

比較分離自葡萄園之 *Colletotrichum* spp. 菌株對葡萄之致病力

林筑蘋^{1*} 蔡志濃² 安寶貞³ 陸明德⁴

摘要

林筑蘋、蔡志濃、安寶貞、陸明德。2023。比較分離自葡萄園之 *Colletotrichum* spp. 菌株對葡萄之致病力。台灣農業研究 72(1):49–61。

比較所蒐集之不同分離來源之 *Colletotrichum* spp. 菌株對「巨峰」葡萄 (*Vitis vinifera* × *V. labrusca*, 'Kyoho') 致病力 (virulence)，在離果的葡萄果粒的接種試驗結果顯示 (*in vivo*)，*Colletotrichum viniferum* 致病力最強，無論果粒有或無傷口，皆可造成顯著且大範圍之晚腐病病斑，且葡萄果分離株致病力有大於葉分離株的趨勢；*Colletotrichum fructicola* 次之，有趣的是，分離自葡萄園內的牛筋草 (*Eleusine indica*) 分離株致病力高於葡萄果或葉分離株；*Colletotrichum tropicale* 致病力最低，本研究中的菌株都需要藉由傷口才能感染果粒。另以 *C. fructicola* 與 *C. tropicale* 進一步做病原性測試，在田間葡萄幼果的接種試驗中 (*in planta*)，以 *C. fructicola* 菌株接種的果串在轉色後皆能成功發展出晚腐病病徵，其中牛筋草分離株接種的果串發病率以及病徵表現皆高於葡萄分離株的，而以 *C. tropicale* 接種的果串則未觀察到晚腐病的病徵；在接種葡萄全植株的試驗中，無論哪個菌株接種後的植株葉片或其他部位皆無出現明顯病徵。本研究為 *C. fructicola* 在台灣感染葡萄之首篇報導，同時確認 *C. fructicola* 可感染牛筋草，造成牛筋草水浸狀與褐化，進一步推論 *C. fructicola* 在田間可以牛筋草為替代寄主 (alternative host)，並可能在葡萄葉片上腐生，伺機感染葡萄果實，直至轉色期前後開始危害葡萄果實造成晚腐病。

關鍵詞：葡萄晚腐病、*Colletotrichum viniferum*、*Colletotrichum fructicola*、*Colletotrichum tropicale*、致病力。

前言

葡萄晚腐病 (grape ripe rot) 為影響葡萄 (*Vitis* sp.) 產業最重要的病害之一。全球各區域引發葡萄晚腐病的主要病原菌種類不一，透過多重序列親緣關係分析 (multi-gene phylogenetic analysis) 確認至少包括 10 個種，包括 *Colletotrichum aenigma* B. S. Weir & P. R. Johnst. (Yan *et al.* 2015)、*Colletotrichum citri* F. Huang, L. Cai, K. D. Hyde & Hong Y. Li (Lei *et al.* 2016)、*Colletotrichum fructicola* Prihast., L. Cai & K. D. Hyde (Peng *et al.* 2013; Echeverrigaray *et al.* 2020; Lim *et al.* 2020)、*Colletotrichum godetiae* Neerg. (Zapparata *et al.*

2017)、*Colletotrichum hebeiense* Xing H. Li, Y. Wang, K. D. Hyde, M. Jayaward. & J. Y. Yan (Yan *et al.* 2015)、*Colletotrichum karstii* Y. L. Yang, Zuo Y. Liu, K. D. Hyde & L. Cai、*Colletotrichum kahawae* J. M. Waller & Bridge、*Colletotrichum limitticola* (R.E.Clausen) Damm, P.F.Cannon & Crous、*Colletotrichum nymphaeae* (Pass.) Aa (Echeverrigaray *et al.* 2020)，以及 *Colletotrichum viniferum* L. J. Peng, L. Cai, K. D. Hyde & Zi Y. Ying (Peng *et al.* 2013; Lei *et al.* 2016; Oo & Oh 2017; Echeverrigaray *et al.* 2020; Gao *et al.* 2020; Yokosawa *et al.* 2020) 等，分屬於 *Colletotrichum gloeospori-*

投稿日期：2022 年 10 月 11 日；接受日期：2022 年 11 月 24 日。

* 通訊作者：cplin@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組前研究員兼組長。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

oides 複合種 (species complex)、*Colletotrichum acutatum* 複合種以及 *Colletotrichum boninense* 複合種等。

在台灣，Duan & Chen (2020) 透過多序列分析比對可知 *C. viniferum* 與 *Colletotrichum tropicale* E. I. Rojas, S. A. Rehner & Samuels 能造成葡萄晚腐病。Lin *et al.* (2022) 透過分析以 5 種基因或序列組成的多重序列親緣關係樹 (包含 internal transcribed spacer、glycer-aldehyde-3-phosphatedehydrogenase、actin、beta-tubulin 2 以及 chitin synthase 1 等)，確定在罹染晚腐病的葡萄果上可分離得 3 菌種，按照分離頻率由高到低為 *C. viniferum*、*C. fructicola* 以及 *C. tropicale* 等。Lin *et al.* (2022) 亦確認 *C. viniferum* 可分為次支序 (subclade) C 與 T，以次支序 T 為目前造成台灣葡萄晚腐病的主要種類，且特別的是，證實 *C. viniferum* 在田間可同時感染葉片與果實。另外，*C. fructicola* 與 *C. tropicale* 亦有文獻指出可感染葡萄果實，其中 *C. fructicola* 為中國大陸、韓國及巴西等地引起晚腐病的重要病原之一 (Peng *et al.* 2013; Duan & Chen 2020; Echeverrigaray *et al.* 2020; Lim *et al.* 2020)。

除了罹染晚腐病的葡萄果外，Lin *et al.* (2022) 亦自罹病幼果或枝條，或者葡萄園區內出現褐色水浸狀病徵的牛筋草 (*Eleusine indica*) 等不同組織與寄主分離得上述 *C. viniferum*、*C. fructicola* 以及 *C. tropicale* 等 3 菌種。為確認以上不同來源的菌株或菌種是否對葡萄具病原性 (pathogenicity) 可感染葡萄，並比較各菌株間致病力 (virulence) 強弱，本研究以成熟的葡萄果粒 (*in vivo*) 為測試材料比較各菌株的致病力，且在田間透過接種發育中的幼果與溫室的植株確認病害發展狀況 (*in planta*)，並證實 *C. fructicola* 可感染牛筋草，確認 *C. fructicola* 對牛筋草的病原性。

材料與方法

菌株培養

使用的菌株共 21 株，包括各分離自葡萄不同部位或葡萄園區牛筋草，分別屬於 *C. viniferum*、*C. fructicola*，或者 *C. tropicale* 等，菌株詳細資料見 Lin *et al.* (2022)。菌株以馬

鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 斜面試管培養，放置於 12 h 光週期，24–26°C，10–14 d 後，以無菌水刮取培養基表面蒐集分生孢子，並以 8 層紗布過濾之，最終製備成 1×10^6 分生孢子/mL 之懸浮液。

