

臺灣草莓炭疽病菌族群分析與 檢測技術開發

鐘珮哲^{1*}、吳竝毅²、洪挺軒²、鍾嘉綾²

¹ 行政院農委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

* 聯繫人 E-mail: peiche@mdais.gov.tw

摘 要

草莓為臺灣具高經濟價值之作物，栽培面積為 500 公頃左右。近 10 年來炭疽病成為草莓頭號殺手，自 2010~2018 年間調查草莓主要產區，高達 50% 以上的病株呈現典型冠腐病徵，經過型態及多基因分析 52 株菌，確認造成臺灣草莓炭疽病之病原菌包含 *Colletotrichum siamense*、*C. fructicola* (*C. gloeosporioides* species complex)、*C. karstii*、*C. boninense* (*C. boninense* species complex) 及一種歸類於 *C. acutatum* species complex 的新種 *Colletotrichum miaoliense* sp. nov.。其中又以 *C. siamense* 為最主要且生長速度快、病原性強之病原菌，瞭解炭疽病菌種類將有助於後續防治策略之開發。由於炭疽病菌能潛伏感染寄主，種植健康不帶菌的草莓苗，將可大幅降低本田期病害的發生，同時減少化學藥劑的使用。而為生產健康的草莓苗，準確、靈敏、快速又合乎成本效益的檢測技術便是其中最重要的關鍵，因此以現有的炭疽病菌基因體資料庫，搜尋適合的目標區域，並以臺灣草莓炭疽病菌的序列進行引子設計，開發巢式聚合酶鏈鎖反應技術。本技術可以偵測最主要的炭疽病菌 *C. siamense* 與 *C. fructicola*，但不會偵測到其他草莓病原菌或土壤中常見的腐生菌，可偵測到低至 100 fg 之 *C. siamense* DNA (約 2 個病原菌細胞)，代表具有高度專一性及靈敏度。

關鍵詞：潛伏感染、健康種苗、巢式聚合酶鏈鎖反應

臺灣草莓炭疽病菌族群分析

臺灣草莓栽種面積約 500-600 公頃，每年產值超過 18 億元，平均每公頃產值超過 300 萬元，為一極具經濟價值之水果。每年草莓大約於初秋 (9 月底至 10 月初) 定植，約於 11 月底至 12 月初開始採收，一直至隔年 3 至 4 月結束。草莓主要藉由走蔓進行無性繁殖，育苗的時間落在每年 3 月至 9 月之間，這期間包括了 5 至 6 月的梅雨季節與 7 至 9 月的颱風季節，高溫高濕加上氣候變遷所造成的強降雨現象，導致近年來草莓炭疽病的發生頻率居高不下 (鐘及彭，2013)。臺灣每年對於草莓苗的需求高達 2500 萬株，近年來平均因炭疽病造成植株死亡的比例高達 20-30% (育苗期 30%，本田期 20%) 有時更因病害發生嚴重，造成全臺缺苗嚴重，出現有錢也買不到苗的現象發生，因此如何有效防治草莓炭疽病實為一亟待解決的重要問題。炭疽病 (anthracnose) 是草莓最主要的病害之一，其病原菌屬於炭疽刺盤孢菌屬 (*Colletotrichum*) 之真菌，近年來因分子生物學發展之影響，以往用傳統型態與寄主範圍做為主要鑑定病原真菌的方法，已逐漸轉變為以分子特徵為主要鑑定依據，特別是炭疽病菌屬之真菌，許多種皆無法以型態特徵來鑑定，需要以分子特徵才能準確鑑定。

為進行草莓炭疽病菌之族群調查，自臺灣地區之新竹縣、苗栗縣、嘉義縣與南投縣蒐集病株，這四個縣市的草莓栽種面積佔總栽種面積之 94%，其中以苗栗縣栽種面積最大，約佔總栽種面積之 90% (107 年農業統計資料)。分析 52 株炭疽病菌株，80% 以上於苗栗縣內不同地區分離出來。分離部位包含罹病株之冠部、葉片、走蔓、根部與果實等不同部位，經由 ITS 區域的序列比對結果顯示，有 45 株屬於 *Colletotrichum gloeosporioides* species complex，有 4 株屬於 *C. boninense* species complex，有 3 株屬於 *C. acutatum* species complex。結果顯示臺灣地區的草莓炭疽病菌至少有三種不同族群，其中又以 *C. gloeosporioides* species complex 的族群佔最大比例 (約 86%)，其分布區域亦包含了所有調查的縣市區域 (佔總栽種面積之 94%)。

