

# 由 *Corynespora cassiicola* 引起之羅勒枝枯病

湯佳蓉<sup>1\*</sup> 蔡叔芬<sup>2</sup> 陳思妤<sup>3</sup> 馮繹升<sup>2</sup>

## 摘要

湯佳蓉、蔡叔芬、陳思妤、馮繹升。2021。由 *Corynespora cassiicola* 引起之羅勒枝枯病。台灣農業研究 70(3):196–205。

羅勒枝枯病 (basil dieback) 為羅勒栽培時期的真菌病害之一，於屏東縣萬丹鄉發現羅勒植株的枝條於採收後，從枝條傷口處開始乾枯，呈現黑褐色壞疽狀病徵，逐漸蔓延至全株、死亡。從不同羅勒栽培區，相同病徵的罹病組織中分離出同一種真菌。室溫下，於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 培養 10 d 後，呈現邊緣為白色至淺灰色，中央為深橄欖綠色的菌落。根據此病原菌之型態特徵，與核醣體核酸基因 (rDNA) 的內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 序列鑑定結果，將該病原菌鑑定為 *Corynespora cassiicola*，並以柯霍氏法則證明，此真菌為造成羅勒枝枯病之病原菌。菌絲生長溫度範圍為 15–35°C，孢子發芽溫度範圍為 10–35°C。在 25°C 下，維持連續 48 h 高濕度環境中，羅勒枝枯病之罹病率可達 75%，為此病害最適發病條件。評估植物保護資訊系統中，羅勒葉斑病 (*Alternaria alternata* 引起) 之推薦用藥，四氯異苯腈、保粒黴素 (甲)、依普同與克收欣，於濃度 1、10 與 100 ppm，對羅勒枝枯病菌菌株 CC-2、CC-3 在 PDA 上菌絲生長之影響。結果發現，依普同對 CC-2 與 CC-3 均有最佳的菌絲生長抑制率，分別為 64.4–77.0% 與 65.0–75.4%；克收欣次之，分別為 60.7–66.8% 與 58.8–63.6%，而四氯異苯腈與保粒黴素 (甲) 則介於 40–50%。故依羅勒葉斑病 (*A. alternata*, leaf spot) 推薦藥劑之稀釋倍數使用，可同時防治羅勒枝枯病發生。

**關鍵詞：**羅勒、枝枯病、鐵刀木棒狀桿菌。

## 前言

羅勒 (*Ocimum basilicum*) 俗稱九層塔，屬於唇形目 (Lamiales)、唇形科 (Lamiaceae)、羅勒屬 (*Ocimum*) 一年生或多年生香草植物，廣泛種植於溫帶、亞熱帶與熱帶地區 (Bilal *et al.* 2012)。羅勒原產於印度及埃及，引進台灣後多應用於烹飪、藥用、提煉精油及景觀園藝作物。於烹飪時多使用嫩莖與葉片進行調味，其種子與葉片則可入藥，應用範圍廣泛。羅勒品種可分為甜羅勒 (sweet basil)、皺葉羅勒 (lettuce-leafed basil)、紫紅羅勒 (dark opal basil)、檸檬羅勒 (lemon basil)、肉桂羅勒 (cinnamon basil)、聖羅勒 (holy basil)、希臘羅勒 (greek

basil) 及灌木羅勒 (bush basil) (Paton & Putievsky 1996)。在台灣，灌木羅勒又稱為九層塔，有 2 個主要栽培品種，分為綠莖種與紫莖種，分別稱作白骨九層塔與紅骨九層塔、紫梗羅勒。由行政院農業委員會農業統計資料 (<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>) 指出，2019 年特作作物類之羅勒栽培面積為 147.53 ha，主要栽培區於雲林縣與屏東縣，分別有 69.26 ha 與 31.96 ha。

Tzeng *et al.* (2019) 指出，羅勒正式記載的病害有葉枯病 [*Alternaria alternata* (Franch) Keissl., *Coleosporium perillae* Syd. 引起]、萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *basilica* Tamietti & Matta 引起)、露菌病 [*Peronospora belbah-*

投稿日期：2021 年 1 月 27 日；接受日期：2021 年 4 月 21 日。

\* 通訊作者：jrtang@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系技工。台灣 高雄市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系計畫助理。台灣 高雄市。

rii Thines, *Pseudocercospora ocimicola* (Petr. & Cif.) Deighton 引起)、菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 引起]、細菌性葉斑病 [*Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 引起]、甜菜西方黃化病毒 [*Beet western yellow virus* (BWYV) 引起] 及蠶豆萎凋病毒 (*Broad bean wilt virus* 引起)。在屏東縣萬丹鄉羅勒栽培田區，於 2019 年 9 月份至 2020 年 3 月份，陸續發現有部分羅勒枝條呈現黑褐色壞疽斑，嚴重者全株呈焦枯狀且停止生長，於初步診斷病兆時，發現有 *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei 之分生孢子與產孢梗。Garibaldi *et al.* (2007) 與 Pereira *et al.* (2019) 均指出 *C. cassiicola* 可造成甜羅勒葉斑病 (leaf spot)。在台灣，尚無由 *C. cassiicola* 引起之羅勒枝枯病相關正式報告，因此本研究針對羅勒枝枯病之病徵、病原真菌之形態特徵、分子生物鑑定、病原菌最適發病溫度及病原菌對藥劑感受性進行探討，期望對本病害之診斷鑑定與病害防治有所助益。

