

葡萄座腔菌屬病原菌為引起台灣木棉潰瘍病 與苦楝流膠病之可能病原

黃裕星¹、洪挺軒²、陳昭翰¹、吳孟玲^{1*}、汪澤宏¹、劉則言¹

¹ 行政院農業委員會林業試驗所

² 國立台灣大學植物病理學系

* 聯絡作者, E-mail: mlw@tfri.gov.tw

摘要

黃裕星、洪挺軒、陳昭翰、吳孟玲、汪澤宏、劉則言。2016。葡萄座腔菌屬病原菌為引起之木棉潰瘍病與苦楝流膠病之可能病原。植物醫學58(1): 39-44。

樹木潰瘍病主要由真菌侵染所致，在引起病害的多種病原真菌中，葡萄座腔菌屬(*Botryosphaeria* spp.)是重要的一屬。該屬真菌屬於座囊菌綱(Dothideomycetes)，是一類世界性分佈的真菌，種類非常豐富，寄主範圍十分廣泛。此屬的某些病原菌是水果及木本植物的重要病原，引起的症狀包括葉斑、枝枯、梢枯、莖腐、果腐、潰瘍及流膠等，進而可能導致樹木死亡。葡萄座腔菌屬的大部分成員多具有廣泛的寄主範圍，當其寄主植物遭遇到逆境或壓力時，便有機會造成廣泛的病徵。比較常見的病害有側柏枝枯病、木瓜與芒果蒂腐病、番石榴莖潰瘍病、桃梅等核果類果樹流膠病及櫻花流膠病等。近年來台灣種植之樹木常出現枝枯或樹幹潰瘍流膠等情形，如各地之木棉樹枝幹出現黑色潰瘍腫塊，以及苦楝樹皮出現縱裂流膠病徵，而國內並無此兩種病害之相關研究發表，我們試圖分離造成該兩種病害之病原菌，並進行分子鑑定，顯示 *Lasiodiplodia theobromae* 及 *L. pseudotheobromae* 兩種葡萄座腔菌屬真菌極有可能為造成此兩種病害的病原菌。木棉潰瘍病已在全台灣普遍的發生，遭受此病害感染之木棉樹會大量出現黑色潰瘍腫塊影響觀感及市容，可能導致整棵樹木愈來愈衰弱，嚴重時亦可能造成樹木死亡。而其近緣的病原菌 *L. pseudotheobromae* 則可能是造成苦楝流膠病的病原菌。在確定病害病原之後可進行相關防治研究及健康管理策略的擬定，將有助於降低此類病害發生情形。

關鍵詞：木棉、苦楝、潰瘍病、流膠病

緒言

樹木潰瘍病主要由真菌侵染所致，在引起病害的多種病原真菌屬中，葡萄座腔菌屬(*Botryosphaeria* spp.)是重要屬之一。該屬真菌屬於座囊菌綱(Dothideomycetes)，是一類世界性分佈的真菌，種類非常豐富，寄主範圍十分廣泛^(7, 21)；此屬的某些病原菌是水果及木本植物的重要病原，引起的症狀包括葉斑、

枝枯、梢枯、莖腐、果腐、潰瘍及流膠等，進而可能導致樹木死亡^(8, 14, 16, 25, 28, 29)。Botryosphaeriaceae的大部分成員多具有廣泛的寄主範圍，而且已被確認為成功的伺機病原(opportunistic pathogens)，也就是說當其寄主植物遭遇到逆境或壓力時，便有機會造成大量的明顯病徵^(15, 26, 30)。比較常見的病害有木瓜與芒果蒂腐病、番石榴莖潰瘍病、桃梅等核果類果樹流膠病及櫻花流膠病等。另外還可引起根腐病(root rot)或領腐病(collar rot)導致整株樹的枯死。葡萄座腔菌屬所致林木及果樹病害，使得木材品質降低，經濟林產量降低，果實腐爛變質，造成嚴重的危害和經濟損失。

