

# 百香果白星病菌微循環分生孢子之病原性與化學防治

戴裕綸<sup>1+</sup>、王清中<sup>2+</sup>、張富翔<sup>3</sup>、林宗俊<sup>4</sup>、林慧玲<sup>5</sup>、王智立<sup>1, 2, 6, \*</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學植物醫學暨安全農業碩士學位學程

<sup>2</sup> 國立中興大學植物病理學系

<sup>3</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場埔里分場（現址：行政院農業委員會農糧署中區分署）

<sup>4</sup> 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

<sup>5</sup> 國立中興大學園藝學系

<sup>6</sup> 國立中興大學永續農業創新發展研究中心

+ 共同第一作者

\* 聯絡作者，Email: clwang@nchu.edu.tw

## 摘要

戴裕綸、王清中、張富翔、林宗俊、林慧玲、王智立。2021。百香果白星病菌微循環分生孢子之病原性與化學防治。植物醫學63(2): 23-30。

百香果 (*Passiflora edulis* Sims) 的果實可供鮮食、加工等多種用途，是重要的經濟果樹。*Septoria passifloricola* Punith 感染百香果嫁接苗，造成葉部白星病，容易引起落葉，減少嫁接苗的存活率。本研究評估溫溼度對白星病菌分生孢子發芽能力的影響，結果顯示24-28°C及相對溼度97%為最適分生孢子發芽的條件。發現該真菌於液態培養下可進行微循環產孢，產生大量分生孢子，將微循環產生之分生孢子接種於百香果切離葉，結果顯示，接種於傷口處理葉之近軸面及遠軸面，及無傷口處理葉之遠軸面皆可產生病徵；接種於經傷口處理的植株葉片上亦可引發病，顯示微循環產生的分生孢子為具傳染性的繁殖體。評估*S. passifloricola*對登記使用於百香果之殺菌劑的敏感性，發現對三氟派瑞、百克敏、亞托待克利及克熱淨等較敏感，遂選用進行溫室藥劑防治試驗，結果顯示三氟派瑞及亞托待克利之防治效果最佳，接種前及接種後施用殺菌劑無顯著差異；其次為百克敏於接種後施用亦有相近的防治效果。

關鍵詞： *Septoria passifloricola*、葉斑、液態培養、殺菌劑

## 緒言

百香果 (*Passiflora edulis* Sims) 及其他西番蓮屬 (*Passiflora*

spp.) 之種類為重要的經濟作物，百香果果實可供鮮食、果汁及加工等用途，而西番蓮屬中有數種植物的果實可供食用或與百香果雜交育種，由於其花形特異亦有許多作為觀花植物。百香果原產於南美洲，現已於全球各洲有大量的商業栽培，台灣在南投、屏東及花東皆有種植，以南投埔里為最主要的產地。商業栽培品種多為紫色種 (*P. edulis*)、黃色種 (*P. edulis* f. *flavicarpa* O.Deg.) 及其雜交品種。雜交種之 '台農一號' [*Passiflora* 'Tainung No.1' (*Passiflora edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*)] 為台灣最主要之栽培品種，種植時常以 '台農一號' 嫁接黃色種實生苗根砧，以降低土傳真菌性病害的發生<sup>(2, 9)</sup>。過去台灣因病毒病害嚴重影響栽培面積，現以每年全國更新種植的生產模式有效減少病毒病害的發生，此種栽培模式也帶動種苗產業的發展，種苗不僅供應內銷市場，近年來外銷市場也逐漸拓展<sup>(5)</sup>。

*Septoria passifloricola* Punith造成的百香果白星病 (Septoria blotch)，曾於美國、巴西、委內瑞拉、哥倫比亞、南非、肯亞、澳洲、紐西蘭等地被報導；寄主包含紫色種百香果 (*P. edulis*)、黃色種百香果 (*P. edulis* f. *flavicarpa*)、大果西番蓮 (*Passiflora quadrangularis* L.)、*Passiflora alata* Curtis、*Passiflora quitensis* Killip等作物，以及野生之*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey；而黃色種百香果又比紫色種百香果易感病<sup>(8)</sup>。報導指出*S. passifloricola*能感染百香果的葉、嫩梢、花器及果實<sup>(8, 16, 19)</sup>。在台灣，*S. passifloricola*已發生於南投魚池、國姓及台中霧峰等地，此病害多發生在苗圃，露天栽培之百香果較少發生，因此葉部病徵最為常見，葉部病斑為淺

