

蓮霧黃腐病之病原真菌鑑定

曾敏南¹¹ 行政院農業委員會高雄區農業改良場。屏東縣長治鄉德和村德和路2-6號。

聯絡作者，Email: minnan@mail.kdais.gov.tw

摘要

曾敏南。2020。蓮霧黃腐病之病原真菌鑑定。植物醫學63(2): 17-22。

高雄市六龜區及屏東縣林邊鄉、南州鄉及東港鎮等地栽培之蓮霧(*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & Perry)曾經因蓮霧黃腐病危害，而造成重要的經濟損失。蓮霧黃腐病是受真菌病原感染，受害初期，果實形成水浸狀斑，斑點隨後快速擴大、褪色、褐化並產生白色菌絲。分離自屏東縣林邊鄉的蓮霧黃腐病菌，經回接及再分離確認為蓮霧病原真菌。此外，造成蓮霧黃腐病的真菌亦可感染大豆(*Glycine max*)、花生(*Arachis hypogaea*)及紅豆(*Vigna angularis*)葉片，並可能感染茄子(*Solanum melongena*)、椶果(*Mangifera indica*)及棗(*Ziziphus mauritiana*)。以內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)、組蛋白H3基因(histone H3)、 β 微管蛋白基因(β -tubulin)及轉錄因子-1 α 基因(transcription factor-1 α , TEF-1 α)部分序列進行多基因類緣分析，以及形態觀察比對結果，判定造成蓮霧黃腐病之病原真菌為*Calonectria sulawesiensis*。

關鍵詞：蓮霧 (*Syzygium samarangense*)、黃腐病、*Calonectria sulawesiensis*

緒言

蓮霧 (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & Perry) 為高屏地區重要熱帶果樹，主要栽植於高雄市六龜區、屏東縣南州鄉、佳冬鄉、東港鎮及林邊鄉等地區。高雄市六龜區之蓮霧園曾於2004年嚴重發生蓮霧黃腐病，經林及蔡氏 (2004) 鑑定為 *Cylindrocladium* sp. 所引起。筆者亦曾於2011年發現該病害嚴重發生於屏東縣南州、佳冬、林邊及東港等蓮霧重要產區。果實受蓮霧黃腐病危害初期，果皮褪色形成水浸狀壞疽斑，隨著時間增加，果實表面皺縮呈土黃色並著生大量白色分生孢子，果實受害後易落果。

蓮霧黃腐病由真菌 *Cylindrocladium* sp. 引起，*Cylindrocladium* (柱狀分枝孢菌屬) 為無性繁殖形態 (anamorph)，其有性繁殖形態 (teleomorph) 為 *Calonectria* (麗赤殼屬)。*Calonectria* 分類位階屬於子囊菌綱 (Ascomycetes)、肉座菌目 (Hypocreales)、叢赤殼科 (Nectriaceae) (Rossman, 1996)。叢赤殼科，包含近20個屬，其中，因 *Calonectria* 為許多重要林木及作物的病原真菌，而顯其重要性。例如在臺灣曾被報導造成樟屬植物葉枯病的 *Calonectria clavatum*⁽⁴⁾、造成樟屬植物黑腐病的 *Calonectria kyotensis*⁽³⁾、引起枇杷枝枯病的 *Calonectria reteaudii*⁽⁵⁾、引起桉樹苗腐病的 *Cylindrocladium floridanum*⁽¹⁾、引起薔薇黑腐病的 *Calonectria scoparium*⁽⁶⁾，以及造成大豆紅冠腐病且近年來日益嚴重的 *Calonectria ilicicola*⁽¹⁴⁾。

有鑑於引起蓮霧黃腐病之病原，時常造成蓮霧嚴重的經濟危害，但對其病原真菌菌種鑑定尚未明確，故本研究著手鑑定之。另外，*Calonectria* spp. 為許多作物之重要病害，故本研究同時將蓮霧黃腐病菌針對臺灣南部的多種重要作物進行病原性測試，以期初步了解本病原可能的危害對象，供本病害防治研究參考。此外，由於多數 *Cylindrocladium* 均已發現其有性世代為 *Calonectria*，而尚未發現有性世代的 *Cylindrocladium*，其類緣分析 (phylogenetic analysis) 證據仍顯現與 *Calonectria* 有關，故依據一真菌一名稱 (one fungus one name) 的命名原則，Lombard (2010b, 2016) 選擇以 *Calonectria* 來命名。本文亦以 *Calonectria* 描述本屬真菌。

