

*Neottiosporina cylindrica*造成之輪傘莎草褐斑病蔡承佑¹、黃煜程¹、鍾文鑫^{1,2}、王智立^{1,2*}¹ 國立中興大學植物病理學系。臺中市。臺灣。² 國立中興大學永續農業創新發展中心。臺中市。臺灣。

* 聯絡作者，E_mail: clwang@nchu.edu.tw

摘要

蔡承佑、黃煜程、鍾文鑫、王智立^{*}。2019。 *Neottiosporina cylindrica*造成之輪傘莎草褐斑病。植物醫學61(1): 19-28。

2017至2018年間於臺灣中部彰化及苗栗地區觀察到輪傘莎草 (*Cyperus involucratus*)葉片具有褐色病斑，病斑中央組織呈現破裂、白化現象，嚴重時葉片枯黃、莖頂萎凋斷裂，採集罹病葉片進行組織分離，並以科霍氏法則確認各分離株皆具有病原性。病原菌可於含有莎草組織的PDA培養基中產生黑色柄孢子殼 (pycnidia)，柄孢子殼內形成無色、單隔、頂端及基部細胞不對稱之柄孢子 (pycnidiospores)，柄孢子為圓筒狀、頂端具傘型附著物 (umbraculiform appendages)。以ITS及LSU基因進行親緣演化樹分析，顯示病原菌屬於 *Neottiosporina* 屬，再根據形態特徵鑑定病原為 *Neottiosporina cylindrica* B. Sutton & Alcorn。進一步試驗環境溫度對病原菌及病害發展的影響，菌絲及柄孢子在 16~32°C 皆可生長與發芽，並以 28°C 為最適溫度，而病斑之發展則以 20°C 下病徵最顯著。對其他寄主之病原性測試顯示，病原菌具有感染土香 (*Cyperus rotundus*)、短葉水蜈蚣 (*Kyllinga brevifolia*) 及水稻臺農 67 號的潛力，但對其他測試之糧食作物 (包含水稻台南 11 號) 皆不具病原性。 *N. cylindrica* 引起輪傘莎草褐斑病為各國未曾紀錄之新病害，亦為臺灣 *Neottiosporina* 屬真菌之首次記錄。

關鍵詞：輪傘莎草 (*Cyperus involucratus*)、*Neottiosporina cylindrica*、莎草科、褐斑病

緒言

輪傘莎草 (*Cyperus involucratus* Rottb.) 屬於莎草科 (Cyperaceae)，目前已有紀錄約 5,000 餘種，多數集中於熱帶南美洲地區之濕地、沼澤環境⁽¹³⁾。而莎草屬 (*Cyperus* spp.) 於全世界紀錄約為 600 餘種，此屬植物於臺灣全島分布廣泛，多生長

於低海拔地區、陽光充足的地區，喜好濕地、田間或是草地，有些種類地下莖發達，或是無性生殖旺盛，容易壓迫到田間經濟作物的生長與產量，因此某些種類已成為須防除的雜草，例如：土香 (*Cyperus rotundus* L.)⁽³⁶⁾。輪傘莎草為多年生的草本植物，根莖短縮、莖桿呈圓三角狀，穗呈指狀，瘦果為闊橢圓形，本種於 1901 年由日本引進做為觀賞植物⁽³⁾，因此經常栽培於公園、校園等公共水生植物池，目前已屬於臺灣歸化種。據翁氏之調查發現，本種與光桿輪傘莎草 (*Cyperus alternifolius* L.) 外觀型態非常相近，但仍可經由穎片、小穗、瘦果與瘦果表面之微細構造進行區別，且兩種之間並無雜交情形⁽³⁶⁾。輪傘莎草除了作為觀賞植物之用途外，同時因為其纖維具有韌性，而可作為編織用途，花東地區阿美族原住民栽培用作編織材料，“Faho” 是輪傘莎草的阿美族語，可編織成草席、太陽席、窗簾等生活用品，或設計草燈、桌墊等藝品。

根據臺灣植物病害名彙，目前尚未有輪傘莎草之相關紀錄，然而臺灣之莎草屬相關真菌病害紀錄則有葉部病害 *Cercospora cyperi* Sawada、*Phyllosticta cypericola* Sawada；銹病 *Puccinia canaliculata* Lag、*P. cyperi-iriae* Sawada、*P. philippinensis* Syd、*Uredo cyperi-tagetiformis* Henn；黑穗病 *Cintractia axicola* var. *minor* Chint、*C. limitata* Clinton、*C. minor* Jackson；白絹病與大粒白絹病 *Athelia rolfsii* Tu et Kimbr、*Thanatephorus cucumeris* Donk⁽¹¹⁾。國外紀錄目前同樣尚未具有輪傘莎草之病害紀錄，然而光桿輪傘莎草 (*C. alternifolius*) 則記錄葉部病害如：*Cercospora cyperacearum* Cheew., Crous & U. Braun.⁽¹⁹⁾、*C. cyperina* Nguanhom, Crous & U. Braun⁽¹⁹⁾、*Passalora cyperi* (D. Gupta, Padhi & Chowdhry) U. Braun & Crou⁽⁴⁾、*Pestalotiopsis palmarum* (Cooke) Steyaert.⁽³⁰⁾、*Phyllachora cyperi* Rehm.⁽¹⁾等。本研究自彰化縣 (衛星座標：24.070949, 120.505699)、苗栗縣 (衛星座標：24.418760, 120.773549) 觀察到輪傘莎草葉部、莖部具有褐斑狀的病徵，罹病組織嚴重感染造成葉片枯黃萎凋，甚至整個莖頂萎凋。本研究藉組織分離純化病原菌，進一步以形態輔以親緣

演化樹分析方式鑑定病原菌，並將討論溫度對病原菌及病斑發展之影響，及其對其他寄主的病原性。

材料與方法

一、罹病葉片組織分離

將具有相似病徵之輪傘莎草葉片，使用解剖刀切下病健交接處之組織塊4塊（約為1~3 mm大小）。將組織塊放入含1%次氯酸鈉的漂白水（1 ml 6%漂白水，5ml dH₂O）中進行消毒處理30秒，之後放入無菌水中漂洗3次，每次3分鐘。取出表面消毒後之組織塊，放置入water agar (agar 10 g, 1L dH₂O)之4個角落，置於28°C生長箱（光照12小時/黑暗12小時）內培養4天，挑取長出之菌絲尖端將其移植至馬鈴薯葡萄糖瓊脂（Potato Dextrose Agar, PDA）(potato starch 4.0 g, sucrose 20.0 g, agar 20.0 g, 1L dH₂O) 中進行純化。

二、病原性測試與病原菌保存

自上述所分離之真菌進行病原性接種測試，採集表面乾淨、健康的輪傘莎草葉片進行離葉接種，以75%酒精（95% ethanol 790 ml, dH₂O 210 ml）進行表面消毒後，以無菌水進行漂洗3分鐘。取出漂洗後的莎草葉片放置於密封箱，已沾濕之擦手紙包覆切口保持濕度，維持其內高濕度。莎草葉片分別進行有傷口與無傷口之處理，將菌株之菌絲塊（約直徑4.0 mm）接種於上，並記錄接種位置與菌株，放置於28°C生長箱（光照12小時/黑暗12小時）中觀察30天，並隨時記錄病徵發展情形。30天後將產生病徵之葉片取出，再次進行組織分離，觀察是否可分離相同的病原菌，分離法如前所述。經接種確認具有病原性的菌株，以PDA斜面進行菌種保存。並選取其中不同地區致病力較強之彰化市分離株CP2、CP4(BCRC FU30997)以及苗栗三義分離株MP1(BCRC FU30998)作為供試菌株進行後續實驗。

