# 由**Phytophthora nagaii**及**Phytophthora bisheria** 引起之玫瑰疫病

袁琴雅1、黄晋興1\*、丁柏瑜1、安寶貞1

1農委會農業試驗所植物病理組,台灣台中市

\*聯絡作者, Email: jhhuang@tari.gov.tw

# 摘要

袁琴雅、黃晉興、丁柏瑜、安寶貞。2020。由Phytophthora nagaii及Phytophthora bisheria引起之玫瑰疫病。植物醫學 62(4): 13-22。

2015年9月在台灣南投埔里的玫瑰花發生一種新病害,罹 病葉片呈現黃化及萎凋,受感染的植株根腐及莖基部褐化, 且褐化現象從莖基部向上擴展,最後導致植株死亡。將玫瑰 根部及莖基部之罹病組織進行分離,分別在不同花圃的罹病 株上分離得2種疫病菌,將分離到的疫病菌游走子懸浮液接種 於玫瑰苗齡40-50天之扦插苗,於溫度32℃及光照12小時的環 境條件下,14-28天後即可造成植株葉片黃化、莖基部褐化及 植株死亡,與田間所發生之病徵相符合,並能再分離得原先 接種之病原菌以完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)。觀察此2 種疫病菌之形態特徵,第1種疫病菌的孢囊形態為橢圓形或卵 圓形,孢囊單頂生,不具乳突且孢囊不脫落,大小為51.4-91.0 × 35.5-70.0 (平均 63.0 × 45.1) µm, 孢囊内再生, 具有不規則狀 之菌絲膨脹體和球狀之厚膜孢子。有性世代為同絲型,藏卵器 大小為29.6-45.5 (平均38.0) µm,大部分卵孢子為未充滿型, 大小為23.1-40.9 (平均31.5) µm;其藏精器主要以侧著為主, 少部分為底著,大小為11.0-22.7×9.1-19.0 (平均16.7×14.6) um。第2種疫病菌的孢囊為卵圓形、卵梨形,單頂生,大小為 32.3 - 50.0 x 25.6 - 36.9 (平均 40.8x30.8) µm, 具明顯乳突, 其 有性世代亦屬於同絲型,藏卵器大小為23.5 - 34.5 (平均28.7) μm, 卵孢子為未充滿型, 大小為19.7 - 32.6 (平均26.2) μm, 藏 精器為側著,大小為7.1-14.8×7.0-11.0 (平均9.8×8.5) µm。 由形態特徵及鄰近連接 (Neighbor-Joining, NJ) 核酸序列 ITS 分析的結果,鑑定第1種疫病菌為屬於Clade 7的Phytophthora nagaii;而第2種疫病菌為屬於Clade 2的Phytophthora bisheria。以盆栽接種結果顯示此2種疫病菌僅感染某些品種的 玫瑰花與草莓。本研究玫瑰疫病為台灣首次報導,並鑑定2種

病原菌為台灣疫病菌之新紀錄種。

關鍵詞: 玫瑰、疫病菌、鑑定、Phytophthora bisheria、 Phytophthora nagaii

# 前言

玫瑰 (Rosa rugosa Thunb. (原生種)、*Rosa hybrid* (雜交種)) 是世界三大切花之一,它有美艷繽紛的色彩,迷人的芬香,高 貴典雅的花容,深受人們的喜愛,堪為「花中之后」。玫瑰 的品種極多,至今世界正式登錄的品種已有15000種以上。依 農業委員會農業知識入口網-玫瑰主題館 (https://kmweb.coa.gov. tw) 資料顯示,台灣在1916年開始從世界各地引進栽培種,至 今品種約達600餘種,而目前主要栽培品種為紅色系的萬年紅 (Wannianhong) 與埔里之星 (Puli Star)。

玫瑰屬於薔薇科,薔薇屬,主要分佈在北半球的溫帶和 亞熱帶地區,為觀賞價值極高的多年生蔓性、亞蔓性、灌木 性木本開花植物。國內玫瑰栽培面積為280公頃,主要產地為 南投縣,佔總生產面積60%以上,分佈於南投縣埔里、仁愛、 草屯及國姓等鄉鎮。性喜溫暖多日照,生長適溫為15-25°C。 但由於台灣氣候高溫多濕,因此玫瑰在生育期間容易受多種 病害侵染,目前在台灣玫瑰已被報導之病害包含白粉病(病 原菌Podosphaera pannosa (Wallr.: Franch) de Bary)、露菌病 (病原菌Peronospora sparsa Berk.)、灰黴病(病原菌Botrytis cinerea Pers.)、炭疽病(病原菌Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc.)、黑斑病(病原菌Diplocarpon rosae Wolf)、銹病(病原菌Kuehneola rosae Sawada)、枝枯病(病原菌 Paraconiothyrium fuckelii (Sacc.) Verkley & Gruyter)及癌腫病 (病原菌Agrobacterium tumefaciens (Smith & Townsend) Conn)等 <sup>(3)</sup>。

2015年9月於台灣南投埔里花圃的玫瑰發生一種新的病 害,園區內葉片呈現淡綠至黃化,後期易褐化脫落,甚至有枝 條萎凋及莖部褐化之情形,在台灣由於玫瑰的栽培歷史上未曾 出現這種病害,故需要從病害調查、病原菌分離與鑑定,以及 病原性測定等基本研究做起,以提供將來探討病害發生生態與 防治的資訊。

