

# 目前台灣地區梨黑星病菌之鑑定 與其對藥劑的感受性

吳舒雅<sup>1</sup> 鍾文全<sup>2</sup> 黃振文<sup>1</sup> 石井英夫<sup>3</sup> 鍾文鑫<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>臺中市國立中興大學植物病理學系

<sup>2</sup>臺中縣行政院農業委員會種苗改良繁殖場繁殖技術課

<sup>3</sup>日本國立農業環境科技研究所

<sup>4</sup>聯絡作者，電子郵件：wenchung@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-4292

接受日期：中華民國 98 年 7 月 29 日

## 摘要

吳舒雅、鍾文全、黃振文、石井英夫、鍾文鑫 2009. 目前台灣地區梨黑星病菌鑑定與其對藥劑的感受性. 植病會刊 18: 135-143.

為釐清台灣梨黑星病菌之種類，本研究自新竹新埔、台中新社及梨山共蒐集 78 株梨黑星病菌株，經孢子形態的觀察，顯示台灣梨黑星病菌與 *Venturia nashicola* 之形態類似。另將核糖體核酸 (rDNA) 內轉錄間隔區 (ITS1/ITS2) 與 5.8S 核酸片斷定序後，以 maximum parsimony (MP) 與 neighbor-joining (NJ) 法分析，證實所供試 39 株台灣梨黑星病菌與 GenBank 中之 *V. nashicola* 同屬一個分子群，而與 *V. pirina* 分屬不同的分子群。此外於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA) 中測試梨黑星病菌對 5 種不同殺菌劑之抗感性，得知克熱淨 (iminotadine) 與撲克拉錳 (prochlorate manganese) 對所有供試菌株菌絲生長抑制之 EC<sub>50</sub> 值小於 10 μg/ml 有效濃度；免賴得 (benomyl) 對所有供試菌株菌絲生長抑制之 EC<sub>50</sub> 值小於 100 μg/ml 有效濃度。雖然克收欣 (kresoxim-methyl) 與三氟敏 (trifloxystrobin) 於對 96% 以上之供試菌株菌絲生長抑制之 EC<sub>50</sub> 值小於 100 μg/ml 有效濃度，但仍有 3 株供試菌株之 EC<sub>50</sub> 值大於 100 或 500 μg/ml 有效濃度，表現低感受性。

關鍵詞：梨黑星病、抗感性、殺菌劑、ITS1/ITS2

## 緒言

梨黑星病 (pear scab) 為梨栽培區最重要的病害之一，在歐洲、美洲、亞洲都有記錄<sup>(16)</sup>。目前引起梨黑星病的病原菌主要有兩種，分屬於 *Venturia pirina* (Cooke) Aderhold (Syn. *V. pyrina* Aderh.) 與 *V. nashicola* Tanaka & Yamamoto，其中 *V. pirina* 分佈於歐美地區，寄主以西洋梨 (*Pyrus communis* Linnaeus)；而造成中國、日本、韓國等地區梨黑星病菌則屬 *V. nashicola*，寄主包括沙梨 (*P. pyrifolia* Nakai)、白梨 (*P. bretschneideri* Rend.)、*P. betulifolia* Bunge、*P. aromatica* (Nakai & Kikuchi) Rehd.、*P. vilis* Nakai<sup>(3, 16, 22, 34)</sup>。梨黑星病菌可感染梨的葉片、芽、花苞及果實。在雨季時，由於氣候適合梨黑星病菌之生長與傳播，引起的損失

較大<sup>(19)</sup>。該病害在台灣梨山地區於 1960 年大發生，當時梨樹果實受黑星病菌為害者高達 50%，且往後每年在台灣各地梨樹栽培專業區均常發生此病害，已成為台灣梨產區之重要病害之一<sup>(31)</sup>。

台灣梨黑星病最早在 1943 年由 Sawada 氏於台北、新竹地區所栽種的水梨 (*P. serotina* Rehd.) 與鳥梨 (*P. lindleyi* Rehd.) 上所發現，並將引起黑星病之病原鑑定為 *V. pirina*<sup>(27)</sup>。當時 Sawada 氏雖有描述病徵與分生孢子的形態、大小，但卻沒有與造成西洋梨黑星病之病原作比較；此後孫氏<sup>(32)</sup> 雖針對台灣梨黑星病菌之生態作詳細研究，但仍未對台灣梨黑星病菌的形態與病原性作更深入探討。此外，台灣自 1976 年高接梨生產技術開發成功之後<sup>(21)</sup>，對梨穗之需求量大增，除本地

梨穗外，每年亦自日本或韓國大量引進梨穗。由於梨黑星病菌可感染梨樹所有部位<sup>(14, 31)</sup>，極易藉由梨穗引進台灣。引起日本梨黑星病之病原菌於 1964 年之前被認定屬於 *V. pirina*，然經 Tanaka 與 Yamamoto 兩氏<sup>(33)</sup> 重新比較鑑定後，認為引起日本梨 (Japanese pear) 黑星病之 *Venturia* sp. 與歐洲所記載的 *V. pirina* 在形態及寄主專一性有明顯差異，因此將引起日本梨黑星病之病原重新命名為 *V. nashicola*。而韓國也於 1985 年報告引起韓國梨黑星病之病原為 *V. nashicola*<sup>(3)</sup>。由於台灣目前已無栽種西洋梨類品系，而以沙梨類與白梨類為主，而這些品系大都來自日本，因此有必要釐清引起台灣梨黑星病之病原。