Lasiodiplodia theobromae 是Botryosphaeriaceae的成員之一，廣泛且活躍分佈於熱帶和亞熱帶地區，高溫多濕的氣候有利於病原菌的發生^(4, 23, 24)。它也是人類病原體的一種，有報告指出它會引起角膜感染及皮膚病^(23, 33)，並且是高達500種植物寄主的植物病原菌⁽²³⁾。芒果蒂腐病首先發生於緬甸，隨後斯里蘭卡、美國、菲律賓、模里西斯、泰國、印度及澳洲亦有報告^(14, 20, 27)。印度也曾報導本病原菌可感染梨、橡膠樹、林投及玉米^(11, 34, 26, 31)。在委內瑞拉，Cedeño與Palacios-Pru報導本菌會引起檸檬及柳橙的流膠病⁽⁵⁾；Phipps⁽²²⁾及Filer⁽⁹⁾則分別記載美國花生領腐病(collar rot)及美國梧桐潰瘍病的發生。在奈及利亞，Arinze⁽²⁾及Okonkwo⁽¹⁹⁾分別記載本菌造成甘藷、樹薯、山藥的儲藏性軟腐病，以及香蕉果腐病。台灣亦記載多種作物受害，大多為果實貯藏型病害，包括芒果、木瓜、柑橘果實蒂腐病、香蕉軸腐病、菜豆苗莖枯病、番石榴果腐病、蓮霧黑腐病、波羅蜜果腐病⁽¹⁰⁾等，樹木受害記錄則有馬拉巴栗編瓣苗黑腐病及番石榴莖潰瘍病等^(32, 37)。*L. pseudotheobromae* 當初被鑑定為 *L. theobromae*，是最近從被分離出來的隱蔽種(cryptic species)⁽¹¹⁾。該物種來自非洲，歐洲和拉丁美洲的森林和果樹。越來越多的證據顯示，*L. pseudotheobromae* 如同 *L. theobromae*，具有廣泛的全球分部及宿主範圍^(3, 17, 35)，台灣相思，南洋楹，桉樹屬，芒果山毛櫸和泡桐都為這一物種的寄主⁽³⁹⁾。

近年來台灣種植之樹木常出現枝枯或樹幹潰瘍流膠等情形，如各地之木棉樹枝幹出現黑色潰瘍腫塊，初期腫塊分部較為零星(圖一A)，中期腫塊逐漸增加甚至接合(圖一B)，後期則全樹皆被黑色腫塊包覆(圖一C)。另外我們亦發現苦楝樹皮出現縱裂流膠病徵(圖二)，而國內並無此兩種病害之相關研究發表，我們試圖分離造成該兩種病害之病原菌，並進行分子鑑定，顯示 *L. pseudotheobromae* 與 *L. theobromae* 兩種葡萄座腔



圖一、行道木棉樹出現黑色潰瘍腫塊病徵，(A)初期，(B)中期及(C)後期。

Fig. 1. Canker and black tumor symptoms of *Bombax ceiba* on the sidewalk, (A)early stage, (B)middle stage and (C)late stage.



圖二、苦楝樹皮出現縱裂流膠病徵。

Fig. 2. Longitudinal split and gummosis symptom on the bark of *Melia azedarach*.

菌屬真菌可能為造成此兩種病害的病原菌。

材料與方法

病原菌分離培養

採集感染木棉樹潰瘍病樹幹部黑色潰瘍腫塊及苦楝莖部流膠塊，分別剝取 $1 \times 1\text{ cm}^2$ 大小樣本數片，用鑷子夾取置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基PDA（馬鈴薯抽出物potato infusion、葡萄糖glucose、洋菜agar含量為20%、2%及2%，經高溫高壓滅菌，待溫度稍微降低之後倒入培養皿製備）上，使其於室溫培養4-7天，切取菌落邊緣之新生菌絲塊（ $0.5 \times 0.5\text{ cm}^2$ ），移殖到新的PDA培養基上，待2-3天後重覆移殖一次，等待4-5天後切取10數片新生菌絲塊，浸泡於ddH₂O中作為菌種保存。上述動作所使用之器具均需高溫高壓滅菌消毒，並全程於無菌通風櫥內操作，以避免菌種污染。

