

臺灣新紀錄甜椒果腐病菌(*Phomopsis capsici*)之病原性鑑定¹

沈原民²、趙佳鴻²、張淑婷³、劉興隆⁴

摘 要

2009年與2010年九月，位於埔里鎮的甜椒園內出現甜椒果實腐敗的徵狀，造成嚴重損失。果實上有水浸狀的凹陷病斑，從病斑上分離出的真菌以其寄主範圍與形態特徵鑑定為*Phomopsis capsici*。測試此真菌的病原性，可感染有傷口的甜椒果實，並從病斑處再分離可得到相同的真菌，但在接種時如果沒有在果實表面製造傷口則不會出現病徵。包括成熟的與未成熟的甜椒果實在接種病原菌後都會受到感染，但未成熟甜椒上形成的褐化病斑小於在成熟果實上的病斑。我們也測試甜椒果腐病菌的寄主專一性，除能感染甜椒外，青椒、辣椒、番茄、茄子的果實也會受此果腐病菌感染並形成果腐病徵。本研究發現由*P. capsici*引起的甜椒果腐病是在臺灣的新病例，且*P. capsici*是臺灣的新紀錄真菌。

關鍵字：甜椒擬莖點霉、間座殼屬、甜椒果腐病、寄主範圍。

前 言

甜椒(sweet pepper、bell pepper)是一種常見的果菜類作物，屬於*Capsicum annuum*眾多栽培種裡的一群，與其他番椒類作物在臺灣合計種植面積約有2,300公頃。西元2009年莫拉克颱風過後，埔里地區的設施甜椒園內有許多成熟的甜椒果實罹病，果實呈現腐爛的症狀，在發病嚴重的時期，病果佔每日採收果實總數的75%以上。當地不同品種的甜椒果實(如Sunny、科卡、紅蘋果等)均受到感染，相同的問題於2010年9月也出現在埔里地區的其他設施甜椒園而造成損失。文獻指出在臺灣為害番椒屬(*Capsicum* sp.)植物果實的病原紀錄有多種*Colletotrichum*屬炭疽病菌^(1,15)、*Botrytis cinerea*⁽⁴⁾、*Sclerotinia sclerotiorum*⁽³⁾、*Phomopsis vexans*⁽¹⁴⁾等真菌，及*Erwinia*與*Xanthomonas*屬之細菌^(2,17)。初步診斷發現此果腐病並非上述病原所引起，確實值得進一步探討研究。本文主要目的在於鑑定造成甜椒果腐病的病原菌，及確認此病原菌對甜椒或其他寄主的果實之致病能力，祈作為甜椒病害管理之參考。

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0727號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

³ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究助理。

⁴ 行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員。

材料與方法

病原分離與鑑定

一、病原真菌之分離

罹病甜椒果實採自南投縣埔里鎮的設施栽培甜椒園，從罹病組織與健康部位的交界處以「組織分離法」分離真菌。用解剖刀切約3 mm²的病健部組織，放入0.6%次氯酸鈉(Clorox)溶液消毒3分鐘，以無菌水漂洗兩次，將已表面消毒的組織放置於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(Potato dextrose agar, PDA)(Difco)平板上，培養數天後形成菌落，取尖端菌絲塊移至PDA上進行後續試驗，受試菌株BCRC34727寄存於食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)。

二、真菌鑑定

真菌特性之描述包括果實上引起的病徵與分離培養在PDA上的形態，孢子與細部特徵以光學顯微鏡(Leica)在放大倍率400倍觀察，描述孢子的最小值、平均值與最大值。此外利用真菌分子序列分析來輔助鑑定，流程如下：(1)真菌核酸抽取：從PDA培養之菌株，刮下約100 mg之菌絲體置入離心管內，以液態氮磨碎，使用植物基因體DNA純化試劑組(Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System, Viogene)萃取真菌基因體DNA，最後溶解於40 µl無菌蒸餾水。(2)聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)：將上述核酸溶液序列稀釋為10倍及100倍，利用ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')與ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')引子⁽⁶⁾搭配聚合酶鏈鎖反應套組(PCR Master Mix Kit, GeneMark)進行PCR反應，增幅出真菌rDNA之ITS (Internal transcribed spacer) 1-5.8S rDNA-ITS2序列。PCR溫度反應條件為94℃/5 min；30個循環之「94℃/45 sec、52℃/45 sec、72℃/2 min」；72℃/7 min。(3)經洋菜膠體電泳確認有增幅出目標核酸片段後，委託源資生技公司以ITS1引子進行定序(Applied Biosystems 3730)，使用網路 BLAST 程序，比對NCBI (National Center for Biotechnology Information)資料庫中的生物序列。

三、菌落培養及光照之影響

將從甜椒果實分離出的真菌培養在含有15 ml PDA、直徑9 cm的塑膠培養皿內，在24℃溫度下進行循環光照及全黑暗兩種處理。循環光照設定每天接收6000 lux (measure by Lutron LM-8000)日光燈光照11 hr、黑暗13 hr；而全黑暗處理組將培養皿個別以鋁箔紙包覆，再用黑色絨布包住，營造每日24 hr的黑暗環境。兩種處理各接種5個培養皿，放置在同一個生長箱內。一週後測量菌絲生長直徑，方法為測量菌落垂直兩軸線的生長直徑，減去原來接種菌塊的長度再取平均值，除以培養天數後可計算出菌絲的生長速率；接種後兩週，觀察菌落表面是否形成黑色的柄子殼(pycnidia)，在解剖顯微鏡下計算獨立形成的柄子殼數量，再由兩週的菌絲生長直徑估算菌落面積，換算單位面積內柄子殼的數量。

