

草莓新興病害－葉枯病病原鑑定及防治方法評估

鐘珮哲^{*1}、吳竑毅²、江詩筑¹、蔡季芸²

¹ 行政院農業委員會苗栗區農業改良場

² 國立臺灣大學植物病理與微生物學系

摘 要

草莓為一具有高經濟價值之作物，平均每分地產值約新台幣 30 萬元。近幾年來主要栽種品種由桃園 1 號（豐香）逐漸轉變為香水品種，雖然降低了炭疽病可能造成的危害，但亦促使新興病害 ” 葉枯病 ” 發生。葉枯病可危害草莓葉片、走蔓、根冠與果實，嚴重時造成 30% 植株死亡。因此本研究利用葉枯病菌之 ITS (internal transcribed spacer region)、 β -tubulin 2 (*TUB2*)、translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1 α*) 與 LSU (*large* subunit of the nrRNA region) 序列於 NCBI 資料庫進行比對，顯示皆與 *Neopestalotiopsis rosae* CBS101057 具有 100% 之相同度。進一步，藉由個別基因與 *Neopestalotiopsis* 屬之真菌進行類緣分析，顯示 *TEF* 與 *TUB2* 之單基因類緣樹圖譜具較高之解析度。在測試病原菌對藥劑敏感度方面，多種用於防治草莓炭疽病之殺菌劑皆具有較佳抑制葉枯病菌之菌絲生長效果，但部份 strobilurin 類之殺菌劑則效果較差。於草莓品種之抗病性檢測方面，顯示桃園 1 號（豐香）與苗栗 1 號（戀香）為抗葉枯病之品種，而目前主要種植的香水草莓為感病之品種。據此，未來除了使用對葉枯病菌具抑制力之殺菌劑來防治本病之外，加速培育具有抗性之品種亦為一經濟有效之方法。

