長出後純化，以形態特徵鑑定病原菌。造成芒果蒂腐病的病原菌多侵染莖部表皮⁽²⁸⁾，因此，刮取相同樣本的另一半枝條的表皮組織，參照上述的方法，萃取 DNA，以半巢式 PCR 技術檢測蒂腐菌。果實樣本：於果實採收前 1-1.5 個月預採果實，由屏東枋寮、台南玉井、台南南化、嘉義等檬果產區的供試果園，每個果園隨機採果 25-50 個，2004 年共計獲得 214 個，2005 年共 91 個檬果，所有樣本以半巢式 PCR，檢測蒂腐菌帶菌率，同時催熟，調查蒂腐病發病率。

檢測蒂腐菌帶菌率，以刀片刮取果梗與果梗周圍約 0.8 mm³ 的果皮組織⁽²²⁾，依前述方法萃取 DNA 與半巢式 PCR。

半巢式 PCR 取樣後，以 70% 酒精擦拭表面消毒，將果實浸泡益收生長素 (ethylene) 3,000 倍稀釋液後，風乾 24 小時，9-12 天後觀察發病情形⁽²⁴⁾，計算罹病率。

結 果

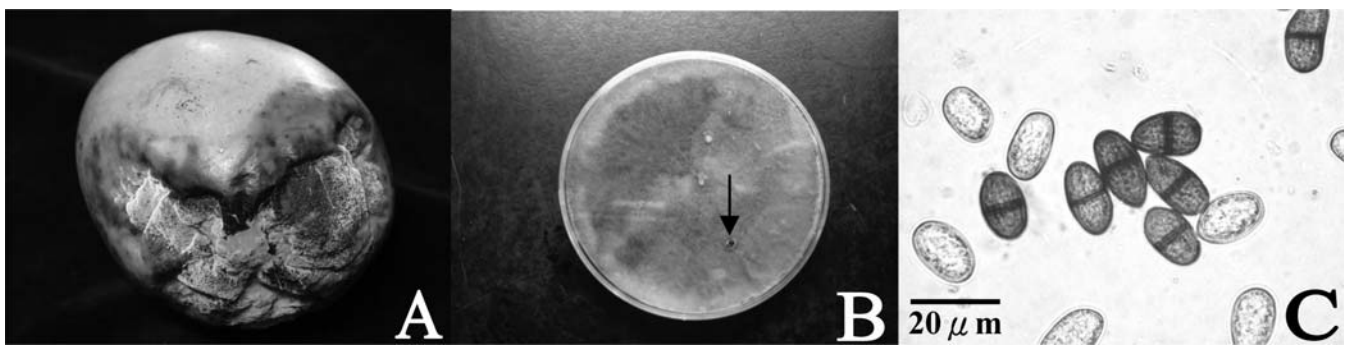
蒂腐病病徵、病原菌分離與形態觀察

蒂腐菌由果梗入侵感染椪果果實，受感染的果梗初期呈現不規則淡褐色小斑點，然後在果蒂周遭出現綠褐色病斑，3-4 天即蔓延整個果實，造成果實腐爛。感染後期病斑為深褐色，呈不規則水浸狀，果皮破裂流汁，並產生酸腐氣味，軟腐區域時有白灰色菌絲生長於果實表面(圖一A)。

由罹病組織挑取菌絲接種於 PDA 上，於 28°C 培養箱中照光培養，蒂腐菌 *L. theobromae* 在營養生長時期有氣生菌絲 (aerial mycelium)，氣生菌絲初期為白色，七天後呈現灰綠色，菌落邊緣平整，菌絲尖端呈羽狀分枝。約 4 星期後，菌絲叢聚形成黑色孢子果

(conidiomata) (圖一B)，將孢子果壓破以光學顯微鏡觀察，可以看到卵形或橢圓形分生孢子 (conidia)，初期呈透明白色，大小約 $22-26 \times 10-15 \mu\text{m}$ ；接著產生淡褐色色素，中間開始出現橫隔雙胞；成熟後變為深褐色，中間具橫隔，表面有縱紋，大小約 $24-30 \times 11-14 \mu\text{m}$ 的雙胞分生孢子(圖一C)。

由南化、嘉義、彰化溪湖等地區有蒂腐病病徵的愛文椪果和巨峰葡萄的果實分離得到 53 株真菌，經形態鑑定包括 *B. dothidea*, *B. ribis*, *L. theobroma*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *C. acutatum* 與 *C. gloeosporioides*。*L. theobroma* 菌株中的 6 株經 rDNA ITS 序列比對確認；兩株炭疽菌株 *C. acutatum* 與 *C. gloeosporioides* 為蓮霧與台農一號椪果上分離得，保存於農業試驗所嘉義分所植物保護系，選取分離得到之



圖一、*Lasiodiplodia theobromae* 感染之椪果蒂腐病病徵 (A)，及其在馬鈴薯瓊脂培養基上的菌落形態 (B)，與分生孢子三個成熟階段的形態 (C)。

Fig. 1. Symptoms of mango stem end rot (A) caused by *Lasiodiplodia theobromae*, its colony morphology (the black arrow is conidiomata) on potato dextrose agar (B), and conidial morphology (C).