於甜椒果實上測定病原性

一、病原菌接種與再分離

將甜椒果腐病菌BCRC34727分離株接種至健康、已轉色的甜椒果實。選擇品種為Sunny

之黃色甜椒與科卡或紅蘋果之紅色甜椒果實(from Enza Zaden)，先用70%酒精擦拭表面，用解剖刀在果實上切出邊長5 mm、深度2 mm的「 Γ 」字形開口，打開後置入5 mm² PDA 培養不含柄子殼的甜椒果腐病菌菌絲塊，再把原本的果實組織蓋上，每顆果實接種4個點，兩種甜椒品種各做3顆果實的重複處理。對照組之甜椒果實採用未接菌的PDA塊，以相同的方法埋入果實組織，品種及重複數與接種處理組相同。另外，將兩種甜椒品種再各取2顆果實，在同一顆果實上做2點的病原接種處理、2點的對照處理。上述總計在甜椒果實上有32個點埋入果腐病菌，有32個點埋入對照的PDA塊。最後將甜椒果實放入封閉的塑膠盒內，放置於24℃生長箱，5天後檢視結果。待病斑從果實上產生後，用前述的組織分離法分離真菌、觀察形態是否與原接種菌株相符。以上病原接種與再分離之流程共試驗兩次。

二、傷口影響及病組織接種

取甜椒果腐病菌BCRC34727分離株，以不造成傷口及造成傷口兩種方法接種至健康、已轉色的Sunny黃色甜椒果實。第一種方法不造成傷口，取5 mm² PDA培養不含柄子殼的菌塊，將菌絲面朝下，以膠帶(Scotch, 3M)貼在果實表面，每顆果實接種2個點，接種3顆果實；第二種方法會造成傷口，即前述將果腐菌菌塊埋入 Γ 字形果實傷口之接種方法，每顆果實接種2個點，共接種3顆果實。接種後的果實放置在塑膠盒內，於24℃、5天後觀察傷口存在與否對甜椒果腐病發病的影響。

後續試驗將接種時的果實傷口面積縮小，以滅菌後的解剖刀尖端刺傷果實，造成長度與深度都小於1 mm的小傷口再進行接種，作3種不同接種來源之處理，接種源如下：(1)設施甜椒園田間病果上的水浸狀凹陷病斑。(2)甜椒果腐病菌BCRC34727分離株在PDA上培養的菌絲。(3)以甜椒果腐病菌BCRC34727分離株的菌絲接種健康甜椒果實後，在果實上產生的水浸狀凹陷病斑。將上述3種接種源，以解剖刀沾取果實病斑的組織或PDA上微量的白色菌絲(小於1 mm³)，接種入健康果實上預先刺傷的小傷口。每顆果實接種2個點，每種處理接種3顆果實，共6個點的重複處理。對照組在果實表面造成傷口後不作其他處理，重複數與處理組相同。將不同處理的甜椒果實分別放入封閉的塑膠盒內，放置於24℃、無光照之生長箱，5天後檢視結果。將病斑直徑長度平均後，利用SPSS 15.0套裝軟體(SPSS Inc.)，以變方分析法(Analysis of variance, ANOVA)比較處理均值之間的差異。

三、病菌對不同成熟度的甜椒之影響

準備兩種不同成熟度的Sunny品種甜椒：分別為尚未轉色仍為綠色的未成熟甜椒，及已轉為黃色的成熟甜椒。在不同成熟度的甜椒上接種甜椒果腐病菌BCRC34727分離株，比較病徵與感染程度的差異。先用70%酒精擦拭果實表面，用解剖刀在果實上刺長度與深度都小於1 mm的小傷口，接種入小於傷口之甜椒果腐病菌PDA培養菌絲塊，每顆果實接種2個點，未成熟甜椒與成熟甜椒各接種3顆果實。對照組包括未成熟的甜椒與成熟的甜椒，在果實表面造成傷口後不作其他處理，重複數與處理組相同。將不同處理的甜椒果實分別放入封閉的塑膠盒內，放置於24℃、無光照之生長箱，5天後檢視結果。將病斑直徑長度平均後，以ANOVA變方分析比較處理均值間的差異。

甜椒果腐病菌接種不同種類的果實

準備不同植物的果實，包括甜椒、青椒、辣椒、番茄、茄子、胡瓜、絲瓜、敏豆、秋葵、番石榴、木瓜、梨，其中辣椒與番茄包括未成熟尚未轉色的果實與成熟已轉色的果實，其餘種類使用成熟的果實進行試驗。先以70%酒精擦拭果實表面，以解剖刀刺入長度與深度都小於1 mm的小傷口，將PDA培養之甜椒果腐病菌BCRC34727分離株的菌絲接種到不同種類的果實上，對照組以相同方法造成傷口但不接種真菌，各種類果實準備足夠數量，處理組與對照組各做4個接種點的重複處理，將不同處理的果實分別放入封閉的塑膠盒內，放置於24℃、無光照之生長箱，3天後檢視結果。