Calonectria 所屬的種 (species) 間分類，主要依據其無性繁殖形態的特徵進行區分，包括產孢枝末端的囊泡 (vesicle) 形態、囊泡柄 (stipe) 延伸長度、分生孢子的隔膜 (septate)、分生孢子長寬等^(16, 17)。本文描述形態乃參照 Crous 於 1994 及 2002 年進行 *Calonectria* (*Cylindrocladium*) 形態描述及分類方法中所使用的各項形態定義。然而，*Calonectria* 屬的菌種之中有許多菌株因其形態相近而被歸於複合群 (species complex)，為避免形態相近造成鑑定上的謬誤，故本研究亦使用組蛋白 H3 基因 (histone H3)、 β 微管蛋白基因 (β -tubulin) 及轉錄因子-1 α 基因 (transcription factor-1 α , TEF-1 α) 的部分序列進行多基因類緣分

材料與方法

一、供試菌株來源及培養

自屏東縣林邊鄉蓮霧園採集受害蓮霧果實，以無菌水沖洗果實表面後再使用無菌紙巾吸除殘餘水份。切取病斑周圍組織，置於1% (V/V) 次氯酸鈉水溶液30秒後，移置2% (W/V) 水瓊脂 (water agar, WA) 培養基平板中培養，待長出菌絲後，切取單一菌絲尖端，並移植至馬鈴薯洋菜瓊脂 (potato dextrose agar, PDA)。獲得之菌株編號為LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3及LB-Cal-4。

二、菌株病原性

於林邊蓮霧田採取表皮已呈現紅色的南洋種成熟蓮霧果實，經自來水清洗後，以75%酒精進行表面噴灑，再以無菌脫脂棉擦試消毒後置於無菌操作台內備用。菌株LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3、LB-Cal-4培養於PDA平板7日，由菌落邊緣切取菌絲塊2 mm，將菌絲塊置於蓮霧果實側面，每處理接種3粒果實、每處理3重複。接種後置於保鮮盒中密封，並置於28°C定溫培養箱。

南洋種蓮霧植株高約100 cm，以田土栽培於盆中。菌株培養於馬鈴薯洋菜瓊脂14天，以0.5% Tween 80無菌水溶液洗下分生孢子，稀釋為 10^5 conidia / ml，取20 ml噴施於蓮霧植株頂梢末端之5片葉。每處理3株，噴施後以大型塑膠袋將全株包覆保濕，置於網室中，3天後除去塑膠袋。

另外，取 10^5 conidia / ml孢子懸浮液20ml噴施於大豆(*Glycine max*)、紅豆(*Vigna angularis*)、花生(*Arachis hypogaea*)、茄子(*Solanum melongena*)、芋頭(*Colocasia esculenta*)、木瓜(*Carica papaya*)、番石榴(*Psidium guajava*)、檬果(*Mangifera indica*)及印度棗(*Ziziphus mauritiana*)植株之嫩葉，葉片不製造傷口，或以針刺製造傷口。前述植株均以田土栽種於盆中。接種後，以塑膠袋套入保濕，3天後去除塑膠袋。

三、類緣分析 (phylogenetic analysis)

菌株LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3、LB-Cal-4培養於PDA平板7日，使用DNeasy® Plant Pro Kit (Qiagen, Germany) 抽取核酸，並以ITS4、ITS5引子對將內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)進行核酸增幅 (polymerase chain reaction, PCR)⁽²⁴⁾，此外並以CYLH3F與CYLH3R、EF1-728F與EF2，以及T1與CYLTUB1R，分別對組蛋白H3基因(histone H3)、 β 微管蛋白基因(β -tubulin)及轉錄因子-1 α 基因 (transcription factor-1 α , TEF-1 α)的部分區域進行增幅^(7, 11, 12, 19, 20)，引子序列及PCR條

表一、引子序列及核酸增幅 (polymerase chain reaction) 條件

TABLE 1. The primer sequences and polymerase chain reaction conditions

Primer	Sequence	PCR condition
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	94°C 3 min., 94
ITS5	5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3'	°C 30 sec, 55 °C
		30 sec, 72 °C 1
		min., 30 cycles.
		72 °C 5 min.
CYLH3F	5'-AGGTCCACTGGTGGAAG-3'	94°C 5 min.,
CYLH3R	5'-AGCTGGATGTCCTTGGAC-3'	94°C 1 min.,
EF1-728F	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'	58°C 1 min.,
EF2	5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'	72°C 1 min., 30
T1	5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'	cycles. 72°C, 7
CYLTUB1R	5'-AGTTGTCGGGACGGAAGAG-3'	min.