三、病原菌分子鑑定

(一)病原菌的DNA萃取

將確認具病原性之菌株CP2、CP4、MP1分別接種至50ml的酵母蛋白葡萄糖培養基（Yeast Extract Peptone Dextrose, YEPD）(yeast extract 3.0 g, peptone 10.0 g, dextrose 20.0 g, 1L dH₂O) 後，放入震盪恆溫培養箱（S360R, Firstek Scientific, Taiwan）中以125 rpm、28°C定溫。培養3日後，以濾布（Miracloth, Merck Millipore, Germany）過濾收集菌絲球，將菌絲球水分擠乾，保存於-20°C待用。取出約1x1 cm²大小之菌絲塊放入研磨袋，加入500 µl Lysis buffer [5M NaCl 5.0 ml, 1M Tris (pH7.5) 0.5 ml, 0.5M EDTA 1.0 ml, 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 5.0 ml, MQ water to 50.0 ml]以研磨棒研磨，待菌絲塊完全磨碎，將液體全數移入2.0 ml微量離心管，放置於65°C乾浴槽（MD-01N110,

Major Science, U.S.A.) 加熱至少15分鐘，之後加入phenol : chloroform 500 µl，並上下搖勻至呈混濁狀。以桌上型離心機（5415D, Eppendorf, the U.S.A.）進行離心6,000 rpm 15分鐘，取上清液至2.0 ml離心管，再加入5.0 µl 10 mg/ml RNase A (ProTECH, Taiwan) 於37°C下反應20分鐘。再加入phenol : chloroform 500 µl，重複萃取兩次。完成後再取上清液移入新的2.0 ml離心管，加入isopropanol 400 µl靜置於-20°C中30分鐘後，離心10,000 rpm 15分鐘。完成後觀察沉澱，並謹慎倒掉上清液，以75%酒精沖洗沉澱物2次後，開蓋於60°C乾浴槽中蒸乾液體，之後以MQ water 40 µl回溶DNA，保存於-20°C。

(二)供試菌株定序

以聚合酶連鎖反應（PCR）增幅核糖體去氧核糖核酸（rDNA）之轉錄區間內序列（Internal transcribed spacer, ITS）以及28S的大次單元（Large subunit, LSU），加入dH₂O 17 µl、10X buffer (ProTECH, Taiwan) 2.5 µl、2.5mM dNTP (ProTECH, Taiwan) 2 µl、10µM ITS區間引子對各1.0 µl：ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')⁽¹¹⁾與V9G (5'-TTACGTCCTGCCCTTTGTA-3')⁽¹⁰⁾；10µM LSU引子對各1.0 µl：LSU1Fd (5'-GRATCAGGTAGGRATACCCG)⁽²⁰⁾、LR5 (TCCTGAGGGAACTTCG)⁽²⁰⁾、2 U/µl Taq polymerase 0.5 µl (ProTECH, Taiwan) 以及試驗菌株DNA template 1 µl，總反應體積為25 µl，混合均勻後放入自動溫度循環控制器（GeneAmp® PCR System 2700, ThermoFisher, U.S.A）中反應，反應流程為95°C反應3分鐘，40次循環之95°C反應30秒、52°C反應30秒、72°C反應2分鐘，接著72°C反應7分鐘，降溫至25°C反應10分鐘。反應完成並確認產物後暫時保存於-20°C。經確認僅具單一PCR產物後，將產物送交源資生技公司進行定序分析，將成功定序之資料資訊與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。

(三)演化樹分析

將菌株CP2、CP4及MP1與親緣接近之Massarinaceae科真菌的序列資料進行演化樹分析。首先使用Bioedit軟體對定序之ITS與LSU序列進行編輯與黏合後，配合由美國國家生物科技資訊中心（National Center for Biotechnology Information, NCBI）資料庫所獲得之其他真菌之序列資料進行ClustalW Multiple alignment，完成後檢整序列資料以Mega7⁽¹⁵⁾軟體進行演化樹分析，選擇Maximum likelihood method方式分析，並以bootstrap method 進行1000次的重複取樣，模式（model）與rate among site 則使用Kimura 2-parameter with Gamma Distributed (K2+G model)⁽¹⁴⁾，呈現ITS/LSU基因演化樹之結果。

四、病原菌形態鑑定

針對病原菌的外表形態進行描述與紀錄，因病原菌較易

於含莎草組織塊的PDA培養基(簡稱為CPDA)產孢,將供試菌株CP2、CP4與MP1接種至CPDA上培養10日後於解剖顯微鏡(SZH10, Olympus, Japan)下挑取病原菌之柄子殼於載玻片,將柄子殼壓碎或以冷凍切片機進行柄子殼的切片,於光學顯微鏡(BX53, Olympus, Japan)下觀察產孢構造,並以數位影像照相系統(SE-319 CUB, Micrometrics, U.S.A)照相紀錄並進行大小量測。

五、溫度對菌絲生長及孢子發芽之影響

將於PDA上培養7日之CP2、CP4與MP1菌株,以打孔器(直徑4 mm)切取菌落邊緣,並將菌絲塊放置於PDA中央,分別培養於16°C、20°C、24°C、28°C、32°C等5種不同溫度之黑暗條件下,每個溫度處理四重複,待生長第7天進行菌落直徑的測量,並計算平均生長速率(mm/day)。

取培養於CPDA 20-30日之供試菌株MP1、CP2、CP4,於含有0.1% Tween 20之1.0 ml 無菌水中進行震盪,所得之孢子懸浮液以血球計數器計算,並以無菌水稀釋調整濃度至 2×10^4 spores/ml,將調整後之孢子懸浮液10 μ l滴加至載玻片上,分別放置於上述5種不同溫度之定溫生長箱,每個溫度三重複。待8小時後取出鏡檢,於顯微鏡下隨機調查50個孢子的發芽情形,孢子發芽判別依據為發芽管超過孢子長度一倍長,孢子發芽率的計算為已發芽孢子數量/計算數量*100%。

六、溫度對病害發生之影響

採集表面乾淨、健康的輪傘莎草葉片進行離葉接種,以75%酒精進行表面消毒後,以無菌水進行漂洗3分鐘。接種方式為以滅菌消毒後之針先行戳刺葉片製造3個傷口,並於傷口處放上供試菌株CP2、CP4及MP1於PDA上培養7日之菌絲塊,記錄接種位置,放置於維持高濕度的密封箱中,試驗分為16°C、20°C、24°C、28°C、32°C等5種不同處理溫度,生長箱光週期為光照12小時/黑暗12小時,其中每片葉片上接種3處,其中2處接種病原菌,1處為對照組(無菌之PDA塊),每個溫度處理3重複,接種後3天取下菌絲塊,觀察9天並記錄病徵發展情形,測量壞疽狀組織與褪綠黃化組織大小作為紀錄。統計使用R軟體(R x64 3.4.4, U.S.A)對溫度與菌株間進行雙因子變異數分析(two way-ANOVA)並以最小顯著差異性測驗(least significance difference test, LSD)對結果進行多重比較(multiple comparison)。