表一、本研究使用供試菌株之來源

Table 1. Isolates of mango stem end rot pathogens used in this study

Isolates	Taxon	Host	Origin
T1-17B	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Irwin mango	Chiayi
E1-20B	<i>L. theobromae</i>	Irwin mango	Chiayi
S2-2B	<i>L. theobromae</i>	Irwin mango	Chiayi
S2-12B	<i>L. theobromae</i>	Irwin mango	Chiayi
E3-18B	<i>L. theobromae</i>	Irwin mango	Chiayi
P4-B	<i>L. theobromae</i>	Kyoho grapevines	Xihu, Changhua
S4-25B	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Irwin mango	Chiayi
S3-19B	<i>B. ribis</i>	Irwin mango	Chiayi
NH8-B	<i>B. ribis</i>	Irwin mango	Nanhua, Tainan
NH-7P	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Irwin mango	Nanhua, Tainan
E2-9X	<i>Phomopsis</i> sp.	Irwin mango	Chiayi
E1-14X	<i>Phomopsis</i> sp.	Irwin mango	Chiayi
WAC-003	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Wax apple	CAES ¹
MAC-003	<i>C. gloeosporioides</i>	Mango (Tainung no.1)	CAES ¹

¹ Chiayi Agricultural Experiment Station (CAES), Taiwan Agricultural Research Institute.

14 株真菌 (表一) 用於核酸序列比對分析與 PCR 專一性測試。

種專一性引子設計與測試

以引子對 ITS5 和 ITS4 進行 PCR，增幅供試菌株 (表一) 核糖體 DNA 的 ITS 區域後，將產物解序，其中 *L. theobromae* T1-17B 序列登錄於 GenBank，登錄號為 GU059257。

與 GenBank 資料庫比對 (blast)，選出與 *L. theobromae* T1-17B 序列相近的菌株序列，包括蒂腐菌無性世代型 (*L. theobromae*: AY160201 與 AF027760)，蒂腐菌有性世代型 (*B. rhodina*: AY236952 與 AF243400)，Leaf litter ascomycete strain (AF502851) 和 Fungal endophyte (AF413049 與 AF413047)，與其他會造成檬果蒂腐病的病原菌序列，包括果腐菌 (*B. ribis*: AF243393 與 AF243394)，褐色蒂腐菌 (*B. dothidea*: AF464948 與 AF464947) 的序列作為參考。根據以上序列間的差異，選取 *L. theobromae* 特殊的 DNA 片段設計種專一性引子 Lth1：5'-CTC CAG TCA GTA AAC GCA GAC-3'，搭配廣效性引子 ITS4 進行 PCR 條件最佳化測試。

在 60°C、58°C、56°C、54°C、52°C 煉合溫度下，以引子對 Lth1/ITS4 增幅 *L. theobromae* 的全量核酸，可增幅出 420 bp 的 DNA 產物。以 52°C 煉合溫度產量最高；60°C 煉合溫度時，產物量顯著減少 (圖二)。

PCR 專一性測試，首先以廣效性引子對 ITS5/ITS4 作為引子對 Lth1/ITS4 的對照，增幅造成檬果蒂腐病的病原菌，包括：蒂腐菌 *L. theobromae*、*B. ribis*，檬果炭疽菌 *C. acutatum*、*C. gloeosporioides*，果腐病菌

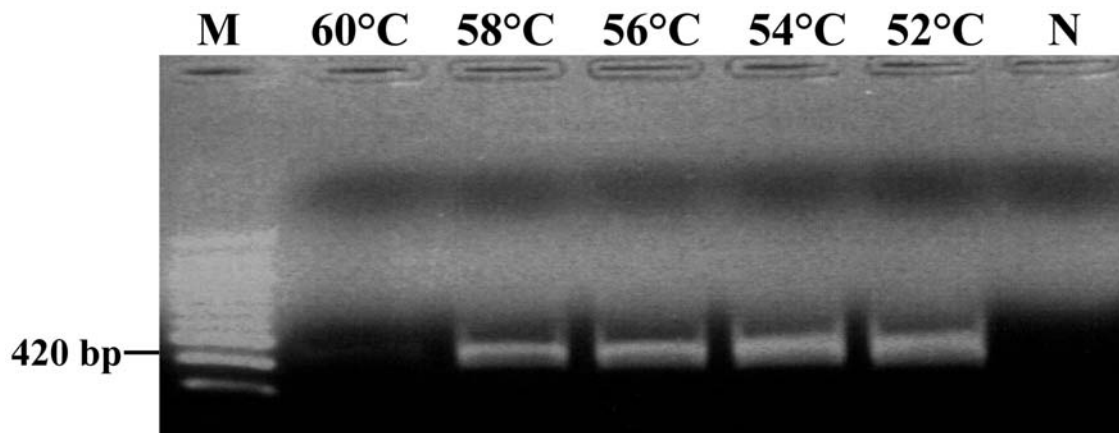
Pestalotiopsis sp. 和褐色蒂腐菌 *Phomopsis* sp. 的 DNA，均獲得 ITS 片段的產物，確定 DNA 樣本沒問題後，再檢測 *L. theobromae* 專一性引子對 Lth1/ITS4 的專一性。結果發現 56°C 以下的煉合溫度專一性較差，*C. acutatum*、*B. ribis* 與 *Phomopsis* sp. DNA 樣本增幅出微量約 500 bp-600 bp 之間大小的 PCR 產物；將 PCR 煉合溫度提高至 58°C，僅 *L. theobromae* 可獲得產物，專一性最好 (圖三)，因此選擇 58°C 作為專一性偵測的 PCR 煉合溫度。

