

# 過氧化氫對灰黴病菌侵染百合過程之影響

劉益宏<sup>1</sup> 黃健瑞<sup>1</sup> 楊耿豪<sup>1</sup> 陳昭瑩<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>國立臺灣大學植物病理與微生物學系

<sup>2</sup>聯絡作者，電子郵件：cychen@ntu.edu.tw

接受日期：中華民國 97 年 8 月 28 日

## 摘要

劉益宏、黃健瑞、楊耿豪、陳昭瑩. 2008. 過氧化氫對灰黴病菌侵染百合過程之影響. 植病會刊 17: 307-314.

百合灰黴病菌 [*Botrytis elliptica* (Berk.) Cooke] 為壞疽型植物病原真菌，感染百合葉片，引起壞疽病斑，病斑上可見灰黴病菌之生長菌絲；以灰黴病菌接種葵百合葉片，被感染部位出現褐化斑點，於顯微鏡下可見侵入點周圍細胞有褐化現象，並累積過氧化氫。生體外試驗指出，過氧化氫濃度高達 0.7 mM 時，對灰黴病菌孢子發芽仍無明顯抑制作用；過氧化氫濃度不超過 0.9 mM 時，不會抑制菌絲生長，甚至有助於菌絲的生長。以添加過氧化氫之灰黴病菌孢子懸浮液接種於葵百合葉片時，可增加發病嚴重度；反之，以 diphenylene iodonium 預先處理百合葉片，可抑制過氧化氫的累積，並降低發病嚴重度，顯示過氧化氫為灰黴病菌侵染百合之促進因子。此外，本研究突破厚質葉片之組織透化瓶頸，得以觀察葵百合葉片之過氧化氫累積情形。

關鍵詞：過氧化氫、灰黴病菌、百合

## 緒言

在植物與病原交互作用之初期，病原可否成功感染植物，決定於植物本身是否能快速且正確地產生相關的防禦訊息，誘發適當的防禦反應，如植物活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) 的產生、過敏性反應 (hypersensitive response, HR) 的表現、二次代謝物及病程相關蛋白質 (pathogenesis-related proteins) 的產生等，以阻礙病原的入侵。

植物通常在進行光合作用、光呼吸反應或電子傳遞鏈之氧解離時，大量產生 ROS，累積於過氧化氫體。在正常情況之下，ROS 可被抗氧化酵素或是經由其他非酵素路徑所代謝，以達到平衡的狀態<sup>(1)</sup>。然而植物在自然環境中受到冷、乾旱、紫外線照射及植物病原危害時，會促使 ROS 快速增加，無法即時恢復平衡狀態，造成植物細胞快速氧化、脂質及蛋白質破壞、細胞死亡、壞疽型斑點形成等<sup>(11,13)</sup>。

植物之 ROS 代謝反應、過敏性反應，終致植物細胞死亡，為阻礙生物型病原 (biotrophic pathogens) 入侵的重要因子<sup>(7,15)</sup>，如在番茄與葉黴病菌之試驗已得到證實，當病原菌侵入時，植物之過氧化氫生合成增加，

使病原菌不易侵入<sup>(2)</sup>。對於壞疽型病原 (necrotrophic pathogens) 而言，植物之感染點產生大量過氧化氫，表現過敏性反應，反而有助於病原之成功感染<sup>(8)</sup>。過去一些研究已證明 ROS 增加與過敏性反應與病原感染植物之關係，如在煙草上接種植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (strain NPS3121)，可誘發煙草產生過敏性細胞死亡 (HR-cell death)，且 NPS3121 菌株可以成功感染煙草；若利用 diphenylene iodonium (DPI, inhibitor of ROS production) 處理煙草，再接種 NPS3121 菌株，會減緩病害發生的嚴重度，說明了植物產生 ROS 與壞疽型病原侵染植物有密切的關係<sup>(14)</sup>。另外，灰黴病菌 (*Botrytis cinerea* Pers. : Fr.) 在感染寄主植物時會誘發 ROS 增加，於感染點處累積大量過氧化氫，加速 *B. cinerea* 之感染<sup>(22)</sup>；當 ROS 的產生被抑制時，*B. cinerea* 即不能在寄主上造成嚴重的危害<sup>(8,19)</sup>。

百合灰黴病菌 (*Botrytis elliptica* (Berk.) Cooke) 與 *B. cinerea* 同為壞疽型植物病原菌，在侵染植物時會分泌細胞壁分解酵素或毒質，將植物細胞殺死，再從植物上得到生存所須的養分，為此等植物病原菌之重要特性。*B. elliptica* 為百合之重要病原，感染百合時，於

葉片及花上造成病徵，初期產生水浸狀的斑點，逐漸擴大並褐化，形成褐色或銹色之圓形或橢圓形病斑，嚴重時全株葉枯<sup>(3, 4, 9)</sup>。*B. elliptica* 侵染百合時，其侵入點及周圍細胞可分別以 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate 與 4'-amino-5-methylamino-2', 7'-difluoro-fluorescein diacetate 螢光染劑偵測到過氧化氫及一氧化氮的累積；百合可經由鈣離子湧入 (calcium flux)、鞘磷脂 (sphingolipid) 代謝、一氧化氮 (nitrous oxide) 及氧化物 (oxidate) 訊息作用等，導致程序性的細胞死亡，表現 HR<sup>(20)</sup>。