褐色圓形或不規則形的壞疽斑，外圍有黃暈，葉片一旦受感染便容易脫落，於病斑中心形成柄子殼，溼度高時分生孢子堆常自柄子殼泌出，隨雨水傳播，在連續降雨及涼溫時，可能在田間及苗圃成為主要的病害。目前栽培之黃色種及 '台農一號' 百香果均為感病品種<sup>(6)</sup>。

微循環產孢 (microcycle conidiation) 為真菌略過生長菌絲的營養生長階段，直接進入產孢階段，產生大量無性孢子的產孢方式，一般認為與環境逆境有關，可縮減完成生活史所需的時間，加速傳播或增加殘存的數量<sup>(10)</sup>。Jung等人將微循環產孢歸納出四種類型<sup>(10)</sup>：第一型為環境高溫時，分生孢子發芽管形成受阻，因而膨大成球形細胞，當環境溫度降低至合適生長的溫度時，便自球形細胞形成不具基底細胞 (metulae) 且厚壁之產孢梗，在末端形成頂囊 (vesicles) 及瓶狀枝 (phialides) 產孢細胞，*Aspergillus niger* Tiegh.、*Aspergillus flavus* Link : Fr.、*Penicillium cyclopium* Westling 為此類型的代表<sup>(1, 3, 14)</sup>。第二種類型之微循環產孢的環境條件與典型產孢相似，當分生孢子培養於水芹菜或液態培養基，分生孢子產生發芽管後形成或直接形成產孢梗，產孢梗直接產孢不形成瓶狀枝，或以孢梗間瓶狀枝 (intercalary phialides) 產孢，此類型以 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 和 *Cercospora zeaе-maydis* Tehon & E.Y. Daniels 等植物病原菌為代表<sup>(11, 12)</sup>。第三種與真菌在寄主體表與體腔內進行雙型性轉換相關，真菌於昆蟲體表為菌絲型，進入昆蟲體液時則轉為酵母型，並進行微循環產孢，發芽管直接分化為分生孢子，不產生其他構造，以 *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 和 *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 等蟲生真菌為代表<sup>(4, 20)</sup>。第四種類型的分生孢子發芽後，發芽管多隔化並迅速增大及增厚，最終分化為一串近似斷生孢子的分生孢子，此類型為 *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge 獨有<sup>(13)</sup>。

由於百香果白星病於固態培養基上生長緩慢，不易獲得足量的接種源進行防治試驗，本研究發現百香果白星病菌可進行微循環產孢，利用微循環產孢製備接種源進行接種試驗，並自百香果登記用藥中篩選具有防治能力的化學殺菌劑，以防治百香果白星病。

## 材料與方法

### 一、供試菌株及植物材料

本試驗使用之病原菌 *S. passifloricola* PLS-S2 分離自台中市霧峰區採集之嫁接苗上紫色種百香果 (*P. edulis*) 的葉部病斑；*S. passifloricola* PLS-R 分離自南投縣魚池鄉採集之黃色種百香果 (*P. edulis* f. *flavicarpa*) 的葉部病斑，病斑以濕室法促使病原菌在葉面病斑形成柄子殼，黃白色孢子堆呈長鬚狀擠出，以玻璃針在水瓊脂培養基 (WA, water agar; agar 20 g, and H<sub>2</sub>O 1000 ml) 上進行病原菌單胞分離，置於室溫24小時，確認孢子發芽

後，移植至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA, potato dextrose agar; Becton Dickinson, USA)<sup>(6)</sup>，在25°C、光照/黑暗為12/12 hr下培養7-14天，待其產孢後以7.5%脫脂牛奶洗下孢子至silica gel震盪混勻，並於-80°C進行保存。試驗使用之植物材料為黃色種百香果，切離葉接種之葉片材料，取自種植於國立中興大學溫室之植株，溫室化學防治試驗使用購自青農生物科技有限公司種植七週的實生苗。