關鍵詞：演化分析、藥劑測試、抗病育種

前 言

草莓是一種外型漂亮獨特，具有特殊風味與高營養價值之小漿果類作物，於全

*論文聯繫人

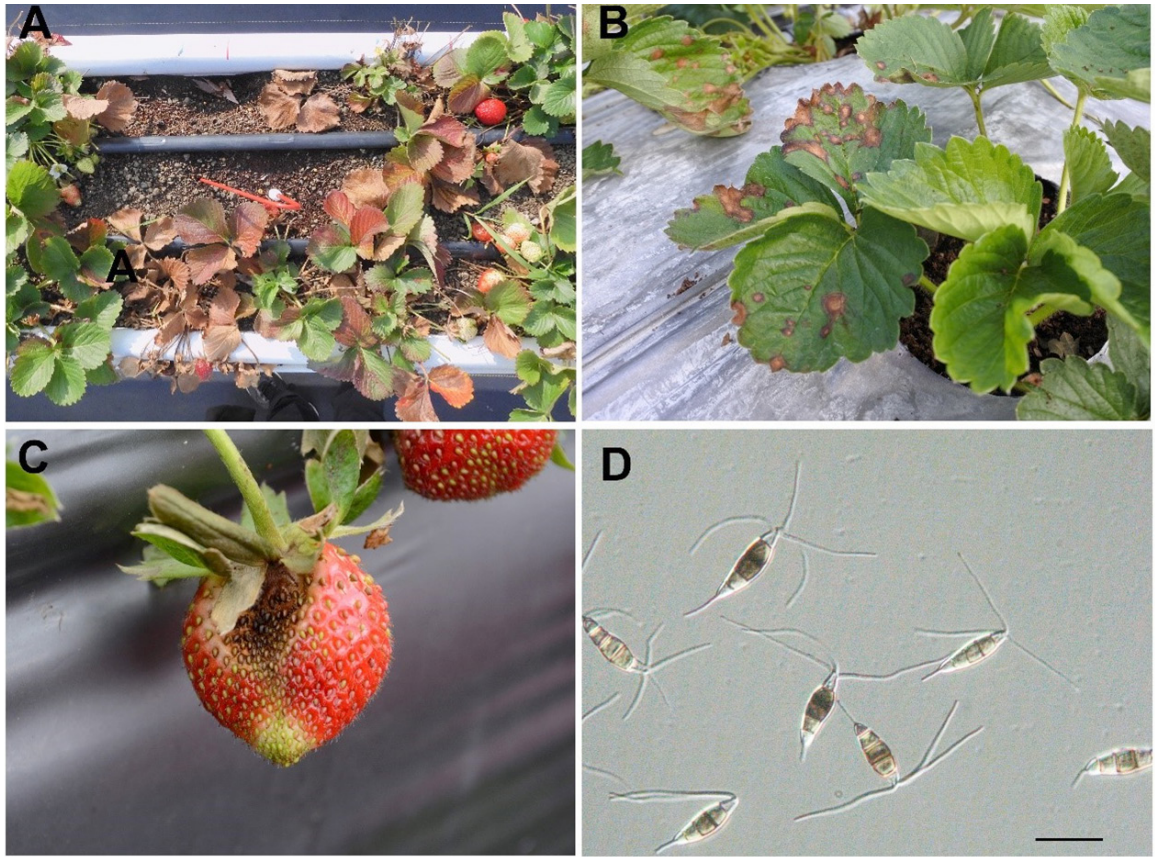
e-mail: peiche@mdais.gov.tw

世界廣受消費大眾的喜愛。在臺灣，草莓為一極具經濟價值之作物，全國栽種面積約 500 公頃，每分地平均產值約新台幣 30 萬元，年總產值超過 15~18 億元（108 年統計年報）。草莓主要栽種區域在苗栗縣，約佔全國栽種面積之九成，每年於初秋（9 月底至 10 月初）定植，並於 11 月底至 12 月初開始採收，產果期約於隔年 3 至 4 月結束（張等，2004）。

從 2011 年開始，草莓炭疽病的發生日益嚴重（鐘及彭，2013），導致已種植約 30 年的主要品種“桃園 1 號（豐香）”在育苗時期及定植初期死亡率偏高，缺株率可達 30~40%(Chung *et al.*, 2019)，使得苗栗地區栽種之草莓品種逐漸改為香水品種（鐘及吳，2020）。「香水」相對於「桃園 1 號」對炭疽病較具耐受性，植株較為直立挺拔，且第一期花較早開始，果實產量高，耐儲運，因此近 2~3 年內已成為主流品種。

然而，品種的改變雖然降低了炭疽病可能造成的損失，但亦促使新興病害“葉枯病”嚴重發生，該病害危害育苗時期與本田產果時期之草莓植株，感染葉片、走蔓、根冠與果實，嚴重時可造成 30% 植株死亡 (Wu *et al.*, 2021)。受感染葉片會出現圓形或橢圓形褐色輪紋病斑，病斑邊緣為較深之咖啡色或暗紫紅色，病斑中心可見黑色斑點（為分生孢子堆），嚴重時病斑會融合而呈大病斑（圖一）。冠部受害時，常見植株地上部葉面出現葉脈間轉變為紅褐色至紫褐色之病徵，其類似葉片晒傷之徵狀，並於葉背可見網格狀黑褐色凹陷之病徵，受感染之部份植株會出現矮化、新葉發展不良，走蔓、開花與產果減少之情況，嚴重時植株葉片大量枯萎死亡，於冠部縱剖面常可見褐色不規則大理石紋病斑。受感染之成熟果實呈現褐色凹陷之病徵（圖一），凹陷部位於濕度高時產生黑色點狀之分生孢子堆，最後果實腐爛。受感染之未成熟果實亦有類似病徵，並伴隨轉色不全，發育不良之徵狀。

草莓葉枯病於近十多年開始在全世界各地嚴重發生，其中包括了美國、巴西、墨西哥、烏拉圭、阿根廷、伊朗、埃及、泰國、義大利與西班牙等國家 (Ayoubi and Soleimani 2016; Baggio *et al.*, 2019; Baggio *et al.*, 2021; Chamorro *et al.*, 2016; Essa *et al.*, 2018; Gilardi *et al.*, 2019; Kummanid *et al.*, 2017; Machin *et al.*, 2019; Obregon *et al.*, 2018; Rebollar-Alviter *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2014)，其病原菌皆為近似 *Pestalotiopsis* 屬之病原菌所造成 (Maharachchikumbura *et al.*, 2014)。*Pestalotiopsis* 之近似屬於早期主要以孢子形態作為分類依據，而後因分子生物學之興起，以基因序列用於真菌之分類鑑定成為一更可靠之方法 (Maharachchikumbura *et al.*, 2014)。然而於 *Pestalotiopsis*



圖一、草莓葉枯病於田間所造成之病徵與病原菌分生孢子形態。(A) 葉枯病於田間危害嚴重時造成全株枯死。(B) 葉枯病於草莓葉片上所造成之病斑。(C) 葉枯病於草莓果實上所造成之病斑。(D) 葉枯病菌之分生孢子型態。

Fig. 1. Symptoms of strawberry leaf blight and conidia morphology of the causal agent. (A) Severe symptoms of leaf blight. (B) Symptoms on leaves. (C) Symptoms on the fruit. (D) Morphology of conidia.