## 材料與方法

### 病原菌分離與保存

自屏東縣羅勒栽培區採集罹患羅勒枝枯病的植物組織樣本，於實驗室進行組織表面消毒。消毒方式為：在組織表面噴灑 75% (v/v) 酒精，待組織表面乾燥後，使用滅菌過的解剖刀切取病、健部相鄰的植物組織，於 0.1% (v/v) 次氯酸鈉水溶液中漂洗 90 s，並以無菌水漂洗 2 次。以滅菌過的擦手紙，吸乾羅勒組織表面多餘的水分後，置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上分離病原菌。於室溫下 5 d 後，切取菌絲尖端移置馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar; PDA)，待其產孢後進行單孢培養，並將其保存於砂管 (10% sand + 1% agar) 中於室溫下保存備用。本研究使用供試菌株來源 CC-2 與 CC-3 分別由屏東縣枋寮鄉與屏東縣萬丹鄉羅勒罹病植株上分離。

### 病原菌形態與分子生物鑑定

以無菌刮鬚刀片進行罹病組織縱向切片，用以觀察病原菌之產孢梗與其分生孢子。另外，

將病原菌單孢培養於 PDA 平板上，於 25°C 下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 7 d 後觀察菌落形態。以光學顯微鏡 (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) 觀察分生孢子型態，並以 Metrics 軟體 (TUCSEN, Fuzhou, China) 量測 50 個分生孢子之長度與寬度，參考 Mmbaga *et al.* (2015) 與 Pereira *et al.* (2019) 敘述分生孢子梗、分生孢子之型態與特徵，鑑定田間分離之菌株。此外，分子生物鑑定則是收集單孢培養於 PDA 斜面的菌絲，參考 DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 建議方式抽取 DNA，以 PCR Master Mix II (GeneMark, Taipei, Taiwan) 進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，使用引子對：CoryITS-fl (5'-GGCCTCGCCCCCTTCGAGAT-3')，CoryITS-r1 (5'-CCGACCCGCAGCCACTTCAG-3') (Mmbaga *et al.* 2015)，增幅核糖體核酸基因 (rDNA) 的內轉錄區 internal transcribed spacer (ITS) 片段。PCR 產物委託源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 進行定序。CC-2 與 CC-3 菌株之 ITS 序列定序結果與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 之資料庫進行比對分析。

### 羅勒枝枯病分離株之病原性測定

將自羅勒枝枯病分離菌株 CC-2，CC-3 單孢培養於 PDA 平板上，於 25°C 下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 28 d 後，以無菌水洗下分生孢子，製成孢子懸浮液 ( $3 \times 10^5$  spores mL<sup>-1</sup>)，對具有 6 片真葉之羅勒植株，OT-42 (紫莖種) 與 OT-43 (綠莖種) 進行接種。接種方法則模擬田間採收羅勒的方式，以 75% 酒精消毒過的剪刀採收羅勒植株嫩梢後，再以塑膠噴瓶噴灑 3 mL 羅勒枝枯病菌的孢子懸浮液/棵於切口位置，待乾燥後置入塑膠袋於室溫下保濕 2 d，每處理 4 重複，以無菌水作為對照組。於接種後逐週觀察並記錄病徵。

### 溫度對羅勒枝枯病菌菌絲生長與分生孢子發芽之影響

菌絲生長試驗：將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 以單孢培養於 PDA 平板上，於 25°C 下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 14 d 後，以火

焰消毒過的打孔器 (直徑 0.7 cm) 切取菌絲塊並置於 PDA 平板中央。分別置於 5、10、15、20、25、30 及 35°C 之生長箱中 (12 h 光照、12 h 黑暗)，於培養後第 3、6、10 天測量 CC-2 與 CC-3 菌落直徑，每個處理 3 重複，試驗重複 2 次。

分生孢子發芽試驗：以上述相同的培養條件，將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 培養 28 d，以無菌水洗下 PDA 平板上形成的分生孢子，製成孢子懸浮液 ( $5 \times 10^4$  spores mL<sup>-1</sup>)。取出 10 μL 孢子懸浮液滴在滅菌過的載玻片上，再將載玻片保濕於滅菌過的玻璃培養皿中，分別置於 5、10、15、20、25、30 及 35°C 之生長箱中。於 15 h 後取出於光學顯微鏡下觀察分孢子發芽情形，每個處理 3 重複，試驗重複 2 次。

### 溫度對羅勒枝枯病發生之影響

將羅勒枝枯病菌 CC-3 以上述接種方式處理羅勒 OT-42 品系植株，於接種後分別置於 20、25 及 30°C 之生長箱中 (12 h 光照、12 h 黑暗)，待接種 2 d 後拆套袋，以無菌水作為對照組，每處理 3 重複。於接種後每週觀察並記錄病害發展之嚴重度。個別植株的罹病指數 (disease index) 分為 0–3 級：0 級為健康；1 級為植株具有 1–30% 罹病組織；2 級為植株具有 31–60% 罹病組織；3 級為植株具有 60% 以上罹病組織或植株死亡。依下列公式計算出罹病度：

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{n_0 \times 0 + n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3}{N \times 3} \times 100$$

$n_i$  為  $i$  級棵數， $N$  為總棵數，本試驗重複 2 次。

### 室內測試藥劑對羅勒枝枯病菌菌絲生長之影響

植物保護資訊系統中，推薦防治小葉菜類葉斑病之殺菌劑如下所述：75% 四氫異苯腈可濕性粉劑 700×、10% 保粒黴素 (甲) 可濕性粉劑 1,000×、50% 依普同可濕性粉劑 1,000× 及 44.2% 克收欣水懸劑 2,500×。將上述藥劑以

