

# 溫度、水分潛勢及光照對灰黴病菌 *Botrytis elliptica* 及 *B. cinerea* 之孢子與菌核發芽、菌絲生長、產胞及菌核形成之影響

陳隆鐘<sup>1,2</sup> 陳天枝<sup>1</sup> 鍾依紋<sup>1</sup>

1. 台中市 國立中興大學植物病理學系

2. 聯絡作者：電子郵件 lcchen@dragon.nchu.edu.tw；傳真 04-2857990

接受日期：中華民國 87 年 11 月 30 日

## 摘 要

陳隆鐘、陳天枝、鍾依紋. 1998. 溫度、水分潛勢及光照對灰黴病菌 *Botrytis elliptica* 及 *B. cinerea* 之孢子與菌核發芽、菌絲生長、產胞及菌核形成之影響. 植病會刊 7:167-176.

*Botrytis elliptica* 之菌絲生長最適溫度為 20 C，菌核產生適合溫度為 8~20 C；菌核在 8~28 C 均可發芽生長，發芽率在各溫度間無明顯差異。菌核再形成數量則以 12 C 最多，28 C 則無菌核再形成。產胞適溫為 12~20 C，孢子在 8~28 C 下 8 小時，有 90% 以上之發芽率，發芽管長度在 20~24 C 時較長，在 32 C 時孢子發芽被抑制。*B. elliptica* 於水分潛勢 -7.3 bar ~ -70 bar 均能生長，最適水分潛勢為 -31 bar。在 12 小時之日夜 (34/24 C) 溫差培養，菌核之發芽率不受影響，但對於菌絲生長則有明顯之抑制，培養一個月後亦無菌核與孢子產生，但將其再放置 20 C 定溫培養，菌絲可恢復生長。而 *B. cinerea* 對照菌株則和上述結果略有有差異。本研究中所見溫度、水分潛勢及光照對供試灰黴病菌發芽、生長、產胞及菌核形成之影響，與灰黴病菌引起之病害調查，於低溫高濕之冬春季發生嚴重的現象極為吻合。

關鍵詞：灰黴病菌、菌絲生長、產胞、菌核形成

## 緒 言

目前已知 *Botrytis* 屬共包含 22 種，在台灣為害較嚴重者計有三種，分別為 *B. cinerea* Pers. ex Fr.、*B. gladiolorum* Timmermans 及 *B. elliptica* (Berk.) Cook。其中 *B. cinerea* 最為普遍，常見之灰黴病多半為此病原菌所引起；唐菖蒲灰黴病則由 *B. gladiolorum* 引起，但 *B. cinerea* 亦可感染，唯所產生的病斑稍有不同，至於百合灰黴病則由 *B. elliptica* 所引起 (3)。由於球根花卉為進口花卉之大宗，且為切花類近年來消費市場導向之主流，尤以顏色多、種類全、花型完整及壽命長之百合類花卉發展最快，百合切花目前是一種高投資、高報酬、高冒險的產業。臺灣種植面積及產量快速成長，產值在切花類僅次於火鶴花排行第二 (1)，因此百合栽培已成為目前重要農產品之產業。由於百合植株栽培生長適合的低溫高濕的栽培環境正為灰黴病菌最適發病及傳播條件，因此百合灰黴病菌 (*B. elliptica*) 危害百合葉片發病嚴重時造成落葉，甚而全株枯萎，而花卉之生產首重外觀和品質，因此百合灰黴病之防治為花農在冬春栽培時最主要之障礙。但關於百合灰黴病菌之研究報告，僅美國 Doss 等氏曾進行其產胞及接種技術之研究來檢定百合品種之抗病性，以及用孢子懸浮液接

種百合葉片進行病原菌感染寄主所需時間與侵入葉肉組織過程之研究 (9, 10, 11, 12)。其他關於 *B. elliptica* 之報告極少，除有關抗藥菌株特性之分析 (13, 14) 及 Chastagner 等氏曾嘗試利用其菌核加孢子懸浮液促進子囊盤產生，研究 *B. elliptica* 有性世代之存在外 (5)，其它關於生理、生態特性等等研究報告尚缺付梓，且在加強拓展外銷花卉市場上，以紐西蘭為例，灰黴病菌即其切花進出口限制因子之一 (18)。因此本研究主要針對發生於本省田間之百合灰黴病菌 (*B. elliptica*)，並以 *B. cinerea* 為對照菌株，探討主要物理環境因子如溫度、水分潛勢及光照等對本菌分生孢子與菌核之發芽、菌絲生長、產胞及菌核形成等之影響，期由此些影響因子之瞭解能提供栽培上病害管理及研擬防治措施之參考。

## 材料與方法

### 供試之菌株來源、保存與純化分離

本研究所採用的灰黴病菌菌株主要分離自不同區域被灰黴病菌感染之花卉作物。除由本研究室自行分離保存者外，尚有由楊秀珠博士 (臺灣省農業藥物毒物試驗所)、謝廷芳先生 (臺灣省農業試驗所)、童伯開教授 (國立嘉義技

術學院) 所提供。供試之菌株培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板 (PDA plate, potato dextrose agar, Difco Laboratories, MI, U.S.A.) 或百合煎煮汁液瓊脂平板 (lily decoction agar plate, aqueous lily leaf exytract obtained by autoclaving 800 g of fresh Alita lily leaves in deionized water, 10 g of glucose, and 15 g of Difco-Bacto agar per liter) (9)。參考 Van den Berg & Lentz 兩氏之方法, 可在 4 C 進行保存一年以上 (23), 若是長期保存則需在培養基上加入無菌的礦物油 (sterile mineral oil), 或將菌核挑出置於滅菌過之試管中保存於 0 C 中。以下實驗進行時, 如無特別說明, 均將菌株培養於 PDA 平板 (90 × 15 mm), 20 C, 每日 12 小時 (0600-1800) 光照 ( $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 12 小時黑暗處理之定溫箱培養。從罹病株分離病原菌的方法為: 將帶有病斑的葉片或病組織部位, 置於盛有 70 % 酒精之燒杯中進行表面消毒約一分鐘, 隨即再以無菌水漂洗三次, 並放置於濾紙上將其水分吸乾。再置於 2 % 之水瓊脂平板 (water agar plate, Difco laboratories, MI, U.S.A.) 上, 放置於 20 C 培養箱中培養一週, 待葉片表面產生分生孢子或菌核後, 利用解剖顯微鏡 (Nikon, SMZ-U, Japan) 直接挑出分生孢子堆或菌核, 置於 PDA 平板上, 放置於 20 C 培養箱 (incubator) 中培養 48 小時, 即可看見發芽之菌絲, 再將菌絲前端移殖 PDA 平板上培養即可。