之近似屬中以 ITS 分類只能將其分為三個主要類群（目前已知為 *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* 與 *Pseudopestalotiopsis* 三個屬），其內之種仍無法鑑別 (Liu *et al.*, 2010)，於是利用多基因類緣分析便成為目前 *Pestalotiopsis* 之近似屬的主要分類方法 (Maharachchikumbura *et al.*, 2014)。於臺灣，這幾年因品種更迭亦開始發生葉枯病 (Wu *et al.*, 2021)，因此本研究便針對草莓葉枯病進行單基因之演化分析，比較出解析度較高之基因，可作為快速鑑定之參考，並進行初步之藥劑測試與接種實驗，提出適

合用於防治葉枯病之藥劑以及對葉枯病具有抗性之品種，以作為擬定防治策略之參考依據。

材料及方法

一、草莓葉枯病病原菌分離、純化與初步鑑定

於田間採集帶有葉枯病病斑之植株，切取大小約 0.2cm² 之病健部進行組織表面消毒，先將組織浸於 0.5%(v/v) 之次氯酸鈉 1 分鐘，再以無菌水浸洗三次後，置於無菌之擦手紙吸乾多餘水分後，將組織置於 1.5% water agar (瓊脂) 上，於 25° C 培養，待菌絲由組織邊緣長出後，以單菌絲分離技術將菌絲切下置於 PDA (potato dextrose agar, 馬鈴薯葡萄糖瓊脂) 培養基平板上 (於 90 mm Petri dish, Alpha Plus)，於 25° C，12 小時光照環境下進行培養。

成功分離之菌株 (ML1664、ML2147 及 ML2411) 先以傳統型態進行鑑定，主要以菌落型態、孢子形狀與大小初步辨別是否為葉枯病菌，而後進行分子序列比對分析。以在 PDA 培養基上生長約 7 天之葉枯病菌為樣本抽取 DNA (Deoxyribonucleic acid, 去氧核糖核酸)，將菌絲以刀片刮下後置於預冷之研鉢內，並倒入適量液態氮，快速以預冷之研杵將菌絲磨成細粉狀，而後依照 Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System (VIOGENE) 內說明之步驟，進行 DNA 萃取與純化，純化後之 DNA 以微量分光光度計 (NanoDrop) 測量 DNA 質與量，再將 DNA 儲存於 -20° C 備用。

初步以 ITS1 與 ITS4 引子對進行分子鑑定，並以不同分離株之 DNA 作為模板進行 PCR 反應，annealing 溫度為 60° C，共 30 個循環，PCR 產物在經過雙向定序後 (Tri-I Biotech)，將原始序列之正負股進行組裝 (assemble)，並將組裝之序列於 NCBI 之 nr 資料庫以 BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) 進行比對，依據比對結果，判斷分離菌株之屬名 (genus name)。

二、草莓葉枯病之演化分析

利用目前主要用於葉枯病菌之基因或區域，包含：ITS (internal transcribed spacer region)、 β -tubulin 2 (*TUB2*)、translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1 α*) 與 LSU (*large subunit of the nrRNA region*)，經由 PCR 增幅後進行雙向定序，同一族群之序列經

由 multiple sequence alignment 後，使用 RAxML 軟體 (Stamatakis 2014) 進行最大似然法則分析 (Maximum likelihood)，條件設定為 GTR-GAMMA 模式並進行 1000 次重複 (Bootstrap)。

三、葉枯病菌對藥劑之敏感度測試

供試菌株 (ML2147) 由 4°C 或 -80°C 冰箱內之存菌管活化後，接種至 PDA 培養基平板上，於 25°C，12 小時光照之條件下培養，待其菌落生長至約 5~7 公分，以打孔器將菌落外圍菌絲塊 (5mm) 切下，置於含有不同藥劑濃度之 25 mL PDA 培養基平板中，在 25°C 黑暗條件下進行培養，於接種後第 6~7 天進行菌落大小之測量與照相。

含市售農藥之培養基配製時，先將高溫高壓滅菌之 PDA 培養基，冷卻至約 40~45°C 後，再加入供試藥劑，快速混合均勻後倒入培養皿中，配製含農藥之 PDA 培養基與接種菌絲塊皆於當日完成。測試之濃度範圍為 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ~1000 $\mu\text{g/mL}$ (測試最終濃度為 1000 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 與 0.01 $\mu\text{g/mL}$)。進行試驗之藥劑包含腐絕快得寧 (thiabendazole + oxine-copper) 53% WP (光華化學股份有限公司)、待克利 (difenoconazole) 10% WG (台灣先正達股份有限公司)、亞托敏 (azoxystrobin) 50% WG (興農股份有限公司)、賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) 62.5% WG (台灣先正達股份有限公司)、百克敏 (pyraclostrobin) 23.6% EC (台灣巴斯夫股份有限公司)、三氟敏 (trifloxystrobin) 50% WG (台灣拜耳股份有限公司)、得克利 (tebuconazole) 25.9% EW (台灣拜耳股份有限公司)、腐絕 (thiabendazole) 41.8% SC (立農化學股份有限公司)、依普同 (iprodione) 50% WP (台灣富美實有限公司) 與普克利 (propiconazole) 25% EC (台灣先正達股份有限公司)。