在本研究中，觀察過氧化氫對 *B. elliptica* 侵染百合之影響，探討過氧化氫對 *B. elliptica* 成功感染百合之作用，以掌握百合灰黴病發病過程及病理機制之重要資訊。

## 材料與方法

### 供試植物及菌株

將市售葵百合 (*Lilium* 'Star Gazer') 種球浸泡於 1% 次氯酸鈉 10 分鐘，表面消毒後種植於栽培介質 (珍珠石：泥炭土=1:3) 中，於相對濕度 70-80% 及每日光照 12 小時的溫室 (20-23°C) 中種植 30 天後 (株高約 45-55 公分)，供接種試驗使用。

灰黴病菌菌株 *B. elliptica* B061 及 *B. cinerea* B071 為謝廷芳博士提供，分別培養於 V-8 培養基 (20% V-8 juice, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, 1.5% Bacto agar) 及馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (PDA, Difco)，於室溫 (23-25°C) 下培養 5-7 天後，供作菌絲接種源，或以無菌水洗下孢子，利用血球計數器估計孢子數，調整濃度至每毫升孢子懸浮液含有 5 × 10<sup>4</sup> 個孢子，供接種使用。

### Trypan blue 染色及鏡檢

參照 Zimmerli 等人的方法<sup>(23)</sup>，將接種 *B. elliptica* 之百合葉片，浸於 95% 酒精中，於 100°C 水浴中隔水加熱以加速退去葉綠素，之後再浸於 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 中，以去除葉肉細胞，使葉片透化。經此透化處理之葵百合葉片以蒸餾水小心沖洗 5 分鐘，再以 0.01% trypan blue (Sigma, USA) /lactophenol 浸染 3 秒左右，於光學顯微鏡 (Leica DMR, Wetzlar, Germany) 下檢視葉片及病原之狀況。

### 百合葉之 DAB 染色

以 DAB (3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride, Sigma, USA) 染色觀察葵百合葉片過氧化氫累積情形，

由 Thordal-Christensen 等人的方法<sup>(18)</sup> 改良，將接種 *B. elliptica* 之葵百合葉片，直接浸泡於 DAB 溶液 (2 mg/ml) 中約 12-16 小時後，浸於 95% 酒精並隔水加熱以加速除去葉綠素，再浸泡於 1% SDS 溶液中，此時葉片呈透明狀，於光學顯微鏡 (Leica DMR, Wetzlar, Germany) 下觀察，累積過氧化氫的植物細胞會呈現紅色。

### 灰黴病菌對過氧化氫之感受性試驗

參考 Schouten 等人的方法<sup>(17)</sup>，並加以修飾。取不同量之 30% 過氧化氫 (Nacalai Tesque, Inc, Japan, 0.88 M) 放入無菌 V-8 培養基 (約 30-40°C)，使 V-8 培養基含有過氧化氫之終濃度為 0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9 及 1.9 mM。將 0.5 × 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的灰黴病菌菌絲塊置於平板中央，於室溫下培養 3 天後量測菌落大小。另外，將灰黴病菌之孢子懸浮液，與過氧化氫溶液混合，過氧化氫之終濃度為 0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9 及 1.9 mM，於室溫下培養 12 小時，於光學顯微鏡 (Leica DMR, Wetzlar, Germany) 下計數 100 個孢子的發芽率，各處理 3 重複，試驗重複 2 次。

### 過氧化氫及 DPI 處理對 *B. elliptica* 感染百合之影響試驗

為觀察植物體內過氧化氫對灰黴病菌侵染植物之影響，分別以 0.68% 過氧化氫及 10 μM DPI (diphenylene iodonium (Sigma, USA) 溶於 0.05% dimethyl sulfoxide, DMSO)<sup>(2)</sup> 處理葵百合葉片 2 小時後，接種分生孢子懸浮液 (每毫升 5 × 10<sup>4</sup> 個分生孢子) 於葉背，直接觀察或經 95% 酒精隔水加熱後，浸泡 1% SDS 溶液，再放置於 80°C 烘箱 12 小時以上，直至葉片完全透化後觀察，比較壞疽病斑的情形形成。

### 百合葉過氧化氫之萃取與定量

植物體內過氧化氫之萃取參考 Jana 和 Choudhuri 的方法<sup>(10)</sup>，將約 6 公克百合葉片放入研鉢中，加入液態氮研磨成粉末，再加入 24 毫升緩衝液 (50 mM phosphate buffer, pH 6.5, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazole)，將樣品置於 50 毫升離心管 (Labcon Inc.) 中，以 6,000 ×g 離心 (MRX-152, Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo, Japan) 25 分鐘。取出約 25 毫升上清液與 8 毫升 0.1% titanium sulfate solution (in 20% sulfuric acid) 混合，於 6,000 ×g 及 4°C 低溫下離心 (MRX-152, Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo, Japan) 15 分鐘，取出 1 毫升上清液測定吸光值 (OD<sub>410</sub>) (Spectrophotometer microplate reader, SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale,.

