

白絹病菌菌核形成與發育

郭克忠 劉媚恩

國立臺灣大學植物病蟲害系

(接受日期：民國 73 年 8 月 20 日)

摘 要

姚氏瓊脂上培養 36 小時之白絹病菌菌落移到蘇氨酸瓊脂上後，主菌絲向前生長速度減慢，開始產生分枝並進行分化。6 至 8 小時後，氣生菌絲所產生之分枝菌絲彼此聚集而成菌絲結。12 小時之後，菌絲結聚合而在菌落邊緣形成肉眼可見之微細針尖狀菌絲聚合體。12 至 20 小時之間發育成疏鬆毛茸狀之苞芽。移入 20 小時後，苞芽內部組織開始分化而成白色幼菌核。36 小時後，菌核黃化，皮層細胞明顯膨大，一星期後，菌核成爲暗褐色，內部組織可明顯區別出外皮層，皮層及髓三部份。

(關鍵字：白絹病菌，菌核形成與發育，形態發生)。

ABSTRACT

Kuo, K.C. and Thomas Mei-En Liu (1984). The Sclerotial Formation and Development of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Plant Prot. Bull. (Taiwan, R.O.C.) 26 : 347~354 (Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, R. O. C.)

When 36-hour old colony on Joham's agar was transferred to L-threonine agar, the growth of main hyphae of *Sclerotium rolfsii* Sacc. was slow down and produced branch aerial hyphae which was ready to differentiate into sclerotia. Irregular branch hyphae produced by aerial hyphae interwove and coalesced to form hyphal knots after 6-8 hr of transferring. Another 4 hours late, very fine pin head-like mycelial aggregate could be seen by naked eyes at the margin of colony which was formed by coalescence of hyphal knots. After 12 to 20 hours of transferring, mycelial aggregate developed to loosen fluffy sclerotial primordium. Afterwards, the sclerotial primordium turned to white young sclerotia and the inner portion of its began to differentiation. After 36 hours of transferring, sclerotia became yellow in color, cortex cell enlarged evidently. One week later, sclerotia fully matured to became dark brown, the

inner tissues of sclerotia could be differentiated from rind, cortex, and medulla clearly.

(Key words: *Sclerotium rolfii* Sacc., sclerotial formation and development, morphogenesis).

緒 言

白絹病 (Southern Blight) 是本省及世界各地多種作物及觀賞植物之重要病害⁽²⁾。病原真菌 (*Sclerotium rolfii* Sacc.) 無分生孢子，於田間亦不易形成有性孢子，殘存與傳播均賴於菌核⁽³⁾。菌核形成與發育之研究雖不少^(4,7)，但有關菌核發育過程中形態變化之報導却不多⁽⁷⁾。本文即報導以光學顯微鏡觀察所得之白絹病菌菌核形成及發育時之形態變化過程。

材料與方法

供試菌株 SR2 分離自屏東九如之大豆病株。試驗前先於姚氏瓊脂 [Joham's agar, K_2HPO_3 , 0.004M, NH_4NO_3 , 0.0125M; KCl, 0.002M; $MgSO_4$, 0.0015M, Fe^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , 2.0ppm (以上均為日本和光牌特級試藥); Thiamine hydrochloride, 1ppm; glucose 4% (w/v) (以上均為美國 Sigma 牌試藥); Difco Bacto Agar 2% (w/v)]⁽⁶⁾ 平板上更新培養三次。姚氏瓊脂分裝於內徑85毫米之培養皿中，每皿10毫升製成平板。接種源為姚氏瓊脂平板上培養2日菌落邊緣直徑3毫米菌絲塊。培養狀況為 30°C，無光。

顯微鏡觀察材料以蘇氨酸 (L-Threonine) 菌核誘起法⁽¹⁾ 製備：無色透明之玻璃紙購自市面，裁成 2.5 公分見方，浸於清潔劑溶液中過夜，經自來水洗淨後，再以蒸餾水漂洗三次後，浸入蒸餾水中以高壓殺菌釜殺菌 (121°C, 15分鐘)。殺菌後之玻璃紙舖於姚氏瓊脂平板上，接上接種源培養，36小時後連同玻璃紙把白絹病菌之菌落放到蘇氨酸瓊脂平板 ($4 \times 10^{-3}M$ L-Threonine, Sigma; 2% Difco Nobel agar (w/v), 10毫升/培養皿)，繼續培養。移到蘇氨酸瓊脂平板後，定期取下白絹

