

小星辰花炭疽病菌之鑑定及其病原性測定

洪爭坊^{1,2} 張碧芳¹ 張景宜¹ 黃振文^{1,3}

¹ 台中市 國立中興大學植物病理學系

² 作者現為行政院農委會台中區農業改良場助理研究員

³ 聯絡作者，電子郵件：Jwhuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：+886-4-22851676

接受日期：中華民國 95 年 11 月 10 日

摘要

洪爭坊、張碧芳、張景宜、黃振文. 2006. 小星辰花炭疽病菌之鑑定及其病原性測定. 植病會刊 15 : 241-249

西元2002-2003年間，台灣中部地區多處花卉育苗場與栽培區發現小星辰花 (*Limonium bellidifolium* Dumort.) 葉片佈滿棕褐色圓形至不規則形之壞疽斑，嚴重時常導致小星辰花整個葉片壞疽或整株死亡。取回罹病葉片進行組織分離，共獲得八個 *Colletotrichum* spp. 菌株。經由柯霍氏法則證實各菌株均具有病原性後，取 *Colletotrichum* sp. Cas-01、Cas-03、Cas-06 及 Sta-04 菌株培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA) 平板上。其中 Cas-01 與 Cas-03 菌株氣生菌絲少，菌落呈暗褐色，會產生大量剛毛 (seta)，分生孢子鐮刀形或新月形；Cas-06 與 Sta-04 菌株的菌落在 PDA 上呈灰白至橄欖綠色，分生孢子長橢圓形，兩端鈍圓或一端為截頭狀 (truncated)。此外，Cas-06 與 Sta-04 菌株在 PDA 上會產生黑色球形的子囊果，子囊果內含透明子囊，每個子囊內有八個子囊孢子，子囊孢子呈棍棒狀至紡錘形且略微彎曲。利用 Mills 氏等人研發之 *C. gloeosporioides* 專一性 CgInt 引子配合 ITS4 引子進行 PCR，可由 Cas-04、Cas-05、Cas-06、Cas-07、Sta-04 與 Sta-b3 菌株增幅出大小約 450 bp 的專一性條帶，卻無法由 Cas-01 及 Cas-03 菌株增幅出任何條帶。進一步以 ITS1 及 ITS2 引子對增幅 Cas-01 與 Cas-03 菌株之 ITS1 與 5.8S rDNA 部分序列，經解序後進行比對，結果它們與 *Colletotrichum dematium* 的序列相同度達 99-100%。綜合上述病原菌形態特徵與分子生物學上的佐證，確定引起小星辰花苗炭疽病之病原菌為 *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 與 *Colletotrichum dematium* (Pers.: Fr.) Grove，前者的有性世代為 *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk。將 *C. dematium* Cas-01 及 Cas-03 菌株與 *C. gloeosporioides* Cas-06 及 Sta-04 菌株的分生孢子分別噴霧接種於十四種植物上，*C. dematium* Cas-01 及 Cas-03 菌株僅在高溫高濕 (28°C，RH 100% 持續七天以上) 下，才可造成小星辰花苗、蜀葵、茼蒿及太陽菊的壞疽病徵；至於 *C. gloeosporioides* Cas-06 及 Sta-04 菌株則可感染小星辰花、藍雪花、檸檬、茼蒿及太陽菊等植株。

關鍵詞：小星辰花、炭疽病、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Glomerella cingulata*、*Colletotrichum dematium*。

緒言

小星辰花 (*Limonium bellidifolium* Dumort.) 又稱卡斯比亞，小石薺蓉，為藍雪花科 (Plumbaginaceae) 匙葉草屬 (*Limonium* sp.) 宿根草本花卉。其葉成倒卵形，花梗直立，著生許多細小花苞，花色柔和淡雅，為切花

之高級花材⁽⁵⁾。小星辰花原產於歐洲、地中海及中亞一代，性喜冷涼與日照良好的環境。在台灣的主要產區包括南投埔里、彰化北斗、田尾、和美、嘉義及屏東等地。由於台灣的氣候溫暖潮濕，致使小星辰花苗於田間栽培時常受病害威脅。據報導，國內外可危害匙

葉草屬花卉的病原有 *Cercospora insulana* Sacc.、*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc.、*Erysiphe limonii* Junell、*Pseudomonas andropogonis* (Smith) Stapp.、*Turnip mosaic virus* 及 *Statice virus Y* 等^(2,3,7,9,11)。其中，炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 在侵染小星辰花幼苗後，病勢擴展迅速且易導致植株死亡。在台灣，楊氏 (1999) 雖曾紀錄小星辰花炭疽病的發生⁽¹⁵⁾，卻僅限於病徵及病原菌形態的描述，至於造成該病害的病原菌種類與寄主範圍等，仍未有進一步的報導。

近年來，筆者由感染炭疽病的小星辰花幼苗與成株分離獲得的菌株，依其分生孢子形態與能否產生有性世代可區分為三群：(一) 菌落灰白色至橄欖綠色，分生孢子堆鮭紅色，分生孢子長橢圓形，在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA, Difco™, MD, USA) 平板上不產生子囊果；(二) 菌落白色至灰白色，分生孢子堆鮭紅色，分生孢子長橢圓形，在PDA上會產生大量子囊果；(三) 菌落呈暗褐色，分生孢子堆米黃色至淡鮭紅色，分生孢子鐮刀形或新月形，在PDA平板上不產生子囊果。其中，第一群的菌株與楊氏 (1999) 的紀錄資料相仿⁽¹⁵⁾，惟未曾有第二及第三群菌株危害小星辰花的相關報導，是以確有必要針對小星辰花炭疽病菌的種類及其相關的病理學資料作進一步的研究。本研究主要針對筆者採集到的第二及第三群小星辰花炭疽病菌菌株進行形態鑑定與病原性測定，並以分子生物學方法做為分類之佐證，期能釐清小星辰花炭疽病菌之種類與其對其他作物之病原性。