### 接種源製備

供試菌株包括 *Botrytis elliptica* CJF801 (*Lilium hybrid* Oriental, acapulco, 清境)、EPL803 (*L. longiflorum*, 鐵砲新雪山一號, 鹽埔)、HLL807 (*L. hybridum* Hort., casablanca, 后里)、WTF809 (*L. longiflorum*, 鐵砲新雪山一號, 萬丹)、BE-85-5-2 (*L. longiflorum*, 童伯開教授提供) 及 *B. cinerea* CJF102 (*Limouium sinuatum* Mill., 星辰花, 清境)、TCL105 (*Eustoma grandiflorum* shim, 洋桔梗, 田中)、CPL120 (*E. grandiflorum*, 洋桔梗, 嘉義溪北)、TWL121 (*Chrysanthemum morifolium*, 菊花, 田尾)、TCF122 (*Rosa hybrida*, 玫瑰, 台中)、CAF133 (*Phalaenopsis* spp., 蝴蝶蘭, 吉安)、CAF138 (*Impatiens walleriana* Hook., 非洲鳳仙花, 吉安)。

菌絲接種源製備: 將灰黴病菌供試菌株以移殖針挑出一小塊, 培養於 PDA 平板上, 於 20 C 培養箱中培養 4 ~ 5 天後, 以直徑 5 mm 的打孔器, 沿著菌落邊緣切取洋菜塊, 以作為接種源。菌核接種源製備: 將灰黴病菌供試菌株以移殖針挑出一小塊, 培養於 PDA 平板上, 於 20 C 培養箱中培養 2 週後, 將菌核挑出以作為接種源。孢子接種源製備: 將灰黴病菌供試菌株以移殖針挑出一小塊, 培養於 PDA 平板上, 於 20 C 培養箱中培養 4 天後, 繼續以近紫外光作為光源經過 1 週培養待產胞後, 滴 10 ml 的無菌水於培養皿中, 將孢子沖洗並配製成濃度為  $1 \times 10^4$

conidia / ml 的孢子懸浮液, 作為接種源。以下實驗如無特別說明者, 皆將接種源個別接種於直徑 90 × 15 mm 的 PDA 平板; 取菌絲洋菜塊, 皆以直徑 5 mm 的打孔器, 沿著菌絲邊緣切取洋菜塊, 每一處理 10 重覆。

### 溫度對灰黴病菌生理性質之影響

#### 溫度對菌絲生長之影響

將菌絲接種源個別接種於 PDA 平板, 先置於 20 C, 24 小時後再將其分別放置於 4、8、12、16、20、24 及 28 C 定溫培養箱中。每天定時觀察並測量其菌落直徑。

#### 溫度對菌核形成之影響

將每一菌絲接種源個別接種於 PDA 平板, 先置於 20 C, 24 小時後再將其分別放置在 4、8、12、16、20、24 及 28 C 定溫培養箱中。4 週後觀察並分別計數每皿菌核數目及秤其乾重, 並求其平均值。

#### 溫度對菌核發芽及再形成之影響

將每粒菌核個別接種於直徑 85 mm 的 PDA 平板, 將其分別放置在 8、12、16、20、24 及 28 C 定溫培養箱中。每天定時觀察並計數其菌核發芽數目, 4 週後並計數其每皿菌核數目。

#### 溫度對分生孢子發芽及其發芽管長度之影響

依 Dhingra 和 Sinclair 氏方法, 將 50 C 未凝固之 PDA 以吸管滴放於個別之載玻片上形成 2 mm 之瓊脂膜, 俟培養基凝固後, 進行實驗 (8)。取 10  $\mu\text{l}$  孢子懸浮液置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂膜培養基載玻片上, 再分別放置在 4、8、12、16、20、24、28 及 32 C 定溫培養箱中, 分別於 8、16 及 24 小時在顯微鏡下, 分別計數孢子發芽數目, 並測量其發芽管長度。

#### 溫度對分生孢子形成之影響

將每一菌絲洋菜塊分別接種於 PDA 平板, 先置於 20 C、24 小時後再將其分別放置在 4、8、12、16、20、24 及 28 C 定溫培養箱中, 以近紫外光作為光源經過 1 週培養待產胞後, 滴 10 ml 的無菌水於培養皿中, 將孢子沖洗製成孢子懸浮液, 利用血球計數器分別計數每皿孢子數。

### 水分潛勢對菌絲生長及分生孢子發芽之影響

以 PDA 為基礎培養基, 參考 Sommers 等人方法, 調製不同水分潛勢之培養基配方 (20)。在 1000 ml 去離水中分別加入 0 g、14.0 g、68.5 g、135.1 g、260.1 g、8377.1 g、486.3 g、587.6 g 與 682.4 g 之 sucrose (Sigma, MO, U.S.A.) 使水分潛勢分別為 -0 bar、-5 bar、-10 bar、-20 bar、-30 bar、-40 bar、-50 bar、-60 bar, 再利用水分潛勢測量器 (DEW point microvoltmeter, Wescor HP-33T, U.S.A.) 製出標準曲線。在 1000 ml 的 PDA 中加入 0 g、1.6 g、8.3 g、16.9 g、34.3 g、52.0 g、69.8 g、87.6 g 之 KCl (Sigma,

MO, U.S.A.)，或 0 g、14.0 g、68.5 g、135.1 g、260.1 g、377.1 g、486.3 g、587.6 g 之 sucrose (Sigma, MO, U.S.A.)，再滅菌後倒入培養皿內，每皿 20 毫升，置於 20 C 下，俟培養基凝固後，再利用水分潛勢測量器測量並配合標準曲線，去估算培養皿在 20 C 時真正的水分潛勢值，供作以下實驗用。

#### 水分潛勢對菌絲生長之影響

將每一菌絲洋菜塊個別接種於上述製成之不同水分潛勢之 PDA 平板中，每處理五重複，置於 20 C 之定溫培養箱中培養，於翌日開始逐日觀察並記錄菌落直徑，求其平均值，並加以分析比較。

#### 水分潛勢對分生孢子發芽之影響

以上述同法製成之不同水分潛勢之 50 C 未凝固 PDA，製成馬鈴薯葡萄糖瓊脂膜培養基。取 10  $\mu$ l 孢子懸浮液將其分別接種於不同水分潛勢之馬鈴薯葡萄糖瓊脂膜培養基載玻片上，每處理五重複，置於 20 C 之定溫培養箱中於 8 小時後在顯微鏡下，分別計數每載玻片孢子發芽數目，並測量其發芽管長度。

#### 菌核對連續高溫的耐受性及其殘存

將接種源菌核個別放置於含田間土內(后里百合栽培田之有機壤土)及乾瀘紙二種不同處理之玻璃培養皿內，再分別放置在 20、32 及 36 C 定溫培養箱中。每隔一週移出 5 粒菌核移殖於 PDA 平板上，於 20 C 培養箱中培養，觀察並計數其菌核發芽數目。

#### 日夜溫差對菌核發芽、菌絲生長及菌核形成的影響

本實驗仿台中縣神岡鄉田間 1996 年 8 月 14 日至 28 日之百合葉表溫度，將培養箱調整為白天有光照 (110  $\mu$ E  $m^{-2} s^{-1}$ ) 培養溫度為 34 C，夜間 24 C、黑暗處理，分

別 12 小時之日夜溫差。將每粒接種源菌核個別接種於 PDA 平板中，每處理五重複，置於 20 C 定溫箱及上述之日夜溫差培養箱中培養，每天定時觀察並計數其菌核發芽數目及菌絲生長情形，3 週後並計數其菌核數目。

