

植物真菌病原之初期侵染行爲

郭克忠

臺中縣霧峰鄉 臺灣省農業藥物毒物試驗所農藥應用系

(接受日期：86年11月30日)

摘 要

郭克忠 1998 植物真菌病原之初期侵染行爲 植保會刊 40：1~23.

從演化的觀點看，植物病原真菌爲了能在寄主上生存，除了生理生化上的變化之外，在形態上也必需發展出特定的構造來達到這個目的。就大多數植物病原真菌孢子而言，此一特定的構造稱之爲「附著器」(appressorium)。附著器的形態構造隨植物病原種類的不同而有所不同，是真菌孢子侵入寄主的首要步驟。因此了解附著器發育過程及附著器形成的機制對病害的防治有深遠的影響。附著器發育過程包括孢子吸著，發芽，尖端生長，菌絲尖端膨大，細胞核分裂，橫隔板形成及黑色素形成等步驟。孢子的吸著與發芽管的吸著通常由不同的機制所控制。孢子吸著的研究近年才漸爲人所重視，許多證據顯示弱作用力及膠體理論扮演重要角色，尤其是忌水性交互作用 (hydrophobic-hydrophobic interaction) 在解釋孢子的吸著上有相當的證據。發芽管的生長分化則較爲複雜。孢子發芽後，先進行尖端生長 (apical growth)，但在接收了分化訊號後尖端生長消失，細胞進行重組 (reorganization)，原來細胞骨架 (cytoskelton) 重新分佈，造成了細胞膨大，並引起一連串的生理生化變化 (physiological cascade)，最後形成了附著器並進行侵入。了解上述諸因子，對於阻止病原侵入寄主，研究藥劑的作用機制或發展新的病害防治策略都有顯著的影響。本文擬以近來研究較多之病原如：稻熱病菌 (*Magnaporthe grisea*)、豆炭疽病菌 (*Collectotrichum lindermuthianum*) 及豆銹病菌 (*Uromyces appendiculatus*) 爲例說明植物病原真菌孢子侵染過程初期的細胞學及分子生物學，並指出其可能在病害防治上的應用。

(關鍵詞：植物病原真菌、尖端生長、附著器形成、病害啓始)

緒 言

技術上需要解決的問題

植物病原真菌爲了達到能在寄主上生存繁衍的目的地，除了生理代謝上的變化之外，在形態上也必需發展出特定的構造來達到這個目的。Frank首先在1883年發現菜豆炭疽菌孢子發芽後又產生一孢子狀構造而稱之爲「附著器」(appressorium, spore-like)⁽⁴²⁾。他並指出該構造與病原侵入寄主有關。在人工培養基上，孢子發芽後往往僅形成營養菌絲，而不進行任何分化；但在寄主上，發芽孢子卻有一連串的形態及生理分化(physiological cascade)。首先孢子必需有固定的吸著(tenacious adhesion)才能進行發芽，在發芽管伸展的同時並有一胞外黏質(extracellular matrix)伴隨而出，在寄主上發芽管往往受特定因子的刺激而形成附著器，我們可以利用這些因子在人爲環境下促使附著器的形成。附著器形成包括了細胞骨架(cytoskeleton)的重組，細胞核分裂，橫隔板形成及就部份真菌而言，附著器的黑色化(melanization)等步驟。成熟的附著器隨即進行侵入，侵入前細胞進行一次核分裂，並分化出侵入墊(infection cushion)或侵入釘(infection peg)。近年來有關附著器形成及初期侵染行爲的研究頗多，Cole and Hoch (1991) 編著的專書對動植物及昆蟲真菌的病害啓始(disease initiation)有極詳細的探討⁽²⁶⁾。另外許多「溫故(review)」性文章，有興趣的讀者可以參考Staples and Hoch (1987)⁽¹²⁹⁾、Mendgen and Deising (1993)⁽⁹⁹⁾、Gooday (1995)⁽⁵⁴⁾、Mendgen *et al.* (1996)⁽¹⁰⁰⁾、Howard and Valent (1996)⁽⁷⁰⁾及Wessels (1996)⁽¹⁴²⁾等的文章。鑑於這方面的研究我國仍在啓蒙階段，筆者僅就近年來這個領域的進展及個人的些許成果作一綜述，以爲相關研究之參考。

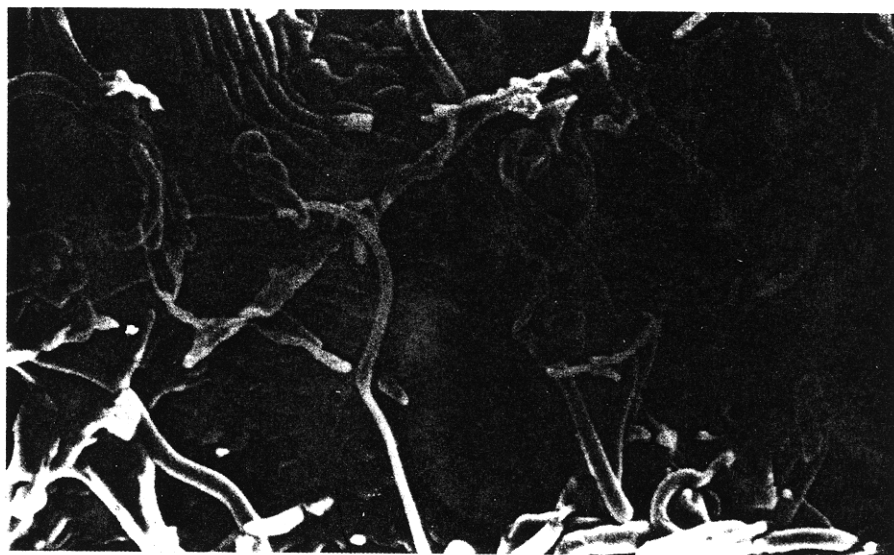
研究能夠有所突破，多仰賴新的技術及材料。分子科技的發展所帶給生物學上的改變是最淺顯易見的例子。除生物技術外，材料科學及新的硬體設備也對植物病原侵染過程研究的進展助益頗大。早在1976年，Wynn首次利用矽膠覆膜術得到葉表氣孔的負相，再以人工高分子如聚苯乙烯(polystyrene)等製作正相，從而得到一光學上透明之人工假葉，藉此可以有比較好的光學特性來觀察植物病原對植物葉表的地形學(topography)的反應，他因此證明了豆銹病菌(*Uromyces phaseoli*)夏孢子自氣孔侵入的行爲係氣孔外表形態的刺激，而非化學性物質如光合作用代謝物的刺激⁽¹⁴⁷⁾。配合不同化學特性的高分子聚合物並透過厚度的調整，吾人可以仔細研究病原受基質化學及物理性刺激後的反應及其控制機制。也因此可以使病原真菌的侵染行爲在光學特性良好的人工材料及光學顯微鏡下進行而不需在不透光的植物材料上來進行(圖一)。

爲了能夠適當的觀察孢子分化過程的細胞學行爲，螢光色基(fluorochrome)及上位螢光顯微鏡(epifluorescence microscope)在植物病原真菌侵染構造的研究上提供了極大的幫助。螢光色基係一種受可見光或紫外光所激發而產生的螢光染料，它們可以單獨用來對特定的細胞成份結合或可以鍵合特定的物質如抗體或凝集素(lectin)等，作爲細胞特定組成的標定之用。隨著新染劑的開發愈來愈多的染劑可以用來標定特定的細胞成份如核酸、脂質、炭水化合物及離子等，也可以用來標定特定的胞器如粒腺體，高基氏體，細胞核，液泡、甚至微小管(microtubule)、肌動蛋白(actin)等⁽²²⁾。利用這些特定的螢光色基，吾人得以觀察病原孢子在形成侵染構造時的核行

爲，細胞壁組成變化及細胞骨架的編排，對於侵染機制的了解有極大的幫助。螢光染劑在真菌學上的應用可參考 Butt *et al.*⁽²²⁾；而較完整的螢光色基資料在新版的 Molecular Probe 目錄中可以查到⁽⁶⁰⁾。儘管傳統「上位螢光顯微鏡」對細胞學的研究貢獻極大，但對厚標本的觀察上仍有許多背景螢光干擾 (signal-to-noise) 及對比不良的問題，因此鐳射掃描共軛焦距顯微鏡 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 在細胞學上的應用近年也極受人重視。LSCM 係利用鐳射掃描沿 Z 軸的方向隔一定距離取一光學切片 (optical sectioning)，而所激發的螢光通過一光柵阻擋了不在焦點上的折射光，因此可以得到較爲清晰的影像，而所得資料再透過影像處理系統將不同焦面上的影像加以重組得到三維構造的影像。有關 LSCM 在真菌細胞學的利用請參考 Kwon *et al.*⁽⁸⁸⁾。

低溫掃描式電子顯微鏡 (low temperature scanning electron microscope, LTSEM) 或環境掃描式電子顯微鏡 (environmental

scanning electron microscope, ESEM) 技術的發展對於微生物的觀察提供了另一個選擇。LTSEM 主要係將材料快速置於低溫 (-190°C) 中以保持其接近自然狀態，隨後置入一裝有低溫室之掃描式電子顯微鏡內趕除過多的水份，隨即加以覆膜並在低溫下 (-175°C) 進行觀察⁽⁹⁾。有別於傳統的化學固定法，本法由於無需以戊醛或鐵酸固定，因此可以保留較接近真實狀態的細胞表面構造，對於孢子發芽過程的了解有極大的助益。如稻熱病菌孢子頂端的粘質物⁽⁷⁰⁾，玉米葉枯病菌發芽孢子的胞外粘質⁽¹⁶⁾，及銹病孢子發芽瞬間的胞外黏質物⁽²⁵⁾均可以此法清晰的顯露出來。由於 LTSEM 的操作較爲繁瑣，且需投資較多的設備，因而近年有利用「相變化」(phase change) 而發展的環境掃描式電子顯微鏡 (ESEM)，本法的操作遠較 LTSEM 容易，材料完全不需固定或覆膜便可以直接觀察，在觀察含水量較高的生物材料上頗受看好。但缺點是材料通常極爲脆弱，倍率無法提高。目前在真菌學上的利用仍多著重在表面形態的觀察



圖一、以熱溶膠製成的葡萄葉表複製膜。

Fig. 1. A grape leaf replica made from gum glue shows the topographic feature of an abaxial side of young grape leaf (cv. Golden Muscat). (Courtesy by Kuo, K. C.)