### 二、溫度和相對溼度對白星病菌分生孢子發芽率之影響

由於白星病菌生長緩慢，以菌絲生長來評估，差異不明顯，因此，溫度和相對溼度的試驗均以孢子發芽率來評估。溫度試驗選用PLS-S2及PLS-R二菌株，利用PDA 培養於25°C 14天，製備濃度5 × 10<sup>5</sup> conidia/ml之分生孢子懸浮液，取10 μl到WA 培養基上，培養於16、20、24、28及32°C，光照/黑暗為12/12 hr之恆溫生長箱，24 hr後鏡檢分生孢子的發芽率。計數100顆分生孢子為一重覆，進行三重覆。

相對溼度試驗利用與溫度試驗相同之菌株，製備濃度5 × 10<sup>5</sup> conidia/ml之分生孢子懸浮液，將10 μl之分生孢子懸浮液滴於風乾之WA切片上，以無菌操作台風乾後，再將玻片置於裝有H<sub>2</sub>O (RH=100%)、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96.9%)、KNO<sub>3</sub> (92.0%)、KCl (84.3%)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (80.3%) 及NaCl (75.8%) 之飽和溶液的玻璃培養皿中，以保鮮膜密封，利用鹽類飽和溶液製造不同相對溼度之環境條件<sup>(17)</sup>，放置於25°C，光照/黑暗為12/12 hr之生長箱，24 hr後鏡檢分生孢子的發芽率。每處理計數100分生孢子為一重覆，進行三重覆。

### 三、固態及液態培養產孢之形態觀察

將PLS-S2及PLS-R以固態之PDA及液態之YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose，酵母萃取物3 g、蛋白胨10 g及葡萄糖20 g/L) 培養基培養在25°C下，光照/黑暗為12/12 hr之環境下，PDA培養約14天後，YEPD約7天後，利用光學顯微鏡觀察菌落及分生孢子的形態。

### 四、固態和液態培養基產孢量之差異

為比較固態與液態培養之產孢量，分別配置PDA、PDB (Potato Dextrose Broth，成分同PDA但不含洋菜20 g/L)、YEPD-A (Yeast Extract Peptone Dextrose-Agar；成分同YEPD，再添加洋菜20 g/L) 和YEPD等共四種培養基，每培養皿或三角瓶倒入20 ml培養基。接種源為將PLS-S2於PDA培養14天，以直徑4 mm打孔器切取菌落邊緣之菌絲塊一塊，分別培養於以上四種培養基，於25°C黑暗之生長箱。固態培養7天後，利用無菌水洗下培養基上之分生孢子，重複收集數次直至光學顯微鏡下鏡檢洗出液無分生孢子殘留，離心 (5000 rpm, 30分鐘) 沉降分生孢子，以1.5 ml無菌水懸浮分生孢子；液態培養為置於迴轉式震盪器 (125 rpm) 上培養7天，以血球計數器計算分生

孢子懸浮液濃度，並換算總產孢量。每處理以一皿或一瓶為一重覆，各進行三重覆。

## 五、微循環分生孢子之病原性

將切離葉材料以0.6% NaClO (CLOROX®) 消毒十分鐘，用無菌水沖洗，再以針頭進行傷口處理。將從PDA及YEPD洗下之PLS-S2分生孢子製備成濃度 $4 \times 10^5$  conidia/ml分生孢子懸浮液，分別接種於同一葉片之左側 (PDA) 及右側 (YEPD)，每接種點接種10  $\mu$ l分生孢子懸浮液，以無菌水接種傷口處理之葉片為對照組。並同時在葉之近軸面 (adaxial surface) 及遠軸面 (abaxial surface) 接種，比較接種部位病斑之發展。

