

由 *Cercospora tetragoniae* 引起之番杏葉斑病初報

呂柏寬^{1, 2*}、歐玟晴^{3, 5}、洪千惠^{2, 4}

¹ 農業部動植物防疫檢疫署基隆分署。基隆市中正區。

² 農業部花蓮區農業改良場。花蓮縣吉安鄉。

³ 國立中興大學植物病理學系。臺中市南區。

⁴ 農業部高雄區農業改良場。屏東縣長治鄉。

⁵ 農業食品產業技術總合研究機構東北農業研究中心。日本岩手縣盛岡市。

* 聯絡作者，E-mail: klpl@klaphia.gov.tw

摘要

呂柏寬、歐玟晴、洪千惠。2025。由 *Cercospora tetragoniae* 引起之番杏葉斑病初報。植物醫學67(2): 79-84。

2019年5月於花蓮縣吉安鄉蔬菜園之番杏葉片產生大量深褐色圓形病斑，病斑中央呈現灰白色點狀，病斑周圍經常伴有黃色暈環，藉由組織分離獲得病原菌，經由病徵及菌株形態並佐以分子親緣分析，最後以柯霍氏法則驗證，確認該病害係由 *Cercospora tetragoniae* (Speg.) Siemaszko 於番杏上造成之葉斑病，為臺灣產尾孢菌類真菌之一新紀錄種，研究菌株 (FU31220) 已保存於臺灣生物資源保存及研究中心 (BCRC)，並首度於基因序列資料庫登錄 *C. tetragoniae* 之基因序列。

關鍵詞：番杏 (*Tetragonia tetragonoides*)、*Cercospora tetragoniae*、葉斑病

緒言

番杏 (*Tetragonia tetragonoides*) 屬於番杏科 (Aizoaceae) 番杏屬 (*Tetragonia*) 一年生草本植物，又稱毛菠菜、洋菠菜或豬母耳，為臺灣南部特色蔬菜作物。於2019年5月於花蓮縣吉安鄉蔬菜園 (WGS84: 121.5650, 23.9748) 栽培番杏之區域發現大量疑似病原菌引起之葉部病害，罹病率達100%，致使番杏失去商品價值。

全世界已知的番杏病害包含銹病 (*Uredo novae-zelandiae*)、*Verticillium albo-atrum* 引起的萎凋病、*Cercospora* sp. 或 *Helminthosporium* sp. 造成之葉斑病、*Alternaria alternata* 及

Botrytis cinerea 引起的儲藏性腐敗病⁽⁷⁾，而國內於番杏上已紀錄之病害僅有菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*)⁽¹²⁾。

自吉安鄉蔬菜園的田間葉部病斑上可以看到尾孢菌類 (cercosporoid) 之真菌，此類病原菌未曾在臺灣的番杏上紀錄過⁽¹²⁾，而世界上尾孢菌類真菌感染番杏之紀錄有 *C. tetragoniae*^(1, 9)。為鑑定此新發生的病害及確定病原菌的病原性，本研究進行病原菌的形態及分子親緣分析，並促進孢子之產生以進行接種，完成柯霍氏法則，達到確認病害成因之目標。

材料與方法

田間病徵及病原菌之形態觀察與分離

2019年5月於吉安鄉蔬菜園發生大量番杏葉片病斑，採集罹病葉片，自葉片罹病處背面挑取產孢構造含分生孢子梗及分生孢子，以觀察其形態特徵。並以玻璃針挑取單一孢子，移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA, potato starch 4 g, sucrose 20 g, agar 20 g, 1L dH₂O)。於3日後挑取菌絲塊純化培養於PDA，並將菌株編號為HL_Tt-1，置於24℃培養供後續試驗使用。

