

台灣新紀錄真菌 *Gilbertella persicaria*

引起之紅龍果濕腐病

林筑蘋¹、安寶貞¹、蔡志濃^{1,2}、徐子惠¹、張捷婷¹

¹ 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

² 聯絡作者，Email: TsaiJN@tari.gov.tw; FAX: +886-4-23302803

接受日期：中華民國 103 年 2 月 21 日

摘要

林筑蘋、安寶貞、蔡志濃、徐子惠、張捷婷. 2014. 台灣新紀錄真菌 *Gilbertella persicaria* 造成之紅龍果濕腐病. 植病會刊 23: 109-124.

紅龍果 (*Hylocereus* spp.) 為台灣重要新興作物之一，2009 年 8 月開始，發現紅龍果果實在採收後常自切口處出現水浸狀病徵，偶而自果實表皮或鱗片開始發病，病斑迅速擴展，3-5 天內感染整顆果實，致果實軟化腐敗；在罹病果園中可發現花苞、花瓣及幼果產生褐黑色凹陷、水浸狀潰爛病徵，或是幼果發育不良情形。這些罹病組織在潮濕環境下皆會產生黑色長柄孢囊，經組織分離可分離到相同的真菌。如以該菌之孢子懸浮液接種花器與果實，花器組織在無傷痕處理下即會出現與田間觀察到的相同病徵，而果實組織則是在有傷口下會出現與市場上觀察到的相同病徵，而無傷痕處理之組織則偶而發病，表示傷口為果實發病重要因子之一。由於此類型病害在潮溼環境下較易發生，且病組織常呈現水浸狀腐爛病徵，因此命名為「紅龍果濕腐病」。藉由形態特徵與 ITS DNA 序列比對結果，確定引起紅龍果果實濕腐病的為病原菌為 *Gilbertella persicaria*。除紅龍果外，田間調查結果顯示，在秋葵 (*Abelmoschus esculentus*) 之枯萎花瓣與水蜜桃 (*Prunus persica*) 之罹病果實病組織上都曾分離到 *G. persicaria*，其中秋葵分離株對紅龍果果實具強烈致病力，然而水蜜桃分離株引起的病斑較小且病斑顏色較褐色，而其 ITS 序列與紅龍果分離株之序列具 1.63% 差異度。藉人工接種孢子懸浮液，本菌可以感染無論有無傷痕處理的水蜜桃、有傷痕處理之硬柿、梨子、李子、蘋果、芒果、及番茄，而奇異果與香蕉則沒有明顯病徵。本研究為 *G. persicaria* 在台灣引起作物病害之首度報導。

關鍵詞： *Gibertalla persicaria*、紅龍果、濕腐病、寄主範圍、儲藏期病害。

緒 言

紅龍果 (*Hylocereus* spp.)，又名火龍果，英名為 pitaya 或 dragonfruit，為台灣近年興盛發展的果樹作物之一，主要商業栽培品系以白肉種 (*H. undatus* Britt. & Rose)、紫紅肉種 (*H. costaricensis* Britt. & Rose) 及紅肉種 (*H. polyrhizus* Britt. & Rose) 為主，其中後 2 者在市場上常統稱為「紅肉」紅龍果。根據農糧署編印之台灣農業統計年報顯示，紅龍果栽種面積 101 年為 979.42 公頃，並有逐年增加的趨勢。

隨紅龍果栽培面積逐年增加，病害問題逐一浮現，除嚴重影響植株生長發育外，亦造成採收後的果實腐敗，導致果實不耐儲藏，更成為外銷時一大障礙。目前台灣紅龍果病害正式紀錄的病原，包括 3 種病毒，如仙人掌病毒 X (*Cactus virus X*, CVX) ^(8, 10, 11)、紅龍果病毒 X (*Pitaya virus X*) ⁽⁷⁾ 和蟹爪蘭 X 病毒 (*Zygocactus virus X*) ⁽¹²⁾，2 種真菌，如 *Bipolaris cactivora* (Petr.) Alcorn ⁽²⁰⁾，以及 *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers ⁽²⁾。其中 CVX 造成植株莖部出現褪綠斑點、斑駁、壞疽及黃化等病徵，嚴重影響植株的發育生長與果實品質 ^(8, 10)、*B. cactivora* 引起的果腐病可造成儲藏期果實表面出現淡褐色壞疽病斑進而腐敗，縮短樹架壽命 ⁽²⁰⁾，而 *N. dimidiatum* 引起的潰瘍病可造成枝條與果實出現斑點、潰瘍及瘡痂病徵，大幅降低果實商品價值 ⁽²⁾。

農試所真菌研究室自 2009 年開始調查紅龍果田間與

儲藏期病害，發現台灣目前最嚴重的紅龍果病害為潰瘍病，除此之外，另存在一嚴重病害，特別在降雨時期，花器與幼果容易受感染而出現水浸狀腐爛病徵；而採收後果實亦常受相同真菌感染而腐敗，大幅降低紅龍果產量與樹架壽命。本報告即為針對該新病害的病害病徵、菌株特性、DNA、定序結果及寄主範圍等之研究報告。

材料與方法

紅龍果病害組織分離、保存、培養與染色

將罹病之紅龍果果實、花器、幼果組織用自來水清洗過後，切取新鮮罹病部位約 $7 \times 7 \times 2 \text{ mm}^3$ ，經 0.5% NaClO 表面消毒 30 秒，以擦手紙吸乾表面多餘水分後，放置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, PDA; Difco) 平板培養基上，於室溫 (24 – 28 °C) 下放置 1 – 2 天，切取自罹病組織長出之單一菌絲尖端，移植於新的 PDA 平板培養基中培養，靜置於室溫下經 12 hr 光照/12 hr 黑暗光週期培養 7 天後，切取 $10 \times 10 \times 0.5 \text{ mm}^3$ 菌塊，移植於無菌礦物油 (100% mineral oil, Sigma, USA) 中保存。病菌培養方法均以 PDA 為培養基，於室溫下，經 12hr 光照/12hr 黑暗光週期培養 1 – 3 天，病菌即可產生黑色產孢構造。

為觀察孢囊形態，菌株在 PDA 平板培養基上黑暗培養 3 – 5 天後，切下菌落邊緣之新鮮菌塊，移植於白肉果實表皮 (已表面消毒) 或 PDA 之 $10 \times 10 \times 0.5 \text{ mm}^3$ 培養

基方塊上，果皮或培養基方塊放置於載玻片上，保持密閉且高濕狀態，於室溫培養 1 – 2 天後，置於解剖顯微鏡下觀察。

為觀察孢囊孢子形態與附著絲數量，將孢囊孢子小心刮取至含有 rose bengal 染劑的載玻片上，待 1 min 後蓋上蓋玻片，置於光學顯微鏡下觀察。

觀察菌株在單獨培養下是否產生接合子的培養方法如下：菌株於 PDA 平板培養基上生長 3 – 5 天，切取菌落邊緣之新鮮菌塊 ($3 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$)，放置於麥芽萃取瓊脂 (malt extract agar, MEA; Difco) 平板培養基單獨培養，並以鋁箔紙包裹避免照光，7 天後於顯微鏡下觀察是否有有性繁殖之接合子產生。共測定 F210187 與 F212122 兩菌株，每菌 1 皿，重複 1 次。