在台灣，目前推薦用於防治梨黑星病的藥劑有三唑類 (Triazoles)、雜環類、Strobilurin 類、苯並咪唑類 (benzimidazoles)、脂肪族類、有機銅劑或混合藥劑等殺菌劑，種類超過 20 種以上<sup>(4)</sup>。其中 strobilurin 類與 benzimidazole 類兩類殺菌劑，在國外有報告指出梨黑星病菌已對 benzimidazole 類產生抗藥性<sup>(11)</sup>，而蘋果黑星病菌 (*V. inaequalis*) 則對此兩種藥劑已有抗藥性菌系的出現<sup>(18, 38)</sup>。台灣自 1969 年引進 benzimidazole 類中的 benomyl 以來，於田間施用此類菌劑已超過 30 年，然自 1981 年來陸續有報告指出田間已有抗 benzimidazole 類藥劑之植物病原菌菌株的出現<sup>(2, 23, 24, 36)</sup>。此外，近年來所引進的 strobilurin 類藥劑，亦有研究顯示抗此類藥劑的病原真菌已在台灣田間開始蔓延<sup>(2, 24, 36)</sup>，因此有必要了解台灣梨黑星病菌對不同殺菌劑之抗感性。本研究目的為，(1) 利用形態學與分子生物學之技術重新鑑定台灣地區梨黑星病菌之種類；(2) 了解台灣地區梨黑星病菌對不同種類殺菌劑之抗感性反應。

## 材料與方法

### 供試菌株

本研究所使用之供試菌株係於 2007 年 4 月陸續蒐集自新竹縣新埔鎮 (Sinpu, Hsinchu County)、台中縣新

社鄉 (Sinshe, Taichung County) 及和平鄉梨山地區 (Lisan, Taichung County) 之橫山梨上罹患黑星病的果實、葉片及枝條，共計 78 株菌株。所有菌株皆於實驗室中以單孢分離後，移置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA, Difco, Detroit, USA) 斜面中，保存於 4°C 備用。

### 菌株鑑定

菌株鑑定主要是以孢子形態與大小來進行比對鑑定。自新鮮罹病組織上刮取分生孢子堆，於光學顯微鏡 (light microscopic, LM) 下觀察分生孢子形態與測量孢子大小，每個罹病標本均測量 50 個分生孢子，包括分生孢子的長、寬及長寬比，並記錄孢子形態。所得測量結果將與 Ishii 和 Yanase 兩氏<sup>(15)</sup> 所發表之 *V. nashicola* 與 *V. pirina* 的分生孢子形態學進行比較。

### 總 DNA 的抽取與核糖體核酸 (rDNA) 內轉錄間隔區 (ITS) 序列之增幅

為進一步確認本研究所分離的梨黑星病菌株種類，係以核糖體核酸 (rDNA) 內轉錄間隔區序列來進行分子親緣性分析。梨黑星病菌總 DNA 之抽取與純化為依據 Goodwin 和 Lee 兩氏<sup>(7)</sup> 所發表並經改良後的方法，首先是刮取培養於 PDA 平板上 30 天的梨黑星病菌菌落，置入含有 100  $\mu$ l 溶菌緩衝液 (lysis buffer : 50 mM Tris (pH 8.0)、25 mM EDTA、3% SDS、300 mg/L protease-K 的微量離心管 (eppendorf) 中，略為震盪後再以小型桌上離心機離心集中，續將微量離心管置入乾浴加熱器，以 65°C 處理 1 小時，後加入 200  $\mu$ l 的萃取緩衝液 (extraction buffer : 10 mM Tris (pH 8.0)、1 mM EDTA、0.3M NaOAc)，然後再加入 300  $\mu$ l 的 phenol : chloroform : isopropanol (25 : 24 : 1) 溶液去除二價金屬離子、蛋白質和鹽類，以 14,000 g 離心 10 分鐘，取上清液至新的微量離心管中，加入 0.6 倍體積的異丙醇置入 -20°C 冷凍庫進行沉澱十分鐘後以 14,000 g 離心 5 分鐘，小心倒去上清液，續以預冷的 70% 酒精

表一、本研究中分離自新竹縣新埔鎮 (Sinpu, Hsinchu)、台中縣新社鄉 (Sinshe, Taichung) 及台中縣梨山地區 (Lisan, Taichung) 之梨黑星病菌菌株

Table 1. Isolates of *Venturia* sp. obtained from Sipu, Hsinchu County, Shinshe, Taichung County and Lisan, Taichung County used in this study

Collected location	Number	Isolate number	Collected date
Sinpu, Hsinchu County	53	VPP001-VPP053	2007/04/27
Sinshe, Taichung County	10	XS01-XS10	2008/01/15
Lisan, Taichung County	15	LS01-LS15	2008/06/08
Tatol	78		

漂洗 DNA 2 次，風乾後將 DNA 溶在純水中保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  備用。

以通用引子對 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 及 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 對<sup>(37)</sup>此模板 DNA 進行 PCR 增幅反應。PCR 反應內容物為 1 倍的 PCR master Mix Kit (GeneMark)、 $100\text{ ng}/\mu\text{l}$  的引子對及  $1\ \mu\text{l}$  的模板 DNA，而 PCR 反應條件則為  $95^{\circ}\text{C}$  變性 5 分鐘後，以  $95^{\circ}\text{C}$  變性 1 分鐘， $53^{\circ}\text{C}$  黏合 1 分鐘， $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 分鐘，共 35 循環，最後再以  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 分鐘完成反應。