結 果

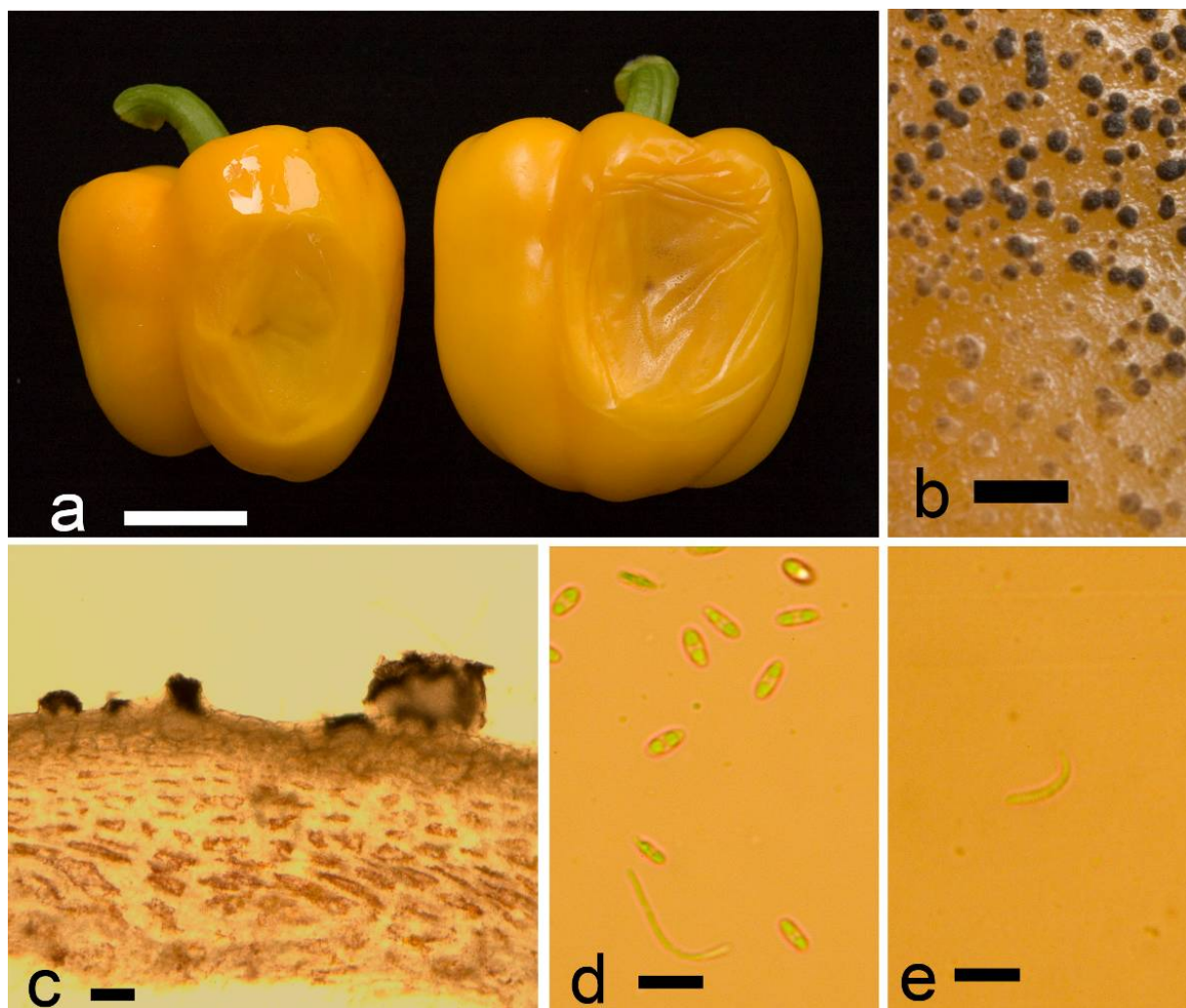
病徵觀察與病原鑑定

田間受到果腐病菌感染的甜椒果實會呈現水浸狀軟化的病徵，在表面凹陷皺縮，造成果實腐爛(圖一a)。初期病斑較為平滑，而後皺褶逐漸增加，嚴重感染處形成黑色的真菌柄子殼(pycnidia)(圖一b)，後期於軟化部位持續向下凹陷，病斑顏色轉為褐色至黑色。從病斑上分離到一株真菌(BCRC34727)，在實驗室環境培養於PDA上可形成許多黑色的柄子殼，大小約1 mm，部份柄子殼內無分生孢子，部份柄子殼內只具有一型分生孢子，少數柄子殼內具有兩型分生孢子。長絲狀的 β 孢子較常形成於PDA上，無色、單細胞，常呈鉤狀，孢子長寬為 $(15.5)-18.8-(37.8) \times (0.8)-1.1-(1.5) \mu\text{m}$ (n=56)， α 孢子罕見於PDA上，卵形至長橢圓形，無色、單細胞，周圍平滑，內部具兩油滴(guttulate)，長寬為 $(4.8)-6.0-(7.5) \times (2.3)-2.6-(3.0) \mu\text{m}$ (n=18)。將此菌株人為接種在甜椒果實上會形成柄子殼(圖一c)，寬度與高度為 $165-350 \times 70-175 \mu\text{m}$ (n=18)，果實上的柄子殼內皆含有兩型分生孢子(圖一d)，與在PDA上培養的孢子形態相同，果實上的 β 孢子長寬為 $(12.5)-16.4-(25.5) \times (0.8)-1.0-(1.3) \mu\text{m}$ (n=45)， α 孢子長寬為 $(5.0)-6.0-(7.5) \times (2.0)-2.7-(3.3) \mu\text{m}$ (n=45)。此外，在果實上還觀察到少數孢子的形態介於前述兩型孢子之間，稱之為 γ 孢子(圖一e)，孢子長寬為 $(8.8)-10.8-(13.8) \times (1.3)-1.9-(2.5) \mu\text{m}$ (n=8)。