菌絲生長與溫度關係之測試

選擇 F210187 (2010 年分離自台中市大里區市場的白肉紅龍果果實)，F211128 (2011 年分離自台中市外埔區的白肉紅龍果幼果)，F212056 (2012 年分離自南投縣草屯鎮的白肉紅龍果果實)，F212122 (2012 年分離自南投縣中寮鄉的紅肉紅龍果幼果) 與 F213084 (2013 年分離自南投縣集集鎮的紅肉紅龍果果實) 共 5 菌株。菌株在 PDA 平板培養基上黑暗培養 3 – 5 天後，切下菌落邊緣之新鮮菌塊，移植於另一 PDA 平板培養基的邊緣，放置於 4 – 40 °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 重複數，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 3 天後即長滿培

養基，為避免菌絲是因受到培養皿大小限制而影響生長速率，故不採用生長 3 天後之數據，每皿每日生長速率計算方法為 (生長滿 2 天距離 – 生長滿 1 天距離)/1 天，取 3 重複數之平均值代表該菌株之生長速率。最高生長溫度測試，則將培養基放置於 36 – 40 °C (以 1 °C 為間距，共 5 個溫度)，處理與試驗重複數如上述。實驗重複 3 次。

菌絲核酸抽取、PCR 聚合酶鏈鎖反應、ITS、聚合酶鏈鎖反應、定序及核酸比對

菌株於 PDA 平板培養基上生長 3 – 5 天，切取菌落邊緣之新鮮菌塊 ($3 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$)，移植於覆蓋一層玻璃紙的 PDA 培養皿中央，在 24 °C 下培養 3 – 5 天後，刮取玻璃紙上的菌絲，經冷凍乾燥後，保存於 -20 °C 備用。將約 20 mg 冷凍乾燥的菌絲置於研鉢內，加入液態氮後磨成粉末，並委託昕穎生醫技術股份有限公司 (the Seeing Bioscience Company, Taipei, Taiwan) 抽取菌絲核酸，以及利用真菌通用引子對 ITS5/ITS4⁽²¹⁾ 進行 PCR 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)，增幅核糖體非轉錄區間 (internal transcribed spacer, ITS) 序列並加以定序。以 Vector NTI^R 10.3.1 (Invitrogen, USA) 進行多序列接合 (contingent) 與修剪 (trimming) 獲得 ITS1-5.8SrDNA-ITS2 完整序列，其中序列前後各包含 18S 與 28S 部分序列，並用 GeneDoc 2.7⁽¹⁶⁾ 聯配比較序列差異。另外，將定序後的 DNA 序列上載到 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 網站，利用 BLAST 軟體從 GenBank database 資料庫中尋找最相近的種 (specie)。

接種與傷痕處理方法

供試接種源：選擇 F210187 為供試菌株，在探討傷口對發病影響試驗中，另加入 F212122 分離株為供試菌株。菌株移植於含 PDA 的直徑 9 cm 培養皿中，經無光照培養 3-5 天後，倒入 20 mL 無菌水，以三角玻璃棒刮下表面孢子，再以 8 層紗布過濾，最後調整成 2×10^6 孢子/mL 孢子懸浮液，作為試驗之接種源。

傷痕處理：果實接種分傷痕與無傷痕接種。傷痕處理方法為以滅菌過之 10 支為一束的蟲針輕輕穿刺果實表面（深度約 1 mm）20 下；或無任何穿刺，即為無傷痕處理。

成熟果實接種：白肉紅龍果 (*Hylocereus undatus*) 樣品來源為種植於台中農業試驗所試驗田的紅龍果；病原性測試用的紅肉果實 (*H. costaricensis*, 品種為大紅) 購入自南投草屯市場。接種前，果實以 75% 酒精消毒擦拭表面，給予傷痕或無傷痕處理。將滅菌過體積約 1 cm^3 之脫脂棉花，完全浸入孢子懸浮液，對照組改以無菌水代替孢子懸浮液，靜置 1–3 min 後取出，放置於待測果實之表皮上，接種後果實放置於保鮮盒 ($16 \times 12 \times 20 \text{ cm}^3$)，並於室溫下保持高濕度狀態。每處理於單顆果實上接種 3 處，各接種 3 個果實。發病率 (infection rate) = (發病接種點) / (總接種點) $\times 100\%$ 。本試驗共重複 3 次。

花器與幼果接種：2013 年 8–10 月份期間，於農試所試驗田白肉紅龍果開完花的當天下午，感染組以孢子懸浮液噴濕花器內外，而對照組則改以無菌水代替孢子懸浮液，套上長度 45 cm 以上之透明塑膠袋保濕，外層以報紙包裹隔絕陽光直接照射。感染組每次接種 10 朵花，而對

照組則每次處理 3 朵花。本實驗共重複 3 次。

不同寄主來源分離株對紅龍果果實之病原性

於台中市場隨機調查得褐色腐敗之水蜜桃，以及於台中外埔紅龍果園周圍發現長有黑色長柄孢囊之秋葵花，利用上述組織分離方法：病組織以 0.5% NaClO 表面消毒後以 PDA 平板培養基培養，純化得分離株 F209130 (分離自水蜜桃果實) 與 F213151 (分離自秋葵花器)。觀察形態特性與用引子對 ITS5/ITS4 增幅 ITS 進行序列鑑定，確認病原種類為 *G. persicaria*。利用前述成熟果實接種方式，測試 2 分離株能否亦感染紅龍果：白肉成熟果實接種點分為傷痕或無傷痕處理，以孢子懸浮液作為接種源，2 天內觀察接種點發病狀況。本實驗共重複 2 次。

人工接種測試寄主範圍

於 7-10 月間隨機自草屯果菜市場購買常見之水果果實，包括水蜜桃 (*Prunus persica*)；梨子 (*Pyrus pyrifolia*, 新興梨)；李子 (*Prunus salicina*)；硬柿 (*Diospyros kaki*)；番茄 (*Solanum lycopersicum*, 聖女)；芒果 (*Mangifera indica*, 愛文)；蘋果 (*Malus domestica*, 富士)；香蕉 (*Musa sapientum*)；綠色奇異果 (*Actinidia deliciosa*)，以 10 支為一束的蟲針輕輕穿刺果實表面 20 下 (深度約 1 mm)，製造傷口，或不做任何穿刺處理。以體積約 1 cm^3 無菌棉花浸於濃度為 2×10^6 /mL 的孢子懸浮液中 1-3 min，再放置於每顆果實之傷口或無傷口接種點，每種果實 (每顆接種點數量，處理果實數量) 處理數量如下：水蜜桃 (1, 4)；

梨子 (1, 6); 李子 (2, 2); 硬柿 (2, 2); 番茄 (1, 4); 芒果 (3, 2); 蘋果 (2, 2); 香蕉 (3, 1); 奇異果 (2, 1)。對照組接種含無菌水之脫脂棉花。接種後，所有果實放置於保鮮盒內，並於室溫下維持高濕度狀態，至少觀察 7 天，若有病徵出現者，表面滅菌後，再經組織分離試驗判別病徵是否由接種病菌所引起。每種水果各重複 2 次。

