

木瓜疫病菌 *Phytophthora palmivora* Butler 胞囊產生之研究¹

黃 東 煌 呂 理 藻²

(接受日期 民國65年11月10日)

摘要: 木瓜疫病菌 *Phytophthora palmivora* 在黑暗中，於合成培養基上，28C 為胞囊產生之最適溫度，但在該溫度下幾不產生厚膜孢子，反之 32C 為厚膜孢子產生之最適溫度，但幾無胞囊產生。

本菌菌絲層 (mycelial mat) 於 28C 下，最有利胞囊產生條件為，以礦物鹽液浸洗菌絲層 3 次，徹底除去培養菌絲層合成培養液中之有機養分，而後吸除浸洗用礦物鹽液，使菌絲層之通氣性良好，再於 2700 燭光 (lux) 之日光燈下照光 36 小時，則每 150 倍視野中，平均可見 250 個胞囊。浸洗條件下通氣性不良時，每視野僅可見 0—20 個圓形，大小 15 μ m，即正常厚膜孢子一半大小，但細胞壁極薄之構造物。通氣性良好，且有養分及照光時，或以去離子水洗去礦物鹽液及養分而在黑暗情況下，皆能產生不少之胞囊。故通氣性，照光，礦物鹽液浸洗及有機養分之去除皆能促進胞囊的產生。

以去離子水洗除菌絲層之養分及礦物鹽，再分別以不同濃度之 Ca, Mg, K 及 Na 等陽離子鹽液及 NO₃, SO₄, H₂PO₄ 及 Cl 等陰離子之鉍鹽單獨去洗後，再使通氣性良好，經照光結果顯示，陽離子鹽液對胞囊產生之促進，皆較鉍鹽為大，其中以鈣最大，鐵次之，鉉及鉀又次之。鈣鹽中以硝酸鈣在 10⁻³M 時效果最好。

疫病菌屬 (*Phytophthora* spp.) 為一極重要且分佈及發生普遍之植物病原菌。該屬病菌多以胞囊及由胞囊釋出之游走子侵入寄主。Dukes 氏研究煙草疫病菌 *P. parasitica* var. *nicotianae* 證明菌株產生胞囊，釋放游走子及游走子之游動能力與其致病性成正相關⁽¹¹⁾。因此對於本屬菌胞囊產生因子之研究或許有助於該等病害之防治。

Waterhouse 女士早於 1931 年報告，濕度，光度，溫度，氧氣及養分等能影響胞囊之產生⁽²⁷⁾。迄今所知有關胞囊產生之因子包括溫度^(5,23,24,26)，濕度^(23,24)，光^(2,5,13,14,23,26)，pH 值^(23,25,26)，通氣^(5,6)，養分濃度^(8,17,26)，固醇類^(13,14)，土壤浸出液或細菌分泌物^(3,4,7,19-22,30)及礦物鹽液等^(8,16,28)。

本文報導利用木瓜分離所得 *P. palmivora* 培養菌絲層後探討照光，通氣性，礦物鹽液及有機養分對胞囊產生之影響，並證明鹽液中之陽離子具有促進胞囊產生之作用。

材 料 與 方 法

菌株及菌絲層: 以茄子果實誘鉤 (baiting) 木瓜果實疫病菌，而後分離培養於 potato dextrose agar (PDA) 上。本試驗所使用之菌株為分離所得 20 菌株中之 P₁₅，係生長最速產胞最多者⁽¹⁾。