分離得到的菌株於ITS序列定序完成後，結果上傳至NCBI基因庫(GenBank accession No. GU591548)。由寄主範圍、甜椒果實上與真菌培養在培養基上的孢子形態觀察、輔以序列比對排除部份近似的物種，將從甜椒果腐病罹病部位分離出之BCRC34727菌株鑑定為*Phomopsis capsici* (Magnaghi) Sacc. 1916 (表三)。

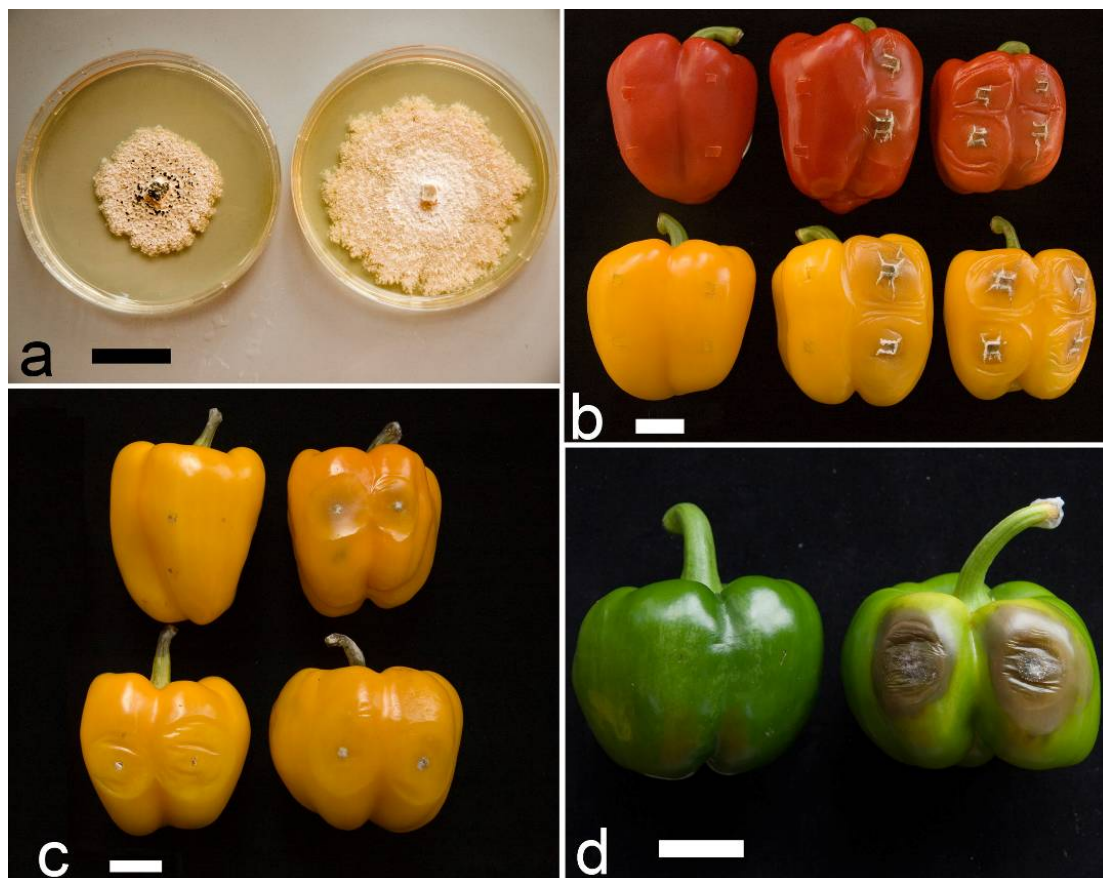
菌落培養及光照之影響

甜椒果腐病菌BCRC34727分離株在PDA上培養的菌落生長緻密，表面與背面都呈白色至米白色(圖二a)，而後菌落背面呈淡褐色至灰黑色，在培養時培養基內無其他色素產出。在黑暗與光照環境時生長速率與柄子殼形成情形不同，全黑暗環境培養甜椒果腐病菌之菌絲生長速率較快，約為循環光照條件時的2倍(表一)，以24℃ PDA培養時，平均生長速率分別為每日6.39與3.10 mm。然而，全黑暗條件下果腐病菌無法形成柄子殼，而在循環光照時，果腐病菌會產生柄子殼，多數集中在靠近菌落中心的區域(表一、圖二a)。



圖一、甜椒果腐病菌。a：田間採收後水浸狀凹陷的果腐病病徵，右側果實已產生柄子殼。比例尺為 3 cm。b：田間病果上生成的柄子殼。上方為成熟的柄子殼，下方為未完全成熟的柄子殼。比例尺為 1 mm。c：甜椒果實接種病菌後在果實上的柄子殼。比例尺為 100 μm 。d：兩型分生孢子。包括具有兩個油滴的 α 孢子與 L 形的 β 孢子。比例尺為 10 μm 。e：第三型的 γ 分生孢子。比例尺為 10 μm 。

Fig. 1. Sweet pepper fruit rot caused by *Phomopsis capsici*. a. Water-soaked lesions and sunken symptoms of fruit rot on field-collected fruits. The fruit at the right side had pycnidia produced. Scale = 3 cm. b. Pycnidia produced on field-collected fruits. Both mature (upper side) and immature (lower side) pycnidia were presented. Scale = 1 mm. c. Pycnidia on fruit of sweet pepper inoculated with the pathogen. Scale = 100 μm . d. Two types of conidia, including 2-guttulated α -conidia and L-shape β -conidium. Scale = 10 μm . e. The third type of γ conidium. Scale = 10 μm .