果粒接種與量測

供試葡萄為「巨峰」品種 (*Vitis vinifera* × *V. labrusca*, 'Kyoho')。果串以 20 ppm 次氯酸水漂洗 3 次後，將果粒連同蒂頭剪下，並分為無傷處理或以 10 針一束之蟲針刺果粒表面 10 下之傷處理。菌株各取 10 uL 分生孢子懸浮液並各別滴於成熟之果粒上，為保濕並固定孢子懸浮液，再覆蓋 10 uL 之 40°C 左右之 1% 洋菜膠。接種後的果粒放於保鮮盒中並保濕使相對濕度 (relative humidity; RH) > 90%，置於 24–28°C 無光照之生長箱，7 d 後測量出現晚腐病病徵的病斑之長與寬，取平均作為病斑大小之直徑。晚腐病病徵包括接種處表面出現水浸狀且果肉腐爛。對照組以無菌水取代懸孢子浮液。每菌株或對照組個別接種 5 粒果粒，試驗重複 2 或 3 次。

病原性測試

供試菌株之分生孢子懸浮液製備方式如上，並加入稀釋 10,000 × 之展著劑 (加收活展；興農股份有限公司，台灣台中市)。

田間幼果接種：2018 年秋季時於台中后里區果園，供試植物為葡萄「巨峰」品種結果 1 mo 內之果串，將仍掛果發育中的果串浸泡入分生孢子懸浮液中 10 s，以葡萄專用套袋之白色紙袋封緊果串，直至果實轉色成熟，約需 1.5 mo，期間持續觀察供試果串病徵表現。對照組以無菌水取代孢子懸浮液。每菌株或對照組個別接種 7 串以上。試驗重複 1 次。

盆栽植株接種：於溫室內，供試植物為「巨峰」葡萄，經催芽 2 mo，待高度約 110–150 cm、具葉片與嫩梢植株後，種植於盆栽中。將分生孢子懸浮液噴霧噴灑全植株直至水滴滑落。以透明塑膠袋使保濕，為使植株能透氣但又能維持高相對濕度 (透明塑膠袋內側仍有水珠)，靠近植株頂端的塑膠袋 2 個角落各剪 1 條長介於 5–7 cm 的開口。接種後植株置入 28°C、12 h 光週期的走入式生長箱。正對照組

使用的菌株為 F217069，負對照組以無菌水取代孢子懸浮液。每處理或正負對照組共 5 盆。試驗重複 2 次。

牛筋草接種：自農業試驗所草坪採集牛筋草之葉片，先以水清洗，再以 75% 酒精擦拭，並分為無傷痕處理，或以 10 針一束之蟲針輕刺葉表 6 下之傷痕處理。以棉花浸泡於分生孢子懸浮液（本試驗分生孢子懸浮液調整為 2.5×10^4 孢子/mL）至少 5 min 後，約取 1 cm^3 的棉花作為接種源，放置於接種點上。接種後之牛筋草葉片放於保鮮盒中並保濕使 $\text{RH} > 90\%$ ，放置於 $24\text{--}28^\circ\text{C}$ ，3 d 後觀察。每菌株或對照組個別接種 5 片葉片，試驗重複 2 次。接種後，如出現病徵，罹病組織經組織分離確認分得相同特徵之菌株才算發病成功，完成柯霍氏法則。

分生孢子、壓器測量與生長觀察

供試菌株以平板 PDA 培養，放置於 12 h 光週期， $24\text{--}26^\circ\text{C}$ ，7 d。以上述方式收集分生孢子懸浮液後觀察與測量 50 個分生孢子之形態。為觀察壓器（*appressorium*，又稱「附著器」），將分生孢子懸浮於 0.5% V8 上後，滴在玻璃載玻片上並保濕，黑暗培養， $24\text{--}26^\circ\text{C}$ ，48 h 後，觀察與測量 50 個壓器。菌絲生長量測方式為菌株在 PDA 上黑暗培養 3–5 d 後，切下菌落邊緣之新鮮菌塊，移植於 PDA 培養基的邊緣，放置於 $4\text{--}40^\circ\text{C}$ （以 4°C 為間距，共 10 個溫度），每個溫度下每菌株每次測試 3 皿，即 3 重複，測試不同溫度下菌絲生長速率。每日記錄菌絲直線生長距離，部分溫度下於 10 d 即長滿培養基，故測量 1–9 d 的生長數據，每皿每日生長速率計算方法為（生長滿 9 d 距離 – 生長滿 1 d 距離） $\text{cm}/8 \text{ d}$ （單位： cm d^{-1} ），取 3 重複數之平均值代表該菌株。試驗重複 3 次。

結果

各菌種致病力測試 (*in vivo*)

為量測各菌株造成之病斑大小，本試驗採固定接種點方式將菌株各別接種於離果之果粒上，並為瞭解傷口的影響性，果粒分為經傷痕處理與無傷痕處理。以離果接種的結果如圖 1。果粒沒有傷痕處理下，以 *C. viniferum* 次

支序 C 接種，計 1 株造成之平均病斑大小為 $1.5 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ；以 *C. viniferum* 次支序 T 接種，葡萄葉分離株共 3 株造成之平均病斑大小為 $0.9 \text{ cm} \pm 0.3 \text{ cm}$ ，葡萄果分離株中除 1 菌株 F217153 幾乎不造成病斑外，另 6 個葡萄果分離株造成之病斑大（平均病斑大小為 $1.6 \text{ cm} \pm 0.2 \text{ cm}$ ）且病徵明顯，葡萄果分離株共 7 株造成之平均病斑大小為 $1.3 \text{ cm} \pm 0.3 \text{ cm}$ ；以上 *C. viniferum* 計 11 菌株（包含次支序 C 與 T 菌株）之平均病斑大小為 $1.2 \text{ cm} \pm 0.2 \text{ cm}$ ；以 *C. fructicola* 接種，其中 5 葡萄分離株不造成病徵，1 牛津草分離株 F216037 造成之平均病斑大小為 $0.3 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ，*C. fructicola* 計 6 菌株平均病斑大小為 $0.1 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ；以 *C. tropicale* 接種，3 菌株不造成病徵，1 菌株造成之平均病斑大小為 $0.1 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ，*C. tropicale* 計 4 菌株造成之平均病斑大小為 $0.0 \text{ cm} \pm 0.0 \text{ cm}$ 。果粒經傷痕處理下，本研究之 21 菌株皆可造成程度不一之病斑；以 *C. viniferum* 次支序 C 接種，計 1 菌株造成之平均病斑大小為 $1.9 \text{ cm} \pm 0.2 \text{ cm}$ ；以 *C. viniferum* 次支序 T 接種，葡萄葉分離株共 3 株造成之平均病斑大小為 $1.6 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ，葡萄果分離株共 7 個葡萄果分離株造成之平均病斑大小為 $2.2 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ；以上 *C. viniferum* 計 11 菌株之平均病斑大小為 $2.0 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ；以 *C. fructicola* 接種，以牛津草分離株 F216037 接種造成的平均病斑最大，*C. fructicola* 計 6 菌株造成之平均病斑為 $1.1 \text{ cm} \pm 0.2 \text{ cm}$ ；以 *C. tropicale* 接種，計 4 個菌株造成之平均病斑為 $0.9 \text{ cm} \pm 0.2 \text{ cm}$ 。出現病徵的果實再次以組織分離皆可回分得相同特徵的菌株，對照組皆未有明顯晚腐病病徵。