1、10 及 100 μg mL<sup>-1</sup> 的濃度，倒入滅菌後溫度降至 50–60°C 的 PDA 中搖晃均勻，製成平板。將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 以單孢培養於 PDA 平板上，於 25°C 下 (12 h 光照、12 h 黑暗) 培養 14 d 後，以火焰消毒過的打孔器 (直徑 0.7 cm) 切取菌絲塊後，置於含有藥劑的 PDA 平板中央與沒有藥劑的 PDA 平板中央 (對照組)。培養於 25°C 之生長箱中 (12 h 光照、12 h 黑暗)，於培養後第 3、6、10 天測量 CC-2 與 CC-3 菌落直徑，依下列公式計算出菌絲生長抑制率：

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Diameter of CK} - \text{Diameter of treatment}}{\text{Diameter of CK}} \times 100$$

每個處理 4 重複，試驗重複 2 次。

### 統計分析

各項處理之試驗結果資料利用 IBM SPSS Statistics 20.0 版統計分析軟體，先進行單因子獨立變異數分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以 Tukey's honestly significant difference (HSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

## 結果

### 羅勒枝枯病之病徵

於屏東市萬丹鄉與路竹鄉的羅勒栽培區，農民以剪刀或採茶機採收羅勒嫩梢與葉片。在採收數日後具有傷口的羅勒枝條呈現黑褐色枯枝病徵 (dieback)。發病初期由傷口處開始失水乾枯，莖部組織逐漸形成黑褐色縊縮狀病斑 (圖 1A)。隨著病程發展，壞疽狀病徵往下蔓延。於發病後期，全株乾枯死亡。於 2019–2020 年高屏地區冬季的羅勒栽培期，進行田間調查與罹病樣本採集，於露天栽培區之分離率為 27%，溫室栽培區之分離率為 90%。

### 羅勒枝枯病菌之形態與分子生物鑑定

從田間採集之罹病樣本，經由植物組織切片後，以光學顯微鏡觀察。於罹病組織周

圍發現羅勒枝枯病菌的分生孢子與產孢梗(圖 1B)。分生孢子的型態為倒棍棒狀或梭形，無色或淡褐色，一端具有明顯突出的深褐色脫落疤痕(basal scar)，具 3–11 個隔膜，散布於分生孢子梗周圍。分生孢子梗(conidiophore)為褐色、略為彎曲狀，單一生長無分叉，基部膨大呈球狀，具 5–10 個隔膜。田間採集的罹病樣本經組織分離後，於 PDA 平板上培養 7 d，觀察其菌落型態。羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 之菌落邊緣為白色至淺灰色，中央為深橄欖綠色(圖 1C)。使用火焰滅菌過的移植針，挑取菌株 CC-2 的菌絲與分生孢子鏡檢，測量菌株 CC-2 分生孢子的平均長度與寬度為 34–265  $\mu\text{m}$   $\times$  10–15  $\mu\text{m}$ ，分生孢子梗為 155–603  $\mu\text{m}$   $\times$  5–7  $\mu\text{m}$ 。分生孢子以串生的方式從分生孢子梗產孢，分生孢子於串生時，孢子的尾部與另一個孢子的頂端以泡狀構造(bulbous swollen tips)連接(圖 1D)。以分子生物學鑑定羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3，將上述菌株的 ITS 序列與 NCBI 基因資料庫進行比對。結果顯示，菌株 CC-2 與 CC-3 與 *C. cassicola* 菌株 KACC48898、SL37 與 LC001 之 ITS 序列(MN871697.1、MN837905.1 及 MN393242.1) 相比之相同度(identity) 為 100%。依據病害的病徵、病原菌型態特徵及分子生物學鑑定結果，證明由羅勒枝枯病罹病組織分離出的病原菌為 *C. cassicola* (Mmbaga *et al.* 2015; Pereira *et al.* 2019; Chang *et al.* 2020)。

### 羅勒枝枯病分離株之病原性測定

利用噴霧接種將羅勒枝枯病菌株 CC-2 與 CC-3 之分生孢子懸浮液接種於羅勒植株之嫩梢切口，以確認其病原性。在接種後第 7 天，於羅勒枝條傷口處出現黑褐色縊縮狀病斑，於葉片出現針狀黑褐色病斑。在接種後第 14 天，發現黑褐色縊縮狀病斑往枝條下方蔓延(圖 1E)，葉片上的黑褐色病斑亦逐漸擴大(圖 1F)。於接種 30 d 後，出現落葉、枝條乾枯且植株死亡的現象。在接種後第 14 天，分離羅勒枝條與葉片的罹病組織與健康組織交界處，確認造成發病的病原菌為原接種病原菌，其菌落形態、分生孢子型態特徵及產孢特徵均相同，完成柯霍氏法則(Koch's postulates)，

確認 *C. cassicola* CC-2 與 CC-3，2 菌株均對羅勒均具有病原性。菌株 CC-2 接種於 OT-42 (紫莖種) 與 OT-43 (綠莖種)，於接種後第 14 天觀察其罹病率分別為 25% 與 6.25%；菌株 CC-3 接種於 OT-42 與 OT-43，於接種後第 14 天觀察其罹病率分別為 43.75% 與 6.25%，顯示紫莖種之羅勒對此病原菌之感受性較高。