藥劑之半最大有效濃度 EC_{50} (Half maximal effective concentration) 為使用 SPSS18 軟體進行計算，先將測試藥劑濃度換算為有效濃度後，以對數 (10 為基底) 進行轉換，再以 logit 進行回歸分析並估算其 EC_{50} 數值。

四、草莓品種對葉枯病之抗感性測定

為測試不同草莓品種對葉枯病菌的抗感病性，使用有傷口之離葉接種方式進行

分析。所使用之草莓品種包含桃園 1 號（豐香），香水與苗栗 1 號（戀香）。葉枯病菌孢子自 25°C，1/4 PDA 培養基培養約 2~3 週之菌落上，以含有 0.05% docusate 之無菌水洗下，再以血球計數器計算孢子濃度並調整至 1×10^6 spores/mL。草莓葉片之接種位置先以 23G 針頭進行葉片穿刺，而後於每一接種點滴加 10 μ L 孢子懸浮液，對照組僅滴加含有 0.05% docusate 之無菌水。待孢子懸浮液稍微風乾後，將葉片置於底部有水之密封透明保鮮盒內（相對濕度 >90%），再移入 25°C，12 小時光照循環之生長箱內。每一菌株在不同處理下至少接種四片葉子（來自不同植株），每片葉子有三片小葉，每一小葉以中間葉脈作為分界，一側接種孢子懸浮液，一側為對照組。於接種後 7 天與 14 天進行觀察與紀錄病斑大小。病斑大小以直徑計算，若病斑呈現橢圓形或長條狀，以長與寬的合取平均值作為病斑大小數值。

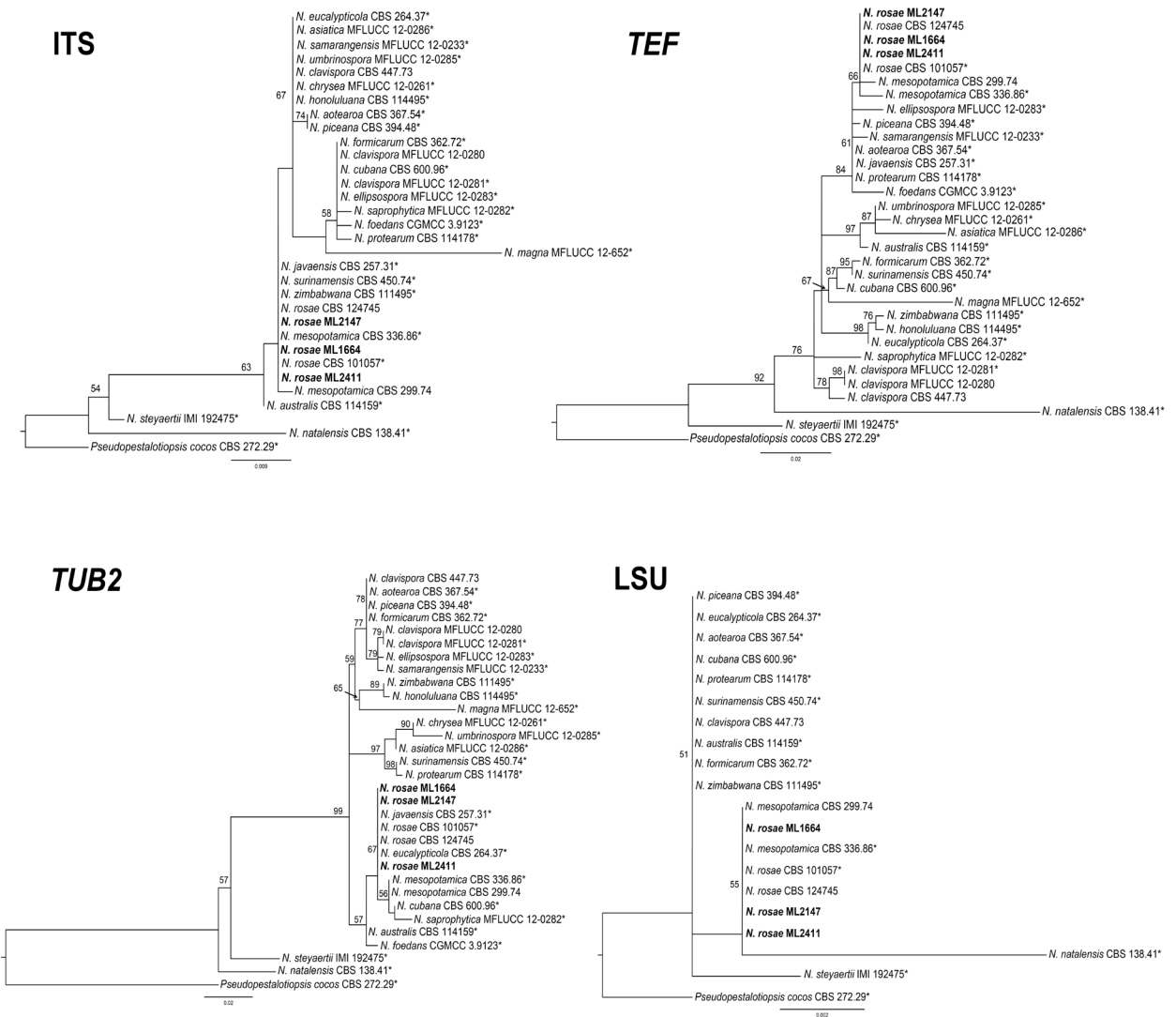
每次接種試驗每個品種共 4 片葉子，共三次獨立重複實驗。結果數據以變異數分析（Analysis of variance）進行分析，顯著差異性以 Tukey's range test 於 $P < 0.05$ ($n = 12$) 進行分析。