#### 光照對菌核發芽、菌絲生長及菌核形成的影響

將每粒接種源菌核個別接種於 PDA 平板中，一組以光照 (50 ~ 60  $\mu$ E  $m^{-2} s^{-1}$ ) 之定溫箱培養照光處理，另一組黑暗處理，每處理五重複，置於 20 C 定溫培養箱中培養，每天定時觀察並計數其菌核發芽數目及菌絲生長情形，3 週後並計數其菌核數目。

## 結 果

### 溫度對灰黴病菌生理性質之影響

#### 溫度對菌絲生長之影響

以 *B. elliptica* (BE85-5-2、CJF801 & HLL807) 為接種源，菌絲生長適溫為 8 ~ 24 C，在 16 ~ 24 C 生長較為快速，在 4 C 時雖生長較為緩慢，但不受影響，在 28 C 時於生長 3 ~ 4 天後則生長減緩，需要 3 週方能長滿培養皿，32 C 則菌絲無法生長，培養在 24 C 以上時菌絲會呈現褐化，在 28 C 與 32 C 定溫培養一週之菌絲，若將其再移至 4 ~ 24 C 下培養，則 28 C 者可恢復生長，而 32 C 者則無法再生長。不同菌株對溫度表現有相似之結果，唯較 *B. cinerea* 菌株 (TCL105、CAF133 & TCF122) 生長較為快速(表一)。

#### 溫度對菌核形成之影響

溫度對產生菌核之影響中，*B. elliptica* (CJF801) 與 *B. cinerea* (TCL105) 於 4 ~ 24 C 均能產生菌核，唯 *B. elliptica* 在 4 C 時產生菌核較少且小，但其適合溫度皆為 8 ~ 20 C。由於灰黴病菌所產生的菌核大小並不一致，因此

表一、溫度對不同灰黴病菌菌絲生長之影響

TABLE 1. Effect of temperature on mycelial growth of *Botrytis elliptica* and *B. cinerea*

Temperature (C)	Diameter of mycelial growth (cm/day) <sup>1</sup>					
	<i>B. elliptica</i>			<i>B. cinerea</i>		
	BE85-5-2	HLL807	CJF801	TCL105	CAF133	TCF122
4	1.162 ± 0.093 c <sup>2</sup>	1.284 ± 0.085 d	1.036 ± 0.072 d	0.520 ± 0.044 c	0.641 ± 0.044 c	0.588 ± 0.038 c
8	1.318 ± 0.178 c	1.526 ± 0.110 c	1.186 ± 0.096 d	0.840 ± 0.048 bc	0.906 ± 0.290 b	0.937 ± 0.137 b
12	1.395 ± 0.145 bc	1.793 ± 0.165 b	1.766 ± 0.126 c	1.258 ± 0.094 b	0.920 ± 0.445 b	1.176 ± 0.387 b
16	1.768 ± 0.128 b	1.640 ± 0.099 c	2.190 ± 0.170 b	1.930 ± 0.104 a	1.340 ± 0.269 ab	1.750 ± 0.284 ab
20	1.990 ± 0.208 a	2.050 ± 0.077 a	2.620 ± 0.050 a	2.140 ± 0.220 a	1.525 ± 0.370 a	2.356 ± 0.341 a
24	1.255 ± 0.293 c	1.805 ± 0.212 b	2.130 ± 0.286 b	1.998 ± 0.136 a	1.550 ± 0.226 a	1.760 ± 0.174 ab
28	1.160 ± 0.192 c	1.375 ± 0.282 d	1.612 ± 0.054 c	1.090 ± 0.202 b	1.100 ± 0.118 b	1.230 ± 0.198 b

<sup>1</sup>. Calculating the diameter of mycelial growth per day after inoculation agar on PDA plate.

<sup>2</sup>. Mean (n=10) in each column followed by the same letter are not significantly different ( $P=0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

菌核數目與其重量並不成正比 (圖一)。

溫度對菌核發芽及再形成之影響

*B. elliptica* (WTF809) 之菌核在 8 ~ 28 C 均可發芽生長，但在低溫時發芽所需時間較長 (圖二)。唯在 28 C 時，菌核發芽後一週，菌絲即停止生長，發芽率在各溫度無明顯差異，菌核再形成數則以 12 C 最多，8、20 和 16 C 次之，28 C 則無菌核再形成 (圖三)。

溫度對分生孢子發芽及其發芽管長度之影響

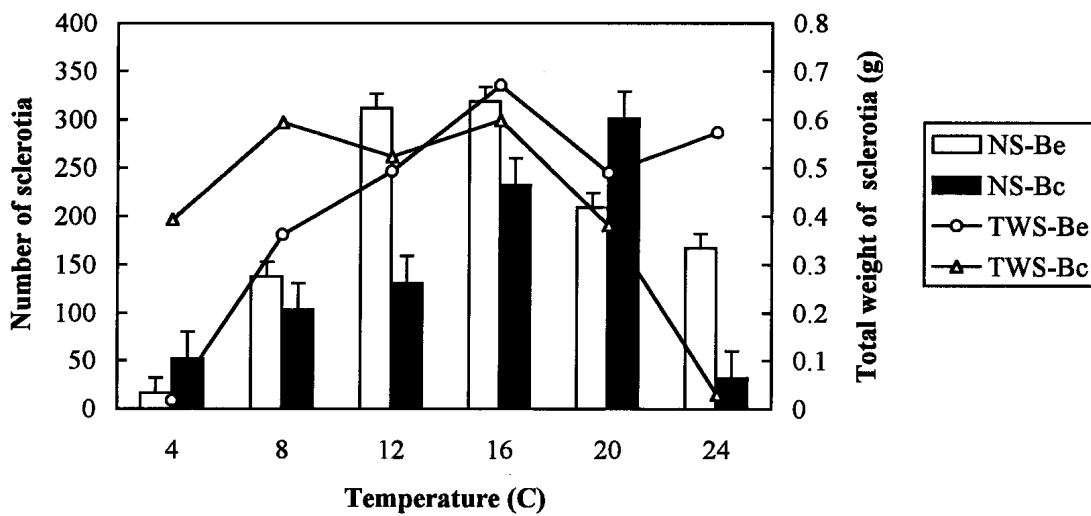
*B. elliptica* (CJF801) 之孢子在 8 ~ 28 C，8 小時發芽率已達 90 % 以上，發芽管生長長度則以 20 ~ 24 C 時較長，16 及 24 小時後觀察結果亦相同，唯在 4 C 時則需 16

小時後始能發芽，而在 32 C 時孢子不發芽 (圖四A)；*B. cinerea* (CPL120) 除在 4 C 時需 24 小時後方能發芽外，其餘結果和 *B. elliptica* 相似 (圖四B)。溫度對分生孢子形成之影響

溫度對菌絲生長後產生孢子之影響中，*B. elliptica* (HLL807) 與 *B. cinerea* (CAF138) 於 8 ~ 28 C 均能產生分生孢子，最適溫度皆分別為 12 ~ 20 C 及 16 ~ 20 C (圖五)。