幼果與植株接種 *C. fructicola* 或 *C. tropicale* 之結果 (*in planta*)

在 Lin *et al.* (2022) 中已確認 *C. viniferum* 在幼果與植株上之病原性，為釐清 *C. fructicola* 與 *C. tropicale* 之病原性，進行以下病原性測試。

田間幼果

為確認所分離之 *C. fructicola* 與 *C. tropicale* 菌株是否能在田間感染原始寄主，將菌株

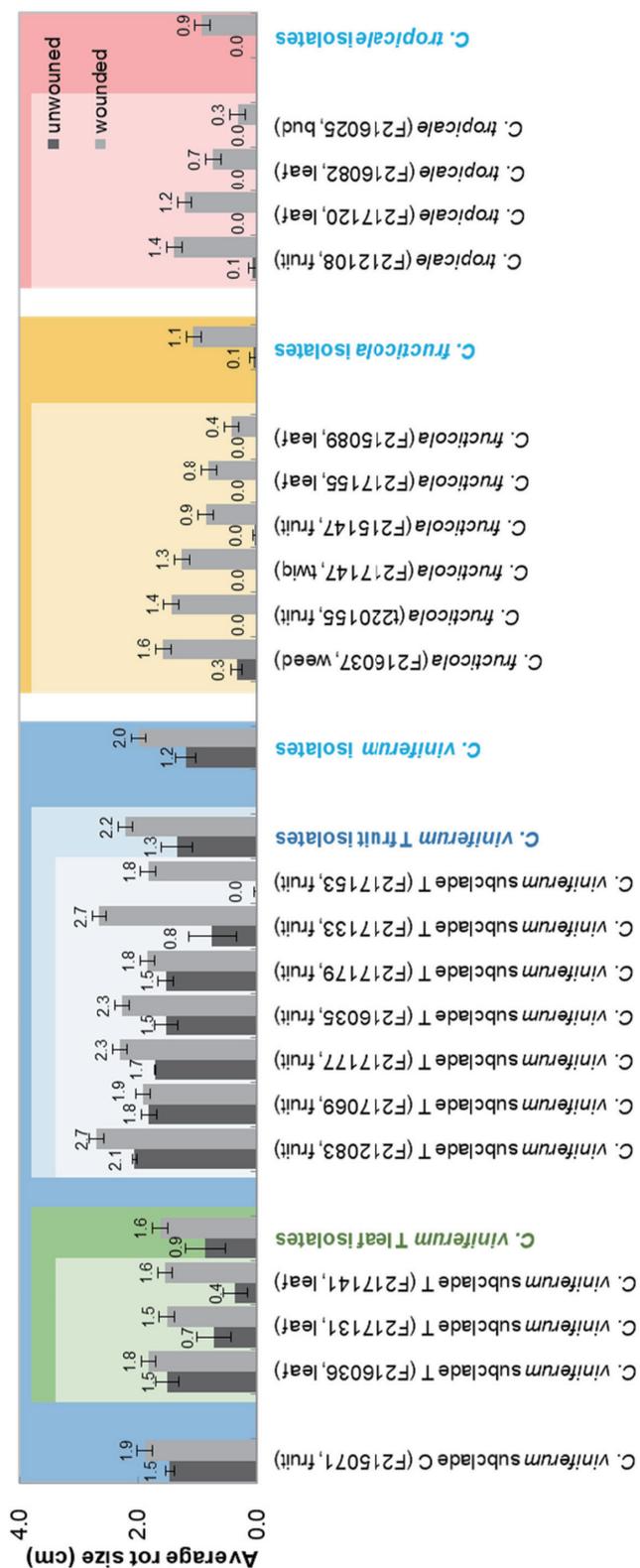


圖 1. *Colletotrichum* spp. 對葡萄果粒致病力測試 (*in vivo*)。

Fig. 1. *In vivo* pathogenicity test result of *Colletotrichum* spp. on detached grapes. The suspensions of each isolate were adjusted to 1×10^6 conidia mL^{-1} , and 10 μL of the suspension were dropped on unwounded or wounded grapes (cultivar: 'Kyoho') each time and covered by 1% agar, and then kept in dark and relative humidity (RH) > 90% for 7 d. Diameter means the average of length and width of each spot ($n = 5$), and the average diameter of 2 to 3 repeats was presented. Bar = standard error.

接種於田間發育中之葡萄幼果。在 *C. fructicola* 方面，選擇葡萄葉分離株 F215089、葡萄果分離株 F215147，以及在致病力測試中有較高毒力的牛筋草分離株 F216037；在 *C. tropicale* 方面，選擇葡萄果分離株 F212108 與葡萄枝條芽點分離株 F216025 為供試菌株。結果顯示，接種以 *C. fructicola* 葡萄果分離株 F215147 (圖 2A) 與葡萄葉分離株 F215089 者 (圖 2B)，發病率低且發病的果粒常伴隨裂果等傷口；接種牛筋草分離株 F216037 者，於接種 1 mo 後接近幼果轉色時即可觀察到病斑呈現塊狀或網狀 (圖 2C、D)，幼果轉色後病斑逐漸變褐色，於果實成熟後出現典型晚腐病病徵，嚴重感染者果皮表面下出現白色至橘色之菌絲 (圖 2E)。發病的果實皆可再回分得相同特徵的菌株，完成柯霍氏假說；對照組與以 *C. tropicale* 菌株 F212108 (圖 2F) 或 F216025 接種的果串直至成熟後皆不會產生晚腐病病徵。

植株感染

供試菌株與上述田間幼果之接種菌株相同，包括 *C. fructicola* 葡萄葉分離株 F215089、葡萄果分離株 F215147，以及牛筋草分離株 F216037，*C. tropicale* 葡萄果分離株 F212108 與葡萄芽點分離株 F216025，另加入 *C. viniferum* F217069 作為正對照組。接種 2 wk 後，除 *C. viniferum* F217069 接種的植株出現葉片斑點、褐化及腐爛等病徵外 (Lin et al. 2022)，其他 *C. fructicola* 與 *C. tropicale* 之各菌株接種的植株，包括 *C. fructicola* 葡萄葉分離株 F215089 (圖 3)，在枝條與葉片上皆沒有產生病徵，與負對照組相似。

C. fructicola 牛筋草分離株 F216037 接種牛筋草

為了確認分離自牛筋草之 *C. fructicola* 分離株 F216037 是否對牛筋草具病原性，將其分生孢子懸浮液接種在經傷痕處理之牛筋草上。經 3 d 後觀察，相較於對照組在傷口處出現僅有小範圍黃暈，處理組在接種處出現較大範圍的褐化水浸狀的腐爛 (圖 4)。無傷痕處理之接種點則處理組與水處理之對照組相似，於接種後 5 d 出現類似生理性之黃化，視為不發病。罹