不含洋菜之菌絲層乃把游走子懸浮液 2ml，滴入直徑 5cm 內裝 5ml 合成培養液之培養皿中，

1. 臺灣植物保護中心植物病理組研究報告第 9 號。本文為第一作者碩士論文之部分資料。
2. 國立中興大學植物病理學系前研究生及臺灣植物保護中心植物病理組校正。

置於 28C 黑暗下培養 24 小時，即可得附着於皿底，菌齡一致，不含洋菜之菌絲層。至於游走子懸浮液乃接 15-20 小菌塊於固體之合成培養基平板上，置於 28C，黑暗之定溫箱中使其生長 1 日，菌絲長滿全皿後，每皿倒入 10ml 礦物鹽液，浸洗 20 分鐘，而後吸去此液，並於 28C 下 2700lux 日光燈下照光 1 日，促進產生大量胞囊。把 5ml 之無菌去離子水加入長胞囊之皿中，復將培養皿移入 10C 定溫箱中，行冷卻處理 (chilling) 20-30 分鐘，然後取出置放於 25-30C 室溫中，經 30 分鐘後可得數量極多之游走子。

培養基及礦物鹽液之配製：合成培養基乃修改中興大學植物病理學系陳教授大武講義“臺灣疫病菌屬之研究”。每 1 公升所含成分如下： KH_2PO_4 0.5g; β -sitosterol (50mg/ml) 溶於 dimethyl chloride 者 1ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g; thiamine chloride, 1mg; asparagine, 2g; glucose, 20g; micro element solution, 1ml 加去離子水至 1 公升後，以 KOH 調節 pH 至 6.5，若需用固態時加入 20g 洋菜粉。Microelement solution 配法如下 (g/l) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.398; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.078; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.052; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.072; 加去離子水成 1 公升。

礦物鹽液乃 Hoagland 氏液中除去酒石酸鐵者，其配法如下： $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5M, 10ml; KNO_3 , 0.5M, 10ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2M, 10ml; KH_2PO_4 , 0.1M, 10ml; 加去離子水至 1 公升。

胞囊產生試驗：胞囊或厚膜孢子皆於培養後，在 150 倍顯微鏡下計數每視野中之數目，重複 3 皿，每皿計數 10 視野，以取得其平均值。

固體合成培養基上胞囊產生之試驗乃把菌塊接種於平板中央，置黑暗中於 16, 20, 24, 28 及 32C 定溫箱中培養 5 天後計數，同時計數厚膜孢子。

照光，通氣性，礦物鹽液及養分對胞囊產生之影響，乃把培養於合成培養液 24 小時之菌絲層，經如下處理：1) 吸除合成培養液後，不浸洗；或再倒入合成培養液，2) 吸除合成培養液後，以 10ml 無菌去離子水浸洗 5 分鐘，吸除去離子水，重複浸洗 3 次，最後吸除去離子水；或再倒入去離子水，3) 同上，但以無菌礦物鹽液代替去離子水。上述 6 種處理，皆置 28C 定溫箱中，浸液者其深度 1cm，再分照光 (2700lux) 及不照光 (黑暗)，共成 12 種處理，經 12, 24 及 36 小時後取出計數胞囊。