材料與方法

供試菌株來源

西元 2002-2003 年間，由台中新社、彰化北斗、田尾、永靖等花卉育苗場與栽培區採回的小星辰花炭疽病罹病植株，切取病葉組織後，以 75% 酒精進行表面消毒 30 秒，並吸乾多餘酒精，移置於 2% 水瓊脂培養基 (water agar, WA) 上，待可疑病原菌長出後，在解剖顯微鏡 (Nikon SMZ-10, Nikon, Japan) 下切取單一菌絲尖端，移至 PDA 平板上，七天後取其分生孢子進行單孢分離培養，共獲得 *Colletotrichum* spp. Cas-01、Cas-03、Cas-04、Cas-05、Cas-06、Cas-07、Sta-04 及 Sta-b3 等八個菌株。按柯霍氏法則確定各菌株的病原性後，選取 *Colletotrichum* spp. Cas-01、Cas-03、Cas-06 及 Sta-04 等四個菌株作為本研究的主要供試菌株。

供試植株與供試菌株之培養

由南投縣仁愛鄉芋卉種苗公司購得組織培養 3-4 個月的小星辰花組培苗 (*L. bellidifolium* cv. Misty blue)，移出組培瓶後，假植於裝有 BVB NO.2 介質的育苗盆 (3×3×3.5 cm³) 中，在室溫下培育十五天後，作為本研究的供試植株。另將 *Colletotrichum* spp. Cas-01、Cas-03、Cas-06 及 Sta-04 菌株培養在 PDA 斜面上，於室溫下每日給予 12 小時光照 (30W 旭光白色日光燈管 2 支，約 1700-2200 Lux，距試管約 50 公分)，使其穩定生長。為避免菌株變異，本試驗之供試菌株每 3-4 週進行單孢培養，以維持菌株的野生型。

小星辰花炭疽病菌之形態鑑定

將小星辰花炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. Cas-01、Cas-03、Cas-06 及 Sta-04 等菌株以單孢方式在 PDA 斜面上培養 7-14 天後，紀錄各菌株的菌落形態。另刮取各菌株的分生孢子製成孢子懸浮液，分別取 10 μl 滴於載玻片上，蓋上蓋玻片，在光學顯微鏡下逢機測量 45 個分生孢子大小後，將載玻片移置溼室中，於 28 °C 定溫箱中保溼 12 小時後，觀察紀錄各菌株分生孢子發芽後形成附著器的形態，並依據 Sutton 氏 (1980) 所著 *The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stroma* 一書的分類系統⁽¹²⁾ 與前人研究^(8,13) 鑑定病原菌的學名。

利用專一性引子對進行聚合酶連鎖反應鑑定小星辰花炭疽病菌

根據張氏 (2005) 修正 Kim 氏等 (1999) 研發的微波法^(1,4,6)，萃取各菌株的 DNA，作為聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 的模板⁽⁶⁾，並以 Sheu 氏等 (2003) 發表的 *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl. Et Bisby 之專一性 CcInt 引子⁽¹⁰⁾，配合 ITS4 引子⁽¹⁴⁾，針對 *Colletotrichum* sp. Cas-01 與 Cas-03 菌株進行 PCR。此外，利用 Mills 氏等 (1992) 發表之 *C. gloeosporioides* 專一性 CgInt 引子⁽⁸⁾ 配合 ITS4 引子，針對本研究中收集的八個菌株進行 PCR。上述之 PCR 條件均依照 Mills 氏等發表的條件進行⁽⁸⁾。

Colletotrichum spp. Cas-01 與 Cas-03 菌株的 ITS1 及 5.8S 部份 rDNA 之增幅及序列比對

利用 ITS1 與 ITS2 共同引子對⁽¹⁴⁾，針對 *Colletotrichum* sp. Cas-01 與 Cas-03 菌株進行 PCR 增幅，並將 PCR 產物濃縮⁽⁴⁾ 後，利用 GeneClean III Kit 試劑組 (Q · BIOgene, CA, USA) 進行 DNA 回收，再將回收之 DNA 送交國立中興大學生物科技發展中心核酸定序服務實驗室，以 ABI PRISM 3100 序列分析儀進行

DNA 解序，進一步將獲得的 DNA 序列與美國生物技術資訊中心 (National Center of Biological Information) 資料庫 (GenBank) 登錄的序列進行相似度比對。