結果及討論

一、草莓葉枯病之病原菌分離、序列比對與演化分析

由葉片或冠部病斑分離之葉枯病菌，於 PDA 培養基上生長之菌落為白色，多氣生菌絲，並且產生分生孢子盤 (acervuli)，其上產生大量之黑色分生孢子 (conidia)。分生孢子為紡錘形至橢圓形，具有 5 個細胞，底部有 1 根附屬絲，頂部則有 3~4 根附屬絲（圖一），與 *Pestalotiopsis* 類真菌之特徵相似。而後將葉枯病菌之 ITS、*TUB2*、*TEF-1 α* 與 LSU 序列於 NCBI 上之資料庫進行序列比對，結果顯示四個基因序列皆與 *Neopestalotiopsis rosae* CBS 101057 之序列相符合（相同度 identity 為 100%），並且只有 *N. rosae* 同時出現在四個基因序列的比對結果當中（表一），代表該菌最接近 *N. rosae*，此比對結果亦與利用多基因串連之類緣分析結果相符合 (Wu *et al.*, 2021)。而為探究是否單一基因序列可以作為辨別葉枯病菌之快速方法，進一步利用單一基因進行演化分析，結果顯示 ITS 與 LSU 之單基因演化分析仍無法將 *N. rosae* 與 *N. mesopotamica* 等其他種分開，而 *TUB2* 基因則可以將 *N. rosae* 與 *N. mesopotamica* 分開，但無法與 *N. javaensis* 或 *N. eucalypticola* 分開，而 *TEF* 則可將大

部分的種分開，且能互補 *TUB2* 無法分開之種（圖二），此結果顯示目前常用於鑑定之 ITS 基因序列已經無法分辨 *N. rosae* 與其他許多種之差別，較佳之選擇為搭配 *TEF* 與 *TUB2* 之序列進行分析，將可較快速的初步判定其是否為 *N. rosae*，但若要精確鑑定未知的種類，則仍需結合不同基因序列之特徵來進行較為準確之分析。



圖二、草莓葉枯病菌之不同單基因演化分析。

Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic trees based on single ITS, *TEF*, *TUB2* and LSU genes of *Neopestalotiopsis* spp.