七、寄主範圍測試

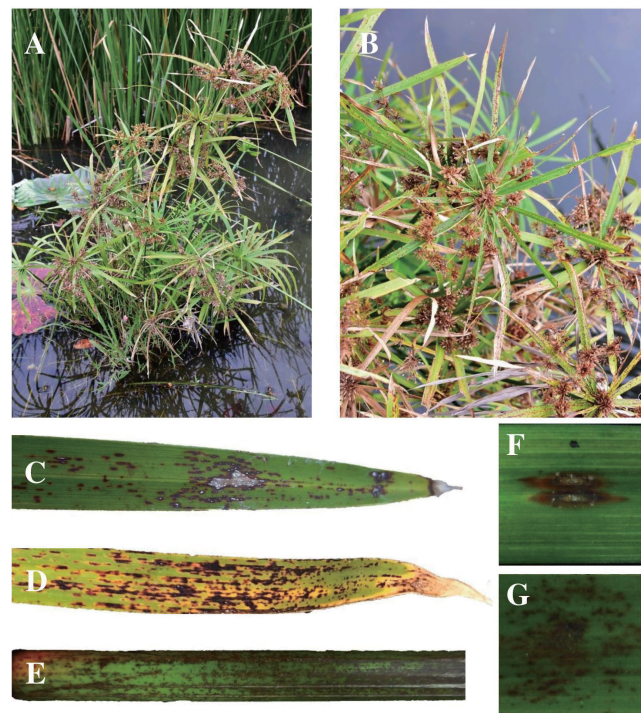
為了解病原菌對單子葉作物之潛在威脅及其寄主範圍,接種水稻臺農67號(*Oryza sativa* L.cv. Tainung 67)、水稻臺南11號(*O. sativa* L.cv. Tainan 11)、玉米(*Zea mays* L.)、五節芒(*Miscanthus floridulus* (Labill.) Warb. ex K. Schum. & Lauterb.)、白甘蔗(*Saccharum sinense* Roxb.)、蘆葦(*Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steud.)、土香(*Cyperus rotundus* L.)、短葉水蜈

蚣(*Kyllinga brevifolia* L.)以及對照組輪傘莎草(*C. involucratus* Rottb.)等植物,接種方式如前所述之菌絲塊接種,供試菌株為CP2、CP4及MP1,記錄接種位置與寄主葉片,放置於維持高濕度的密封箱中,於28°C生長箱(光照12小時/黑暗12小時)中3-9天逐日觀察並記錄病徵發展情形,亦對病斑發生數目記錄。

結 果

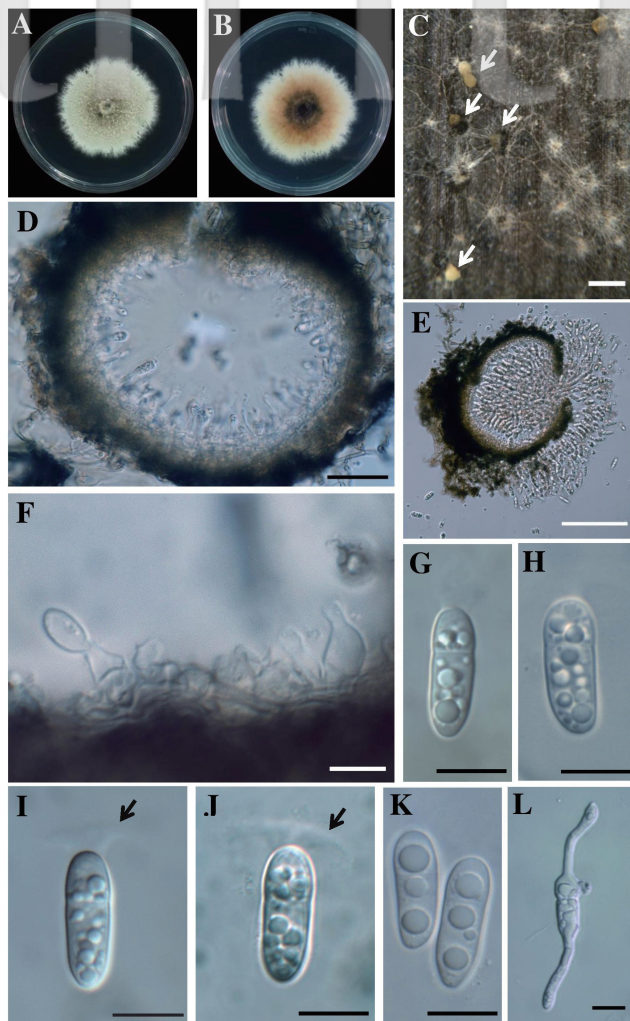
一、田間病徵與病原菌分離

田間可觀察到褐斑狀的病徵分布於枯株葉部及莖部,兩者病徵相似。初期為褐色點狀病徵主要分布於上位葉,病斑漸漸擴大癒合,感染點中心位置變為壞疽狀並呈現表皮組織破裂、轉變為白色、薄膜化的現象,外圍則為橘色至深褐色的罹病組織,下位葉嚴重感染葉片逐漸褪綠,最後枯黃萎凋,甚至整個莖頂萎凋(圖一A-E)。



圖一、輪傘莎草褐斑病田間病徵與人工接種之病徵。(A、B)田間植株,葉片呈現褐斑及乾枯症狀;(C)上位葉之田間病徵,褐化病斑中央呈現表皮組織破裂之白化現象;(D)下位葉之田間病徵,葉片受到嚴重感染逐漸枯黃;(E)輪傘莎草莖桿受感染呈現出黑褐色病斑;(F)有傷口處理之接種病徵;(G)無傷口處理之接種病徵。

Fig. 1. Symptoms of brown spot of umbrella flat sedge (*Cyperus involucratus*) caused by *Neottiosporina cylindrica*. (A, B) Plants showed chlorotic and dry-out leaves; (C) Symptoms on an upper leaf showed brown spots with cracked and white epidermis in the center; (D) Symptoms on a lower leaf showed severe infection with chlorosis; (E) Symptoms on a stem showed a number of brown spots; (F) Symptoms generated from wounded inoculation; (G) Symptoms generated from un-wounded inoculation.



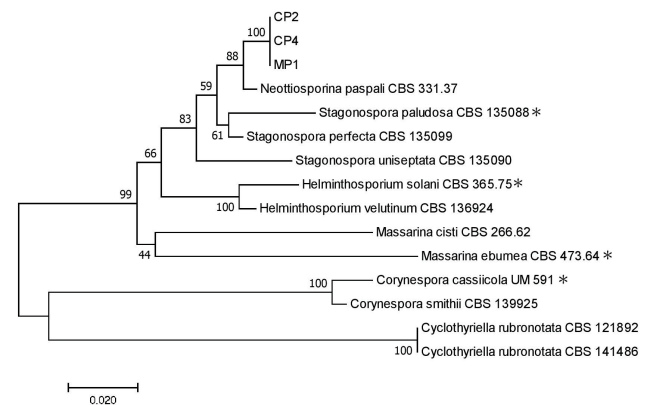
圖二、*Neottiosporina cylindrica*之形態特徵。(A)於PDA培養基生長7日之菌落型態；(B)PDA培養基背面之菌落特徵；(C)含輪傘莎草組織塊之PDA上產生的黑色柄孢子殼，於濕度高環境下柄孢子自孔口擠出，箭頭所指即為擠出之淡黃色柄孢子團；(D)柄孢子殼之橫切面；(E)柄孢子殼內存有大量柄孢子，自孔口擠壓釋放；(F)產孢細胞形狀為瓶狀至桶狀；(G-K)柄孢子形狀為圓筒狀，單隔，頂端細胞與基部細胞大小不對稱，柄孢子頂端具有附著物，形狀多變，以傘狀居多，箭頭所指即為頂端附著物；(L)柄孢子由兩端進行發芽。