分子親緣分析

測試菌株使用HL_Tt-1菌株，並參考Viogene 基因組 DNA 萃取套組 (Viogene BioTek Corp.) 之方法萃取核酸，並以V9G/LR1引子對^(3, 11)將內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 進行核酸增幅 (polymerase chain reaction, PCR)，此外並以 EF1-728F/ EF1-986R，CAL-228F/ CAL-737R，以及ACT512F /

ACT783R引子對，分別對真核生物延伸因子 (elongation factor-1 alpha, *EF-1*)、鈣調蛋白基因 (calmodulin, *CAL*) 及肌動蛋白基因 (actin, *ACT*) 的部分區域進行增幅⁽²⁾，引子序列及PCR條件如表一。

取5 μ L PCR反應產物進行膠體電泳分析，確認核酸產物條帶大小後，將核酸產物委請基龍米克斯生物科技有限公司進行定序。接著使用BLAST演算法，於美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 資料庫進行比對，以初步鑑定病原種類，並下載ITS序列相似度超過99%的菌株序列進行親緣分析。親緣分析採用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 與貝氏法 (Bayesian inference method, BI) 進行。首先，將相關序列自NCBI下載，並加入葡萄褐斑病

菌*Pseudocercospora vitis*做為外群菌株。所有序列利用MAFFT進行多序列排比 (alignment) 後，排比不佳的區域使用gBlocks移除^(4, 10)。排比後之不同基因序列經串接後，使用IQ-TREE 2及MrBayes 3建構ML及BI親緣樹^(6, 8)。ML樹以IQ-TREE內建之快速拔靴法 (ultrafast bootstrap) 重複1000次，並依此計算每一節點之bootstrap支持度；BI樹則以馬可夫鏈蒙地卡羅(MCMC)法迭代100萬次，計算每一節點之後驗機率 (posterior probability)。

接種源製備與病原性檢定

選用菌株HL_Tt-1進行病原性檢定，將菌株HL_Tt-1培養於V8培養基 (V8 Agar, V8 juice 200 mL, agar 20 g, 1L dH₂O) 上，置於22°C，以每日12小時近紫外光 (NUV) 光週期培養刺激產孢，培養7日以上供作接種源使用。以0.05% Tween 20水溶液洗下，並調整成 2×10^4 conidia/mL之孢子懸浮液，懸浮液均勻噴灑至播種於3吋盆之3個月大小的番杏植株，再以透明塑膠袋包裹保濕48小時，並以僅噴灑0.05% Tween 20水溶液的植株為對照組，每處理為4盆重複，所有處理均放置於植物生長箱中 (20-25°C，相對溼度85%，每日12小時光照) 觀察後續發病情形。

結 果

田間病徵觀察及病原菌分離保存

本病害葉片初期病徵呈細小圓形褐色壞疽斑，隨病程發展圓形病斑逐漸擴大可達直徑15 mm，病斑中央呈現灰白色點

表一、本研究使用之引子對及PCR反應條件

TABLE 1. Primer pairs and PCR conditions used in the study

Primer	Sequence 5'→3'	PCR condition
V9G	TTACGTCCTGCCCTTTGTA	94°C 3 min., 94°C 30
LR1	GGTTGGTTTCTTTTCCT	sec, 55°C 30 sec, 72°C
		1min., 30 cycles.
		72°C 5 min.
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	95°C 8 min., 95°C 15
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC	sec, 55°C 20 sec, 72°C
CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	1min., 35cycles.
CAL-737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG	72 °C 5 min.
ACT512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	
ACT783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	



圖一、番杏葉斑病之病徵。(A)田間嚴重罹病病徵；(B)葉面產生圓形褐色壞疽斑；(C)葉部病斑末期有時呈現穿孔病徵；(D)莖部病徵。

Fig. 1. Symptoms of New Zealand spinach leaf spot. (A) Severely infected *Tetragonia tetragonioides* in the field, (B) brown and round spots on a leaf; (C) The leaf spot developed shoot hole symptom in the late stage; (D) The necrotic lesions on a stem.