圖二、甜椒果腐病菌菌落形態與病原性試驗。比例尺長度皆為 3 cm。a：甜椒果腐病菌在 PDA 上於 24℃ 培養 2 週的菌落形態。左為循環光照，右為全黑暗環境培養。b：病原接種 7 天後之發病情形。左側是接種無菌 PDA 之對照組，右側接種甜椒果腐病菌。c：不同接種源接種 7 天後之發病情形。左上為未接種之對照果實，左下果實接種田間果腐病果的罹病組織，右上接種 BCRC34727 甜椒果腐病菌在 PDA 培養之菌絲，右下接種用的罹病組織來自以 BCRC34727 甜椒果腐病菌接種健康果實後產生果腐病徵的甜椒。所有接種的果實都產生水浸狀病斑。d：未成熟甜椒接種病原後 9 天之發病情形。左為未接種之對照果實，右為接種甜椒果腐病菌於果實上產生褐色病斑的情形。

Fig. 2. Colony morphologies and pathogenicity tests of *Phomopsis capsici*. Scales = 3 cm in all figures. a. Effect of light on mycelia of *P. capsici* cultured on PDA at 24℃ for 2 weeks. Left: alternate light regime. Right: 24 hr dark. b. Pathogenicity tests at 7 days after inoculation. Left: sterile PDA control. Right: inoculated with the fruit rot fungus. c. Pathogenicity tests by different inocula at 7 days post-inoculation. Upper left: non-inoculated control. Lower left: inoculated with diseased tissues of field-collected fruit. Upper right: inoculated with hyphae of *P. capsici* BCRC34727 from PDA culture. Lower right: inoculated with diseased tissues of fruits which were inoculated with *P. capsici* BCRC34727. All the inoculated fruits produced water-soaked lesions. d. Pathogenicity tests of immature sweet pepper fruits at 9 days post-inoculation. Left: non-inoculated control. Right: inoculated with the fruit rot fungus, brownish lesions were produced on the immature fruit.

表一、光照對甜椒果腐病菌菌落生長與柄子殼生成之影響，病原菌於 24℃ 培養在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基上

Table 1. Effect of light on mycelial growth rate and pycnidial production of sweet pepper fruit rot pathogen (*Phomopsis capsici*) at 24°C on potato dextrose agar

Light regimes ¹	Mycelial growth rate (mm/day)	Pycnidial production ² (No. of pycnidia/cm ²)
11 h light / 13 h dark	3.10 ± 0.20 ³	7.32 ± 1.60
24 h dark	6.39 ± 1.21	0.00 ± 0.00

¹ Light treatment was at the intensity of 6000 lux.

² Numbers of pycnidia were counted 2 weeks after inoculation.

³ Values are averages followed by ± standard errors of the means.

果腐病菌對甜椒之病原性

接種果腐病菌後1天，甜椒果實尚未出現病徵，接種後3天可觀察到水浸狀軟化病斑從接種點周圍向外延伸，與田間甜椒果腐的病徵相同，接種後5天，兩種受試甜椒品種在所有接種病菌的接種點都出現病徵(圖二b)，自接種點周圍初步形成柄子殼，在第6天之後柄子殼數量持續增加；而接種PDA塊之對照組在接種後12天果實組織仍維持健康。從接種再發病的果實邊緣可再分離得到相同的果腐病菌菌落，而完成科霍氏法則(Koch's postulates)的鑑定流程，顯示*P. capsici*對甜椒具有病原性，能夠感染甜椒引起果腐病。兩次重複實驗得到相類似的結果。

傷口及接種來源的影響

傷口影響的試驗中，以不造成傷口的接種方法接種甜椒果腐病菌，所有接種點的果實組織在接種後12天仍保持健康，表面無果腐病徵；而將菌塊埋入傷口接種，在接種後5天所有接種點都出現明顯的果腐病徵。

另以解剖刀刺傷果實造成小傷口後再接種甜椒果腐病菌，仍會引起果腐病徵。以3種不同接種源接種果實，皆在接種後3天產生明顯的水浸狀病斑，於接種後5天時，自田間病果上取病組織接種的果實平均病斑直徑為2.9 cm，由PDA培養的菌絲接種之果實平均病斑直徑為2.1 cm，由菌絲接種造成果實腐敗的病組織接種的果實平均病斑直徑為2.4 cm，比較以上3種處理相互之間的病斑直徑，差異未達5%之顯著水準。3種處理在接種7天後陸續在果實表面的病斑上生成柄子殼。對照組的甜椒果實並未形成果腐病斑與柄子殼(圖二c)。

不同成熟度果實之反應

接種果腐病菌後1天，甜椒果實皆尚未出現病徵，接種後3天，未成熟的甜椒果實上產生淡褐色至褐色的病斑，造成果實組織軟化，從接種點周圍向外延伸，相較之下，成熟果實接種病原菌後產生的軟化水浸狀病斑並非褐色，而與甜椒果實表面原來的顏色相同。於接種後5天測量病斑直徑，未成熟果實上的平均病斑直徑為2.0 cm，成熟甜椒果實上的平均病斑直徑為2.9 cm，比較兩處理均值間的差異達到1%之顯著水準。接種病原菌的未成熟甜椒果實與成熟甜椒果實於接種7天後陸續在果實表面的病斑上生成柄子殼(圖二d)，對照組的甜椒果實仍