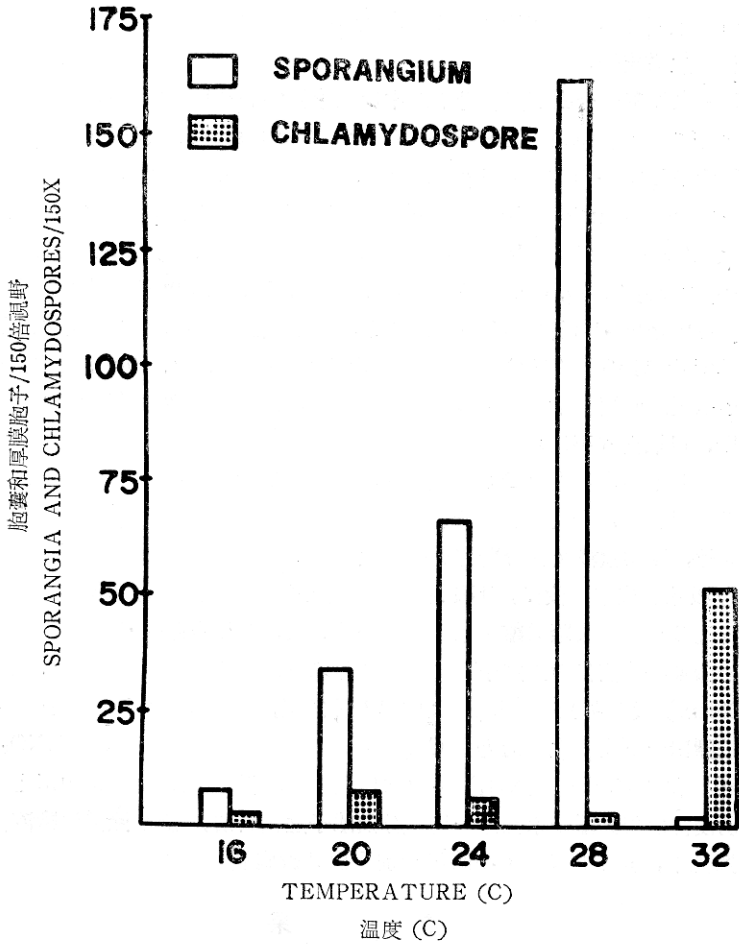
陽離子及鉍鹽對胞囊產生之試驗乃把 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , MgSO_4 , MgCl_2 , KNO_3 , KCl , KH_2PO_4 , NaNO_3 及 NaCl 和 NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$ 及 NH_4Cl 配成 0.5 至 10^{-4}M 之 8 種不同濃度，分別浸洗已用去離子水洗淨一切養分及離子之菌絲層，經吸除浸洗鹽液後在 28C 定溫箱中，2700lux 照光下，經 24 及 36 小時後分別取出計數胞囊。

結 果

溫度對產胞之影響：本菌株於固體合成培養基上培養 5 天，胞囊產生之最適溫度為 28C，雖不照光，150 倍視野中平均約有 160 個胞囊。隨溫度之降低數目劇減。32C 時胞囊數目極少，但却有利於厚膜孢子之形成，每視野約有 50 個 (圖 1)。

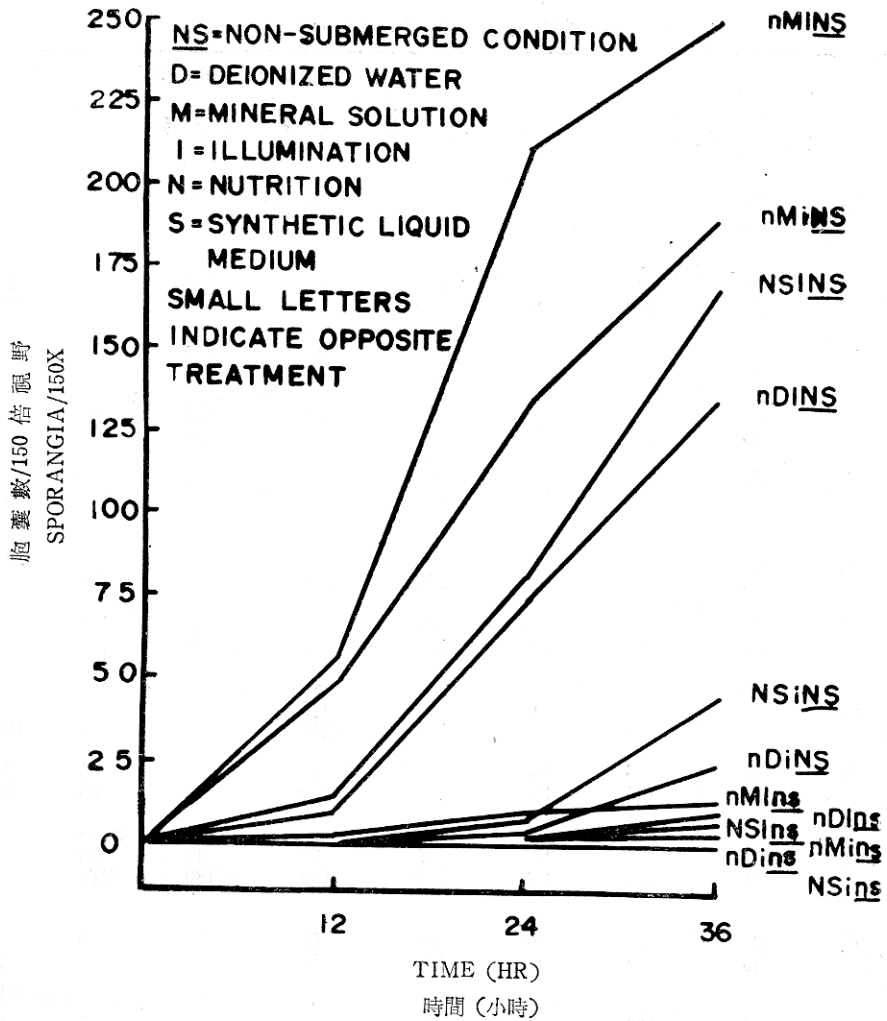
照光，通氣性，養分及礦物鹽液浸洗對胞囊產生之影響：胞囊產生最有利之情況為洗除有機養分，菌絲層經礦物鹽液浸潤後，保持良好通氣性，且照光者。24 小時後每視野平均可見 210 個胞囊，36 小時後增至 250 個。反之，雖洗除有機養分，但未經礦物鹽液浸潤，再加以用去離子水或合成培養液覆蓋菌絲層，使通氣性不良，且不照光，則 36 小時後皆未見胞囊，即通氣性之良好與否，對胞囊產生之影響最大 (圖 2)。