件如表一。增幅所得核酸片段經定序後利用SeqMan將序列進行連結及檢查⁽²³⁾，完成之序列資料利用美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的基因資料庫中的Nucleotide BLAST進行物種比對，協助後續物種類緣分析作業。利用MEGA X⁽¹³⁾進行多序列資料的排列比對 (alignment)，使用MEGA X及RAXML⁽²²⁾進行鄰近連接類緣分析 (neighbor joining)及最大似然類緣分析(maximum likelihood)。

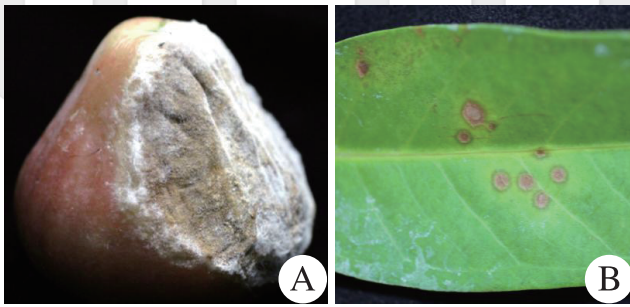
類緣分析作業中以分離自高雄市岡山地區毛豆植株造成紅冠腐病的3株*Calonectria ilicicola*病菌做為外群菌株，編號為KS-Cal-10-1、KS-Cal-12-3及KS-Cal-23-1。

四、造成蓮霧黃腐病之真菌的形態特徵

菌株培養於馬鈴薯洋菜瓊脂14天，觀察其產孢構造。參照Crous (1994, 2002)定義的各項分類特徵，量取分生孢子長度、觀察分生孢子有無隔膜(septate)、產孢枝延伸長度、產孢枝末端囊泡形狀，及產孢瓶梗形狀等。每1培養皿至少記錄50個分生孢子長寬，總共記錄3皿、150個分生孢子。以400倍放大倍率觀察記錄。另外，於載玻片置入1滴0.1% Calcofluor white再置入分生孢子並覆以蓋玻片，靜置2分鐘後，於螢光顯微鏡(Leica DFC 480)以1,000倍的放大倍率觀察分生孢子隔膜數量。觀察時使用405 nm的激發光濾片(excitation filter)及465nm散發光濾片(emission filter)。

結果

蓮霧果實經LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3及LB-Cal-4菌絲塊接種約3天後形成褪色病斑，病斑面積隨著時間增加，隨後皺縮，病斑上著生黃褐色菌絲並產生白色分生孢子團，所有菌株均可感染蓮霧果實，所有蓮霧均可形成相同病徵(圖一A)。人為接種所造成的病徵亦與田間自然發病病徵相符。葉



圖一、蓮霧黃腐病菌接種於蓮霧果實及葉片造成之病徵。(A)果實經人工接種黃腐病菌菌絲塊9天後之病徵。(B)葉片經人工接種黃腐病菌分生孢子3天後之病徵。

Fig. 1. Symptoms of yellow rot of wax apple fruit and leaf. (A) Symptoms of wax apple fruit recorded nine days after artificial inoculated with a mycelial disc of *Calonectria sulawesiensis*. (B) Symptoms of wax apple leaf recorded three days after artificial inoculated with conidia suspension of *Ca. sulawesiensis*.

片經分生孢子懸浮液接種後4-5天，形成黃褐色圓形病斑(圖一B)，由受害組織可再分離獲得相同真菌。此外，以LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3及LB-Cal-4分生孢子接種於未經製造傷口的大豆、花生及紅豆之嫩葉3-5天後亦可侵染並形成褐斑(圖二A-C)。需經由傷口才得以感染的作物則有茄子、椪果及棗。而芋頭、木瓜及番石榴則不論有無傷口，均不受該菌株影響。