Fig. 2. The morphological characteristics of *Neottiosporina cylindrica*. (A) Upper view of a colony on PDA medium for 7 days; (B) Reverse view of a colony on PDA medium; (C) Black pycnidia produced on CPDA medium. Mass of pycnidiospores (white arrows) squeezed out of pycnidia through ostioles in high humid condition; (D) A section of a pycnidium; (E) A section of a pycnidium containing lots of pycnidiospores; (F) Conidiogenous cells were determinate, ampuliform to doliiiform; (G-K) Pycnidiospores were asymmetrically 1-eusptate, cylindrical, with apical appendages mostly in umbraculiform (black arrow); (L) Bipolar germination of a pycnidiospore. (Scale bars: C&E=100 μ m, D=50 μ m, F-L=10 μ m)

採集具上述病徵之葉片數片進行組織分離，自彰化縣採集的樣本中分離出CP1、CP2、CP3、CP4、CP5、CP6等共6個分離株，苗栗採集樣本中分離出MP1、MP2等共2個分離株，分離株之菌落型態間差異不大，於PDA培養基上菌落特徵初期為橄欖灰之後轉變為灰色，邊緣不整並有向內彎曲之菌絲，菌落上會產生生理的黑褐色菌絲團，菌落生長約5天左右會自中央位置開始累積黑褐色素（圖二A、B），病原菌於28°C下生長兩週內即可覆滿培養基表面。

二、病原性測試

以CP1、CP2、CP3、CP4、CP5、CP6、MP1及MP2共8個菌株進行接種測試，接種後第5天即可觀察到接種位置附近開始出現褐化並有逐漸擴大的趨勢，記錄至第30天，有傷口之處理與無傷口之處理皆可見褐化病斑，且中央表皮組織破裂，變為白色、薄膜化，中央褐化組織由內而外依序由黑褐色及橘色至深褐色的罹病組織圍繞（圖一F-G），與田間觀察之病徵相似，另外無傷口處理之接種，病徵發展較慢且呈現多點分散的褐斑。從罹病組織進行再分離，可分離到與接種菌株相同的病原菌，完成科霍氏法則。



圖三、輪傘莎草褐斑病菌之親緣演化樹。將供試菌株CP2、CP4與MP1與相近屬參考菌株之ITS及LSU基因序列，以Mega v7.0軟體進行演化樹分析，使用Maximum likelihood method (1000 bootstraps)及Kimura 2-parameter with Gamma Distributed model (K2*+G model)。節點上之bootstrap值代表該支序群之統計可信度；比例尺為核苷酸之平均替代率。（*：表示為模式種之ex-type strain）

Fig. 3. Phylogenetic analysis on pathogens of brown spot of *Cyperus involucratus*. Phylogenetic analysis based on concatenated sequences of ITS and LSU was performed using Mega v7.0 by Maximum likelihood method (1000 bootstraps) with Kimura 2-parameter with Gamma Distributed model (K2*+G model). Studied isolates CP2, CP4 and MP1 and twelve reference taxa were included in the tree analysis. *Cyclothyriella rubronotata* strains were used as the outgroup taxa. Bootstrap values above nodes represent the statistic support for clades. The scale indicates nucleotide substitution per site. (*:means ex-type strain of the type species)

表一、親緣演化樹分析之菌株

TABLE 1. Fungal isolates and their accession numbers of partial ITS and LSU gene sequences used in phylogenetic analysis.

Taxon	Culture no.	ITS	LSU	Reference
<i>Corynespora cassiicola</i> ^a	UM 591	Genome ^b	Genome ^b	Lopez, D., et al. 2018.
<i>Corynespora smithii</i>	CBS 139925	KY984299	KY984299	Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017.
<i>Cyclothyriella rubronotata</i>	CBS 121892	KX650541	KX650541	Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017.
<i>Cyclothyriella rubronotata</i>	CBS 141486	KX650544	KX650544	Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017.
<i>Helminthosporium velutinum</i> ^a	CBS 136924	KY984347	KY984347	Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017.
<i>Helminthosporium solani</i>	CBS 365.75	KY984341	KY984341	Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017.
<i>Massarina eburnea</i> ^a	CBS 473.64	AF383959	GU301840	Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017.
<i>Massarina cisti</i>	CBS 266.62	LC014568	AB807539	Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017.
<i>Neottiosporina paspali</i>	CBS 331.37	KP170653	EU754172	Trakunyingcharoen, T., et al. 2014. De Gruyter, J., et al. 2009.
<i>Neottiosporina cylindrica</i>	CP2	MH423482	MH423485	This study.
<i>Neottiosporina cylindrica</i>	CP4 (BCRC FU30997)	MH423483	MH423486	This study.
<i>Neottiosporina cylindrica</i>	MP1 (BCRC FU30998)	MH423484	MH423487	This study.
<i>Stagonospora paludosa</i> ^a	CBS 135088	KF251257	KF251760	Quaedvlieg, W., et al. 2013.
<i>Stagonospora perfecta</i>	CBS 135099	KF251258	KF251761	Quaedvlieg, W., et al. 2013.
<i>Stagonospora uniseptata</i>	CBS 135090	KF251264	KF251767	Quaedvlieg, W., et al. 2013.

^a Type species.^b Sequence retrieved from genome deposited at NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

三、病原菌分子鑑定

選取已確認病原性之CP2、CP4及MP1菌株作為供試菌株，進行ITS及LSU序列之增幅與定序，並上傳至NCBI (ITS accession numbers MH423482-MH423484; LSU accession numbers MH423485-MH423487)。將獲得之供試菌株與參考菌株的ITS與LSU序列資料經檢整後，用於分析的核苷酸數分別為460 bp與720 bp，為進行多基因演化樹分析合併已整理之ITS與LSU序列資料共計1180 bp，與親緣較相近之真菌(表一)進行分析(圖三)，其中因*Neottiosporina*屬僅有1種之序列資料可供比對，而其他屬真菌則挑選模式物種(type species)與同屬內相關真菌進行比對，並以*Cyclothyriella rubronotata*作為外群(outgroups)之對照⁽³⁵⁾，分析結果顯示本研究之3菌株自成一個支序群(clades)，具100%的bootstrap值，且較為接近*Neottiosporina paspali*具88%的bootstrap值，因此推論輪傘莎草褐斑病菌應為*Neottiosporina*屬之真菌。

四、病原菌形態鑑定

供試菌株CP2、CP4及MP1於CPDA上培養約3-4周後可見柄子殼產生，將柄子殼壓碎進行鏡檢，測量3菌株柄孢子大小約在16.6-22.7 x 5.1-9.6 μm (n=50)，柄孢子形狀為圓筒狀(cylindrical)，單隔，頂端與基部兩細胞不對稱，頂端細胞長約為6.0-10.2 μm，基部細胞長約為10.2-14.3 μm，比例約等於3:4，細胞內具有一至多個油滴，柄孢子頂端多為平坦狀(flattened

apex)，基部則多為截形(truncate)(部分為圓形)，頂端附著物(apical appendages)約為2.8-4.7 x 12.1-19.3 μm (n=30)，形狀上多變且不易觀察，通常為傘狀(umbraculiform)，柄子殼表生於組織塊上，並由多層細胞組成，外圍通常為深棕色至黑色的厚壁細胞，該組織為角狀的厚壁組織(thick-walled texture angularis)，單一孔口(ostiole)，內層顏色透明且可觀察到產孢細胞排列，產孢細胞大小約為9.0-11.5 x 6.4-7.6 μm (n=5)，形狀為瓶狀至桶形(ampuliform to doliform)(圖二及表二)。依上述形態特徵與*Neottiosporina*屬之已知種進行形態比對，根據柄孢子之隔膜數、柄孢子之形態、產孢細胞形態、柄子殼大小及寄主，鑑定輪傘莎草褐斑病菌為*Neottiosporina cylindrica* B. Sutton & Alcorn.。