狀，推測為侵入感染點，部分病斑具黃暈，後期病斑互相癒合，造成葉片褐化，少數病斑末期呈現穿孔病徵；本病害亦可感染莖部，莖部初期病斑成水浸狀略凹陷之淡褐色長橢圓形病斑，病斑擴大後為不規則形褐色壞疽斑蔓延莖部（圖一）。病菌經分離培養挑選菌株編號HL_Tt-1為後續試驗菌株，並寄存於臺灣生物資源保存及研究中心 (Taiwan Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，菌株編號FU31220。

病原菌形態觀察與親緣分析

形態鑑定：病斑壞疽處可見產孢構造，葉背多於葉表。子座 (stroma) 不明顯，深褐色，僅由數十個細胞組成，佔據寄主氣孔開孔。分生孢子梗 (conidiophore) 自子座長出，呈2-15枝之集束或散束，長25-300 μm ，寬3-4.5 μm ($n = 30$)，橄欖褐色，近尖端漸淺，頂端有1-6個產孢點。產孢點處常顯著曲折，並有直徑2-3 μm 之深褐色孢痕 (conidial scar)。分生孢子透明無色，圓柱狀 (cylindrical)，具3-15個不明顯的隔膜，近頂端轉窄，基部具有截平形、略為加厚的臍 (hilum)，大小30-200 $\times$ 3.5-5 μm (圖二)。

親緣分析：本研究成功定序HL_Tt-1菌株之ITS、*CAL*、*ACT*與*EF-1*等基因之部分序列，並上傳至INSD資料庫 (International Nucleotide Sequence Database)，序列編號分別

為MT095118 (ITS)、LC589277 (*CAL*)、LC589278 (*ACT*) 及LC589279 (*EF-1*)。上述序列經BLAST後回傳之結果顯示，ITS序列與*C. zebrina* CBS 118790最相近 (99.85%)；*CAL*、*ACT*與*EF-1*則與*C. cf. helianthicola* MUCC 716最相近 (99.47-100%)。將BLAST取得之相近序列，進行親緣分析顯示，HL_Tt-1與*Cercospora*屬之模式種*C. apii* CBS 116455及其餘相關物種形成一單系群，並與自菊芋 (*Helianthus tuberosus*；菊科) 分離之*C. cf. helianthicola* MUCC 716形成高支持度之姊妹群，顯示HL_Tt-1為*Cercospora*屬真菌 (圖三)。

病原性檢定

接種菌株之處理組各重複於接種10日後，所有供試植株葉片均可產生直徑2-8 mm灰褐病斑，接種18日之葉片則可產生直徑大於10 mm之圓形至不規則形灰褐色病斑，病斑顏色較田間病徵為淡，病斑中央呈偏白色小點狀，且部分病斑可互相癒合成較大的壞疽斑，以及莖部可產生淡褐色長橢圓形略凹陷之病斑 (圖四)，接種後之病徵與田間相符，並於病徵病健處分離真菌，經以接種源製備相同之培養條件培養後，菌落可產生相同形態之孢子，而對照組均未產生病徵，確認菌株HL_Tt-1對番杏具病原性。