(27.104)。

在細胞超微構造研究上，冷凍取代技術 (freeze substitution) 或微波固定 (microwave fixation) 技術的運用對於微細構造的保存助益甚大。以冷凍取代為例，該技術保存了較佳的次細胞構造，已成為真菌細胞學研究的標準製備技術⁽⁶²⁾，本法主要將低溫冷媒如乙烷 (ethane) 或丙烷 (propane) 降至-194°C，然後迅速將切的極小的材料投入，加以冷凍，然後再逐步回溫，藉此將細胞內非結晶型的冰取代出來。此法的好處是可將擔子菌或子囊菌的微細構造保存的很好；各胞器的微細構造不至於像化學固定般的容易對胞器造成程度不等的變形。壞處則是需要的設備較特殊，冷媒易爆炸且耗時稍久。另外有些菌類細胞壁過厚形成了絕緣般的效果，往往造成細胞內形成結晶型冰晶，因此也影響了切片的品質⁽⁶²⁾。Bourett及Howard (1992) 研究冷凍取代之侵入釘發現侵入過程與細胞肌動蛋白有關，而這種結果是無法以傳統化學固定法可以得到的⁽¹⁴⁾。微波固定則是一種利用微波的作用快速將細胞固定藉以保存較接近自然狀態的微細構造，近年有專為電顯設計的微波裝置，但事實上以一般家用的微波爐只要幾次嘗試錯誤，也可以得到不錯的效果。但微波時間長短需經過仔細的計算以免過度而破壞了微細結構，另外由於鐵酸會隨熱逸散，在安全上必需極為小心⁽⁹¹⁾。而在電顯層次的細胞標定上，金膠 (colloid gold) 則是一種被廣泛應用的工具。基本上，金膠是一種帶負價的氯化金離子(AuCl₂)，它可以因目的不同而製成大小不同的膠體，以便光學顯微鏡、掃描及穿透式電子顯微鏡觀察之用⁽⁵⁹⁾。近年來在細胞壁合成過程、成份鑑定、特定胞器組成之標定、量化以及在寄主病原關係上的應用有極大的價值。

爲了更清楚觀察孢子在侵入過程之細胞學變化，活細胞的觀察有其重要性，然

而整個侵染過程常長達數小時，短時間的觀察往往不能提供足夠細胞動力學的資訊。在70年代後期持續發展的電子影像處理技術如錄像加強顯微鏡 (video enhanced microscopy)，價鍵偶合裝置(charge-coupled device, CCD) 及影像處理技術 (image processing techniques) 爲這個領域的研究開了一扇大門⁽⁷¹⁾。電子加強對比光學顯微鏡 (electric enhanced optical microscopy) 及錄像存檔 (video taping) 在1985年由Allen, R. D. 引入生物學後有長足的進步⁽²⁾。數位化影像 (digitized image) 及影像處理 (image processing) 不單單可以儲存高品質影像，藉著CCD裝置及影像捕捉卡 (frame grabber) 也可以捕捉、儲存及播放生活細胞的影像，甚至可以進行長時間的積時錄像 (time lapse)，使吾人對細胞在時間及空間的動態本質有較深的了解。過去無法長時間觀察的細胞行爲如今均可以在顯微裝置稍加改良的情況下進行長時間的觀察，也因此使得細胞動力學的研究成爲可能。

超微蝕刻 (nanofabrication) 是另一個在未來生物學研究上有極大潛力的領域，利用掃描式電子顯微鏡加裝一超微蝕刻儀 (nanometer pattern generation system, NPGS)，電子束可以將矽晶元 (silicon wafer) 蝕刻成所需要的高度寬度及距離，1987年Hoch利用了超微蝕刻技術發現銹菌之附著器形成乃單純趨觸性 (thigmotrophic) 而非化學誘引 (chemotrophic)⁽⁶⁵⁾，此後附著器形成及侵染初期行爲的研究得以在控制的人工環境下進行，對於細胞分化的研究有極大的幫助。近年來，利用UV超微蝕刻 (UV light lithography) 及對光敏感物質 (photoresist) 加以刻畫出特定的尺寸，另外利用自我合成物質 (self assembly materials, SAM) 如silanes來處理特定材料的表面因而可以得到不同表面特性的物質來研究微生物的辨認 (recognition) 機制⁽¹⁷⁾。

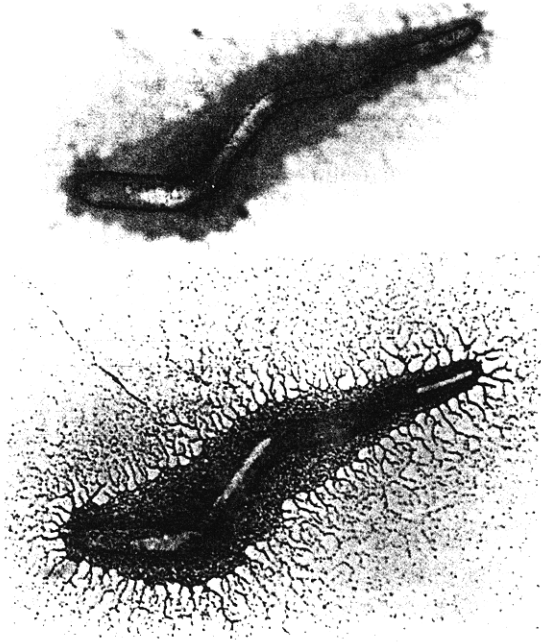
其它如電穿孔技術 (electroporation)⁽⁷³⁾

、微針注射(microinjection)⁽¹¹⁹⁾及光學鑷子(optical tweezers)⁽¹⁰⁾、patch clamp⁽⁴⁸⁾等技術的開發應用、使得觀察生活細胞的胞器成爲可能。也將植物病原真菌的侵染研究推向了一個全新的研究方向。

孢子的吸著與發芽

真菌孢子的發芽行爲並不全然像植物的種子的發芽行爲，真菌孢子發芽除了發芽抑制劑及促進劑外⁽⁴³⁾，爲了對抗表面張力，它們通常有特別的設計來幫助它們吸附在植物表面，然後再進行發芽，以避免無謂的能源浪費。微生物的吸著現象最早爲細菌學者所注意，尤其在牙科醫學⁽¹⁴³⁾。Webster及Davey (1984)研究水生絲狀菌 *Anguillospora longissima* 及 *Lanulospora curvula* 發現當孢子吸著在基質上時，發芽率明顯提高⁽¹⁴⁰⁾。也因此得以假設孢子的吸著爲發芽的必要條件。許多植物病原孢子的吸著與基質的忌水程度 (hydrophobicity) 則有關係。例如稻熱病菌 (*Magnaporthe grisea*) 分生孢子⁽⁵⁸⁾、灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*)⁽³⁶⁾、豆炭疽病菌 (*Collectotrichum lindemuthianum*)⁽¹⁴⁹⁾、禾本植物炭疽病菌 (*Collectotrichum graminicola*)⁽¹⁰¹⁾、菜豆銹病菌 (*Uromyces appendiculatus*)⁽¹³⁵⁾、及葡萄黑腐病菌 (*Phyllosticta ampellicida*)⁽⁸⁴⁾等均顯示孢子較偏好在忌水性高的基質上發芽。Young and Kauss 觀察豆炭疽菌孢子的吸著，發現若加入陽性離子或降低pH，孢子的吸附能力大爲提高⁽¹⁴⁹⁾。Kuo及Hoch (1996) 研究葡萄黑腐病菌的發芽行爲，發現孢子的發芽需要有穩固的吸著才能進行發芽，而穩固的吸著僅發生於當孢子被置於忌水性的基質上。仔細的觀察孢子的吸著行爲，發現吸著本身以少於0.03秒的速度進行。以開水煮沸、蛋白質凝結劑乙醛 (formaldehyde)、及呼吸作用抑制劑氰化鈉 (sodium azide) 處理孢子均不會影響孢子的

吸著行爲，可知該行爲並不須代謝活動參與⁽⁸⁴⁾。這種孢子吸著行爲與DLVO理論頗爲接近，DLVO理論最早被用來解釋膠體 (colloid) 的行爲，是Dejaguin和Landau (1941)⁽³³⁾及Verway及Overbeek (1948)⁽¹³⁸⁾分別提出。根據該理論孢子的吸附純粹爲物理上的弱作用力交互作用的結果，並無任何代謝活動所參與。值得一提的是過去對於附著並無明確的定義，所謂的黏著 (adhesion)、吸附 (absorption)、附著 (attachment) 並無清楚的定義，根據現有極有限的知識，所謂孢子的粘著應可粗分兩個步驟，第一階段的附著 (attachment) 及第二階段的黏著 (adhesion)。第一階段主宰因子或爲物理性的力量如忌水性交互作用 (hydrophobic-hydrophobic interaction) 或凡得瓦力 (van der Waals interaction)，該階段無涉細胞之代謝活動，而與孢子自身之電價⁽⁷⁵⁾、周遭環境之pH、離子濃度、離子種類而影響^(36,84,149)。第二階段的黏著則有化學性的物質參與。以一些非特定的標定物如金膠 (gold sol)，印度墨水 (India ink) 等可以加以標定，並藉此可以進一步了解其特性^(76,83)。該類物質又可大分爲兩類，其中一種自孢子滲出，見於炭疽菌⁽⁷⁶⁾(圖二)，白粉病菌^(82,104)；另一類自發芽管滲出如黑腐菌 (*Phyllosticta ampellicida*)⁽⁸³⁾及銹病菌 (*Uromyces viceae-fabae*)⁽²⁵⁾等。胞外粘質的組成頗爲複雜，因菌的種類不同其組成便不相同，可爲碳水化合物⁽⁸⁹⁾或蛋白質^(39,83)。電泳圖譜顯示，它們甚至往往超過一種⁽¹⁰⁵⁾，分子量也有所差異^(11,86)。有資料顯示該成份至少含幾丁質酵素 (chitinase) 及脂化酵素 (esterase)⁽³¹⁾。另外Wessels指出一類富含cysteine的外泌忌水性蛋白稱之爲忌水素 (hydrophobins)，也可能與孢子吸著、病勢進展，細胞分化及寄主微生物共生作用有關⁽¹⁴²⁾。孢子的附著也可被其它的機制所左右，如稻熱病菌仰賴特殊的頂端黏質物來吸附在基質上，該物質以特定的細胞凝聚



圖二、炭疽菌分生孢子的胞外粘質。

Fig. 2. The extracellular matrix of *Collectotrichum gleosporioides* exuded from the conidium and germ tube. (Courtesy by Kuo, K. C.)