引子 Lth1/ITS4 對 *L. theobromae* DNA 靈敏度的測定，以續列稀釋的 *L. theobromae* 模板 DNA 進行 PCR 增幅，獲得 DNA 產物的最低濃度為 1.25 µg；為提高田間樣本偵測的靈敏度，以半巢式 PCR 可測得最低 DNA 濃度為 125 fg (圖四)。

田間枝條樣本檢測

田間檬果枝條樣本 *L. theobromae* 分離率：

由以賽普護汰寧噴藥處理與未噴藥處理的愛文檬果植株，分別於 2004 年 3 月中旬 (開花期)、4 月上旬 (幼果期)、5 月上旬 (果實肥大期) 及 2005 年 1 月 (開花前)、3 月、5 月，隨機剪取農業試驗所嘉義分所之檬果枝條樣本，每個樣本包括老枝、新枝、花序和/或小果，分離樣本的 *L. theobromae* 帶菌率，結果如表二：綜合 2004 及 2005 年分離愛文檬果枝條蒂腐菌的結果，未噴藥植株 (K) 一月到三月之蒂腐菌分離率約為 30%~35%，四、五月的分離率達 100%。；施用防治藥劑滅普護汰寧的植株 (F)，三月的枝條蒂腐菌分離率為 30%、四月僅 50%，至五月枝條蒂腐菌分離率達 70%、100%，顯示施用藥劑可延遲病勢進展。



圖二、以 Lth1/ITS4 引子對增幅 *Lasiodiplodia theobromae* DNA 之最適煉合溫度測試。

Fig. 2. Analysis of the optimized annealing temperatures of PCR for *Lasiodiplodia theobromae* total DNA with primer pair Lth1/ITS4. M: 100 bp ladder maker; N: negative control (sterile water was used as the template).

由於五月南化採樣果園 (F5) 管理較差，雖用藥保護，但枝條分離率仍偏高；觀察除南化以外其他果園樣本的分離率：用藥保護的果樹，新枝、新舊枝交接處與舊枝的蒂腐菌總分離率分別為 0%、18% 與 27%；未用藥保護的果樹枝條，新枝、新舊枝交接處與舊枝的蒂腐菌總分離率分別為 11%、35% 與 57%。

以半巢式 PCR 技術檢測檸檬果枝條樣本 *L. theobromae*：

2004 年自三到五月，未用藥果樹 (K1、K2 與 K3) 的老枝中，蒂腐菌拓殖進入新枝：三月自前一年舊枝枝稍 5 公分處測得，四月隨莖的頂端生長在新舊之交界處可測得蒂腐菌，五月生長延伸拓殖到新枝 5 公分枝稍，皆可以半巢式 PCR 測得帶菌之正反應 (部分樣本偵測結果見圖五)；以半巢式 PCR 測得帶菌用藥處理果樹樣本 (F1、F2、F3) 亦獲類似結果 (表三)，但在相同

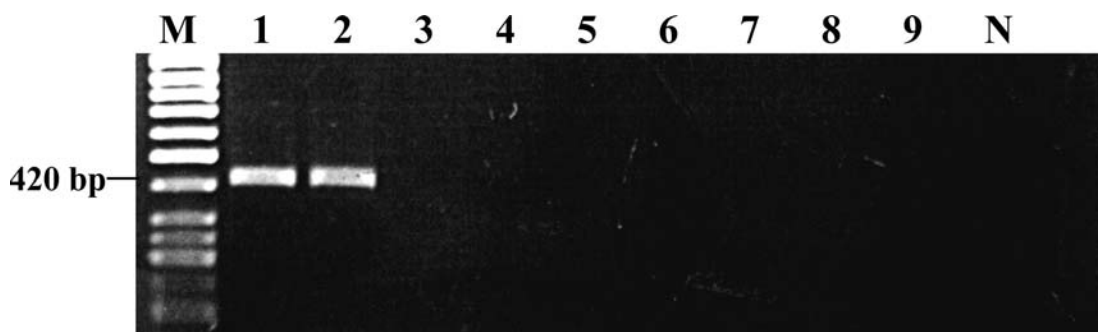
樣本分離培養，新枝未獲蒂腐菌菌落 (F2、F3) (表二)。

整體來看，當年度新枝基部偵測率可達 45.5%，新舊枝交接處 (63.3%) 與老枝頂端 (72.7%) 的偵測率最高，老枝 15 公分處仍能測得蒂腐菌 (表三)。