# 材料與方法

# 病害調查以及病原菌分離、培養與保存

2015年9月在南投縣埔里鎮內的設施土耕玫瑰發生新病 害,植株的根與莖基部褐化腐敗、枯葉死亡,在牛眠里、蜈蚣 里及藍城里的8處玫瑰田以肉眼判斷其大約的罹病率,並每一 田區取10-20株萬年紅、埔里之星…等玫瑰品種(表一)的病 株進行病原菌分離;另外赴供應玫瑰扦插苗的國姓鄉雙冬村 某苗圃,取生長不良或隨機選取樣本10-20株,進行病原菌分 離。分離的方法為:將罹病玫瑰植株採回,先將根與褐化莖基 腐罹病組織洗淨,以紙巾吸乾水分,將罹病組織切取約5 mm × 5 mm大小之組織塊,根部則切成約8 mm長的小片段,經0.6% 次氯酸鈉(NaClO)進行表面消毒30秒,再以無菌水進行漂洗2 次,每次約30秒,以滅菌過之吸水紙吸去游離水,移置於含有 20 mL 之 5 % Clarified V-8 juice agar (CVA) 半選擇性培養基上 <sup>(8)</sup>,室溫環境下(28±2°C)培養約24小時後,即可見疑似卵菌綱 微生物之無隔膜菌絲自病組織長出,切取前端單一菌絲培養於 10% V-8 vegetable juice agar (10% VA), 室溫(28±2°C)培養3-5 天,即可供試驗用。切取前端菌絲塊 (10 mm×10 mm×2 mm) 置

於含礦物油及無菌水之試管中<sup>(4)</sup>,於24°C環境中保存。

#### 病原菌之形態鑑定觀察

將從埔里玫瑰病株組織分離出之疑似卵菌綱微生物培養 於10% CVA培養基及馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, PDA) 培養基平板中,觀察其菌落型態。取在10% VA培養基生 長3-5天之供試菌株菌落,移植於含有20 mL無菌水的玻璃培 養皿 (直徑6 cm, Pyrex Co., USA)中,再經光照處理,將產孢之 疫病菌置於光學顯微鏡下鏡檢,可以觀察到大量的孢囊與游走 子釋放。另將菌絲塊培養於新配置10%VA 固態培養皿中,在 24℃無光照培養6-10天,於顯微鏡下鏡檢即可觀察到卵孢子 (oospores)的產生。

### 溫度對菌絲生長之影響

配製5% CVA平板,每培養皿中含有20 mL培養基。供試菌 株先於10% VA培養3-5天,利用打孔器(直徑0.5cm)切取先端 的菌絲,移入含5% CVA培養皿的側緣。分別置於8、12、16、 20、24、28、32、36及40℃培養箱中(12小時光照),培養48小 時後畫線,以此為基準(0mm),於培養第5天測量菌絲生長長 度,計算菌絲每日生長長度(mm/day),每處理3皿,試驗重複2 次。

# 供試玫瑰植株、病原菌接種源之準備及接種方法

供試玫瑰植株之準備:供試玫瑰植株為購自南投縣國姓鄉 種苗商販售的苗齡40-50天種植於1.5吋盆之萬年紅、埔里之星 品種的扦插苗,移植至盛有栽培介質(泥炭土:蛭石=3:1)之3 吋盆,每盆1株,1-2星期後即可進行試驗。每品種

**病原菌接種源之製備:**自埔里玫瑰病株組織分離出之

#### 表一、玫瑰罹病組織上疫病菌及腐黴病菌之分離率

TABLE 1. Isolation ratio of Phytophthora spp. (Ph.) and Phytopythium sp. (Py.) isolated from diseased rose plants

			Isolatio	tion rate of sampled plant (%)		
Location	Rose variety	Disease incidence (%)	Ph. nagaii	Ph. bisheria	Py. helicoides	
	Wannianhong (萬年紅)	45	100	0	60	
Niumian-2, Puli (埔里鎮牛眠里)	Wannianhong (萬年紅)	15	100	0	0	
Niumian-3, Puli (埔里鎮牛眠里)	Wannianhong (萬年紅)	40	100	0	40	
Wugong-1, Puli (埔里鎮九芎林里)	Wannianhong (萬年紅)	10	100	0	0	
Wugong-1, Puli (埔里鎮九芎林里)	Puli Star (埔里之星)	5	60	0	0	
Wugong-2, Puli (埔里鎮九芎林里)	Jade White (翡翠白)	5	100	0	0	
Lancheng -1, Puli (埔里鎮籃城里)	Imported yellow flower	15	0	100	0	
Lancheng -2, Puli (埔里鎮籃城里)	Imported Pink flower	5	0	60	0	
Shuangdong, Guoxing (國姓鄉雙冬村)	Wannianhong (seedling)	100	0	0	90	
	Wannianhong (seedling)	0	0	0	10	
	Wannianhong (seedling)	0	0	0	10	

Phytophthora spp.培養於10% CV8培養基,為了讓供試菌株產 生大量孢囊,參考Hwang et al.<sup>(7)</sup>研發的方法,將盛有含有供 試菌菌絲團玻璃紙的培養皿置於24°C光照24小時之培養箱中 6-24小時,或再進行低溫處理(放置16°C不照光培養箱30分 鐘,室溫回溫10分鐘後),即可產生大量游走子。每皿加入約 30ml無菌水,將游走子懸浮液濃度分別調節成5×10<sup>3</sup> zoospore/ mL,供接種試驗用。

接種方法:每株接種15 mL之游走子懸浮液於根部與莖基 部處,接種後的植株盆栽浸漬於盛有水深2-3 cm之塑膠方形 密盆內,每處理5盆,於32℃光照12小時生長箱或26-36 ℃之 遮雨溫室內培養,以接種無菌水為對照組,於接種後14-28天 觀察及記錄發病率與發病度。