### 核糖體核酸 (rDNA) 內轉錄間隔區 (ITS) 之分子親緣性分析

為確定台灣產梨黑星病菌 *Venturia* sp. 與 *V. nashicola* 和 *V. pirina* 之分子親緣關係，自 78 株梨黑星病菌株中選取 39 株菌株進行分子親緣性分析，供試菌株包括新竹地區所分離的 33 株菌株、新社地區所分離的 2 株菌株與梨山地區所分離的 4 株菌株。分析方法為利用 Clustal X v1.8 軟體<sup>(35)</sup> 將完成 ITS/ITS2 與 5.8S 序列定序之 39 株梨黑星病菌株進行排序 (alignment)，再以 Sequence Alignment (Se-Al) Editor v.1.0<sup>(25)</sup> 進行序列的調整，然後使用 PAPA v.4.0b 之套裝軟體中的 neighbor-joining (NJ)<sup>(26)</sup> 與 maximum parsimony (MP) 法進行分析<sup>(5)</sup>。此外自 GenBank 中選取 *V. nashicola* (EU035465、AF065846) ITS 序列和 *V. pirina* (EU035468、EU035469、AF333438、AF333439) ITS 序列與台灣地區梨黑星病菌一起進行分析，分析過程中並以 *V. inaequalis* (EU282477、EU035437) 的 ITS 序列當作外群菌株 (out group)。

### 梨黑星病菌 (*Venturia nashicola*) 對殺菌劑之感受性測試

供試藥劑包括 50% 免賴得可濕性粉劑 (benomyl, WP) (興農有限公司)、44.2% 克收欣水懸劑 (kresoxim-methyl, SC) (巴斯夫有限公司)、50% 三氟敏可濕性粉劑 (trifloxystrobin, WP) (拜耳有限公司)、40% 克熱淨可濕性粉劑 (iminocadine, WP) (日本曹達有限公司) 及 50% 撲克拉錳可濕性粉劑 (prochlorate manganese, WP) (景茂貿易有限公司)。

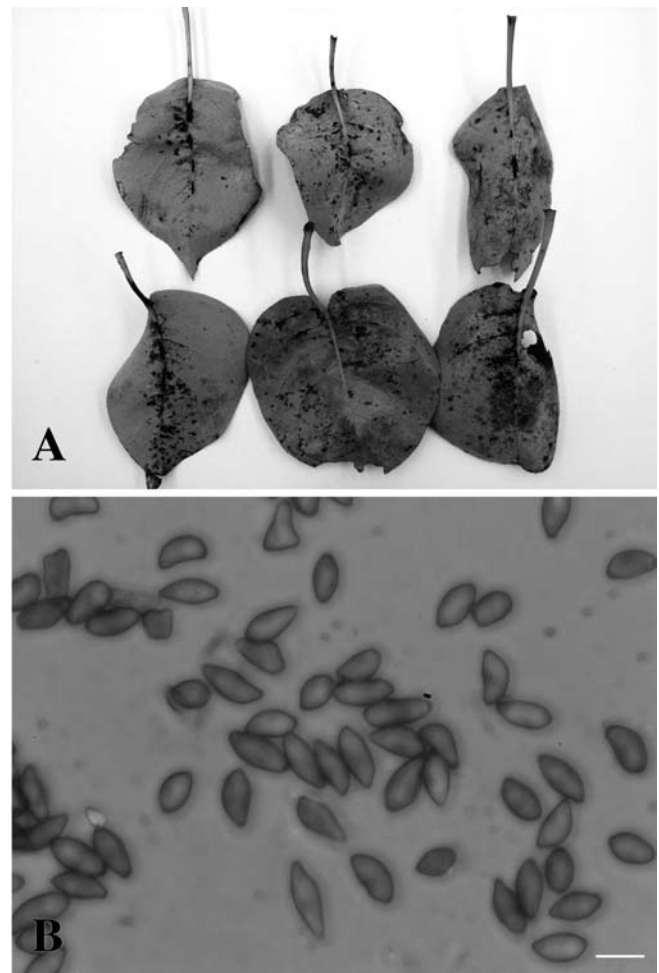
自保存於 PDA 斜面的 78 株梨黑星病菌株，分別以移植針取出菌絲塊置入 PDA 平板培養基中培養 30 天，然後以直徑 0.3 公分的打孔器切取菌絲圓盤，分別置於含有有效濃度 1、10、100 及  $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$  的 9 公分四分 PDA 培養皿中，並以未添加農藥之處理作為對照組，無照光培養於  $20^{\circ}\text{C}$  定溫箱中。每一試驗處理 4 重

複，培養 30 天之後記錄其菌落直徑，並以半數有效抑制濃度 (Effective concentration for 50% inhibition;  $\text{EC}_{50}$ ) 作為菌株抗感性評估之依據。本實驗重複兩次。

## 結 果

### 梨黑星病菌形態鑑定

經由分生孢子形態鑑定，可明顯得知台灣地區所分離的梨黑星病菌株與 Ishii 和 Yanase 兩氏<sup>(20)</sup> 所發表，日本及大陸之 *V. nashicola* 的分生孢子形態學特徵相似，為卵形 (ovariform)、洋梨形 (pyriform)、紡錘形 (fusiform) 或不規則形 (irregular) 孢子，而非 *V. pirina* 之長寬圓形 (oblong-ellipsoid) 或長棍棒形 (baculiform) 孢子 (圖一)。在分生孢子大小方面，台灣梨黑星病菌



圖一、台灣地區梨黑星病之葉部病徵 (A) 與黑星病菌菌株之分生孢子形態 (B)。比例尺長度： $10\ \mu\text{m}$ 。  
Fig. 1. Symptoms of pear scab in leaves (A) and the morphology of *Venturia* sp. isolates (B) obtained from Taiwan. Scale bar in B= $10\ \mu\text{m}$ .