田間檸檬果果實樣本罹病率及檢測

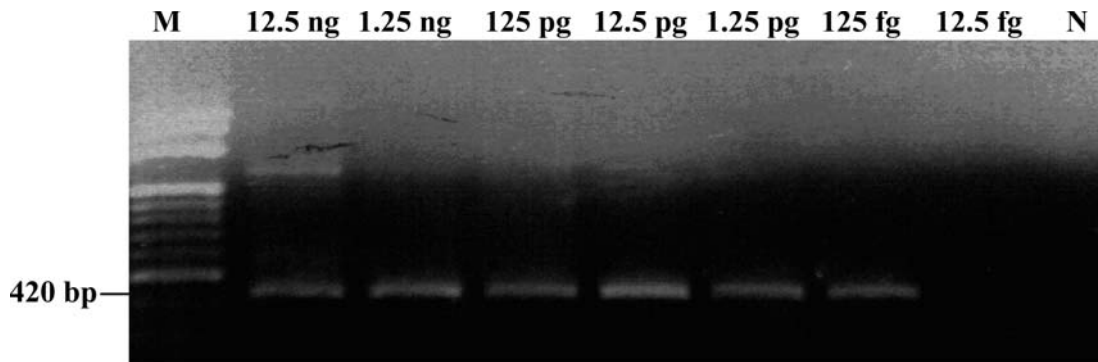
由台灣主要檸檬產區獲得預採果實樣本，由南向北，屏東、台南、嘉義地區的樣本，分別於 2004 年五月、六月與七月採得。樣本經採樣抽取核酸，以半巢式 PCR 技術檢測檸檬樣本中是否帶有蒂腐菌 *L. theobromae*，取樣後，將果實樣本催熟，觀察蒂腐菌罹病率。

屏東地區未套袋與套袋檸檬果果實各 22、32 個，共 54 個，果實罹病率分別為 13.6% 與 0%，*L. theobromae*



圖三、以引子 Lth1/ITS4，在 58°C 煉合溫度下，對 *Lasiodiplodia theobromae* 與其他檸檬上常見之病原真菌進行專一性測試。

Fig. 3. Analysis of the specificity of PCR for *Lasiodiplodia theobromae* total DNA with primer pair Lth1/ITS4 at 58°C annealing temperature. M, 100 bp ladder maker; lanes 1 and 2, *Lasiodiplodia theobromae*; lanes 3 and 9, *Botryosphaeria ribis*; lane 4, *Pestalotiopsis* sp.; lane 5, *Colletotrichum gloeosporioides*; lane 6, *C. acutatum*; lanes 7 and 8, *Phomopsis* sp.; N: negative control (sterile water was used as the template).

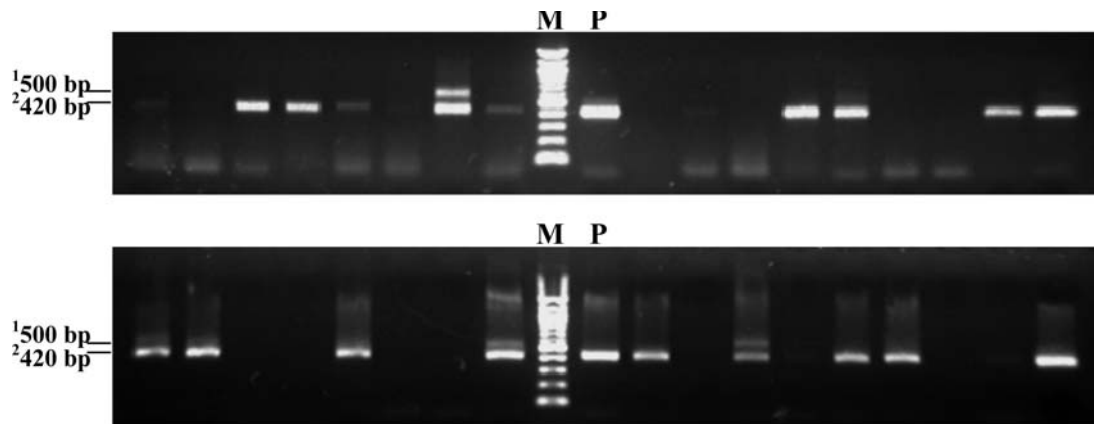


圖四、半巢式 PCR 靈敏度測試。*Lasiodiplodia theobromae* DNA 量分別由 12.5 ng 至 125 fg。

Fig. 4. Analysis of the sensitivity of the seminested PCR (20 cycles of the first PCR reaction and 35 cycles of the second PCR reaction) for *Lasiodiplodia theobromae* detection. M, 100 bp DNA ladder; Lane 1, 12.5 ng; lane 2, 1.25 ng; lane 3, 125 pg; lane 4, 12.5 pg; lane 5, 1.25 pg; lane 6, 125 fg; lane 7, 12.5 fg; N: negative control (sterile water was used as the template).