陽離子及鉍鹽對胞囊產生之影響：所試含鈣、鎂、鉀及鈉 4 種陽離子之 9 種無鉍鹽液在濃度適宜時，皆較單獨使用去離子水浸潤菌絲層，有促進產生胞囊之作用。適宜濃度在使用之 2 種鉍鹽及鉍鹽皆為 10^{-3}M ，2 種鎂鹽及 3 種鉀鹽則 MgSO_4 與 KCl 為 0.1M, MgCl_2 與 KNO_3 為 $5 \times 10^{-3}\text{M}$, KH_2PO_4



圖一、溫度對培養在合成培養基不照光下5天後 *P. palmivora* 產胞之影響。

Fig. 1 Effect of temperatures on sporulation of *Phytophthora palmivora* cultivated on synthetic agar medium under dark for 5 days.



圖二、未浸條件下，光照，營養及礦物鹽液對 *Phytophthora palmivora* 菌絲層產胞囊之影響

NS=未浸條件，D=去離子水，M=礦物鹽液，
I=光照，S=合成培養液，英文小字母示相反處理。

Fig. 2. Effect of non-submerged condition, illumination, nutrition and mineral solution on the sporulation of mycelial mat of *Phytophthora palmivora*.

爲 $5 \times 10^{-2} M$ 。9種無機鹽中以 $Ca(NO_3)_2$ 之促進效果最明顯(表1)。

表一、不同鹽類對 *P. palmivora* 產孢囊之影響¹

Table 1. Effects of different salts on sporangium production by *Phytophthora palmivora*¹