病組織經組織分離可得相同特徵之菌株，完成柯霍氏法則，確認 *C. fructicola* 可感染牛筋草。

菌株特徵與生理特性

在 Lin et al. (2022) 中已闡述 *C. viniferum* 菌株特徵與生理特性，本研究針對 *C. fructicola* 與 *C. tropicale* 代表菌株瞭解其在培養基上之特徵。

C. fructicola，以 F216037 為代表描述其特徵如下：菌落似綿狀 (cottony) 中央為灰綠色，外圍為灰色到灰綠色，氣生菌絲生長微蓬鬆，菌落背面可看到帶淡黃至橘色 (圖 5A)；分生孢子透明，長橢圓形 (cylindrical)，兩端圓鈍，具明顯液胞，長度 × 寬度為 10.9–12.4–14.6 × 4.2–4.9–6.2 μm (min.–avg.–max.)，長寬比為 2.1–2.5–3.3 (圖 5B)；壓器為灰綠色到褐棕色之間，為不規則的卵狀 (irregular ovoid) 或棍棒狀 (clavate) 邊緣為圓鋸齒狀 (crenate)，長度 × 寬度為 7.3–9.1–11.5 × 4.5–6.0–7.8 μm (最大–平均–最小) (圖 5C)。F215147 菌株與 F216037 相比雖然分生孢子較小，且 F215147 菌株菌絲最適生長溫度為 24°C，而 F216037 為 28°C，但其他特徵相似，包括菌落特徵相似，4°C 以下以及 40°C 以上無法生長 (表 1)。

C. tropicale，以 F212108 為代表描述其特徵如下：菌落為淡橘色到橘色，上覆白色氣生菌絲 (圖 5D)。分生孢子透明，長橢圓形 (cylindrical)，兩端圓鈍，液胞明顯，長度 × 寬度為 12.3–13.4–15.1 × 4.5–5.2–5.6 μm，長寬比為 2.2–2.6–3.3 (圖 5E)；壓器為灰綠色到褐棕色之間，多數為不規則的卵狀，邊緣為圓鋸齒狀，長度 × 寬度為 8.4–10.3–15.1 × 5.6–7.3–10.1 μm (圖 5F)。F216025 菌株特性與 F212108 相比分生孢子較小，且 F216025 菌株菌絲最適生長溫度為 24°C，而 F212108 為 28°C，但菌落特徵相似，且都於 4°C 以下以及 40°C 以上無法生長 (表 1)。

討論

Colletotrichum spp. 對葡萄之致病力

本研究 *C. viniferum* 次支序 C 的菌株僅蒐集得 1 株，在果實無論有無傷痕處理下皆具強

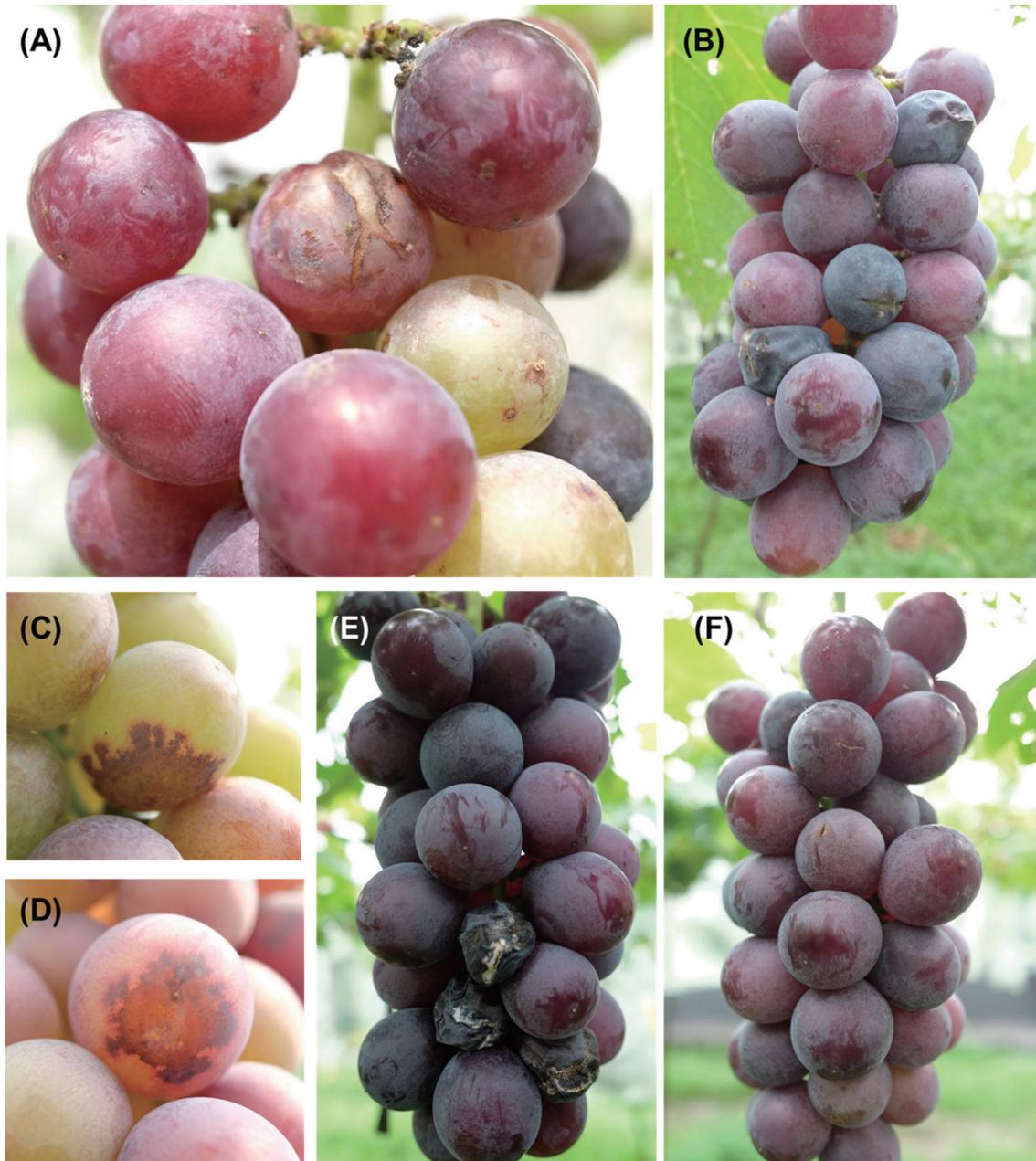


圖 2. 田間葡萄幼果以 *Colletotrichum fructicola* 菌株 (A) F215147、(B) F215089 以及 (C-E) F216037 接種後，果實成熟過程中形成之病徵。以 *C. tropicale* 菌株 F216025 與 F212108 接種者如同水處理之 (F) 負對照組不產生病徵。

Fig. 2. Symptoms of grape fruits (cultivar: 'Kyoho') inoculated by *Colletotrichum fructicola* isolate (A) F215147, (B) F215089 and (C-E) F216037 and (F) water *in planta*. The 1-month-old grape berries in the orchard were inoculated *in planta* with the conidia spore suspension (1×10^6 conidia mL⁻¹) of the isolates. After veraison, typical symptoms of grape ripe rot appeared on the berries inoculated with these *C. fructicola* isolates but not with *Colletotrichum tropicale* isolates F216025 and F212018.