病菌之菌落進行以下之處理與觀摩：(1)直接以反射式顯微鏡觀察，(2)以含有 0.05% 棉藍之乳酚液 (Lactophenol solution) 染色後觀察，(3)菌核苞芽以上述染液染 24~48 小時⁽⁷⁾ 後，再以冷凍切片機 (IEC International Cryostat, Model CTI) 切片後觀察。(4)石臘切片以 Jensen (1962)⁽⁵⁾ 所述之方法行之。不同發育期之菌核經 FAA 固定液 (Formalin: glyacial acetic acid: ethyl alcohol=5:5:90) 固定12~24小時後，以50%乙醇洗數次。再經特丁醇 (t-Butyl alcohol) 一乙醇系列脫水，共分8個步驟，每步驟2~8小時。其後以 Tissue Prep. TM 610 (Fisher Co.) 滲臘12小時後包埋。再以 Erma 切片機切片。臘帶以蛋白與甘油 (1:1) 之混合液粘著於玻片上。經脫臘後以 Fisher Permount 封片。

全部試驗以 Nikon Optiphot 系列顯微鏡觀察，Nikon HFX 系統攝影，底片使用 Kodak Panatomic X。

結 果

在顯微鏡下，白絹病菌菌絲可分成幾類，按菌絲分枝方式及粗細不同，可分為主菌絲及非主菌絲二類。主菌絲為構成菌落之主幹菌絲，縱貫整個菌落，其組成細胞直徑約 $5\mu m$ ，長度則不定。菌落邊緣之幼菌絲細胞較長，隔膜很少。老菌絲則隔膜增多，細胞較短。隔膜處偶可見扣子體 (Clamp connection)。主菌絲常粘在一起而成菌絲束 (Mycelium strand)。

非主菌絲是主菌絲分枝而長出之第二次菌絲 (Secondary hyphae) 及由其再長出之第三次菌絲 (Tertiary hyphae) 所構成，前者寬約 $3\mu m$ ，後者在 $0.5\sim 3\mu m$ 之間，均不見扣子體，但有旺盛的菌絲癒合 (Anastomosis)。

在姚氏培養基，若按生長方式不同，又可分為埋生菌絲，表生菌絲及氣生菌絲三種。埋生菌絲乃埋藏於瓊脂內生長之菌絲，但大部份菌絲分佈於近瓊脂表面處，往底層則分布較疏。菌絲寬度在 $2\sim 6\mu\text{m}$ 間。表生菌絲平貼於瓊脂表面生長，包括了主菌絲及非主菌絲。氣生菌絲則自表生菌絲分枝向空中發展而成，常彼此癒合。若以蘇氨酸誘起法培養於玻璃紙上時，則僅能得到表生菌絲與氣生菌絲而已。

以反射顯微鏡(Nikon Episcopic Optiphot)觀察，白絹病菌在姚氏培養基培養，主菌絲向前生長，偶可見第二次氣生菌絲長出(圖1~A)，但氣生菌絲很少再長出側生分枝。

菌落移入蘇氨酸瓊脂之後，菌絲開始分化，主菌絲生長速率降低，長出許多側生分枝。6~8小時之後，氣生菌絲失去向前失長之習性，而向左右甚或向後生長，彼此聚集(圖1~B)，不同來源的側生分枝彼此糾結聚合成菌絲結(hyphal knot)(圖1~C)。菌絲結形成後再長出新的菌絲以形成新的菌絲結，如此不斷反覆而形成肉眼可見之微細針尖狀菌絲聚合體(mycelial aggregate)(圖1~D)。菌絲聚合體隨菌絲結發育而逐漸互相癒合，最後數個聚合體形成一個苞芽(Primordium)(圖1~E.F.G)。