為求更精確地鑑定不同族群內之炭疽病菌，所有分離純化的菌株皆以多基因並聯的方式進行類緣分析，分析的基因或區域包含 ITS、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)、chitin synthase (*CHS-1*)、actin (*ACT*)、 β -tubulin 2 (*TUB2*)、calmodulin (*CAL*) 與 intergenic region of *Apn2* and *MAT1-2-1* (*ApMAT*)。序列經由 PCR 增幅後進行雙向定序，同一族群之序列經由 multiple sequence alignment 後，分別進行貝葉氏分析 (Bayesian inference)，

最大似然法則分析 (Maximum likelihood) 與最大簡約法分析 (Maximum parsimony)，結果顯示 *C. gloeosporioides* species complex 的族群內包含兩種炭疽病菌，為 *C. siamense* 與 *C. fructicola*，*C. boninense* species complex 當中包含兩種炭疽病菌，為 *C. boninense* 與 *C. karstii*，*C. acutatum* species complex 包含一種炭疽病菌。在所有分離菌株當中，以 *C. siamense* (圖一) 出現的頻率最高，有約 75% 的出現頻率 (52 株當中佔 39 株) (Chung et al. 2019)。此外，於 *C. acutatum* species complex 當中分離的菌株，在演化樹分析上出現以獨立的分枝自成一個族群，且有著高度的可靠性，已命名為新種 *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. (Chung et al. 2020)。

確立不同炭疽病菌族群後，於各族群當中各挑選至少 2 株菌作為代表性菌株，進行培養基上菌落生長速度及草莓葉上致病性強弱之比較，結果顯示 *C. siamense* 在不同溫度下 (18 °C、22 °C、25 °C、28 °C、30 °C 與 32 °C) 皆生長最為快速，病原性亦最強，推測臺灣草莓炭疽病菌雖然至少有五種，但 *C. siamense* 為田間最普遍的種類，亦為病原性最強的一種。

炭疽病檢測技術開發

由於炭疽病菌可以藉由壓器 (appressoria) 於植物組織表面潛伏感染，並且可以產生二次孢子 (secondary conidia)，因此潛伏感染時仍舊可以產生分生孢子，造成田間感染源的增加與散播 (Leandro et al., 2001)。經長期田間監測發現，炭疽病菌會潛伏於種苗，然後隨著種苗傳播至本田，因而偵測此病原菌潛伏感染情形，應有助於大幅降低其散播。炭疽病潛伏感染之偵測，可使用除草劑 (paraquat) 或冷凍法殺死植物組織後，加速其內潛藏的炭疽病菌之生長，並使分生孢子盤較易產生，藉此觀察是否有潛伏感染情形 (Mertely and Legard, 2004)。Dr. Ishikawa 則將外觀無病徵之草莓葉片以酒精表面消毒後，經 10-14 天可觀察潛伏感染之炭疽病的分生孢子堆產生情形 (Ishikawa, 2004)。分子生物學發展後，最常用來做為炭疽病菌種間鑑定及偵測潛伏感染情形之方法為聚合酶鏈鎖反應 (PCR)，然而當目標 DNA 量非常低時 (潛伏感染時期)，一般 PCR 不見得適用，此時需以高靈敏度之技術 (如 real-time PCR 等) 才能偵測得到。

為提升檢測速度，爰開發巢式聚合酶鏈鎖反應 (nested PCR) 引子對，此種方法是將第一次的 PCR 產物作為第二次 PCR 循環的模版，可以提高特異性及靈敏度。引子設計的目標區域設定在尋找 *C. gloeosporioides* complex 當中保守、

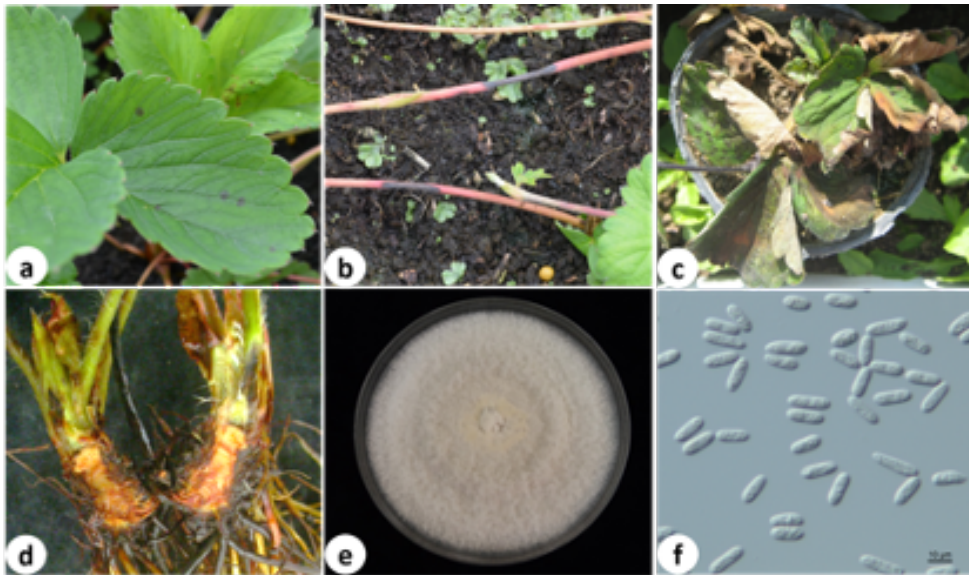
但對其他 *Colletotrichum* spp. 不保守，且其上下游序列對大部分 *Colletotrichum* 為保守的區域。設計的 nested PCR 引子對首先進行專一性的分析，分別以 *C. siamense* ML133 的 DNA (為正對照組)，比較對於其他 *C. siamense* 分離株及不同種類炭疽病菌菌株，如 *C. fructicola* 與 *C. karstii* 的專一性，結果顯示可偵測到目前田間最主要之炭疽病菌種類 *C. siamense* 及 *C. fructicola*，經第一次 PCR 增幅出 490 bp 片段，第二次 PCR 則增幅出 150 bp 片段 (圖二)。將 *C. siamense* ML133 的 DNA 序列稀釋 (1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg per μ L) 後進行測試，結果顯示 nested PCR 可以偵測低至 100 fg 之 *C. siamense* ML133 DNA，代表具有高靈敏度 (圖二)。