### 溫度對羅勒枝枯病菌菌絲生長與分生孢子發芽之影響

將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 菌絲塊培養在 5、10、15、20、25、30 及 35°C 生長箱中，於培養第 10 天發現 2 菌株的菌絲生長溫度範圍為 15–35°C (圖 2)。在 5–25°C 的環境下菌絲生長速度受溫度上升而增加，於 25°C 生長箱中有最快生長速率，在 25–35°C 生長箱中菌絲生長速度則隨溫度上升而下降。在羅勒枝枯病菌受溫度影響分生孢子發芽的試驗中，將菌株 CC-2 與 CC-3 之分生孢子以無菌水洗下後，置於不同溫度生長箱中，於洗下後第 15 小時計算發芽率。發現 2 菌株分生孢子發芽溫度範圍為 10–35°C。在 20–35°C 下，菌株 CC-2 之孢子發芽率達 80% 以上；在 15–35°C 菌株 CC-3 之孢子發芽率可高達 90% 以上。然而，在低於 15°C 的環境均不利 2 菌株之分生孢子發芽(圖 3)。

### 溫度對羅勒枝枯病發生之影響

將羅勒 OT-42 品系植株製造傷口後，噴霧接種菌株 CC-3 之孢子懸浮液，並套袋保濕於 20、25 及 30°C 之生長箱中。在接種後 2 d 拆袋，第 7 天觀察植株發病情形。結果發現於 20、25 及 30°C 生長箱中，羅勒枝枯病的罹病度分別為 16.67、75 及 16.67% (圖 4)。

### 室內測試藥劑對羅勒枝枯病菌菌絲生長之影響

將羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 菌絲塊，培養在含有 1、10 及 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  四氯異苯腈、保粒黴素(甲)、依普同及克收欣的 PDA 平板(25°C、12 h 光照、12 h 黑暗)。於培養後第 10 天，發現 1、10 及 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  依普同對 CC-2、CC-3 有最佳的菌絲生長抑制率分別為