以乳酚液染色後，可見表生主菌絲失去頂端優勢(Apical dominance)而產生不規則之側生分枝(圖2~A)且分枝再行粘合(圖2~B)而形成菌絲結(圖2~C)。許多菌絲結聚集方才形成菌絲聚合體(圖3~A, B)。

苞芽經冷凍切片觀察，內部只見到疏鬆之菌絲(圖4~A)。菌落移到蘇氨酸瓊脂上16至24小時之間，苞芽成為白色圓球形之幼菌核。此時距菌核外緣 $20\mu\text{m}$ 處菌絲排列緊密，棉藍染色較深(圖4~B)。菌核外表菌絲則逐漸崩解消失。蘇氨酸瓊脂上24到48小時後，菌核外觀開始黃化，皮層細胞逐漸加大，棉藍染色甚深。由於膨大細胞彼此擠壓，細胞間之界限並不明顯(圖4~C)。蘇氨酸瓊脂上48~96小時後菌核外觀已成黃褐色，外皮層細胞扁平化，其外偶可見一些菌絲殘體。此時外皮層、皮層及髓之發育仍在進行，尤其是髓層細胞

壁正逐漸加厚中(圖4~D)。一週後，菌核完全成熟，各層組織界限分明。外皮層細胞空胞化，內容物消失，細胞壁加厚，度量100個細胞，細胞平均大小為 $5.83\times 2.83\mu\text{m}$ 。向內則為皮層，約有5~7層細胞，細胞壁薄，排列緊密，大小平均為 $6.67\times 7.50\mu\text{m}$ 。最內層為髓層，細胞形狀不規則，寬度平均 $3.3\mu\text{m}$ 。細胞間隙亦較大(圖4~E)。

討 論

白絹病菌菌核之萌起及發育過程之形態變化一向少有研究⁽⁹⁾，唯有 Townsend 與 Willetts (1954) 作了較詳細的觀察⁽⁸⁾，但仍無法清晰地指出菌核萌起及分化之時間而只能用菌核的顏色作為發育期的標準。至於菌核形成早期之變化過程則不甚明瞭，此或由於所用方法限制之故。本試驗中使用蘇氨酸瓊脂菌核誘起法⁽¹⁾，使菌核萌起時間及位置均可預期，因此可觀察菌核出現前之變化。但此方法却無法使所有苞芽仍繼續發育以致於成熟，可能由於在移入蘇氨酸瓊脂平板前由姚氏瓊脂平板所得之能量仍不足以供給所有苞芽發育成熟之故。

Townsend 與 Willetts 指出白絹病菌之菌核萌起乃自單一菌絲束或二根菌絲束之交叉點上開始產生分枝，彼此錯綜纏繞而成⁽⁸⁾。本觀察中却發現菌核形成多由數條菌絲同時多叉分枝纏繞所形成之菌絲結反覆聚集融合而形成，並非自一特定之菌絲束交叉點「位置」開始不斷多叉分枝，然後再形成菌核苞芽。

綜觀結果，菌核形成之初期特徵應為氣生菌絲失去極性生長之習性而且增加分枝，彼此錯綜交纏而成菌絲結。Chet 與 Henis 曾認為菌絲間或許有互相吸引之物質而促使菌絲集中而形成菌核⁽⁴⁾。本觀察中發現失去極性生長習性之菌絲及菌絲結之菌絲棉藍染色程度比他處為深，表示該處細胞質較他處為稠密。如有此種假定之物質存在，似應存在於該處。至於有無此假定物質？究為何物質？如何產生？則有待進一步之研究方能究明。