結 語

在發展草莓抗病育種技術與防治技術之前，必須先瞭解目前田間的草莓炭疽病是單一或多種病原菌所造成，才有可能針對主要病原菌研發相對應的整合性管理技術。目前所開發之 nested PCR 技術，可以檢測臺灣主要的草莓炭疽病菌 *C. siamense* 與 *C. fructicola*，但不會檢測出別種的炭疽病菌，且於土壤中常見的 *Fusarium* spp. 或木黴菌 (*Trichoderma* sp.) 亦不會被檢測出來，本檢測技術除了具有好的專一性，亦具有高度靈敏度，只要有 100 fg 的炭疽病菌 DNA (約 2 個病原菌細胞) 即可被偵測，適合檢測在草莓上潛伏感染的少量炭疽病菌。本檢測技術使用 nested PCR 反應，相較於一般 PCR，其靈敏度與專一性皆較高，到達與 real-time PCR 相當的靈敏度，且每次反應的成本較 real-time PCR 低，唯有其反應所需要的時間稍長，但相較於需要 10-14 天才能完成的酒精檢測法，整個檢測流程可在 1-2 天之內完成，已經符合快速檢測所需。國內目前正在積極推動草莓種苗三級繁殖制度，本檢測技術可以實際應用或支援種苗病害驗證作業 (鐘，2017)，未來將持續開發其他草莓病害檢測技術，以提高國內健康草莓苗的品質，減少病害發生與降低化學藥劑使用。

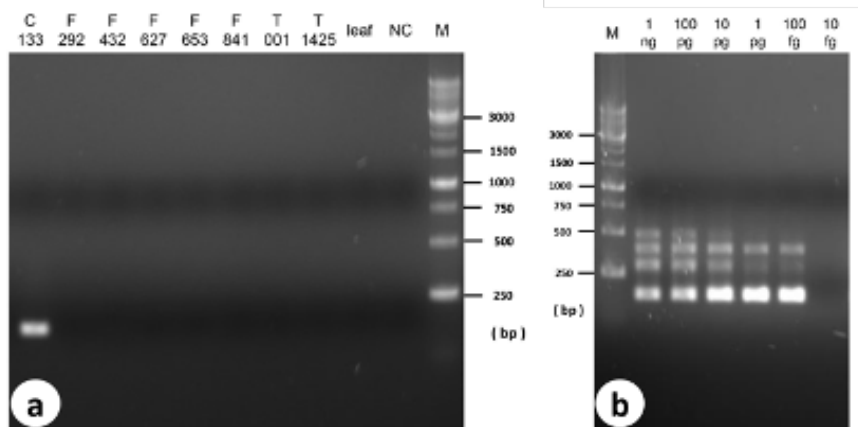
參考文獻

1. 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 期：9-10。
2. 鐘珮哲。2017。草莓育苗主要病害監測檢測及防治技術。出國報告資訊網。
3. Ishikawa, S. 2004. Simple diagnosis using ethanol immersion of strawberry plants with latent infection by *Colletotrichum acutatum*, *Dendrophoma obscurans*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Journal of General Plant Pathology 70:249-255.
4. Leandro, L. F. S., Gleason, M. L., Nutter, F. W., Wegulo, S. N., Dixon, P. M. 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology 91, 659-664.
5. Mertely, J. C., Legard, D. E., 2004. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. Plant Disease 88, 407-412.
6. Chung, P.-C., Wu, H.-Y., Ariyawansa, H. A., Tzean, S.-S., Chung, C.-L. 2019. First report of anthracnose crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. Plant Disease 103 (7), 1775-1776.
7. Chung, Pei-Che, Wu, Hung-Yi, Wang, Yen-Wen, Hu, Hsien-Pin, Ariyawansa, Hiran-A., Hung, Ting-Hsuan, Tzean, Shean-Shong and Chung, Chia-Ling. 2020. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. Scientific Reports. 10, 14664.