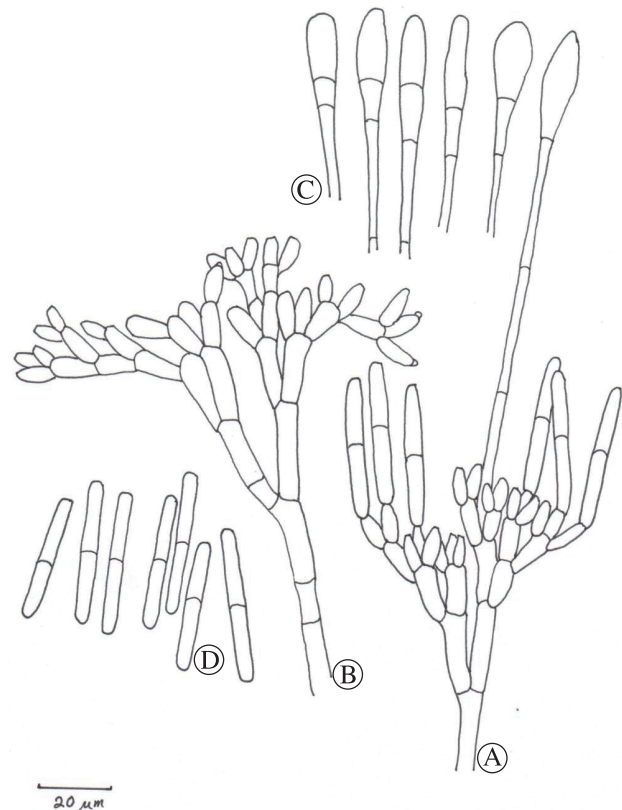
造成蓮霧黃腐病之真菌於培養基或蓮霧果實上，均未發現其有性繁殖形態。其無性繁殖形態可產生厚膜孢子(chlamydospore)及分生孢子。分生孢子的產孢構造具有分枝狀產孢枝(conidiophore)，產孢枝多為2-3分枝(圖三A-B，圖四A)。產孢枝著生桶狀(doliiform)至腎形(reniform)的瓶梗(phialae)(圖三B，圖四A)，產孢枝延伸末端膨大為1囊泡(vesicle)構造，囊泡形狀主要為棒棍形(clavate)，囊泡柄長度約介於110~170 μm之間(圖三C)。分生孢子(31.5)37.5(47.2) × 4 μm，具有1隔膜(septate)(圖三D，圖四B-C)。

LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3及LB-Cal-4菌株的ITS、β-tubulin、elongation factor TEF-1 α及histone H3序列經NCBI比對分析，結果顯示，該菌株的ITS序列與*Ca. sulawesiensis*、*Ca. brasiliensis*、*Ca. morganii*及*Ca. pauciramosa*分別有99-100%、



圖二、蓮霧黃腐病菌接種於大豆(A)、花生(B)及紅豆(C)可侵染葉片並產生褐化斑。

Fig. 2. Symptoms of leaf spots developed after inoculation with conidial suspension of *Calonectria sulawesiensis*. (A) soybean, (B) peanuts, (C) adzuki beans.



圖三、*Calonectria sulawesiensis* (A) 產孢構造具有分枝狀的產孢枝(conidiophore)，產孢枝可延伸為末端膨大構造；(B) 產孢枝著生桶狀(doliiform)至腎形(reniform)的瓶梗(phialae)；(C) 棍棒狀(clavate)的膨大構造；(D)大分生孢子(macroconidia)，具有1個隔膜(septate)。

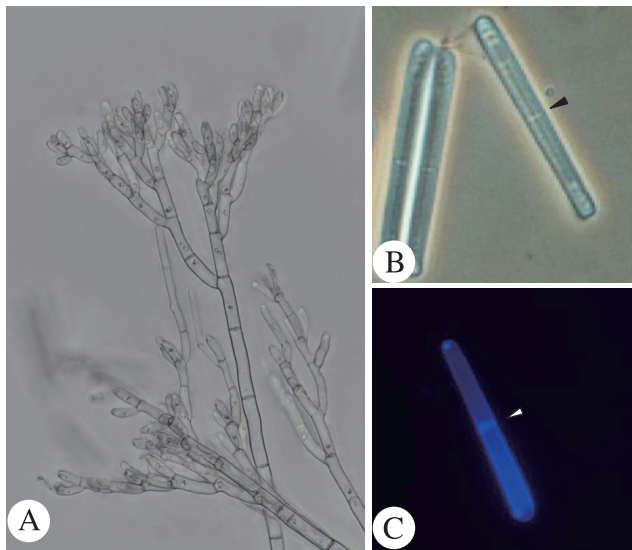
Fig. 3. *Calonectria sulawesiensis*. (A) Sporulation structures of consisting a stipe, a penicillate arrangement of fertile branches, a stipe extension, and a terminal vesicle. (B) Conidiogenous apparatus with conidiophore branches and doliiform to reniform phialides. (C) Clavate vesicles; (D) One-septate macroconidia.