鹽類 Salt	處理後時間 Hr after treatment	濃度 Concentration (M)							
		1×10^{-4}	5×10^{-5}	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}	0.1	0.5
去離子水 Deionized Water	24 36	對照 Control (75) (135)							
硝酸鈣 $Ca(NO_3)_2$	24	85	125	160	200	235	50	25	0
	36	200	220	260	350	375	290	280	0
氯化鈣 $CaCl_2$	24	80	130	140	165	190	50	40	0
	36	140	150	160	175	200	120	100	0
硝酸鈉 $NaNO_3$	24	80	90	110	120	155	60	45	0
	36	100	130	150	165	215	95	90	0
氯化鈉 $NaCl$	24	80	85	100	130	180	105	25	0
	36	85	135	150	165	240	120	35	0
硫酸鎂 $MgSO_4$	24	5	25	35	50	110	120	180	30
	36	30	100	160	200	220	230	250	115
氯化鉀 KCl	24	5	20	35	45	105	135	140	10
	36	20	100	110	120	150	195	220	15
氯化鎂 $MgCl_2$	24	15	45	60	135	105	85	55	0
	36	45	80	110	210	155	120	105	0
硝酸鉀 KNO_3	24	5	100	135	185	50	45	20	0
	36	100	155	165	200	90	85	40	0
磷酸二氫鉀 KH_2PO_4	24	25	105	125	60	45	30	20	0
	36	120	140	170	180	180	200	105	0
硫酸銨 $(NH_4)_2SO_4$	2	75	80	83	85	70	10	t	0
	36	140	160	165	170	130	60	5	0
硝酸銨 NH_4NO_3	24	100	70	60	50	35	5	0	0
	36	160	150	145	110	75	10	0	0
磷酸氫二銨 $(NH_4)_2HPO_4$	24	75	50	45	35	25	5	0	0
	36	170	160	150	85	60	10	0	0
氯化銨 NH_4Cl	24	35	20	15	10	5	3	0	0
	36	75	65	35	15	10	5	0	0

1. 三重複平均, 每一處理計數 10 個視野 (每視野 150 倍)

1. Average of 3 replications, each with a microscopical field (150×/field)

至於4種波蘭對胞囊產生之影響，除 NH_4Cl 較對照之去離子水少外，其它雖稍多，但相差不大，且有隨濃度之增高而減少之趨勢。最適濃度在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 為 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 外，其他3種皆在 10^{-4}M (表1)

討 論

疫病菌之胞囊為多核，本菌胞囊分化後經鏡檢可得知釋出15—20個單核或偶具雙核的游走子。因此產生胞囊之過程必先經激烈的有絲分裂，並合成大量的核酸及核蛋白，以構成新細胞核，因而直接或間接影響有絲分裂及/或核酸與核蛋白之合成，皆能影響胞囊之產生。

一般而言，光能促進疫病菌產生胞囊⁽³¹⁾。Aragaki 氏雖報告在綠木瓜果實，照光對胞囊之產生無促進作用，但在蔬菜汁培養基上，波長300—600nm之光，有促進產生胞囊之作用⁽²⁾。本菌於合成培養基上，不照光時雖能產生不少胞囊，但通氣性良好時胞囊之產生最多。光對胞囊產生之作用所了解者仍不多。

養分之存在與否對本菌胞囊產生之影響不如 *P. cinnamomi*⁽⁸⁾ 明顯，養分存在時該菌完全不產生胞囊⁽⁹⁾。但如洗除有機養分則能促進產生胞囊，即養分之存在與胞囊產生之關係非絕對性。至於通氣性對疫病菌之胞囊產生有利，則似無例外，本試驗亦證實本菌確亦如此，即菌絲層只要有液體覆蓋，使通氣性不良，皆不利胞囊之產生(圖2)。

鈣元素除 *P. fragariae* 外⁽⁹⁾，並非疫病菌類生長所必需⁽⁶⁾，但少量時略可促進其生長^(15,16)。故本試驗使用缺鈣之合成培養液中，胞囊仍能正常發育釋出游走子，可能是鈣不用於生長，故濃度低到 10^{-2}M 便有明顯的促進產生胞囊之作用。Yang 等氏報告鈣，鎂及鉀皆能促進 *Pythium* spp. 產胞囊，其中鈣還能促進卵孢子之形成⁽²⁹⁾。鈣為正常之有絲分裂所必需，亦為生成 ATP 及 ADP 有關之 adenosine triphosphatase 及 adenyl kinase 兩種酵素之 activator，又與雙價陽離子和核蛋白彼此間之結合也有關⁽¹⁰⁾，鈣可能因此而有促進產生胞囊之作用。