圖 3. 溫室葡萄植株以 *Colletotrichum fructicola* 葡萄葉分離株 F215089 接種後不產生病徵。

Fig. 3. No obvious symptoms were found on the grape plants (cultivar: 'Kyoho') at 7 d after inoculating with *Colletotrichum fructicola* isolate F215089, which isolated from rotten grape leaf, or any of the isolates, including *C. fructicola* grape fruit isolate F215147, goose weed isolate F216037 and *C. tropicale* grape fruit isolate F212108 and grape bud isolate F216025. The potted plants were inoculated with the conidial suspension (1×10^6 conidia mL^{-1}) and then were kept in 28°C and high humidity condition (relative humidity; RH > 85%).

烈病原性。屬次支序 T 的 10 菌株中，在果實無傷痕處理下僅少數菌株造成的病斑較小，多數菌株皆能造成明顯的病斑，而在果實傷痕處理下 10 菌株皆造成明顯病斑，顯示具有強烈病原性。因為本研究蒐集得之 *C. viniferum* 次支序 C 菌株數量少而無足夠代表性，無法直接定論與次支序 C 與 T 病原性高低差異，但可確定 *C. viniferum* 對葡萄皆具強烈病原性。

在中國、日本與巴西等地的試驗研究顯

示，*C. viniferum* 平均致病力較 *C. aenigma*、*C. hebeiense*、*C. perseae*、*C. fructicola*、*C. gloeosporioides sensu stricto*、*C. kahawae* 與 *C. nymphaeae* 等菌種對葡萄果實具更高的病原性 (Yan *et al.* 2015; Yokosawa *et al.* 2020)。但 Echeverrigaray *et al.* (2020) 研究顯示，部分 *C. fructicola* 菌株可與 *C. viniferum* 菌株有差不多或更高的致病力。本研究使用分離自台灣葡萄上的不同菌種比較在離果上造成的病斑大小，從結果可知，*C. viniferum* 對葡萄果粒致病力最強，*C. fructicola* 次之，*C. tropicale* 病原性最低。

由本研究與上述研究顯示，*C. viniferum* 對葡萄果粒的致病力普遍較其他菌種高，且對葉片感染力亦較 *C. fructicola* 與 *C. tropicale* 等菌種高 (Lin *et al.* 2022 與圖 3)，對葡萄產業極具威脅。

C. viniferum 不同分離來源致病力差異

C. viniferum 次支序 T 中，無論在果粒有無傷痕處理下，葡萄果分離株 (共 7 株) 造成之平均病斑大小皆大於葡萄葉分離株 (共 3 株) (圖 1)。即使在果粒無傷口下分離自果粒的菌株 F217153 幾乎不形成病徵，致病力弱於其他葡萄葉分離株，但在果粒有傷口時，F217153 菌株造成典型晚腐病病徵，其病斑或大或相似於其他葡萄葉分離株。本研究亦取得分離自不同部位之 *C. fructicola* 與 *C. tropicale* 菌株，但數量較少代表性不足不易看出趨勢。

本試驗亦顯示傷口為 *Colletotrichum* spp. 重要的感染條件，對 *C. viniferum* 與 *C. fructicola* 而言可增加致病力；對 *C. viniferum* 部分菌株 (如 F217153)，以及尤其是對 *C. tropicale* 本研究中使用的 4 菌株而言，更為感染時不可或缺的條件，果粒無傷口下幾乎不形成病徵，果粒出現傷口下才能發展病徵。

C. fructicola 可能的田間感染生態

經由離果接種可知，本研究的 *C. fructicola* 葡萄果分離株 F215147 與其他葡萄枝條或葡萄葉分離株等，需要藉由傷口才能在果粒上造成明顯病徵，而牛筋草分離株 F216037 則不需藉由傷口即可造成感染 (圖 1)。在田間接種試驗