素 (concanavalin A, Con A) 可以將之標定出，可知其內含有糖甘類 (glucan) 的物質⁽⁵⁸⁾。另外許多孢子帶有附絲 (appendage) 或特殊形狀，它們也具有附著的功能⁽¹⁴⁰⁾，分類學上近年才稍受人注意⁽¹⁰⁹⁾，但與孢子附著及訊號傳導的關係則極待釐清。

發芽管的生長

一般孢子發芽後，即形成一發芽管 (germ tube, 或統稱 sporling or germling)，而絲狀菌的發芽管生長與其它生物極不相同，稱為極性發育 (polarized cell development) 或尖端生長 (apical growth)。這個現象受注意超過百年，但有許多細節仍不了解。發芽管或菌絲的生長多集中於菌絲尖端，估計尖端 $1 \mu\text{m}$ 細胞壁的合成速率是距尖端 $50 \mu\text{m}$ 處的 50 倍⁽⁵³⁾。基本上有

兩個假說解釋尖端生長，第一種稱之為「靜態說」(steady-state hypothesis)，認為菌絲尖端的塑性與展性，細胞內剛合成的物質含有非結晶型的幾丁質 (chitin) 及 $\beta(1-3)$ 糖甘，當這些物質自菌絲尖端被送出胞外時，它們與原來的細胞壁進行交互鍵合 (cross link)，同時聚合 (polymerization) 反應使幾丁質形成更大的分子，糖甘形成 $\beta(1-6)$ 鍵結，並且不同成份彼此纏繞而形成堅固的胞外構造⁽¹⁴¹⁾。另一種假說稱「動態說」(dynamic-state hypothesis) 認為細胞壁一直都是堅硬的構造，但經由一個不斷分解及合成的步驟牽引細胞朝特定的方向生長並合成新的細胞壁物質⁽⁶⁾。不論哪個假說，無疑的次尖端區 (subapical zone) 都是提供尖端生長所需能量，酵素，細胞壁先驅物及合成新的胞膜的處所。回溯本世紀初期 Brunswik (1924) 發現高等菌菌絲尖端

有一特定構造而稱之為端體 (Spizenkörper, apical body)⁽¹⁹⁾。卅年後, Girbardt進一步指出該構造與尖端生長有關^(50,51)。80年代初期一位剛自康乃爾大學獲得博士學位的年輕人Rick Howard (1981)利用他自己發展出來的冷凍取代技術觀察*Fusarium acuminatum* 菌絲尖端的縱切片, 結果發現了幾個重要的現象, 1)高氏體為許多互相結合小管組成的網洞狀構造且常與粒腺體伴隨, 2)端體為許多細小泡體組成且彼此間有微絲連結的三維網狀構造, 3)細胞微泡體 (vesicles)常見與微小管(microtubules)伴隨, 4)一個新發現的胞器稱之為纖維體 (filasome) 常見於細胞合成作用旺盛的位置, 其功用可能與細胞壁合成有關⁽⁶⁷⁾。1989年, Barnicki-Garcia *et al.*則建議端體可能是小泡體 (vesicles) 的供應中心⁽⁸⁾。1992年, 普渡大學的 Bracker及他的研究生 Lopez-Franco利用錄像光學顯微鏡 (video enhanced light microscopy) 發現事實上端體是一個代謝活動旺盛的「區域」, 因真菌的種類不同也有不同型式。他們因而歸納出八種的端體構造來⁽⁹²⁾。根據現有資料, 泡體理論 (vesicle theory) 可以解釋細胞的尖端生長。但是泡體的種類, 它們運行的方式, 製造泡體的處所仍有許多待解的地方。泡體大小約可分兩種, 一種大小在40-80nm之間; 另一種則在100-200nm之間⁽¹³⁷⁾。諸多泡體中最為人所了解的應算幾丁質泡體。它們的大小大約在40-70nm之間^(15,41), 現已可在人工環境下分離純化並合成幾丁質。幾丁質泡體約含有1/3的脂質及2/3蛋白質, 主為幾丁質合成酵素 (chitin synthetase)。它的出處仍不太清楚, 可能與高基式體有關。Barnicki-Garcia (1990) 認為泡體內含酵素母體 (zymogen), 當它們被送至細胞尖端時與細胞膜癒合, 同時酵素母體被活化而進行代謝活動⁽⁷⁾。

尖端生長受鈣離子影響頗大^(55,72,121,124)。

以紅麵包霉 (*Neurospora crassa*) 為例, 添加高濃度的鈣 (50-500mM) 多分叉突變株 'Frost' 及 'Spray' 能變回野生型, 而以鈣離子通道阻斷劑Verpamil則可使野生型變成多分叉型⁽³⁴⁾。鈣離子測定可以用特定的螢光染劑如chlorotetracyclin (CTC) 來測定膜上的鈣離子濃度或Indo-1、Fura-2、Fluo-3等來測定細胞質內的自由鈣⁽¹¹⁹⁾。另外也可以利用對鈣具專一性的微電極來測定⁽¹⁸⁾。需強調的是運用這些技術在真菌研究上還不是很成熟, 因此在解釋結果上需特別小心。以*Saprolegnia ferax*為材料, Jackson and Heath (1993) 發現自由鈣離子多集中在菌絲尖端但CTC可以結合的鈣卻多集中在次尖端區⁽⁷⁴⁾。利用patch-clamp技術發現菌絲尖端確實有鈣離子通道 (calcium channel) 存在。離子通道現知有兩種, 一種需由鈣離子活化的鉀離子通道, 它可能主調節細胞內的膨壓; 另一種則是受擠壓啟動的鈣離子通道。它同時也受鉀離子的活化, 而且與尖端的伸展有關^(46,47)。後者與*Uromyces appendiculatus*附著器形成上可能有些關係⁽¹⁵⁰⁾。目前的假說認為這些離子通道係由小泡體送到菌絲尖端, 由細胞骨架將它們固著在膜上, 然後藉著菌絲持續生長的過程中將離子再回收利用, 其過程可能透過calmodulin, cAMP, cGMP的調節^(120,121)。摘要言之, 鈣離子對尖端生長的影響如下: 1) 促使肌動蛋白由單體 (G-actin) 變成多體 (F-actin), 而菌絲藉此呈極性生長^(72,74), 2) 小泡體的輸送⁽⁹⁸⁾, 3) 小泡體的外泌 (exocytosis)⁽¹²²⁾, 4) 幾丁質的合成⁽⁹⁷⁾, 5) 遺傳學上 *Saccaromyces cerevisiae* 調節細胞極性生長的基因CDC24事實上證明也是一個鈣離子的結合蛋白⁽⁹⁶⁾。

膨壓 (turgor pressure) 自早年即認為與尖端生長有關, Burnett (1979) 認為由於菌絲尖端較鬆軟, 其它部位較緊密, 因此膨壓可以迫使菌絲向前生長⁽²⁰⁾。膨壓的計算

過去只能以計算滲透壓 (osmometry) 的方式來達成，近年則可以一微針所製成的壓力計來達成⁽¹⁰⁶⁾。儘管一般認為膨壓與尖端生長有關，但 *Achlya bisexualis* 即使在完全無膨壓的狀況下也可以有些許的生長，而且即使在外界滲透壓改變的狀況下，菌絲內部的膨壓也可以暫時維持⁽¹⁰⁷⁾。以 *Saprolegnia ferax* 為材料，加入鉀離子通道阻斷劑 tetrapentyl ammonium chloride 時，菌絲生長受影響但膨壓卻沒有變化⁽⁷⁹⁾。另外有些菌的尖端生長受電場的影響稱之為趨電性 (galvanotropism)。趨電性受 pH⁽⁹⁰⁾、鈣離子濃度⁽⁹⁰⁾、電場強度^(29,90)、甚至不同部位的分化菌絲而影響，有的趨向陽極生長有的則趨向陰極生長⁽³²⁾。這是一個還不太清楚的領域，其生物學上的顯著性則仍有待觀察。

附著器的分化

為了達到直接侵入寄主的目的地，病原真菌必需發育出特定的構造來完成此一目標。唯必需強調的是侵入構造事實上是極多樣的。菌核類如 *Sclerotium rolfisii*、*Rhizoctonia solani*、*Sclerotinia sclerotiorum* 及 *Cristulariella moricola* 等需形成一特定的侵入墊 (infection cushion) 或稱為複式附著器 (compound appressorium)⁽³⁷⁾ 來達到此一目的。為了避免本文過於複雜，侵入墊的分化侵染過程並不擬包含在此文中，有興趣的讀者可以參考 Armentrout and Downer (1987)⁽⁴⁾、郭等 (1988)⁽¹⁾ 的報告，本文將只集中討論附著器的形成。

菌絲是如何「感覺 (sense)」到寄主而進行分化是本節要討論的重點。附著器的形態依菌的種類不同而有所不同，依 Emmet 及 Parbery (1975) 的定義，附著器可大分三種：原附著器 (protoappressorium)、