CA, USA)。每處理 2 棵植株，每株 7 片百合葉，比較處理間過氧化氫定量數據的差異，試驗重複 2 次。

## 結 果

### *B. elliptica* 侵染百合葉片之觀察

於萎百合葉上接種 *B. elliptica* 24 小時後，經組織透化及 trypan blue 染色，可見 *B. elliptica* 順利侵入，並造成侵入點周圍之植物細胞褐化（圖一、A）；接種後 72 小時可見壞疽病斑，於光學顯微鏡下觀察，除了褐化之植物細胞還可見到 *B. elliptica* 之生長菌絲（圖一、B）。

### 百合受 *B. elliptica* 感染累積過氧化氫之觀察

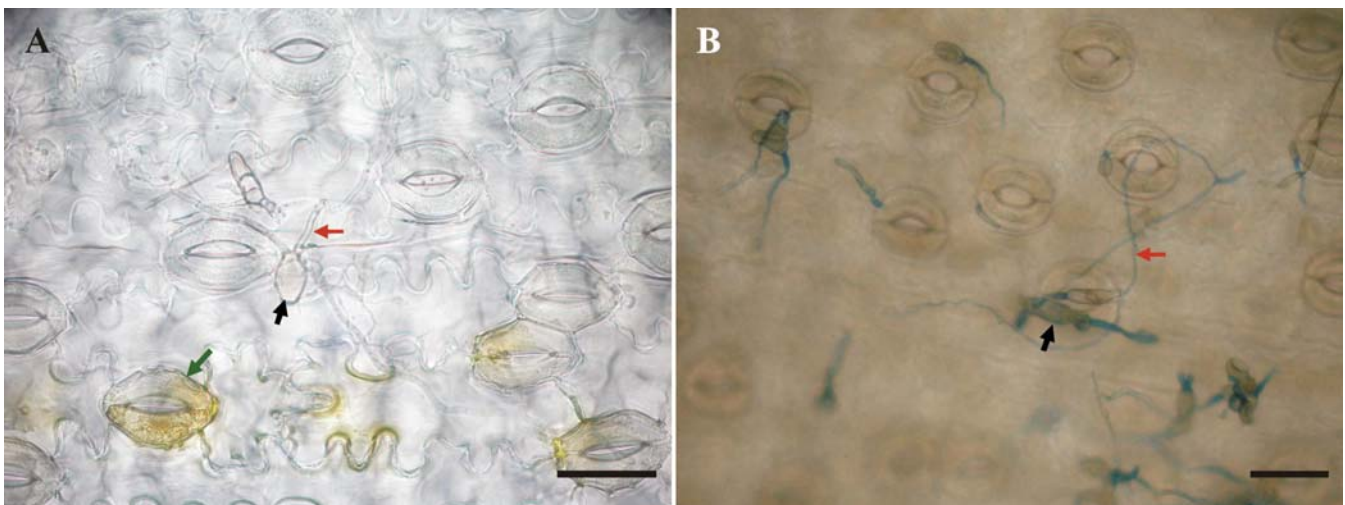
以組織透化方式比較罹病萎百合葉片與僅處理水之對照組（圖二、A）在細胞褐化上之差異，發現接種 *B. elliptica* 24 小時後之百合葉片，出現明顯的褐色斑點（圖二、B），於顯微鏡下觀察，可見 *B. elliptica* 侵染點周圍的植物細胞呈現褐化（圖二、C）。利用 DAB 與過氧化氫反應時會使植物細胞呈現紅褐色，比較受 *B. elliptica* 感染的百合葉片與僅處理水之對照組（圖二、D）在呈色反應上之差異，結果發現接種 *B. elliptica* 24 小時後之百合葉片，可觀察到明顯的褐化斑點（圖二、E），於顯微鏡下可見到 *B. elliptica* 侵染部位及周圍細胞呈現紅褐色，表示有過氧化氫之累積（圖二、F）。

### *B. elliptica* 對過氧化氫之耐受性

利用 V-8 培養基添加不同濃度過氧化氫，模擬植物體內過氧化氫的含量，探討 *B. elliptica* 對植物體累積過氧化氫的反應。試驗結果指出 0.03-0.7 mM 濃度之過氧化氫對 *B. elliptica* 孢子發芽並無影響，但當過氧化氫濃度增加至 0.9 mM 以上時，孢子發芽開始有明顯受到抑制的現象，過氧化氫濃度增加至 1.9 mM 時，孢子發芽率僅有 20% 左右（圖三、A）。觀察 *B. elliptica* 培養 3 天之菌絲生長情形，顯示培養基含 0.03-0.4 mM 之過氧化氫時，*B. elliptica* 之菌絲生長率隨著過氧化氫濃度增加而增加，添加 0.4 mM 過氧化氫時，菌落半徑達 2.4 公分；過氧化氫濃度增至 0.7 mM 時，菌落半徑仍可維持 2.0 公分。當過氧化氫濃度增至 0.9 mM 時，菌絲生長則明顯降低，但菌落半徑仍較對照組大；然而過氧化氫濃度增加至 1.9 mM 時，菌絲生長即停止。此結果指出 *B. elliptica* 對過氧化氫具有耐受性，適量的過氧化氫不會影響 *B. elliptica* 孢子發芽且有助於 *B. elliptica* 菌絲的生長。