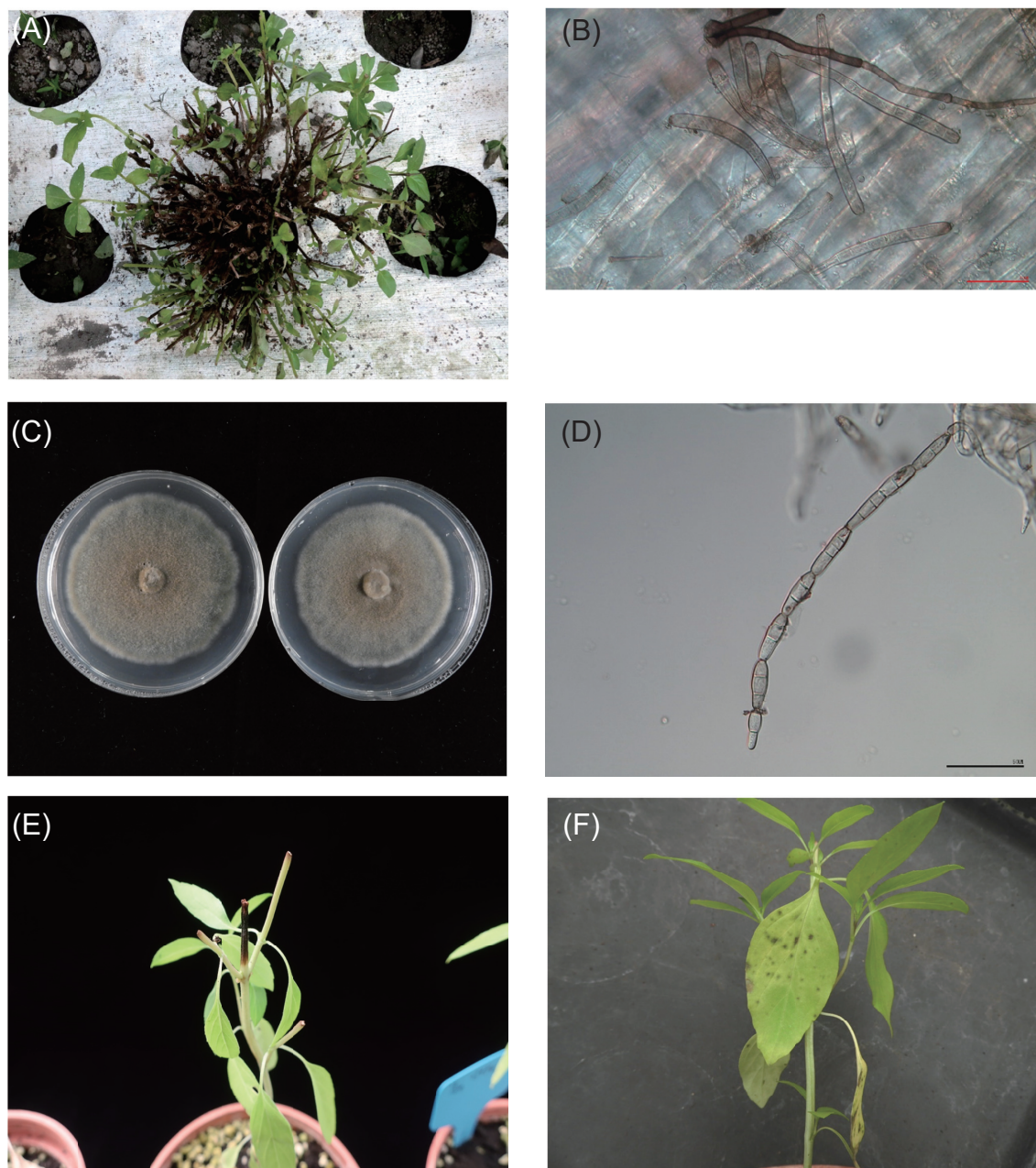


圖 1. 由 *Corynespora cassiicola* 引起之羅勒枝枯病的病徵與羅勒枝枯病菌之菌落、孢子形態特徵。(A) 田間病徵；(B) 罹病莖部組織切片上 *C. cassiicola* 之分生孢子與產孢梗；(C) *C. cassiicola* 於 25°C 定溫箱中 PDA 培養基上培養 14 d 的菌落形態；(D) 分生孢子以串生方式產孢；(E) 病原性測試中 *C. cassiicola* 造成的羅勒莖部病徵；(F) 病原性測試中 *C. cassiicola* 造成的葉部病徵。比例尺 = 50  $\mu\text{m}$ 。

**Fig. 1.** Symptoms of basil dieback disease caused by *Corynespora cassiicola* and its colony, conidia morphology. (A) symptom in the field; (B) conidia and conidiophore of *C. cassiicola* on basil diseased shoot section; (C) colony of *C. cassiicola* grown on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 14 d; (D) conidia developed in chain; (E) basil shoot symptom caused by *C. cassiicola* in pathogenicity tests; and (F) basil leaf symptom caused by *C. cassiicola* in pathogenicity tests. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .

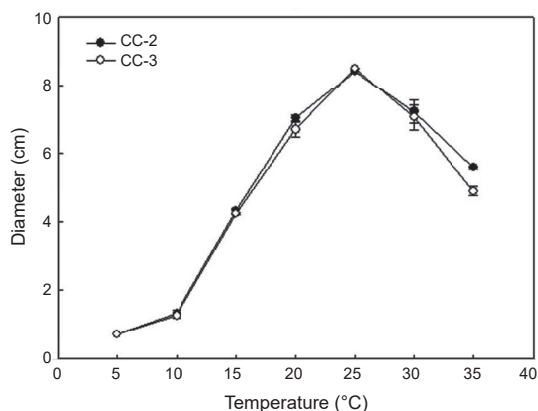


圖 2. 溫度對羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 菌絲生長之影響。

Fig. 2. Effect of temperature on the mycelial growth of *Corynespora cassiicola* CC-2 and CC-3, cultured on potato dextrose agar (PDA) for 10 d.

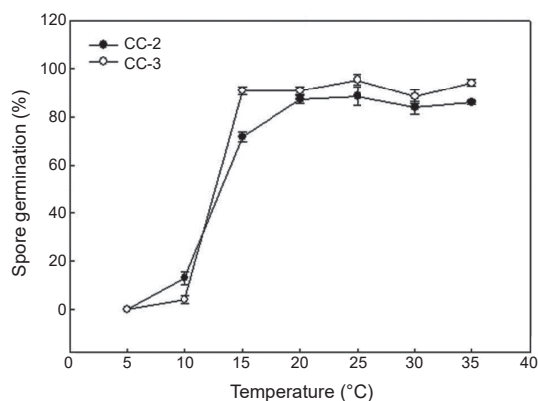


圖 3. 溫度對羅勒枝枯病菌菌株 CC-2 與 CC-3 孢子發芽之影響。

Fig. 3. Effect of temperature on the spore germination of *Corynespora cassiicola* CC-2 and CC-3.

72.9、64.4、77% 與 73.5、64.9、75.4%。克收欣次之，分別為 62.2、66.8、60.7% 與 73.5、64.9、75.4%。保粒黴素(甲)分別為 57.7、42.2、45.3% 與 53.7、48.7、50.9%。而四氯異苯腈則為 47.3、49.5、51.6% 與 43.3、44.4、46.3% (表 1、表 2)。

## 討論

羅勒是台灣主要香草植物之一，於 2019 年 9 月至 2020 年 3 月間陸續於屏東羅勒栽培



圖 4. 溫度對羅勒枝枯病發生之影響。

Fig. 4. Effect of temperature on the basil dieback disease caused by *Corynespora cassiicola* CC-3 at 7 d after inoculation.

田，發現機械採收羅勒的嫩葉與新梢後數日，於傷口處出現縊縮狀黑褐色壞疽型病徵。於屏東縣田間調查發現，該病害零星發生於羅勒露天栽培區，而溫室栽培區則受病害影響範圍較大，最嚴重者發病率可達 60%。由中央氣象局一年內觀測資料查詢系統 (<http://e-service.cwb>).

表 1. 室內試驗四氯異苯腈、保粒黴素 (甲)、依普同及克收欣對羅勒枝枯病菌 *Corynespora cassiicola* CC-2 菌絲生長之抑制率 (%)。  
**Table 1.** The inhibitory activity (%) of chlorothalonil, polyoxins, iprodione and kresoxim-methyl on mycelial growth of *Corynespora cassiicola* CC-2.