小星辰花炭疽病菌對其他作物之病原性測定

將培養於 PDA 斜面上 2-3 週的 *C. dematium* (Pers.: Fr.) Grove Cas-01 與 Cas-03 菌株及 *C. gloeosporioides* Cas-06 與 Sta-04 菌株的分生孢子，以無菌水調配成濃度為 10^5 conidia/ml 的孢子懸浮液後，各取 0.5 ml 以空氣壓縮機 (Rich Star Precision Industrial Co., Ltd, Italy) 分別噴霧接種 (壓力 1.5 atm, 噴霧顆粒直徑約 0.1-0.3 mm, 接種植株與噴槍距離約 30-35 mm) 於假植 15 天的小星辰花苗和株齡 2 週的太陽菊 (*Chrysanthemum grinatum* L. cv. rainbow)、非洲菊 (*Gerbera jamesonii* H. Bolus: Hook f.)、萬壽菊 (*Tagetes erecta* L.)、蜀葵 (*Althaea rosea* L.)、茼蒿 (*Chrysanthemum coronarium* L.)、萵苣 (*Lactuca sativa* L.)、茄子 (*Solanum melongena* L.)、辣椒 (*Capsicum annuum* L.)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. tropical ruby)、甜椒 (*Capsicum annuum* L. var. *grossum* Seudt. cv. trim star)、白菜 (*Brassica rapa* L. Chinese Group) 等植株；此外，在檸檬 (*Mangifera indica* L.) 與藍雪花 (*Plumbago auriculata* L.) 的切離葉上分別滴加三滴 10 μ l 的孢子懸浮液，隨即將接種後的植株及切離葉置於 28°C 定溫箱中。接種 *C. dematium* Cas-01 及 Cas-03 菌株的植物持續套袋保濕 (RH 100%) 七天，並分別於接種後第七天與第十四天紀錄不同植物的發病情形。至於接種 *C. gloeosporioides* Cas-06 及 Sta-04 菌株的植株，則於套袋保濕 24 小時後隨即拆袋 (拆袋後 RH 65-85%)，七天後觀察紀錄不同植物的發病情形。每處理有四重複，每重複各有四棵植株或四片切離葉。

結 果

小星辰花炭疽病之病徵與病原菌形態

小星辰花受炭疽病菌危害初期葉部會出現褐色凹陷壞疽病斑，病斑中央顏色較淺，周圍偶有紅褐色暈環；當環境適合時，多數病斑會互相融合，莖基部亦可發現腐爛的現象 (圖一)，常導致葉片或整株幼苗枯死。將經柯霍氏法則確認具病原性的 *Colletotrichum* sp. Cas-01、Cas-03、Cas-06 及 Sta-04 菌株，培養在 PDA 平板上 7-14 天後，Cas-01 與 Cas-03 菌株產生的氣生菌絲較少，菌落呈暗褐色，培養基背面有深褐色色素累積，分生孢子座 (conidiomata) 會產生大量剛毛 (seta)

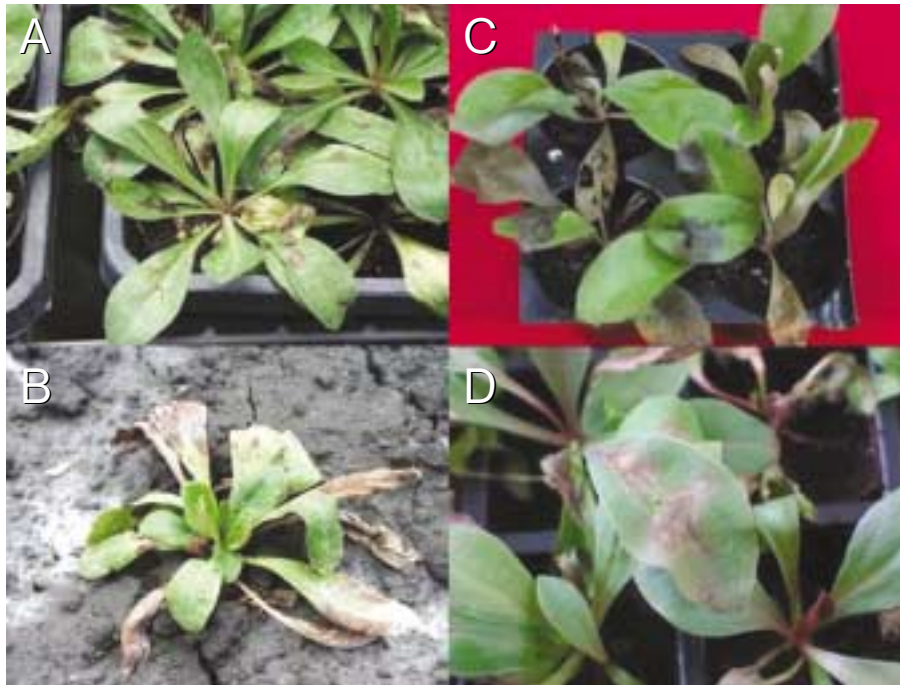
，分生孢子堆米黃色至淡鮭紅色，分生孢子無色透明，鐮刀形或新月形，大小 $22.0-30.0 \times 3.0-4.5 \mu\text{m}$ 。孢子發芽後形成之附著器 (appresoria) 呈深褐色至黑色，棍棒狀至圓形 (圖二)。Cas-06 與 Sta-04 菌株的菌落呈灰白色，無菌核及剛毛，分生孢子堆呈鮭紅色，分生孢子無色透明，呈長橢圓形，一端為截頭狀或兩端皆鈍圓，大小 $11.3-17.5 \times 3.8-6.3 \mu\text{m}$ 。孢子發芽後形成之附著器呈深褐色至黑色，橢圓形或不規則形。兩菌株在 PDA 平板培養基上會產生黑色球形的子囊果，子囊果內的子囊呈透明棍棒狀，大小 $42.5-68.8 \times 8.8-12.5 \mu\text{m}$ ，內含八個子囊孢子，子囊孢子透明，呈棍棒狀至紡錘形，略微彎曲，大小 $11.3-18.8 \times 3.8-6.3 \mu\text{m}$ (圖三)。