病原菌菌絲全核酸萃取

此方法依據Hung 等人發表之核酸抽取方法修改後進行，主要步驟簡述如下：用微量吸管刮取培養基上菌絲，置入離心管內，利用磨蟲棒加以磨碎後，加入1.5 mL CTAB核酸抽取緩衝溶液（100 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB（hexadecyltrimethyl ammonium-bromide），100 μL 10% sarkosyl，置於55°C水浴作用30分鐘，加熱期間取出震盪數次。之後加入100 μL 10%CTAB/0.7 M NaCl及100 μL 5M NaCl，置於65°C水浴10分鐘，加熱期間取出震盪數次。之後加入1/2體積之氯仿/異戊醇（chloroform/ isoamyl alcohol, CIAA, 24:1 v/v），劇烈混合至乳黃色後，以12,000 rpm離心5 min，收集含有核酸之上方水層；再加入1/2體積之酚/氯仿/異戊醇（phenol/CIAA, phenol: CIAA = 1:1 v/v），劇烈混合至乳白色，以12,000 rpm離心 5 min，收集含有核酸之上方水層。最後加入等體積的異丙醇（isopropanol），在-20°C沉澱DNA 10 min，高速12,000 rpm 離心 5 min，收集沉澱核酸，再以70%酒精洗滌沉澱之核酸以去除殘留之鹽類，真空抽氣乾燥處理後，加入100 μL TE buffer (10mM pH 8.0 Tris-HCl, 1mM pH 8.0 EDTA) 溶解核酸，置於-20°C下保存備用。以核酸計算儀（GeneQuant II RNA/DNA Calculator; Pharmacia Biotech, Science Park, Cambridge, UK）測定OD260 讀值，以計算DNA含量，供PCR反應之用。

木棉潰瘍病黑色腫塊組織核酸萃取

此方法依據 Hung 等人發表之核酸抽取方法修改後進行，採集感染潰瘍病莖幹部黑色腫塊組織，取0.15g組織利用液態氮於研鉢磨碎後，加入0.9 mL CTAB核酸抽取緩衝溶液（100 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB（hexadecyltrimethyl ammonium-bromide），100 μL 10% sarkosyl，置於55°C水浴作用 30 分鐘，加熱期間取出震盪數次。之後以 6000 rpm 低速離心 5 分鐘，取上清液 800 μL ，加入100 μL 10%CTAB/0.7 M NaCl及100 μL 5M NaCl，置於65°C水浴 10 分鐘，加熱期間取出震盪數次。之後加入1/2體積之氯仿／異戊醇（chloroform/isoamyl alcohol, CIAA, 24:1 v/v），劇烈混合至乳褐色後，以 12,000 rpm離心 5 min，收集含有核酸之上方水層；加入 1/2 體積之酚/氯仿/異戊醇（phenol/CIAA, phenol: CIAA = 1:1 v/v），劇烈混合至乳白色，以 12,000 rpm離心 5 min，收集含有核酸之上方水層。最後加入等體積的異丙醇（isopropanol）在-20°C沉澱 DNA 10 min，高速 12,000 rpm離心 5 min 收集沉澱核酸，再以70%酒精洗滌沉澱之核酸以去除殘留之鹽類，真空抽氣乾燥處理，加入 100 μL TE buffer 溶解核酸，置於-20°C下保存備用。

病原菌核酸PCR增幅反應

病原菌通用性引子對PCR增幅測試：將純培養病原菌抽取出來之DNA，以下列通用性引子對ITS5: 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'; ITS-4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3'進行增幅，25 μL PCR反應溶液中含：2 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs mixture、50 ng引子對、1.5 U Tag DNA polymerase（Invitrogene, San Diego, CA, USA）、100 ng模板核酸（template DNA）。PCR反應器所設定之反應程式為：94°C 預熱2 min；再以94°C 30 sec變性（denaturation），56°C 30 sec黏合（annealing），72°C 40 sec延展（extention）進行30個循環；最後再以72°C反應5 min使Tag酵素完全作用，即完成PCR

反應，增幅出的產物交由廠商完成定序。

病原菌專一性引子對增幅：採集台北市區六個樣點之木棉潰瘍病組織，包括青年公園、古亭捷運站、公館商圈、愛國西路、忠孝東路及中華路福星國小旁，直接萃取核酸後以專一 Lth1 5'-CTC CAG TCA GTA AAC GCA GAC-3' 搭配通用性引子 ITS4 進行 PCR 增幅試驗，引子序列取自參考文獻⁽¹³⁾。