維持健康。保留接種的果實繼續觀察，未成熟的綠色甜椒在轉為黃色後，受果腐病菌感染的病斑部位仍然維持褐色。

甜椒果腐病菌感染不同種類的果實

不同種類果實接種甜椒果腐病菌後3天之結果呈現於表二。試驗結果發現甜椒、青椒、辣椒、番茄、茄子可受甜椒果腐病菌感染而產生病徵。成熟、已轉色的辣椒及番茄顯現的病徵與果腐病菌在成熟甜椒上引起的病徵類似，在果實表面形成水浸狀的凹陷病斑，與果實表面原來的顏色相同，病斑由接種點向外側擴大；而在青椒、未成熟的辣椒與未成熟的番茄上顯現的病徵，則與果腐病菌在未成熟甜椒上引起的病徵類似，在綠色或尚未轉色的果實上造成淡褐色至褐色的病斑，逐漸向外延伸；接種於茄子上形成的斑點較不明顯，呈淡褐色，由接種點些微往外側擴大。其餘受試植物果實包括胡瓜、絲瓜、敏豆、秋葵、番石榴、木瓜、梨，在處理時間內接種點週圍的果實組織仍維持健康，未觀察到類似果腐病菌在甜椒果實上造成的病徵。

表二、甜椒果腐病菌接種於不同種類的果實後產生果腐病徵之情況

Table 2. Occurrences of fruit rot symptoms by inoculating *Phomopsis capsici* on various fruits

Common names	Scientific names	Symptoms shown after inoculation ¹
Sweet pepper (甜椒)	<i>Capsicum annuum</i>	+
Green bell pepper (青椒)	<i>Capsicum annuum</i>	+
Chili pepper (辣椒)	<i>Capsicum frutescens</i>	+
Tomato (番茄)	<i>Solanum lycopersicum</i>	+
Eggplant (茄子)	<i>Solanum melongena</i>	+
Cucumber (胡瓜)	<i>Cucumis sativus</i>	-
Luffa (絲瓜)	<i>Luffa cylindrica</i>	-
Common bean (敏豆)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-
Okra (秋葵)	<i>Abelmoschus esculentus</i>	-
Guava (番石榴)	<i>Psidium guajava</i>	-
Papaya (木瓜)	<i>Carica papaya</i>	-
Asian pear (梨)	<i>Pyrus pyrifolia</i>	-

¹ A “+” sign indicated the occurrence of water-soaked lesions extended from points of inoculation. A “-” sign indicated no lesion produced on fruits. The results were observed at 3 days post-inoculation, incubated at 24°C.

討 論

Phomopsis 屬為不完全菌 (Deuteromycetes) 內之一個屬，其有性世代歸為子囊菌 (Ascomycota) 的 *Diaporthe* 屬，產生無性構造的 *Phomopsis* 與產生有性構造的 *Diaporthe* 屬真菌具有相同來源的演化關係^(9,10,20)。 *Phomopsis* / *Diaporthe* 屬真菌能夠感染並危害甜椒果實，過去紀錄可引起番椒屬植物病害的有 *D. phaseolorum*⁽¹⁶⁾、*P. vexans*⁽¹⁴⁾、*P. capsici*^(11,13)，這些物種與受試菌株的特徵比較列於表三。上述三個物種都能夠產生 *Phomopsis* 屬真菌特有的 α 孢子與 β

孢子， α 孢子同為無色、單細胞、具有兩油滴的卵形至長橢圓形孢子， β 孢子同為無色、單細胞，常呈鉤狀或L形的長絲狀孢子，這些種類除孢子形態類似外，孢子大小也在重疊的區間內。然而，*P. capsici*除了具有典型的兩型孢子之外，還會生成形態介於 α 孢子與 β 孢子之間的 γ 孢子，這是*D. phaseolorum*與*P. vexans*所沒有的特徵。由於本試驗分離得到的*Phomopsis*屬真菌的寄主為甜椒，並具有 α 、 β 、 γ 三型分生孢子，因此我們將在臺灣中部地區所採集到的甜椒果腐病鑑定為*P. capsici*，為初次在臺灣被發現的新紀錄真菌。

在分子層面探討相近的種類，比較*D. phaseolorum*、*P. vexans*的ITS序列與本試驗中甜椒果腐病菌的ITS序列差異，相似性在95%以下(表三)，推測本試驗中甜椒果腐病菌與*D. phaseolorum*、*P. vexans*屬於不同的物種，與形態觀察得到的結果相符。然而資料庫比對結果中，部份現有序列與本試驗中分離得的*P. capsici*序列相似性達99%，包括在九重葛上發現的*P. glabrae*⁽⁵⁾與一些未確定物種的內生菌，這些內生菌序列是從12個植物科中分離出來的，分別為禾本科、棕櫚科、漆樹科、旋花科、紫草科、無患子科、唇形科、大戟科、錦葵科、肉豆蔻科、番荔枝科、疊珠樹科。由於*Phomopsis*屬的形態有互相重疊與變異的特性，分子證據是這個屬內的重要特徵之一^(9,10,20)，因此本試驗裡的*P. capsici*，與*P. glabrae*或其他內生菌可能為同種真菌在不同寄主上生存，或這些真菌種類的演化關係非常接近。