株之分生孢子長為 11.6-25.8  $\mu\text{m}$ ，平均值為 14.6  $\mu\text{m}$ ；寬為 6.1-8.4  $\mu\text{m}$ ，平均值為 7.0  $\mu\text{m}$ 。此外，分生孢子長寬比介於 1.9-3.1  $\mu\text{m}$ 。由測量結果顯示，台灣地區梨黑星病菌株之分生孢子大小與來自日本及中國的 *V. nashicola* 相近，而與來自歐洲地區的 *V. pirina* 在孢子大小上有明顯的差異(表二)。

### 核糖體核酸 (rDNA) 內轉錄間隔區 (ITS) 序列之分子親緣關係分析

以通用引子對 ITS1 及 ITS4 對 39 株台灣地區梨黑星病菌 *Venturia* sp. 之總 DNA 進行 PCR 反應後，得到約 500 bp 大小的 DNA 條帶，經定序後，利用 Clustal X v.1.8 進行最初的排序，再以 Se-Al Editor v. 1.0 調整

表二、比較台灣地區梨黑星病菌菌株 (*Venturia* sp.) 與日本、中國梨黑星病菌 (*Venturia nashicola*) 及歐洲梨黑星病菌 (*Venturia pirina*) 之孢子大小

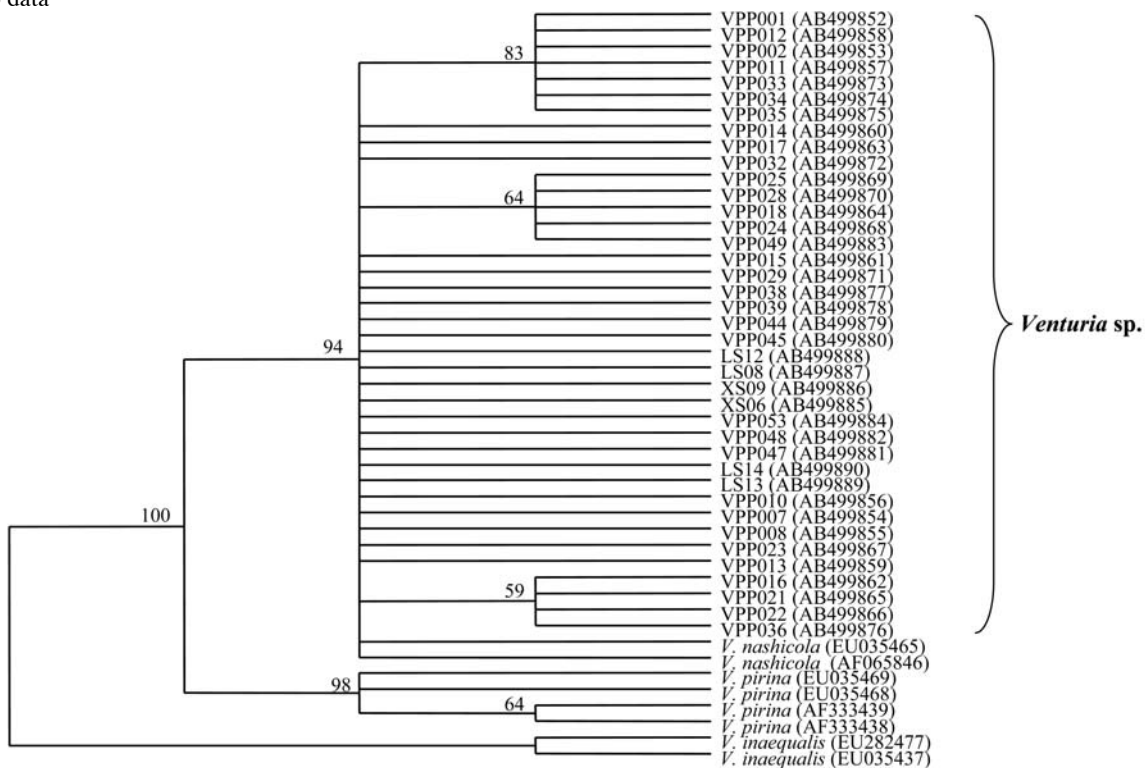
Table 2. Conidial characters comparison of *Venturia* sp. from Taiwan with *Venturia nashicola* from Japan and China and *Venturia pirina* from Europe

Conidia	<i>Venturia</i> sp.	<i>Venturia nashicola</i> <sup>1</sup>		<i>Venturia pirina</i>	
	This study	Japanese pear	Chinese pear	European pear <sup>1</sup>	Taiwanese pear <sup>2</sup>
Shape	ovarioform, pyriform, fusiform or irregular	ovarioform, pyriform, fusiform or irregular	ovarioform, pyriform, fusiform or irregular	oblong-ellipsoid, baculiform	fusiform
Length range (mean) $\mu\text{m}$	11.6-25.8 (14.6)	8.0-27.6 (15.4)	8.3-26.3 (15.8)	9.5-42.2 (22.0)	18-21
Width range (mean) $\mu\text{m}$	6.1-8.4 (7.0)	5.1-11.8 (7.4)	5.0-10.0 (7.6)	5.2-11.2 (7.8)	6-9
Length/Width ratio range $\mu\text{m}$	1.9-3.1	1.7-2.4	1.7-2.6	1.8-3.8	ND <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Published by Ishii and Yanase, 2000.

<sup>2</sup> Published by Sun, 1967.

<sup>3</sup> ND: no data



圖二、以 maximum-parsimony (MP) 分析台灣地區 39 株梨黑星病菌株之 ITS1/5.8S/ITS2 核苷酸序列所作成的親緣關係樹狀圖。各分岐點之數字代表以 1,000 次重複分析所得的 bootstrap 值，括號中的編號為 GenBank 庫中之編號。

Fig. 2. Internal transcribed spacer (ITS1/ITS2) and 5.8S sequence-based tree generated using maximum-parsimony (MP) analysis from 39 isolates of *Venturia* sp. Numbers on the branch indicate node support for 1,000 bootstrap replicates. *Venturia* sp. isolates in bold type were obtained from Taiwan. Number in parentheses is accession number in GenBank.