木棉接種測試

由於樹木生長期長，且觀察本病原菌病徵皆發生於已木質化之木棉樹皮表面，因此考量在不危害成樹的前提下，切取木棉樹新鮮枝條，將培養基上已產孢之純培養病原菌切取 0.5 × 0.5 cm² 置放於枝條上，觀察病原及病徵發展情形。

結 果

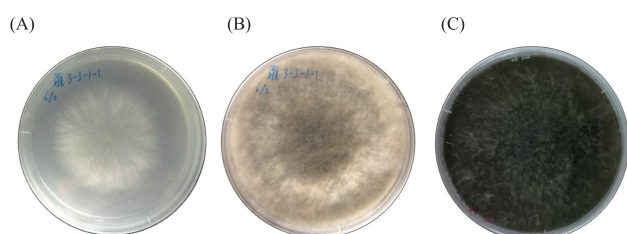
病害症狀

潰瘍腫塊發生在寄主木棉樹皮上，大多數情形下剝除腫塊可看見內部木材仍健康正常，並無腐朽空洞化情形，故此病原菌感染範圍較侷限於樹皮表面。而該潰瘍往往伴隨傷口出現，然後向四周擴展，主幹和側枝枝條皆會遭受侵染。高溫高濕環境下發生情形較乾燥環境下嚴重，在適宜的環境條件下病斑擴展迅速。苦楝流膠病之枝幹有縱裂傷口，傷口處流出琥珀色膠體，風乾硬化後黏附於樹皮表面，流膠病可能會因為機械損傷、病蟲害及寒害等原因而發生，本研究之苦楝流膠病樣本在攜回實驗室後有天牛羽化鑽出，故本苦楝樣本可能因為天牛寄生造成木材內部腐朽，進而產生傷口再伴隨真菌感染導致流膠現象發生。

病原菌分離培養

木棉樹潰瘍病：取木棉樹潰瘍病樹幹部黑色潰瘍腫塊，於 PDA 培養基上分離出病原菌，菌落邊緣平滑完整，菌絲尖端呈羽毛狀分岔，菌絲生長初期為白色(圖三A)，數日後轉為灰綠色(圖三B)，兩周後則完全呈現墨綠色至黑色(圖三C)。

苦楝流膠病：剝取發生流膠病之苦楝莖部流膠硬塊，置於 PDA 培養基上數小時後會融解呈果凍狀，分離出之病原菌相十分單一，呈現出的生長特性如同木棉樹潰瘍病所分離到之病原菌。



圖三、木棉樹潰瘍病於PDA培養基上分離出病原菌，菌絲初期為白色(A)，數日後轉為灰綠色(B)，兩周後則完全呈現黑色(C)。

Fig. 3. Pathogen fungi isolated from canker tissues of *Bombax ceiba* cultured on PDA medium, the hyphae is white in the beginning(A), then turns to grey green in 5-7 days (B), finally convert to black in couple weeks(C).

病原菌鏡檢及分子鑑定

病原菌鏡檢：刮取木棉樹潰瘍病分離到之菌絲置於顯微鏡下觀察，可以看到卵型或橢圓型分生孢子，初期為透明白色，成熟後轉為深褐色，中間有橫隔，此為葡萄座腔菌屬真菌之重要病徵(圖四)。

病原菌通用性引子對PCR增幅及定序：刮取木棉潰瘍病與苦楝流膠病分離到之病原菌絲，萃取核酸後，以真菌通用性 ITS4/ITS5 引子對進行增幅，增幅產物大小約為 600bp，將增幅核酸片段送交廠商定序(明欣生物科技有限公司，台北)，ITS 序列定序結果與美國國家生物科技資訊中心(NCBI: The National Center for Biotechnology information)之 GeneBank 基因序列資料庫進行 BLAST 演算比對後，顯示兩種病原菌分別為 *L. theobromae* 及 *L. pseudotheobromae*，序列相似性分別都達到 99%。



圖四、刮取 *L. theobromae* 病原菌於顯微鏡下觀察，可以看到卵型或橢圓型分生孢子，初期為透明白色，成熟後轉為深褐色，中間有橫隔，此為葡萄座腔菌屬真菌之重要特徵。

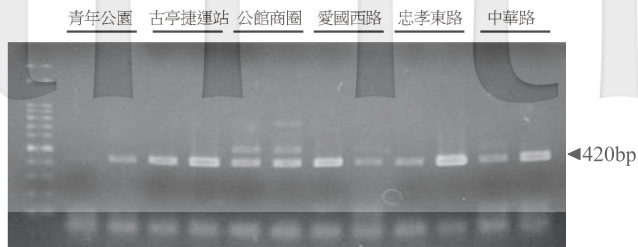
Fig. 4. *L. theobromae* is observed by optical microscope, Hyaline immature conidia (arrow 1), mature pigmented conidia with longitudinal striations (arrow 2), immature thick-walled conidia (arrow 3), immature conidia without longitudinal striations developed.