*Phomopsis capsici*對甜椒的病原性試驗中，以菌絲接種或罹病組織接種都能在有傷口的健康的甜椒果實上造成水浸狀病斑、形成含有*Phomopsis*屬孢子的柄子殼，且能從病斑再分離得到相同的病原，確認*P. capsici*對甜椒具有病原性。雖然還有其他病原如鐮孢菌屬(*Fusarium* sp.)的病原菌以類似的方式接種可造成甜椒果實腐爛^(12,18)，但其病徵、產生的真菌孢子與本試驗裡觀察到的不同，為不同原因造成的果腐病害。另外，不同成熟度的甜椒對接種*P. capsici*的反應有差異，在成熟果實上產生的軟化水浸狀病斑與果實表面原來的顏色相同(圖二b、c)，而未成熟的綠色甜椒果實上的病斑為淡褐色至褐色(圖二d)，此結果與接種不同種類果實得到的結果類似，在綠色的青椒、未成熟的辣椒、未成熟的番茄上接種後，果實組織同樣呈褐色。接種後果腐病斑之大小在不同成熟度的甜椒果實上有差異，未成熟甜椒果實上形成的病斑小於成熟果實的病斑，顯示*P. capsici*對成熟甜椒的感染能力高於未成熟甜椒，此結果可部份解釋2009及2010年在臺灣中部地區田間觀察到甜椒果腐病病果都是發生在成熟果實上的現象。

由接種不同果實的試驗結果發現*P. capsici*除感染甜椒之外，也會在青椒、辣椒、番茄、茄子這些茄科植物的果實上造成類似在甜椒上的果腐病徵(表二)，顯示*P. capsici*並非專一地寄生及感染甜椒果實。另外，番椒屬植物的果實可受到一種以上的*Phomopsis*屬或*Diaporthe*屬真菌感染^(11,13,14,16)。從其他*Phomopsis* / *Diaporthe*屬真菌的案例中也發現到類似的狀況：如*P. longicolla*可從旋花科與大戟科兩類植物中分離出來⁽⁸⁾，而一種錦葵科野草*Abutilon theophrasti*會遭受*D. phaseolorum* var. *caulivora*、*D. phaseolorum* var. *sojae*、*P. longicolla*之感染⁽¹⁹⁾。依據本試驗結果與過去文獻的例子，同一個*Phomopsis*的真菌物種可感染不同植物，同一種植物也可受到一種以上的*Phomopsis*屬真菌感染，呈現出*Phomopsis*屬真菌對寄主專一性低的特性。

表三、果腐病菌 BCRC34727 與文獻內近似的 *Phomopsis* 種類之特徵

Table 3. Characteristics of *Phomopsis* sp. in literatures and the present study (BCRC 34727 isolate)

Pathogens	Literatures ¹	Hosts	α -conidia (μ m)	β -conidia (μ m)	γ -conidia (μ m)	Identities ²
BCRC34727 isolate	Present study	<i>Capsicum annuum</i>	(5.0)-6.0-(7.5)× (2.0)-2.7-(3.3) on fruits (4.8)-6.0-(7.5)× (2.3)-2.6-(3.0) in cultures	(12.5)-16.4-(25.5)× (0.8)-1.0-(1.3) on fruits (15.5)-18.8-(37.8) × (0.8)-1.1-(1.5) in cultures	(8.8)-10.8-(13.8) × (1.3)-1.9-(2.5) on fruits	-
	Punithalingam (1982)	<i>Capsicum</i> sp.	5.5-8×2-2.5	18-25×0.5	10-12×1-1.5	
	Rodeva <i>et. al.</i> (2009)	<i>Capsicum</i> sp.	Averaging 6.84×2.88	Averaging 29.82×1.81	Averaging 11.05×2.93	-
<i>Phomopsis vexans</i>	Sawada (1959)	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>acuminatum</i> , <i>Lycopersicum</i> <i>esculentum</i>	³	-	-	93%
	Kim <i>et. al.</i> (2003)	<i>Prunus armeniaca</i> , <i>Prunus mume</i>	5-9×2-3	12.5-32.5×0.6-1.2	-	
	Tucker (1935)	<i>Capsicum annuum</i>	(7.2)-7.9-(9.2)× (2.2)-2.7-(3.2) on fruits 6.1×2.6 in cultures	14.6×1.5 in cultures	-	95%
<i>Phomopsis glabrae</i>	Chang <i>et. al.</i> (2005)	<i>Bougainvillea</i> <i>glabra</i>	5.0-7.4×1.6-2.1	13.5-22.5×0.6-1.0	-	99%

¹ The literatures were correspondent with the descriptions of hosts and sizes of conidia.

² ITS sequence of BCRC34727 isolate was used to compare with those of *Phomopsis* species at NCBI. The relative accession numbers of the sequences were GU373630 for *P. vexans*, AY577815 for *D. phaseolorum*, and AY601918 for *P. glabrae*.

³ A “-” sign indicated the characteristics were not described

2009年田間觀察到的甜椒果腐病是在颱風過後約一個月發生，依據實驗結果發現，果實傷口有助於甜椒果腐病菌感染，在沒有傷口的情況下，病原菌菌塊與健康果實接觸並未造成果實腐爛。Kim等人⁽⁷⁾以*P. vexans*接種杏樹與梅樹果實的實驗中，杏樹果實只有在有傷口時才呈現病斑，無傷口的杏樹果實並沒有病斑形成，而梅樹果實接種後的病斑則在有傷口時大於無傷口存在的情況；另外Ramdial與Rampersad⁽¹²⁾作甜椒接種鐮孢菌的實驗中，只有在有傷口的果實上才會發病，病斑未在無傷口的果實上形成。因此，有傷口存在時會提高*Phomopsis*屬真菌或其他病原感染甜椒引起果實腐爛的機會，避免甜椒果實的傷口有助於減少病原菌感染果實的風險。

我們在臺灣中部地區發現具有果腐病徵之甜椒果實，將自罹病果實分離出的真菌鑑定為*P. capsici*，並確認此病原能夠感染甜椒，為在臺灣發現*P. capsici*造成甜椒果腐病的新紀錄。除甜椒外，此病原菌還能感染一些茄科植物的果實造成果腐病徵，顯示*P. capsici*並非專一地感染同一種寄主植物。由於試驗發現果實在傷口存在時會提高病原菌感染的機會，以及成熟果實的罹病程度高於未成熟的果實，因此，在本病的潛在發生地區管理此病害時，應注意避免果實受傷，並在果實轉色期及早預防與保護，減少病害發生。