### 過氧化氫對 *B. elliptica* 侵染百合有促進之作用

以 *B. elliptica* 孢子懸浮液噴佈萎百合葉背，與對照組（圖四、A, A-1）比較病徵之發展，以肉眼觀察或將葉片透化後觀察。接種 *B. elliptica* 之後 3 天的百合葉片呈現褐化病斑（圖四、B, B-1），若以 0.2 mM 過氧化氫與 *B. elliptica* 孢子懸浮液混合，接種 3 天後，百合葉片出現水浸狀病斑（圖四、C, C-1），發病程度比沒



圖一、*Botrytis elliptica* 侵染百合葉片之觀察。

Fig. 1. Induction of cell death (necrosis) by *Botrytis elliptica* on lily leaves. Trypan blue staining revealed that *B. elliptica*-infected leaves showed dead cells (green arrow) near penetration sites 24 hr after inoculation (A) and colonization by *B. elliptica* on necrotic lesions on the leaves as that shown at 72 hr after inoculation (B). Germinated spores (black arrow) and penetrating or invading hyphae (red arrow) were observed on the leaves. Bar = 50  $\mu$ m.

有添加過氧化氫時嚴重；當以 DPI 預先處理百合葉片 2 小時，再接種 *B. elliptica* 3 天後所造成的病斑嚴重度 (圖四、D, D-1) 明顯地較單獨接種 *B. elliptica* 時為低，顯示過氧化氫對 *B. elliptica* 侵染百合有促進的作用。

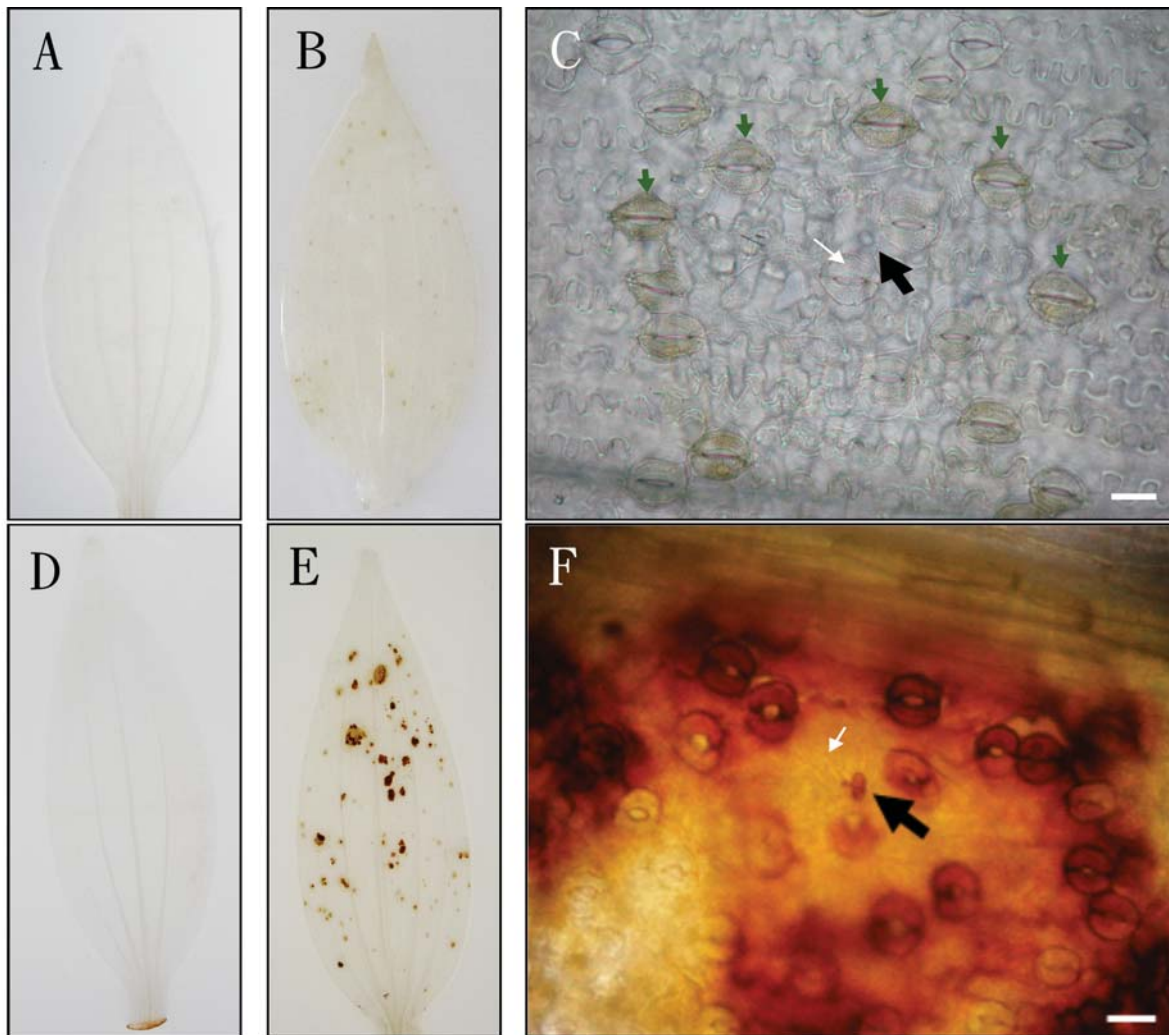
### 百合受 *B. elliptica* 感染後之過氧化氫含量變化及 DPI 之作用