在菌核內部構造方面，前人均僅描述成熟菌核之內部構造^(4,9)，至於其發育之過程少有涉及，唯 Townsend 與 Willetts 曾加描述⁽⁸⁾，

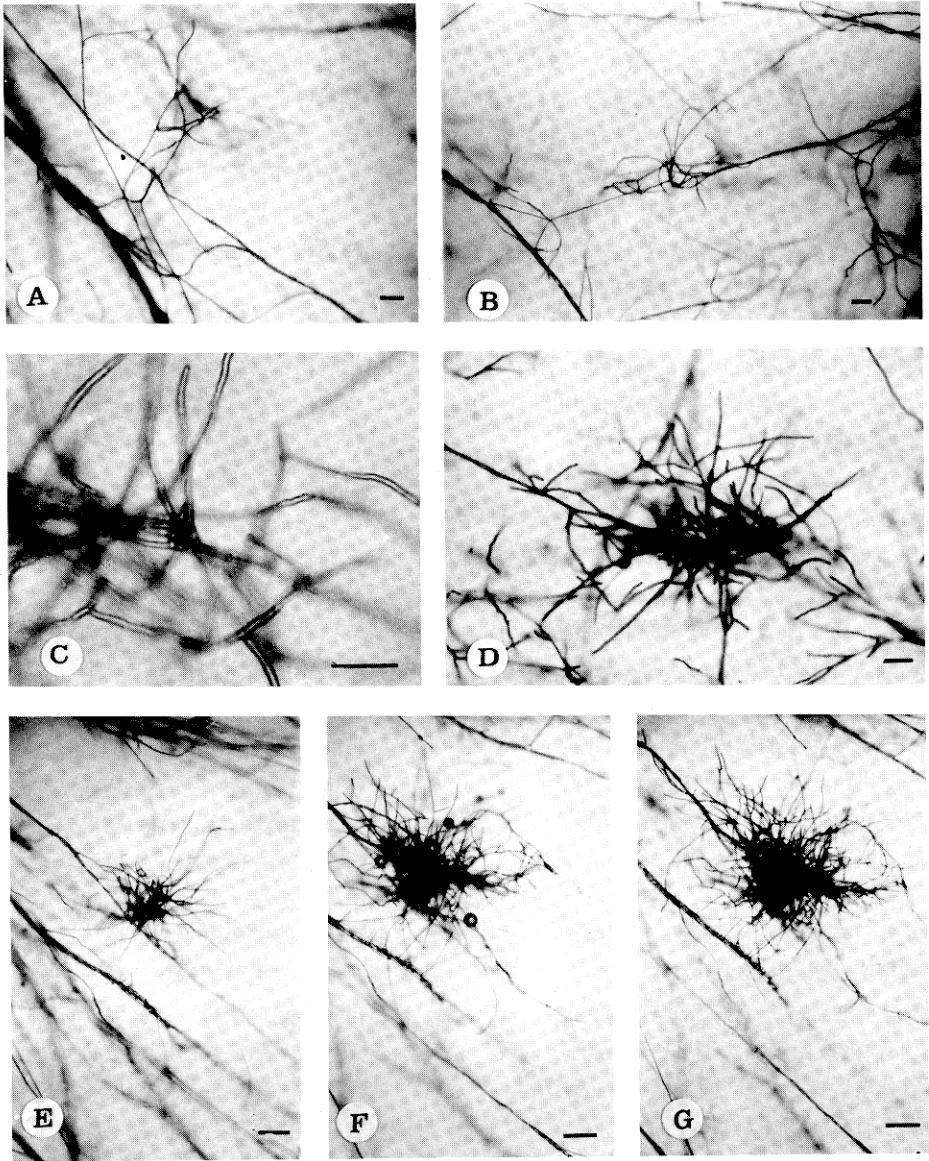


圖 1. 蘇氨酸瓊脂上白絹病菌菌核苞芽形成過程

(Fig. 1. The formation processes of sclerotial primordia of *Sclerotium rolfsii* Sacc. after transferring to L-threonine agar)