無色附著器 (hyaline appressorium) 及暗色附著器 (dark appressorium)⁽³⁷⁾。附著器的發育過程則約可分為尖端生長停止 (cessation of apical growth)，菌絲尖端膨大 (balloning of cell tip)，橫隔板形成 (septum formation) 及黑色素化 (melanization) 等幾個步驟(圖五)。基本上，在附著器形成的初期尖端生長停止，細胞骨架的分布自原來平行於菌絲的方向變成平行於寄主或基質的方向⁽⁸⁷⁾，原來朝前端送出的小泡體改成朝細胞的周邊分布並造成細胞膨大 (balloning)。但一極重要的指標是在膨大細胞的上方通常需有一橫隔板的形成，以區隔發芽管及附著器。整個附著器發育的時間約在1.5至4小時之間。通常發芽孢子會有一段發芽管後才進行分化，但在寄主上附著器的形成則常在發芽的一瞬間便進行分化，而形成所謂的無柄附著器 (sessile appressorium)。有許多化學物質可以誘導孢子發芽及附著器形成⁽⁴³⁾，葉片滲出物可以誘導 *Botrytis* sp. 分生孢子發芽及附著器的形成⁽²⁴⁾。稻熱病菌及 *Cochliobolus* 附著器之形成受泌液 (guttation water) 的促進⁽³⁸⁾。成熟果實的分泌物也可促使炭疽菌 (*C. piperatum*) 之附著器的形成⁽⁵¹⁾。一種植物生長調節劑，乙烯 (ethylene)，已被證明可以誘導炭疽菌 *C. gloeosporioides* 及 *C. musae* 孢子發芽及附著器的形成⁽⁴⁰⁾。酪梨表面的蠟質也被發現具有類似的功用⁽¹¹⁵⁾。麥銹菌 (*Puccinia graminis*) 附著器形成及氣孔下囊的形成受孢子揮發性萃取物的誘導⁽⁴⁴⁾。Macko 則指出該物質為 acrolein (2-propenol)⁽⁹⁵⁾。一些簡單的糖類或離子可以有效的促使豆銹菌 (*U. appendiculatus*) 附著器分化^(77,78,131,132)。當培養基加入 K、Ca 離子或蔗糖，豆銹菌氣生菌絲產生附著器及侵入構造⁽⁶⁴⁾。除此以外，cAMP、cGMP、3-isobutyl-1-methyl xanthine、4-(3-butoxy)-4-methylbenzyl-2-imidazoleidionone、NaF、Forskolin, adenosine、2'-deoxyadenosine 等化學物質

均可誘導附著器的形成⁽⁶³⁾。除了化學刺激外，物理性的刺激也可以誘使附著器形成。早在本世紀初期植病學者便注意到附著器形成偏好在「硬」的表面。以稻熱病菌爲材料，Xiao等(1994)發現其附著器的形成與培養基的硬度有關，在新鮮的洋菜表面沒有附著器形成但在烘乾的洋菜上則可有超過六成的發芽孢子形成附著器⁽¹⁴⁸⁾。但所謂「硬」並非一定義名詞，真菌對「硬」質表面的反應，可能傾向於其它的表面特質⁽³⁷⁾。許多真菌喜好自表皮細胞接縫處侵入，如炭疽菌(*Collectotrichum* spp.)^(3,89)、白粉菌(*Erysiphe polygoni*)、露菌(*Peronospora parasitica*)⁽¹¹⁶⁾、*Endocronartium harnessii*⁽⁶⁶⁾及*Phyllosticta ampellicida*⁽⁸⁵⁾。若以合成的高分子如塑膠製成的假葉測試附著器的形成位置，發現結果與真葉上相同⁽⁸⁹⁾。Wynn在1976使用塑膠覆膜發現豆銹病的附著器形成係受葉表地形(topography)的影響⁽¹⁴⁷⁾，但是覆膜仍然無法完全排除植物殘餘化學物質的影響。這個假說一直到1987年才由Hoch利用電子光束超微蝕刻的矽晶元加以證明。他還發現銹菌附著器的形成只對 $0.5\ \mu\text{m}$ 左右的高度敏感，高度超過 $1\ \mu\text{m}$ 或低於 $0.25\ \mu\text{m}$ 則不會誘導形成附著器⁽⁶⁵⁾。一般氣孔孔邊細胞突起高度約在 $0.4\text{--}0.8\ \mu\text{m}$ 之間，以極精細的定位切片觀察菌絲在氣孔上的行爲，可以看見菌絲在孔邊細胞突起上形成附著器並壓迫突起向下彎曲變形；以積時錄相(time lapse)觀察菌絲行經 $0.5\ \mu\text{m}$ 高度的聚苯乙烯稜脊上時，即進行分化，初時細胞尖端膨大，40分鐘後生長改爲向下生長，並壓迫聚苯乙烯稜脊使之變形⁽¹³⁶⁾。以微針作爲阻斷訊號發現菌絲尖端對分化敏感的位置僅座落在菌絲尖端 $10\ \mu\text{m}$ 之內，超過 $40\ \mu\text{m}$ 的距離菌絲便無法「感覺」到物理刺激⁽²⁸⁾。

有關菌絲尖端分化過程的細胞學了解極少，主要原因係菌絲尖端的寬度僅數毫米，沿縱軸方向的切片極爲困難，技術上

僅康乃爾大學Harvey Hoch、Jim Aist等人及他們所訓練的學生們所成的學派所掌握。Rick Howard係首位利用高壓穿透式電子顯微鏡(HVTEM)研究菌絲尖端的先河⁽⁶⁷⁾。這群人及英國的Richard O'Connell, 德國的Kurt Mendgen等對附著器形成的研究貢獻極大。細胞核在發芽初期所扮演的角色不容忽視，*C. truncatum*在發芽初期先進行一次核分裂隨後形成一橫隔，在附著器形成初期則有另一回合的核分裂，以抑制劑fluorodeoxyuridine或hydroxyurea可以抑制附著器形成，但卻不影響發芽，相反的，添加actinomycin D卻可抑制附著器形成卻不抑制核分裂。由此可知抑制mRNA之polyA的形成抑制了附著器的形成⁽¹³⁰⁾。以*Uromyces appendiculatus*爲材料，Kwon及Hoch(1991)證實了細胞核在接觸人工膜的突起位置後30分鐘至60分鐘內連續進行兩次有絲分裂，細胞核由一變二，再進行一次同步分裂(synchronous nuclear division)而成四核，同時菌絲尖端膨大，尖端生長停止。約120分鐘後，一橫隔形成於膨大部位及管狀菌絲之間，分隔了附著器與一般菌絲⁽⁸⁷⁾。細胞核同步分裂似乎在附著器形成上普遍，*Uromyces vignae*春孢子初爲雙核，附著器形成時則進行一次同步分裂而形成四核，形成氣孔下囊(substomatal vesicle)時則又進行一次分裂而形成8核⁽¹³³⁾。Kuo and Hoch(未發表)以葡萄黑腐菌(*Phyllosticta ampellicida*)爲材料亦觀察到類似現象，但其在附著器形成上的意義則仍不太清楚。細胞核分裂，微小管的分布配置及橫隔板的形成習習相關，Girbardt(1979)以電子顯微鏡證明橫隔形成前有微小管及微粒體在該處聚集而形成一帶狀區(septal belt)⁽⁵²⁾。另外以*Neozygites*爲材料，Butt and Heath(1988)展示肌動蛋白在生長菌絲多集中於尖端位置，但當核進行分裂時，肌動蛋白則聚集於赤道位置，隨著核分裂的完成肌動蛋白逐漸收縮，最後在赤

道位置形成一碟狀構造並完成了橫隔的形成⁽²¹⁾。

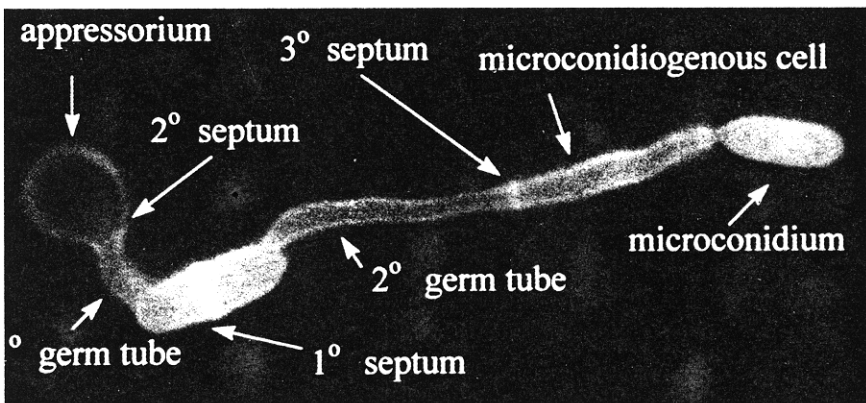
根據對豆銹病菌的觀察，在附著器形成之初細胞骨架隨意的分佈，但在接觸人工誘導突起後，細胞骨架與突起成平行排列，隨後成網狀排列於細胞壁之下方且有許多纖微體與細胞壁結合^(13,87)。

附著器細胞壁的構成與一般發芽管頗不相同。凝聚素 (lectins) 在這方面的研究上貢獻極大。它們是一群對特定炭水化物有辨識作用的糖蛋白，由於對特定的單糖有辨識能力，因此可以用來辨識附著器細胞壁的組成⁽¹¹⁰⁾。一般附著器可與WGA (wheat germ agglutinin)、PWM (pokeweed mitogen) 及Con A有反應，顯示附著器細胞壁含幾丁質 (chitin)、甘露糖 (mannose) 及葡萄糖 (glucose)^(45,61)。即使是無色附著器如銹菌，附著器內的幾丁質較發芽管多了一層⁽⁴⁵⁾。有色附著器構造則更加複雜，*M. grisea* 的附著器的細胞壁至少有六層構造^(68,69)。在附著器之外通常含有一粘質物，可能主司

附著，在炭疽菌此物質至少含有 β -1,4-linked N-acetylglucosamine、 α -linked N-acetyl-galactosamine 及 α -linked mannose⁽¹¹¹⁾。利用WGA偵測顯示幾丁質大多在細胞壁的外層⁽¹¹⁰⁾。

黑色素 (melanin) 的合成是部份植物病原附著器與一般菌絲明顯不同的地方，以炭疽菌或稻熱病菌為例，無法合成黑色素的突變株或以抑制劑抑制黑色素的形成便使上述病原無法完成侵入^(68,108,118,134,144,145)。

稍早Howard及Ferrari (1989) 曾證明黑色附著器產生的膨壓足以穿透人工高分子薄膜 (Mylar)，經過計算該膨壓約達 8.0 M Pa^(68,69)。一般認為該值過於高估，但利用比較細胞內外冰晶溶點的差異而求得的膨壓值也達 3.38 M Pa⁽¹⁰⁸⁾。黑色素在附著器累積的位置仍有爭議，Howard等 (1989) 指出稻熱病菌成熟附著器具6層細胞壁，而黑色素層形成在細胞壁幾丁質層的內層，由是胞內溶質不能流出，水卻持續流入因而產生了大的膨壓，致使菌單靠機械力量便可