鈉亦非生長所必需元素，又在 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 便有促進產生胞囊之作用，最適濃度則與鈣鹽者相同，皆在 10^{-2}M 。

鎂是本菌生長所必需元素，為多種酵素，即包括合成核醱及 DNA, RNA 等所需酵素之 activator⁽¹⁰⁾，或因此需較高濃度或較長之時間才見效。

鉀亦為生長所必需，它為某些與醱類代謝有關及 peptide bonds 之形成有關酵素之 activator⁽¹⁰⁾。濃度較高時可促使某些構成核蛋白之 polypeptide 之合成。

鉍鹽雖能被微生物分解利用，但未能如陽離子鹽液，顯著促進胞囊之產生。

Leonian 氏利用 NH_4NO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , KCl , MgCl_2 及 NH_4Cl , K_2SO_4 , MgSO_4 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 供 *P. palmivora* 生長結果，皆以鉍鹽者最不利胞囊之產生⁽¹⁷⁾與本試驗結果相吻合。雖然 Leonian 氏曾認為硝酸根有促進產生胞囊之作用，但吾等認為促進胞囊產生之作用，主要為其所含之礦物陽離子所致。

參 考 文 獻

1. 黃東煌、陳大武、呂理榮 1976. 臺灣木瓜疫病之研究. 植物保護學會會刊 18: (印刷中)
2. Aragaki, M and R. B. Hine. 1963. Effect of radiation on sporangial production of *Phytophthora parasitica* on artificial media and detached papaya fruit. Phytopathology 53:854-856.
3. Ayers, W. A. 1971. Induction of sporangia in *Phytophthora cinnamomi* by a substance from bacteria and soil. Can. J. Microbiol. 17:1517-1523.

4. Ayers, W. A. and G. A. Zentmyer. 1971. Effect of soil solution and two soil Pseudomonads on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193.
5. Brasier, C. M. 1969. The effect of light and temperature on reproduction in vitro in two tropical species of *Phytophthora*. *Brit. Mycol. Soc. Trans.* 52:105-113.
6. Chee, K. H. and F. J. Newhook. 1965. Nutritional studies with *Phytophthora cinnamomi* Rands. *New Zealand J. Agr.* 8:523-529.
7. Chee, K. H. 1966. Relationship of microorganisms to sporulation of *Phytophthora cinnamomi* Rands. *New Zealand J. Agr.* 9:32-43.
8. Chen, D. W. and G. A. Zentmyer. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 58:397-402.
9. Davies M. E. 1959. The nutrition of *Phytophthora fragariae*. *Brit. Mycol. Soc. Trans.* 42:193-200.
10. Develin, R. M. 1969. Plant physiology-functions of the essential mineral elements. Van, Nostrand and Reinhold Co.
11. Dukes, P. D. and J. L. Apple. 1962. Relationship of zoospore production potential and zoospore motility with virulence in *Phytophthora*. *Phytopathology* 52:191-193.
12. Harnish, W. N. 1965. Effect of light on production of zoospores and sporangia in species of *Phytophthora*. *Mycologia* 57:85-90.
13. Hendrix, J. W. 1965. Influence of sterols on growth and reproduction of *Pythium* and *Phytophthora* spp. *Phytopathology* 55:790-797.
14. Hendrix, J. W. 1967. Light cholesterol relationships in morphogenesis of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* sporangia. *Mycologia* 59:1107-1111.
15. Hendrix, J. W. 1969. Cation and sterol effects on growth of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 59:1620-1624.
16. Kennedy, B. W. and D. C. Erwin. 1961. Some factors influencing sporangium formation of a *Phytophthora* species isolated from lucerne in certain salt solution. *Brit. Mycol. Soc. Trans.* 44:291-297.
17. Leonian, L. H. 1925. Physiological studies on the genus *Phytophthora*. *Amer. J. Bot.* 12:444-498.
18. Lopatecki, L. E. and W. Newton. 1956. The nutrition of *Phytophthora*. *Can. J. Bot.* 34:751-757.
19. Manning, W. J. and D. F. Crossan. 1966. Effects of particular soil bacterium on sporangial production in *Phytophthora cinnamomi* in liquid culture. *Phytopathology* 56:235.
20. Marx, D. H. and F. A. Haasis. 1965. Induction of an aseptical sporangialin formation in *Phytophthora cinnamomi* by metabolic diffusates of soil microorganisms. *Nature* 206(4985)673-674.
21. Marx, D. H. and W. C. Bryan. 1969. Effect of soil bacteria on the mode of infection of pine roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 56:614-619.
22. Mehrlich, F. P. 1935. Nonsterile soil leachate stimulating to zoosporangia production by *Phytophthora* sp. *Phytopathology* 25:432-435.
23. Peries, O. S. & T. M. Fernando. 1966. Studies on the biology of *Phytophthora meadii*. *Brit. Mycol. Soc. Trans.* 49:311-325.
24. Trujillo, L. E. 1965. The effects of humidity and temperature on *Phytophthora* blight of taro. *Phytopathology* 55:183-188.
25. Turner, G. J. 1969. Effects of hydrogen ion concentration on *Phytophthora palmivora* from *Piper nigrum*. *Brit. Mycol. Soc. Trans.* 52:419-423.