利用分子生物技術佐證小星辰花炭疽病菌的鑑定

採用 Sheu 氏等 (2003) 研發 *Colletotrichum capsici* 之專一性引子配合 ITS4 引子，對 *Colletotrichum* sp. Cas-01 與 Cas-03 進行 PCR，無法增幅出專一性的條帶 (圖四)，而利用 Mills 氏等 (1992) 研發之 CgInt 引子，針對 *Colletotrichum* sp. Cas-04、Cas-05、Cas-06、Cas-07、Sta-04 及 Sta-b3 菌株進行 PCR，則可增幅出片段大小約 450 bp 的專一性條帶，卻無法由 Cas-01 與 Cas-03 增幅出任何條帶 (圖五)。進一步利用 ITS1 與 ITS2 引子對，針對 Cas-01 與 Cas-03 進行 PCR，並將增幅出大小約 259 bp 的 rDNA 片段回收解序後 (圖六)，與美國生物技術資訊中心 (NCBI) 資料庫 (GenBank) 的資料進行比對，結果發現 Cas-01 與 Cas-03 菌株的 ITS1 區間與 5.8S 部份 rDNA 的核酸序列與 *C. dematium* (Accession numbers: AB046608.1、AB042310.1、AB042311.1) 的相似度達 99-100%。根據 Sutton 氏 (1980) 分類系統描述 *C. capsici*、*C. dematium* 及 *C. gloeosporioides* 之形態特徵，並佐以分子生物學之證據，確認小星辰花炭疽病菌 Cas-01 與 Cas-03 菌株同為 *C. dematium*。而 Cas-06 與 Sta-04 則為 *C. gloeosporioides*，其有性世代為 *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk。

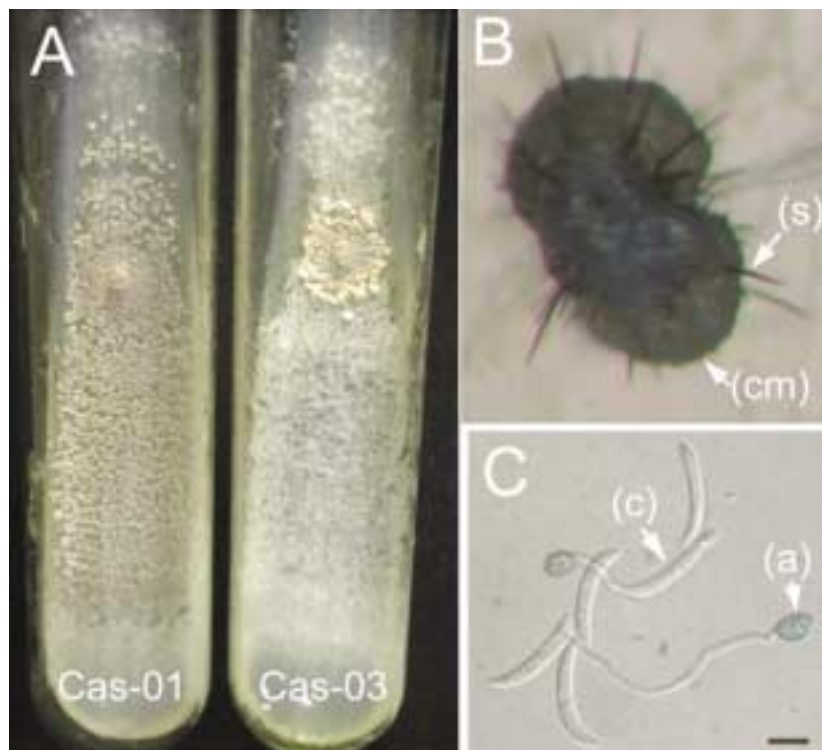
小星辰花炭疽病菌對其他作物之病原性測定

取 *C. dematium* Cas-01 與 Cas-03 及 *C. gloeosporioides* Cas-06 與 Sta-04 菌株分生孢子懸浮液 (10^5 conidia/ml)，分別噴霧接種於小星辰花、藍雪花、檸檬、太陽菊、非洲菊、萬壽菊、蜀葵、茼蒿、萵苣、茄子、辣椒、番茄、甜椒、白菜等植株上，結果顯示 *C. dematium* Cas-01 與 Cas-03 菌株需在高溫高濕 (28°C, RH 100%) 下持續七天以上，才會引起小星辰