#### 玫瑰疫病之病害調查

- 發病率(disease incidence,%):調查出現疫病病徵之植株佔所 有供試植株之比例視為發病率。
- 發病度(disease severity,%):依植株發病嚴重程度區分為 0、1、2、3及4,五個等級。0級:無病害;1級:葉片 萎凋佔該株總比率<10%;2級:葉片萎凋佔該株總比率 10%-49%;3級:葉片萎凋佔該株總比率>50%;4級:植株 死亡。再依下列公式計算發病度,發病度(%)=(Σnixi/Nx4) ×100%。

#### 寄主範圍測定

供試玫瑰植株為萬年紅(Wannianhong)、埔里之星(Puli Star);非玫瑰寄主作物為草莓(Fragaria ananassa)、胡瓜(Cucumis sativus)、辣椒(Capsicum annuum)、豇豆(Vigna sinensis)、長春 花(Catharanthus roseus)與柑桔(Citrus reticulate),栽培高度約 30-40cm左右之植株。這些供試植株與上述病原性測定之接 種方法相同,置於32°C,光照12小時生長箱,每處理5重複, 與以接種無菌水為對照組,於接種後2、4、8週觀察及記錄病 害。

#### 病原菌之ITS核酸序列分析

DNA 備製:供試菌株於5% VA生長3-5天,切取菌落邊 緣之新鮮菌絲塊 (ca.2 mm × 2 mm × 2 mm),接種於覆蓋一層 玻璃紙的5% VA培養皿的中央,在24°C培養5-7天後,刮取 玻璃紙上的菌絲,經冷凍乾燥後,保存於-20°C下備用。將約 20 mg冷凍乾燥的疫病菌菌絲置於研鉢中,加入少許液態氦 (liquid nitrogen)後磨成粉末。使用Genomic DNA Purification Kit (GeneMark Technology Co., Taichung, Taiwan)並依其推薦操作方 法抽取疫病菌的 DNA。

聚合酶連鎖反應 (PCR) 與 DNA 定序 (sequencing): 核醣體內轉錄區間 [ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions] 的DNA序列,包括ITS1與ITS2、5.8S rRNA基因,及部 份18S rRNA基因與 28S rRNA基因序列,以供試菌株DNA為模 板,利用通用引子對ITS5與ITS4 (11)進行PCR擴增核醣體內轉錄區間,將PCR反應後的DNA產物直接定序,此2種序列之增 幅與解序皆委託昕穎生物科技公司 (Seeing Bioscience Company, Taipei, Taiwan) 進行。

定序後的疫病菌DNA 序列直接上傳到NCBI GenBank 資料 庫(http://www.ncbi.nlm.nih.gov),利用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)軟體從資料庫尋找最相近的疫病菌種類 與菌株,並將具代表性的疫病菌 DNA 序列登錄在 GenBank 資 料庫。

### 利用 DNA 序列分析疫病菌菌株親緣關係:

本研究使用Geneious v8.0 軟體進行親緣關係分析,以該軟 體內建之ClustalW Alignment功能進行供試菌株ITS序列的多重 比對(Multiple Alignment),缺口打開值 (Gap open cost) 是15, 而缺口延續值 (Gap extend cost) 是5,進一步將比對好的序列 群以該軟體內建之Tree功能建構演化樹,而遺傳距離模式採 用Tamura-Nei,以 *Phytopythium helicoides* 為外群 (outgroup) 進行鄰近連接分析 (Neighbor-Joining, NJ),引導再取樣分析 (bootstrap) 的次數為1,000,檢驗各個分枝的統計支持度,本演 化樹只呈現支持度 (support threshold) 超過70%的分枝數據。首 先將供試菌株與標準疫病菌株進行ITS序列多重比對,每個分 群 (Clade1-12) 取2支菌株,由結果得知供試疫病菌株Ph-317, Ph-94為clade2分群; Ph-307,Ph-308,Ph-309,Ph-310,Ph-314 為clade7分群,接著再將兩分群所發表之疫病菌株與供試菌株 進行ITS序列比對,進一步確認供試菌株之親緣關係。

## 統計分析

各項處理之資料,利用SAS 7.1版統計分析軟體先進行變 方分析 (analysis of variance; ANOVA),再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在5%顯著水準下,比較處 理間平均值之差異。

# 結 果

## 田間病害調查與病原菌分離

2015年9月台灣南投埔里種植的萬年紅、埔里之星等玫瑰 品種 (*Rosa hybrid*) 發生新病害 (圖一A),罹病植株之葉片由下 往上呈現淡綠至黃化 (圖一B),無明顯壞疽斑,葉片於病害後 期易發生萎凋褐化及脫落 (圖一C),幼苗易猝倒及死亡 (圖一 D),植株部分枝條急速萎凋、根腐及莖基部褐化等 (圖一E、 F、G),且褐化從莖基部開始向上延伸,最終植株莖部均褐化 而造成植株死亡,再重新補植新苗於同一處,植株也常會死 亡。

此外,由南投埔里之牛尾里、九芎林里及藍城里等地 區種植之萬年紅、埔里之星、翡翠白及進口之黃花和粉紅花等 玫瑰品種疑似罹病植株進行病原菌分離,皆能於半選擇性培



- 圖一、玫瑰疫病病徵。在溫室設施中玫瑰罹病之情形(A);罹病株葉片 黃化(B)、萎凋(C)、幼株黃葉枯死(D)、以及根部壞疽褐化,壞 疽有時會從莖基部向上延伸(E,F,G)。利用病原菌游走子懸浮液 接種於玫瑰萬年紅品種(H)及埔里之星品種(I),產生與田間罹病 株相似之病徵。
- Fig. 1. Symptoms of root and basal stem rot of rose (*Rosa* hybrid) in Taiwan. Disease infected rose plants in greenhouse (A), causing yellowing (B) and wilting (C) of leaves, young plants dying (D), root necrosis, sometimes extending to the basal stem (E, F, G). Potted rose plants presented similar symptoms on cultivar 'Wanianhong' (H) and 'Puli star' (I) after artificial inoculation with zoospore suspension of *Phytophthora* species.