五、溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

供試菌株CP2、CP4及MP1於PDA生長至第7天進行菌落直徑(mm)大小的測量，結果顯示3菌株之菌絲生長速率由16°C至28°C漸漸上升，於16°C生長速度僅1.5-2.6 mm/day，於28°C生長最快，菌絲生長速率介於8.3-10.3 mm/day，超過28°C開始遞減，於32°C時為4.8-5.0 mm/day(圖四A)。供試菌株CP2、CP4及MP1之柄孢子發芽率與菌絲生長相似隨溫度上升而漸漸提高，16°C發芽率介於5-20%，於28°C最佳，發芽率介於77-80%，超過28°C則下降，於32°C時介於44-60%(圖四B)。

表二、*Neottiosporina* spp.相近種之形態與寄主比較TABLE 2. Morphological and host comparison of closely related species in *Neottiosporina*.

	<i>N. paspalii</i> ^a	<i>N. sorghicola</i> ^b	<i>N. masonii</i> ^c	<i>N. cylindrica</i> ^d	CP2	CP4	MP1
Conidioma (µm)	≥115	85-130	≥300	135-270	110-220	110-220	110-220
Conidiogenous cell							
Size (µm)	5-8 x 8-14	5-8 x 6-10	6-10 x 3-3.5	6.5-7 x 3-6	9-11.5 x 6.4-7.6	9-11.5 x 6.4-7.6	9-11.5 x 6.4-7.6
Shape	ampuliform to doliiform	doliiform	more cylindrical	ampuliform to doliiform	ampuliform to doliiform	ampuliform to doliiform	ampuliform to doliiform
Conidium							
Shape	cylindrical to navicular	cylindrical, ellipsoid	clavate	cylindrical	cylindrical	cylindrical	cylindrical
Septation	2	1 symmetrical	1 asymmetrical	1 asymmetrical	1 asymmetrical	1 asymmetrical	1 asymmetrical
Size (µm)	26-33 x 6.8-8	18.5-25 x 7.5-9.5	15.5-19 x 4.5-6	15-23 x 5-7	16.6-21.8 x 5.1-7.7	16.8-21.2 x 6.8-9.6	18.5-22.7 x 6.2-7.3
Apical cell (µm)	ND ^e	ND	5-7	5-10	6-8.2	6.1-8.2	6.6-10.2
Basal cell (µm)	ND	ND	9-12.5	9.5-14	10.2-14.2	10.8-14.3	11.5-14.2
Apical appendage (µm)	6.5-13	5-12 x 10-15	6.5-11.5 x 2-3	7.5-11 x 6-12.5	12.1-16.7 x 2.8-4	12.7-19.3 x 3.1-4.7	12.6-18.3 x 3.1-4.4
Host	<i>Paspalum laeve</i>	<i>Sorghum vulgare</i>	<i>Pinus caribaea</i>	<i>Kyllinga brevifolia</i>	<i>Cyperus involucratus</i>	<i>Cyperus involucratus</i>	<i>Cyperus involucratus</i>
(English name)	(Field beadgrass)	(Sorghum)	(Caribbean pine)	(green kyllinga)	(Umbrella flat sedge)	(Umbrella flat sedge)	(Umbrella flat sedge)
Family of host plant	<i>Poaceae</i>	<i>Poaceae</i>	<i>Pinaceae</i>	<i>Cyperaceae</i>	<i>Cyperaceae</i>	<i>Cyperaceae</i>	<i>Cyperaceae</i>

^a Sutton, B. C., and Alcorn, J. L. 1974. ^b Sutton, B. C., and Wu W. P. 1995. ^c Sutton, B. C., and Marasas, W. F. O. 1976. ^d Sutton, B. C., and Alcorn, J. L. 1985. ^e Not determined.

六、溫度對病害發生之影響

以輪傘莎草葉片進行離葉接種，接種源為供試菌株CP2、CP4、MP1之4 mm菌絲塊，接種後測量壞疽與黃化狀病徵之大小，結果顯示接種部位的葉片組織出現褐化，除28°C之接種葉外，各溫度下接種形成的病斑外圍皆有褪綠黃化組織，其中又以16°C、20°C下最明顯，測量接種後第9天之病斑大小，以20°C下接種形成之病斑最大。對溫度與菌株間進行雙因子變異數分析並以最小顯著差異性測驗 (least significance difference test, LSD) 對結果進行多重比較，菌株間無顯著差異，綜合3菌株的病斑資料分析顯示測試溫度20°C與其他溫度具有顯著差異(圖四C、D)。

七、寄主範圍測試

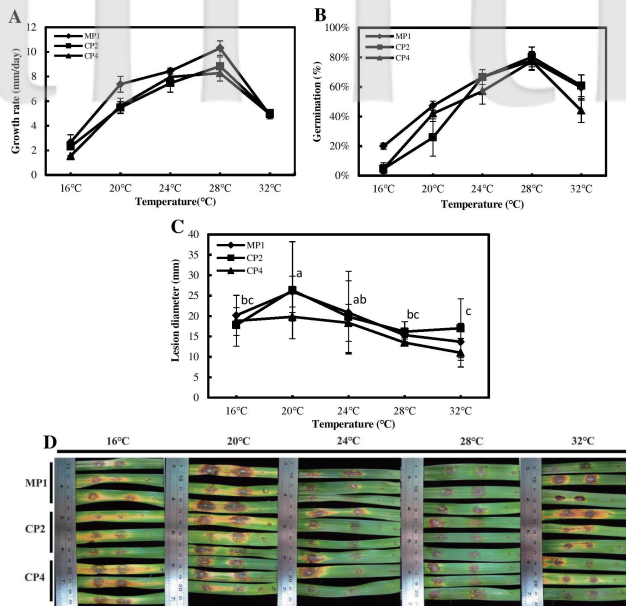
為了解病原菌對單子葉作物之潛在威脅及其寄主範圍，接種莎草科土香、短葉水蜈蚣3天下即可見與輪傘莎草相似之病斑，且隨時間增加而擴大，兩者之發病率分別為88% (n=18) 及86% (n=15)，表示病原菌對此兩雜草具病原性。禾本科水稻臺農67號接種後3天出現壞疽病斑，且與對照組有明顯區別，但病斑的發展緩慢，發病率為66% (n=6)，因此推測可能具潛在的病原性。禾本科玉米、五節芒、白甘蔗、蘆葦、水稻臺南11號接種後3天，接種處出現針刺傷口造成之壞疽且周圍有菌絲