病原菌專一性引子對增幅

採集台北市區六個樣點之木棉潰瘍病組織，將各樣點組織直接萃取核酸以 Lth1/ITS4 專一性引子對⁽⁶⁾進行 PCR 增幅，該引子對是以 *L. theobromae* 核醣體 DNA 之 ITS 區域片段所設計之種專一性引子 Lth1，與廣效性引子 ITS4 配對增幅，目標產物大小為 420bp⁽⁶⁾。結果各樣本皆呈現陽性反應(圖五)，增幅產物片段大小為 420bp，將產物送交廠商完成核酸定序，序列定序結果於 NCBI 基因序列資料庫進行 BLAST 演算比對後，結果亦證實所增幅之核酸序列為 *L. theobromae*。

木棉枝條接種

由於樹木生長期長，且本病原菌病徵皆發生於已木質化之木棉樹皮表面，因此考量不危害成樹的前提下，切取木棉樹新鮮枝條，將培養基上純培養之 *L. theobromae* 病原菌切取 0.5 × 0.5 cm² 菌絲塊置放於枝條上，可觀察到病原在木棉樹枝條上順利生長，數周後出現類似黑色腫塊病徵(圖六)，將該腫塊壓碎置於顯微鏡下，可觀察到深褐色中間有橫隔之成熟分生孢子。



圖五、採取台北市區六個樣點之木棉潰瘍病組織，直接萃取組織核酸以Lth1/ITS4專一性引子對進行PCR增幅，結果各樣本皆呈現陽性反應，增幅片段大小為420bp。

Fig. 5 Collect canker tissues of *Bombax ceiba* from six plots in Taipei city, extract DNA and subject to PCR reaction by specific primer pair Lth1/ITS4. All samples show positive results with PCR products of 420bp.



圖六、將培養基上純培養之 *L. theobromae* 病原菌切取0.5 × 0.5 cm²置放於枝條上，可觀察到病原菌在木棉樹枝條上順利生長，數周後出現類似黑色腫塊病徵。

Fig. 6. Inoculate twigs of *Bombax ceiba* by pure cultured *L. theobromae*, the pathogen grew well and developed black tumor symptoms in several weeks.

討 論

樹木潰瘍病主要由真菌侵染所致，在引起病害的多種病原真菌中，葡萄座腔菌屬(*Botryosphaeria* spp.)是重要的一屬。該屬真菌屬於座囊菌綱(Dothideomycetes)，是一類世界性分佈的真菌，種類非常豐富，寄主範圍十分廣泛。本研究報告中從木棉潰瘍病所分離出之 *L. theobromae* 病原真菌，已被鑑定可造成多種植物病害，包括芒果、木瓜、柑橘果實蒂腐病、香蕉軸腐病、菜豆苗莖枯病、番石榴果腐病、蓮霧黑腐病、波羅蜜果腐病等。木棉潰瘍病已在全台灣普遍的發生，本研究結果顯示具有廣泛寄主範圍的 *L. theobromae* 很可能是造成此病害的病原菌，包括染病樣本分離出的純菌株，分子定序比對結果，及各地病徵樣本核酸專一性引子對檢測結果，皆指出 *L. theobromae* 極可能為造成木棉潰瘍病的病原菌。但由於樹木生長期長且本病原菌病徵皆發生於已木質化之木棉樹皮表面，因此考量不危害成樹的前提下，本研究採取離枝接種實驗，結果會產生類似的黑色潰瘍腫塊病徵，本結果雖顯示 *L. theobromae* 很可能是造成木棉潰瘍病的病原菌，但未來仍須以柯霍氏法則