99%、99%及99%的相似性(identity)；beta-tubulin序列與*Ca. sulawesiensis*、*Ca. brasiliensis*、*Ca. polizzii*及*Ca. pauciramosa*分別有99%、99%、93%及93%的相似性；TEF-1 α序列與*Ca. sulawesiensis*、*Ca. brasiliensis*及*Ca. polizzii*分別有99%、98%及91%的相似性；histone H3序列與*Ca. sulawesiensis*、*Ca. brasiliensis*、*Ca. morganii*、*Ca. pauciramosa*及*Ca. polizzii*分別有100%、99%、97%、91%及91%的相似性。由NCBI取得前述菌株序列(表二)，經鄰近連接類緣分析及最大似然類緣分析，所整合之類緣樹(phylogenetic tree)顯示LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3及LB-Cal-4菌株與*Ca. sulawesiensis*關係相近(bootstrap value = 99/99)，但兩者被分開，LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3及LB-Cal-4菌株形成單系群(monophyly)。而*Ca. sulawesiensis*及蓮霧黃腐病菌又與*Ca. brasiliensis*關係相近(bootstrap value = 98)(圖五)。

表二、用於類緣分析之 *Calonectria* 菌株TABLE 2. *Calonectria* spp.

Species	Isolate	GenBank accession no.				Host	Reference
		β -tubulin	TEF-1 α	ITS	Histone H3		
<i>Ca. brasiliensis</i>	CBS 230.51*	GQ267241.1	GQ267328	GQ267328.1	GQ267259.1	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lombard <i>et al.</i> 2010 b
<i>Ca. brasiliensis</i>	CBS 114257	GQ267242.1	GQ267329	GQ267329.1	GQ267260.1	Leaf litter	Lombard <i>et al.</i> 2010 b
<i>Ca. ilicicola</i>	CBS 190.50	AF333412.1	AY725726.1	GQ280605.1	AY725676.1	<i>Solanum tuberosum</i>	Lombard <i>et al.</i> 2010 b
<i>Ca. ilicicola</i>	KS-Cal-10-1	MW544141	MW544147	MW541638	MW544144	<i>Glycine max</i>	This study
<i>Ca. ilicicola</i>	KS-Cal-12-3	MW544142	MW544148	MW541639	MW544145	<i>Glycine max</i>	This study
<i>Ca. ilicicola</i>	KS-Cal-23-1	MW544143	MW544149	MW541640	MW544146	<i>Glycine max</i>	This study
<i>Ca. morganii</i>	CBS 110666	FJ918509.1	FJ918557.1	GQ280626.1	FJ918527.1	<i>Ilex vomitoria</i>	Lombard <i>et al.</i> 2010 b
<i>Ca. morganii</i>	CBS 119670	DQ521600.1	GQ421797.1	KY653251.1	DQ521602.1	<i>Pistacia lentiscus</i>	Lombard <i>et al.</i> 2010 a
<i>Ca. pauciramosa</i>	CMW 7592	FJ972380.1	FJ972497.1	MT359788.1	MT335567.1	<i>Eucalyptu grandis</i>	Lombard <i>et al.</i> 2010 a
<i>Ca. polizzii</i>	CMW 10151	FJ972418.1	FJ972487.1	GQ280667.1	FJ972437.1	<i>Arbutus unedo</i>	Lombard <i>et al.</i> 2010 b
<i>Ca. sulawesiensis</i>	LB-Cal-1	MW544150	MW544158	MW541641	MW544154	<i>Syzygium samarangense</i>	This study
<i>Ca. sulawesiensis</i>	LB-Cal-2	MW544151	MW544159	MW541642	MW544155	<i>Syzygium samarangense</i>	This study
<i>Ca. sulawesiensis</i>	LB-Cal-3	MW544152	MW544160	MW541643	MW544156	<i>Syzygium samarangense</i>	This study
<i>Ca. sulawesiensis</i>	LB-Cal-4	MW544153	MW544161	MW541644	MW544157	<i>Syzygium samarangense</i>	This study
<i>Ca. sulawesiensis</i>	CMW 14878	GQ267220.1	GQ267340.1	GQ280635.1	GQ267269.1	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lombard <i>et al.</i> 2010 b
<i>Ca. sulawesiensis</i>	CMW 14879	GQ267222.1	GQ267342.1	GQ280637.1	GQ267271.1	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lombard <i>et al.</i> 2010 b

* The type strains are indicated in bold letter.