與對照組比較，萎百合葉片受 *B. elliptica* 感染時組織內的過氧化氫含量快速且大量地增加。在接種後 12 小時，過氧化氫之偵測量高達 0.7 mM；接種後 18 小時，過氧化氫之偵測量為 0.8 mM (圖五)。另一方面，以 DPI 處理萎百合葉片，可降低葉片之過氧化氫含量；若預先處理 DPI 2 小時後再接種 *B. elliptica* 時，

在單獨接種 *B. elliptica* 時明顯增加過氧化氫含量之時間點，百合葉片維持低的過氧化氫含量 (圖五)，顯示以 DPI 預先處理百合，可以抑制病原接種所造成的過氧化氫含量提升。

### 討 論

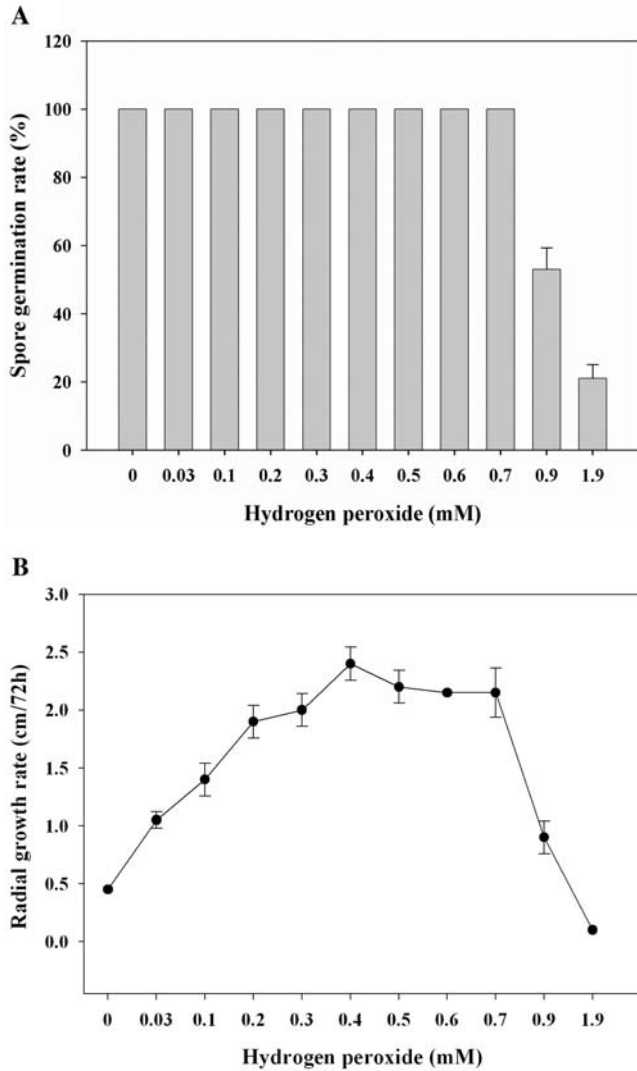
於灰黴病菌侵入植物組織之過程中，已知其可分泌多種酵素，以瓦解植物細胞壁，並將植物細胞殺死以取得病原菌生存所須的養分；此類病原菌在感染寄主植物之初期，會誘發寄主組織之 ROS 增加，造成寄主細胞累積大量過氧化氫，導致寄主植物細胞快速死亡<sup>(20, 22)</sup>。本研究，由人工接種下檢視 *B. elliptica* 侵染



圖二、灰黴病菌感染百合造成過氧化氫累積情形。

Fig. 2.  $H_2O_2$  accumulation caused by *Botrytis elliptica* infection on lily leaves. Control, water treatment on lily leaves before (A) and after DAB staining (D). *B. elliptica*-infected leaf showed necrotic lesions on the inoculation sites (B) and dead cells (green arrows) around infection sites 24 hr after inoculation (C). DAB staining revealed  $H_2O_2$  accumulation in *B. elliptica*-infected lily leaf which showed necrotic lesions (E) and dead cells around inoculation sites (F). Germinated spores (black arrow) and penetrating hyphae (white arrow) were observed. Bar = 50  $\mu m$ .