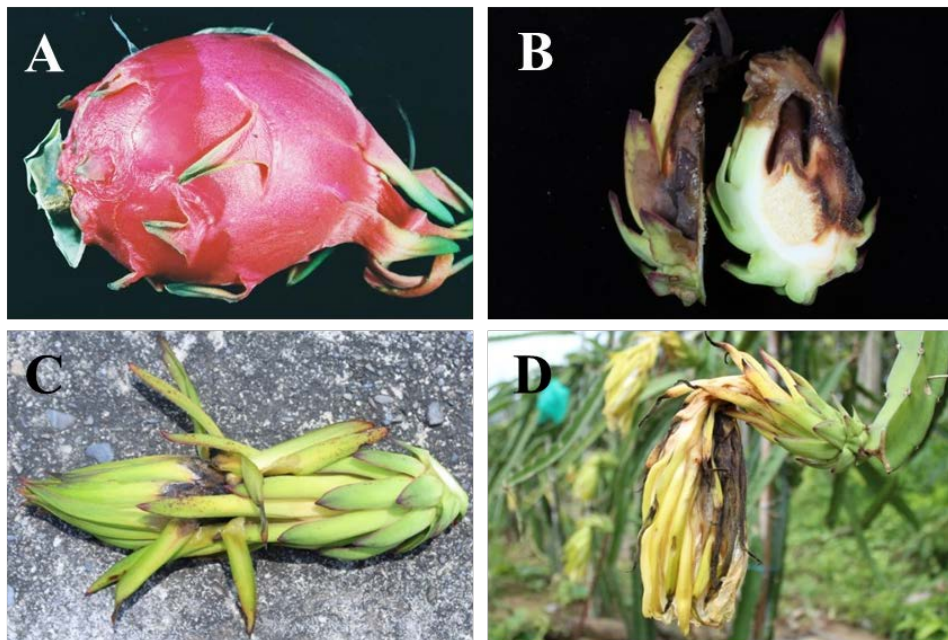
結 果

紅龍果濕腐病病害發生與病原菌鑑定

自西元 2009 年 8 月份開始，調查各地果園與市場 (包括新竹、台中、南投、彰化、嘉義、台南、高雄、屏東、宜蘭、花蓮、台東、澎湖等地) 紅龍果果實採收前與儲藏期病害，發現無論紅肉或白肉品種，果實常常自果梗切口

處往果肉組織出現水浸狀大面積且界線分明的濕腐病徵，病斑擴展迅速，2 – 3 天後佈滿整個果實，果實完全軟腐。用手輕觸，腐敗果皮立即脫落 (圖一 A)，有時病害亦會自果皮或鱗片開始。全台儲藏期發生率約 3 – 30%，視不同地區或雨季與否而定；在連續降雨後，陸續發現各地果園的幼果柱頭果皮與果肉亦出現褐變腐敗，致果實無法正常發育 (圖一 B)；而花苞 (圖一 C) 或花瓣 (圖一 D) 容易產生水浸狀潰爛情形，甚而落花、落果。

在潮濕狀況下，罹病果皮、幼果、花器組織上會長出大量黑褐色霉狀物，長度 0.5 – 1.5 cm，為病菌的長柄孢囊構造，用手輕觸會散發黑色孢子粉末。而後調查全台各主要產區，幾乎都有此病害問題，雨後發病率約 10 – 50%。將呈現濕腐病徵之成熟果實、幼果及花器採集後，自罹病



圖一、 *Gilbertella persicaria* 引起紅龍果果實(A)、幼果(B)、花苞 (C)，以及花瓣 (D)濕腐病之病徵。

Fig. 1. *Gilbertella persicaria* caused wet rot symptoms on pitaya harvested fruit (A), young fruit (B), flower bud (C), and petals (D).

組織進行病原菌分離，皆分離到相同形態特徵的真菌。由於病害常在降雨季節特別嚴重，而且在病組織上產生水浸狀腐爛病徵，故稱之為「紅龍果濕腐病」。本研究自全台

17 鄉鎮共分離得 84 株菌株（表一），亦曾在台東、花蓮與新竹地區發現罹病花器與果實（資料未顯示），幾乎遍及全台。

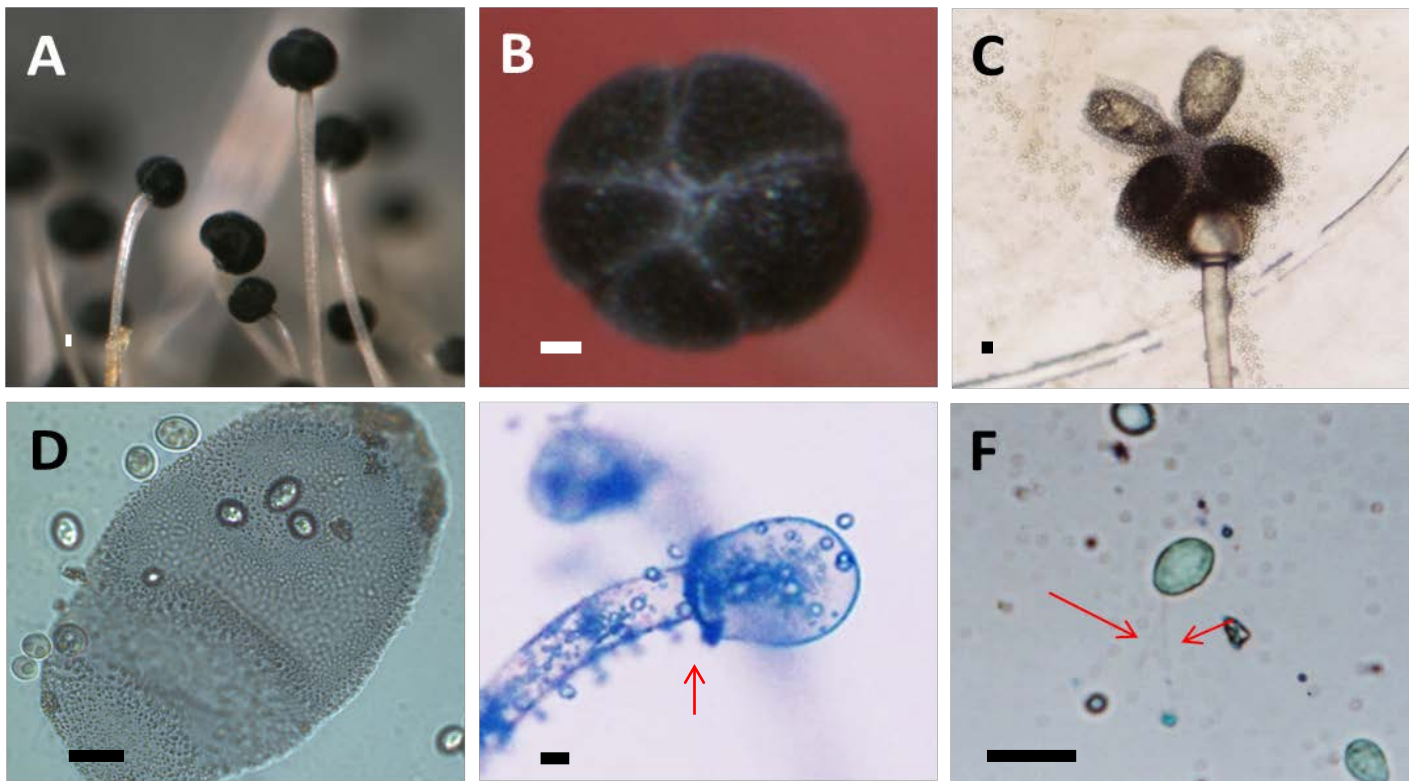
表一、台灣紅龍果上 *Gilbertella persicaria* 之分離情形