- A) 姚氏瓊脂上未分化之氣生菌絲 (Undifferentiated aerial hyphae on Joham's agar)。
 - B) 6小時後，氣生菌絲聚集 (Aerial hyphae aggregation, after 6 hrs of transfer)
 - C) 自不同菌絲長出之氣生菌絲，彼此糾結粘合成菌絲結 (Aerial hyphae branches from different parent mycelium are interwoven to form hyphal knot after transfer)
 - D) 8小時後，形成菌絲聚合體 (Mycelium aggregates formed, after 8 hrs of transfer)
 - E) 10小時後之苞芽 (Sclerotial primordium after 10 hrs of transfer)
 - F) 12小時後之苞芽 (Sclerotial primordium after 12 hrs of transfer)
 - G) 14小時後之苞芽 (Sclerotial primordium after 14 hrs of transfer)
- 以反射式顯微鏡觀察。1~4中之標尺表 10 μ m, 5~7中之標尺表 20 μ m (observed by episcopic microscope, the bar of 1-4 represents 10 μ m, 5-7 represents 20 μ m)

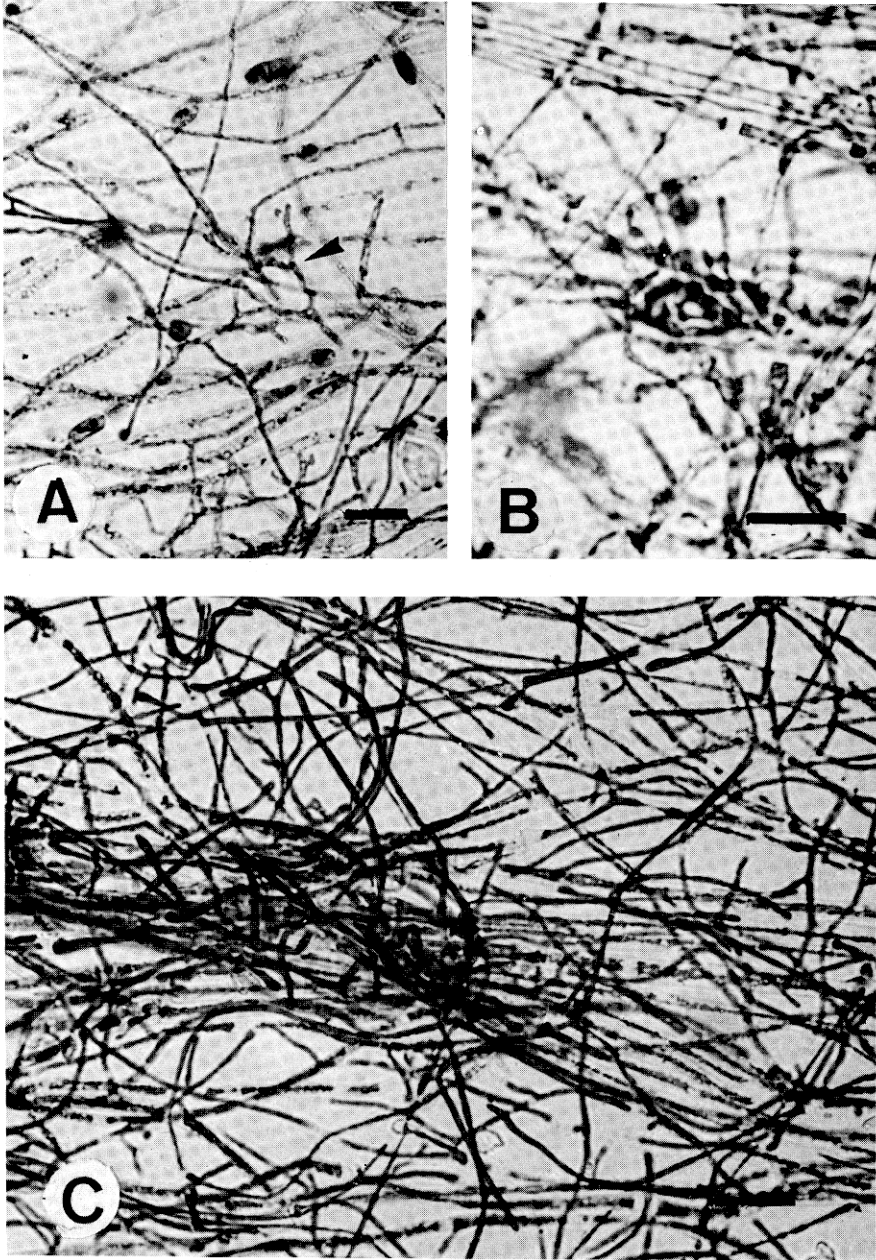


圖 2. 蘇氨酸瓊脂上白絹病菌菌核結之形成

(Fig. 2. The formation of hyphal knot of *Sclerotium rolfsii* Sacc. after transferring to L-threonine agar)