圖四、*Calonectria sulawesiensis* 之分生孢子及產孢構於可見光及螢光顯微境下之觀察。(A, B) 可見光；(C) 螢光。

Fig. 4. Light and fluorescent microscopy of conidia and sporulation structures of *Calonectria sulawesiensis*. (A, B) Visible light; (C) UV-fluorescent image. Arrow heads indicates a septum of the conidia.

依據上述NCBI比對結果，摘錄及比對Crous (1994, 2002) 及Lombard 等人所整理的Calonectria分類系統^(16, 17)，*Ca. brasiliensis*囊泡柄長度小於200 μm ，產孢枝多為3分枝，分生孢子約 $38 \times 3.5 \mu\text{m}$ 。*Ca. morganii* (無性繁殖形態為*Cy. scoparium*) 囊泡柄長度150~200 μm ，囊泡呈橢圓形 (ellipsoidal) 至梨形

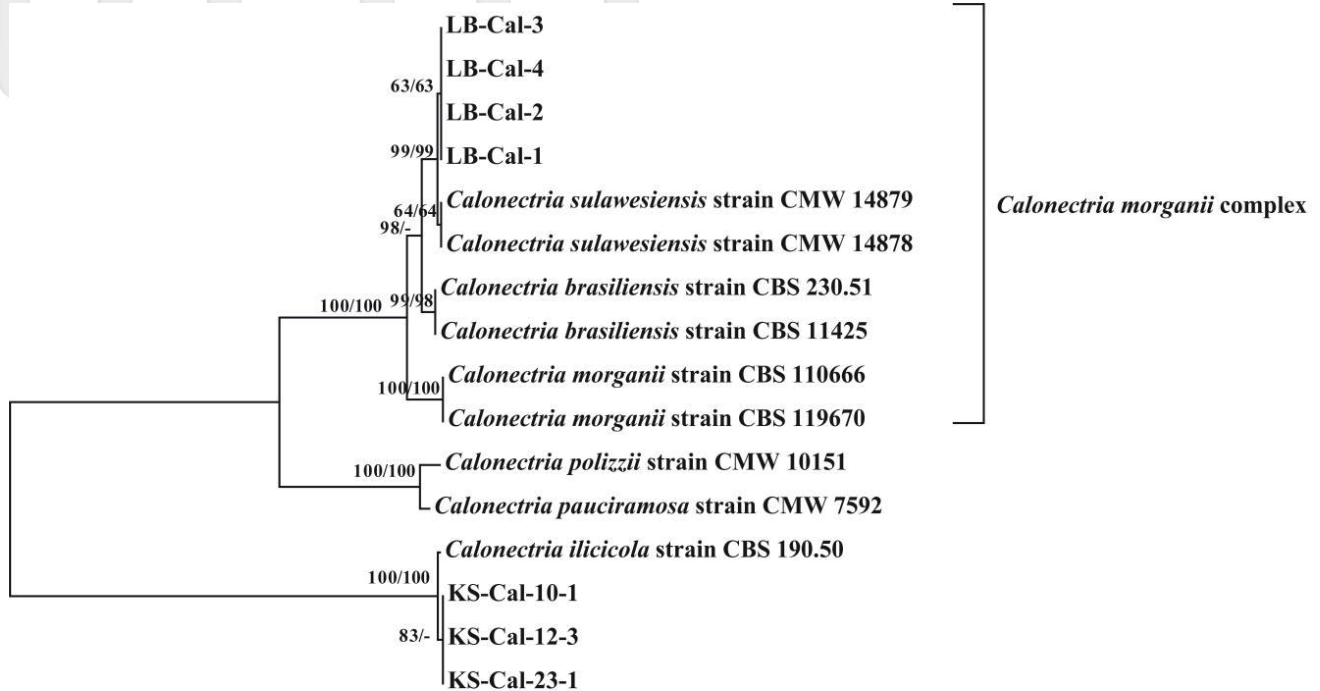
(pyriform) 或棍棒形 (clavate)，分生孢子 $(42)45(50) \times (3)4(5) \mu\text{m}$ 。*Ca. pauciramosa* (無性繁殖形態*Cy. pauciramosum*)，囊泡為倒梨形 (obpyriform) 至橢圓形 (ellipsoidal)，囊泡柄約120-230 μm 。分生孢子 $(45)50(55) \times (4)4.5(5) \mu\text{m}$ 。*Ca. polizzii*囊泡柄長度約111~167 μm ，末端囊泡為倒梨形 (obpyriform) 至橢圓形 (ellipsoidal)，分生孢子具有1隔膜，約 $(32)37(49) \times (3)4(5) \mu\text{m}$ 。*Ca. sulawesiensis*囊泡柄長度約113~262 μm ，囊泡為寬棒狀 (broadly clavate)，產孢枝多為5分枝，分生孢子約 $48 \times 4 \mu\text{m}$ (無性繁殖形態未知)⁽¹⁷⁾。