養基中分離出疫病菌,其中以疫病菌 Phytophthora nagaii 分離率為最高,其次為 P. bisheria,少部份分離出 Phytopythium helicoides。而於國姓鄉的玫瑰苗圃所採集之萬年紅玫瑰扦插苗,則常於幼苗莖基部褐化的組織分離得 Phytopythium helicoides (表一)。

## 病原菌之鑑定

分離出疫病菌共有兩種(表一),第1種疫病菌在10% CVA與PDA培養的菌落呈輻射狀且生長較慢,而其邊緣較平 整(圖二A),在10% VA 菌絲生長的溫度為8-33°C,最適溫為 28°C<sup>(11)</sup>,而生長速率為7 mm/day;第2種疫病菌在10%CVA培 養的菌落生長相對較快,菌落外觀具有玫瑰花瓣(rosette)之紋 路,在PDA培養的菌落其邊緣不平整(圖三A),在10% VA 培 養基上適合菌絲生長溫度為16-32°C,最適溫為28°C,而生 長速率為12 mm/day。第1種疫病菌的孢囊柄不分支(圖二B、 C),孢囊單頂生,孢囊型態為橢圓形或卵圓形(圖二D、E),大 小為51.4-91.0 × 35.5 - 70.0 (平均63.0x45.1) µm,不具乳突,



- 圖二、玫瑰疫病菌 Phytophthora nagaii(菌株Ph-308)之型態。培養於 V8(左)及PDA(右)培養基之菌落型態(A);孢囊柄不分枝(B, C); 未成熟(D)及成熟(E)孢囊卵形不具乳突;孢囊內嵌外展增生(F, G)或由巢內增生(H);藏卵器(oog);卵孢子(oos);藏精器(ant)側 著(I, J)及底著(K)。橫線條代表長度10 µm。
- **Fig. 2.** Morphology of *Phytophthora nagaii* isolate Ph-308. Colony pattern of *P. nagaii* on V8 agar (left) and PDA agar (right) (A); unbranched sporangiophore (B, C); immature (D) and mature (E) non-papilla ovoid sporangia; internal extended proliferation (F, G) and nest internal proliferation sporangia (H); oogonia (oog), oospores (oos) and paragynous antheridia (ant) (I, J), and amphigynous antheridium (ant) (K). bars: 10 μm.



- 圖三、玫瑰疫病菌 Phytophthora bisheria (菌株Ph-317)之型態。 P. bisheria 培養於 V8(左)及PDA(右)培養基之菌落型態(A); 單軸生型態之孢囊(B);半乳突之卵形孢囊具單(C)、雙(D)、或三孔突(E);藏卵器(oog)、卵孢子(oos)及藏精器(ant) (F,G,H)。橫線條代表長度10 μm。
- Fig. 3. Morphology of *Phytophthora bisheria* isolate Ph-317. Colony pattern of *P. bisheria* on V8 agar (left) and PDA agar (right) (A); simple sympodial sporangiophore (B), semi-papilla ovoid sporangia (C, D, E); oogonia (oog), oospores (oos) and paragynous antheridia (ant) (F, G, H). bars: 10 μm.

#### 表二、Phytophthora spp和其他型態相似種之形態特徵比較形態特徵比較

TABLE 2. Morphological characters of *Phytophthora* spp. isolated from diseased rose plants and other morphologically similar species

Character		Phytophthora nagaii <sup>(9)</sup>	Ph-308	Phytophthora bisheria (1)	Ph-317
Hyphal swellings		Spherical irregular, clustered	Spherical irregular, clustered	not observed	not observed
	Mean diameter (µm)	25 ± 9	$24 \pm 4$	—	_
Chlamydospore		Present	Present	not observed	not observed
Sporangiophore		Unbranched or simple sympodial	Unbranched or sometimes simple sympodial	Unbranched (simplicia)	Mostly unbranched or simple sympodial
Sporangia		Terminal, ellipsoid, ovoid eccentric basal point	Terminal, ellipsoid, ovoid eccentric basal point	Ovoid, obpyriform, ovoid- obpyriform, obturbinate, globose or irregular	Ovoid, ovoid-obpyriform
	Size (µm)	26.8 - 79 × 23.7 - 55.4	45.0 - 91.0 × 35.5 - 70.0	ovoid-obpyriform sporangia	32.3 - 50.0 × 25.6 - 36.9
		(avg. 46.7 × 35. 4)	(avg. 63.0 × 45.1)	26 - 44 × 21 - 30	(avg. 40.8×30.8)
				globose on average 22.8	Globose rare
	L/B ratio	1.35	1.32	_	1.32
	Papilla	Nonpapillate	Nonpapillate	Semipapillate, some bipapillate	semipapillate, some bipapillate
	Proliferation	Internal, extended nested or external	Internal, extended nested or external	No	No
Exit pore	Caducity	No	No	No	No
Oogonia	width (µm)	6.7 - 24.6 (avg. 14.7)	9.3 - 20.8 (avg. 16.0)	7.0 - 9.0 (avg. 7.2)	4.0 - 10.5 (avg. 7.5)
		Smooth	Smooth	smooth-walled, tapering base	Smooth
	Shape	Spherical, funnel-shaped base, distorted	Spherical, funnel-shaped base	Spherical	Spherical
Sexual system	Size (µm)	32.2 - 53.3 (avg. 40.0)	29.6 - 45.5 (avg. 38.0)	24 - 46 (avg. 35)	23.5 - 34.5 (avg. 28.7)
Oospore		Homothallic	Homothallic	Homothallic	Homothallic
		Aplerotic	Aplerotic	Aplerotic	Aplerotic
	Size (µm)	29.5 - 47.7 (avg. 37.6)	23.1 - 40.9 (avg. 31.5)	25 - 31 (avg. 28.0)	19.7 - 32.6 (avg. 26.2)
Antheridum	Wall thickness (um)	$3.3 \pm 0.5$	-	4.0 - 6.0	
		Mostly paragynous, some amphigynous	Mostly paragynous, some amphigynous	paragynous	paragynous
	Size (µm)	13.5 - 28.1 × 10.7 - 15.3	11.0 - 22.7 × 9.1 - 19.0	_	7.1 - 14.8 × 7.0 - 11.0
		(avg. 19.1 × 13.5)	(avg. 16.7 × 14.6)		(avg. 9.8 × 8.5)
Optimum growth (°	C)	28	28	26	28
Maximum growth (	°C)	33	33	32	34
Minimum growth (	°C)	5	8	10	16
Growth rate (mm/d)	)	11.8	7	3.7 - 4.9	12