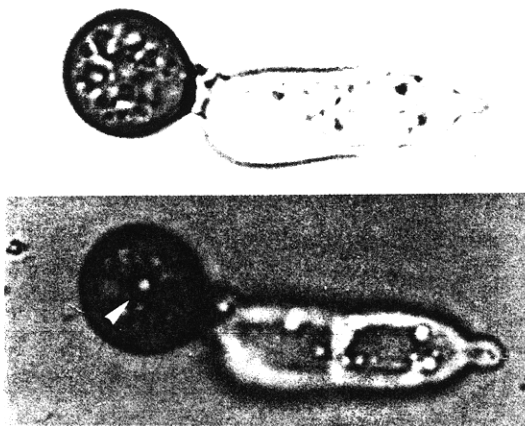
圖三、炭疽菌分生孢子一端發芽產生附著器，另一端則形成一產胞細胞。此種一邊侵入一邊產胞的現象也見於自然環境下。

Fig. 3. An appressorium and a secondary microconidium of a germinated conidium of *Collectotrichum gleosporioides*. The conidium first germinated to form an appressorium within 9 hours and then a conidiogenous cell protruded from the second half of the conidium and formed a secondary conidium. The phenomenon may be common in nature which account for some degree of infection. (Courtesy by Kuo, K. C.)

穿透Mylar，而不具黑色素附著器的突變株則無法進行侵入⁽⁶⁸⁾。針對突變株的遺傳分析發現至少三個各自獨立的基因參與了黑色素的合成，根據它們的菌落的顏色分別稱之為白化 (albino)、薔薇 (rosy) 及淺黃 (buff)。它們的控制基因則分別稱之為 ALB1, RSY1, 及 BUF1。這三個基因均已被選殖。ALB1產物與 polyketide synthases 類似⁽⁷⁰⁾。RSY1的產物為 scytalone dehydratase⁽⁹³⁾。BUF1則是 polyhydroxynaphalene reductase的基因⁽¹³⁹⁾。這些酵素的功用均與黑色素的合成有關。其中 polyhydroxynaphalene reductase是許多殺菌劑如三賽挫 (tricycloazole)、pyroquilon、phthalide等的作用目標⁽¹⁴⁶⁾。最近我的試驗室觀察到炭疽菌附著器形成後會在分生孢子另一端產生產胞細胞並形成一小孢子。這在本菌的殘存及孢子散布上或許扮演了重要角色，實際田間的發生頻度仍待詳細的調察 (圖三)。

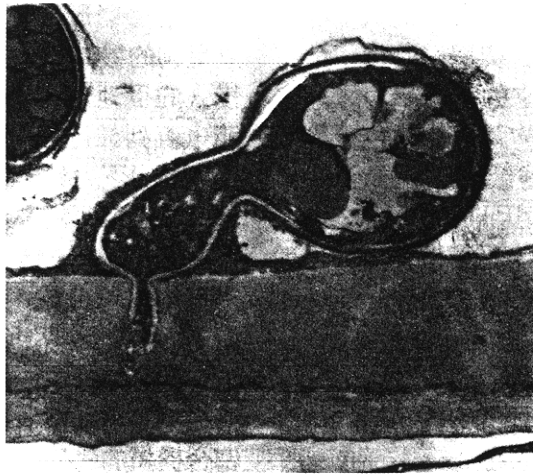
初期的侵染行為

附著器形成的作用是為了使病原菌建立足夠的機械力 (mechanical force) 來達到侵入的目的地，早為人所熟知⁽³⁷⁾。但許多細節一直到最近才有比較精細的研究。在菌絲尖端向下生長 (nose down) 開始，整個細胞分化過程便朝侵入的途徑進行。*M. grisea* 分生孢子侵入之初在侵入位置有一圓形區未有細胞壁合成，該區可以位相差顯微鏡觀察到一透明反光圈稱之為侵入孔 (infection pore)，電子顯微鏡下它具一環狀構造稱之為孔環 (pore ring)。它的功用頗似密合機械的墊片 (o-ring) 主要在幫助病原牢固的貼緊寄主。在侵入釘 (penetration peg) 發生之初則有另外兩層細胞壁形成來補強孔環，其成份主要仍是幾丁質及 mannoprotein類的物質⁽⁶⁸⁾。而侵入釘的寬度極窄，大約只有400nm⁽¹²⁾。以抗體結合法知有肌動蛋白的存在⁽¹⁴⁾。與稻熱病菌相同，豆炭疽菌在侵入部位在光學顯微鏡下呈現一明顯光點 (圖四)，但在微細構造上，它侵入之初先形成一圓錐狀構造稱之為附著器錐 (appressorial cone)⁽¹¹⁴⁾，它為一



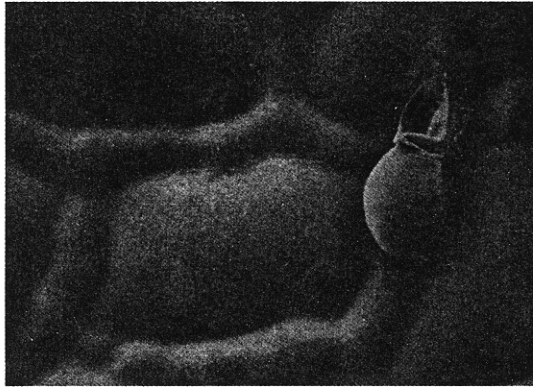
圖四、炭疽菌分生孢子產生附著器並進行侵入。下圖中附著器中心的反光點即為侵入位置。

Fig. 4. An appressorium of *Collectotrichum gleosporioides*. The halo ring revealed by a differential interference contrast microscopy in the center of an appressorium indicates the point of infection (arrow). (Courtesy by Kuo, K. C.)



圖五、葡萄苦腐病菌在葡萄果實上形成附著器及侵入釘。

Fig. 5. The appressorium and infection peg of *Greeneria uvicola* on grape berry. (Courtesy by Kuo, K. C.)



圖六、黑腐病菌的附著器及侵入菌絲，其中侵入菌絲沿著細胞間隙生長。

Fig. 6. The appressorium and colonizing hyphae of *Phyllosticta ampellicida*. Note that the colonizing hyphae go through anticlinal wall. (From Kuo and Hoch (1996) by permission of Mycologia)

炭水化物組成的漏斗狀構造。類似的構造也見於其它病原⁽¹⁰³⁾。很可能是細胞質在侵入過程中細胞質流 (cytoplasmic influx) 遇到阻力後堆積而形成 (O'Connell, personal communication)。但也有部份的菌類附著器形成過程未能看到孔環或孔錐的構造如 *Phyllosticta ampellicida*、*Greeneria uvicola* (圖五) 等。由現有的知識雖然附著器在外

表形態上近似，但若基質不同在超微構造上恐怕也有所差異。

除物理力外，角皮酵素 (cutinase) 一度被認為在侵染過程的初期扮演重要角色⁽⁸¹⁾。但寄主角皮 (cutin) 事實上厚度有限，是否真能阻擋病原侵入多有爭議，因此表皮酵素在致病過程中所扮演的角色仍待更多的研究方能有比較肯定的結論。

真菌侵入後的行爲有數種方式，炭疽菌類侵入後可深入寄主細胞潛伏一段很長的時間稱intracellular hemibiotrophic phase或僅停留在表皮下及表皮細胞外的間隙稱subcuticular intramural phase⁽⁵⁾。黑腐病菌侵入後在表皮細胞間隙迷走生長達兩週之久，再行侵入寄主細胞內⁽⁸⁵⁾(圖六)。類似侵入寄主後卻在細胞外生活一段時間不進入寄主細胞的現象也見於*Venturia inaequalis*⁽⁴⁹⁾及*Cladosporium fulvum*⁽¹²⁵⁾。這個好處是病原不會觸動寄主的防禦反應，直到寄主細胞老化後方才進行纏化。Luttrell (1974)曾稱此現象爲半嗜生性(hemibiotrophic)⁽⁹⁴⁾；按de Bary (1887)的定義，在這類病害在表現病癥以前在寄主內的生長相都可稱它們爲內生菌(endophytes)⁽³⁰⁾。有關內生菌及潛伏感染的關連性近年正逐漸受到重視，也是一個值得加強研究的領域^(117,127)。

病原侵入後的細胞學較易掌握，但是它的局部生化學卻不易了解。O'Connell的研究組則利用共免疫(co-immunization)的方式來達到這個目的^(112,113)。首先他們將接種後不同時間的植物材料磨碎後，以反復離心的方式來取得在寄主上的孢子、發芽管、附著器及侵入菌絲等⁽¹¹²⁾，隨後將侵入後40小時材料製成的多株抗體與侵入4天的材料混合，以之製造單株抗體。如此可以得到對孢子發芽侵染過程中不同部位具專一性的單株抗體⁽¹¹³⁾。利用該法得到的單株抗體UB25可以辨識侵入囊(infection vesicles)及初菌絲(primary hyphae)，但卻不與孢子、發芽管及附著器等有反應。可知菌體在侵入後細胞壁構造有所改變⁽¹¹³⁾。

病原侵入後所產生的寄主病原間形態、生理及分子層次上的交互作用，近年來極爲熱門，亦有極多的研究，筆者不擬在此贅述，有興趣者可以參考 Kessmann *et al.* (1994)⁽⁸⁰⁾、Hahn(1996)⁽⁵⁷⁾及 Mills *et al.* (1996)⁽¹⁰²⁾等的論述。