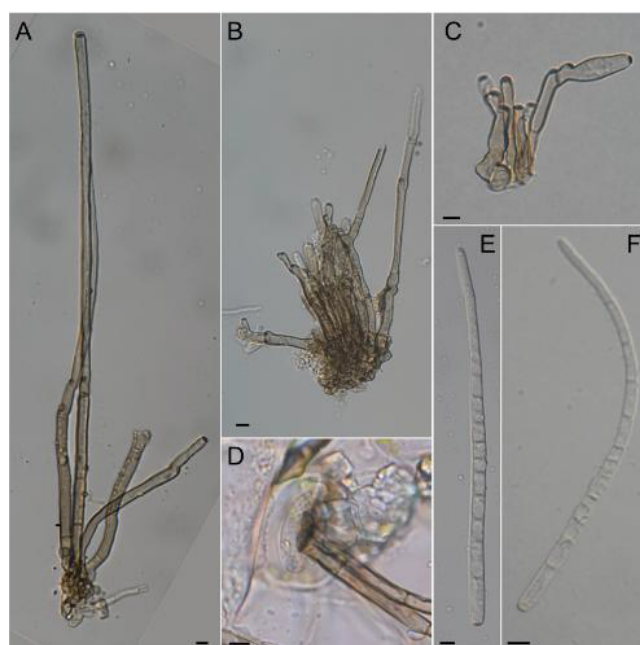
經由田間寄主番杏之罹病葉片上觀察到之產孢構造、分生孢子形態並依照文獻比對，以及實驗室中進行病原性檢定完成柯霍式法則，依據上述結果鑑定菌株HL_Tt-1為 *C. tetragoniae* (Speg.) Siemaszko^(1,9)。

討 論

全球基因資料庫中無可供參照之*C. tetragoniae*基因序列可供比對，目前可感染番杏之尾孢類真菌紀錄僅*C. tetragoniae*，經由親緣分析結果顯示本研究試驗菌株HL_Tt-1屬於*Cercospora*屬真菌，病理學與形態學分析上與*C. tetragoniae*相符^(1,9)，經由寄主及病原性檢定確認，本研究將HL_Tt-1鑑定為*C. tetragoniae*。

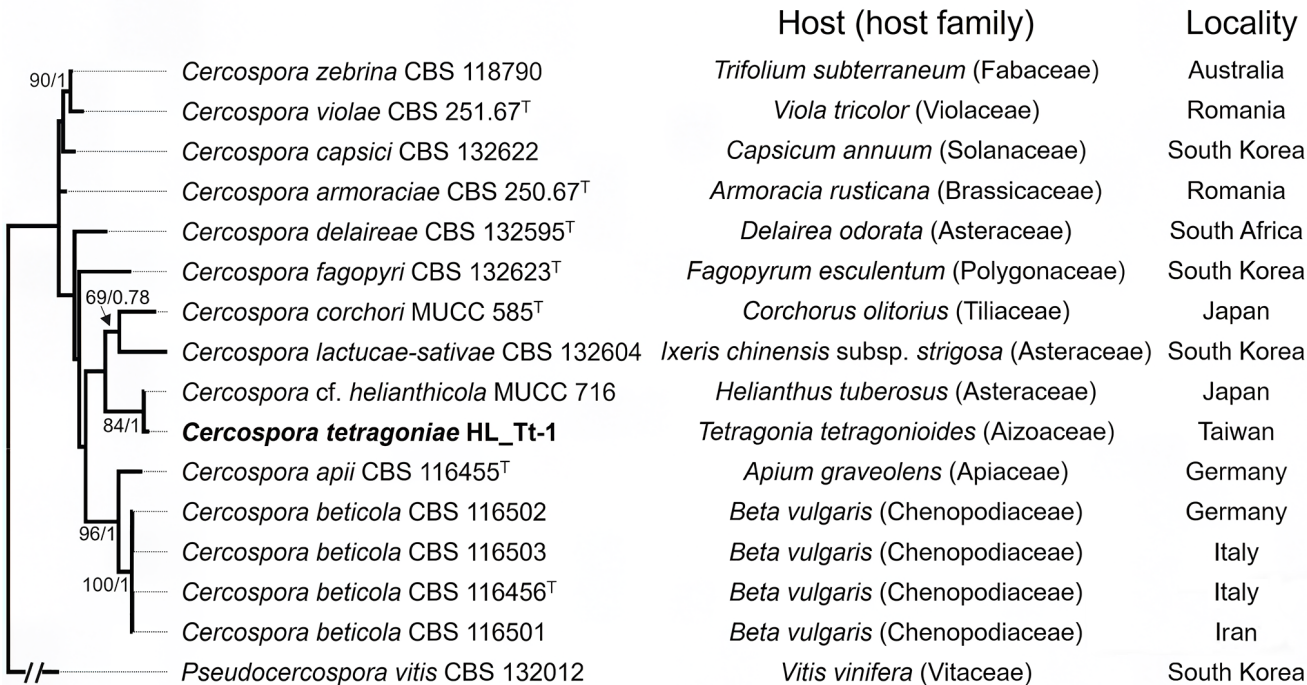
病原菌*C. tetragoniae*所造成之番杏病害目前已報導於非洲的肯亞與坦尚尼亞等國家，北美洲的美國，中南美洲之巴西與阿根廷，跨洲國家喬治亞，亞洲目前僅汶萊、以色列以及日本有紀錄⁽¹⁾，該病害首度發現於臺灣，為臺灣產尾孢類真菌之一新紀錄種。