孢囊長寬比值1.32。孢囊在釋出游走子後常有內再生(internally extended proliferation)或為內巢生 (internally nested proliferation) (圖二F、G、H)等;可產生少量的菌絲膨大體 (hyphal swellings),具有厚膜孢子,有性世代為同絲型 (homthallism),其藏精器 主要以側著 (paragynous) 為主,少部分為底著 (amphigynous), 藏卵器 (oogonia) 大小為29.6 - 45.5µm (平均為38.0µm) (圖二I、J、K);第2種疫病菌孢囊為卵圓形、卵梨形 (圖三B),大小為32.3 - 50.0 × 25.6 - 36.9 µm (平均為40.8×30.8 µm),具有乳突 (圖三C、D、E),孢囊長寬比值1.32,其有性世代亦屬於同絲型,藏精器皆為側著 (paragynous),藏卵器大小為23.5 - 34.5 µm (平均為28.7 µm),卵孢子為未充滿型,大小為19.7 - 32.6 µm (平均為26.2 µm),藏精器為側著,大小為7.1 - 14.8 × 7.0 -

11.0 µm (平均為9.8×8.5 µm) (圖三F、G、H)。(表二)

將分離得到的2類疫病菌經DNA定序後,登錄在 GenBank 資料庫, ITS accession number: KY499722 (Ph-94)、KY499723 (Ph-317)、KY499724 (Ph-307)、KY499725 (Ph-308)、KY499726 (Ph-309)、MN270926 (Ph-310)、MN270927 (Ph-314),並將登 錄號列於表3中。結果第1種疫病菌 (Ph-308) ITS全長DNA序 列為835bp,和屬於Clade 7的*Phytophthora nagaii*<sup>(10)</sup>標準菌株 (CH00MKR2) 序列AB688362最接近,相同度達99.88%;第2種 疫病菌 (Ph-317)的ITS全長DNA序列為805bp,和屬於Clade 2的 *P. bisheria*<sup>(1)</sup>標準菌株(Cg.2.3.3)序列AY241924最接近,相同度 達99.01%。根據ITS片段分析之NJ的結果顯示,第一種疫病菌 (Ph-307, Ph-308, Ph-309, Ph-310, Ph-314)屬於clade7分群;第二種

-

# 表三、本試驗在ITS序列分析所使用之疫病菌菌株

TABLE 3. Isolates of *Phytophthora* spp. presented in the study of ITS sequence analysis.

Pathogen							
Scientific name	Isolates	Isolation year	no. of ITS sequence	Clade			
P. acenna	ET CPHST BL 114	2014	MG518642	2			
P. alni multiformis	ET CPHST BL 2	2004	MG783372	7			
P. alni uniformis	P16206	2004	GU259293	7			
P. alni. subsp. alni	IMI392314	2004	GU993881	7			
P. amaramthi	ET CPHST BL 174	2016	MG783373	2			
P. asiatica	ET CPHST BL 124	2014	MG783378	7			
P. attenuata	TW 129	2017	KU517154	7			
P. bisheria	ET CPHST BL 6	2008	MG783381	2			
P. bisheria	Ph-94	2015	KY499722	2			
P. bisheria	Ph-317	2015	KY499723	2			
P. botryosa	IMI136915	1969	AF266784	2			
P. cajcani	CPHST BL 116	1978	MG783386	7			
P. cambivora	CPHST BL 155	1927	MG783387	7			
P. capensis	ET CPHST BL 10	2010	MG865466	2			
P. capsici	ET CPHST BL 33G	1922	MG865467	2			
P. catyae	NJB2013-AF-08	2016	KJ631538	2			
P. cinnamomi	ET CPHST BL 12	1922	MG865473	7			
P. citricola	ET CPHST BL 34	1927	MG865475	2			
P. citrophthora	ET CPHST BL 60	1925	MG865476	2			
P. colocasiae	CPHST BL 173	1900	MG865479	2			
P. elongata	ET CPHST BL 62	2010	MG865485	2			
P. europaea	ET CPHST BL 37G	2002	MG865488	7			
P. flexuosa	TW 78	2017	KU517152	7			
P. formosa	TW 107	2017	KU517153	7			
P. fragariae	CPHST BL 18	1940	MG865494	7			
P. frigida	ET CPHST BL 39G	2007	MG865496	2			
P. glovera	ET CPHST BL 36	2011	MG865500	2			
P. himalsilva	ET CPHST BL 102	2011	MG865507	2			
P. intricata	TW 259	2013	KU517155	7			
P. meadii	CPHST BL 81	1918	MG865529	2			
P. mekongensis	ET PF6a2	2017	KC875838	2			
P. melonis	ET CPHST BL 23	2007	MG865536	7			
P. mengei	ET CPHST BL 31	2009	MG865539	2			
P. mexicana	CPHST BL 24	1923	MG865540	2			
P. mulitivora	ET CPHST BL 104	2009	MG865546	2			
P. multivesiculata	ET CPHST BL 50G	1998	MG865544	2			
P. nagaii	ET CPHST BL 121	2014	MG865547	7			
P. nagaii	Ph-307	2015	KY499724	7			
P. nagaii	Ph-308	2015	KY499725	7			
P. nagaii	Ph-309	2015	KY499726	7			
P. nagaii	Ph-310	2015	MN270926	7			
P. nagaii	Ph-314	2015	MN270927	7			
P. niederhauserii	ET CPHST BL 45	2014	MG865552	7			
P. occultans	ET CPHST BL 163	2015	MG865555	2			
P. oleae,	ET Pola	2018	KY982930	2			
P. pachypleura	ET CPHST BL 146	2004	MG865558	2			
P. parvispora	CBS132772	2014	KC478667	7			
P. pini	ET CPHST BL 48	1925	MG865565	2			
P. pisi	ET CPHST BL 133	2013	MG865567	7			
P. pistaciae	ATCC MYA-4082	2001	FJ746648	7			
P. plurivora	ET CPHST BL 74	2009	MG865568	2			
P. rubi	ET CPHST BL 54	2007	MG865584	7			
P. sojae	CPHST BL 180	1958	MG865587	7			
P. terminalis	ET CPHST BL 164	2015	MG865592	2			
P. tropicalis	ET CPHST BL 58	2001	MG865596	2			
P. tyrrhenica	PH 154	2017	KU899188	7			
P. uliginosa	ET CPHST BL 59	2002	MG865597	7			
P. vignae	CPHST BL 30	1957	MG865598	7			
P. vulcanica	X3a	2017	MF036209	7			
Phytopythium helicoides	55C7	2013	KC907734	Out group			