結語

病原對植物的初期侵染行爲是病勢進展中最首要但也是最脆弱的一環。學理上能夠阻止病原進入寄主便可以有效的阻止病害發生。Schafer (1994)認爲植物病原真菌孢子的，1)吸著，2)發芽及形成侵入構造，3)進行侵入及4)寄主內的纏化爲決定植物病原菌致病性(pathogenecity)的四大步驟⁽¹²³⁾。但是這麼複雜的過程中哪些是病原繼續種族繁衍所必須，卻需要仔細加以檢視。近年來由於生物技術的發達，找尋致病基因(pathogenecity gene)成爲熱門，而與病毒或細菌不同，常常「真菌的致病基因未必爲該特定菌完成生活史的絕對需要基因」⁽¹²³⁾。以爲破壞或阻礙某一特定基因便可以控制真菌病害的假說未必實際。最著名的例子爲Stahl及Schafer (1992)⁽¹²⁸⁾利用除去*Nectria haematococca*表皮酵素(cutinase)的試驗推翻了Dickman (1989)⁽³⁵⁾的試驗結論認爲表皮酵素爲致病基因之一。另外以「潛伏感染」爲例，Simmonds (1965)早年提出的四個假說截至今日均未有實際的證明⁽¹²⁶⁾。主要原因在於初期的侵染行爲僅涉及病原及其鄰近的少數寄主細胞的交互作用，這種細胞層次的交互作用要以較巨觀的現象如果實糖度酸度的變化來加以解釋病害誘發的因子極爲牽強。因此細胞學層次上，侵染初期的寄主病原交互作用極需加強了解。結合了生物技術及細胞學，植物真菌侵染過程的研究在近年來藉著少數的模式系統(model systems)如稻熱病菌、豆類銹病菌及炭疽菌的研究而揭露了許多侵染過程初期的細節。對於這些細節的了解除學術上的價值外，在遺傳育種、開發新藥劑、及發展新的病害防治策略上均有顯著的影響。展望未來對特定基因產物的標定，離子通道位置及其功能的了解，細胞骨架的動力學及它們與分化

及病勢進展的關係均是未來需加強研究的方向。由模式系統的研究知生化學及細胞學的研究必需並重才能使相關研究相輔相乘。我國在這個領域的研究仍極缺乏，是將來極需加強的領域。

引用文獻

1. 郭克忠、高清文、呂理燊 1988 葡萄灰斑病：病徵，病原菌，侵染過程及藥劑篩選。植保會刊 30:110-124.
2. Allen, R. D. 1985. New observations on cell architecture and dynamics by video enhanced contrast optical microscopy. *Ann. Rev. Biol. Biophysic. Chem.* 14:265-290.
3. Anderson, J. L., and Walker, J. C. 1962. Histology of watermelon anthracnose. *Phytopathology* 52:650-653.
4. Armentrout, V. N., and Downer, A. J. 1987. Infection cushion development by *Rhizoctonia solani* on cotton. *Phytopathology* 77:619-623.
5. Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J., and Nash, C. 1992. Infection strategies of *Collectotrichum* species. pp. 88-120. In J. A. Bailey and M. J. Jeger [eds.], *Collectotrichum: Biology, pathology and control*. CAB International, UK.
6. Bartnicki-Garcia, S. 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. pp. 245-267. In J. M. Ashworth and J. E. Smith [eds.], *Microbial differentiation*. Cambridge University Press, London, UK.
7. Bartnicki-Garcia, S. 1990. Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. pp. 211-232. In I. B. Heath [ed.], *Tip growth of plant and fungal cells*. Academic Press, San Diego, USA.
8. Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., and Gierz, G. 1989. Computer simulation of morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 153: 46-57.
9. Beckett, A., and Read, N. D. 1986. Low-temperature scanning electron microscopy. pp. 45-86. In H. C. Aldrich, and W. J. Todd [eds.], *Ultrastructure techniques for microorganisms*. Plenum Publishing Co. New York, USA.
10. Berns, M. W., Aist, J. R., Wright, W. H., and Liang, H. 1992. Optical trapping in animal and fungal cells using a tunable, near-infrared titanium-sapphire laser. *Exp. Cell Res.* 198:375-378.
11. Borreback, C. A. K., Mattison, B., and Nordbring-Hertz, B., 1984. Isolation and partial characterization of a carbohydrate-binding protein from a nematode-trapping fungus. *J. Bacteriol.* 159:53-56.
12. Bourett, T. M., and Howard, R. J. 1990. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can. J. Bot.* 68:329-342.
13. Bourett, T. M., and Howard, R. J. 1991. Ultrastructural immunolocalization of actin in a fungus. *Protoplasma* 163: 199-202.
14. Bourett, T. M., and Howard, R. J. 1992. Actin in penetration pegs of the fungal rice blast pathogen, *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma.* 168 : 20-26.
15. Bracker, C., Ruiz-Herrera, J., and Bartnicki-Garcia, S. 1976. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during micro-fibrils synthesis *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73:4570-4574.

16. Braun, E. J., and Howard, R. J. 1994. Adhesion of *Cochliobolus heterostrophus* conidia and germlings to leaves and artificial surfaces. *Exp. Mycol.* 18:211-220.
17. Britland, S., Clark, P., Connolly, P., and Moores, G. 1992. Micropatterned substratum adhesiveness: A model for morphogenetic cues controlling cell behavior. *Exp. Cell Res.* 198:124-129.
18. Brownlee, C., and Wood, J. W. 1986. A gradient of cytoplasmic free calcium in growing rhizoid cells of *Fucus serratus*. *Nature* 320: 624-626.
19. Brunswik, H. 1924. Untersuchungen über Geschlechts und Kernverhältnisse bei der Hymenomyzetenart Coprinus. pp. 1-152. In K. Goebel [ed.], *Botanische abhandlung*. Gustav Fischer, Verlag, Jena, Germany.
20. Burnett, J. H. 1979. Aspects of the structure and growth of hyphal walls. p.1-15. In J. H. Burnett and A. P. Trinci [eds.] *Fungal walls and hyphal growth*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
21. Butt, T. M., and Heath, I. B. 1988. The changing distribution of actin and nuclear behavior during the cell cycle of the mite-pathogenic fungus *Neozygites* sp. *European J. Cell Biol.* 46: 499-505.
22. Butt, T. M., Hoch, H. C., Staples, R. C., and Leger, R. J. St. 1989. Use of fluorochromes in the study of fungal cytology and differentiation. *Exp. Mycol.* 13: 303-320.
23. Chamberland, H. 1994. Gold labeling methods for the ultrastructural localization of host wall and pathogen components. pp. 1-12. In O. Petrini and G. B. Ouellette [eds.], *Host wall alterations by parasitic fungi*. APS Press. Minnesota, USA.
24. Clark, C. A., and Lorbeer, J. W. 1977. Comparative nutrient dependency of germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. *Phytopathology* 67: 212-218.
25. Clement, J. A., Martin, S. G., Porter, R., Butt, T. M., and A. Beckett. 1993. Germination and the role of extracellular matrix in adhesion of uredospores of *Uromyces viciae-fabae* to synthetic surfaces. *Mycol. Res.* 95: 585-593.
26. Cole, G. T., and Hoch, H. C. 1991. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press. NY, USA.
27. Connolly, J. H., Chen Y., and Jellison, J. 1995. Environmental scanning electron microscopic observation of the hyphal sheath and mycofibrils in *Postia placenta*. *Can. J. Microbiol.* 41:433-437.
28. Correa Jr. A., and Hoch, H. C. 1995. Identification of thigmoresponsive loci for cell differentiation in *Uromyces* germlings. *Protoplasma* 186:34-40.
29. Crombie, T., Gow, N. A. R., and Gooday, G. W. 1990. Influence of applied electrical fields on yeast and hyphal growth of *Candida albicans*. *J. Gen Microbiol.* 136:311-317.
30. de Bary, A 1887. *Comparative morphology and biology of the fungi, Mycetozoa and bacteria*. Oxford: Clarendon (English translation).
31. Deising, H., Nicholson, R. L., Haug, M., Howard, R. J., and Mendgen, K. 1992. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases.

- Plant Cell 4: 1101-1111.
32. De Silva, L., Youatt, J., Gooday, G. W., and Gow, N. A. R. 1992. Inwardly directed ionic currents in *Allomyces macrogynus* and other water moulds indicate sites of proton-drive nutrient transport but are incidental to growth. *Mycol. Res.* 96:925-931.
 33. Derjaguin, B. V., and Landau, L. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physiochem. USSR* 14:633-662.
 34. Dicker J. W., and Turian, G. 1990. Calcium deficiencies and apical hyperbranching in wild-type and the 'frost' and 'spray' morphological mutants of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1413-1420.
 35. Dickman, M. B., Podila, G. K., and Kolattukudy, P. E. 1989. Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *Nature* 342:446-448.
 36. Doss, R., Potter, S. W., Chastagner, G. A., and Christian, J. K. 1993. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1786-1791.
 37. Emmett, R. W., and Parbery, D. G. 1975. Appressoria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13:147-167.
 38. Endo, R. M., and Amacher, R. H. 1964. Influence of guttation fluid on infection structures of *Helminthosporium sorokinianum*. *Phytopathology* 54:1327-1334.
 39. Epstein, L., Laccetti, L., Staples, R. C., Hoch, H. C., and Hoose, W. A. 1985. Extracellular proteins associated with induction of differentiation in bean rust uredospore germlings. *Phytopathology* 75:1073-1076.
 40. Flaishman, M. A., and Kolattukudy, P. E. 1994. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6579-6583.
 41. Flores-Martinez, A., Lopez-Remero, E., and Martinez, J. P. 1990. Protein composition of purified chitosomes of *Mucor rouxii*. *Exp. Mycol.* 14:160-168.
 42. Frank, A. B. 1883. Uber einige neue und weniger bekannte Pflanzenkrankheiten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 1:I 29-34, II 58-63.
 43. French, R. C. 1992. Volatile chemical germination stimulators on rust and other fungal spores. *Mycologia* 84:277-288.
 44. French, R. C., and Weintraub, R. L. 1957. Pelargonaldehyde as an endogenous germination stimulator of wheat rust spores. *Arch. Biochem. Biophys.* 72:235-237.
 45. Freytag, S., and Mendgen, K. 1991. Surface carbohydrates and cell wall structure of in vitro induced uredospore infection structures of *Uromyces viciae-fabae* before and after treatment with enzymes and alkali. *Protoplasma* 161:94-103.
 46. Garrill, A., Lew, R. R., and Heath, I. B. 1992. Stretch-activated Ca^{2+} and K^{+} channels in the hyphal tip plasma membrane of the oomycete *Saprolegnia ferax*. *J. Cell Sci.* 101:721-730.
 47. Garrill, A., Jackson, S. L., Lew, R. R., and Heath, I. B. 1993. Ion channel activity and tip growth: tip localized stretch-activated channels generate an essential Ca^{2+} gradient in the oomycete *Saprolegnia ferax*. *Eur. J. Cell Biol.* 60:358-365.