的半巢式 PCR 偵測率分別為 18.2% 與 6.3%；台南地區檬果果實共 109 個，果實蒂腐病罹病率約 33.3%~82.1%，半巢式 PCR 偵測率約在 23.1%~76% 間；嘉義地區檬果果實共 51 個，蒂腐病罹病率為 39.2%，PCR 偵測率為 15.7% (表四)。綜合結果，2004 年枋寮與玉井套袋處理果園的果實樣本蒂腐病罹病率 (0%，33.3%) 與偵測率 (6.3%，26.6%) 低於未套袋樣本的罹病率 (13.6%，48.0%) 與偵測率 (18.2%，76.0%)；南化套袋處理果園的果實樣本罹病率 (82.1%) 與偵測率 (28.6%)

則高於未套袋處理的罹病率 (73.1%) 與偵測率 (23.1%)；嘉義果園罹病率 (39.2%) 及偵測率 (15.7%) 皆偏低，顯示施用賽普護汰寧藥劑可降低果實受 *L. theobromae* 感染的機率。2005 年，玉井未套袋處理果園之罹病率 (70.8%) 高於偵測率 (29.2%)，而套袋處理之罹病率 (20%) 低於偵測率 (36%)；官田果園之罹病率 (92.9%) 與偵測率 (81%) 皆偏高。以上結果顯示罹病率與偵測率結果不一致，可能原因於討論中論述。



圖五、田間枝條樣本以半巢式 PCR 檢測 *Lasiodiplodia theobromae* 之電泳分析圖。

Fig. 5. The seminested PCR detection (ITS5/ITS4, Lth1/ITS4) of *L. theobromae* from branches DNA samples of Irwin mango trees. ¹, a 500 bp band was amplified by primer pair ITS5/ITS4; ², 420 bp bands were amplified by primer pair Lth1/ITS4. M: 100 bp DNA ladder; P: positive control.

表二、愛文檬果田間枝條樣本舊枝、新枝與新舊枝交接處 *L. theobromae* 之分離率

Table 2. Isolation rate of Irwin mango stem end rot pathogen *L. theobromae* of different mango branches positions by traditional tissue isolation

No. ¹	Year/month	No. of positive/ sample size of different branch positions				Isolation rate ³ (%)
		Old branch	Junction ²	New branch	total	
K1	2004/03	1/3	1/3	0/3	1/3	33%
K2	2004/04	1/2	0/2	2/2	2/2	100%
K3	2004/05	3/3	2/3	2/3	3/3	100%
K4	2005/01	4/26	9/26	0/26	9/26	35%
K5	2005/03	1/3	1/3	0/3	1/3	33%
F1	2004/03	1/3	0/3	0/3	1/3	33%
F2	2004/04	1/2	1/2	0/2	1/2	50%
F3	2004/05	3/3	1/3	0/3	3/3	100%
F4	2005/03	1/3	0/3	0/3	1/3	33%
F5	2005/05	6/10	7/10	4/10	7/10	70%
Total		22/58	22/58	8/58	29/58	50%

¹ K, non-spraying; F, spraying (Cyprodinil + Fludioxonil); F5, Tainan Guantian orchard samples. The branches of Irwin mango were collected from experimental orchards in CAES. Each branch of 1 cm in length was longitudinally cut into two sections, one for tissue isolation test with isolated medium (PDA with 40 μ g/ml streptomycine sulphate), and the other for semi-nested PCR test with the primer pairs of ITS5/ITS4 and Lth1/ITS4 in Table 3.

² Junction is the connection point between old branch and new branch.

³ Isolation rate = (*L. theobromae* isolated from branch samples/total branch samples) \times 100%

表三、以半巢式PCR偵測田間愛文欖果枝條舊枝、新枝與新舊枝交接處的蒂腐菌 *Lasiodiplodia theobromae*Table 3. Detection of Irwin mango stem end rot pathogen *Lasiodiplodia theobromae* from different positions of mango branches by seminested PCR

No. ¹	Year/month	Old branches (cm) ²			Junction 0	New branches (cm) ²		
		15	10	5		5	10	15
K1-1	2004/03	/ ⁴	-	+	-	-	-	/ ⁴
K2-1	2004/04	/ ⁴	+	+	+	-	-	/ ⁴
K3-1	2004/05	+	+	+	+	+	-	/ ⁴
K4-1	2005/01	-	-	-	-	-	-	/ ⁴
K4-2	2005/01	-	-	+	+	-	-	-
K5-1	2005/03	+	+	-	+	-	-	-
F1-1	2004/03	/ ⁴	-	+	+	+	-	-
F2-1	2004/04	/ ⁴	+	+	+	+	+	-
F3-1	2004/05	/ ⁴	+	+	+	+	+	/ ⁴
F4-1	2005/03	/ ⁴	+	-	-	-	/ ⁴	/ ⁴
F5-1	2005/05	/ ⁴	+	+	-	+	-	/ ⁴
Total (%) ³		50%	63.6%	72.7%	63.6%	45.5%	20%	0%

¹ K, non-spraying, presented no drug treatment in the mango fields. F, spraying drugs (Cyprodinil + Fludioxonil).² Old branches were collected away from junction 5, 10, and 15 cm toward the stem, respectively.³ Total (%) = (*L. theobromae* detected from the position of branch samples/the position of tested branch samples) × 100%⁴ non-collected.表四、以半巢式PCR檢測預採果實 *Lasiodiplodia theobromae* 偵測率與果實催熟後之罹病率Table 4. *Lasiodiplodia theobromae* detection rate of pre-plucked mango samples collected from different orchards by seminested PCR and their disease rate. Pre-plucked mango samples were collected from 7 orchards in Pingtung, Tainan, and Chiayi. The pathogen in fruit stalk and the skin near stalk was detected by seminested PCR. The pre-plucked samples were treated with ethylene and stem end rot symptoms appeared in 9-12 days, significantly after 12 days