<sup>a</sup> Genbank accession number of ITS sequences.



- 圖四、利用近鄰結合法(neighbor-joining)進行以核醣體非轉錄區間(ITS)核酸序列建構玫瑰疫病菌 Phytophthora nagaii and P. bisheria 與其他親緣相近 疫病菌的演化樹。
- Fig. 4. Phylogenetic tree of *Phytophthora nagaii* and *P. bisheria* based on ITS sequences by using neighbor-joining analysis under Geneious 8 with *Phytopythium helocoides* as outgroup. Numbers on the branches represent bootstrap values obtained from 1000 replications (only values greater than 70% are shown).

疫病菌 (Ph-94, Ph-317) 則屬於clade2分群。再將此兩分群進行 細部親緣關係分析,根據ITS片段分析之類緣關係顯示第1種疫 病菌和*P. nagaii*標準菌株成一群的支持度為100%,而第2種疫 病菌和*P. bisheria*標準菌株成一群的支持度為99.4%(圖四)。

以上由形態、生理特徵、核醣體內轉錄區間 DNA 序列分 析序列片段分析與其他疫病菌的親緣關係比較,鑑定第1種疫 病菌為屬於Clade 7的*P. nagaii*;而第2種疫病菌為屬於Clade 2 的*P. bisheria*。

#### 病原性測定

從罹病玫瑰根系及莖基部,共分得13株疫病菌,挑選 其中6株菌株分別為 P. nagaii (Ph-308、Ph-309、Ph-310); P. bisheria (Ph-94、Ph-315、Ph-317)進行病原性測試,將之接種 於萬年紅及埔里之星品種的根部與莖基部處(圖一 H、I),由 表4結果得知,在 P. nagaii 菌株中以Ph-308的毒力 (virulence) 最強,植株罹病度達85.7-93.8%;而 P. bisheria 菌株中以Ph-315及Ph-317毒力較強,罹病度為37.5 - 87.5%,而 P. nagaii 其 毒性又強於 P. bisheria,後續試驗以Ph-308及Ph-317兩菌株作 為供試菌株 (表四)。

#### 寄主範圍測定

以莖基部澆灌方式接種 P. nagaii (Ph-308) 與 P. bisheria (Ph-317) 游走子懸浮液,接種於不同寄主,觀察其罹病情形。 由結果得知,二株病原菌並不會感染胡瓜、辣椒、豇豆、長春 花及柑桔等寄主,接種8週仍未見病徵出現,但2病原菌皆會感 染草莓,且接種後2週可見病徵出現,4週後造成植株死亡。不 同玫瑰之品種對此病原菌的罹病度也不同。接種 P. nagaii 發 現以大花矮叢玫瑰(Hybrid Tea Roses)之品種最為感病,罹病度 可高85 - 100%,其次為迷你玫瑰(Miniature Roses)之品種;而 接種 P. bisheria 罹病度最高亦為大花矮叢玫瑰之品種,於其他 玫瑰品種其感病性較低(表五)。

#### 表四、玫瑰疫病菌病原性測定

TABLE 4.	Pathogenicity	test of P	hytophthora	isolates c	on two rose	e cultivars
----------	---------------	-----------	-------------	------------	-------------	-------------

Wan	nianhong	Puli Star		
DI (%) <sup>1</sup>	DS (%) <sup>2</sup>	DI (%)	DS (%)	
0	0.0±0.0	0	0.0±0.0	
100	87.5±7.2	100	93.8±6.3	
75	56.3±18.8	75	62.5±23.9	
100	68.8±18.8	100	81.3±6.3	
25	25.0±25.0	50	31.3±23.7	
50	41.7±2.0	100	87.5±12.5	
50	37.5±23.9	100	75.0±10.2	
	Wan   DI (%) <sup>1</sup> 0   100   75   100   25   50   50	Wanianhong   DI (%) <sup>1</sup> DS (%) <sup>2</sup> 0 0.0±0.0   100 87.5±7.2   75 56.3±18.8   100 68.8±18.8   25 25.0±25.0   50 41.7±2.0   50 37.5±23.9	Wannianhong Put   DI (%) <sup>1</sup> DS (%) <sup>2</sup> DI (%)   0 0.0±0.0 0   100 87.5±7.2 100   75 56.3±18.8 75   100 68.8±18.8 100   25 25.0±25.0 50   50 41.7±2.0 100   50 37.5±23.9 100	

<sup>a</sup>: DI= disease incidence.