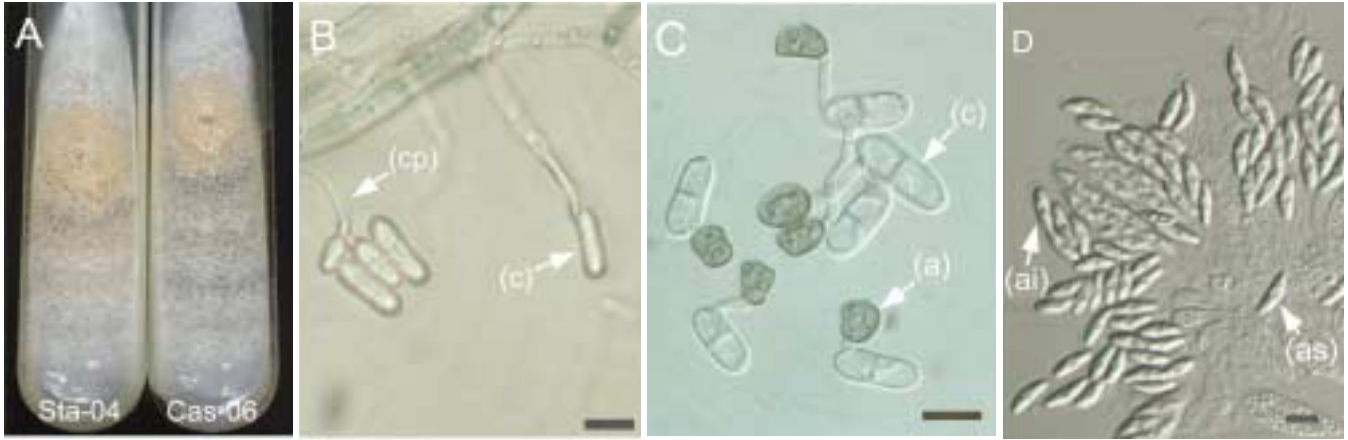
圖一、由 *Colletotrichum* spp.引起小星辰花炭疽病的病徵。(A) 育苗床上，罹病植株之病徵；(B) 田間罹病植株之病徵；(C) 接種 *C. dematium* 之病徵；(D) 接種 *C. gloeosporioides* 之病徵。

Fig. 1. Diseased caspia showed brown necrotic spots on leaves caused by *Colletotrichum* spp. (A) Symptoms of caspia seedling anthracnose occurred in nursery bed, (B) symptoms of caspia anthracnose occurred in the field, (C) necrotic symptoms on caspia seedling leaves inoculated artificially with *C. dematium*, and (D) with *C. gloeosporioides*.



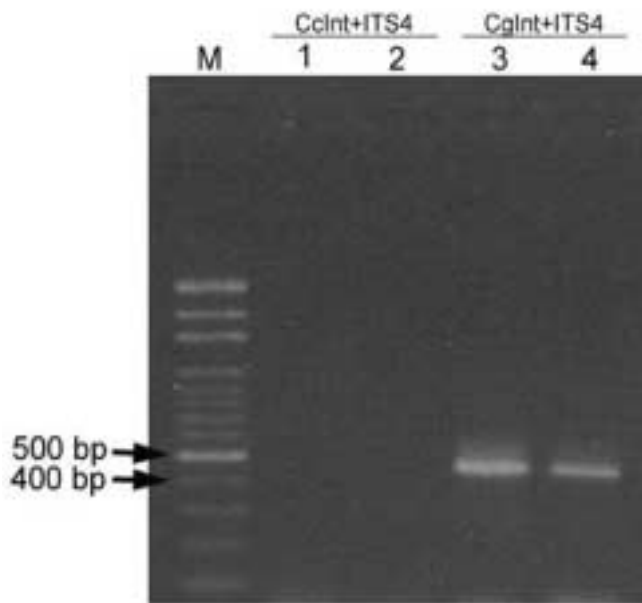
圖二、小星辰花炭疽病菌 *Colletotrichum dematium* Cas-0 與 Cas-03 菌株的形態特徵：(A) 在 PDA 斜面上的菌落形態；(B) 分生孢子堆具剛毛；(C) 分生孢子發芽形成附著器。

Fig. 2. Morphological characteristics of *Colletotrichum dematium* isolates Cas-01 and Cas-03. (A) Morphology of colonies of the two isolates on PDA, (B) setae (s) and conidiomata (cm), (C) germinated conidia (c) with appressoria (a). Bar = 10 μ m.



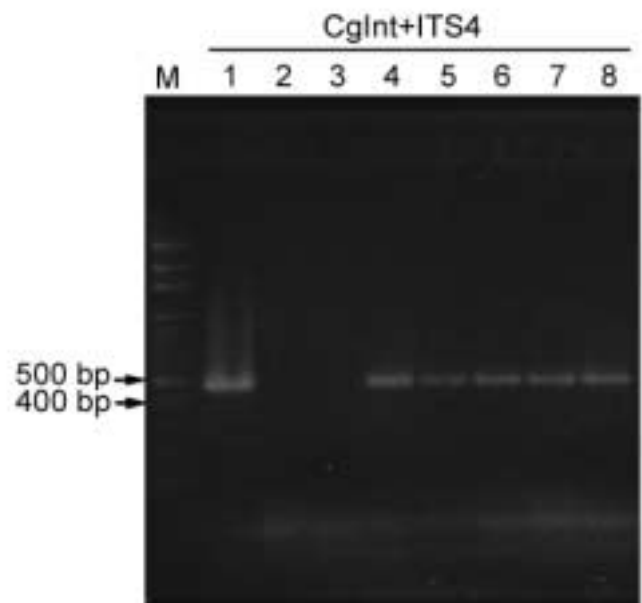
圖三、小星辰花炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Cas-06 與 Sta-04 菌株的形態特徵：(A) 在 PDA 斜面上的菌落形態；(B) 分生孢子著生於分生孢子梗上的情形；(C) 分生孢子發芽形成附著器；(D) 子囊及子囊孢子。

Fig. 3. Morphological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates Cas-06 and Sta-04. (A) Morphology of colonies of the two isolates on PDA, (B) conidiophore (cp) and conidia (c), (C) germinated conidia (c) with appressoria (a), (D) asci (ai) and ascospores (as). Bar = 10 μ m.