Date Y/M/D	Origin	No.	Seminested PCR detection rate ⁴	disease rate
2004/05/26	Fangliao Township, Pingdong County ¹	22	18.2%	13.6%
	Fangliao Township, Pingdong County ²	32	6.30%	0.0%
2004/06/08	Yujing Township, Tainan County ¹	25	76.0%	48.0%
	Yujing Township, Tainan County ²	26	26.6%	33.3%
	Nanhua Township, Tainan County ¹	30	23.1%	73.1%
2004/07/02	Nanhua Township, Tainan County ²	28	28.6%	82.1%
	Chiayi County ³	51	15.7%	39.2%
2005/06/27	Yujing Township, Tainan County ¹	24	29.2%	70.8%
	Yujing Township, Tainan County ²	25	36.0%	20.0%
2005/06/29	Guantian Township, Tainan County	42	81.0%	92.9%

¹ non-bagged mango fruits.² bagged mango fruits.³ Mango fruits were collected from the mango field with drugs treatment (cyprodinil + fludioxonil). ⁴ Cut 0.8 cm² area of mango peel around mango stem end

討論與結論

本研究針對主要造成臺灣欖果蒂腐病⁽¹⁰⁾之病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* 設計專一性引子 Lth1, 建立半巢式 PCR 方法, 偵測欖果蒂腐菌, 以建立方法的專一性與靈敏度, 試用於田間欖果開花枝條及預採果實之病原菌偵測, 有助於蒂腐菌田間生態研究、田間病害調查、及預測果實罹病率。

本研究以 PCR 方法, 證明欖果蒂腐菌在一月越冬時, 潛存於沒有病徵的枝條樣本中, 形成內生; 次年嫩枝發芽生長, 形成花序, 開花結果的過程中, 老枝內的蒂腐菌拓殖進入新枝, 有潛力經由果梗感染果實, 應是田間果實重要的感染源。

比較 2004 年三月到五月, 未用藥處理 (K1、K2、K3) 的分離率隨月份增加, 多數連接果實的新枝都可分

離到蒂腐菌；藥劑保護的枝條 (F1、F2、F3) 到五月果實肥大期新枝仍未受感染，而舊枝則都帶菌。因此，施以藥劑保護後，當年度新長枝條未分出蒂腐菌，可使枝稍末端的果實暫不受感染。但是棲息於去年度的舊枝的蒂腐菌似乎未被藥劑撲滅，分離率超過50%，因此，即便施用滅浦護汰寧保護，也不能完全去除樹枝中，尤其是舊枝中的蒂腐菌，它們在果園中應是重要的存活機制與感染源。

綜合枝條病原菌分離與半巢式 PCR 結果，四月幼果期蒂腐病會感染至新舊枝交界處或拓殖到新枝，繼而將延伸長向果實。防治上，可在此時期前或3月晚花期用藥，以防止蒂腐病蔓延至新枝感染果實，採收後清園處理，可進行老枝枝條修剪，清除前一年的病原菌潛伏於老枝中，亦可延遲老枝中的病原菌進入新枝的時間。施藥處理可以延遲病原菌經舊枝拓殖至新枝，入侵莖頂，避免蒂腐菌由果梗進入果實，進而影響椪果內外銷的經濟效益。此外，新舊枝交接處分離率與偵測率俱高，採收後的剪枝並不能完全去除病原菌，傷口也有受感染的可能，因此，剪枝後適當施藥亦可避免蒂腐菌由外部感染。

本研究發現椪果枝條中，以新舊枝交界處或舊枝頂端的表皮組織蒂腐菌分離率與偵測率最高，適宜作為蒂腐菌田間偵測之取樣部位，偵測結果可作為田間施用藥劑或病害防治之重要參考依據。由與感染常源自莖頂蒂基，果實病害好發於近果蒂處，因此稱為 stem end rot，實際上，果實帶菌偵測也以果蒂與果蒂周圍之表皮組織偵測率最高，為其病害特色，適合作為預採果實偵測的取樣部位；相較之下，椪果炭疽菌在整個果實表面都有可能發病，由於罹病的位置不定，取要具代表性的樣本進行偵測很困難，使得以 PCR 偵測椪果果實上的炭疽菌的準確率(未發表)遠低於蒂腐病的偵測，因此，PCR 偵測技術不適用於椪果炭疽病預採果實的偵測。

本研究發現套袋罹病率高於未套袋處理，推測原因為套袋可以保護果實不受外來蒂腐菌侵染，但蒂腐菌可經由內生潛伏感染，當果實套袋而施藥減少後，使得潛伏於老枝的病原菌有機會藉由果梗入侵至果實，因此套袋處理不能保護這個感染途徑的侵害。施藥(賽普護汰寧)保護，可使果實罹病率降低。

預採果實催熟可於採收前預測貯藏期果實病害，但處理與觀察需時兩週以上。以 PCR 技術可直接測得採收時已侵入潛伏休眠的極少量蒂腐菌，在兩天內完成檢測，不用等到果實後熟，糖分增加，蒂腐菌增生。