誌 謝

我們要謝謝本場長官的支持、植物保護研究室江美換小姐協助實驗、蔡全來先生提供相關資料。承蒙同領域的前輩與本場研究同仁對實驗及相關內容的建議與指教。在此謹致謝意。

參考文獻

1. 中華民國植物病理學會 2002 臺灣植物病害名彙 p.48-50。
2. 許秀惠、徐世典、曾國欽 1990 臺灣茄科細菌性斑點病菌之特性，病原型與血清型 植物保護學會會刊 32: 59-69。
3. 澤田兼吉 1919 菌核病菌 p.209-244 臺灣產菌類調查報告第壹編 臺灣總督府中央研究所 臺灣。
4. 澤田兼吉 1919 灰色菌 p.598-603 臺灣產菌類調查報告第壹編 臺灣總督府中央研究所 臺灣。
5. Chang, C. Q., Y. H. Cheng, M. M. Xiang, Z. D. Jiang and P. K. Chi. 2005. New species of *Phomopsis* on woody plants in Fujian province. *Mycosystema*. 24: 6-11.
6. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York.
7. Kim, W. G., S. K. Hong, W. D. Cho and C. H. You. 2003. Brown rot of apricot and mume caused by *Phomopsis vexans*. *Plant Pathol. J.* 19: 231-234.

8. Mengistu, A., L. A. Castlebury, J. R. Smith, A. Y. Rossman and K. N. Reddy. 2007. Isolates of *Diaporthe-Phomopsis* from weeds and their effect on soybean. *Can. J. Plant Pathol.* 29: 283-289.
9. Murali, T. S., T. S. Suryanarayanan and R. Geeta. 2006. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. *Can. J. Microbiol.* 52: 673-680.
10. Pioli, R. N., E. N. Morandi, M. C. Martínez, F. Lucca, A. Tozzini, V. Bisaro and H. E. Hopp. 2003. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology.* 93: 136-146.
11. Punithalingam, E. 1982. *Diaporthe capsici*. No.733. In: CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. England.
12. Ramdial, H. A. and S. N. Rampersad. 2010. First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of sweet pepper in Trinidad. *Plant Dis.* 94:1375.
13. Rodeva, R., Z. Stoyanova and R. Pandeva. 2009. A new fruit disease of pepper in Bulgaria caused by *Phomopsis capsici*. p. 551-556. In: Krasteva, L. and N. Panayotov (eds.). IV Balkan symposium on vegetables and potatoes. Bulgaria.
14. Sawada, K. 1959. Genus *Phomopsis*. p. 131-133. Descriptive catalogue of Taiwan (Formosan) fungi Part 11. National Taiwan University. Taipei.
15. Sheu, Z. M. and T. C. Wang. 2006. First report of *Colletotrichum boninense* as causal agent of pepper anthracnose in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 15: 294-295.
16. Tucker, C. M. 1935. *Diaporthe phaseolorum* on pepper fruits. *Mycologia.* 27:580-585.
17. Tzeng, K. C. and S. T. Hsu. 1981. Identification and characterization of soft-rotting *Erwinia* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 23: 77-85.
18. Utkhede, R. and S. Mathur. 2003. *Fusarium* fruit rot of greenhouse sweet peppers in Canada. *Plant Dis.* 87:100.
19. Vrandecic K., J. Cosic, L. Riccioni, T. Duvnjak and D. Jurkovic. 2005. Isolation of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* from *Abutilon theophrasti* in Croatia. *Plant Pathol.* 54: 576.
20. Zhang, A. W., L. Riccioni, W. L. Pedersen, K. P. Kollipara and G. L. Hartman. 1998. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathology.* 88:1306-1314.

Identification for Pathogenicity of *Phomopsis capsici*, a Newly Reported Fruit Rot Disease of Sweet Pepper in Taiwan¹

Yuan-Min Shen², Chia-Hung Chao², Shu-Ting Chang³ and Hsing-Lung Liu⁴

ABSTRACT

Fruit rot symptoms on sweet pepper seriously occurred in Puli, Taiwan in September of 2009 and 2010. A fungus isolate was collected from the diseased fruit of sweet pepper showing water-soaked lesions and sunken symptoms. The pathogen was identified as *Phomopsis capsici* based on its host range and morphological characteristics. Pathogenicity tests showed that *P. capsici* could infect wounded fruits of sweet pepper and be reisolated, but the inoculation tests without wounding did not induce symptoms. Both mature and immature fruits could be infected. Brownish lesions on immature fruits expanded slower than lesions on mature fruits. Host specificity of *P. capsici* was demonstrated in our studies. Sweet pepper, green bell pepper, chili pepper, tomato, and eggplant could be infected, showing fruit rot symptoms. This is the first report of fruit rot of sweet pepper caused by *P. capsici* in Taiwan. In addition, this is a newly recorded fungal species of Taiwan.

Key words: *Phomopsis capsici*, *Diaporthe* sp., sweet pepper fruit rot, host ranges.

¹ Contribution No. 0727 from Taichung DARES, COA..

² Assistant Researcher of Crop Environmental Division, Taichung DARES, COA.

³ Research Assistant of Crop Environmental Division, Taichung DARES, COA.

⁴ Associate Researcher of Crop Environmental Division, Taichung DARES, COA.