Chemical	Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
	1	10	100
Chlorothalonil	47.3 $\pm$ 0.96 B <sup>2</sup> d	49.5 $\pm$ 0.56 AB b	51.6 $\pm$ 0.83 A c
Polyoxins	57.7 $\pm$ 2.03 A c	42.2 $\pm$ 1.18 B c	45.3 $\pm$ 0.93 B d
Iprodione	72.9 $\pm$ 3.82 AB a	64.4 $\pm$ 0.58 B a	77.0 $\pm$ 0.28 A a
Kresoxim-methyl	62.2 $\pm$ 1.10 B b	66.8 $\pm$ 0.0 A a	60.7 $\pm$ 0.92 B b

<sup>2</sup> Data are the means of inhibitory activity (%) from four biological replicas ( $N = 4$ ), which were compared by row and column for the efficacy of same fungicide in different concentrations and the efficacy of different fungicides in same concentration, respectively. Values in each row and column followed by different letters in uppercase and lowercase represent significant differences based on Tukey's honestly significant difference (HSD) test ( $P = 0.05$ ). The statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20.0 version.

表 2. 室內試驗四氯異苯腈、保粒黴素 (甲)、依普同及克收欣對羅勒枝枯病菌 *Corynespora cassiicola* CC-3 菌絲生長之抑制率 (%)。  
**Table 2.** The inhibitory activity (%) of chlorothalonil, polyoxins, iprodione and kresoxim-methyl on mycelial growth of *Corynespora cassiicola* CC-3.

Chemical	Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
	1	10	100
Chlorothalonil	43.3 $\pm$ 0.93 A <sup>2</sup> d	44.4 $\pm$ 0.65 A b	46.2 $\pm$ 0.67 A d
Polyoxins	53.7 $\pm$ 0.82 A c	48.7 $\pm$ 2.73 A b	50.9 $\pm$ 0.54 A c
Iprodione	73.5 $\pm$ 3.04 A a	64.9 $\pm$ 0.25 B a	75.4 $\pm$ 0.10 A a
Kresoxim-methyl	62.2 $\pm$ 1.16 AB b	63.6 $\pm$ 0.74 A a	58.8 $\pm$ 0.86 B b

<sup>2</sup> Data are the means of inhibitory activity (%) from four biological replicas ( $N = 4$ ), which were compared by row and column for the efficacy of same fungicide in different concentrations and the efficacy of different fungicides in same concentration, respectively. Values in each row and column followed by different letters in uppercase and lowercase represent significant differences based on Tukey's honestly significant difference (HSD) test ( $P = 0.05$ ). The statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20.0 version.

gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp) 中，發現於上述調查時間內，屏東縣萬丹鄉的氣溫約為 20.4–34.6°C，相對濕度約為 70–77%；枋寮鄉的氣溫約為 20.1–31.6°C，相對濕度約為 77–81%。將田間實際溫度與羅勒枝枯病菌最適生長溫度進行比對，發現萬丹鄉與枋寮鄉 9 月份至隔年 3 月份的溫度範圍，適合羅勒枝枯病菌生長。於上述調查期間內，於每日午後 5 點至隔天清晨 7 點前的夜晚時段，上述地點的相對濕度常高達 86% 以上。而農民採收羅勒的時段位於清晨，於適合羅勒枝枯病發展的環境下製造傷口，會促進病原菌入侵感染。由文獻指出，*C. cassiicola* 危害植株的嚴重程度受環境影響甚鉅，於持續性 (16–44 h) 的高濕度環境下嚴重發生 (Pernezny *et al.* 1996; Mackenzie *et al.* 2018)。在日本，由於黃瓜 (cucumber) 常

年栽培於溫室中，屬於相對濕度較高的環境，*C. cassiicola* 造成的葉斑病成為黃瓜栽培最大限制因子 (Miyamoto *et al.* 2009; Duan *et al.* 2019)。

於本研究接種實驗發現，*C. cassiicola* 除了造成莖部病徵，也會造成葉部病徵，初期呈現針狀黑褐色小斑，逐漸發展為不規則型黑褐色壞疽斑。在發病後期，葉部壞疽型病斑中央仍為壞疽狀，並無灰白色斑或是同心輪紋出現，可依照此特性與羅勒葉枯病 *A. alternata* 進行區分。唯在田間與溫室調查中，葉部病徵的 *C. cassiicola* 分離率低於莖部病徵，遂將此病害取名為羅勒枝枯病。*C. cassiicola* 為子囊菌門、座囊菌綱、格孢菌目之鐵刀木棒狀桿孢菌。最早於 1868 年，由 Berkeley & Curtis (1868) 發現此病原菌與 *Helminthosporium* spp. 有相

似的形態特徵，將其命名為 *Helminthosporium cassiicola*。隨後 Goh *et al.* (1998) 根據限制性片段長度多態性分析 (restriction fragment length polymorphism; RFLP)，將此菌從 *Helminthosporium* 複合種中區分出來，將其重新命名為 *Corynespora cassiicola*。*C. cassiicola* 可感染橡膠樹、番茄、黃瓜、棉花、菸草、大豆、木瓜、藍莓、番薯等 380 種以上的農作物 (Onesirosan *et al.* 1974; Koenning *et al.* 2006; Garibaldi *et al.* 2007; Schlub *et al.* 2009; Conner *et al.* 2013)，屬於廣寄主性的病原真菌。此病原菌主要以壞疽型寄生 (necrotrophic) 於植體上，藉由分泌毒素影響植株正常生理反應，形成壞疽型病徵。例如分泌 *C. cassiicola* of tomato (CCT) toxin，對番茄植體中具有抑制真菌生長能力的  $\alpha$ -tomatine 進行解毒作用，以利病原菌進行感染與纏據 (Oka *et al.* 2006)。除此之外，可感染橡膠樹之 *C. cassiicola* 菌株，其分泌小分子醣基化蛋-Cassiicolin 的能力與該菌之毒力呈正相關 (Lopez *et al.* 2018)。