經藥劑處理的枝條樣本 (F1-1、F2-1、F3-1) 半巢

式PCR都偵測出新枝帶菌(表三)，但同批枝條樣本當年新枝部分並未分離出蒂腐菌(表二)，推測可能的原因如下，(1) 半巢式 PCR 偵測率靈敏度高於分離率；(2) 培養基分離時，常伴有其他生長快速的真菌，可能干擾低量的內生菌的生長或形成菌落；(3) 半巢式 PCR 與分離方法各取縱剖的一半莖部樣本進行檢測，雖分取同一樣本，但在樣本中的蒂腐菌可能分部不均，導致兩種方法所獲得的實驗結果不一致；(4) 施以保護藥劑殺死病原菌，但 DNA 仍殘留，足被半巢式 PCR 測出。

本研究顯示椪果果實蒂腐菌半巢式 PCR 偵測率與罹病率結果不完全一致，推測原因包括：(1) 偵測部位與發病組織不同，使得實驗數據有差異；(2) 2004 年枋寮與玉井樣本中，部分預採果實成熟度不足，造成果實不易催熟，影響病徵產生與罹病率判讀，可能導致偵測率高於罹病率；(3) 本研究針對於臺灣主要引起椪果蒂腐病之病原菌 *L. theobromae* 設計專一性引子，但國外研究發現尚有其他病原菌可引起椪果蒂腐病，是否有其他可引起椪果蒂腐病之病原菌存在，而造成半巢式 PCR 偵測率與罹病率結果不一，未來可由設計其它蒂腐病病原菌種專一性引子以待釐清。

雖然各果園半巢式 PCR 偵測率與預採果實罹病率不盡相符，但罹病率超過 10% 的樣本，半巢式 PCR 偵測率皆超過 10%。依據政府『貯藏期果實病害預測方法』，訂定凡經預測之果園，蒂腐病罹病果實率在 10% 以下，得選為日本外銷果園⁽²⁴⁾。半巢式 PCR 偵測以其靈敏與快速的優點，適宜開發成監測與偵測的技術。

謝 辭

本論文感謝行政院農業委員會動植物防疫檢疫局研究計畫支持(94 農科-13.1.2- 檢-B2, 95 農科-13.1.2- 檢-B2)，前農業委員會農業試驗所鳳山分所林正忠主任協助採樣與診斷，謹此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Johnson, G. I., Mead, A. J., Cooke, A. W., Dean, and J. R. 1992. Mango stem end rot pathogens-Fruit infection by endophytic colonization of the inflorescence and pedicel. *Ann. Appl. Biol.* 120: 225-234.
2. Denman, S., Crous, P. W., Groenwald, J. Z., Slippers, B., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2003. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia* 95: 294-307.

3. Hildebrand, E. M. 1947. Stem end rot fungi attack immature citrus fruit. *Phytopath.* 37: 433. (Abstract)
4. Nadel, M. 1944. Anatomical study of the button of Shamouti oranges in relation to stem end rot. *Palestine J. Bot.* 4: 166-170.
5. Minz, G. 1946. *Diplodia natalensis*, its occurrence on flowers, button and stem end of Shamouti orange and its relation to stem end rot and fruit drop. *Palestine J. Bot.* 55: 152-168.
6. Sabalpara, A. N., Vala, D. G., and Solanky, K. U. 1991. Morphological variation in *Botryodiplodia theobromae* Pat. causing twig-blight and die-back of mango. *Acta Horticulturae* 291: 312-315.
7. Peterson, R. A. 1984. Mango diseases. *Proceedings First Australian Mango Workshop 1984*. CSIRO Melbourne: 233-247.
8. Punithalingam E, 1976. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 519*. Wallingford, UK: CAB International.
9. Mohali, S, Burgess, T. I., and Wingfield, M. J., 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathol.* 35: 385-396.
10. Liao, J. S. 1975. Stem end rot: A mango disease in Taiwan. *Scientific Agriculture* 23: 415-416. (in Chinese)
11. Cheng, A. S., and Chen, S. C. 2001. Tainan District Agricultural Research & Extension Station, COA. 114: 90-95. (in Chinese with English abstract)
12. Lan, C. C. 2001. Diseases survey and integrated control of disease on forcing culture on wax-apple fruit trees. *Assistant of Kaohsiung District Agriculture Improvement Station* 13(1): 20-29. (in Chinese with English abstract)
13. Yang, H. R., Ko, W. C., Wang, R. J., and Ni, H. F. The study for survival of mango stem-end rot pathogen by tissue isolation of mango. *Plant Protection Department, Chiayi Agriculture Experiment Station, Agriculture Research Institute, COA*. (in Chinese with English abstract)
14. Burhan, M. J. 1987. *Botryodiplodia* on mangoes and bananas. *FAO Plant Protect. Bull.* 35: 34.
15. Spalding, D. H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control post-harvest diseases. *Plant Dis.* 66: 1185-1186.
16. Ragab, M. M., Sabet, K. A., and Dawood, N. A. 1971. *Botryodiplodia theobromae* Pat., the cause of fruit rot and die-back of mango in A.R.E. *Agr. Res. Rev.* 49: 81-97.
17. Srivastava, D. N., and Urgapal, J. C. D. 1965. Mode of infection and control of *Diplodia* stem end rot of mango (*Mangifera indica* L.). *Ind. J. Horticulture* 22: 77-79.
18. Kuo, C. H. 1998. Seedling stem blight of lima bean caused by *Botryodiplodia theobromae*. *Plant Pro. Bull.* 40: 315-327. (in Chinese with English abstract)
19. Cedeño, L, Palacios, P., and Ernesto. 1992. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causa de lesiones y gomosis en cítricos. *Fitopatología Venezolana* 5(1): 10-13.
20. Zhou, S., Smith, D. R., and Stanosz, G. R. 2001. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycol. Res.* 105(8): 919-926.
21. Meah, M. B., Plumbley, R. A., and Jeger, M. J. 1991. Growth and infectivity of *Botryodiplodia theobromae* causing stem end rot of mango. *Mycol. Res.* 95(4): 405-408.
22. Johnson, G. I., Mead, A. J., Cooke, A. W., and Dean, J. R. 1991. Mango stem end rot pathogens-Infection levels between flowering and harvest. *Ann. Appl. Biol.* 119: 465-473.
23. Jitareerat, P., Wongs-Aree, C., and Sangchote, S. 2006. Detection of quiescent infection of *Colletotrichum gloeosporioides* on green mango fruit by polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae* 712: IV International Conference on Managing Quality in Chains-The Integrated View on Fruits and Vegetables Quality.
24. Chuang, T. Y., Leu, L. S., Ann, P. J., Yang, H. C., Yang, H. R., and Kao, C. W. 1999. Mango anthracnose prevention and control processes for exportation. Integrated management for mangoes. p109-116. (in Chinese)
25. Mascarenhas, P., Behere, A., Sharma, A., and Padwal-Desai, S. R. 1995. Post-harvest spoilage of mango (*Mangifera indica*) by *Botryodiplodia theobromae*. *Mycol. Res.* 100(1): 27-30.
26. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
27. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., eds. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press 315-322.
28. Pathak, V. N., and Srivastava, D. N., 1969. Epidemiology and prevention of *Diplodia* stem end rot of mango fruit. *Phytopath. Z.* 65: 164.