黏附之汗狀，然而壞疽組織範圍不隨時間而進展，與對照組表現相似，黏附葉表之菌絲擦除後，亦無病徵顯現，因此皆判定為病原菌對所接種之禾本科植物無病原性(圖五)。

討 論

本研究於彰化與苗栗地區觀察到輪傘莎草葉片具有褐斑狀病徵，病斑中央褐化並呈現表皮組織破裂現象，採集相同病徵之葉片進行組織分離，獲得8株真菌分離株，經科霍氏法則確認所有分離株皆具病原性，並以形態鑑定輔以多基因親緣演化樹分析，鑑定病原菌為*Neottiosporina cylindrica*，此紀錄為*N. cylindrica*及*Neottiosporina*屬真菌於臺灣的首次記錄⁽²⁸⁾，亦為目前各國皆未曾記錄過的輪傘莎草新病害⁽⁸⁾。

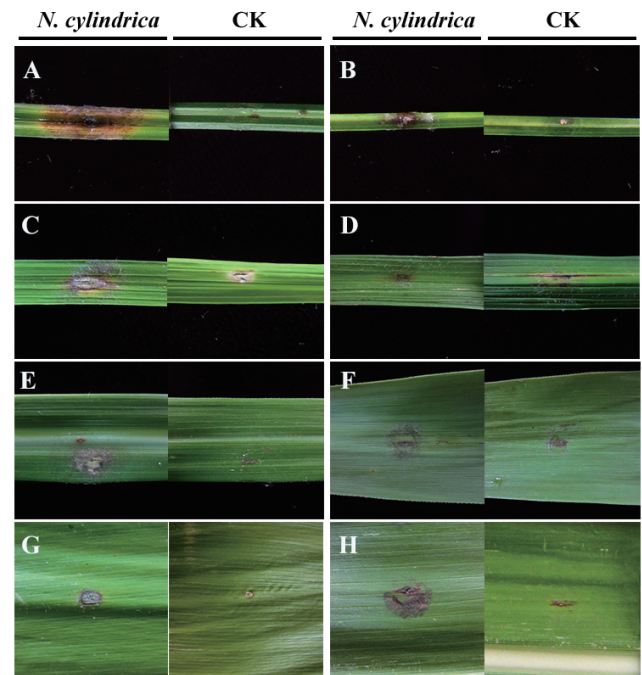
根據ITS及LSU序列資料進行親緣演化樹分析，結果顯示供試菌株與*Neottiosporina*屬最為接近。*Neottiosporina*屬為子囊菌門(Ascomycota)座囊菌綱(*Dothideomycetes*)格孢菌目(*Pleosporales*)之*Massarinaceae*科之一屬。*Massarinaceae*由Munk氏於1956年首次建立，當時依照形態將*Keissleriella* Höhn.、*Massarina* Sacc.、*Metasphaeria* Sacc.、*Pseudotrichia* Kirschst.以及*Trichometasphaeria* Munk.包含於此科⁽¹⁷⁾。在2009



圖四、溫度對病原菌生長、發芽及病斑發展之影響。(A)溫度對菌絲生長速度之影響；(B)溫度對孢子發芽之影響(8小時之結果)；(C、D)溫度對病斑發展之影響及各溫度下的接種病徵，字母標示為溫度對3菌株病斑發展之顯著分析。

Fig. 4. Effect of temperatures on vegetative growth, pycnidiospore germination and lesion size of brown spot of umbrella flat sedge caused by *Neottiosporina cylindrica* isolates MP1, CP2 and CP4. (A) Effect of temperatures on mycelium growth rate of *N. cylindrica* isolates MP1, CP2 and CP4; (B) Effect of temperatures on pycnidiospore germination of *N. cylindrica* isolates MP1, CP2 and CP4; (C, D) Effect of temperatures on lesion size of brown spot of umbrella flat sedge. Significance of temperatures on lesion size of 3 isolates were analyzed statistically. The same letters in (C) indicates no significant difference between temperatures.

年由Schoch氏等人藉由多基因親緣演化樹分析將*Massarinaceae* 視為單源群 (monophyly)⁽²⁸⁾。2013年Quaedvlieg氏等人將重要病原菌屬*Stagonospora*之模式種*S. paludosa*移入此科⁽²⁰⁾。2015年，Thambugala氏等人根據多篇多基因親緣演化樹分析與形態鑑定報告，認為*Aquaticheirospora* spp.、*Cheirosporium* spp.、*Corynespora* spp.、*Helminthosporium* spp.與*Neottiosporina* spp.皆屬於此科⁽³²⁾。*Neottiosporina* spp.於1961年由Subramanian氏首次報導*Neottiosporina apoda*，其主要特徵在於*Neottiosporina* spp.產生柄子殼 (pycnidia)，柄孢子 (pycnidiospores)頂端或基部具有膠狀、透明之附著物，可依此與其他相似的真菌分別⁽²²⁾。1974年則由Sutton氏對此屬真菌進行更多描述與介紹，該篇論文藉由形態特徵將*Stagonospora paspali*移轉為*Neottiosporina paspali*，並依照形態特徵增加此屬成員至6個種⁽²²⁾。之後Sutton氏等人分別於1976年、1985年以及1995年，描述了3種具有單隔柄孢子特徵的真菌並建立在此屬中，使*Neottiosporina*之柄孢子隔膜數由2-3個改為1-3個，形態上可與不具隔膜之*Tiarospora*屬相區別^(24, 26, 27)。



圖五、*Neottiosporina cylindrica*之寄主範圍測試與病徵。將待測植物以針穿刺製造傷口後，以*N. cylindrica*之菌絲塊接種，並以無菌之培養基作為對照組(CK)，接種5天後的發病情形。(A)土香；(B)短葉水蜈蚣；(C)水稻臺農67號；(D)水稻臺南11號；(E)五節芒；(F)蘆葦；(G)玉米；(H)白甘蔗。

Fig. 5. Host range assays of *Neottiosporina cylindrica* and induced symptoms. Tested plants were wounded and inoculated with either mycelial blocks of *N. cylindrica* or sterilized agar blocks (CK). Symptoms were photoed at 5 days post inoculation. (A) *Cyperus rotundus* L.; (B) *Kyllinga brevifolia* L.; (C) *Oryza sativa* L.cv. Tainung 67; (D) *O. sativa* L.cv. Tainan 11; (E) *Miscanthus floridulus* (Labill.) Warb. ex K. Schum. & Lauterb.; (F) *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steud.; (G) *Zea mays* L.; (H) *Saccharum sinense* Roxb.

本研究圖三的親緣演化數顯示輪傘莎草褐斑病菌與*N. paspali*最接近，但*N. paspali*之柄孢子具2個隔膜，明顯不同於褐斑病菌，因此比對Sutton氏等人所描述的3種具有單隔柄孢子特徵的*Neottiosporina*，分別為*N. masonii*、*N. cylindrica*、*N. sorghicola*。雖然以上3種形態相近而容易混淆，然而其仍舊具有可辨別的特徵，如*N. sorghicola*柄孢子為單隔、對稱，並具有microconidia⁽²⁷⁾，本研究分離菌株皆未觀察到microconidia，且柄孢子為不對稱分隔；而另外兩種形態上更為接近，主要差異在於*N. masonii*之柄子殼較大 ($\geq 300 \mu\text{m}$)，且柄孢子之特性為單隔，不對稱分隔，形狀為棍棒狀 (clavate)，產孢細胞細長、圓柱形 (cylindrical)⁽²⁴⁾；*N. cylindrica*之柄子殼約為135-270 μm 之間，柄孢子之特性為單隔，不對稱分隔，形狀為圓柱形，頂端具有扁平截形的特徵，產孢細胞則為瓶狀至桶狀⁽²⁶⁾。此外在寄主範圍方面，根據Sutton氏等人對*N. masonii*與*N. cylindrica*兩者之寄主描述，前者分離自加勒比松 (*Pinus caribaea* Morelet.)，