- A) 5 小時後，氣生菌絲失去頂端優勢，產生不規則分枝（箭頭所示）（Aerial hyphae lost apical dominance, became to produce irregular branch hyphae (arrowhead indicated), after 5 hrs of transfer)
- B) 6 小時後，分枝菌絲互相卷曲，纏繞而粘合(Branched aerial hyphae coiled, interwoven and stuck together, after 6 hrs of transfer)
- C) 7 小時後，菌絲結形成，注意其寬窄不一之菌絲 (Hyphal knot formed, after 7 hrs of transfer. Note irregular width of hyphae)
- 觀察材料以 0.05% 棉藍染色，標尺表 10 μm (Observed materials stained by 0.05% cotton blue, bar represents 10 μm)

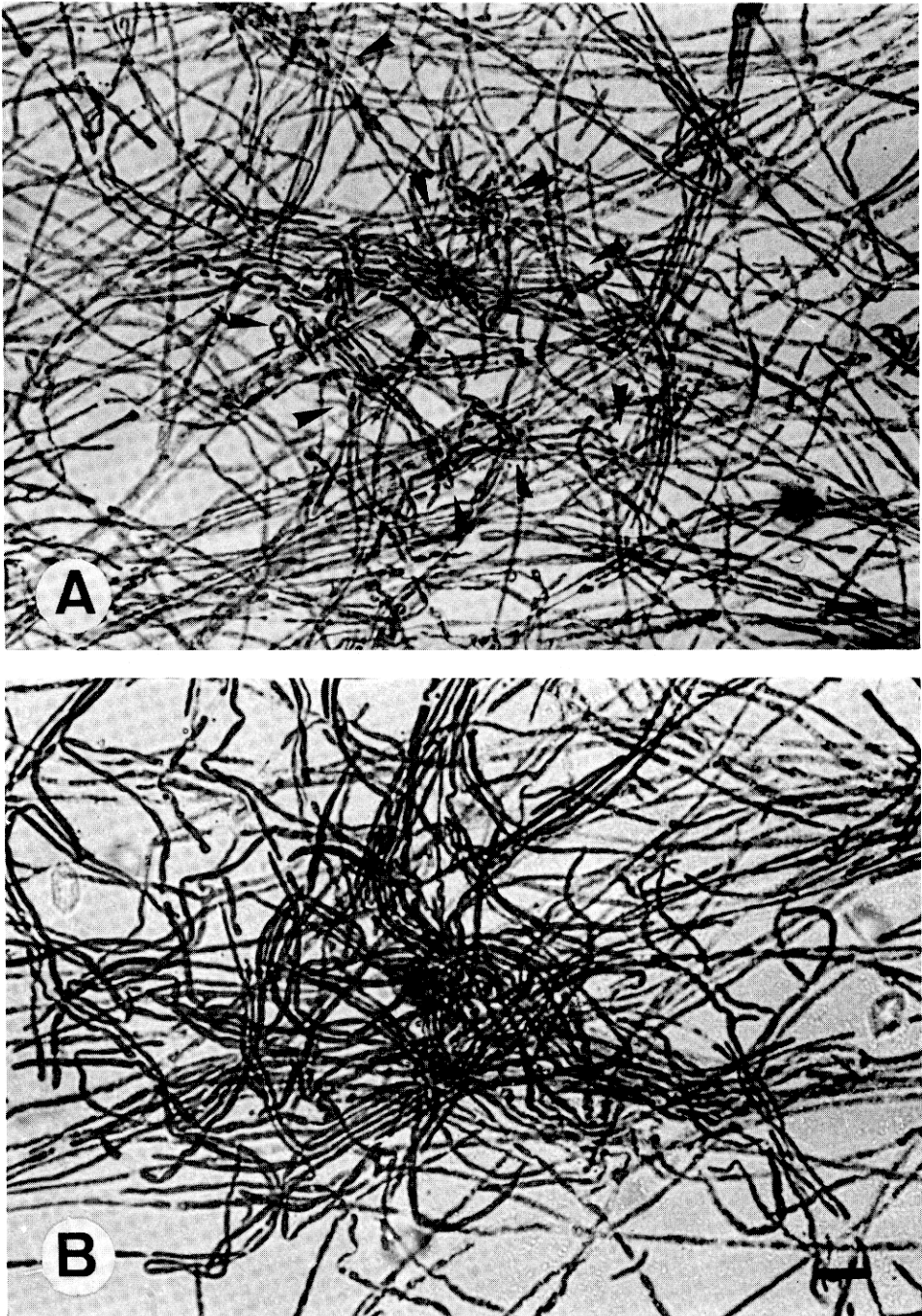


圖 3. 白絹病菌菌絲聚合體形成

(Fig. 3. The formation of mycelial aggregate of *Sclerotium rolfsii* Sacc.)

- A) 菌絲聚合體形成初期，可見許多菌絲結 (箭頭所示) (Many hyphal knots (arrowhead indicated) in early stage of mycelial aggregate formation, after 7 hrs of transferring to L-threonine agar)
- B) 菌絲聚合體形成中期，菌絲互相纏繞 (Mycelium interwoven at mediate stage of mycelial aggregate formation, after 8 hrs of transferring to L-threonine agar)
 觀察材料以 0.05% 棉藍染色，標尺表 10 μ m (observed materials stained by 0.05% cotton blue, bar represents 10 μ m)