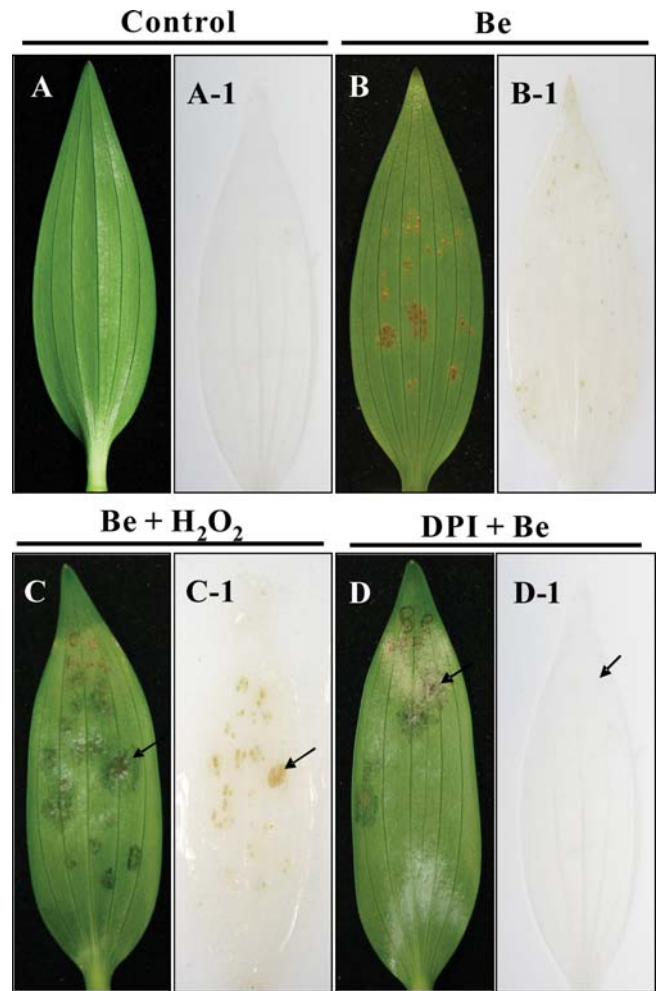
藥百合的過程，也證實其可在感染點上造成壞疽病斑(圖一)，同時有過氧化氫的累積(圖二)，此結果指出 *B. elliptica* 對過氧化氫具有耐受性；另由添加過氧化氫可以促進 *B. elliptica* 之菌絲生長(圖三、B)，及在高達 0.7 mM 之過氧化氫濃度下對孢子發芽未見抑制作用(圖三、A)，亦同樣地反映 *B. elliptica* 對過氧化氫具有耐受性的特質。



圖三、過氧化氫對於百合灰黴病菌菌絲生長及孢子發芽之影響。

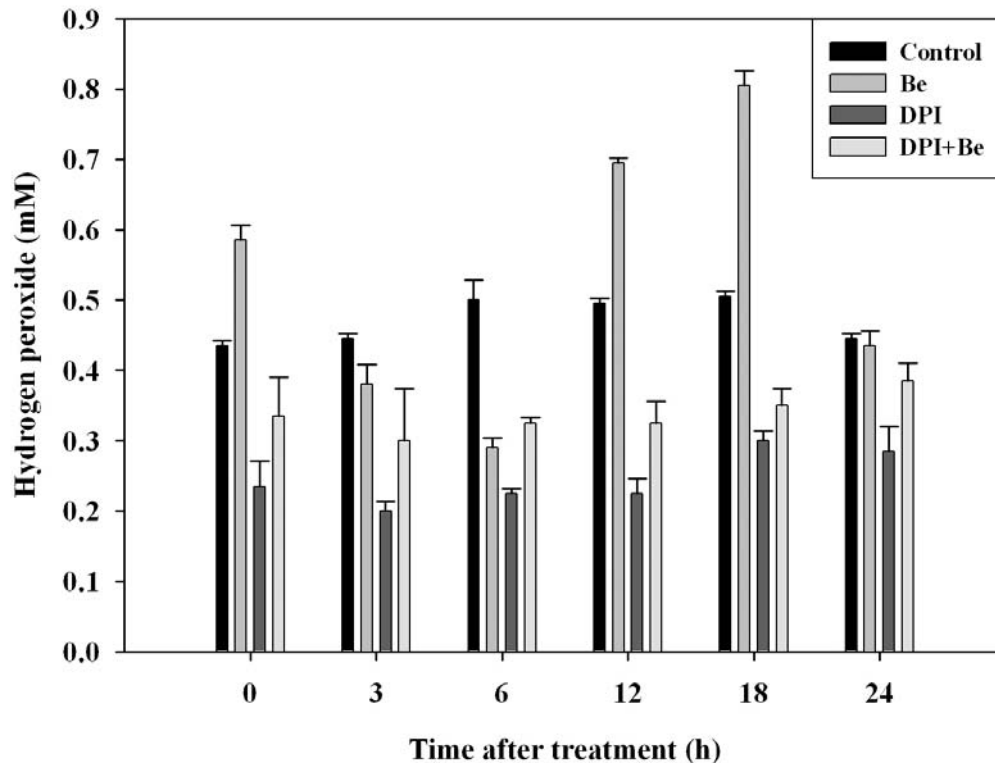
Fig. 3. Effect of  $H_2O_2$  on spore germination and mycelial growth of *Botrytis elliptica*. Spore suspensions of *B. elliptica* ( $10^5$  conidia/ml) were mixed with equivalent amount of different concentrations of  $H_2O_2$  solution (final concentrations indicated); spore germination rates were recorded 24 hr after incubation (A). Mycelial disc of *B. elliptica* was placed on the center of V-8 agar and incubated at 23-25°C. The diameters of colonies were recorded 3 days after inoculation (B). The error bars represent the standard error of the mean.