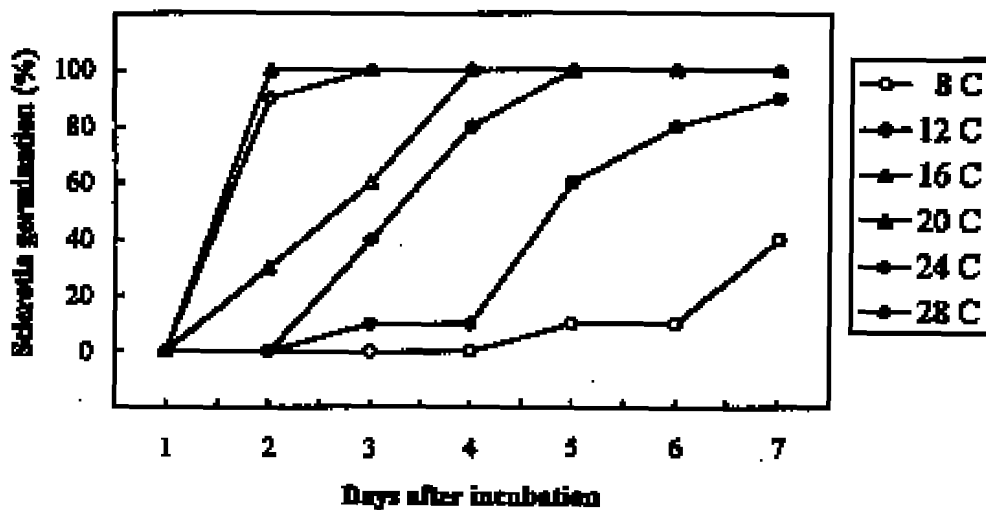
水分潛勢對菌絲生長及分生孢子發芽之影響

經估算培養皿在 20 C 時真正的水分潛勢值分別為 -



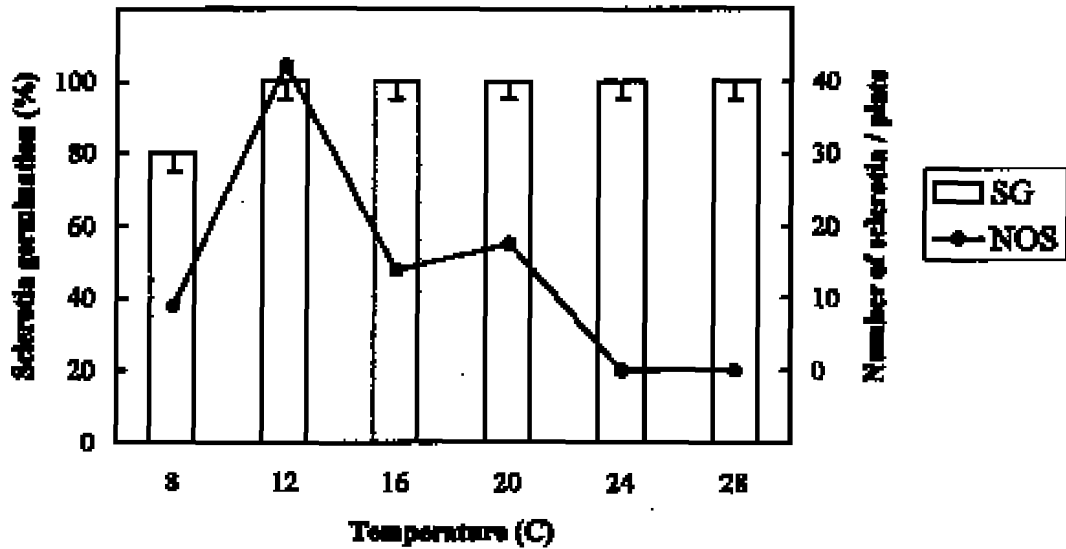
圖一、溫度對灰黴病菌菌核形成數目及重量之影響。

Fig. 1. Effect of temperature on the number (NS) and total weight of sclerotia (TWS) of *Botrytis elliptica* (Be, CJF801) and *B. cinerea* (Ba, TCL105) 4 wk after incubation on PDA medium.



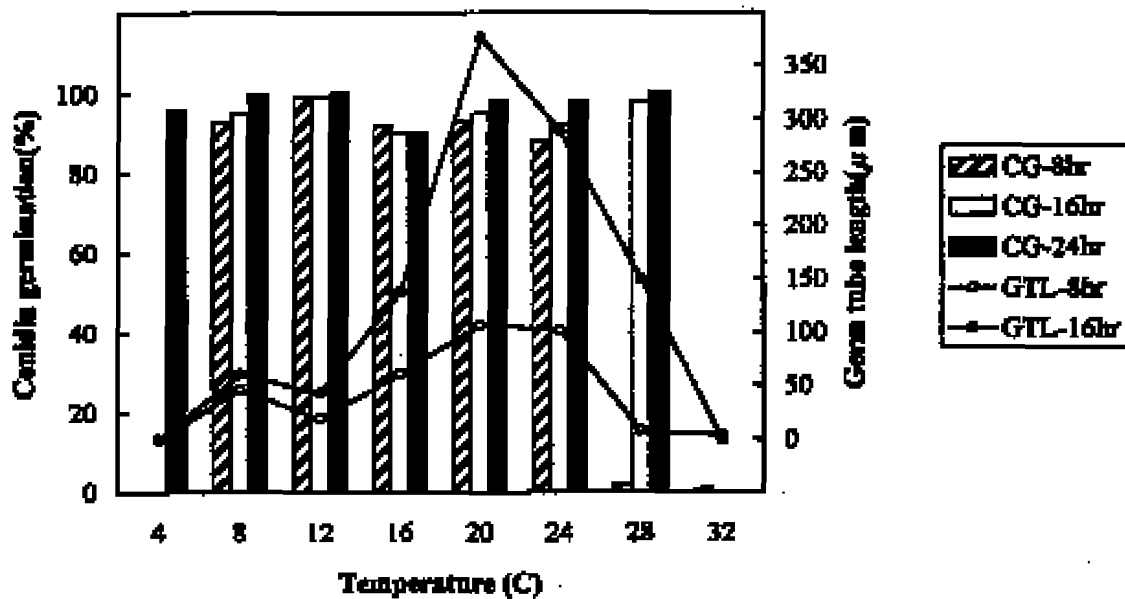
圖二、溫度對灰黴病菌菌核發芽之影響。

Fig. 2. Effect of temperature on sclerotia germination of *Botrytis elliptica* (WTF809).



圖三、溫度對菌核發芽及其再形成之影響。

Fig. 3. Effect of temperature on the germination (SG) and number (NOS) of sclerotia of *Botrytis elliptica* (WTF809) at 4 wk after inoculation.



圖四 A、溫度對灰黴病菌孢子之發芽及發芽管長度之影響。

Fig. 4A. Effect of temperature on conidial germination (CG) and length of germ tube (GTL) of *Botrytis elliptica* (CJF801) at 8, 16 and 24 hr after inoculation on PDA.