ABSTRACT

Yu-Ju Lin¹, Yen-Ting Wang², Hong-Ren Yang³, Pi-Han Wang^{4,5}. 2009. Detection of quiescent infection of mango stem end rot pathogen *Lasiodiplodia theobromae* in shoot and pre-plucked mango fruit by seminested PCR. Plant Pathol. Bull. 18: 225-235. (¹Department of Microbiology, Soochow University, Taipei, Taiwan; ²Department of Medical Research and Education, Cheng Hsin General Hospital, Taipei, Taiwan; ³Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Station, TARI, Chiayi, Taiwan; ⁴Department of Life Sciences, Tunghai University, Taichung, Taiwan; ⁵Corresponding author, E-mail: phwang@thu.edu.tw, FAX: +886-4-2359-0296)

A seminested PCR-based method was developed for specific detection of mango (*Mangifera indica* L.) stem end rot pathogen *Lasiodiplodia theobromae* Griffon & Maubl. (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.) in plant tissues. A specific primer Lth1 was designed from rDNA internal transcribed spacers (ITS) region of *L. theobromae*. Under stringent PCR conditions, a 420-bp amplicon formed from *L. theobromae* DNA but not from other stem end rot pathogens such as *Botryosphaeria dothidea*, *B. ribis*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum acutatum*, and *C. gloeosporioides*. Seminested PCR using primer pairs of ITS5/ITS4 and Lth1/ITS4 was sensitive enough to detect 125 fg of genomic DNA. The technique was used to detect *L. theobromae* and study the colonization of the pathogen in shoots and pre-plucked fruits. The pathogen in asymptomatic old branches was detected by seminested PCR. It survived endophytically. During March to May, it grew into new branch and extended to inflorescence. The endophytic pathogen seems to be an important inoculum source of the post-harvest disease. In infected orchards, the pathogen was detected in 45.5% of the base of new shoots, in 63.2% tissues between new shoot and old branch, and in 72.7% old branch top. Pre-plucked mango samples were collected from 7 orchards in Pingtung, Tainan, and Chiayi. The pathogen in fruit stalk and the skin near stalk was detected by seminested PCR. The pre-plucked samples were treated with ethylene and stem end rot symptoms appeared in 9-12 days, significantly after 12 days. In 2004, 0%-82% fruit samples developed stem end rot and the detection rate of *L. theobromae* was between 6.3%-76%. In 2005, the disease rate of the fruit was 20%-92.9% and the detection rate was about 29.2%-81%. The detection rate of pre-plucked samples was not always consistent with the disease rate. However, when the detection rates in these samples were higher than 10% by seminested PCR, their disease rates were higher than 10%. Based on the standards of mango export orchards, the mango stem end rot disease rates need to be lower than 10%. The seminested PCR assay showed promise as a monitor tool for the mango stem end rot pathogen.

Key words: Stem end rot of mango, *Lasiodiplodia theobromae*, Semi-nested PCR, monitoring technique