後，以 maximum parsimony (MP) 法分析 39 株台灣地區梨黑星病菌株和 GenBank 中 *V. nashicola* 與 *V. pirina* 的分子親緣關係，得知所有供試的台灣地區梨黑星病菌株與 *V. nashicola* 形成單一分子群 (monophyletic group)，具有高達 94% 的 bootstrap 值，然 *V. pirina* 菌株則自成一個分子群 (圖二)。若以 neighbor-joining (NJ) 法分析發現其結果與 MP 分析法相同，所有供試的台灣梨黑星病菌與 *V. nashicola* 均同在一個分子群內，且 bootstrap 值為 88% (圖三)，證實台灣地區的梨黑星病菌株與 *V. nashicola* 有較接近的親源關係，而與 *V. pirina* 之分子親緣性較遠。此外，比對 39 株梨黑星病菌株的 ITS 與 5.8S 核苷酸序列與 GenBank 中 *V. nashicola* 和 *V. pirina* 的 ITS 與 5.8S 核苷酸序列，結果亦證實所供試梨黑星病菌株與 *V. nashicola* 的一致性 (identity) 高達 99%，而與 *V. pirina* 的一致性則低於 98%。本研究所得 39 株梨黑星病菌的 ITS 與 5.8S 核苷酸序列，已登錄到 DDBJ/NCBI/EMBL 之 GenBank 資料庫。

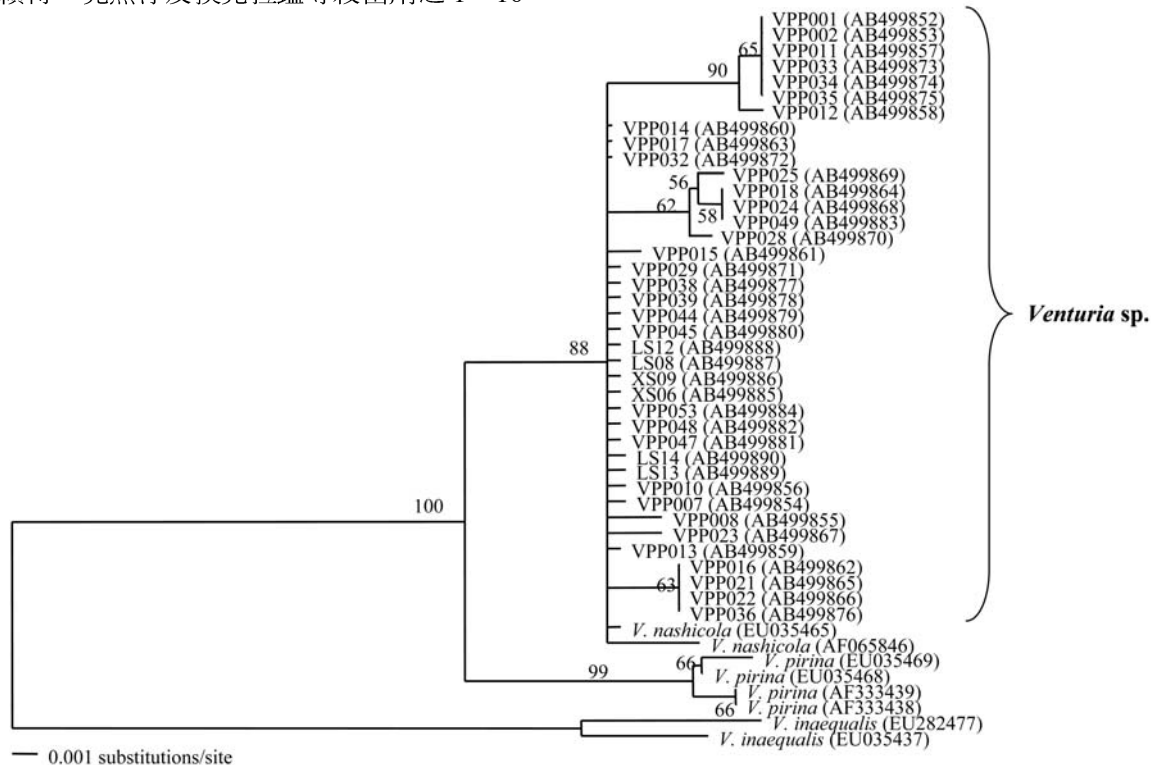
### 梨黑星病原菌對不同殺菌劑之感受性測試

將 78 株菌株之菌絲塊培養於含有克收欣、三氟敏、免賴得、克熱淨及撲克拉錳等殺菌劑之 1、10、

100 和 500  $\mu\text{g/ml}$  等有效濃度的四分隔 PDA 培養基平板 30 天後，計算抑制率並換算成  $\text{EC}_{50}$ ，結果如表三所示，40% 克熱淨可濕性粉劑對新埔、新社及梨山之梨黑星病菌株菌絲生長的抑制效果最佳，其  $\text{EC}_{50}$  值小於 1  $\mu\text{g/ml}$ ，其次是 50% 撲克拉錳可濕性粉劑，其抑制梨黑星病菌菌絲的生長的  $\text{EC}_{50}$  值濃度為 10  $\mu\text{g/ml}$ 。此外，針對 50% 免賴得可濕性粉劑測試結果得知，在有效濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  下，對 97% 以上供試菌株的菌絲生長抑制效果達 50%。至於 44.2% 克收欣水懸劑與 50% 三氟敏可濕性粉劑之測試中，雖然在有效濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  下，可分別抑制 93.5% 與 83.3% 之供試菌株菌絲生長，但有少數菌株於有效濃度 500  $\mu\text{g/ml}$  下仍可生長良好。

## 討 論

藉由形態學的觀察比較與分子生物學的鑑定，證明台灣梨黑星病菌應屬於 *V. nashicola*。Tanaka 和 Yamamoto 兩氏首度於 1964 年發表 *Venturia nashicola*<sup>(33)</sup> 為亞洲地區，如日本、韓國及中國等梨栽培地之主要



圖三、以 neighbor-joining (NJ) 分析台灣地區 39 株梨黑星病菌株之 ITS1/ITS2/ITS 核苷酸序列所作成的親緣關係樹狀圖。各分歧點之數字代表以 1,000 次重複分析所得的 bootstrap 值，括號中的編號為 GenBank 庫中之編號。

Fig. 3. Internal transcribed spacer (ITS1/ITS2) and 5.8S sequence-based tree generated using neighbor-joining (NJ) analysis from 39 isolates of *Venturia* sp. Numbers on the branch indicate node support for 1,000 bootstrap replicates. *Venturia* sp. isolates in bold type were obtained from Taiwan. Number in parentheses is accession number in GenBank.