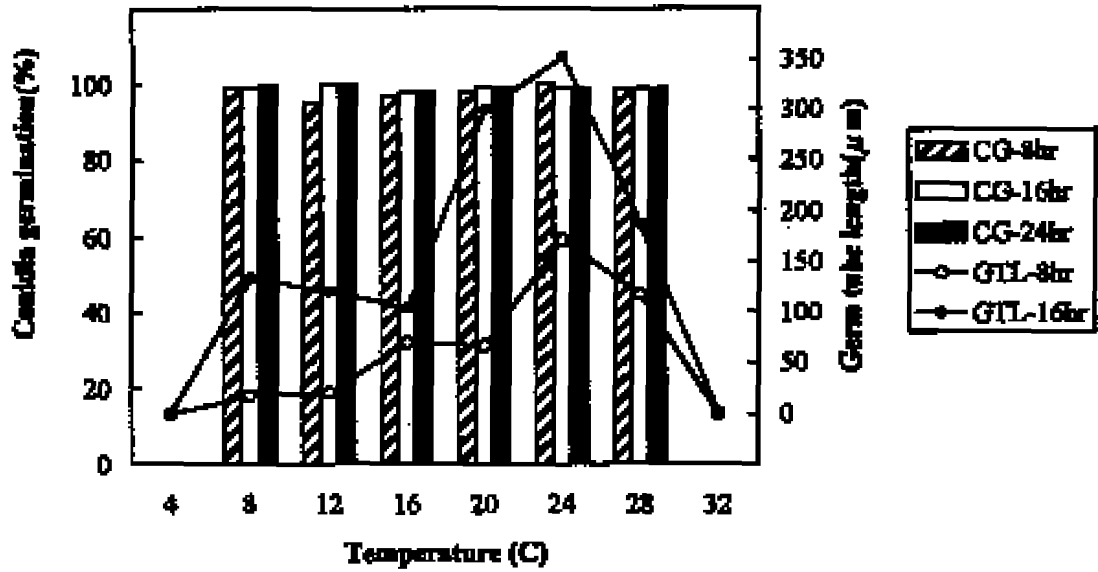
7.3 bar、-10 bar、-17.5 bar、-22 bar、-31 bar、-44 bar、-59.5 bar、-70 bar，，供作以下實驗用。

水分潛勢對菌絲生長之影響

在 20 C 定溫下，進行水分潛勢對菌絲生長之影響中，*B. elliptica* (HLL807) 與 *B. cinerea* (CAF138) 於 -7.3 bar ~ -70 bar 均能生長，最適水分潛勢皆為 -7.3 bar ~ -31 bar。在含 sucrose 的 PDA 培養基中，菌絲生長皆較優於含 KCl 相同水分潛勢的 PDA 培養基(表二)。

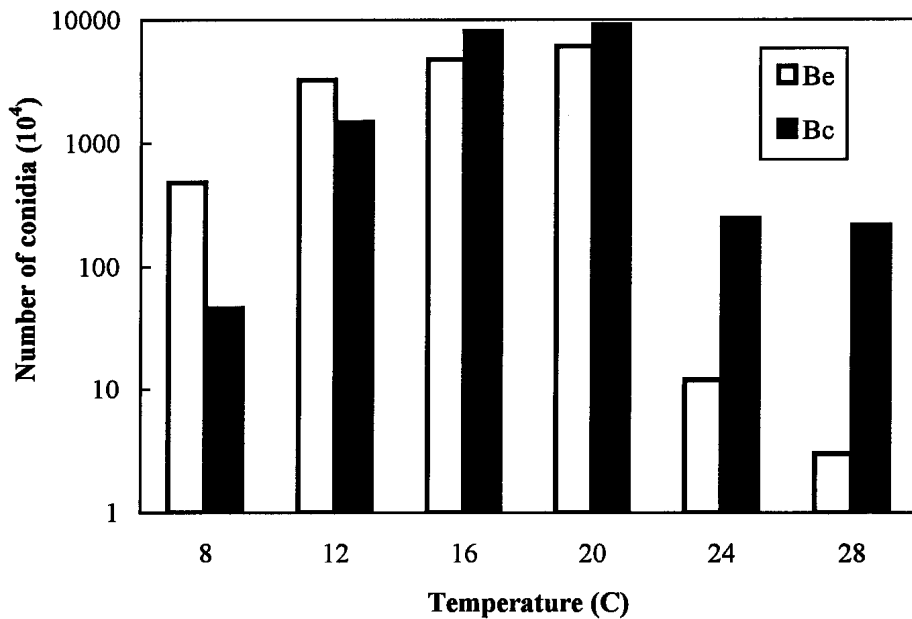
水分潛勢對分生孢子發芽之影響

置於 20 C 之定溫培養箱中於 8 小時後，在含 sucrose 的 PDA 培養基中 *B. elliptica* (HLL807) 與 *B. cinerea* (CAF138) 於 -7.3 bar ~ -59.5 bar 培養基中，分生孢子發芽率均達 90 % 以上，但在水分潛勢低至 -70 bar 時，則分生孢子皆無法發芽。在含 KCl 的 PDA 培養基中 -7.3 bar ~ -70 bar，分生孢子發芽率均達 90 % 以上(表三)。且觀察其發芽管長度時，發現當水分潛勢低至 -31 bar 時，發芽管始



圖四B、溫度對灰黴病菌孢子之發芽及發芽管長度之影響。

Fig. 4B. Effect of temperature on conidial germination (CG) and length of germ tube (GTL) of *Botrytis cinerea* (CPL120) at 8, 16 and 24 hr after inoculation on PDA.



圖五、溫度對灰黴病菌分生孢子形成的影響。

Fig. 5. Effect of temperature on the sporulation of *Botrytis elliptica* (Be, HLL807) and *B. cinerea* (Bc, CAF138) on PDA for 1 wk.

明顯變短。

菌核對連續高溫的耐受性及其殘存

供試菌株 (HLL807、WDF809、BE85-5-2、TWL121、TCF122 and CAF138) 之菌核對連續高溫的耐受性及其殘存皆有所不同。 *B. elliptica* (HLL807) 之菌核放置於含田土

之玻璃培養皿內，在 36°C 連續高溫一週後即無法發芽，即使在 32°C 連續高溫時二週後亦無法發芽。CAF138 菌株之菌核對連續高溫的耐受性及其殘存力最強，在不含田土之玻璃培養皿內，置於 32、36°C 連續高溫三週後仍可發芽，但若置於含田土之玻璃培養皿內則發芽率下降 (表四)。

表二、水分潛勢對對灰黴病菌菌絲生長之影響

TABLE 2. Effect of water potential on mycelial growth of *Botrytis elliptica* and *B. cinerea*

Water potential (-bar)	Diameter of mycelial growth (cm/day) <sup>1</sup>			
	Sucrose		KCl	
	HLL807 <sup>2</sup>	CAF133 <sup>2</sup>	HLL807 <sup>2</sup>	CAF133 <sup>2</sup>
-10.0	2.310±0.065 b	2.140±0.155 a <sup>3</sup>	1.750±0.176 c	1.870±0.103 a
-17.5	2.500±0.252 ab	2.305±0.117 a	2.000±0.215 b	1.930±0.097 a
-22.0	2.630±0.067 a	2.100±0.061 a	2.290±0.027 a	1.810±0.065 a
-31.0	2.430±0.115 ab	1.562±0.143 b	1.872±0.161 bc	1.772±0.279 a
-44.0	2.332±0.458 c	1.782±0.595 b	1.730±0.152 c	1.360±0.152 b
-59.5	0.996±0.035 d	0.836±0.025 c	0.776±0.185 d	0.790±0.044 c
-70.0	0.336±0.252 e	0.464±0.060 d	0.512±0.052 e	0.170±0.164 d
CK(-7.3)	2.270±0.120 a	1.996±0.226 a		

<sup>1</sup>. Calculating the diameter of mycelial growth per day on PDA plate at 20 C.