48. Garrill, A., and Davies, J. M. 1994. Patch clamping fungal membranes: a new perspective on ion transport. *Mycol. Res.* 98:257-263.
49. Gessler, C., and Stumm, D. 1984. Infection and stroma formation by *Venturia inaequalis* on apple leaves with different degrees of susceptibility to scab. *Phytopath. Z.* 110:119-126.
50. Girbardt, M. 1957. Der Spitzenkörper von *Polysticus versicolor* (L.). *Planta* 50:47-59.
51. Girbardt, M. 1959. Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhyphen. *Protoplasma* 67:413-441.
52. Girbardt, M. 1979. A microfilamentous septal belt (FSB) during induction of cytokinesis in *Trametes versicolor* (L. ex Fr.). *Exp. Mycol.* 3:215-228.
53. Gooday, G. W. 1971. An autoradiographic study of hyphal growth of some fungi. *J. Gen. Microbiol.* 67:125-133.
54. Gooday, G. W. 1995. The dynamic of hyphal growth. *Mycol. Res.* 99:385-394.
55. Gow, N. A. R., Miller, P. F. P., and Gooday, G. W. 1992. Life at the apex: growth of the hyphal tip. *J. Chem. Tech. Biotech.* 56:217-219.
56. Grover, R. K. 1971. Participation of host exudate chemicals in appressorium formation by *Collectotrichum piperatum*. pp. 509-518. In T. F. Preece and C. H. Dickinson [eds.], *Ecology of leaf surface microorganisms*. Academic Press. NY, USA.
57. Hahn, M. G. 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:387-412.
58. Hamer, J. E., Howard, R. J., Chumley, F. G., and Valent, B. 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239:288-290.
59. Handley, D. A. 1989. The development and application of colloidal gold as a microscopic probe. pp. 1-12. In M. A. Hayat [ed.], *Colloid gold. Principles, methods, and applications*. vol. 1. Academic Press. NY, USA.
60. Haugland, R. P. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6th edition. Molecular Probes Inc. OR, USA.
61. Heath, M. C. 1989. In vitro formation of haustoria of the cowpea rust fungus *Uromyces vignae* in the absence of a living plant cell. I. Light microscopy. *Can. J. Bot.* 68:278-287.
62. Hoch, H. C. 1986. Freeze-substitution of fungi. pp. 183-212. In H. C. Aldrich, and W. J. Todd [eds.], *Ultrastructure techniques for microorganisms*. Plenum Publishing Co. New York, USA.
63. Hoch, H. C., and Staples, R. C. 1984. Evidence that cyclic AMP initiates nuclear division and infection structure formation in the bean rust fungus, *Uromyces phaseoli*. *Exp. Mycol.* 8:37-46.
64. Hoch, H. C., Staples, R. C., and Bourett, T. M. 1987. Chemically induced appressoria in *Uromyces appendiculatus* are formed aerielly, apart from the substrate. *Mycologia* 79:418-424.
65. Hoch, H. C., Staples, R. C., Whitehead, B., Comeau, J., and Wolf, E. D. 1987. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* 235: 1659-1662.
66. Hopkin, A. A., Reid, J., Hiratsuka, Y., and Allen, E. 1988. Initial infection and early colonization of *Pinus contorta* by

- Endocronartium harnessii* (western gall rust). *Can. J. Plant Pathol.* 10:221-227.
67. Howard, R. J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskelton and endomenbranes after freeze-substitution. *J. Cell Sci.* 48: 89-103.
68. Howard, R. J., and Ferrari, M. A. 1989. Role of melanin in appressorium function. *Exp. Mycol.* 13:403-418.
69. Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H., and Money, N. P. 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11281-11284.
70. Howard, R. J., and Valent, B. 1996. Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:491-512.
71. Inoue, S. 1986. Video microscopy. Plenum Press. NY, USA
72. Jackson, S. L., and Heath, I. B. 1989. Effects of exogenous calcium ions on tip growth, intracellular Ca^{2+} concentration, and actin arrays in hyphae of the fungus *Saprolegnia ferax*. *Exp. Mycol.* 13:1-12.
73. Jackson, S. L., and Heath, I. B. 1990. Visualization of actin arrays in growing hyphae of the fungus *Saprolegnia ferax*. *Protoplasma* 154: 66-70.
74. Jackson, S. L., and Heath, I. B. 1993. Roles of calcium ions in hyphal tip growth. *Microbiol. Rev.* 57:367-382.
75. Jones, L., and O'Shea, P. 1993. The electrostatic nature of the cell surface of *Candida albicans*: A role in adhesion. *Exp. Mycol.* 18:111-120.
76. Jones, G. L., Bailey, J. A., and O'Connell, R. J. 1995. Sensitive staining of fungal extracellular matrices using colloid gold. *Mycol. Res.* 99: 567-573.
77. Kaminskij, S. G. W., and Day, A. W. 1984. Chemical induction of infection structures in rust fungi. I. Sugars and complex media. *Exp. Mycol.* 8:193-201.
78. Kaminskij, S. G. W., and Day, A. W. 1984. Chemical induction of infection structures in rust fungi. II. Inorganic ions. *Exp. Mycol.* 8: 193-201.
79. Kaminskyj, S. G. W., Garrill, A., and Heath, I. B. 1992. The relation between turgor and tip growth in *Saprolegnia ferax*: turgor is necessary, but not sufficient to explain apical extension rates. *Exp. Mycol.* 16:64-75.
80. Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., and Herzog, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:439-459.
81. Kolattukudy, P. E. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 223-250.
82. Kunoh, H., Yamaoka, N., Yoshioka, H., and Nicholson, R. L. 1988. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*. I. Contact mediated changes in morphology of the conidium surface. *Exp. Mycol.* 12:325-335.
83. Kuo, K. C., and Hoch, H. C. 1995. Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings, and appressoria of *Phyllosticta ampellicida*. *Mycologia* 87:759-771.
84. Kuo, K. C., and Hoch, H. C. 1996. Germination of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores: prerequisite of adhesion to the substratum and the relationship of

- the substratum wettability. *Fun. Gen. Biol.* 20:18-29.
85. Kuo, K. C., and Hoch, H. C. 1996. The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. *Mycologia* 88:626-634.
 86. Kwon, Y. H., and Epstein, L. 1993. A 90Kda glycoprotein associated with adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia to substrata. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:481-487.
 87. Kwon, Y. H., and Hoch, H. C. 1991. Temporal and spatial dynamics of appressorium formation in *Uromyces appendiculatus*. *Exp. Mycol.* 15:116-131.
 88. Kwon, Y. H., Wells, K. S., and Hoch, H. C. 1993. Fluorescence confocal microscopy: Applications in fungal cytology. *Mycologia* 85:721-733.
 89. Lapp, M. S., and Skoropad, W. P. 1978. Location of appressoria of *Collectotrichum graminicola* on natural and artificial barley leaf surfaces. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 70:225-228.
 90. Lever, M. C., Robertson, B. E. M., Buchan, A. D. B., Miller, P. F. P., Gooday, G. W., and Gow, N. A. R. 1993. pH and Ca^{2+} dependent galvanotropism of filamentous fungi: implications and mechanisms. *Mycol. Res.* 98:301-306.
 91. Login, G., and Dvorak, A. 1993. A review of rapid microwave fixation technology: It's expanding niche in morphologic studies. *Scanning* 15:58-66.
 92. Lopez-Franco, R., Howard, R. J., and Bracker, C. E. 1995. Satellite spitzenkörper in growing hyphal tips. *Protoplasma* 188:85-103.
 93. Lundqvist, T., Rice, J., Hodge, C. N., Basarab, G. S., Pierce, J., and Lindqvist, Y. 1994. Crystal structure of scytalone dehydratase-a disease determinant of the rice pathogen *Magnaporthe grisea*. *Structure* 2: 937-944.
 94. Luttrell, E. S. 1974. Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia* 66:1-15.
 95. Macko, V., Renwick, J. A. A., and Rissler, J. F. 1978. Acrolein induces differentiation of infection structures in the wheat stem rust fungus. *Science* 199:442-443.
 96. Madden, K., Costigan, C., and Snyder, M. 1992. Cell polarity and morphogenesis in *Sacchomyces cerevisiae*. *Trends in Cell Biology* 2:22-29.
 97. Martinez-Cadena, G., and Ruiz-Herrera, J. 1987. Activation of chitin synthetase from *Phycomyces blakesleeanus* by calcium and calmodulin. *Arch. Microbiol.* 148:280-285.
 98. McKerracher, L. J., and Heath, I. B. 1986. Polarized cytoplasmic movement and inhibition of saltations induced by calcium-mediated effects of microbeams in fungal hyphae. *Cell Mot. Cytoskel.* 6:136-145.
 99. Mendgen, K., and Deising, H. 1993. Tansley review No. 48: Infection structures of fungal plant pathogens-a cytological and physiological evaluation. *New Phytol.* 124: 193-213.
 100. Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:367-386.
 101. Mercure, E. W., Kunoh, H., and Nicholson, R. L. 1994. Adhesion of ungerminated conidia of *Collectotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiol. Mol. Plant Path.* 45:421-440.