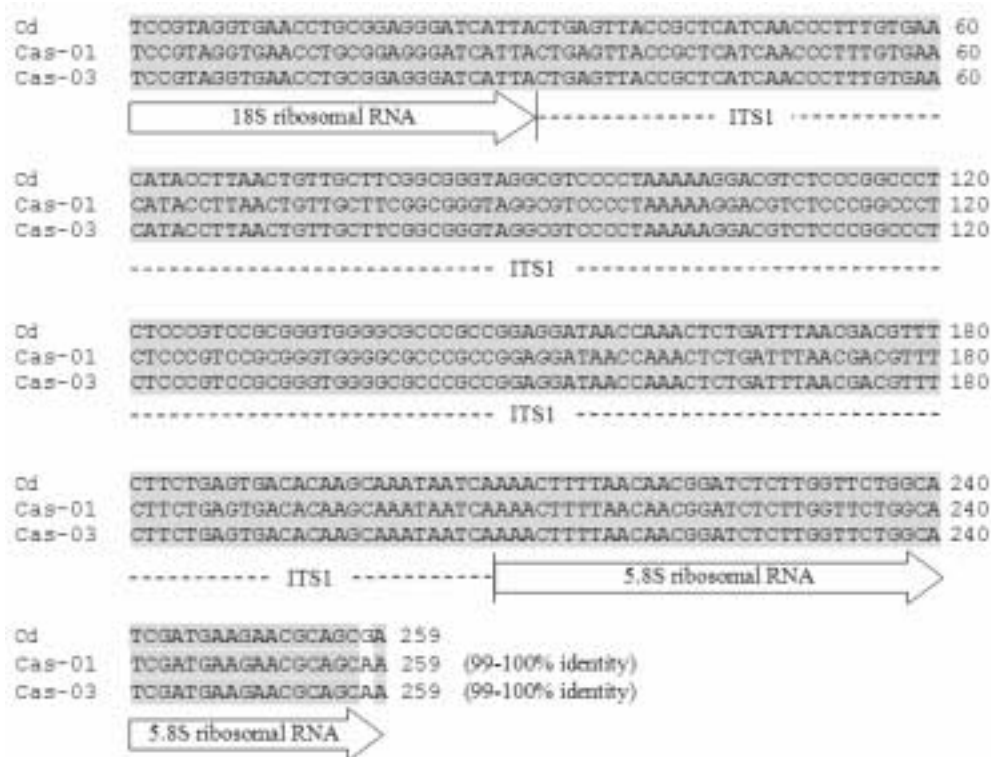
圖四、利用 *Colletotrichum capsici* 的專一性 CcInt 引子與 *C. gloeosporioides* 的專一性 CgInt 引子，分別配合 ITS4 引子，針對 *Colletotrichum* spp. Cas-01、Cas-03、Cas-06 及 Sta-04 菌株進行 PCR 增幅的結果。M: marker; lane 1: Cas-01; lane 2: Cas-03; lane 3: Cas-06; lane 4: Sta-04。

Fig. 4. PCR results amplified from DNA of *Colletotrichum* spp. isolates Cas-01, Cas-03, Cas-06, and Sta-04 by using *C. capsici* specific CcInt primer coupled with ITS4 primer and by using *C. gloeosporioides* specific CgInt primer coupled with ITS4 primer. A DNA fragment of about 450 bp was amplified specifically from *Colletotrichum* sp. Cas-06 and Sta-04 isolates using CgInt and ITS4 primers. M: marker; lane 1: Cas-01; lane 2: Cas-03; lane 3: Cas-06; lane 4: Sta-04.



圖五、利用專一性 CgInt 引子配合 ITS4 引子對小星辰花炭疽病菌 *Colletotrichum* spp. Cas-01、Cas-03、Cas-04、Cas-05、Cas-06、Cas-07、Sta-04 及 Sta-b3 等八個菌株進行 PCR 增幅的結果。M: marker; lane 1: Cas-06; lane 2: Cas-01; lane 3: Cas-03; lane 4: Cas-04; lane 5: Cas-05; lane 6: Cas-07; lane 7: Sta-b3; lane 8: Sta-04.

Fig. 5. A DNA fragment about 450 bp was amplified specifically from the DNA of six of the eight tested *Colletotrichum* spp. obtained from diseased caspia. No specific DNA fragment was amplified from the other two *Colletotrichum* sp. isolates, namely Cas-01 and Cas-03, by using CgInt primer coupled with ITS4 universal primer. M: marker; lane 1: Cas-06; lane 2: Cas-01; lane 3: Cas-03; lane 4: Cas-04; lane 5: Cas-05; lane 6: Cas-07; lane 7: Sta-b3; lane 8: Sta-04.



圖六、*Colletotrichum dematium* (Cd) , *Colletotrichum* sp. Cas-01 與 Cas-03 菌株之 ITS1 與 5.8S 部分 rDNA 序列比對及其相同度。

Fig. 6. Sequence alignment and comparison of the ITS1 and partial 5.8S rDNA among *Colletotrichum dematium* (Cd), *Colletotrichum* sp. isolates Cas-01 and Cas-03.