*C. cassiicola* 的寄主範圍廣泛，仍有部分菌株具有寄主專一性。Dixon *et al.* (2009) 藉由分析以下 4 個基因座 (loci): two random hyper-variable loci (ga4, caa5), actin-encoding locus (act1) 與 ribosomal DNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS)，將 *C. cassiicola* 分為 6 種不同基因型的品系 (phylogenetic lineages; PLs)。舉例 PL1 品系的 *C. cassiicola* 係具有寄主專一性者，能感染木瓜、胡瓜、豇豆、棉花與羅勒；PL2 品系的 *C. cassiicola* 可感染胡瓜與番薯；PL3 品系的 *C. cassiicola* 可感染番茄、羅勒與黃瓜；PL4 品系的 *C. cassiicola* 可感染胡瓜、豆科、番茄與番薯。本研究中，以柯霍氏法則證明羅勒枝枯病菌之病原性，未來可進行寄主範圍測試與基因分析，進一步釐清此病原菌之菌系。

在植物保護資訊系統中推薦於小葉菜類蔬菜，防治絲狀真菌中不完全菌類的藥劑有：75% 四氯異苯腈 (chlorothalonil) 700 $\times$ 、10% 保粒黴素甲 (polyoxins) 1,000 $\times$ 、23.7% 依普同 (iprodione) 1,000 $\times$  及 44.2% 克收欣 (kresoxim-methyl) 2,500 $\times$ ，換算成濃度分別為 1,072、100、237 及 177  $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。由本研究結果發現 4 種藥劑中，以 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  依普同對 *C.*

*cassicola* 有最佳的菌絲生長抑制率，分別為 77.07% (CC-2) 與 75.39% (CC-3)。此外，實驗結果顯示四氯異苯腈、保粒黴素甲、依普同及克收欣於 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  濃度下，菌株 CC-2 與 CC-3 之菌絲生長抑制率分別為 47.3、57.65、72.92、62.15% 與 43.33、53.72、73.52、62.15%。故依照植物保護資訊系統推薦之藥劑及其稀釋倍數使用，可同時防治羅勒葉斑病與枝枯病。在藥劑試驗結果的統計分析中，以依普同為例，二菌株均在該藥劑 1 ppm 下有最高的標準偏差，表示在該濃度下，藥劑的不穩定性高，實驗數據誤差大，無法與 10、100 ppm 形成線性關係。然而在 10、100 ppm 二濃度中，藥效較為穩定。因此，於田間實際施用時，應遵守推薦使用方式與其推薦濃度，勿隨意調整稀釋倍數而影響藥效。

由於 *C. cassiicola* 與 *A. alternata* 此二類病原真菌，對殺菌劑的抗藥性屬於高風險族群 (Fungicide Resistance Action Committee 2019)，在防治策略上應特別注意，避免長期連續性使用呼吸作用相關-粒線體電子傳遞複合物 III 細胞色素 bc1 (Qo) 抑制劑類的殺菌劑，如克收欣 (Duan *et al.* 2019)。以綜合防治策略，將推薦藥劑於尚未發病時、發病初期輪流施用，以降低抗藥性菌株之選汰壓力。

## 引用文獻

- Berkeley, M. J. and M. A. Curtis. 1868. Fungi cubenses (Hymenomycetes). J. Linn. Soc., Bot. 10:280–320. doi:10.1111/j.1095-8339.1868.tb00529.x
- Bilal, A., N. Jahan, A. Ahmed, S. N. Bilal, S. Habib, and S. Hajra. 2012. Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn- A review. Int. J. Cur. Res. Rev. 4:73–83.
- Chang, C. R., H. H. Shih, J. H. Ou, C. Y. Chen, and C. F. Chau. 2020. First report of brown leaf spot on *Lonicera japonica* caused by *Corynespora cassiicola* in Taiwan. Plant Dis. 104:989. doi:10.1094/PDIS-06-19-1214-PDN
- Conner, K. N., A. K. Hagan, and L. Zhang. 2013. First report of *Corynespora cassiicola*-incited target spot on cotton in Alabama. Plant Dis. 97:1379. doi:10.1094/PDIS-02-13-0133-PDN
- Dixon, L. J., R. L. Schlub, K. Pernezny, and L. E. Datnoff. 2009. Host specialization and phylogenetic di-



- iversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 99:1015–1027. doi:10.1094/PHYTO-99-9-1015
- Duan, Y., W. Xin, F. Lu, T. Li, M. Li, J. Wu, J. Wang, and M. Zhou. 2019. Benzimidazole- and QoI-resistance in *Corynespora cassiicola* populations from greenhouse-cultivated cucumber: An emerging problem in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 153:95–105. doi:10.1016/j.pestbp.2018.11.006
- Fungicide Resistance Action Committee. 2019. Pathogen risk list. <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf> (visit on 02/27/2020)
- Garibaldi, A., S. Rapetti, J. Rossi, and M. L. Gullino. 2007. First report of leaf spot caused by *Corynespora cassiicola* on basil (*Ocimum basilicum*) in Italy. *Plant Dis.* 91:1361. doi:10.1094/PDIS-91-10-1361B
- Goh, T. K., K. D. Hyde, and D. K. L. Lee. 1998. Generic distinction in the *Helminthosporium*-complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. *Fungal Divers.* 1:85–107.
- Koenning, S. R., T. C. Creswell, E. J. Dunphy, E. J. Sikora, and J. D. Mueller. 2006. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. *Plant Dis.* 90:974. doi:10.1094/PD-90-0974C
- Lopez, D., S. Ribeiro, P. Label, B. Fumanal, J. S. Venisse, A. Kohler, R. R. de Oliveira, K. Labutti, A. Lipzen, K. Lail, D. Bauer, R. A. Ohm, K. W. Barry, J. Spatafora, I. V. Grigoriev, F. M. Martin, and V. Pujade-Renaud. 2018. Genome-wide analysis of *Corynespora cassiicola* leaf fall disease putative effectors. *Front. Microbiol.* 9:276. doi:10.3389/fmicb.2018.00276
- Mackenzie, K. J., L. G. Sumabat, K. V. Xavier, and G. E. Vallad. 2018. A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. *Plant Health Prog.* 19:303–309. doi:10.1094/PHP-05-18-0023-RV
- Miyamoto, T., H. Ishii, T. Seko, S. Kobori, and Y. Tomita. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathol.* 58:1144–1151. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x
- Mmbaga, M. T., M. S. Kim, L. Mackasmiel, and N. B. Klopfenstein. 2015. Differentiation of *Corynespora cassiicola* and *Cercospora* sp. in leaf-spot diseases of *Hydrangea macrophylla* using a PCR-mediated method. *Can. J. Plant. Sci.* 95:711–717. doi:10.4141/cjps-2014-354
- Oka, K., A. Okubo, M. Kodama, and H. Otani. 2006. Detoxification of  $\alpha$ -tomatine by tomato pathogens *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola* and its role in infection. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:152–158. doi:10.1007/s10327-005-0262-8
- Onesirosan, P. T., D. C. Army, and R. D. Durbin. 1974. Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 64:1364–1367. doi:10.1094/Phyto-64-1364
- Paton, A. and E. Putievsky. 1996. Taxonomic problems and cytotoxic relationships between and within varieties of *Ocimum basilicum* and related species (Labiatae). *Kew Bull.* 51:509–524. doi:10.2307/4117026
- Pereira, C. M., S. S. Salcedo, E. de Oliveira Lopes, and R. W. Barreto. 2019. *Corynespora cassiicola* causes leaf spots on sweet basil (*Ocimum basilicum*) in Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 14:32. doi:10.1007/s13314-019-0364-3
- Pernezny K., L. E. Datnoff, T. Mueller, and J. Collins. 1996. Losses in fresh-market tomato production in Florida due to target spot and bacterial spot and the benefits of protectant fungicides. *Plant Dis.* 80:559–563.
- Schlub, R. L., L. J. Smith, L. E. Datnoff, and K. Pernezny. 2009. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. *Acta Hort.* 808:25–28. doi:10.17660/ActaHortic.2009.808.1
- Tzeng, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5<sup>th</sup> ed. Taiwan Phytopathological Society Press. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)

## *Corynespora cassiicola* Causes Dieback on Basil

Jia-Rong Tang<sup>1\*</sup>, Shu-Fen Tsai<sup>2</sup>, Szu-Yu Chen<sup>3</sup>, and I-Sheng Feng<sup>2</sup>

### Abstract

Tang, J. R., S. F. Tsai, S. Y. Chen, and I. S. Feng. 2021. *Corynespora cassiicola* causes dieback on basil. J. Taiwan Agric. Res. 70(3):196–205.

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is a perennial herb belonging to the family lamiaceae, and is commonly cultivated as a condiment or spice in Taiwan. A symptom of dieback appeared on basil planted in the field and greenhouse at Wandan Township, Pingtung Country, and Luzhu Township, Kaohsiung City, Taiwan, during September 2019 to March 2020. The dark brown lesion initiated from the cutting ends made by the regular harvest, then extended progressively, and eventually resulted in the dieback of the branches and defoliation. Conidiophores and conidia characteristics of *Corynespora cassiicola* were observed from diseased tissues. Margin of lesion was excised and sterilized. Hyphae, once emerged from the plant tissue, were transferred from water agar, subcultured on potato dextrose agar (PDA) plates, and incubated at room temperature. The colonies on PDA were white to pale gray in color and dark olive green in the center area. After 25 days incubation, conidia characteristics of *C. cassiicola* were observed at middle of the colony. Genomic DNA was extracted from pure cultures. The internal transcribed spacer (ITS) DNA fragment was amplified by PCR with primer pairs: CoryITS-f1 and CoryITS-r1, and sequenced. ITS sequence was blasted with GenBank on National Center for Biotechnology Information (NCBI). Blast analysis showed that CC-2 and CC-3 had 100% identity to *C. cassiicola*. Necrosis or dieback appeared at seventh day on some inoculated basil, with disease severity being 75% at 25°C, while 16.67% at 20°C and 30°C. *C. cassiicola* was reisolated from the lesions, thus fulfilling Koch's postulate. The results suggested that the optimal condition for *C. cassiicola* to cause dieback of basil was at 25°C in high humidity. Fungicides, which recommended on control of leaf spot caused by *Alternaria alternata* were tested and revealed that iprodione effectively inhibited mycelial growth of *C. cassiicola*.

**Key words:** Basil, Dieback, *Corynespora cassiicola*.

---

Received: January 27, 2021; Accepted: April 21, 2021.

\* Corresponding author, e-mail: jrtang@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Technicians, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Project Assistant, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.