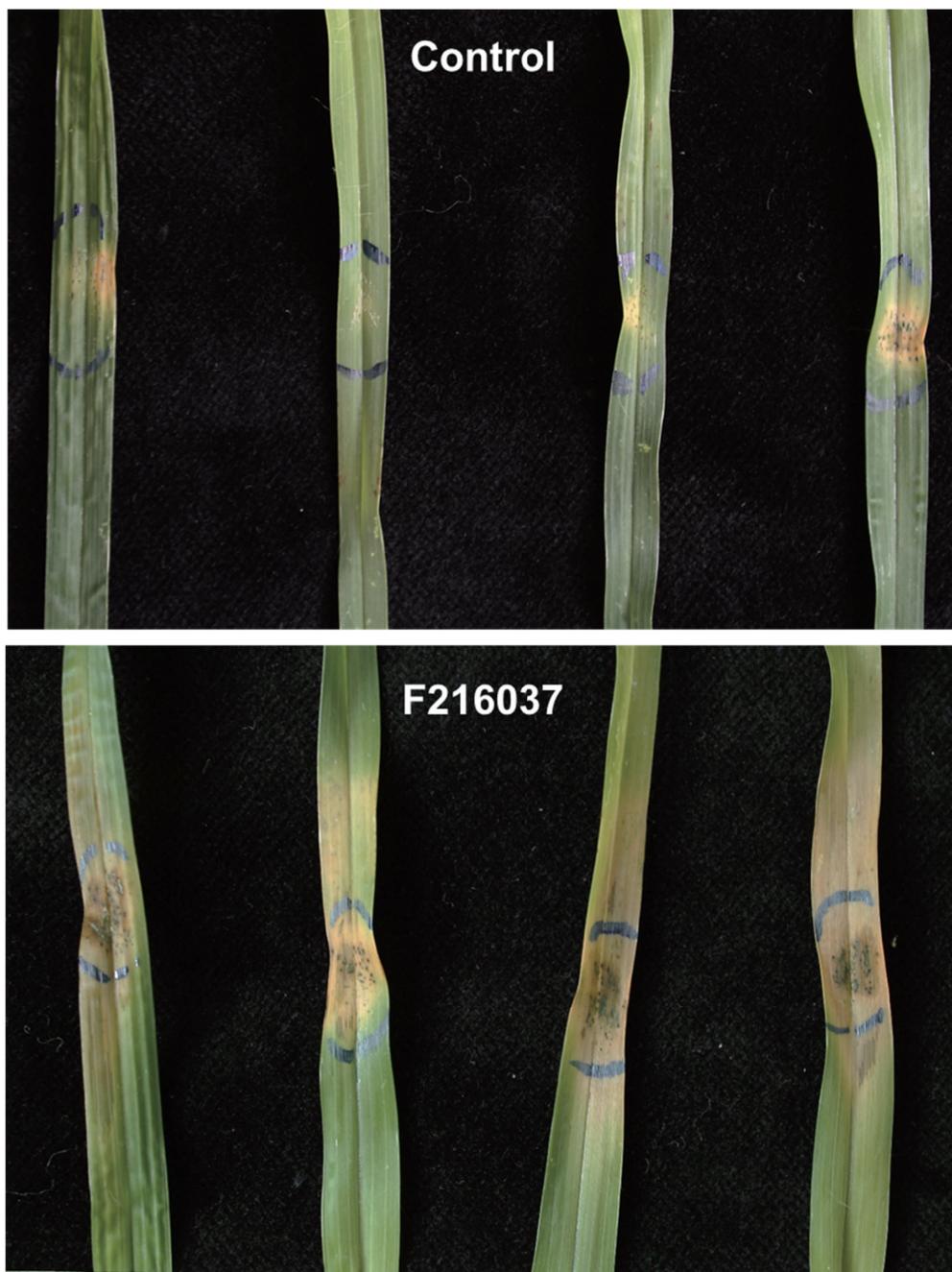


圖 4. *Colletotrichum fructicola* 菌株 F216037 感染牛筋草之病原性測試。

Fig. 4. *In vivo* pathogenicity test result of *Colletotrichum fructicola* isolate F216037 on detached leaves of goosegrass (*Eleusine indica*). The approximately 1 cm³ cotton mats were soaked in the conidial suspension (2.5×10^4 conidia mL⁻¹) as inocula, placed on the wounded inoculation sites, and kept in dark with relative humidity (RH) > 90% for 3 d. This experiment was conducted twice with similar results.

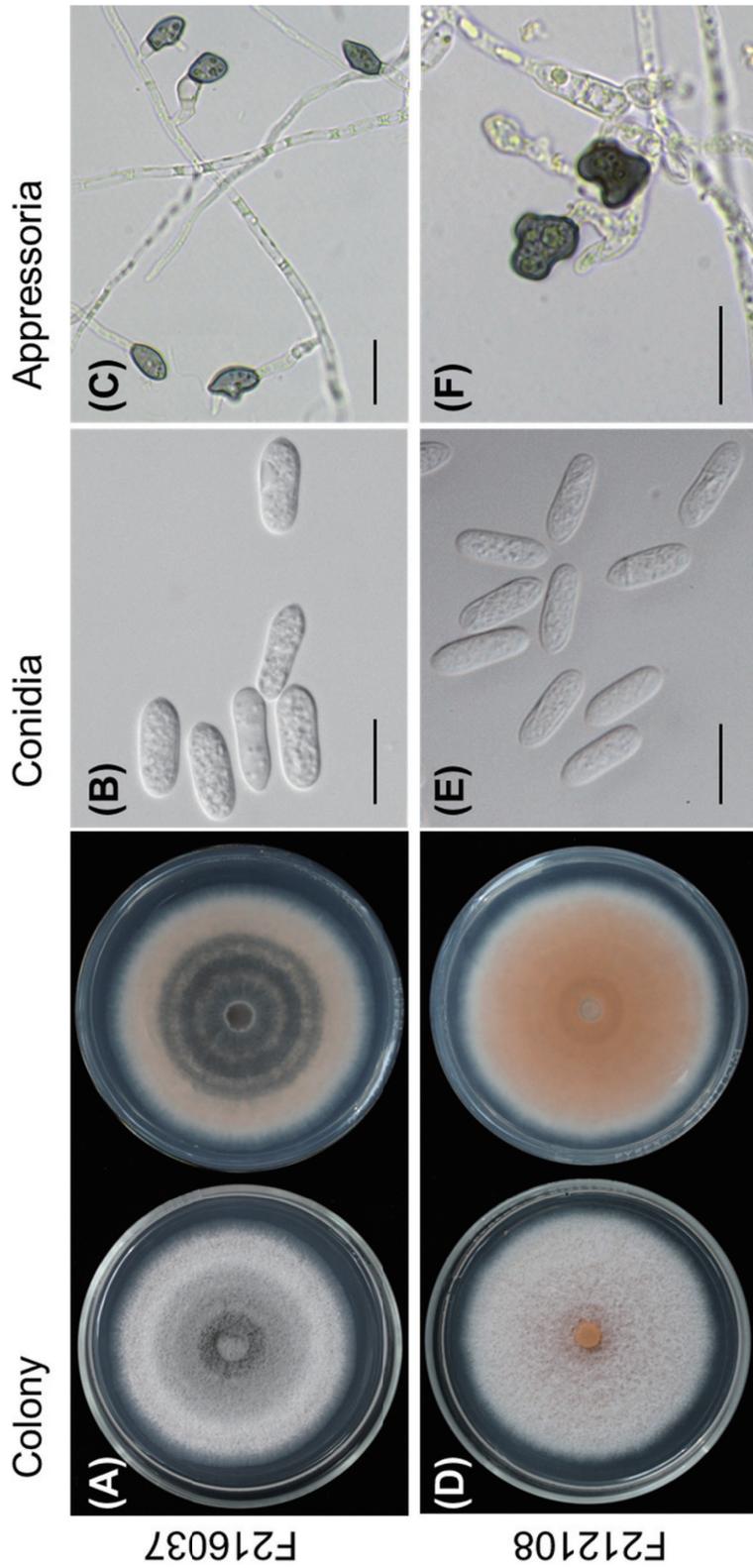


圖 5. *Colletotrichum fructicola* 菌株 F216037 與 *Colletotrichum tropicale* 菌株 F212108 菌絲形態特徵。由左至右，菌落正面與背面、分生孢子、壓器。
 Fig. 5. Morphological features of isolates of *Colletotrichum fructicola* isolate F216037 (upper row) and *Colletotrichum tropicale* F212108 (lower row). The top and reverse views of the colony, conidia, and appressoria of each isolate were illustrated in one row from left to right. Cultures were grown on potato dextrose agar (PDA) at 22–24°C under 12 h light period for 7 to 9 d. Conidia were from 7-d PDA cultures. Appressoria developed from conidia suspended in 0.5% V8 juice were induced on glass slides for 24 h. (Bar = 10 µm)

表 1. *Colletotrichum fructicola* 與 *Colletotrichum tropicale* 形態與生理特徵。Table 1. Synopsis of morphological and physical data of the *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum tropicale* isolates in Taiwan.

Isolate No.	Conidia length × width min. -avg.-max (µm)	Conidia length width ratio	Appressorium length × width min. -avg.-max (µm)	Optimum temp. for Mycelium growth (°C)	Mycelium growth rate at optimum temp (mm d ⁻¹)
<i>Colletotrichum fructicola</i>					
F215147	10.9-13.5-16.6 × 4.2-5.0-5.7	2.2-2.7-3.6	Not detected (nd)	24	5.4
F216037	10.9-12.4-14.6 × 4.2-4.9-6.2	2.1-2.5-3.3	7.3-9.1-11.5 × 4.5-6.0-7.8	28	5.5
<i>Colletotrichum tropicale</i>					
F212108	11.8-13.4-15.1 × 4.5-5.2-5.6	2.2-2.6-3.3	8.4-10.3-15.1 × 5.6-7.3-10.1	28	6.1
F216025	11.2-12.8-15.1 × 5.1-5.7-6.7	1.8-2.3-2.8	nd	24	5.7