表一、小星辰花炭疽病菌 *Colletotrichum dematium* Cas-01 與 Cas-03 菌株及 *C. gloeosporioides* Cas-06 與 Sta-04 菌株對其他作物之病原性測定

Table 1. Pathogenicity tests of *Colletotrichum dematium* isolates Cas-01 & Cas-03 and *C. gloeosporioides* isolates Cas-06 & Sta-04 obtained from diseased caspia plants

Plant names	Pathogenicity test ¹			
	<i>C. dematium</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	Cas-01	Cas-03	Cas-06	Sta-04
African marigold (<i>Tagetes erecta</i> L.)	— ²	—	—	—
Cape leadwort (<i>Plumbago auriculata</i> L.)	—	—	+	+
Caspia (<i>Limonium bellidifolium</i> Dumort. cv. misty blue)	+	+	+	+
Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> L. Chinese Group)	—	—	—	—
<i>Chrysanthemum grinatum</i> L. cv. rainbow	+	+	+	+
Egg plant (<i>Solanum melongena</i> L.)	—	—	—	—
Garland chrysanthemum (<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.)	+	+	+	+
Hollyhock (<i>Althaea rosea</i> L.)	+	+	—	—
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> L.)	—	—	—	—
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	—	—	+	+
Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)	—	—	—	—
Sweet pepper (<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>grossum</i> Seudt. cv. trim star)	—	—	—	—
Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. tropical ruby)	—	—	—	—
Transvaal daisy (<i>Gerbera jamesonill</i> H. Bolus:Hook f.)	—	—	—	—

¹ The plants were inoculated with conidial suspension of the pathogens (10⁵ conidia/ml) and were kept in RH 100 % at 28 °C.

² “+” yes; “—” no

花、茼蒿、蜀葵及太陽菊葉片出現壞疽病徵，但無法侵染其他接种植物。至於 *C. gloeosporioides* Cas-06 與 Sta-04 菌株，除可侵染小星辰花，造成壞疽病徵外，尚可危害同科的藍雪花，並且可在椪果的葉片上造成壞疽的病斑；此外，亦可在茼蒿及太陽菊上引起灰白色至褐色之壞疽斑，惟無法感染其他供試植株(表一)。

討 論

西元 2002-2003 年間，筆者於台中新社、彰化北斗、田尾、永靖等花卉育苗場及栽培區，發現許多小星辰花葉片上出現褐色壞疽病斑，病斑周圍偶有紅褐色暈環，中央顏色較淺，嚴重時病斑癒合且造成植株死亡。取罹病葉片進行組織分離，獲得的菌株依其孢子形態與是否產生有性世代可分為三群：(一) 菌落灰白色至橄欖綠色，氣生菌絲較多，分生孢子長橢圓形，在 PDA 上不產生子囊果；(二) 菌落白色至橄欖綠色，氣生菌絲較少，具大量鮭紅色分生孢子堆，分生孢子長橢圓形，且在 PDA 上會產生大量子囊果，子囊透明棍棒狀，子囊孢子棍棒狀或紡錘形，略微彎曲；(三) 菌落呈褐色，氣生菌絲少，分生孢子堆米黃色至淡鮭紅色，並著生大量剛毛。楊氏 (1999) 曾報導 *C. gloeosporioides* 可造成小星辰花炭疽病⁽¹⁵⁾，而其所提及的病原菌與本研究所採集到的第一群菌株相仿，是故筆者另就第二及第三群病原菌的形態及對其他作物的病原性等方面進行研究。

根據 Sutton (1980) 的分類系統與分子生物學上的證據，確認引起小星辰花炭疽病的病原菌除了楊氏 (1999) 報導的 *C. gloeosporioides* 外，另包括筆者所述之第二群病原菌 *C. gloeosporioides* (有性世代為 *Glomerella cingulata*)，以及第三群病原菌 *C. dematium*。其中，*C. gloeosporioides* Cas-06 與 Sta-04 菌株可侵染小星辰花、藍雪花、椪果、茼蒿及太陽菊等；而 *C. dematium* Cas-01 與 Cas-03 菌株則需在高溫高濕的狀態下才能感染小星辰花、茼蒿、蜀葵及太陽菊。

引起小星辰花炭疽病的病原菌雖包括 *C. gloeosporioides*、*Glomerella cingulata* 及 *C. dematium* 等，但筆者在田間採集獲得的病原菌多屬 *C. gloeosporioides* 與 *Glomerella cingulata*，*C. dematium* 則較為少數(資料未載於文中)。前人研究則指出，*C. dematium* 屬於弱病原性之病原菌⁽¹²⁾，是否因此導致田間小星辰花罹病葉上分離到 *C. dematium* 的比率較低，則需進一步的探討。