表一、葉枯病菌 (ML2147) 基因序列於 NCBI 資料庫比對之結果

Table 1. Result of leaf blight genes sequences blast against the NCBI database

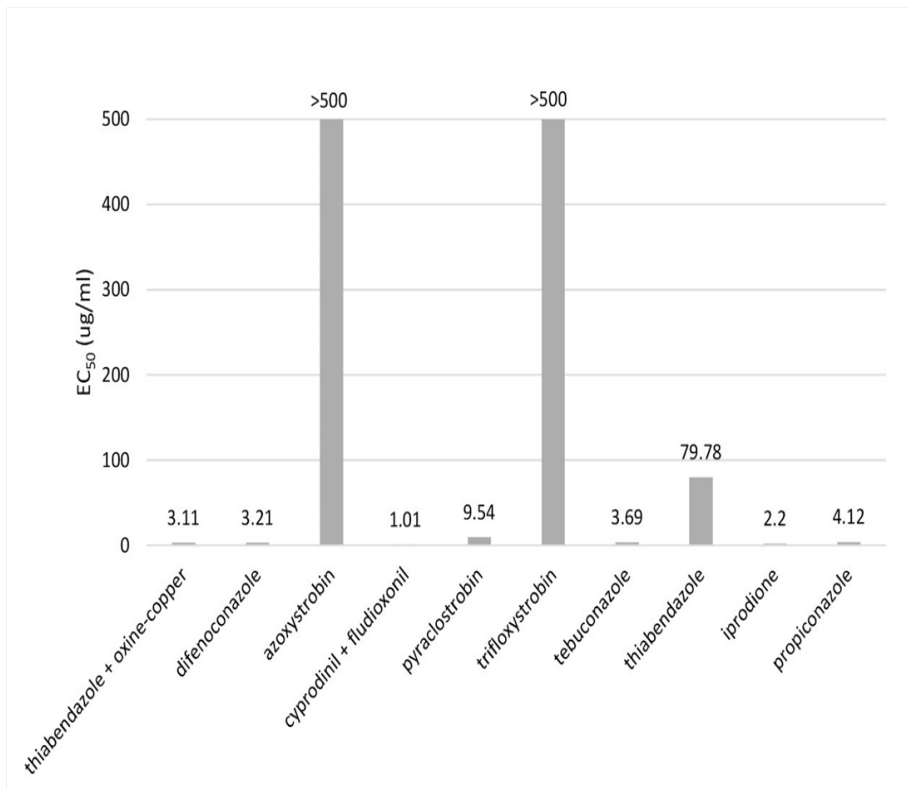
gene/region	species name	identity	e-value	coverage
ITS	<i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 101057	100.00%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 336.86	99.79%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis acrostichi</i> MFLUCC 17-1754	99.79%	0	100%
LSU	<i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 101057	100.00%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 336.86	100.00%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i> CBS 367.54	99.88%	0	100%
TEF	<i>Neopestalotiopsis rosae</i> strain CBS 101057	100.00%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis petila</i> isolate MFLUCC 17-1737	99.79%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i> strain CBS 367.54	99.79%	0	100%
TUB2	<i>Neopestalotiopsis rosae</i> strain CBS 101057	100.00%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis javaensis</i> strain CBS 257.31	100.00%	0	100%
	<i>Neopestalotiopsis eucalypticola</i> strain CBS 264.37	100.00%	0	100%

二、葉枯病菌對藥劑之敏感度測試

依據供試菌株之菌落生長受抑制情形，推算該藥劑之半最大有效濃度 (EC_{50})，結果如圖三所示，不同藥劑中，大略以 EC_{50} 數值之範圍作為區間，約可將所測試之藥劑分為三群：

1. 對菌株菌絲生長具高抑制之藥劑，其 EC_{50} 濃度介於 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 之間。包含腐絕快得寧、待克利、賽普護汰寧、百克敏、得克利、依普同與普克利。
2. 對菌株菌絲生長具中度抑制之藥劑，其 EC_{50} 濃度介於 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 之間。包含腐絕。
3. 對菌株菌絲生長具低抑制之藥劑，其 EC_{50} 濃度大於 500 $\mu\text{g/mL}$ 。包含亞托敏與三氟敏。

受測試之藥劑當中，除得克利之外，腐絕快得寧、待克利、賽普護汰寧、百克敏與普克利皆為目前炭疽病菌之推薦用藥，因此這些藥劑可以同時用於防治草莓葉枯病與炭疽病。而對菌株菌絲生長較不具抑制力之藥劑包括了亞托敏與三氟敏，皆為 strobilurin 類之殺菌劑，顯示葉枯病菌對該類農藥可能具有某種程度之抗性，因此使用其他同為 strobilurin 類之藥劑（如百克敏）防治葉枯病時，需注意預防抗藥性之發生，應使用混合藥劑或與其他藥劑輪替使用。