加以驗證，才能更加確認本病原菌之病原性與相關致病機制。遭受此病害感染之木棉樹會大量出現黑色潰瘍腫塊影響觀感及市容，可能導致整棵樹木愈來愈衰弱，嚴重時亦可能造成樹木死亡。現地觀察黑色潰瘍病徵時可發現到黑色腫塊常常伴隨外傷或是修枝產生的斷點出現，由於該病原菌會產生大量分生孢子進行傳播，因此有可能藉由風力或是雨水噴濺，再經由樹木傷口侵入造成病徵，因此，選擇適當的修枝時機，例如避開梅雨季或颱風季節，並避免造成過大傷口，必要時在修枝斷點施以保護性藥劑，可能可以減少病原傳播機率，而防治藥劑的選擇方面，根據植物保護手冊，依普同水懸劑及枯草桿菌為此病原菌之建議防治藥劑，但由於手冊登載使用標的對象為橡果及木瓜果實，因此，該兩種藥劑對於樹木上之 *L. theobromae* 病原菌防治效果則有待進一步測試。

在分離病原研究過程中值得注意的是，該病原菌在高於室溫培養時生長十分快速，而近年來，台灣本島氣溫逐年升高，加上豪大雨及颱風發生情形相當普遍，是否由於氣候因素造成該病害生長活躍，而豐沛的雨水促使其廣泛傳播，因而造成大範圍的發生是一個值得探究的問題。此外，在進行木棉潰瘍病調查時可觀察到每株樹木出現之病徵不盡相同，有些樹木腫塊範圍大且造成樹皮變形嚴重，有些則較為輕微，腫塊較不明顯且發病範圍亦較侷限，是否有不同病原品系造成致病力的差異，亦或是不同木棉品系具有不同的耐抗病力則值得進一步探討。在防治策略上，一般潰瘍病的防治處理為剷除病徵處，必要時施以保護性藥劑或樹木癒合劑，但木棉潰瘍病的處理可能就必須加以斟酌，因為其病原特性是發病範圍廣而淺，通常較侷限於樹皮表面而不至於造成樹木立即死亡，但如果進行大面積的病徵組織剷除則可能反而造成樹木環狀剝皮，進而導致樹木死亡，因此，若感染範圍過大則不宜採取傳統之擴創防治作法。

與木棉潰瘍病原之近緣病原菌 *L. pseudotheobromae* 可能是造成苦楝流膠病的病原菌，*L. pseudotheobromae* 由於型態與核酸序列皆與 *L. theobromae* 非常近似，因此一開始被鑑定為 *L. theobromae*，直到近年才被單獨分離出來，*L. pseudotheobromae* 同樣具有廣泛的寄主範圍，但國內尚未有該病害之研究報告發表。另外，有趣的是，有國外研究報告指出本病原菌發酵產生之活性物質，對於白粉病及雜草具有抑制效果，可進一步研究開發提供防治應用。流膠病可分為生理性和病原性流膠，生理性流膠是樹膠流出後，腐生菌由傷口侵入造成病部腐爛，病原性流膠則是病菌從傷口或側芽侵入枝條後潛伏感染，次年造成樹皮開裂而溢出膠液。而苦楝的流膠現象屬性還需進一步釐清，對樹體造成的影響也尚需要更多證據加以證實，但可確定的是，流膠現象一般伴隨著腐朽或是外力傷口發生，減少不當修剪、注意環境棲地的排水問題以及避免割草機的傷害，皆能減少流膠病發生的機會。另一個有趣的現象是，當苦楝流膠硬塊置放於馬鈴薯洋菜培養基上後，數十分鐘內該流膠硬塊便會軟化融解，是什麼原因造成此現象則是值得進一步探討的問題。

病害病原確定後，未來可進行相關防治研究及健康管理策略的擬定，例如修剪季節的選擇，雨季前預防性施藥的可行性，傷口保護藥劑的使用、棲地的排水效能監測及樹體保護裝置的設置等，將有助於降低此類病害發生情形。