謝 辭

本研究承行政院農委會動植物防疫檢疫局補助經費，使試驗順利進行，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Chang, J. Y. 2005. Molecular Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and Its Detection in Infected Banana Seedlings. Master thesis. National Chung-Hsing University, Taichung. 84 pp.
2. Engelhard, A. W., Howard, C. M., and Wilfret, G. J. 1972. A new crown rot, leaf and scape spot disease of statice (*Limonium sinuatum*) infected by *Colletotrichum* sp. *Plant Dis.* 56:894-895.
3. Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P., and Rossman, A. Y. 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States.* APS, USA, 1252 pp.
4. Hong, C. F. 2004. Biological Characteristics and Control of the Causal Agent of Caspia Seedling Anthracnose. Master thesis. National Chung-Hsing University, Taichung. 62 pp. (In Chinese)
5. Hsue, T. S. 1989. Illustration of Horticultural Plant of Taiwan. Taiwan Pulo Co. Ltd. Changhua. 94 pp. (In Chinese)
6. Kim, S. H., Uzunovic, A., and Breuil, C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. and Environ. Microbiol.* 61:287-290.
7. Lawson, R. H., Brannigan, M. D. and Foster, J. 1985. Clover yellow vein virus in *Limonium sinuatum*. *Phytopathology* 75: 899.
8. Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S., and Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 98:137-144.
9. Moffett, M. L., Hayward, A. C., and Fahy, P. C. 1986. Five new hosts of *Pseudomonas andropogonis* occurring in eastern Australia: host range and characterization of isolates. *Plant Pathol.* 35: 34-43.
10. Sheu, Z. M., Wang, T. C., and Wang, J. F. 2003. Identification of *Colletotrichum* species causing pepper anthracnose in Taiwan based on molecular and morphological criteria. *Plant Prot. Bull.* 12 (4):274 (abstract).
11. Sobers, E. K., and Cox, R. S. 1973. Anthracnose of statice in southern Florida. *Phytopathology* 63:193-194.
12. Sutton, B. C. 1980. *The Ceolomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli, and Stromata.* Commonwealth Mycological Institute, England, 696 pp.

13. Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Pages 1-26 in: *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. J. A. Bailey and M. J. Jeger, eds. C.A.B International, Oxford, 388 pp.
14. White, T. J., Bruns, T., Lee, L., 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. V. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, New York, 482 pp.
15. Yang, H. C. 1999. *Illustration of Horticultural Plant Diseases*. Mao-Li Co. Ltd., Taichung. 503 pp. (In Chinese)

ABSTRACT

Hong, C. F.^{1,2}, Chang, P. F. L.¹, Chang, J. Y.,¹ and Huang, J. W.^{1,3} 2006. Identification for the Causal Agent of Caspia Anthracnose and Its Pathogenicity Tests. *Plant Pathol. Bull.* 15:241-249 (¹Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R. O. C. ; ²Taichung District Agriculture Research and Extension Station, Changhua, Taiwan, R. O. C. ; ³ Corresponding author, E-mail: Jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; Fax : +886-4-22851676)

In 2002 and 2003, plants showing symptoms of necrotic, reddish brown spots on caspia (*Limonium bellidifolium*) leaves were observed in central Taiwan. Eight isolates of *Colletotrichum* sp., Cas-01, Cas-03, Cas-04, Cas-05, Cas-06, Cas-07, Sta-04, and Sta-b3, were isolated from leaf lesions of diseased seedlings and adult plants. Conidia of the isolates were used to inoculate caspia and kept at 100% RH for one day, then grown in the growth chamber. After 7 to 14 days, numerous acervuli were produced on inoculated leaves from which the same pathogen could be consistently isolated. On potato dextrose agar (PDA), spore masses of six isolates of *Colletotrichum* sp. Cas-04, Cas-05, Cas-06, Cas-07, Sta-04, and Sta-b3 were pinkish or salmon red with dense to sparse grayish aerial mycelia. Conidia were hyaline, straight, cylindrical, and apices obtuse. Perithecia of *Colletotrichum* isolates Cas-06 and Sta-04 formed on PDA produced asci with 8 single-celled, slightly curved ascospores. Spore masses of the other two *Colletotrichum* isolates, Cas-01 and Cas-03, were pale buff to salmon red with sparse grayish aerial mycelia. Conidiomata produced abundant setae. Conidia were hyaline, falcate, fusiform, apices acute. Further polymerase chain reaction was conducted with specific CgInt, CcInt, and universal ITS4 primer pairs for the identification of the eight isolates of *Colletotrichum* spp. A DNA fragment of about 450 bp was amplified from six *Colletotrichum* isolates, Cas-04, Cas-05, Cas-06, Cas-07, Sta-04, and Sta-b3, by using *C. gloeosporioides* specific CgInt primer and ITS4 universal primer, but not from isolates Cas-01 and Cas-03. The ITS1 and partial 5.8S rDNA sequences of *Colletotrichum* isolates Cas-01 and Cas-03 were amplified by using universal ITS1 and ITS2 primer pairs. The DNA sequences showed 99-100% identities to those of *Colletotrichum dematium* (Accession numbers: AB046608.1 \ AB042310.1 \ AB042311.1) deposited to NCBI GenBank database. Based on morphology, pathogenicity and molecular biological evidences, it was concluded that the disease on caspia plants was caused by *C. dematium* (Pers.: Fr.) Grove and *C. gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc. with the teleomorph *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk. Fourteen plant species including African marigold, caspia, cape leadwort, Chinese cabbage, *Chrysanthemum grinatum*, egg plant, garland chrysanthemum, hollyhock, lettuce, mango, pepper, sweet pepper, tomato, and transvaal daisy were inoculated with conidial suspension (10^5 conidia/ml) of *C. dematium* isolates Cas-01 and Cas-03 and *C. gloeosporioides* isolates Cas-06 and Sta-04, respectively, for evaluation of pathogenicity of the pathogens on different plants. The results showed that *C. dematium* isolates Cas-01 and Cas-03 infected caspia, *Chrysanthemum grinatum*, garland chrysanthemum, and hollyhock only under high temperature (28 °C) and high humidity (RH 100 % was prolonged over 7 days). On the other hand, *C. gloeosporioides* Cas-06 and Sta-04 could infect caspia, cape leadwort, *Chrysanthemum grinatum*, mango, and garland chrysanthemum under high temperature (28 °C) and high humidity (RH 100 % was only kept for one day).

Keywords: caspia, anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum dematium*.