表三、不同地區梨黑星病菌對 5 種殺菌劑免賴得 (benomyl)、克收欣 (kresoxim-methyl)、三氟敏 (trifloxystrobin)、克熱淨 (iminoctadine) 及撲克拉錳 (prochlorate manganese) 之感受性

Table 3. Sensitivity of *Venturia nashicola* from different area to benomyl, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, iminocadine and prochlorate manganese

Fungicide	Collected place	EC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (ppm) of A. I. <sup>2</sup>				
		<1	1-10	10-100	100-500	>500
Benomyl	Sinpu, Hsinchu	5	46	2	0	0
	Sinshe, Taichung	0	10	0	0	0
	Lisan, Taichung	12	3	0	0	0
Kresoxim-methyl	Sinpu, Hsinchu	38	10	2	3	0
	Sinshe, Taichung	10	0	0	0	0
	Lisan, Taichung	15	0	0	0	0
Trifloxystrobin	Sinpu, Hsinchu	23	16	11	1	2
	Sinshe, Taichung	5	5	0	0	0
	Lisan, Taichung	0	9	6	0	0
Iminocadine	Sinpu, Hsinchu	53	0	0	0	0
	Sinshe, Taichung	10	0	0	0	0
	Lisan, Taichung	15	0	0	0	0
Prochlorate manganese	Sinpu, Hsinchu	50	3	0	0	0
	Sinshe, Taichung	9	1	0	0	0
	Lisan, Taichung	15	0	0	0	0

<sup>1</sup> EC<sub>50</sub>: the concentration at which the inhibitive response is present for 50 percent of the population.

<sup>2</sup> A. I.: Active ingredient of fungicide.

病原<sup>(5, 19, 22)</sup>。雖然仍有學者認為 *V. nashicola* 與 *V. pirina* 為同種異名<sup>(30)</sup> 或 *V. nashicola* 為 *V. pirina* 的生理小種<sup>(29)</sup>，但最近的研究證實，在分子親緣性分析<sup>(1, 28)</sup>、菌株配對實驗<sup>(15)</sup>、形態學差異<sup>(15)</sup>、接種試驗結果<sup>(15)</sup> 及酯化酶 (esterase) 與過氧化酶 (peroxidase) 之結構差異<sup>(13)</sup> 確定 *V. nashicola* 不同於 *V. pirina*。加上，台灣所栽種之梨品系與日本相似，因此引起台灣梨黑星病之病原極可能是 *V. nashicola* 而非 *V. pirina*。筆者曾與中興大學植物病理學系孫守恭老師討論台灣梨黑星病菌之種類時，證實早年梨山地區的福壽山農場確實曾栽種西洋梨，然筆者於 2008 年到福壽山調查梨山之梨黑星病時已無西洋梨踪跡，且當地農民亦早已不再種植此類品種。此外，本研究亦由石井英夫博士針對台灣梨黑星病菌菌株進行病原性測試，確定所分離的梨黑星病菌株能感染橫山梨，且依孢子形態學、大小與分子親緣性分析，證實台灣梨黑星病菌應屬於 *V. nashicola*。此外，分子親緣關係分析中，指出新竹新埔地區所蒐集到的菌株中可再形成不同之分子亞群 (subgroup) (圖二與圖三)，顯示新竹新埔地區的梨黑星病菌具有分子多樣性的特徵。Ishii 氏等人<sup>(14)</sup> 曾報告日本產 *V. nashicola* 的菌株間存在有生理小種，雖然本研究針對台灣產 *V. nashicola* 之病原性並沒有深入探討，但根據分子親緣關係推測台灣梨黑星病菌亦可能存在有不同毒力之菌株。

台灣地區梨黑星病菌對藥劑感受性測試中，顯示除克收欣與三氟敏外，免賴得、克熱淨及撲克拉錳仍可抑制大部份台灣梨黑星病菌菌絲的生長。其中克熱淨與撲克拉錳於有效濃度 10  $\mu$ g/ml 下即可有效抑所有供試梨黑星病菌菌株，而免賴得於相同有效濃度下亦可抑制 97% 以上黑星病菌菌絲生長。克熱淨屬胍類 (guanidines) 類具廣效性，在 FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 中的 Mode of Action Code 為 M7，在台灣被推薦用於防治柑桔、葡萄、蘋果等果樹病害<sup>(4)</sup>。該藥劑雖未推薦用於防治梨黑星病，但卻推薦用於防治梨的輪紋病，屬多重作用藥劑，主要是抑制真菌細胞膜與脂質生合成<sup>(20)</sup>，目前台灣田間並無抗藥性菌株之報告，本實驗結果亦證實台灣梨黑星病菌對克熱淨仍屬感受性。撲克拉錳為混合性殺菌劑，可用於防治炭疽病、百合苗枯病、蘭花黃葉病等病害<sup>(20)</sup>，雖未推薦用於防治梨黑星病，但由於對炭疽病有防治效果，因此梨栽培區的農民有施用此藥劑的記錄，本研究中針對撲克拉錳進行抗性測試，結果顯示田間的梨黑星病菌菌株對撲克拉錳仍屬感受性。在日本，benzimidazole 類殺菌劑中的甲基多保淨 (thiophanate-methyl) 與免賴得 (benomyl) 被推薦用於防治梨黑星病，但由於田間的常期施用，導致日本已出現抗 benzimidazole 類之黑星病菌菌株<sup>(10, 11, 12)</sup>。本試驗中得知所調查的所有黑星病菌菌株中只有兩株之 EC<sub>50</sub> 值介於