中，接種以葡萄果分離株 F215147 與葡萄葉分離株 F215089 者，發病果粒少且常伴隨果粒裂開(圖 2A、B)，推測可能先有傷口如果粒生理性裂果或者蟲咬傷後才促進病菌入侵。接種以 *C. fructicola* 牛筋草分離株 F216037 者，發病果粒多且為典型晚腐病徵(圖 2C-E)，病徵與接種以 *C. viniferum* 次支序群 T 者病徵相似(Lin *et al.* 2022)。另亦證明 *C. fructicola* 亦可感染牛筋草(圖 4)，本試驗以離葉方式確認 *C. fructicola* 透過傷口感染牛筋草，且本研究僅在一處果園調查得牛筋草罹病。未來仍有待例如以盆栽栽種牛筋草的方式探討 *C. fructicola* 對牛筋草之致病力，並調查其他果園牛筋草罹病況。據所知本研究為 *C. fructicola* 感染葡萄之台灣首次正式病害紀錄，亦為感染牛筋草之台灣與世界首次正式病害紀錄。

由於牛筋草分離株 F216037 為 2016 年分離自新社一處葡萄園地上的牛筋草，本研究 2015 年亦同在新社區同一處果園發現罹染 *C. fructicola* 的葡萄果粒，即本研究中的 F215147 分離株，兩菌株序列與親緣關係一致(Lin *et al.* 2022)，不排除 *C. fructicola* 在該區域內交互感染葡萄果粒與牛筋草。未來需要更多田間調查，以及 *C. fructicola* 葡萄果或葉分離株試驗，如接種於牛筋草上等試驗，以證明此推論。

於台灣、中國大陸以及巴西等地的研究顯示 *C. fructicola* 是僅次於 *C. viniferum* 的重要葡萄晚腐病原(Peng *et al.* 2013; Echeverrigaray *et al.* 2020; Lin *et al.* 2022)，防治 *C. fructicola* 感染亦為管理葡萄晚腐病的重點之一。本研究確認 *C. fructicola* 可感染葡萄園內的牛筋草與葡萄果實，在田間 *C. fructicola* 可能以腐生方式存在於葡萄葉片表面，或以牛筋草做為替代寄主(alternative host)。雖然田間 *C. fructicola* 感染牛筋草的嚴重度仍需要再進一步調查，但為預先做好葡萄晚腐病防治，建議可特別注意同時預防牛筋草受 *C. fructicola* 感染，並注意移除腐爛的葉片，避免藏匿 *C. fructicola*。其他 *C. viniferum* 與 *C. tropicale* 對牛筋草或是葡萄園區常見草類之病原性亦有待探討。

C. tropicale 於田間感染方式有待研究

本試驗分離之 *C. tropicale* 菌株病原性較弱，僅在具傷口的果粒上有小範圍的病斑，而在田間接種試驗中則無法造成顯著的病徵。Duan & Chen (2020) 發現田間感染 *C. tropicale* 葡萄果，大範圍噴布孢子懸浮液於成熟葡萄果粒表面成功確認 *C. tropicale* 病原性。推測該試驗使用的菌除了可能病原性較高外，不排除菌株可能是透過蒂頭或其他不明顯之傷口感染成熟果粒。為避免田間汙染，本田間試驗係將果串浸入添加有展著劑的 *Colletotrichum* spp. 孢子懸浮液內，已知可成功讓 *C. viniferum* (Lin *et al.* 2022) 與 *C. fruticola* 感染果串並發病 (圖 2)。然而或許在不會交互汙染的狀況下，也可考慮以其他接種方式以更有利孢子停留於果實表面或保濕方法接種 *C. tropicale*，如以孢子懸浮液噴霧方式等 (Duan & Hsieh 1990)。 *C. tropicale* 於田間感染的方式需要再進一步研究。

Colletotrichum spp. 於葡萄園內生態差異

Kuo & Hseu (2003) 以及 Ko (2008) 認為晚腐病菌為 *C. gloeosporioides*，且較少感染葡萄葉片，而是在葉片上行有限的腐生繁殖。Duan & Hsieh (1991) 研究亦顯示「巨峰」及「奈加拉」品種葡萄葉片對晚腐病菌具抗性。Lin *et al.* (2022) 確認引起台灣葡萄晚腐病的主要菌種為 *C. viniferum*，然而除了可感染果實外，亦確定在田間具感染葉片的紀錄，並證實對葉片、花以及鬚具有強烈病原性。推論 Kuo & Hseu (2003)、Ko (2008) 與 Duan & Hsieh (1991) 相較於 Lin *et al.* (2022) 的差異可能為使用的菌種不同之故。

近年的分子親緣分析，早期被鑑定為 *C. gloeosporioides* 之病原多數為 *C. gloeosporioides* 複合種，包含 *C. viniferum*、*C. fruticola* 以及 *C. tropicale* 等 (Cai *et al.* 2009; Prihastuti *et al.* 2009; Weir *et al.* 2012; Peng *et al.* 2013)。Kuo & Hseu (2003) 以及 Ko (2008) 所提及之 *C. gloeosporioides* 可能也是複合種，是否有可能當時調查時優勢菌種為 *C. fruticola* 或 *C. tropicale*，而後被致病力較高的 *C. viniferum*

取代，為要確認此推論需要取得以前的菌株才能證明。

Lin *et al.* (2022) 與本研究確認從田間罹病果實、葉片或枝條分離得之 *C. fruticola* 與 *C. tropicale* 能造成程度輕微之葡萄晚腐病；然而 *C. fruticola* 與 *C. tropicale* 供試菌株接種葡萄植株後皆無法在葉片或枝條上造成明顯病徵，如同 Kuo & Hseu (2003) 以及 Ko (2008) 的說法一樣，可能是因為菌種在罹病組織上行腐生繁殖之故。

形態差異與鑑定的結果

雖然本試驗中 *C. fruticola* 與 *C. tropicale* 都出現菌株間僅菌落形態相似，菌株間分生孢子大小不同，且分生孢子大小與生長速度各別也與 *C. fruticola* 標準株 (Prihastuti *et al.* 2009) 或 *C. tropicale* 標準株描述不一 (Rojas *et al.* 2010)。然而 Weir *et al.* (2012) 以多重序列親緣關係確認 *C. fruticola* 與 *C. tropicale* 種內菌株間分生孢子以及菌絲生長速度差異大為普遍的現象，不適合作為 *C. gloeosporioides* 複合種內鑑定之依據。因此本研究以 Lin *et al.* (2022) 多重序列親緣關係分析結果為主，各別將菌株鑑定為 *C. fruticola* 與 *C. tropicale*。

誌謝

本文承蒙行政院農業委員會農業試驗所 104 農科-10.6.3-農-C1 (8)、105 農科-10.5.3-農-C1 (7)、106 農科-9.5.2-農-C1 (2)，以及 107 農科-8.4.2-農-C1 (8) 計畫經費支持，家昌綠色莊園吳家昌先生提供植株供試，陳品儒、黃麟婷、詹月梅與戴裕綸等助理協助調查與進行試驗。