<sup>2</sup>. HLL807: *Botrytis elliptica*; CAF133: *B. cinerea*.

<sup>3</sup>. Mean (n=5) in the column of each experiment followed by the same letter are not significantly different (P=0.05) according to Duncan's multiple range test.

表三、水分潛勢對對灰黴病菌孢子發芽率之影響

TABLE 3. Effect of water potential on conidial germination of *Botrytis elliptica* and *B. cinerea*

Water potential (-bar)	Spore germination (%)			
	Sucrose		KCl	
	HLL807 <sup>2</sup>	CAF133 <sup>2</sup>	HLL807 <sup>2</sup>	CAF133 <sup>2</sup>
-10.0	100±0.00 a	100±0.00 a <sup>3</sup>	100±0.00 a	100±0.00 a
-17.5	100±0.00 a	100±0.00 a	100±0.00 a	100±0.00 a
-22.0	100±0.00 a	100±0.00 a	100±0.00 a	100±0.00 a
-31.0	94±1.50 ab	98±0.35 a	98±0.50 a	96±0.50 a
-44.0	95±1.50 ab	100±0.00 a	94±4.50 ab	100±0.00 a
-59.5	92±3.55 ab	94±2.02 ab	97±0.50 a	97±0.50 a
-70.0	0±0.00 c	0±0.00 c	92±0.05 ab	98±1.50 a
CK(-7.3)	98±0.15 a	100±0.00 a		

<sup>1</sup>. Calculating the percentage of spore germination 8 hr after inoculation at 20 C.

<sup>2</sup>. HLL807: *Botrytis elliptica*; CAF133: *B. cinerea*.

<sup>3</sup>. Mean (n=5) in the column of each experiment followed by the same letter are not significantly different (P=0.05) according to Duncan's multiple range test.

日夜溫差對菌核發芽、菌絲生長及菌核形成的影響

*B. elliptica* (HLL807) 及 *B. cinerea* (CAF138) 於日夜溫差環境下時，並不影響其菌核之發芽率，但對菌絲生長則有明顯之抑制現象。在此日夜溫差培養箱中培養一個月後，均無菌核與孢子產生，但將其再放置於 20 C 定溫培養下，則菌絲可恢復生長能力。因此當灰黴病菌以不同溫度交替處理時，將可使連續一週高溫 (超過 32 C) 造成之致死作用改變為靜菌作用。

表四、溫度對菌核殘存的影響

TABLE 4. Effect of temperature on survival of sclerotia of *Botrytis elliptica* and *B. cinerea*

Temperature (C)	Sclerotia germination <sup>1</sup>					
	<i>B. elliptica</i>			<i>B. cinerea</i>		
	HLL807	WDF809	BE85-5-2	TWL121	TCF122	CAF138
One week						
P <sup>3</sup> -36	2/5	4/5	3/5	0/5	4/5	5/5
P-32	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
P-20	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
S <sup>3</sup> -36	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
S-32	2/5	3/5	1/5	0/5	0/5	4/5
S-20	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Two week						
P-36	0/5	2/5	2/5	0/5	0/5	4/5
P-32	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
P-20	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
S-36	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
S-32	0/5	2/5	1/5	0/5	1/5	4/5
S-20	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Three week						
P-36	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
P-32	3/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5
P-20	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
S-36	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
S-32	0/5	2/5	1/5	1/5	2/5	0/5
S-20	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

<sup>1</sup>. Data were recorded 4 days after inoculation.

<sup>2</sup>. HLL807、WDF809、BE85-5-2: *Botrytis elliptica*; TWL121、TCF122、CAF138: *B. cinerea*.

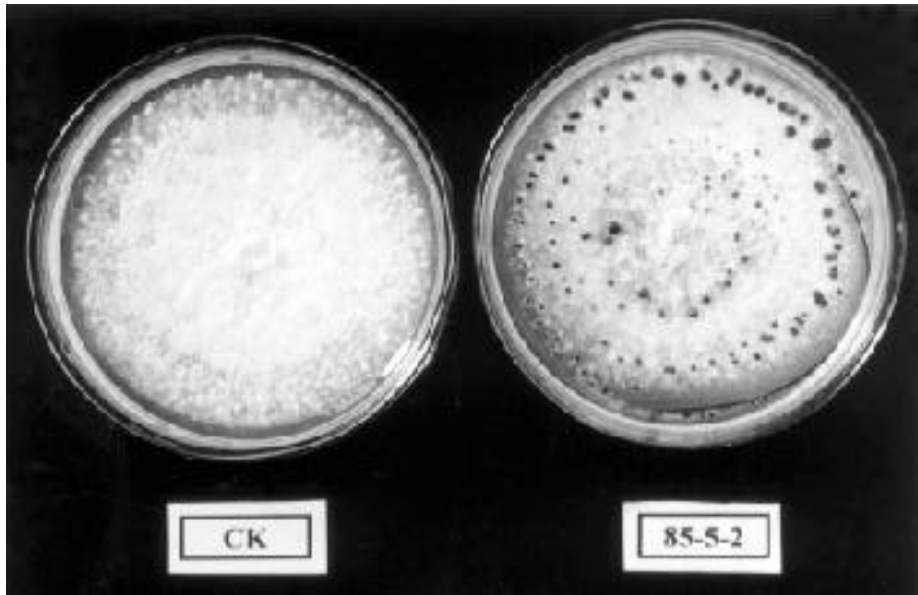
<sup>3</sup>. P : on filter paper ; S : in natural soil.

光照對菌核發芽、菌絲生長及菌核形成的影響

結果顯示光照對 *B. elliptica* (HLL807) 與 *B. cinerea* (CAF138) 其菌核發芽及菌絲生長並無明顯差異。黑暗處理對 *B. elliptica* (Be85-5-2) 促進其菌核形成 (圖六)，而對 *B. cinerea* 並無明顯差異。

討 論

溫度及濕度為灰黴病發病之重要條件 (3, 7, 15)，本研究中溫度對其菌絲生長之結果顯示灰黴病菌其生長適溫皆為 8 ~ 24 C，較蒲氏報告中 20 ~ 24 C (4) 及童等氏對柿灰黴病原菌菌絲生長適溫的報告 15 ~ 25 C (2) 範圍較寬。*B. elliptica* 較 *B. cinerea* 在低溫時生長較佳。在 4 C 時雖生長較為緩慢，但並未完全受抑制，在 28 C 時於生長 3 ~ 4 天後則生長受抑制，需要 3週方能長滿培養皿，32 C 則菌絲受抑制無法生長，在 28 C 與 32 C 定溫培養一週受抑制之菌絲，若將其再放置 4 ~ 24 C 下培養，28 C 受抑制之菌絲可恢復生長，而 32 C 則無法再生長。可見連續長期的高溫可促使菌絲生長衰退，與在田間氣溫升高後，即難發



圖六、光照與暗處理對灰黴病菌菌核生成之影響。

Fig. 6. Effect of light (left) or dark (right) treatment on the formation of sclerotia of *Botrytis elliptica* (BE85-5-2).