引用文獻

- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A., and Phillips, A. J. L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fun Divers.* 28:1 – 13.
- Arinze, A. E. 1985. The adsorption of a polygalacturonase isoenzyme of *Botryodiplodia theobromae* on plant tissues and the implication on the pathogenicity of the fungus. *Phytopath. Z.* 114:13-20
- Begoude, B. A. D., Slippers, B., Wingfield, M. J., and Roux, J. 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress.* 9:101-123.
- Burgess, T. I., Barber, A., Mohali, S., Pegg, G., De Beer, W., and Wingfield, M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia.* 98:423 – 435.
- Cedeño, L., and y Palacios-Pru, E. 1992. Identification of *Botryodiplodia theobromae* as the cause of lesions and gummosis on citrus. *Fitopatol. Venez.* 5:10-13
- Cilliers, A. J., Swart, W. J., Wingfield, M. J. 1994. Selective medium for isolating *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Dis.* 78:1052-1055
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, F. O., Phillips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol.* 55:235 – 253.
- Damm, U., Crous, P. W., Fourie, P. H. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia.* 99:664 – 680.
- Filer, T. H. 1969. Sycamore canker caused by *Botryodiplodia theobromae*. *Phytopathology.* 59:76-78
- Hsu, S. T., Chang T. T., Chang C. A., Tsai J. L., and Tsay T. T. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. Taiwan Phytopathological Society. Taichung. 386 pp. (in Chinese)
- Kumar, V. and Shetty, H. S. 1983. Seed-borne nature and transmission of *Botryodiplodia theobromae* in maize (*Zea mays*). *Seed Science & Technol.* 11:781-789
- Kuo, C. H. 1998. Seedling stem blight of lima bean caused by *Botryodiplodia theobromae*. *Plant Prot. Bull.* 40:315 – 327. (in Chinese)
- Lin, Y. J., Wang, Y. T., Yang, H. R., and Wang, P. H. 2009. Detection of quiescent infection of stem end rot pathogen *Lasiodiplodia theobromae* in shoot and pre-plucked mango fruit by seminested PCR. *Plant Pathology Bulletin.* 18: 225-235. [in Chinese with English summary]
- Johnson, G. I., Cooke, A. W., Mead, A. J., and Wells, I. A. 1991. Stem end-rot of mango in Australia: causes and control. *Acta Hortic.* 219:288 – 295.
- Johnson, G. I. 1992. Biology and control of stem end rot pathogens of mango. Dissertation, University of Queensland.
- Johnson, G. I., Cooke, T., and Mead, A. 1993. Infection and quiescent of mango stem-end rot pathogens. *Acta Hortic.* 341:329 – 336.
- Meh, I J. W. M., Slippers, B., Roux, J., Wingfield, M. J. 2011. Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia.* 103:534-553.
- Ni, H. F., Chen R. S., Chang S. F., and Yang H. R. 2008. First report of *Lasiodiplodia* fruit rot of jackfruit in Taiwan. *Plant Dis.* 92:1137.
- Okonkwo, S.N., Amund, O.O., and Ogunsanya, C.O.. 1990. Microbial rotting and preservation of banana fruits (*Musa sapientum* L.) in Nigeria. *Biomedical Letters.* 44:147-155
- Pathak, V. N. and Srivastava, D. N. 1969. Epidemiology and prevention of *Diplodia* stem end rot of mango fruits.. *Phytopath. Z.* 65:164
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Pennycook, S. R., Johnston, P. R., Ramaley, A., Akulov, A., and Crous, P. W. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia.* 21:29 – 55.
- Phipps, P. M. and Porter, D. M. 1998. Collar rot of peanut caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Dis.* 82:1205-1209
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, No.519. Commonwealth Mycological Institute, Key, Surrey, England.
- Punithalingam, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. J. Carmer Vaduz.
- Ramos, L. J., Lara, S. P., McMillan, R. T., Narayanan, K. R. 1991. Tip die back of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Dis.* 75:315 – 318.
- Sakalidis, M. L., Ray, J. D., Lanoiselet, V., Hardy, G. E. S., and Burgess, T. I. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. *Eur J Plant Pathol.* 130:379 – 391.
- Sangchote, S. 1991. Botryodiplodia stem end rot of mango and its control. *Acta Horticulturae.* 291:296-303
- Smith, H., Crous, P. W., Wingfield, M. J., Coutinho, T. A., and Wingfield, B.D. 2001. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the B. dothidea-complex on Eucalyptus in South Africa. *Mycologia.* 93:277 – 285.
- Slippers, B., Johnson, G. I., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B., and Wingfield, M. J. 2005. Phylogenetic and morphological revolution of the Botryosphaeria species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia.* 97:99 – 110.
- Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and their impact. *Fungal Biol Rev.* 21:90 – 106.
- Srivastava, S. N. S. 1964. Seed rot of *Hevea brasiliensis* caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Indian Phytopath.* 17:172-177
- Su, J. F., Ann, P. J., Yang, C. W., Hsu, Z. H., Chern, L. L., Tsay, H. C., Huang, C. C., and Hsieh, T. F. Black rot of braided seedlings of malabar chestnut caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 23(3-4): 263-269 (in Chinese)
- Summerbell, R. C., Krajden, S., Levine, R., and Fuksa, M. 2004. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia*