有效濃度 10~100  $\mu\text{g/ml}$  之間，其餘菌株的  $\text{EC}_{50}$  值皆小於 10  $\mu\text{g/ml}$ ，顯示台灣梨黑星病菌對免賴得仍屬感受性，與日本菌株抗 benzimidazole 類藥劑之情不同。雖然 benzimidazole 類藥劑在台灣為防治梨黑星病的推薦藥劑之一，但近十年來農民已鮮少使用此類藥劑防治梨黑星病，推測田間抗 benzimidazole 類藥劑之梨黑星病菌族群密度降低的原因可能與田間不再施用該類藥劑有關。

Strobilurin 類藥劑具廣效性，在 FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 中的 Mode of Action Code 為 C3，為台灣近年來推薦用於防治梨黑星病的主要殺菌劑之一<sup>(4)</sup>。目前國內外已有報告指出，多種植物病原真菌對 strobilurin 類殺菌劑產生了抗藥性，如炭疽病菌<sup>(8, 24, 36)</sup>、水稻稻熱病菌<sup>(17)</sup>、蘋果黑星病菌<sup>(6)</sup>、瓜類白粉病菌與露菌<sup>(9)</sup>、灰黴病菌<sup>(2)</sup>等。在台灣，農民在防治梨黑星病時亦發現，strobilurin 類藥劑中的克收欣與亞托敏於田間防治效不佳。本實驗檢測台灣梨黑星病菌對克收欣與三氟敏之感受性，得知台灣梨黑星病菌可能已產生抗 strobilurin 類藥劑的菌株，其中三氟敏對自新竹新埔所蒐集到菌株中有 2 株之  $\text{EC}_{50}$  值介於有效濃度 100~500  $\mu\text{g/ml}$  之間，1 株之  $\text{EC}_{50}$  值大於 500  $\mu\text{g/ml}$ 。雖然結果顯示，台灣梨黑星病菌對 strobilurin 類藥劑可能存在產生抗藥性菌株之高風險，但本研究比較 3 個梨栽培地區之菌株顯示，除新竹地區外台中區與梨山地區之梨黑星病菌對 strobilurin 類藥劑仍屬感受性，顯示此類藥劑對梨黑星病仍有一定的防治效果，未來在使用此類藥劑應與其他種類之殺菌劑或輪流使用，降低黑星病菌對此類藥劑產生抗藥性之風險。

## 謝 辭

本研究承行政院國家科學委員會 NSC 96-2313-B-005-035 暨教育部邁向頂尖大學計畫補助，特以致謝。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Cam, B. L., Devaux, M., and Parisi, L. 2001. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 900-904.
2. Chen, L. S. 2008. Investigation of sensitivities and resistant mechanisms of *Botrytis cinerea* to strobilurins in Taiwan. Master thesis, National Chung Hsing University, 93 pp. (in Chinese)
3. Cho, E. K., Cho, W. T., and Lee, E. J. 1985. The causal organism of pear scab in Korea. *Korean J. Mycol.* 13: 263-265.
4. Fei, W. C., and Wang, Y. M. 2004. *Plant Protection Manual*. Wufeng, Taichung, Taiwan, Agriculture Chemicals and Toxic Substances Research Institute Press, 825pp. (in Chinese)
5. Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for specified tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
6. Fontaine, S., Remuson, F., Fraissinet-Tachet, A. M., Marmeisse, R., and Melayah, D. 2009. Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays. *Pest Manag. Sci.* 65: 74-81.
7. Goodwin, D. C., and Lee, S. B. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques* 15: 438-444.
8. Inada, M., Ishii, H., Chung, W. H., Yamada, T., Yamaguchi, J., and Furuda, A. 2008. Occurrence of strobilurin-resistant strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*) the causal fungus of strawberry anthracnose. *Jpn. J. Phytopathol.* 74: 114-117. (in Japanese with English abstract)
9. Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., and Hollomon, D. W. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166-1171.
10. Ishii, H., and Yamaguchi, A. 1977. Tolerance of *Venturia nashicola* to thiophanate-methyl and benomyl in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 43: 557-561.
11. Ishii, H., and Yamaguchi, A. 1981. Resistance of *Venturia nashicola* to thiophanate-methyl and benomyl existence of weakly resistant isolates and its practical significance. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 4: 528-533.
12. Ishii, H., Udagawa, H., Yanase, H., and Yanaguchi, A. 1985. Resistance of *Venturia nashicola* to thiophanate-methyl and benomyl: build-up and decline of resistance in the field. *Plant Pathol.* 34: 363-368.
13. Ishii, H., and Suzuki, H. 1994. Isozyme variation and inheritance of *Venturia* species causing scab on pears. *Norw. J. Agric. Sci. Suppl.* 17: 113-122.
14. Ishii, H., Watanabe, H., and Tanabe, K. 1997. Physiological races of *Venturia nashicola* on pears. Pages 130-133 in: *Integrated Control of Pome Fruit Diseases*. Vol. 9. A. M. Berrie, X. M. Xu, D. C. Harris, A. L. Roberts, K. Evans, D. J. Barbara, and C. Gessler (eds). IOBC/WPRS, Gent, Belgium.
15. Ishii, H., and Yanase, H. 2000. *Venturia nashicola*, the scab fungus of Japanese and Chinese pears: a species distinct from *V. pirina*. *Mycol. Res.* 104: 755-759.
16. Ishii, A., Akimitsu, K., Ishii, H., and Yamamoto, H.