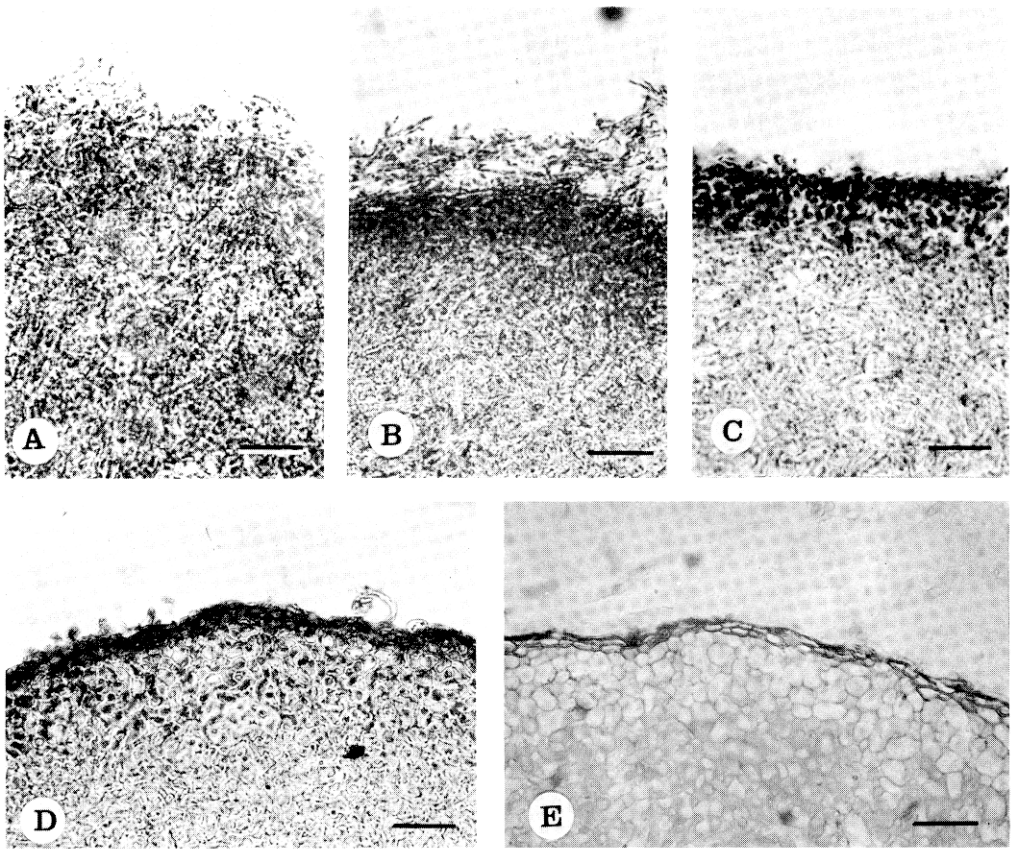


圖 4. 蘇氨酸瓊脂上白絹病菌菌核之發育

(Fig. 4. Developing processes of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* Sacc. after transferring to L-threonine agar)

- A) 14小時後之苞芽，由疏鬆之菌絲組成 (Primordium was constituted by loosen mycelium, after 14 hrs of transfer)
- B) 20小時後之白色幼菌核。注意距外緣約 $20\mu\text{m}$ 處棉藍染色較深 (White young sclerotium, after 20 hrs of transfer. Note the deeper cotton blue stained region at $20\mu\text{m}$ near outer edge)
- C) 36小時之黃色菌核，外圍菌絲崩解，皮層細胞膨大。 (Yellow sclerotium, after 36 hrs of transfer, outer surface hyphae lysed and cortex cell enlarged)
- D) 72小時之黃褐色菌核，外層細胞空胞化，皮層細胞繼續膨大而髓層細胞壁加厚 (Yellow sclerotium, after 72 hrs of transfer, rind cell became vacuolized, cortex cell continuing to enlargement and medulla cell wall became more thicked)
- E) 7日後之成熟菌核，內部構造發育齊全而分成外皮層，皮層及髓層 (Matured sclerotium, after 7 days of transfer, inner structure were fully developed to rind, cortex and medulla)

標尺表 $20\mu\text{m}$ (Bar represents $20\mu\text{m}$)

但亦語焉不詳。本觀察中發現苞芽期菌核由疏鬆菌絲構成，內部並未開始分化，與 Townsend 與 Willetts⁽⁸⁾ 所述相同，但在白色幼菌核期，即移到蘇氨酸瓊脂上16至24小時之間，距菌核外緣 20 μ m 處，菌絲細胞排列緊密而且棉藍染色程度較深。在菌核內部之發育分化上此處應具有相當之意義。由結果中顯示白絹病菌菌核之發育是由外向內，即先由外皮層開始分化，其次為皮層，最後為髓層。菌核完全成熟變成暗褐色時，內部組織已分化完全，可清楚地分別為三層。