Table 1. Isolation of *Gilbertella persicaria* from pitaya in Taiwan

Name of host	Infected site	Isolation no.	Location	Year of isolation
<i>Hylocereus undatus</i>	Harvested fruit	F209072-73	Market (Taichung)	2009
<i>H. undatus</i>	Harvested fruit	F210187-90	Market (Taichung)	2010
<i>H. costaricensis</i>	Harvested fruit	F210266	Chichi, Nantou	2010
<i>H. undatus</i>	Young fruit	F211128-30	Waipu, Taichung	2011
<i>H. undatus</i>	Harvested fruit	F212056-57	Caotun, Nantou	2012
<i>H. costaricensis</i>	Harvested fruit	F212113	Chichi, Nantou	2012
<i>H. undatus</i>	Harvested fruit	F212115	Wufeng, Taichung	2012
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F212118-24, 56-57	Chungliao, Nantou	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212146, 49, 53	Chungliao, Nantou	2012
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F212160-64	Chichi, Nantou	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212175	Chichi, Nantou	2012
<i>H. undatus</i>	Flower	F212176-77	Erlin, Changhua	2012
<i>H. undatus</i>	Young fruit	F212202-03, 08	Erlin, Changhua	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212220	Fongshan, Kaohsiung	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212224	Neipu, Pingtung	2012
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F212231	Neipu, Pingtung	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212240-41	Changjhih, Pingtung	2012
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F212242-44	Changjhih, Pingtung	2012
<i>H. undatus</i>	Harvested fruit	F212258-61	Caotun, Nantou	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212300-02, 06-08, 10	Taibao, Chiayi	2012
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F212321-22	Chimei, Penghu	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212331-39	Sanshing, Yilan	2012
<i>H. costaricensis</i>	Flower	F212347-50	Chungliao, Nantou	2012
<i>H. undatus</i>	Young fruit	F212365-67	Erlin, Changhua	2012
<i>H. costaricensis</i>	Harvested fruit	F213084, 96-97	Chichi, Nantou	2013
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F213105	Chichi, Nantou	2013
<i>H. undatus</i>	Harvested fruit	F213154	Dongshan, Tainan	2013
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F213176-77	Pushin, Changhua	2013
<i>H. costaricensis</i>	Young fruit	F213178-79	Mingjian, Nantou	2013
<i>H. undatus</i>	Harvested fruit	F213181	Wandan, Pingtung	2013

以菌株 F210187 為代表，描述分離菌株的形態特性。在 PDA 上生長時，菌落初為白或淡黃色，菌絲透明，沒有假根 (rhizoids)。該菌在紅龍果果皮與 PDA 上均可產生菌絲與孢囊，孢囊 (sporangia) 形成於長柄狀的孢囊柄 (sporangiohores)，而孢囊柄多數單生、偶爾分歧，褐黑色，直立或彎曲 (圖二 A)，長度為 0.8 – 15.7 mm (Avg. 5.4 mm)，直徑 18.2 – 50.0 μm (Avg. 34.1 μm)。孢囊在未成熟時為白色圓形，逐漸轉變成褐色，成熟後呈現深黑褐色不

規則圓形，直徑 60 – 115 μm (Avg. 80.4 μm)，且孢囊壁 (sporangial walls) 具有 1 條以上的縱向裂縫 (圖二 B)。成熟時孢囊壁自裂縫分裂成面積大致均勻的 2 – 5 片，多為 4 片 (圖二 C)，偶而達 7 片，表面有細小之顆粒 (圖二 D)。孢囊內有柱軸 (columella) 與孢囊孢子 (sporangiospores)，柱軸 25.0 – 60.0 $\mu\text{m} \times 25 - 60.0 \mu\text{m}$ (Avg. 42.7 $\mu\text{m} \times 39.7 \mu\text{m}$)，基部具有領 (collar) (圖二 E)，與孢囊柄間具隔板區分開；孢囊孢子著生在柱軸上，透明、



圖二、*Gibbertella persicaria* 分離株 F210187 接種於果實 (A - B) 或培養於 PDA (C - F) 上產生的無性繁殖構造。A: 成熟孢囊，大部分孢囊柄呈微彎曲狀；B: 孢囊具孢囊壁，壁上具縱裂縫；C: 孢囊壁可分裂成 2 - 5 片，圖中為 4 片；D: 孢囊壁上具細小顆粒；E: 孢囊柱軸，基部具有領；F: 具附著絲之孢囊孢子。

Fig. 2. Morphology of asexual reproduction structures of *Gibbertella persicaria* isolate F210187 produced on fruit tissues (A - B) and PDA (C - F). A: mature sporangia produced on curved (mostly) sporangiophores. B: persistent sporangial wall with longitudinal sutures. C: sporangial wall could separate into 2 - 5 pieces (in the case of this picture were 4 pieces). D: sporangial wall covered with crystalline spines. E: a columella with collar (arrow). F: a spore with two hyaline appendages (arrows), stained by rose bengal. Bar = 10 μm .

圓或橢圓形 (圖二 F)，大小 $5.5 - 11.8 \mu\text{m} \times 4.5 - 8.8 \mu\text{m}$ (Avg. $8.0 \mu\text{m} \times 6.0 \mu\text{m}$)，頭尾端具有 0–3 根透明附著絲，長 $10.0 - 20.0 \mu\text{m}$ (Avg. $15.1 \mu\text{m}$)。除 F210187 外，另觀察 F211128、F212056、F212122 與 F213084，共 5 菌株，其孢囊壁分裂狀況與孢囊孢子附著絲數量皆相似 (資料未顯示)。將 F210187 培養在無光照之 MEA 平板培養基 7 天以上，可發現橢圓形之厚膜孢子 (chlamydospores) 形成，大小 $18.9 - 25.4 \mu\text{m} \times 14.9 - 23.8 \mu\text{m}$ (Avg. $22.2 \mu\text{m} \times 21.1 \mu\text{m}$) (圖三)。除 F210187 外，另觀察 F212122，共 2 菌株，個別以 MEA 平板培養基單獨培養菌株，結果顯示單獨培養下均不會產生有性繁殖的接合子 (zygospore)。

在 PDA 平板培養基上，菌株之菌絲可於 $12 - 36 \text{ }^\circ\text{C}$ 間生長，在 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 下生長最快速， $8 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下及 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上則完全不生長 (圖四)。進一步以 1 度為間距，測其最高生長溫度為 $37 - 39 \text{ }^\circ\text{C}$ 之間，隨不同菌株略為不同 (資料未顯示)。



圖三、*Gibbertella persicaria* 分離株 F210187 在 MEA 平板培養基上產生之厚膜孢子。

Fig. 3. An intercalary chlamydospore produced by the isolate F210187 of *Gibbertella persicaria* on MEA. Bar = $10 \mu\text{m}$.