後者則來自短葉水蜈蚣。綜觀而言，本研究分離之菌株柄孢子、產孢細胞形態及柄子殼大小較接近*N. cylindrica*，分離寄主輪傘莎草之分類地位亦與短葉水蜈蚣較為接近。惟柄孢子頂端附著物之大小不相符，可能因本研究僅針對傘狀(umbraculiform)附著物進行量測，Sutton氏等人量測方法可能包含傘狀與非傘狀附著物，因此與本研究在大小上具有差異。此外於CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International) 資料庫紀錄中有1株*N. masonii*分離自土香，可惜的是該機構無活體菌株之保存，無法獲得分子資料進行比較。

褐斑病菌在孢子發芽與菌絲生長上皆於28°C為最佳，而於16-32°C範圍內皆可生長與發芽，病斑發展於20°C最為顯著，於16-32°C範圍內皆可使輪傘莎草葉片發病。值得注意的是病斑發展與最佳生長、孢子發芽溫度並不相一致，觀察發現在孢子發芽及生長最佳的28°C下，接種病斑外圍並無褪綠黃化的病徵，褪綠黃化的病徵可能源自於病原菌產生之毒素，因此推測*N. cylindrica*可產生毒素促進病斑發展，且毒素於不利於生長及發芽的溫度下產生較多。根據Venkatasubbaiah氏等人於1987年之報導，此類真菌普遍可產生6-methylsalicylic acid (6-MSA)與(+)-epoxydon毒素，此兩種毒素與褐化病斑的大小有密切的正向關係⁽³⁴⁾。此外，在小麥赤黴病菌產生deoxynivalenol真菌毒素的研究指出，*Fusarium graminearum*相較於在菌絲較易生長之pH7的培養基中，在pH3.5生長逆境的培養基中可誘導deoxynivalenol生合成基因較高量的表現⁽⁹⁾。推測在20°C對於病原菌而言為輕微的逆境環境，可能因此促進病原菌產生毒素，然而雖然16°C為更強的逆境，可能刺激較多毒素產生，但病原菌本身菌絲生長在此溫度下受抑制更顯著，因此無法觀察到更為嚴重的病徵，而32°C同為逆境環境，同樣刺激毒素產生，導致病斑發展大於28°C的病斑。然而毒素的產生與溫度之關係仍需試驗證明，方能支持以上之推測。

寄主範圍部分，根據前人所紀錄*Neottiosporina* spp.之分離寄主多為禾本科植物，且本屬皆為植物病原菌，如*N. australiensis*於蘆葦(*Phragmites australis*)、*N. infundibularis*於雙穗雀稗(*Paspalum distichum*)皆在葉片上造成病斑，其中僅有*N. cylindrica*寄主為莎草科之短葉水蜈蚣⁽²⁵⁾。然而本研究發現*N. cylindrica*亦可感染輪傘莎草與土香。國外對於田間雜草土香*C. rotundus* L.與黃土香*C. esculentus* L.目前紀錄葉部病害*Curvularia tuberculata* B.L. Jain.⁽⁵⁾、*C. oryzae* (S. Ito & Ishiy.) Hara.⁽⁵⁾、*Ascochyta cypericola* R.K. Upadhyay, Kenfield, Strobel & W.M. Hess.⁽³¹⁾、*Dactylaria higginsii* (Luttr.) M.B. Ellis.，其中較為特別的是*D. higginsii*之紀錄亦可感染短葉水蜈蚣*Kyllinga brevifolia* Rottb.，因其產孢量、保存效期與感染效率較佳，而能用作防治土香之生物製劑⁽¹⁸⁾，同理而言未來褐斑病菌可進行相關防治試驗，了解其是否具有生物製劑的功能。此外有趣的是，Richardson氏等人於2015年發表之報告中顯示，自美國白松(*Pinus strobus* L.)分離之葉片內生菌株經由LSU序列進行演

化樹分析，菌株自成一個支序群，具96%的bootstrap值，且最接近*Neottiosporina paspali*，雖該篇文章並未進行形態等其他鑑定方式確定該菌株之分類地位，卻提供了此屬真菌可為內生菌的可能性，並且與*N. masonii*先前所分離的寄主加勒比松(*Pinus caribaea* Morelet.)相互呼應⁽²¹⁾。為了解病原菌對單子葉作物之潛在威脅而進行的禾本科病原性試驗，接種結果發現僅在水稻臺農67號(*Oryza sativa* L.cv. Tainung 67)具有潛在的病原性，然而於水稻臺南11號(*O. sativa* L.cv. Tainan 11)卻無法觀察到同樣的病斑，此部分之差異可能來自於水稻品種的不同，或是接種材料的株齡不同，本次使用之水稻臺農67號為生長約1個月的幼苗，而臺南11號則為已結穗的植株，或許對於此病原而言，較適當的感染時機為幼苗期，此病原與植物在生態上交互作用仍需具備更多資料了解。

謝 辭

本研究承蒙教育部高教深耕計畫特色領域研究中心計畫永續農業創新發展中心經費補助得以順利完成，謹此致謝。作者之ORCID numbers: CLW (0000-0001-6262-9945); WHC (0000-0002-8517-6368)。

引用文獻

1. Alfieri Jr., S. A., Langdon, K. R., Wehlburg, C., and Kimbrough, J. W. 1984. Index of Plant Diseases in Florida (Revised). Florida Dept. Agric. and Consumer Serv., Div. Plant Ind. Bull. 11: 1-389.
2. Beck, J. J., and Ligon, J. M. 1995. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology* 85: 319-324.
3. Chen, T. S. and Hu, T. W. 1976. A list of Exotic Ornamental Plants in Taiwan. Taipei, Taiwan: Taiwan Forest Research Institute, Taipei, Taiwan. 618 pp. (In Chinese).
4. Crous, P. W., and Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 571 pages.
5. De Luna, L. Z., Watson, A. K., and Paulitz, T. C. 2002. Seedling blights of Cyperaceae weeds caused by *Curvularia tuberculata* and *C. oryzae*. *Biocontrol Sci. Techn.* 12: 165-172.
6. De Gruyter, J., Aveskamp, M. M., Woudenberg, J. H., Verkley, G. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycol. Res.* 113: 508-519.
7. De Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2013.

- Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in *Pleosporales*. *Stud. Mycol.* 75: 1-36.
8. Farr, D. F., and Rossman, A. Y. 2018. Fungal Databases. U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved July 9, 2018.
<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
 9. Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K., and Manners, J. M. 2009. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiol. Res.* 155: 3149-3156.
 10. Hoog, G. D., and Ende, A. H. G. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* 41: 183-189.
 11. Hsu S. T., Chang, T. T., Chang, C. A., Tsai, J. L., and Tsay, T. T. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. The Phytopathological Society of the Republic of China. (In Chinese). 386 pp.
 12. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. 1989. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. California, U.S.A. Academic Press. 482 pp.
 13. Koyama, T. 1978. *Cyperus*. 5: 270-271. in Flora of Taiwan Li H.-L. et al.(eds) Epoch Publishing Co., Ltd., Taipei, Taiwan. 1150 pp.
 14. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
 15. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
 16. Lopez, D., Ribeiro, S., Label, P., Fumanal, B., Venisse, J. S., Kohler, A., de Oliveira, R. R., Labutti, K., Lipzen, A., Lail, K., Bauer, D., Ohm, R. A., Barry, K. W., Saptafora, J., Grigoriev, I. V., Martin, F. M., and Pujade-Renaud, V. 2018. Genome-wide analysis of *Corynespora cassiicola* leaf fall disease putative effectors. *Front. Microbiol.* 9: 276.
 17. Munk, A. 1956. On *Metasphaeria coccodes* (Karst.) Sacc. and other fungi probably related to *Massarina* Sacc. (*Massarinaceae* n. fam.). *Friesia* 5: 303-308.
 18. Morales, P. J., Charudattan, R., and Stall, W. M. 2005. Fungi for biological control of weedy Cyperaceae, with emphasis on purple and yellow nutsedges (*Cyperus rotundus* and *C. esculentus*). *Outlooks Pest Manage.* 16: 148.
 19. Nguanhom, J., Cheewangkoon, R., Groenewald, J. Z., Braun, U., To-anun, C., and Crous, P. W. 2015. Taxonomy and phylogeny of *Cercospora* spp. from Northern Thailand. *Phytotaxa* 233: 27-48.
 20. Quaedy, W., Verkley, G. J. M., Shin, H. D., Barreto, R. W., Alfenas, A. C., Swart, W. J., Groenewald, and Crous, P. W. 2013. Sizing up *Septoria*. *Stud. Mycol.* 75: 307-390.
 21. Richardson, S. N., Nsiama, T. K., Walker, A. K., McMullin, D. R., and Miller, J. D. 2015. Antimicrobial dihydrobenzofurans and xanthenes from a foliar endophyte of *Pinus strobus*. *Phytochemistry* 117: 436-443.
 22. Subramanian, C. V. 1961. On some species of *Cyptostictis*. *Biol. Sci.* 27: 236-45.
 23. Sutton, B. C., and Alocorn, J. L. 1974. *Neottiosporina*. *Aust. J. Bot.* 22: 517-530.
 24. Sutton, B. C., and Marasas, W. F. O. 1976. Observation on *Neottiosporina* and *Tiarosporella*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 69-76.
 25. Sutton, B. C. 1980. The *Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, U.K. 696 pp.
 26. Sutton, B. C., and Alcorn, J. L. 1985. Undescribed species of *Crinitospora* gen. nov., *Massariothea Mycoleptodiscus* and *Neottiosporina* from Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 437-445.
 27. Sutton, B. C., and Wu, W. P. 1995. *Neottiosporina sorghicola* sp. nov., associated with leaf lesions on *Sorghum vulgare* from China. *Mycol. Res.* 99: 831-832.
 28. Schoch, C. L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Boehm, E. W. A., Burgess, T. I., de Gruyter, J., de Hoog, G. S., Dixon, L. J., Grube, M., Gueidan, C., Harada, Y., Hatakeyama, S., Hirayama, K., Hosoya, T., Huhndorf, S. M., Hyde, K. D., Jones, E. B. G., Kohlmeyer, J., Kruys, A., Li, Y. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Marvanová, L., Mbatchou, J. S., McVay, A. H., Miller, A. N., Mugambi, G. K., Muggia, L., Nelsen, M. P., Nelson, P., Owensby, C. A., Phillips, A. J. L., Phongpaichit, S., Pointing, S. B., Pujade-Renaud Raja, H. A., Rivas Plata, E., Robbertse, B., Ruibal, C., Sakayaroj, J., Sano, T., Selbmann Shearer, C. A., Shirouzu, T., Slippers, B., Suetrong, S., Tanaka, K., Volkmann-Kohlmeyer, B., Wingfield, M. J., Wood, A. R., Woudenberg, J. H. C., Yonezawa, H., Zhang, Y., and Sptafora, J. W. 2009. A class - wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Stud. Mycol.* 64: 1 - 15.
 29. Shao, K. T. 2009. Catalogue of life in Taiwan. Web electronic publication. version. <http://taibnet.sinica.edu.tw>.
 30. Thaug, M. M. 2008. Biodiversity survey of coelomycetes in Burma. *Australas. Mycol.* 27: 74-110.
 31. Trakunyingcharoen, T., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., To-anun, C., Alfenas, A. C., and Crous, P. W. 2014. Mycoparasitic species of *Sphaerellopsis*, and allied lichenicolous and other genera. *IMA fungus* 5: 391-414.
 32. Thambugala, K. M., Chunfang, Y., Camporesi, E., Bahkali, A. H., Liu, Z. Y., and Hyde, K. 2015. *Pseudodidymosphaeria* gen.

- nov. in Massarinaceae. Phytotaxa 231: 271-282.
33. Upadhyay, R. K., Kenfield, D., Strobel, G. A., and Hess, W. M. 1991. *Ascochyta cypericola* sp. nov. causing leaf blight of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). Can. J. Bot. 69: 797-802.
34. Venkatasubbaiah, P., Kohmoto, K., Otani, H., Hamasaki, T., Nakajima, H., and Hokama, K. 1987. Two phytotoxins from *Stagonospora sacchari* causing leaf scorch of sugarcane. Jpn. J. Phytopathol. 53: 335-344.
35. Voglmayr, H., and Jaklitsch, W. M. 2017. *Corynespora*, *Exosporium* and *Helminthosporium* revisited-New species and generic reclassification. Stud. Mycol. 87: 43-76.
36. Weng, S.H. 1999. A Taxonomic Study of *Cyperus* L. (Cyperaceae) in Taiwan. Master thesis. Hualien, Taiwan: National Hualien University of Education. (In Chinese).

Taiwan and of the brown spot disease on *C. involucratus* worldwide.

Keywords: *Cyperus involucratus* · *Neottiosporina cylindrica* ·
Cyperaceae · Brown spot

ABSTRACT

Tsai, C. Y., Huang Y. C., Chung W. H. and Wang, C. L.*. 2019. Brown spot of *Cyperus involucratus* caused by *Neottiosporina cylindrica*. J. Plant Med. 61(1): 19-28.

*Corresponding author, Wang, C. L., clwang@nchu.edu.tw

In 2017 and 2018, brown spots of umbrella flat sedge (*Cyperus involucratus* Rottb.) were observed in both Chenghua and Miaoli counties, central Taiwan. Brown spots on leaves are necrotic lesion with cracked and white epidermis in center. Severe damages caused chlorotic and dry-out leaves, and even collapsed entire canopy. Pathogenicity of fungal isolates that were isolated from diseased leaves was verified by the Koch's postulates. Pathogens formed numerous black pycnidia on pieces of sterilized sedges leaf laid on PDA. Pycnidiospores were asymmetrically 1-eusptate, cylindrical, hyaline, with apical appendages mostly in umbraculiform. Phylogenetic analysis based on concatenated sequences of ITS and LSU revealed that the isolates belonged to the genus of *Neottiosporina*. According to the morphological characteristics, the isolates were identified as *Neottiosporina cylindrica* B. Sutton & Alcorn. The effects of environmental temperatures on the pathogens and the disease were further assessed. The optimum temperatures for mycelial growth and pycnidiospore germination were 28°C, while the optimum temperature for disease development was 20°C. Host range assays indicated that the pathogens were potentially pathogenic to green kyllinga (*Kyllinga brevifolia*), purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) and rice Tainung No. 67 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung No.67), but not to tested other staple crops (including *O. sativa* L.cv. Tainan 11). To our knowledge, this is the first report of the fungus in