謝 辭

本研究承行政院國家科學委員會支助經費 (計畫編號：NSC72-0409-B 002-32)，謹此申謝。

引 用 文 獻

1. 郭克忠。1983。白絹病菌菌核形成之生理，形態及細胞學研究。國立臺灣大學植物病蟲害系碩士論文。125pp。
2. 劉順恩、吳龍溪。1972。熱帶植物病害——白絹病。科學農業 20 : 213-228, 313-338。
3. Aycock, R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. or the status of Rolf's fungus after 70 years. North Carolina Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 174, 202 pp.
4. Chet, I. and Y. Henis 1975. Sclerotial morphogenesis in fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 13 : 169-192.
5. Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 408 pp.
6. Joham, H.C. 1943. A nutritional study of the fungus *Sclerotium rolfsii*. M. S. Thesis, A. & M. College of Texas. (Cited in Reference 3).
7. Kubicek, R. and G. Lysek 1981. A simple method for staining fungal substrate hyphae in agar media. Stain Tech. 56 : 46-48.
8. Townsend, B. B., and H. J. Willetts 1954. The development of sclerotia of certain fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 37 : 213-221.
9. Willetts, H. J. 1978. Sclerotium formation. In The Filamentous Fungi. Vol. 3. Developmental Mycology. p. 197-213. Ed. by J. E. Smith and D. E. Berry., Edward Arnold, London, 464 pp.