根據菌種形態與生理特徵，分離到的菌株除孢囊壁分裂況與孢囊孢子附著絲數量外，皆符合 Benny 在 1991 年對 *Gilbertella persicaria* (Eddy) Hesseltnine 菌株的描述 (1)。

將菌株以真菌通用引子對 ITS5/ITS4 增幅 ITS1-5.8SrDNA-ITS2 序列，其中序列前後各包含 18S 與 28S 部分序列，全長為 675 bp。以 3 菌株，F210187、F212122 及 F213084 為例，可得 100% 相同序列 (圖五)。經比對，與 GeneBank 核酸資料庫登錄之 JQ951601.1，中國大陸紅龍果濕腐病徵之病原 *G. persicaria* ITS1-5.8SrDNA-ITS2 序列 (6)，序列相同度為 100%。

經形態、生理特性與序列鑑定，確認分離之菌株為 *G. persicaria*。

儲藏期果實與田間花器接種 *Gilbertella persicaria*

紅龍果白肉品種 (*H. undatus*) 的成熟果實在接種 *G. persicaria* 菌株 F210187 24 hr 後，有針刺傷痕處理之接種點組織開始出現軟化現象，並呈現暗紅色的水浸狀濕腐病徵；接種 48 hr 後，病斑逐漸擴大，部分接種點產生菌絲，並可看到黑色孢囊柄形成；無傷痕處理者，則無病害發生。紅肉 (*H. costaricensis*) 成熟果發病狀況亦相似。

為了解 *G. persicaria* 對紅龍果結果的影響，在白肉紅龍果花開 24 hr 內即進行孢子懸浮液接種。接種 1 天後，花瓣邊緣出現水浸狀濕腐；接種 2 天後，雄蕊以及柱頭開始出現水浸狀、組織褐化情形；接種 8 天後，發現接種之花器雖然仍可持續結成幼果，但蒂頭組織可能因為感染嚴重而褐化潰爛，果實果頂變形，甚至在接種 15 天後出現