Gil-ad (2000) 指出 *B. cinerea* 可分泌多種酵素以分解過氧化氫，其中包括了產生過氧化氫酶 (catalase, CAT)，可快速將過氧化氫分解為氧及水<sup>(5)</sup>。於番茄與 *B. cinerea* 的交互作用中，Van der Vlugt-Bergmans 等人 (1997) 證實，將失去 *cat* 基因的 *B. cinerea* 突變株接種於番茄時，突變株無法在番茄上建立族群及成功感染，可能即是因 *B. cinerea* 失去分泌過氧化氫酶的能力，無法抵抗植物之氧化逆境 (oxidative stress)，因而失去在番茄上存活的能力<sup>(21)</sup>。Schouten 等人 (2002) 亦指出 *B. cinerea* 產生 CAT 的能力，主要以保護自身以



圖四、以 DPI 降低過氧化氫含量可抑制百合灰黴病之發病嚴重度。

Fig. 4.  $H_2O_2$  suppression by DPI against *Botrytis* leaf blight of lily. Control, water treatment on lily leaves (A, A-1) showed no symptom. *B. elliptica* (B, B-1) and *B. elliptica* +  $H_2O_2$  (0.2 mM) (C, C-1)-inoculated leaves showed necrotic lesions 3 days after inoculation. DPI-treated lily leaf showed less symptom development (D, D-1) than that without DPI pretreatment 3 days after inoculation. The leaves of A-1, B-1, C-1, and D-1 were cleared with 1% SDS solution before observation.



圖五、百合預先處理 DPI 對灰黴病菌感染後過氧化氫含量增加之影響。

Fig. 5. Effect of pretreatment of DPI on accumulation of  $H_2O_2$  in lily leaves after *B. elliptica* infection. Control, water treatment on lily leaves; Be, *B. elliptica*-inoculated leaves; DPI, DPI-treated leaves; DPI+Be, *B. elliptica*-inoculation on DPI-treated leaves. The leaves were homogenized and performed  $H_2O_2$  extraction. The amount of  $H_2O_2$  was assayed by spectrophotometer at  $OD_{410}$ . The error bars represent the standard error of the mean of  $H_2O_2$  concentration.

免在侵染植物後受高量過氧化氫的危害，故過氧化氫含量增加並不會抑制灰黴病菌的感染<sup>(17)</sup>。過氧化氫酶亦與 *B. cinerea* 對殺菌劑造成氧化逆境之抗性有關，Lee 等人利用對屬於 dicarboximide 類農藥依普同 (iprodione) 敏感的 *B. cinerea* 菌株及抗依普同的菌株進行試驗，發現過氧化氫酶及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性較高為抗依普同之 *B. cinerea* 菌株有較高殺菌劑抗性之主要原因<sup>(12)</sup>。還有其他酵素可分解過氧化氫，使 *B. cinerea* 可於高濃度過氧化氫下存活，如有報告指出 *B. cinerea* 可釋放過氧化酶 (peroxidases)，分解過氧化氫，故可於含有 180 mM 過氧化氫的情況之下發芽並生長<sup>(6)</sup>。由此可知 *B. cinerea* 之所以能存活於累積過氧化氫的植物環境，與其抗氧化的能力有密切的關係，推測 *B. elliptica* 亦具有類似之抗氧化能力。

圖四的結果指出以 0.2 mM 過氧化氫與 *B. elliptica* 孢子懸浮液混合，接種於葵百合葉片，會加速灰黴病發病嚴重度，且觀察到灰黴病菌菌絲在壞疽病斑上纏據。反之，預先於葵百合葉片處理 DPI，可降低因接種 *B. elliptica* 造成過氧化氫累積的量，並可降低灰黴

病的發病嚴重度，顯示過氧化氫可影響百合受 *B. elliptica* 感染的程度。同為壞疽型病原之 *B. cinerea* 與植物的交互作用中，過氧化氫已被證實有助於 *B. cinerea* 感染大豆葉片，當大豆葉片大量累積 ROS 時，確實可以加速並加劇 *B. cinerea* 之危害<sup>(16, 19, 22)</sup>。