由於類緣分析結果，LB-Cal-1、LB-Cal-2、LB-Cal-3及LB-Cal-4菌株與*Ca. sulawesiensis*、*Ca. brasiliensis*及*Ca. morganii*關係相近，且皆為*Ca. morganii*複合群^(8, 17) (species complex)(圖五)，其形態亦接近。

討 論

本試驗依據類緣分析結果以*Calonectria sulawesiensis*與造成蓮霧黃腐病的真菌最為接近，另外依照Crous(1994, 2002) 及Lombard 等人(2010a, 2010b)之型態分類系統，造成蓮霧黃腐病之真菌，其產孢構造形態及尺寸則與*Ca. brasiliensis*及*Ca. polizzii*較為相近(圖五)。

*C. sulawesiensis*為Lombard等人於2010年首次由印尼蘇拉威西島(Sulawesi)的桉樹所發現。*Ca. brasiliensis* 則由Batista在1951年於桉樹種苗所發現，當時被鑑定為*Cy. scoparium*的小孢子變種*Cy. scoparium* var. *brasiliensis* (Batista & Ciferri)⁽¹⁰⁾。*Cy.*



圖五、以組蛋白H3 基因, 轉錄因子1 α 基因, β -微管蛋白基因及內轉錄間隔區序列排列比對後, 進行鄰近連接類緣分析及最大似突類緣分析。

Fig. 5. The Neighbor Joining / Maximum Likelihood phylogenetic tree of the nucleotide sequences in the histone H3, translation elongation factor-1 α , b-tubulin, and ITS.

scoparium 為柱狀分枝孢菌屬(*Cylindrocladium*)無性繁殖形態的模式種 (type species), 其有性繁殖形態為 *Calonectria morganii* Crous⁽¹⁶⁾。Lombar 等人, 經類緣分析結果又將 *Cy. scoparium* var. *brasiliensis* 由變種, 重新鑑定歸類為種 (species) 而命名為 *Calonectria brasiliensis*⁽¹⁷⁾。

由於 *Ca. sulawesiensis*、*Ca. brasiliensis*、*Ca. cerciana*、*Ca. hawksworthii*、*Ca. leucothoes* 及 *Ca. morganii* 形態甚為相近, 因此被歸屬於 *Ca. morganii* 複合群^(8, 17)。本試驗分析結果, 雖然蓮霧黃腐病菌產孢構造與孢子尺寸與 *Ca. brasiliensis* 較為接近, 但是 Lombard 於 2010 年的報導中亦指出, *Ca. sulawesiensis* 與 *Ca. morganii* 複合群的 *Ca. brasiliensis* 及其他菌種在形態上差異甚小, 只有在大分生孢子的平均長寬 (48 \times 4 μ m) 略大於其它菌種⁽¹⁷⁾, 而且真菌容易因培養條件影響, 造成產孢構造之尺寸之變化, 因此本研究依據類緣分析之結果判定造成蓮霧黃腐病的真菌為 *Calonectria sulawesiensis*。