不均勻轉色現象；接種後約 1 個月，可發現接種的果實體積平均較對照組小，部分果實明顯縮小，果肉組織海綿化，且種子呈褐色，完全無可食用價值。

以上處理組之病徵皆與田間或市場上觀察到的病徵相同，且皆能重新自接種點分離到相同型態特徵之真菌，對照組都無明顯病徵出現。本試驗完成柯霍氏法則

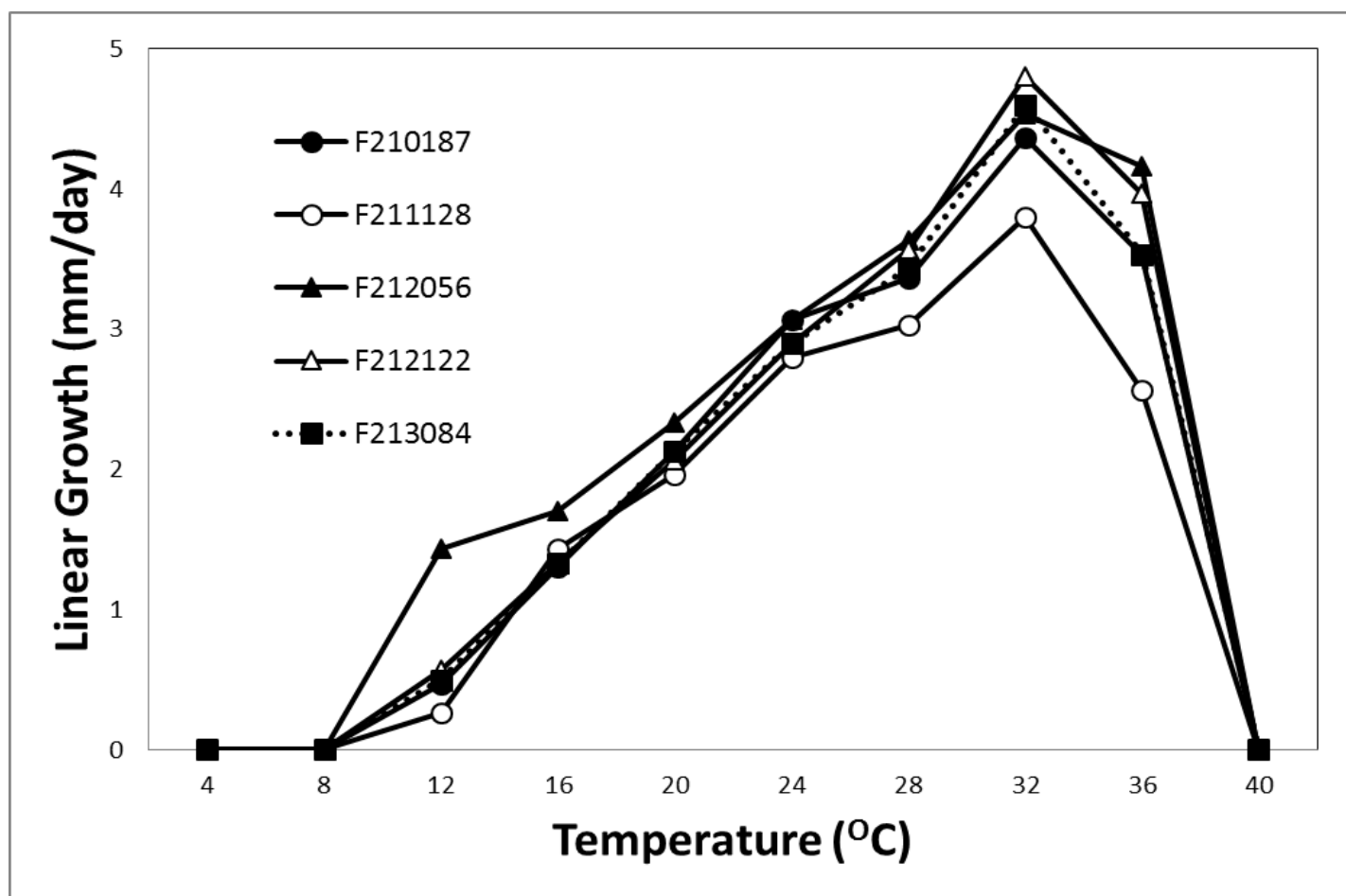
(Koch's postulates)，確認紅龍果花萼

之濕腐病為相同病原真菌 *G. persicaria* 引起。

傷口與 *G. persicaria* 病害發生的關係

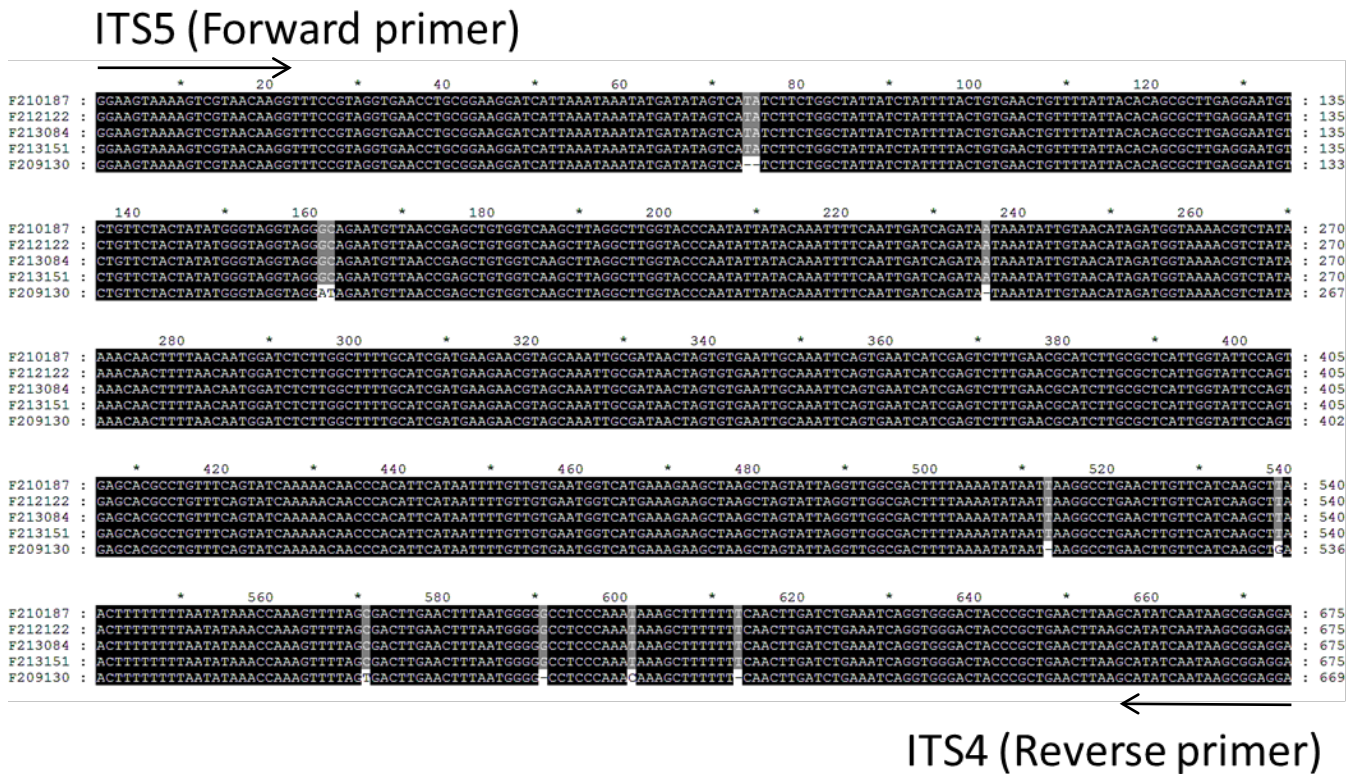
為了解傷口對 *G. persicaria* 感染紅龍果果實之影響，

除 F210187 菌株外，另加入 F212122 分離株觀察傷痕處理



圖四、紅龍果濕腐病 *Gibbertella persicaria* 菌株 F210187、F211128、F212056、F212122 與 F213084 菌絲在不同溫度下的直線生長情形。

Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Gibbertella persicaria* isolates F210187, F211128, F212056, F212122, and F213084. Cultures were grown on PDA in petri dishes (diam. 9 cm) for 2 days. Linear growth rates were shown as average of 3 replicates of each isolates in a single experiment. This experiment was repeated for 3 times with similar results.



圖五、 *Gibbertella persicaria* 紅龍果 (F210187, F212122 及 F213084), 秋葵 (F213151) 與水蜜桃分離株 (F209130) 以真菌通用性引子對 ITS5/ITS4 增幅出之 ITS1-5.8SrDNA-ITS2 多重序列聯配比較, 其中序列前後各包含 18S 與 28S 部分序列。

Fig. 5. Multiple sequences alignment of ITS1-5.8SrDNA-ITS2 sequence of *Gibbertella persicaria* isolates from pitaya (F210187, F212122 and F213084), okra (F213151) and peach (F209130). These sequences were amplified by fungal universal primers ITS5/ITS4 as shown by arrows and including partial 18S and 28S sequences in the 5'- and 3'-end respectively.

對紅龍果果實發病的影響性 (表二)。結果顯示, 兩個分離株的發病狀況略有不同, 傷痕處理接種 F212122 菌株者, 接種 24 hr 後即 100% 發病, 隨後病斑發展迅速, 無傷痕處理者發病較慢, 接種 48 hr 後才出現病徵, 發病率為 77.7 ± 29.8 (平均值 \pm 標準誤差) %。F210187 唯有傷痕處理者在接種 24 hr 後發病達 100%, 無傷口者直至接種 72 hr 都不會出現類似的病徵, 發病率為 0%。由結果

可知, 不同菌株的致病力 (virulence) 有差異, 而且果實在有傷口的狀況下較容易受 *G. persicaria* 感染, 無受傷時雖然亦有可能受感染, 但發病率較低。

不同 *G. persicaria* 寄主分離株對紅龍果果實病原性之探討

本實驗室曾於 2009 年發現台中市場水蜜桃 (*Prunus*

表二、傷痕處理對紅龍果果實接種 *Gilbertella persicaria*¹ 發病率的影響Table 2. Effect of wounded treatment on infection rates of pitaya fruit caused by *Gilbertella persicaria*¹.

Isolate	dpi ²	Infection rates (%) ³	
		Unwounded	Wounded
F212122	1	0	100
	2	77.7 ± 29.8	100
F210187	1	0	100
	2	0	100

¹ The harvested fruits (*Hylocereus undatus*) were unwounded or wounded by bug needles and inoculated with a piece of cotton which was pre-immersed in spore suspensions of *Gilbertella persicaria* isolates F212122 or F210187 (2×10^6 spores/ml) for 1 - 3 min and infection rates was counted at 72 hr post inoculation. This experiment was repeated for 2 times.

² “dpi” stands for “days post inoculation”.

³ Infection rates were presented as mean ± standard error % and counted as follows: (infected inoculation sites) / (total inoculation sites) × 100%.

persica) 果實表面出現褐色腐敗，並長出黑色孢囊；2013 年於台中外埔紅龍果果園外圍，觀察到秋葵 (*Abelmoschus esculentus*) 已結小果的花瓣皺縮褐化，經組織分離純化、形態及生理特徵鑑定，確認水蜜桃與秋葵分離株 (各別為 F209130 及 F213151) 為 *G. persicaria*。為了解不同寄主分離株是否也對紅龍果具病原性，於紅龍果成熟果實上接種 F209130 及 F213151，結果顯示 2 菌株皆在果實有傷痕處理下可成功發展病害。其中秋葵分離株產生的病斑與紅龍果分離株 F210187 相似，然而水蜜桃分離株產生的病徵顏色較淡，且病斑較小，致病力較弱 (資料未顯示)。進一步定序與分析 ITS1-5.8SrDNA-ITS2 序列，秋葵分離株 (F213151) 與紅龍果分離株 (F210187、F212122 及 F213084) 序列長度與相同度為 100 %，而水蜜桃分離株者 (F209130)，全長共 669 bp (圖五)，較紅龍果分離株缺少 6 bp (T74, A75, A236, T513, G591, T613)，差異 5 bp (G161A, C162T, T539G, C571T, T601C)，序列具有 1.63%

不同，於 GeneBank 比對，結果與 HM999958.1 相同度為 100%，而 HM999958.1 為 *G. persicaria* 之標準菌株 CBS 190.32⁽¹⁾之序列。

人工接種測試 *G. persicaria* 寄主範圍

為了解紅龍果濕腐病菌在台灣可能的寄主範圍，自草屯果菜市場隨機購買台灣常見之水果果實，包括水蜜桃、梨子、番茄、奇異果、香蕉、愛文芒果、硬柿以及李子，接種 *G. persicaria* 紅龍果分離株 F210187 後放置於高濕的環境下。部分果實接種 24 hr 後陸續出現病徵，於接種 72 hr 後病害發生最明顯，發病狀況如表三。結果顯示，水蜜桃最感病，無論有無傷口處理，接種 24 hr 後陸續出現水浸狀褐斑、組織軟化，面積逐漸擴大，接種 48 hr 後發病率達 100%。蘋果、芒果、梨、硬柿、李子與番瓜果實在有傷痕處理下才會發病：蘋果與芒果發病率各別為 91.7 ± 8.3% 與 87.5 ± 12.5%，接種點表皮破裂，周圍出現小範