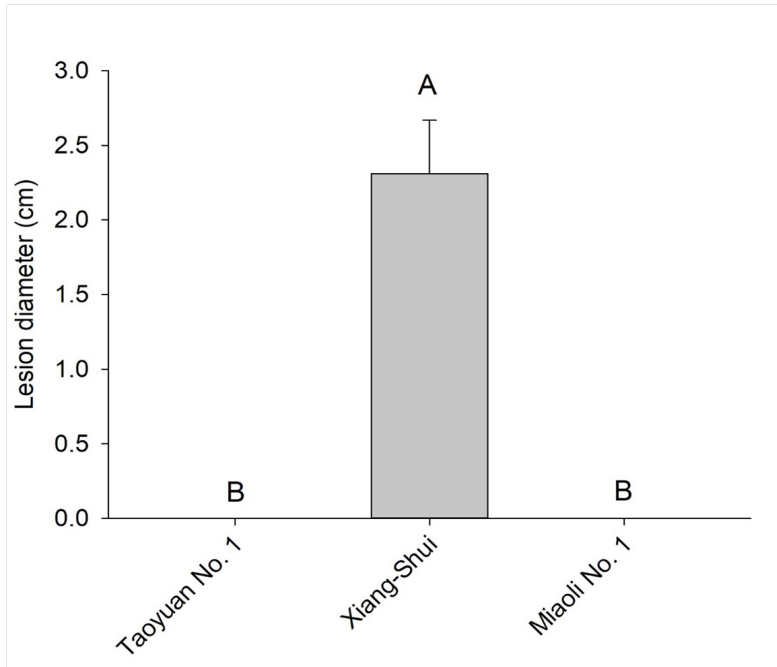


圖三、不同藥劑對草莓葉枯病菌之半最大有效濃度 (EC₅₀)。

Fig. 3. Half-maximal inhibitory concentration (EC₅₀) of fungicides to the pathogen of strawberry leaf blight based on the inhibition rate of mycelial growth.

三、草莓品種之抗感病性測定

以不同草莓品種之葉片進行離葉接種感染之實驗結果顯示，香水品種對於葉枯病為感病，但桃園 1 號（豐香）與苗栗 1 號（戀香）則對葉枯病具有抗性（圖四），而其中苗栗 1 號的親本包含了桃園 1 號，因此這代表了苗栗 1 號與桃園 1 號的草莓



圖四、不同草莓品種對葉枯病之抗感性。

Fig. 4. The susceptibility of different strawberry cultivars to leaf blight.

品種當中帶有葉枯病的抗性因子，且該因子是可以藉由有性繁殖將其抗性遺傳給後代，因此推測可能帶有抗葉枯病之抗性基因存在，值得進一步研究分析。

此外，針對草莓葉枯病菌寄主範圍探討，美國佛羅里達大學研究團隊發現鄰近草莓田區之杜鵑屬植物 (*Rhododendron* sp.)，亦呈現葉枯病菌所致之相似病徵，有趣的是分析其病原菌後結果顯示該菌與近年在佛州造成嚴重葉枯病之 *Neopestalotiopsis* spp. 非常相似（相較於 *N. rosae* 致病力更強之新病菌）(Baggio *et al.*, 2021)。而造成蓮霧果腐病的 *Neopestalotiopsis* spp. 在接種濃度 10^4 、 10^5 conidia/ml 的情況下，皆不易感染香水葉片，當提高接種濃度至 10^6 conidia/ml 則可造成病徵 (徐等, 2020)。對於此病害於國內草莓田間的寄主範圍仍待進一步調查及測試，以確認田間其他可能傳播來源。

綜合上述結果，依照目前草莓栽種的情況，種植香水品種時，應特別留意葉枯病之發生，且建議施用對葉枯病較敏感之藥劑，亦可同時用於防治炭疽病，而種植桃園 1 號與苗栗 1 號時，因其對葉枯病具有抗性，因此不需特別使用藥劑防治葉枯

病，但仍需留意炭疽病之發生。在後續的新品種開發當中，可利用桃園 1 號或苗栗 1 號作為親本進行育種，並將抗葉枯病之特性加入篩選的條件之一，且在長期的研究方向中，投入抗性基因與機制之研究，以利未來利用分子標誌輔助方式加速抗病育種。

誌 謝

試驗期間承蒙本場陳碧君、謝淑園及涂鳳清小姐協助田間樣本採集及處理，謹此一併誌謝。

引用文獻

- 徐巧芳、鄭婷文、陳冠勳、連怡婷、林政谷、黃卓君、夏凱、王惠亮。2020。由 *Neopestalotiopsis rosae* 引起之臺灣草莓新病害與藥劑篩選。植物醫學 62(4)：39-47。
- 張廣森、吳添益、彭淑貞。2004。莓栽培管理。行政院農業委員會苗栗區農業改良場。p. 39。
- 鐘珮哲、彭淑貞。2013。草莓育苗期重要病害管理。苗栗區農業專訊 61：9-10。
- 鐘珮哲、吳竝毅。2020。草莓育苗病害管理策略。苗栗區農業專訊 89：9-11。
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410.
- Ayoubi, N., and M. J. Soleimani. 2016. Strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp nov., and *N. mesopotamica*. Current Microbiology 72:329-336.
- Baggio, J., B. B. Forcelini, R. G. Ruschel, J. C. Mertely, and N. A. Peres. 2019. Characterization, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Pestalotiopsis* spp. on strawberry in the US. Phytopathology 109:109.
- Baggio, J. S., B. B. Forcelini, N. Y. Wang, R. G. Ruschel, J. Mertely, and N. A. Peres. 2021. Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. Plant Disease 105(2):305-315.
- Chamorro, M., A. Aguado, and B. De los Santos. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. Plant Disease 100:1495-1495.