<sup>b</sup>: DS= disease severity. DS (%)=[( $\Sigma$ nixi)/Nx4] x100, i=disease index.

# 討 論

目前在全世界的疫病菌種類中,曾被報導對玫瑰具有致病性的疫病菌為 P. cactorum、P. citrophthora、P. megasperma、 P. nagaii、P. bisheria<sup>(1,5,9,10)</sup>,但這些疫病菌皆未曾在台灣玫 瑰被發現。近幾年,許多國家均有玫瑰疫病菌首次報導,如 在北美洲的扦插玫瑰苗發生危害,經由試驗証實為 P. bisheria 所造成<sup>(1)</sup>;另外在日本玫瑰植株上亦發現新種疫病菌 P. nagaii <sup>(9)</sup>,並証實其病原性。上述兩種疫病菌在2016年於臺灣被發 現,推測可能由進口商品所引入。隨著進口貿易的盛行,許 多病原菌隨著商品被帶進台灣,近年來有數種疫病菌成為台 灣新紀錄種,如2005年於台中東勢發現新種 P. cambivora<sup>(6)</sup>國 染山櫻花,以及2007年於雲林西螺莧菜田發現新種疫病菌 P. amaranthi<sup>(2)</sup>。

臺灣產 P. nagaii 與 P. bisheria 在形態、生理及核酸序列 演化樹與標準菌株大致相同,且致病性相同,包括可危害玫 瑰與草莓<sup>(1,9)</sup>(表五),不過臺灣玫瑰疫病菌 P. nagaii 菌株 (Ph-308)與標準菌株NBRC H-13102(9)在形態及生理特性上有些許 差異,Ph-308孢囊較大(63.0×45.1 µm v.s. 46.7×35.4 µm),而 菌絲生長速率較慢(7 mm/d v.s. 11.8 mm/d);另一臺灣玫瑰疫病 菌與標準菌株BPI 878369<sup>(1)</sup>在生理特性有些許差異,菌絲生長 速率較快(12 mm/d v.s. 3.7 - 4.9 mm/d)(表二),且ITS 核酸序列 有數個核酸鹼基不同。

在玫瑰疫病田間調查與病原菌分離的工作中,發現可 分離得前述2種疫病菌 P. nagaii, P. bisheria與1種腐霉菌 Phytopythium helicoides,以 P. nagaii 分離率為最高且毒力 也最強, P. bisheria 分離率與毒力次之,而 Phytopythium helicoides 分離率較低且多分離自幼苗及少數成株腐敗的根部 (表一)。此外,因為懷疑病原菌源自於種苗,故於國姓鄉的玫 瑰種苗圃採集萬年紅玫瑰扦插苗進行根與莖基部病原菌分離, 於幼苗病株可大量分離得 Phytopythium helicoides,健苗則分 離率低(表一),但未分離得本文描述的2種疫病菌,顯示埔里 田間的玫瑰疫病菌可能不是源自國姓鄉的玫瑰種苗圃,而初次 鳳染源來自何處則需要進一步研究。

多數種類的植物疫病菌以卵孢子或厚膜孢子長期存活在土 壞中<sup>(5,8)</sup>,在環境適合的條件下能直接或經感染植株後繁殖形 成孢囊,爾後產生游走子藉水大規模的傳播<sup>(5)</sup>。玫瑰疫病的病 原菌 *P. nagaii* 與 *P. bisheria* 皆為同絲型疫病菌,不需配對而 由單一菌株便可自行產生卵孢子,可能為主要之存活器官。由 玫瑰罹病株的黑褐化病徵皆在根部以及由根部往上蔓延到莖基 部,引起植株黃葉或是失水枯萎,最後造成植株死亡,可見主 要的感染點是在根部或莖基部,由此推測病原菌殘存在土壤 中,在適合發病的環境下能感染寄主的地下部而造成病害,至 於發病的環境條件與防治方法則有待進一步的研究。

#### 表五、玫瑰疫病菌之寄主範圍測定

TABLE 5. Host range test of Phytophthora nagaii and P. bisheria isolated form rose plants

Rose varieties system or	СК		P. nagaii		Puli Star		
tested crops	Cultivar	DI <sup>1</sup> (%)	DS <sup>2</sup> (%)	DI (%)	DS (%)	DI (%)	DS (%)
Hybrid Tea Roses	Wannianhong	0	0	100	85±12.5 a <sup>y</sup>	100	80±12.5 a
	Puli Star	0	0	100	75±20.9 a	60	50±20.9 ab
Fragaria ananassa	Local strawberry cultivar	0	0	100	100±12.5 a	100	63±12.5 ab
Cucumis sativus	Local cucumber cultivar	0	0	0	0±0.0 b	0	0±0.0 c
Capsicum annuum	Local pepper cultivar	0	0	0	0±0.0 b	0	0±0.0 c
Vigna sinensis	Local cowpea cultivar	0	0	0	0±0.0 b	0	0±0.0 c
Catharanthus roseus	Local periwinkle cultivar	0	0	0	0±0.0 b	0	0±0.0 c
Citrus reticulata	Local mandarin cultivar	0	0	0	0±0.0 b	0	0±0.0 c

<sup>a</sup>: DI= disease incidence.

<sup>b</sup>: DS= disease severity. DS (%)=[( $\Sigma nixi$ )/Nx4] x100, i=disease index.