表三、*Gibbertela persicaria* 人工接種夏季常見水果之發病狀況¹Table 3. Host ranges tests of *Gibbertela persicaria* on various harvested fruits¹

Name of tested fruit	Infection rates (%) ²	
	Unwounded	Wounded
Apple (<i>Malus domestica</i>)	0	87.5 ± 12.5
Banana (<i>Musa sapientum</i>)	0	0
Kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>)	0	0
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	0	91.7 ± 8.3
Peach (<i>Prunus persica</i>)	100	100
Pear (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	0	100
Persimmon (<i>Diospyros kaki</i>)	0	100
Plum (<i>Prunus salicina</i>)	0	100
Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	0	100

¹ Fruits were unwounded or wounded by bug needles and inoculated with a piece of cotton which was pre-immersed in spore suspensions of *G. persicaria* isolate F210187 for 1 - 3 min. This experiment was repeated for 2 times.

² The inoculation sites were counted as infected only if soft-rot symptoms appeared within 7 days post inoculation and *G. persicaria* can be reisolated again.

圍的水浸狀濕軟，面積並不會持續擴大；梨子、硬柿與李子發病率 100%，病徵與水蜜桃病徵相似；番茄發病率 100%，表面褪色，並出現灰白色斑點，組織出現水浸狀濕軟。以上病組織經組織分離皆能再分離到 *G. persicaria*，而其相對應之對照組於接種 72 hr 後傷口結痂癒合，有時會出現表皮破裂現象，但都不會有水浸狀病斑出現，而且未曾分離到 *G. persicaria*。而奇異果與香蕉無論有無傷口處理，直至接種 7 天後都沒有明顯病徵出現，且也無法分離出 *G. persicaria*。

討 論

日本⁽¹⁹⁾與中國⁽⁶⁾分別於 2005 年與 2011 年發現真菌可造成儲藏期紅龍果果實腐敗軟化，且在潮濕環境下，會自果皮表面長出具長柄的黑色孢囊。但日本報導的病原菌

為 *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill.；而中國報導的為 *G. persicaria*。*R. stolonifer* 與 *G. persicaria*，均屬於 *Mucorales*，此兩菌種的無性世代都可產生大量黑色長柄孢囊，但 *R. stolonifer* 最大特徵為具有假根，孢囊柄直立，且孢囊直徑可高達 300 μm，孢囊成熟後，孢囊壁會碎裂並且消失，最高生長溫度為 33°C^(9, 18)；而 *G. persicaria* 不具假根，孢囊柄直立或微彎曲，孢囊直徑在 100 μm 以下，孢囊壁具 1 縱向裂縫，孢囊成熟後自縱向裂縫分裂成面積大約相同的 2 片，並且不會消失，最高生長溫度根據紀錄可高達 40°C^(1, 5)，兩者形態特徵與生理特性有明顯差異。引起台灣紅龍果濕腐的病原菌，雖然根據本研究觀察條件，並非所有孢囊孢子都具有附著絲，而且孢囊壁上的縱裂縫可能有 1 - 4 條以上，將孢囊壁分裂成大致相同的 2 - 5 片，多為 4 片，偶而可達 7 片。但除此之外，其他形態

構造與生理特徵與 Benny (1991) 描述之 *G. persicaria* 相同⁽⁴⁾，再加上此病原菌之 ITS rDNA 序列與中國大陸紅龍果濕腐病徵之病原 *G. persicaria* JQ951601.1 序列相同度為 100%⁽⁶⁾，確認台灣紅龍果濕腐病病原為 *G. persicaria*。

G. persicaria 為異宗交配 (heterothallic)，需要有不同交配型，(+) 與 (-)，菌株菌絲互相接觸接合後才會產生接合子⁽¹⁷⁾。本研究指出，台灣濕腐病病原 *G. persicaria* 單獨培養皆無法產生有性繁殖體接合子，然而，目前無合適之標準交配型可供為基準，未來有待引進標準交配型菌株進行配對測試，以便了解台灣 *G. persicaria* 交配型存在狀況，以及其在田間產生有性構造的可能性。

本研究將開花後 24 hr 內的花器接種 *G. persicaria*，觀察病原菌對後續結果的影響。結果顯示部分果實出現果頂變形，而果頂原本為花器與果實組織的交界處，可能是因為花器嚴重感染並延伸至果實，造成後續果頂變形；另外，部分染病果實容易提早轉色，果實體積較正常果實為小；而嚴重染病之果實果肉組織海綿化，種子呈褐色（正常為黑色），無法正常結果。吾人推測 *G. persicaria* 感染花器與柱頭後可能會導致授粉不良，果實發育受阻礙，無法正常發育成果肉與種子。本研究為首次指出 *G. persicaria* 感染花器後會影響紅龍果結果的報導。

果實在有傷痕處理下接種後發病率高、發病速率快，部分菌株甚至需要有傷痕處理才能進行感染。結果顯示 *G. persicaria* 在田間可能多藉由傷口感染果實，而觀察市場果實之濕腐病徵亦常見由果梗切口處發病，推測病菌孢子可能普遍存在田間，採果時果梗出現傷口，病菌由傷口

入侵；也可能採果的剪刀帶病菌，在剪下果實的同時也將病菌接種上去，造成採收後果實發生濕腐病。田間調查時，於紅龍果果園旁正在凋謝的秋葵花瓣上分離到 *G. persicaria*，且經過人工接種方式顯示，此菌株對紅龍果果實具有強烈的致病性，不排除秋葵花可能成為非產季時 *G. persicaria* 的替代寄主 (alternate host)。

於台中市場隨機調查時，亦曾自水蜜桃果實病組織上分離到 *G. persicaria*，菌株代號 F209130，但其在紅龍果果實上的致病性稍弱。進一步比對 ITS1-5.8S-ITS2 DNA 序列，結果顯示 F209130 與 *G. persicaria* 標準株 CBS 190.32，序列相同度為 100%，但與紅龍果分離株有 1.63% 差異。F209130 與 CBS 190.32 皆分離自水蜜桃，而 F209130 的病原性與序列都跟紅龍果分離株有些微差異，不同寄主分離株是否含有寄主偏好性，或是菌株是否產生分化，都是未來值得探討的研究議題之一。然而，目前本實驗室在水蜜桃上只發現過單一次的感染狀況，沒有足夠的不同寄主分離株可供測試，而 *G. persicaria* 在台灣之寄主範圍亦有待持續調查。

國外報告指出，*G. persicaria* 可感染桃^(4, 5, 15)、梨⁽¹⁴⁾、*Prunus* sp.⁽³⁾及番茄⁽¹³⁾。本研究為了解 *G. persicaria* 在台灣可能的影響範圍，利用人工接種方式測試 *G. persicaria* 紅龍果分離株對不同果實的病原性。與國外報導相似的是，高經濟價值之水蜜桃無論有無傷痕處理都容易受到 *G. persicaria* 紅龍果分離株感染，但是梨子以及番茄只在傷痕處理下接種才會出現水浸病徵，顯示台灣紅龍果分離株之致病力與國外文獻報導有些微差異；進一步測試，其