引用文獻

- Cai, L., K. D. Hyde, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, J. M. Waller, M. M. Abang, J. Z. Zhang, Y. L. Yang, S. Phoulivong, Z. Y. Liu, H. Prihastuti, R. G. Shivas, E. H. C. McKenzie, and P. R. Johnston. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers.* 39:183–204.
- Duan, C. H. and W. H. Hsieh. 1990. Pathogenicity of *Glomerella cingulate* on Kyoho grape. *J. Agric.*

- Res. China 39:113–120. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.199006.0005
- Duan, C. H. and W. H. Hsieh. 1991. Inoculum sources of ripe rot of grape. *Plant Prot. Bull.* 33:275–282. (in Chinese with English abstract)
- Duan, C. H. and G. Y. Chen. 2020. Molecular identification and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from grape in Taiwan. *J. Plant Med.* 62(4):23–32. (in Chinese with English abstract) doi:10.6716/JPM.202012_62(4).0003
- Echeverrigaray, S., F. J. Scariot, G. Fontanella, F. Favaron, L. Sella, M. C. Santos, J. Schwambach, C. Pedrotti, and A. P. L. Delamare. 2020. *Colletotrichum* species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. *Plant Pathol.* 69:1504–1512. doi:10.1111/ppa.13240
- Gao, H., X. Yin, X. Jiang, H. Shi, Y. Yang, C. Wang, X. Dai, Y. Chen, and X. Wu. 2020. Diversity and spoilage potential of microbial communities associated with grape sour rot in eastern coastal areas of China. *PeerJ* 8:e9376. doi:10.7717/peerj.9376
- Ko, Y. 2008. Illustrated Book of Plant Diseases of Economic Fruit Trees in Taiwan. Yi Hsien Publishing Co. Ltd. New Taipei, Taiwan. 431 pp. (in Chinese)
- Kuo, K. C. and S. H. Hseu. 2003. Ripe rot of grape. p.115–119. *in*: Compendium of Grape Diseases and Pests (Wang, C. L., P. J. Ann, H. L. Lin, C. I. Yuan, C. P. Chang, K. C. Kuo, S. H. Hseu, Y. S. Yang, T. C. Yang, M. Y. Chiang, and T. T. Tsay) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. Taipei, Taiwan. 250 pp. (in Chinese)
- Lei, Y., X. B. Tang, R. S. Jayawardena, J. Y. Yan, X. D. Wang, M. Liu, T. Chen, X. M. Liu, J. C. Wang, and Q. X. Chen. 2016. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in southern China. *Mycosphere* 7:1177–1191. doi:10.5943/mycosphere/si/2c/8
- Lim, Y. S., O. Hassan, and T. Chang. 2020. First report of anthracnose of shine muscat caused by *Colletotrichum fructicola* in Korea. *Mycobiology* 48:75–79. doi:10.1080/12298093.2019.1697190
- Lin, C. P., C. L. Wang, J. N. Tsai, Y. L. Dai, P. J. Ann, Y. M. Zhan, and S. Y. Huang. 2022. Occurrence of grape ripe rot in Taiwan and the pathogenicity and phylogenetic relationship of its primary causal agent *Colletotrichum viniferum*. *J. Taiwan Agric. Res.* 71:135–157. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.202206_71(2).0004
- Oo, M. M. and S. K. Oh. 2017. Identification and characterization of new record of grape ripe rot disease caused by *Colletotrichum viniferum* in Korea. *Mycobiology* 45:421–425. doi:10.5941/MYCO.2017.45.4.421
- Peng, L. J., T. Sun, Y. L. Yang, L. Cai, K. D. Hyde, A. H. Bahkali, and Z. Y. Liu. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience* 54:29–41. doi:10.1016/j.myc.2012.07.006
- Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, and K. D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* 39:89–109.
- Rojas, E. I., S. A. Rehner, G. J. Samuels, S. A. Van Bael, E. A. Herre, P. Cannon, R. Chen, J. Pang, R. Wang, Y. Zhang, Y. Q. Peng, and T. Sha. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102:1318–1338. doi:10.3852/09-244
- Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73:115–180. doi:10.3114/sim0011
- Yan, J. Y., M. M. R. S. Jayawardena, I. D. Goonasekara, Y. Wang, W. Zhang, M. Liu, J. B. Huang, Z. Y. Wang, J. J. Shang, Y. L. Peng, A. Bahkali, K. D. Hyde, and X. H. Li. 2015. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. *Fungal Divers.* 71:233–246. doi:10.1007/s13225-014-0310-9
- Yokosawa, S., N. Eguchi, and T. Sato. 2020. Characterization of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing grape ripe rot in Nagano Prefecture, Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 86:163–172. doi:10.1007/s10327-020-00907-5
- Zapparata, A., D. D. Lio, S. Sarrocco, G. Vannacci, and R. Baroncelli. 2017. First report of *Colletotrichum godetiae* causing grape (*Vitis vinifera*) berry rot in Italy. *Plant Dis.* 101:1051. doi:10.1094/PDIS-12-16-1764-PDN

Virulence of *Colletotrichum* spp. from Different Isolating Source in Grape Orchards was Compared on Grape

Chu-Ping Lin^{1*}, Jyh-Nong Tsai², Pao-Jan Ann³, and Ming-Te Lu⁴

Abstract

Lin, C. P., J. N. Tsai, P. J. Ann, and M. T. Lu. 2023. Virulence of *Colletotrichum* spp. from different isolating source in grape orchards was compared on grape. *J. Taiwan Agric. Res.* 72(1):49–61.

Virulence of *Colletotrichum viniferum*, *Colletotrichum fructicola*, and *Colletotrichum tropicale* from different isolation sources were compared on grapes (*Vitis vinifera*). *In vivo* pathogenicity test on the detached grape berries showed that *C. viniferum* was the strongest virulent species, which could cause significant and larger spots of ripe rot on grape berries with or without wounds. Moreover, the virulence of fruit isolates seems to be stronger than that of the leaf isolates; *C. fructicola* was ranked second in virulence. Interestingly, the virulence of the *C. fructicola* isolate from goose weed (*Eleusine indica*) was stronger than other isolates from grape fruits and leaves; *C. tropicale* was the lowest virulent species, and all the isolates in this study required wounds to infect berries. In addition, *in planta* pathogenicity tests of *C. fructicola* and *C. tropicale* were performed. In young grapes inoculation test, only berries inoculated with isolates of *C. fructicola* could develop the typical ripe rot disease symptoms after veraison. The disease rate and symptoms were higher and severer with *C. fructicola* isolated from goose weed than those from grape isolates, while no obvious symptoms with *C. tropicale* isolates. As for whole potted plants inoculation test, no obvious disease symptoms appeared on leaves or other parts of plants inoculated with any of the selected isolates of *C. fructicola* and *C. tropicale*. To our knowledge, this study is also the first report of goose weed leaf anthracnose caused by *C. fructicola*, which showed water-soaked and browning symptoms on leaf. These data suggest that, in the field, goose weeds could be an alternative host of *C. fructicola*. *C. fructicola* might live in a saprophytic life on grape leaves, waiting for chances to infect grape berries.

Key words: Grape ripe rot, *Colletotrichum viniferum*, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum tropicale*, Virulence test.

Received: October 11, 2022; Accepted: November 24, 2022.

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

¹ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Former Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.