#### 致 謝

感謝美國農部動植物防疫檢疫局植物健康中心的資深研究 員Dr. Gloria Abad (USDA-PPQ Center of Plant Health Science and Technology (CPHST) Beltsville Laboratory) 協助於菌株之鑑定, 以及承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之計畫「107救 助調整-檢-02(Z)」補助試驗經費,僅此致謝。

# 引用文獻

- 1. Abad, Z. G., Abad, J. A., Coffey, M. D., Oudemans, P. V., Man in 't Veld, W. A., de Gruyter, H., Cunnington, J., and Louws, F. J. 2008. Phytophthora bisheria sp. nov., a new species identified in isolates from the rosaceous raspberry, rose and strawberry in three continents. Mycologia 100: 99 - 110.
- 2. Ann, P. J., Tsai, J. N., Wang, I. T., Huang, J. H., Lin, J. P., Tsai, H. L., Wang, S. T. and Yang, C. K. 2016. Ecology and control of Phytophthora disease of Amaranth. Plant Pathol. Bull. 24: 241-249. (In Chinese).
- 3. Anonymous. 2019. List of plant diseases in Taiwan (fifth edition). Taiwan Phytopathological Society Press, 329p. (in Chinese)
- 4. Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. Trans. Br. Mycol. Soc. 66:183-185.
- 5. Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society Press. 562 p.
- 6. Huang, J. H., Ann, P. J., Chiu, Y. H., and Tsai, J. N. 2012. First report of Phytophthora cambivora causing leaf and stem blight and root rot on Taiwan cherry (Prunus campanulata) in Taiwan.

Plant Dis. 96: 1065-1065.

- 7. Hwang, S. C., Ko, W. H. and Aragaki, M. 1975. A simplified method for sporangial production by Phytophthora cinnamomi. Mycologia 68:1233 - 1234.
- 8. Ko, W. H., Chang, H. S., and Su, H. J. 1978. Isolates of Phytophthora cinnamomi from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71:496-499.
- 9. Rahman, M. Z, Uematsu, S. and Takeuchi, T. 2014. Two new species, Phytophthora nagaii sp. nov. and P. fragariaefolia sp. nov., causing serious diseases on rose and strawberry plants, respectively, in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 80: 348 - 65.
- 10. Stamp, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., and Hall, G. S. 1990. Revised Tabular Key to the species of Phytophthora. Mycol. Pap. 162:1 - 28.
- 11. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR- Protocols and Applications- a laboratory manual. Academic Press, San Diego. p315 - 322.

# ABSTRACT

Yuan C. Y., J. H. Huang, P.Y. Ting, and P. J. Ann. 2020. First report of rose blight caused by Phytophthora nagaii and Phytophthora bisheria in Taiwan. J. Plant Med. 62(4): 13-22. \*Corresponding author, E-mail: pjann@tari.gov.tw

In September 2015, a severe root rot disease of rose was observed in Puli Township, Nantou County, Taiwan. Disease symptoms included yellowing and wilting of leaves and finally

plant death. All the infected plants showed root necrosis, sometimes extending to the basal stem. Two Phytophthora species were consistently isolated from the infected plants. The pathogenicity of these two Phytophthora species was confirmed to fulfil the Koch's postulates by zoospore suspension inoculation on basal stem of rose seeding plants, and the diseased plants showed leaf-yellowing 14 days and died 28 days after inoculation at 32 °C, similar to those observed in naturally infected plants. On 10% V8 agar, the first Phytophthora species could grow at 8 - 33 °C with a growth rate of 7 mm/day at the optimum temperature of 28 °C, showing radiate colony pattern. Sporangia are ovoid shaped, produced on the top of unbranched sporangiophores, nonpapillate and nondeciduous, 51.4-91.0  $\times$  35.5-70.0 (avg. 63.0  $\times$  45.1)  $\mu$ m, proliferated internally. Occasionally spherical hyphal swellings and chlamydospores are observed on 10% V8 agar and agar discs in water. The pathogen is homothallic, and produced oogonia 29.6 - 45.5 (avg. 38.0) µm in diameter with smooth walls. Oospores are mostly aplerotic, and 23.1 - 40.9 (31.5) µm in diameter. Antheridia are mostly paragynous, sometimes amphigynous,  $11.0-22.7 \times 9.1-19.0$  (avg.  $16.7 \times 14.6$ ) µm. The second *Phytophthora* species could grow at 16 - 32 °C at a rate of 12 mm/day on 10% V8 agar at the optimum temperature of 28 °C showing rosette colony pattern. Sporangia were pear shaped, produced on the top of unbranched or occasionally simple sympodial sporangiophores, semipapillate and nondeciduous, 32.3 - 50.0 × 25.6 - 36.9 (avg. 40.8 × 30.8) µm. Hyphal swellings and chlamydospores are both absent on 10% V8 agar and in water. The pathogen is homothallic, and produced oogonia 23.5 - 34.5 (avg. 28.7) µm in diameter with smooth walls. Oospores are mostly aplerotic, and 19.7 - 32.6 (avg. 26.2) µm in diameter. Antheridia are paragynous,  $7.1 - 14.8 \times 7.0 - 11.0$  (avg.  $9.8 \times 8.5$ ) µm. Based on morphological characteristics and neighbor-joining analysis of DNA sequences of internal transcribed spacer (ITS), the two pathogens were respectively identified as P. nagaii (clade 7) and P. bisheria (clade 2). The host range test showed that these two Phytophthora species only infected some rose cultivars and strawberry. This is the first report of *Phytophthora nagaii* and causing rose disease in Taiwan.

# Keywords: rose, *Phytophthora*, identification, *Phytophthora* bisheria, *Phytophthora nagaii*