- Chung, P. C., H. Y. Wu, H. A. Ariyawansa, S. S. Tzean, and C. L. Chung. 2019. First report of anthracnose crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. *Plant Disease* 103:1775.
- Essa, T. M., S. Kamel, A. Ismail, and S. El Ganainy. 2018. Characterization and chemical control of *Neopestalotiopsis rosae* the causal agent of strawberry root and crown rot in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology* 46:1-19.
- Gilardi, G., F. Bergeretti, M. L. Gullino, and A. Garibaldi. 2019. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry in Italy. *Plant Disease* 103:2959.
- Kummanid, J., K. Akimitsu, and S. Nalumpang. 2017. Mutations of the beta-tubulin gene fragments from carbendazim-resistant isolates of *Pestalotiopsis* sp. causing strawberry leaf blight in Chiang Mai, Thailand. *Journal of Phytopathology* 165:515-521.
- Liu, A. R., S. C. Chen, S. Y. Wu, T. Xu, L. D. Guo, R. Jeewon, and J. G. Wei. 2010. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:528-535.
- Machin, A., P. Gonzalez, E. Vicente, M. Sanchez, C. Estelda, J. Ghelfi, and E. Silvera-Perez. 2019. First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on strawberry in Uruguay. *Plant Disease* 103:2946.
- Maharachchikumbura, S. S. N., K. D. Hyde, J. Z. Groenewald, J. Xu, and P. W. Crous. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*:121-186.
- Obregon, V. G., N. G. Meneguzzi, J. M. Ibanez, T. E. Lattar, and D. S. Kirschbaum. 2018. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. *Plant Disease* 102:1856.
- Rebollar-Alviter, A., H. V. Silva-Rojas, D. Fuentes-Aragon, U. Acosta-Gonzalez, M. Martinez-Ruiz, and B. E. Parra-Robles. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease* 104:2054-2059.
- Rodrigues, F. A., I. T. Silva, M. F. Antunes Cruz, and V. Carré-Missio. 2014. The Infection Process of *Pestalotiopsis longisetula* leaf spot on strawberry leaves. *Journal of Phytopathology* 162:690-692.

- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.
- Wu, H. Y., C. Y. Tsai, Y. M. Wu, H. A. Ariyawansa, C. L. Chung, and P. C. Chung. 2021. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Disease* 105:487.

Emerging strawberry disease-identification of leaf blight pathogen and evaluation of control methods

Pei-Che Chung^{*1}, Hung-Yi Wu², Shih-Jhu Jiang¹, Chi-Yun Tsai²

¹ Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan

² Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University.

ABSTRACT

Strawberry is a high economic value crop with 3,000,000 NTD per hectare in average value. In recent years, the major strawberry cultivar has changed from ‘Taoyuan No. 1’ to ‘Xiang-Shui’. Although this cultivar is more tolerance to anthracnose disease, the emerging disease "leaf blight" become more severe. It could infect strawberry leaves, runners, crowns and fruits, and caused up to 30% plant death in severe cases. In this study, we used the sequences of ITS (internal transcribed spacer region), β -tubulin 2 (*TUB2*), translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1 α*) and LSU (*large* subunit of the nrRNA region) form the pathogen of leaf blight to blast against NCBI database. All genes have 100% identity to *Neopestalotiopsis rosae* CBS101057. In addition, based on phylogenetic analysis of single genes, the *TEF* and *TUB2* genes have higher resolution in the phylogenetic tree. In the part of testing fungicide sensitivity, leaf blight pathogen also have high sensitivity to several fungicides used for control strawberry anthracnose, but some strobilurin fungicides have lower sensitivity. In the part of inoculation result, ‘Taoyuan No. 1’ and ‘Miaoli No. 1’ are resistant to the leaf blight disease, but the major strawberry cultivar ‘Xiang-Shui’ is susceptible. Therefore, in addition to use higher sensitive fungicides, breeding resistant cultivars is also an economical and effective method to control this disease.

Keywords: phylogenetic analysis、fungicide test、breeding resistant cultivars

*Corresponding author email: peiche@mdais.gov.tw