引用文獻

- 王維洋 1992, 台灣桉樹病害調查報告。林試所研究報告季刊7:179-194。
- 林正忠、蔡叔芬。2004。蓮霧黃腐病。植物保護圖鑑系列 14 - 蓮霧保護, 第78頁。防檢局。
- 張東柱, 1991, *Calonectria kyoensis* 引起牛樟扦插苗之黑腐病。中華林學季刊24: 111-120。
- 張東柱, 1992, 牛樟扦插苗之兩種新病害。林試所研究報告季刊7:231-236。
- 蔡宜儒、陳本源、黃振文, 2012, 台灣枇杷枝枯病菌的鑑定。Plant Pathology Bulletin 21: 79-89。
- 鄭吉助、黃振文, 2003, 台灣玫瑰黑腐病之病原菌形態與生理特性。植病會刊12: 85-92。
- Carbone, I., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553 - 556.
- Cinquerrui, A. 2014. Sustainable approaches to control *Calonectria* diseases in ornamental nursery. PhD theses of Università degli STUDI di Catania.
- Crous, P. W. 1994. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. Mycotaxon 51: 341-435.
- Crous, P. W. 2002. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. The American phytopathological society, Minnesota, USA, 278 pp.
- Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, and V.,

- Stegehuis, G. 2004a. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology* 50: 19 – 22.
12. Crous, P.W., Groenewald, J. Z., Risède, J.-M., Simoneau, P., Hywel-Jones, N. L. 2004b. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50: 415 – 430.
13. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
14. Liu, H. H., Shen, X. M., Chang, H. X., Tseng, M. N. and Lin, Y. H. 2020. First report of red crown rot caused by *Calonectria ilicicola* on soybean in Taiwan. *Plant disease* 104: 979.
15. Lombard, L., Chen, S. F., Mou, X., Zhou, X. D., Crous, P. W., and Wingfield, M. J. 2015. New species, hyper-diversity and potential importance of *Calonectria* spp. From Eucalyptus in South China. *Studies in Mycology* 80: 151-188.
16. Lombard, L., Crous, P. W., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2010a. Multigene phylogeny and mating tests reveal three cryptic species related to *Calonectria pauciramosa*. *Studies in Mycology* 66:15-30.
17. Lombard, L., Crous, P. W., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2010b. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology* 66: 31-69.
18. Lombard, L., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C., and Crous, P. W. 2016. The forgotten *Calonectria* collection: Pouring old wine into new bags. *Stud. Mycol.* 85: 159-198.
19. O' Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103 – 116.
20. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95: 2044 – 2049.
21. Rossman, A. Y. 1996. Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. *Mycologia* 88: 1-19.
22. Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312 – 1313.
23. Swindell, S. R., and Plasterer, T.N. 1997. SEQMAN. In: Swindell S.R. (eds) *Sequence Data Analysis Guidebook. Methods In Molecular Medicine™*, vol 70. Springer, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/0-89603-358-9:75>.
24. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* pp. 315-322. Academic Press.

ABSTRACT

Tseng, M. N. 2020. The causal agent of wax apple yellow rot disease. *J. Plant Med.* 63(2): 17-22.

*Corresponding author, E-mail: minnan@mail.kdais.gov.tw

A large number of cultivated apples were infected by wax apple yellow rot disease and caused important economic losses in Liugui District of Kaohsiung City, Linbian Township, Nanzhou Township and Donggang Township of Pingtung County. The symptoms of the wax apple yellow rot disease on the wax apple fruit appear at first as water-soaked spots. The spots enlarge rapidly and form brown, blighted areas and covered by white mold. The pathogens were isolated from wax apple fruit in Linbian Township, and Koch's postulates were proven by pathogenicity tests on wax apple fruit. In vivo infection studies showed that the causal agent of yellow rot disease isolated from wax apple were able to infect soy bean (*Glycine max*), peanut (*Arachis hypogaea*) and adzuki bean (*Vigna angularis*) and also could infect eggplant (*Solanum melongena*), mango (*Mangifera indica*) and jujube (*Ziziphus mauritiana*). Portions of the internal transcribed spacer and β -tubulin, histone H3, and transcription factor-1 α genes of the causal agent were sequenced for multigene phylogenetic analysis. The morphological characters were also used to identify. The results indicated that the causal agent of the wax apple yellow rot disease was *Calonectria sulawesiensis*.

Keywords: *Syzygium samarangense*, yellow rot, *Calonectria sulawesiensis*