現其病徵擴散的現象非常吻合。但本研究長期調查田間溫度，在夏季夜間溫度仍可低至 24 C 左右，意謂田間並非連續高溫而是具有明顯的日夜溫差，在本實驗中 *B. cinerea* 與 *B. elliptica* 於培養於日夜溫差時，對菌絲有明顯之抑制作用，且在此日夜溫差培養箱中培養一個月後，並無菌核與孢子產生。但將其再放置 20 C 定溫培養，菌絲可恢復生長能力，此結果和 *B. cinerea* 曾被報導其菌絲可為殘存結構結果相符 (17)。

*B. cinerea* 產生菌核為其重要存活構造並藉分生孢子產生為其田間重要感染源 (3, 17, 23)。溫度對產生菌核之影響中，*B. cinerea* 於 4 ~ 20 C 均能產生菌核、*B. elliptica* 則為 8 ~ 24 C，較 *B. cinerea* 稍偏高溫，但最適溫度皆為 8 ~ 20 C 亦較童等人報告 15 ~ 20 C 範圍要寬許多 (2)。菌核是主要越冬殘存構造，因此菌核一般形成的溫度較低於菌絲的生長溫度，而灰黴病菌所產生的菌核大小並不一致，菌核數目與其總重量亦並不成正比，主要是菌核形成開始是由小群的菌絲集合形成苞芽，有時幾個苞芽再癒合形成一個較大的苞芽 (24)，因此與苞芽的癒合數有關，也有研究結果指出菌核的形成和其碳氮比有關 (6)。*B. cinerea* 之菌核在 8 ~ 28 C 均可發芽生長，但在低溫時發芽所需時間較長。唯在 28 C 時，菌核發芽後一週，菌絲即停止生長，發芽率於不同各溫度下無明顯差異。在本實驗中結果顯示菌株間其菌核對連續高溫的耐受性及其殘存皆有所不同。然本研究 *B. cinerea* 則在 36 C 連續高溫一週後即無法發芽，若將菌核放置於含田間土之玻璃培養皿內即使在 32 C 連續高溫一週後亦無法發芽。但若培養於日夜溫差時，並不影響其菌核之發芽率。由於休眠之菌絲及菌核於

環境適合時，能恢復其生長勢，並產生大量分生孢子後散佈，為田間初次感染的來源之一。由本研究結果可推知，夏季夜溫為灰黴病菌之菌絲及菌核是否能殘存之決定重要因素之一，又研究曾指出 *B. tulipae* 的菌核能在土表殘存 18 個月，仍有 100 % 的發芽率，埋入土中的深度將可降低其發芽率 (6) 因此若能於夏季翻土並連續一週保持土壤夜溫 32 C，應可有效抑制灰黴病菌在田間的殘存。溫度對分生孢子發芽及產生分生孢子之影響中，*B. elliptica* 除在 4 C 時需 16 小時後始能發芽及在 32 C 時孢子不發芽外，在 8 ~ 28 C，8 小時發芽率已達 90 % 以上，發芽管生長長度則以 20 ~ 24 C 時較長，與報告中指出灰黴病菌可發芽的溫度為 5-30 C 相似 (15)。在本實驗中觀察得知在低溫時，孢子發芽容易產生雙發芽管，其原因則有待進一步研究探討。*B. elliptica* 於 8 ~ 28 C 均能產生分子孢子，最適溫度皆為 12 ~ 20 C，與報告 *B. tulipae* 在低溫時有助於孢子柄形成相似 (6)。孢子大小約為 13 ~ 38  $\mu\text{m}$   $\times$  8.5 ~ 24  $\mu\text{m}$  與 Doss 等氏觀察 (18 ~ 50  $\mu\text{m}$   $\times$  7.5 ~ 23  $\mu\text{m}$ ) (9) 頗為接近。由於發芽管的長度與其致病力有關 (2, 6)，可供說明雖然灰黴病菌雖為低溫菌，但在田間總在冬春轉暖之際發生嚴重，在 16 C 以下時只能發現零星病斑。雖然灰黴病菌在低溫時發芽較不佳，但 Salinas 等氏在報告中指出孢子的殘存溫度和發芽溫度有相反的結果 (19)。有研究亦指出，在 20 C 下 *B. tulipae* 孢子一週時發芽率為 94.3 %，但二週後就無法發芽，若在 0 ~ 10 C 下保存 6 週仍有 90 % 以上的發芽率 (6)，這說明如果切花上存有大量之灰黴病菌之分生孢子，在低溫儲運時，並不易發現灰黴病菌造成之病徵，而在市場批售時病徵卻嚴重發生。



水分潛勢對菌絲生長及孢子發芽之影響中，在 20 C 定溫培養下，*B. elliptica* 於 -7.3 bar ~ -70 bar 均能生長，但在 -70 bar 時生長明顯緩慢，最適水分潛勢為 -31 bar。且在含 sucrose 的 PDA 培養基中生長皆較優於在含 KCl 相同水分潛勢的 PDA 培養基中，可能與碳素源的提供有關。在含 KCl 的 PDA 培養基中 *B. elliptica* 於 -7.3 bar ~ -70 bar，孢子均有 90 % 以上的發芽率。但生長在含 sucrose 相同水分潛勢的 PDA 培養基中至 -70 bar 時則無孢子發芽。至 -31 bar 時發芽管已明顯變短，可見水分潛勢為決定孢子是否發芽的重要因子。此乃因為灰黴病菌之分生孢子含水量極低，一般僅介於 6 ~ 25 %，因此發芽時對水分之需求相當高，相對濕度 93 ~ 100 % 時分生孢子方能發芽 (19)，但當相對濕度不高時，灰黴病菌仍能因寄主的表面覆蓋水膜而造成侵入 (3, 6)，亦即寄主表面之水膜、游離水及高濕度皆為分生孢子發芽及侵入寄主組織之重要環境因子。與 Doss 等氏亦曾於研究報告指出，*B. elliptica* 分生孢子在 20 C，100 % 相對濕度 48 小時，最利於發病。孢子接種後 2 ~ 3 小時內開始發芽，8 ~ 16 小時開始形成附著器，多出現於氣孔部位之保衛細胞及表皮細胞間隙 (9, 11) 頗為符合。光照對灰黴病菌之菌核發芽、菌絲生長及菌核形成的影響結果顯示，其對菌核發芽及菌絲生長並無明顯差異，但對產胞則為必要的條件，與 Doss 等氏之報告中指出在近紫外光連續照射下可促其產胞，產胞量在 20 C 近紫外光連續照射培養十二日時達到最高 (11, 12) 有相同之結果。Tan and Epton 發表 *B. cinerea* 在黑暗、黃、紅及紅外光或近紫照少於 30 分鐘照射下，可以促進形成菌核 (21)，本研究中 *B. elliptica* 亦有相同的結果。