102. Mills, D., Kunoh, H., Keen, N. T., and Mayama, S. 1996. Molecular aspects of pathogenicity and resistance: requirement for signal transduction. APS Press. Minnesota, USA.
103. Mims, C. W., and Richarson, E. A. 1989. Ultrastructure of appressorium development by basidiospore germlings of the rust fungus *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Protoplasma* 148:111-119.
104. Mims, C. W., K. A. Liljebjelke, and Richarson, E. A. 1995. Surface morphology, wall structure, and initial adhesion of conidia of the powdery mildew fungus *Uncinuliella australina*. *Phytopathology* 85:352-358.
105. Moloshok, T. D., Terhune, R. T., Lamboy, J. S., and Hoch, H. C. 1994. Fractionation of extracellular matrix components from urediospore germlings of *Uromyces*. *Mycologia* 86:787-794.
106. Money, N. P. 1990. Measurement of turgor pressure. *Exp. Mycol.* 14:416-425.
107. Money, N. P., and Harold, F. M. 1992. Extension of the water mold *Achlya*: interplay of turgor and wall strength. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:4245-4249.
108. Money, N. P., and Howard, R. 1996. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenecity using a new method of turgor measurement. *Fun. Genet. Biol.* 20:217-227.
109. Nag Raj, T. R. 1993. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue Publications.
110. O'Connell, R. J., and Ride, J. P. 1990. Chemical detection and ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Collectotrichum lindermultianum*. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* 37:39-53.
111. O'Connell, R. J., Nash, C., and Bailey, A. 1992. Lectin cytochemistry: a new approach to understanding cell differentiation; pathogenesis and taxonomy in *Collectotrichum*. In M. J. Teger, and J. A. Bailey [eds.] *Collectotrichum: Biology, pathology and control*. CAB International, UK.
112. Pain, N. A., Green, J. R., Gammie, F., and O'Connell, R. J. 1994. Immunomagnetic isolation of viable intracellular hyphae of *Collectotrichum lindermultianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav. from infected bean leaves using a monoclonal antibody. *New Phytol.* 127:223-232.
113. Pain, N. A., O'Connell, R. J., Mendgen, K., and Green, J. R. 1994. Identification of glycoproteins specific to biotrophic intercellular hyphae formed in the *Collectotrichum lindermultianum*-bean interaction. *New Phytol.* 127:233-242.
114. Pain, N. A., O'Connell, J. O., and Green, J. R. 1995. A plasma membrane-associated protein is a marker for differentiation and polarization of *Collectotrichum lindermultianum* appressoria. *Protoplasma* 188:1-11.
115. Podilia, G. K., Rogers, L. M., Kolattuduky, P. E. 1993. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Collectotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.* 103:267-272.
116. Preece, T. F., Barnes, G., and Bayley, J. M. 1967. Junction between epidermal cells as sites of appressorium formation by plant pathogenic fungi. *Plant Pathol.*

- 16:117-118.
117. Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:413-434.
118. Rasmussen, J. B., and Hanau, R. M. 1989. Exogenous scytalone restores appressorial melanization and pathogenicity in albino mutants of *Collectotrichum graminicola*. *Can. J. Plant Pathol.* 11:349-352.
119. Read, N. D., Allen, W. T. G., and Knight, H. 1992. Imaging and measurement of cytosolic free calcium in plant and fungal cells. *J. Microscopy* 166:57-86.
120. Robson, G. D., Wiebe, M. G., and Trinci, A. P. J. 1991. Low calcium concentrations induce increased branching in *Fusarium graminearum*. *Mycol. Res.* 95:561-565.
121. Robson, G. D., Wiebe, M. G., and Trinci, A. P. J. 1991. Exogenous cAMP and cGMP modulate branching in *Fusarium graminearum*. *J. Gen. Microbiol.* 137:963-969.
122. Ruiz-Herrera, J., Valenzuela, C., Martinez-Cadena, G., and Obregon, A. 1989. Alterations in the vesicular pattern of and wall growth of *Phycomyces* induced by the calcium ionophore A23197. *Protoplasma* 148: 15-25.
123. Schafer, W. 1994. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:461-477.
124. Schmid, J., and Harold, F. M. 1988. Dual role for calcium ions in apical growth of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2623-2631.
125. Scholtens, I. M. J., Joosten, M. H. A. J., and De Wit, P. J. G. M. 1991. Appearance of pathogen-related proteins in plant hosts. pp.247-265. In G. T. Cole and H. C. Hoch [eds.], *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, NY, USA.
126. Simmonds, J. H. 1965. A study of the species of *Collectotrichum* causing ripe rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 22: 437-459.
127. Sinclair, J. B., and Cerkauskas, R. F. 1996. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. pp.3-29. In S. C. Redlin and L. M. Carris [eds.], *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systemics, ecology and evolution*. APS Press, Minnesota, USA.
128. Stahl, D. J., and Schafer, W. 1992. Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *Plant Cell* 4:621-629.
129. Staples, R. C., and Hoch, H. C. 1987. Infection structures-Form and function. *Exp. Mycol.* 11:163-169.
130. Staples, R. C., Laccetti, L., and Z. Yaniv 1976. Appressorium formation and nuclear division in *Collectotrichum truncatum*. *Arch. Microbiol.* 109:75-84.
131. Staples, R. C., Grambow, H. J., and Hoch, H. C. 1983. Potassium ion induces rust fungi to develop infection structures. *Exp. Mycol.* 7:40-46.
132. Staples, R. C., Hassouna, S., and Hoch, H. C. 1985. Effect of potassium on sugar uptake and assimilation by bean rust germlings. *Mycologia* 77:248-252.
133. Stark-Urnau, M., and Mendgen, K. 1993. Differentiation of aecidiospore- and uredospore-derived infection structures on cowpea leaves and on artificial surfaces by *Uromyces vignae*. *Can. J. Bot.* 71:1236-1242.
134. Suzuki, K., Kubo, Y., Furusawa, I., Ishida, N., and Yamamoto, M. 1982. Behavior of colorless appressoria in an

- albino mutant of *Collectotrichum lagenarium*. *Can. J. Microbiol.* 28:1210-1213.
135. Terhune, B. T., and Hoch, H. C. 1993. Substrate hydrophobicity and adhesion of *Uromyces urediospores* and germlings. *Exp. Mycol.* 17:241-252.
136. Terhune, B. T., Bojko, R. J., and Hoch, H. C. 1993. Deformation of stomatal guard cell lips and microfabricated artificial topographies during appressorium formation by *Uromyces*. *Exp. Mycol.* 17: 70-78.
137. That, T. C. C.-T. Hoang-Van, K., Turian, G., and Hoch, H. C. 1987. Isolation and characterization of coated vesicles from filamentous fungi. *Eur. J. Cell Biol.* 43:189-194.
138. Verwey, E. J. W., and Overbeek, J. T. G. 1948. Theory of the stability of lyophobic colloids-The interaction of sol particles having an electric double layer. pp.205. Elsevier, NY, USA.
139. Vidal-Cros A., Viviani F., Labesse, G., Boccara M., and Gaudry, M. 1994. Polyhydroxynaphthalene reductase involved in melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. *Eur. J. Biochem.* 219: 985-992.
140. Webster, J., and Davey, R. A. 1984. Sigmoid conidia shape in aquatic fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83:43-52.
141. Wessels, J. G. H. 1988. A steady state model for apical wall growth. *Acta Bot. Neerl.* 37:3-16.
142. Wessels, J. G. H. 1996. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trend in Plant Science* 1:9-15.
143. Whittaker, C. J., Klier, C. M., and Kolenbrander, P. E. 1996. Mechanism of adhesion by oral bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:513-552.
144. Wolkow, P. M., Sisler, H. D., and Vigil, E. L. 1983. Effects of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Collectotrichum lindermuthianum*. *Physiol. Pl. Pathol.* 23:55-72.
145. Woloshuk, C. P., Sisler, H. D., Tokousbalides, M. C., and Dutky, S. R. 1980. Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: Site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 14:256-264.
146. Woloshuk, C. P., Sisler, H. D., and Vigil, E. L. 1983. Action of the antipenetrant, tricyclazole, on appressoria of *Pyricularia oryzae*. *Physiol. Plant Pathol.* 22:245-259.
147. Wynn, W. K., 1976. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to a surface contact stimulus. *Phytopathology* 66:136-146.
148. Xiao, J.-Z, Watanabe, T., Kamakura, T., Ohshima, A., and Yamaguchi, I. 1994. Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*. Physicochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation. *Physio. Mol. Pl. Pathol.* 44:227-236.
149. Young, D. H., and H. Kaus. 1984. Adhesion of *Collectotrichum lindermuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 616-619.
150. Zhou, X. L., Stumpf, A., Hoch, H. C., and Kung, C. 1991. A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. *Science* 253:1415-1417.

ABSTRACT

Kuo, K. C. 1998. The early stages of infection behavior in plant pathogenic fungi. Plant Prot. Bull. 40: 1-23. (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R. O. C.)

Plant fungal pathogens have evolved in many ways biochemically and morphologically to ensure their spores can penetrate into their host immediately after spore attachment. Among these changes, one of the most crucial stage is to form a highly specified structure called 'appressorium' that is widely seen in many plant pathogenic fungi for penetration. Appressorium is recognized as the first step that plant fungal pathogens facilitate themselves morphologically in penetrating into their plant hosts. Based on the current knowledge available, the detail procedures of appressorium formation is different among different taxonomic group of fungi and, thus, to understand the detail process and mechanism that resulted appressorium formation are necessary for developing noble measures for plant disease control. The detail process of appressorium formation may be divided into several steps such as spore adhesion, spore germination, apical growth, tip swelling, nuclear division, septation and, in some fungi, melanization. The adhesion of fungal spore and sporlings may be dominated by different kind of mechanisms. Up-to-date information indicates that weak forces especially hydrophobic-hydrophobic interaction and colloid theory play important roles in explaining the adhesion of fungal spores. Tip growth is another unique feature in fungal physiology and at least two hypothesis have been proposed: 'steady-state hypothesis' and 'digest and rebuild hypothesis'. In recent years, a more detail information collected through real time video taping has revealed a more dynamic nature of the tip growth. A more dramatic changes occurs when the germlings 'sense' the differentiation signal and undergoes a series of physiological changes that include reorganization of organell and cytoskelton, balloning of cell tip, synchronous nuclear division and septation etc. Accompany these, a more and more documented information indicated that the role of extracellular matrix may important in terms of adhesion, differentiation and, also, triggering host defense responses. The detail study of the mechanisms of disease initiation will help plant pathologists to discover noble means for disease management. This review mainly focus on the cell biology in model systems such as *Magnaporthe grisea*, *Collectotrichum lindermuthianum*, and *Uromyces appendiculatus* in order to give an overview of recent progress of disease initiation and their potential application in disease control.

(Key words: plant pathogenic fungi, apical growth, appressorium formation, disease initiation)