親緣分析顯示，HL_Tt-1 與 *C. cf. helianthicola* MUCC 716 形成高支持度的姊妹群，形態上亦無法與該物種區別。序列比對結果顯示，ITS 和 *ACT* 區間僅有 1 個鹼基差異，而 *CAL* 與 *EF-1* 區間則完全相同。然而，*C. helianthicola* 的寄主為菊科植物菊芋 (*Helianthus tuberosus*)，與本研究的番杏 (番杏科 *Aizoaceae*) 屬於不同科，寄主範圍差異顯著。因此，本研究於



圖二、*Cercospora tetragoniae*形態特徵。(A-C) 子座及分生孢子梗。(D)分生孢子梗自氣孔內之子座伸出。(E& F) 分生孢子 (Bars = 5 μm)。

Fig. 2. Morphological characteristics of *Cercospora tetragoniae*. (A-C) Stromata and conidiophores. (D) Conidiophores emerging from a stroma within a stoma. (E & F) A conidium (Bars = 5 μm).



圖三、*Cercospora tetragoniae*與相近*Cercospora*屬物種之ITS、*CAL*、*ACT*及*EF-1*多基因親緣分析結果。本研究分離之HL_Tt-1菌株以粗體表示。以上標的T註記者為模式菌株。親源分析以最大似然法進行，節點之bootstrap統計支持度 (BS) 大於50且後驗機率 (PP) 高於0.7時，以BS/PP的形式將數值標註於節點旁。

Fig. 3. A phylogenetic tree of *Cercospora tetragoniae* and allied taxa inferred from concatenated ITS, *CAL*, *ACT*, and *EF-1* regions by maximum likelihood method. Strain HL_Tt-1 is in bold. Bootstrap support (BS) values greater than 50 and posterior probabilities (PP) higher than 0.7 are provided at the nodes, denoted as BS/PP. Sequences from ex-type strains are marked with a superscript "T."



圖四、HL_Tt-1菌株接種番杏18日之病徵。(A)葉片病徵；(B)莖部病徵。

Fig. 4. Inoculated symptoms of New Zealand spinach were induced by HL_Tt-1 strain at 18 days post-inoculation. (A) Leaf symptoms; (B) Stem symptoms.

此採用生態種概念 (ecological species concept)，將 HL_Tt-1 鑑定為 *C. tetragoniae*。值得注意的是，與本菌株親緣相近的 *C. beticola* 有跨寄主、感染不同科植物的報導⁽⁵⁾。因此，本研究無法完全排除 *C. tetragoniae* 具備感染菊芋的可能性，亦無法斷定其與 *C. helianthicola* 是否屬於同一物種。然而，這部分的討論已超出本研究的範疇，待未來進一步收集更多菌株進行詳細分析。此外，本研究首次將 *C. tetragoniae* 的基因序列登錄於國際核苷酸序列資料庫(International Nucleotide Sequence Databases, INSD)，以供後續研究參考。