- theobromae* and successfully treated surgically. Med Mycol. 42: 543-547.
34. Suryanarayanan, T. S., and Narasimhan, C. L. 1981. A leaf blight of *Pandanus odoratissimus* cause caused by *Botryodiplodia theobromae*. Indian Phytopath. 34:254-256
 35. Van der walt, F. J. J., Marais, G. J., Roux, J., Wingfield, M. J., and Slippers, B. 2008. Botryosphaeriaceae associated with *Acacia* species in southern Africa with special reference to *Acacia melifera*. Masters Thesis, University of Pretoria: South Africa, p198 .
 36. Verma, K. S., and Cheema, S. S. 1984. *Botryodiplodia theobromae* – the cause of dieback and bark canker of pear in Punjab. Indian Phytopath. 37:325-327
 37. Wang, C. L. and Hsieh, H. Y. 2006. Occurrence and pathogenecity of stem canker of guava in Taiwan caused by *Botryosphaeria rhodina*. Plant Pathol. Bull. 15:219 – 230. (in Chinese)
 38. Wang, H. L., Chen P. H., Ni, H. F., and Chen, R. S. 2007. Physiological characterization and screen of control chemicals for *Lasiodiplodia theobromae* of papaya. Plant Pathol. Bull. 16:71 – 77. (in Chinese)
 39. Zhao, J. P., Q. Lu, J. Liang, C. Decock, and X. Y. Zhang, 2010. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, a new record of pathogenic fungus from some subtropical and tropical trees in southern China. Cryptogam Mycol. 31: 431-439.

ABSTRACT

Huang, Y.-H., Hung, T.-H., Chen, C.-H., Wu, M.-L., Wang, L.-J., and Liu, T.-Y. 2016. The probable pathogens cause canker disease of *Bombax ceiba* and gummosis of *Melia azedarach* belong to *Botryosphaeria* spp. in Taiwan. J. Plant Med. 58(1):39-44.

Canker diseases of trees are caused by fungal pathogens, among them *Botryosphaeria* spp. is one important group. Botryosphaeriaceae is a genus-rich family in the Dothidiomycetes, containing numerous species with a cosmopolitan distribution. Some of the genera are important pathogens of fruit and woody trees causing symptoms such as leaf spot, dieback, stem-end rot, fruit rot, gummosis and cankers that can result in tree mortality. Most members of the Botryosphaeriaceae have a broad host range, and have been recognized as successful opportunistic pathogens that occasionally cause extensive disease symptoms when their plant hosts are subjected to unfavourable conditions. Common related diseases include dieback of *Thuja orientalis*, stem end rot of papaya and mango fruit, stem canker of guava, and gummosis of peach trees, plums and cheery trees. In recent years, trees emerged dieback, canker, gummosis and longitudinal crack symptoms frequently in Taiwan, for example, the canker and black tumors on *Bombax ceiba* and Gummosis on the bark of *Melia azedarach*, which are never been investigated or discussed by domestic research articles. Two fungal pathogens were isolated from theses two diseased samples and subjected to molecular identification, the results showed two *Botryosphaeria* spp., *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae*, are very likely responsible for the two diseases. Canker disease of *Bombax ceiba* occurs prevalently in Taiwan, the infection of the trunks and stems resulting in black tumors developed extensively, inaeesthetic appearance, and may cause the decline of the host then can result in tree mortality at last. On the other hand, the relative species, *L. pseudotheobromae*, could be the pathogen that cause Gummosis of *Melia azedarach*. We can progress associated control research and draft health management strategy after verifying pathogens, which will contribute to reduce the occurrence of these diseases.

Keywords: *Bombax ceiba*, *Melia azedarach*, Canker, Gummosis