27. Vujcic, R. and J. Colhoun. 1966. Asexual reproduction in *Phytophthora erythroseptica* Brit. Mycol. Soc. Trans. 49:245-254.
27. Waterhouse, G. M. 1931. The production of conidia in the genus *Phytophthora*. Brit. Mycol. Soc. Trans. 15:311-322.
28. Wills, W. H. 1954. Sporangium formation by *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* (Breda de Rean) Tucker. J. Elisha Mitchel Soc. 70:235-243.
29. Yang, C. Y. and J. E. Mitchell. 1965. Cation effect of *Pythium*. spp. Phytopathology 55:1127-1131
30. Zentmyer, G. A. 1965. Bacterial stimulation of sporangium production in *Phytophthora cinnamomi*. Science 150:1178-1179.
31. Zentmyer, C. A. and D. C. Erwin. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora*. Phytopathology 60:1420-1127.

Production of Sporangia by *Phytophthora palmivora* Butler¹

Huang, T. H. and L. S. Leu²

The optimum temperature for sporangium production by *Phytophthora palmivora* isolated from papaya fruit was 28C, when the fungus was grown under dark on plates containing synthetic agar medium. The number of sporangia decreased as the temperature decreased. Chlamydospore production by the same fungus was best at 32C among the temperatures tested.

The largest number of sporangia was obtained among various treatments used, when mycelial mats which were washed with mineral solution (Hoagland's solution deleting ferric tartrate) were kept moist and under light for 36 hr. Under such conditions, the average number of sporangia produced per 150×microscopic field was 250. Good aeration seemed to be the most prominent factor in the induction of sporangium formation. Under submerged conditions only 0-20, 15μm, i. e., half in size of chlamydospore, with thin-walled structure, per microscopic field were observed.

Salt solutions of calcium, magnesium, potassium and sodium in different concentrations were used to wash mycelial mats. The results revealed that cation stimulated production of sporangia in the descending order of Ca, Mg, Na, and K. Calcium nitrate at 10⁻²M was the best with 375 sporangia per microscopic field.

-
1. Research Paper No. 9, Plant Pathology Division, Plant Protection Center, Taiwan, Part of the Master's thesis of the senior author.
 2. Former graduate student, Department of Plant Pathology, Chung Hsing University, and Senior Specialist, Plant Protection Center, Taiwan.