2000. Purification of polygalacturonases produced by the pear scab pathogens, *Venturia nashicola* and *Venturia pirina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 263-271.
17. Kim, Y. S., Dixon, E. W., Vincelli, P., and Farman, M. L. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93: 891-900.
  18. Koenraadt, H., Somerville, S. C., and Jones, A. L. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.
  19. Li, B., Zhao, H., Li, B., and Xu, X. M. 2003. Effects of temperature, relative humidity and duration of wetness period on germination and infection by conidia of the pear scab pathogen (*Venturia nashicola*). *Plant Pathol.* 52: 546-552.
  20. Liao, L. S. 2005. Practical Pesticide. Taichung, Taiwan, Te Li Composite Ind. Ent. and Che Fac Press, 2005. (in Chinese)
  21. Ning, S. X. 2002. Introduction of amendments of importing quarantine practices in pear scion. *Agric. Poli. Situ.* 125: 22-25. (in Chinese)
  22. Park, P., Ishii, Y., Adachi, Y., Kanematsu, S., Ieki, H., and Umemoto, S. 2000. Infection behavior of *Venturia nashicola*, the cause of scab on Asian pears. *Phytopathology* 90: 1209-1206.
  23. Pei, C. L. 1981. Investigation on resistance of phytopathogenic fungi to fungicides in Taiwan. Master thesis, National Chung Hsing University. 125 pp. (in Chinese with English abstract)
  24. Peng, M. T. 2008. Sensitivity of mango and strawberry anthracnose fungi to strobilurins (QoIs) and benzimidazoles in Taiwan. Master thesis, National Chung Hsing University. 49 pp. (in Chinese with English abstract)
  25. Rambaut, A. 2000. Sel-AL: Sequence alignment editor. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK.
  26. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
  27. Sawada, K. 1943. Descriptive catalogue of the Formosan fungi 8. Rept. Gov't. Agr. Res. Inst. Taiwan No. 85. (in Japanese)
  28. Schnabel, G., Schnabel, E. L., and Jones, A. L. 1999. Characterization of ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree-fruit *Venturia* species. *Phytopathology* 89: 100-108.
  29. Shabi, E., Rotem, J., and Loebenstein, G. 1973. Physiological races of *Venturia pirina* on pear. *Phytopathology* 63: 41-43.
  30. Sivanesan, A. 1977. The taxonomy and pathology of *Venturia* species. pp. 94-99. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein.
  31. Sun, S. K. 2001. Fruit Diseases in Taiwan. Shih Way Publishers, Taichung, ROC. pp. 234-239. (in Chinese)
  32. Sun, S. K., and Du, D. Y. 1967. Ecology of pear scab and its control. *Plant Prot. Bull.* 9: 97 (in Chinese with English abstract)
  33. Tanaka, S., and Yamamoto, S. 1964. Studies on pear scab. II. taxonomy of the causal fungus of Japanese pear scab. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 29:128-136.
  34. The Phytopathological Society of Japan. 2000. Common Names of Plant Diseases in Japan. Japan Plant Protection Association, Tokyo, Japan. 880 pp. (in Japanese)
  35. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
  36. Tsai, J. N., Ann, P. J., Hu, C. Y., and Cheng, S. F. 2006. Evaluation of fungicides for suppression of mycelial growth and conidial germination of *Colletotrichum* species isolated from mango, pomelo and banana fruit. *Plant Pathol. Bull.* 15: 39-54. (in Chinese with English abstract)
  37. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). Academic Press: San Diego, U.S.A.
  38. Zheng, D., Olaya, G., and Köller, W. 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Curr. Genet.* 38: 148-155.



## ABSTRACT

Wu, S. Y.<sup>1</sup>, Chung, W. C.<sup>2</sup>, Huang, J. W.<sup>1</sup>, Ishii, H.<sup>3</sup>, and Chung, W. H.<sup>1,4</sup> 2009. Identification and fungicidal sensitivity of the fungus *Venturia* sp., the causal agent of pear scab in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 18: 135-143. (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung; <sup>2</sup>Taiwan Seed Improvement and Pripagation Station, COA; <sup>3</sup>National Institute for Agro-Environmental Sciences, Ibaraki, Japan; <sup>4</sup>Correspondence author, E-mail: wenchung@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-2285-4292)

To identify the species of pear scab caused by *Venturia* sp., we examined the morphological and molecular characteristics of the fungus *Venturia* sp. collected from Sinpu, Hsinchu County, Shishe, Taichung County and Lisan, Taichung County. Morphological results showed that the fungus belongs to *V. nashicola*. In the genetic analysis, the internal transcribed spacer (ITS1/ITS2) and 5.8 S regions of ribosomal DNA also conformed to the results of the morphological examinations of *V. nashicola* based on maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) analysis with 94% and 88% bootstrap support. A total of seventy eight isolates of *Venturia* sp. from three places in Taiwan were examined for their sensitivities to iminoctadine, prochlorate manganese, benomyl, kresoxim-methyl and trifloxystrobin in PDA medium. Iminoctadine and prochlorate manganese inhibited mycelial growth of all *V. nashicola* isolates with EC<sub>50</sub> values < 10 μg/ml, whereas benomyl inhibited mycelial growth of all *V. nashicola* isolates with EC<sub>50</sub> values < 100 μg/ml. Although kresoxim-methyl and trifloxystrobin inhibited more than 96% *V. nashicola* isolates with EC<sub>50</sub> values < 100 μg/ml, three isolates of *V. nashicola* showed low sensitivities in 100 or 500 μg/ml.

Keywords: pear scab, sensitive/resistant, fungicides, ITS1/ITS2