圖五的結果指出接種 *B. elliptica* 於百合葉片 0、12 及 18 小時後，百合過氧化氫累積量比對照組高，然而接種 *B. elliptica* 於百合葉片後 3、6 及 24 小時，百合葉片過氧化氫累積量比對照組低，推測 *B. elliptica* 可能與 *B. cinerea* 相似，具有去毒化的能力以保護自身，使之在處於高量過氧化氫的環境得以存活<sup>(17)</sup>。

綜合上述結果，本研究已證實罹病組織之過氧化氫累積為百合受 *B. elliptica* 感染的反應之一，且有助於 *B. elliptica* 侵染百合，進一步探討過氧化氫在百合抗感病反應中所扮演的角色，應有助於本病之防治管理施作。

## 謝辭

本研究承國科會經費補助，特以致謝。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-99.
2. Borden, S., and Higgins, V. J. 2002. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defense response of tomato to *Cladisporium fulvum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61:227-336.
3. Doss, R. P., Chastagner, G. A., and Riley, K. L. 1984. Techniques for inoculum production and inoculation of lily leaves with *Botrytis elliptica*. *Plant Dis.* 68: 854-856.
4. Doss, R. P., Christian, J. K., and Chastagner, G. A. 1988. Infection of Easter lily leaves from conidia *Botrytis elliptica*. *Can. J. Bot.* 66:1204-1208.
5. Gil-ad, N. L., Bar-Nun, N., Noy, T., and Mayer, A. M. 2000. Enzymes of *Botrytis cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol. Lett.* 190:121-126.
6. Gil-ad, N. L., and Mayer, A. M. 1999. Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 176:455-461.
7. Gilchrist, D. G. 1998. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:393-414.
8. Govrin, E. M., and Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10: 751-757.
9. Hsieh, T. F., and Tu, C. C. 1993. The occurrence of lily leaf blight caused by *Botrytis elliptica* (Berk.) Cooke in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 35:355. (Chinese abstract)
10. Jana, S., and Choudhuri, M. A. 1982. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquat. Bot.* 12:345-354.
11. Lamb, C., and Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:251-275.
12. Lee, H. J., Choi, G. J., and Cho, K. Y. 1998. Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity. *J. Agric. Food Chem.* 46:737-741.
13. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
14. Mittler, R., Herr, E. H., Orvar, B. L., van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D., and Ellis, B. E. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14165-14170.
15. Piffanelli, P., Devoto, A., and Schulze-Lefert, P. 1999. Defence signaling pathways in cereals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:295-300.
16. Schumacher, J., de Larrinoa, I. F., and Tudzynski, B. 2008. The calcineurin- responsive zinc finger transcription factor CRZ1/'CRaZy' of *Botrytis cinerea* is required for growth, development and full virulence on bean plants. *Eukaryot. Cell* 7:584-601.
17. Schouten, A., Tenberge, K. B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B., and van Kan, J. A. L. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 3:227-238.
18. Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D. B. 1997. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11:1187-1194.
19. Unger, C., Kleta, S., Jandl, G., and Tiedemann, A. V. 2005. Suppression of the defence-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 153:15-26.
20. Van Baarlen, P., Staats, M., and van Kan, J. A. L. 2004. Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Mol. Plant Pathol.* 5: 559-574.
21. Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Wagemakers, C. A. M., Dees, D. C. T., and van Kan, J.A.L. 1997. Catalase A from *Botrytis cinerea* is not expressed during infection on tomato leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:1-15.
22. Von Tiedemann, A. 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:151-166.
23. Zimmerli, L., Métraux, J. P., and Mauch-Mani, B. 2001.  $\beta$ -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 126:517-523.

## ABSTRACT

Liu, Y. H., Huang, C. J., Yang, K. H., and Chen, C. Y. 2008. Effect of hydrogen peroxide on infection of lily by *Botrytis elliptica*. 17: 307-314. (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup>Corresponding author, E-mail: cychen@ntu.edu.tw)

*Botrytis elliptica* (Berk.) Cooke, a pathogenic fungus of necrotrophic type, causes necrotic lesions on lily leaves and is able to grow on necrotic lesions. When the leaves of Oriental lily cv. Star Gazer were inoculated with *B. elliptica*, brown spots were observed at the inoculation sites and brown cells appeared around the infection sites. Although hydrogen peroxide accumulated in lily leaves after *B. elliptica* infection, it did not retard the fungal growth. *In vitro* assays showed that hydrogen peroxide did not inhibit spore germination at a concentration of 0.7 mM or less and it did not inhibit mycelial growth at a concentration below 0.9 mM; moreover, enhancement of mycelial growth was observed. In addition, when hydrogen peroxide was added in the inoculation fluid of *B. elliptica*, symptom became severer than when inoculation was done singly with *B. elliptica*. Pretreatment of diphenylene iodonium inhibited accumulation of hydrogen peroxide and reduced the disease severity, indicating the role of hydrogen peroxide as an enhancing factor for *B. elliptica* infection. In this study, a difficulty of clearing the thick leaves had been resolved to examine the accumulation of hydrogen peroxide in the leaves of lily cv. Star Gazer.

Key words: hydrogen peroxide, *Botrytis elliptica*, lily