綜合本研究中所見溫度、水分潛勢及光照對供試灰黴病菌發芽、生長、產胞及菌核形成之影響，結果顯示與灰黴病於冬春之際低溫高濕時發生嚴重之現象頗為吻合。

## 謝 辭

本實驗承蒙臺灣省農業藥物毒物試驗所楊秀珠博士、臺灣省農業試驗所謝廷芳先生提供部分研究菌株，又研究工作中承臺灣省農業藥物毒物試驗所李敏郎、蘇秋竹先生，花蓮農改場陳任芳女士、后里及神岡鄉花農王建誠與鄭義田先生等甚多協助，在此誌謝。本研究亦承蒙行政院農委會計畫 87 生技-2-2-糧-04 補助經費，特此致最大之謝忱。

## 引用文獻

1. 台灣農業年報. 1997. 臺灣省農林廳. 403頁。
2. 童伯開、黃啟鐘、曾素玲、蔡竹固. 1994. 臺灣柿灰黴病的發生及化學防治. 植保會刊 36:53-63.
3. 楊秀珠. 1993. 觀賞植植物灰黴病之發生與防治. 臺灣花卉病蟲害研討會專刊. 167-177頁. 中華植物保護學會. 台中。
4. 蒲秀滿. 1988. 草莓灰黴病菌對 Vinclozolin 殺菌劑抗藥性的研究. 國立臺灣大學植物病蟲害研究所碩士論文. 84頁。
5. Chastagner, G. A., Riley, K. L., and Doss, R. P. 1992. An attempt to produce an apothecial state of *Botrytis elliptica* in vitro. Acta Hort. 325: 689-693.
6. Coley-smith, J. R., Verhoeff, K., and Jarvis, W. R. 1980. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London, 318 pp.
7. Dashwood, E. P., and Fox, R. A. 1988. Infection of flowers and fruits of red raspberry by *Botrytis cinerea*. Plant Pathol. 37:423-430.
8. Dhinrra, C.D., and Sinclair, J.B. 1985. Basic Pathology Methods. CRC Press, INC, New York, 355pp.
9. Doss, R. P., Chastagner, G. A., and Riley, K. L. 1984. Techniques for inoculum production and inoculation of leaves with *Botrytis elliptica*. Plant Dis. 68: 854-856.
10. Doss, R. P., Chastagner, G. A., and Riley, K. L. 1986. Screening ornamental lilies for resistance to *Botrytis elliptica*. Sci. Hort. 30:237-246.
11. Doss, R. P., Chastagner, G. A., and Riley, K. L. 1988. Infection of easter lily leaves from conidia of *Botrytis elliptica*. Can. J. Bot. 66: 1204-1208.
12. Doss, R. P., Chastagner, G. A., and Riley, K. L. 1988. Streaking of lily leaves associated with infection by *Botrytis elliptica*. Plant Dis. 72: 859-861.
13. Hsiang, T., and Chastagner, G. A. 1991. Growth and virulence of fungicide-resistant isolates of three species of *Botrytis*. Can. J. Plant Pathol. 13:226-231.
14. Hsiang, T., and Chastagner, G. A. 1992. Production and viability of sclerotia from fungicide-resistant and fungicide-sensitive isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica* and *B. tulipae*. Plant Pathol. 41:600-605.
15. Kerssies, A. 1994. Effects of temperature, vapour pressure deficit and radiation on infectivity of conidia of *Botrytis cinerea* and on susceptibility of gerbera petals. Eur. J. Plant Pathol. 100:123-136.
16. Lopez-Herrera, C. J., Verdu-Valiente, B., and Melero-Vara, J. M. 1994. Eradication of primary inoculum of *Botrytis cinerea* by soil solarization. Plant Dis. 78:594-597.
17. McClellan, W. D., and Hewitt, W. B. 1973. Early *Botrytis* Rot of Grapes : Time of Infection and Latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. Phytopathology 63:1151-1157.

18. Salinas, J., and Schots, A. 1994. Monoclonal antibodies-based immunofluorescence test for detection of conidia of *Botrytis cinerea* on cut flower. *Phytopathology* 84:351-356.
19. Salinas, J., Glandorf, D. C. M., Picavet, F. D., and Verhoeff, K. 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Neth. J. Plant Pathol.* 95:51-64.
20. Sommers, L. E., Gilmour, C. M., Wildung, R. E., and Beck, S. M. 1981 The Effect of Water Potential on Decomposition Processes in Soil. Pages 23-97 in: *Water Potential Relations in Soil Microbiology*. eds. S.S.S.O.A., Madiso, Wisconsin, 151pp.
21. Tan, K. K., and Epton, H. A. S. 1973. Effect of light on the growth and sporulation of *Botrytis cinerea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 61:147-157.
22. Townsend, B. B. and Willetts, H. J. 1954. The development of sclerotia of certain fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 37 : 213-221.
23. Van den Berg, L., and Lentz, C. P. 1981. The effects of relative humidity and temperature on survival and growth of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Neth. J. Plant Pathol.* 87: 55-64.

### ABSTRACT

Chen, L. C.<sup>1,2</sup>, Chen, T. Z.<sup>1</sup>, and Chung, Y. W.<sup>1</sup> 1998. Effect of temperature, water potential, and light illumination on the spore and sclerotia germination, mycelial growth, sporulation, and sclerotia formation of *Botrytis elliptica* and *B. cinerea*. *Plant Pathol. Bull.* 7:167-176. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup> Corresponding author: E-mail:lcchen@dragon.nchu.edu.tw ; Fax:04-2857990)

The optimum temperature for mycelial growth of *Botrytis elliptica* was ranged from 12 to 24 C . The sclerotia germinated at the temperature ranging from 8 to 28 C. The sclerotia germination ratio were not significantly difference in different temperature. The total numbers of sclerotia reformation was greatly increased at 12 C, and no sclerotia was formed at 28 C. The optimum temperature for sporulation of *B. elliptica* range from 12 to 20 C, and the conidial germination ranged from 8 to 28 C. The conidia of *B. elliptica* incubated at 20 and 24 C have longer germ tube, and the conidia couldn't germinate at 32 C. The isolates of *B. elliptica* could grow in the water potential ranging from -7.3 bar to -70 bar. The optimum water potential was -31 bar. The sclerotia of *B. elliptica* under day and night at 34 C / 24 C could germinate but the mycelial growth was apparently inhibited. The mycelial incubated under this condition for one month couldn't induce the sclerotia formation and conidia production, but return to grow at 20 C. In regards, this results of *B. cinerea* isolate posses some diversity. The environmental effects on conidia germination, mycelial extension, sporulation and sclerotia formation were all in accordance to the previous field observation as regard to the correlation of pathogen activities and in the low temperature and high humidity. The presented data provided a scientific basis useful in the strategy of integrated management of lily disease in Taiwan.

key words: *Botrytis elliptica*, mycelial growth, sporulation, sclerotia formation