圖一、炭疽病菌在豐香草莓植株上各部位之病徵及菌落、分生孢子型態。a. 黑色壞疽葉斑。b. 走蔓上凹陷病斑。c. 炭疽病菌感染冠部造成草莓植株顯現出褪綠到枯萎症狀。d. 冠部的縱切面顯現褐色壞疽。e. 真菌菌落最初為白色，後來在上側逐漸轉為淺灰色。f. 分生孢子透明，長圓形到圓柱形，具圓形鈍角

Fig. 1. Anthracnose symptoms on strawberry and morphological characters of *Colletotrichum siamense*. (a) Black necrotic leaf spots. (b) Withering and girdling on a runner. (c) A strawberry plant with anthracnose crown rot showing chlorotic to blighted leaves and wilting symptoms. (d) Longitudinal section of an infected crown showing marbled reddish-brown necrosis. (e) The fungal colony was initially white, later became light gray on the upper side. (f) Conidia hyaline, oblong to cylindrical, with round obtuse ends. Scale bar = 10 μ m



圖二、巢式聚合酶鏈鎖反應之專一性及靈敏度測試。a. DNA 樣本包含 *Colletotrichum siamense* ML133 (C133)、*Fusarium* spp. (F292、F432、F627、F653、F841)、*Trichoderma* sp. (T001、T1425)、草莓葉片 (leaf) 及負對照 (NC)。M：1 kb DNA 分子標記 (Faith Biotechnology)。b. 測試樣本為序列稀釋之 *Colletotrichum siamense* ML133 的 DNA：1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL。M：1 kb DNA 分子標記 (Faith Biotechnology)

Fig. 2. Specificity and sensitivity test of the nestd-PCR assay. (a) Samples included the DNA of *Colletotrichum siamense* ML133 (C133), *Fusarium* spp. (F292, F432, F627, F653、F841), *Trichoderma* sp. (T001, T1425), strawberry leaf (leaf), and negative control (NC). M: 1 kb DNA ladder (Faith Biotechnology). (b) Samples included serial dilutions of *C. siamense* ML133 DNA: 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL. M: 1 kb DNA ladder (Faith Biotechnology)

Population analysis and development of a detection method for *Colletotrichum* species associated with strawberry anthracnose in Taiwan

*Pei-Che Chung¹, Hung-Yi Wu², Ting-Hsuan Hung², Chia-Ling Chung²

¹ Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Miaoli, Taiwan, R. O. C.

² Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei City

* Corresponding author, E-mail: peiche@mdais.gov.tw

Abstract

In Taiwan, strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) is a high-value crop with an average annual cultivated area of ~500 ha in the last 5 years. Anthracnose has become more destructive over the past decade in Taiwan. From 2010 to 2018, we surveyed anthracnose in major strawberry cultivation areas in Taiwan, and observed that more than 50% of diseased plants showed typical anthracnose crown rot (ACR) symptoms. Multi-gene analysis and morphological characterization of 52 isolates revealed that *C. siamense*, *C. fructicola* (*C. gloeosporioides* species complex), *C. karstii*, *C. boninense* (*C. boninense* species complex) and *Colletotrichum miaoliense* sp. nov of the *C. acutatum* species complex were associated with strawberry anthracnose in Taiwan. *C. siamense* was recognized as the most dominant, fast-growing and highly virulent causative agent of strawberry anthracnose in Taiwan. Our results would help develop a comprehensive control strategy to alleviate strawberry anthracnose in the future. Because *Colletotrichum* spp. can cause latent infections, use of healthy and pathogen-free strawberry seedlings will greatly reduce the occurrence of anthracnose rot in the field and the usage

of fungicides. To produce healthy seedlings, it is important to diagnose anthracnose at the stage of latent infection. We conducted comparative genomics analysis of known *Colletotrichum* spp. genomes to search for ideal regions suitable for the design of specific primers. We developed a nested-PCR assay which can specifically detect *C. siamense* and *C. fructicola*, the predominant pathogens causing strawberry anthracnose in Taiwan, but not other pathogens and saprophytes associated with strawberry plants. It could detect as low as 100 fg genomic DNA of *C. siamense*, which corresponds to 2 cells of *C. siamense*, suggesting the high sensitivity of this new detection technique.

Key words: latent infection, healthy runner plants, nested-PCR