他台灣常見之水果，包括蘋果、芒果、硬柿以及李子，在傷痕處理下接種紅龍果分離株後，均會出現水浸狀病徵，顯示 *G. persicaria* 有機會成為台灣多種水果儲藏期病原，而上述之果實則為可能的潛在寄主，在搬運過程中果實易發生碰撞導致表面出現傷口，此時若不慎感染 *G. persicaria*，配合密閉紙箱內形成的高溫高濕狀態，容易促使果實快速發病，降低商品價值。

根據病菌之形態特徵與 ITS1-5.8SrDNA-ITS2 序列比對結果，本研究首次發現 *G. persicaria* 存在於台灣，亦首次發現 *G. persicaria* 可嚴重危害紅龍果花器與幼果。目前台灣 *G. persicaria* 交配型分布狀況未知，菌株的形態與文獻顯示之 *G. persicaria* 特徵有些微差異，而台灣 *G. persicaria* 紅龍果分離株是否為變異或分化型等，未來都需要持續研究。此外，該菌亦可存在我國的水蜜桃果實與秋葵花器上，而利用人工接種方式，發現有多種水果可為該菌的寄主，因而顯示 *G. persicaria* 對台灣農業生產具有相當的影響，宜持續調查與追蹤。

誌 謝

本研究承農委會科技計畫 [100 農科-9.2.2-農-C4，101 農科-10.2.2-農-C1(2)，102 農科-10.2.2-農-C2(13)]補助試驗經費，及黃鴻章教授修正英文，謹此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Benny, G. L. 1991. Gilbertellaceae, a new family of the mucorales (Zygomycetes). *Mycologia* 83: 150-157.
2. Chuang, M. F., Ni, H. F., Yang, H. R., Shu, S. L., Lai, S. Y., and Jiang, Y. L. 2012. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Dis.* 96: 906.
3. French, A. M. 1989. California Plant Disease Host Index. Calif. Dept. Food Agric., Sacramento, p394.
4. Ginting, C. 1992. Gilbertella rot of peaches caused by *G. persicaria* in South Carolina. *Plant Dis.* 76: 753.
5. Ginting, G., Zehr, I. E., and Westcott, S. W. III. 1996. Inoculum sources and characterization of isolates of *Gilbertella persicaria* from peach fruit in South Carolina. *Plant Dis.* 80:1129-1134.
6. Guo, L. W., Wu, Y. X., Mao, Z. C., He, Y. Q., and Ho, H. H. 2012. Storage rot of dragon fruit caused by *Gilbertella persicaria*. *Plant Dis.* 96: 1826.
7. Li, Y. S., Mao, C. H., and Chang, Y. C. 2010. Characterization of a new pitaya-infecting potyvirus and the construction of its infectious cDNA clone. *Plant Pathol. Bull.* 19:111. (Abstract)
8. Liao, J. Y., Chang, C. A., Yan, C. R., Chen, Y. C., and Deng, T. C. 2003. Detection and incidence of *Cactus virus X* on pitaya in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 12:225-234. (in Chinese with English abstract).

9. Liou G. Y., Chen S. R., Wei Y. H., Lee F. L., Fu H. M., Yuan G. F., and Stalpers J. A. 2007. Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. Mycol. Res. 111:196-203.
10. Liou, M. R. Hung, C. L., and Liou, R. F. 2001. First report of *Cactus virus X* on *Hylocereus undatus* (Cactaceae) in Taiwan. Plant Dis. 85:229.
11. Liou, M. R., Hung, C. L., and Liou, R. F. 2004. Characterization of a *Cactus virus X* Infecting *Hylocereus undatus* and its detection by DAS-ELISA. Plant Pathol. Bull. 13: 27-34. (in Chinese with English abstract).
12. Mao, C. H., Lu, Y. C., and Chang Y. C. 2008. Molecular characterization analysis and field survey of new *Zygodactylus virus X* from pitaya. Plant Pathol. Bull. 17:97-98. (Abstract, in Chinese).
13. Mehrotra, M. D. 1964. Fruit rot of tomato caused by *Gilbertella persicaria*. Sydowia 17: 17-19.
14. Mehrotra, M. D. 1964. Fruit rot of pear caused by *Gilbertella persicaria* var *indica*. Sydowia 17: 124-125.
15. Mehrotra, M. D. 1966. Fruit rot of peach by *Gilbertella persicaria* var. *indica* from India. Mycopathologia et mycologia applicata 29:151-154.
16. Nicholas, K. B., Nicholas Jr H. B., and Deerfield II D. W. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. Embnew News 4: 1-4.
17. O'Donnell, K. L., Ellis, J. J. Hesseltine, C. W., and Hooper, G. R. 1977. Zygosporogenesis in *Gilbertella persicaria*. Can. J. Bot. 55: 662-675.
18. Schipper, M. A. A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. 1. The *Rh. stolonifer* group and *Rh. oryzae*. Stud. Mycol. 25: 1-19.
19. Taba, S., Moronizato, Z., Ooshiro, A., and Teruya, K. 2005. Rhizopus rot of pitaya (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britt. & Rose) caused by *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg: Fries) Vuillemin var. *stolonifer*. Jpn. J. Phytopathol. 71: 213-214. (in Japanese).
20. Wang, C. L. and Lin, C. C. 2005. Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14:269-274. (in Chinese with English abstract).
21. White, T. J., Bruns, T., Lee, J., 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, Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds): Academic press, San Diego, California, USA.

ABSTRACT

Lin, J. P., Ann, P. J., Tsai, J. N., Hsu, Z. H., and Chang, J. T. 2014. Flower and Fruit Wet Rot of pitaya (*Hylocereus* spp.) Caused by *Gilbertella persicaria*, a New Disease Record in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23: 109-124. (¹ Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, COA, Wufeng, Taichung, Taiwan; ² Corresponding author, E-mail: TsaiJN@tari.gov.tw; FAX: +886-4-23302803)

Pitaya (*Hylocereus* spp.) is one of the important emerging fruit crops in Taiwan. Fruit wet rot, a severe postharvest disease of pitaya caused by *Gilbertella persicaria*, was first found in August 2009. Fruit infection occurred in the field during rainy season with a small water-soaked lesion around the stem-end, which developed into fruit soft rot within 3-5 days after harvest. Occasionally, fruit soft rot initiated from lesions on fruit skin or scales were also observed. Results of survey of pitaya orchards in 2010 showed that infection of *G. persicaria* on young fruits or on flower buds and petals resulted in the development of symptoms similar to that observed in 2009. Most of the infected fruits in the orchard failed to develop normally and dropped prematurely. Brown to black sporangia of *G. persicaria* were formed on the surface of infected tissues, especially under humid conditions. Young pitaya fruits and flowers collected from the field were inoculated by *G. persicaria* resulted in the development of soft rot symptoms identical to that observed in the orchards and tissue wounding was an important factor affecting the disease severity. In addition to morphological characteristics, identity of *G. persicaria* from pitaya was also confirmed by ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence analysis. Results of artificial inoculations also showed that isolates of *G. persicaria* from pitaya were pathogenic on fruits of peach and wounded fruits of apple, mango, persimmon, plum and tomato, but they were non-pathogenic on banana and kiwifruits. *Gilbertella persicaria* is a new record fungal pathogen causing wet rot of pitaya in Taiwan.

Key words: *Gilbertella persicaria*, postharvest disease, host range, *Hylocereus* spp., pitaya, wet rot.