該病害於2019年5月於吉安鄉蔬菜圃首度發現，並經查閱文獻及初步確認後，通報於農業部動植物防疫檢疫署，當年度即以翻耕剷除，此後同區域未再種植相同作物，經過實地訪查種植較大宗之光復鄉，亦未見相同病害，農友表示過往亦無類似病害發生，初步判斷該病害於栽培區田間罹病率不高。故回溯當年度該病害採集時之現況，該蔬菜圃田區地勢低窪易淹水，且病害採集時期連續強降雨，造成田區淹水，植株處於生育弱勢逆境狀態，在此田間狀況下，初發輕微之病害，後續因逆境及強降雨傳播嚴重感染蔬菜圃，但仍不能解釋該病害自何處引進，推測番杏為東部著名野菜，野外及濱海常見野生植株是否為最初感染來源仍需調查。

番杏葉斑病目前未於產業造成影響，未來若有經濟性影響，利用目前保存的菌種可快速經過相關試驗了解其防治資材，擬定相關防疫策略及研究。

謝 辭

本文承蒙農業部花蓮區農業改良場計畫109農科-8.4.2-花-V1試驗經費，國立中興大學真菌研究室協助鑑定及陳啟予教授提供寶貴建議，謹此誌謝。

引用文獻

- Braun, U., Crous, P.W., and Nakashima, C. 2015. Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 4. Species on dicots (Acanthaceae to Amaranthaceae). IMA Fungus 6:373-469.
- Carbone, I., and Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91(3):553-556.
- de Hoog, G.S., and Gerrits van den Ende, A. H.G. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. Mycoses 41:183-189.
- Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Brief. Bioinform 20(4):1160-1166.
- Knight, N. L., Niloofar Vaghefi, Kikkert, J. R., and Pethybridge, S. J. 2019. Alternative hosts of *Cercospora beticola* in field surveys and inoculation trials. Plant Dis. 103(8):1983-1990.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., and Lanfear, R. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. Mol. Biol. Evol. 37(5):1530-1534.
- Roskrug, N. 2011. The commercialisation of kōkihi or New Zealand spinach (*Tetragonia tetragonioides*) in New Zealand. Agronomy New Zealand 41:149-156.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., and Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539-542.
- Spegazzini, C. 1910. Mycetes argentinenses, series V. Anales Mus. Nac. Buenos Aires 20:329-467.
- Talavera, G., and Castresana, J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Syst. Biol. 56:564-577.
- Vilgalys, R., and Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J. Bacteriol. 172:4238-4246.
- Zeng X.X., Zeng G.Q., Chang, C.A., Tsay, T.T., and Yan X.F. 2019. Tetragonia, *T. tetragonioides*. Page 290 in: List of Plant Diseases in Taiwan, 5th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taichung city, 311 pp. (in Chinese).

ABSTRACT

Lu, P. K.*, Ou, J. H., and Hung, C. H. 2025. Leaf spot of *Tetragonia tetragonioides* caused by *Cercospora tetragoniae*. J. Plant Med. 67(2): 79-84.

*Corresponding author, E-mail: klpl@klaphia.gov.tw

In May 2019, in the vegetable garden of Ji'an Township, Hualien County, large amounts of dark brown circular spots appeared on the leaves of *Tetragonia tetragonioides*. These lesions exhibited grayish-white spots at the centers and were often surrounded by yellowish halos. The pathogen was isolated from the infected tissues. Through the symptoms and the pathogen morphological characteristics and molecular phylogeny, the leaf spot disease of *T. tetragonioides* was confirmed to be caused by *Cercospora*

tetragoniae (Speg.) Siemaszko. This discovery represents a new record species of cercosporoid fungi in Taiwan. The strain (FU31220) has been preserved at the Taiwan Bioresource Collection and Research Center, (BCRC) and gene sequences of *C. tetragoniae* have been deposited into the genetic sequence database for the first time in the world.

Keywords: New Zealand spinach (*Tetragonia tetragonioides*), *Cercospora tetragoniae*, Leaf spot