## 六、殺菌劑對分生孢子發芽率之影響

選用PLS-S2及PLS-R二株菌株進行試驗；受評估之殺菌劑為9種百香果炭疽病登記藥劑：甲基多保淨 (Thiophanate-methyl, 40% SC, 東和化學)、三氟敏 (Trifloxystrobin, 50% WG, BAYER)、亞托敏 (Azoxystrobin, 23% SC, 高事達農化)、百克敏 (Pyraclostrobin, 23.6% EC, BASF)、三氟派瑞 (Fluopyram + Trifloxystrobin, 50% SC, BAYER)、亞托待克利 (Azoxystrobin + Difenconazole, 325g/l SC, Syngenta®)、得克利 (Tebuconazole, 25.9% EW, BAYER)、賽普護汰寧 (Cyprodinil + Fludioxonil, 62.5% WG, Syngenta®) 和克熱淨 (Iminoctadine triacetate, 40% WP, 日本曹達株式會社)，將藥劑加入PDA，使殺菌劑有效成分濃度分別為1、10、100及500 ppm，以無藥劑PDA為對照組。製備濃度 $5 \times 10^5$  conidia/ml之分生孢子懸浮液，取10  $\mu$ l滴於藥劑培養基，將培養皿培養於25°C，光照/黑暗為12/12 hr之生長箱，24 hr後鏡檢，以分生孢子發芽抑制率評估對殺菌劑的敏感性。每處理計數100顆分生孢子為一重複，並以公式[孢子發芽抑制率 (%) = (對照組孢子發芽率 - 處理組孢子發芽率) / 對照組孢子發芽率]換算成孢子發芽抑制率，每處理三重覆。

## 七、接種前及接種後施用殺菌劑防治百香果白星病之效果

植株栽培於走入式生長箱 (25  $\pm$  1°C) 之層架上，每棵植株取四片葉，每片葉子以針頭處理6點傷口。供試菌株選用PLS-S2，以YEPD液態培養微循環產孢製備接種源，離心沉降分生孢子後以含0.1%之tween 80之無菌水調整為濃度為 $10^7$  conidia/ml，每一傷口接種10  $\mu$ l分生孢子懸浮液，層架四周以塑膠布包圍，每天加濕以維持高濕度生長環境。選擇三氟派瑞、亞托待克利、百克敏及和克熱淨等殺菌劑，依據登記藥劑之稀釋倍率稀釋 (三氟派瑞稀釋4000倍、亞托待克利稀釋3000倍、百克敏稀釋3000倍及和克熱淨稀釋1500倍)，於接種前或接種後一天噴佈於植株，並以不加殺菌劑的無菌水為對照組。接種後8天調查葉部之接種點罹病指數，並計算罹病度。罹病指數設定：零級為無病徵；一級為無壞疽但接種點周圍出現黃暈；二級

為壞疽斑直徑1 mm以下；三級為壞疽斑直徑1-3 mm；四級為壞疽斑直徑超過3 mm；五級為落葉。罹病度公式：罹病度 (%) =  $\Sigma$  (接種點罹病指數  $\times$  該指數之接種點數) / (最高罹病指數  $\times$  總調查接種點數)  $\times$  100。每處理接種6棵植株，每植株接種4片葉，每片葉6個接種點。

## 八、統計分析

本研究之試驗數據以SAS Enterprise Guide V. 7.1統計軟體進行分析，並使用Tukey's HSD (honestly significant difference) 或Fisher's LSD (least-significant difference) 分析各處理間之顯著性差異 (P < 0.05)。其結果利用Microsoft office 2019 Excel進行繪圖。

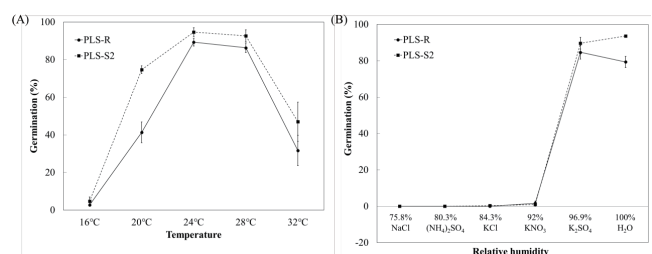
# 結果

## 一、溫度和相對溼度對白星病菌分生孢子發芽率之影響

為了解適合白星病發病之環境條件，調查溫度及相對濕度對分生孢子發芽率之影響，溫度試驗之結果，24-28°C之間為PLS-R和PLS-S2二菌株較適合孢子發芽之溫度範圍，發芽率均可達80%；32°C時兩菌株發芽率均低於50%，16°C時兩菌株發芽率皆不到10% (圖一 A)。相對溼度試驗之結果，25°C時，相對濕度高於97%，孢子發芽率可達70%以上，低於92%則幾乎無法發芽，顯示白星病菌孢子的發芽對相對溼度極為敏感，且需要高相對濕度才能促使孢子發芽 (圖一B)。

## 二、固態及液態培養產孢之形態觀察

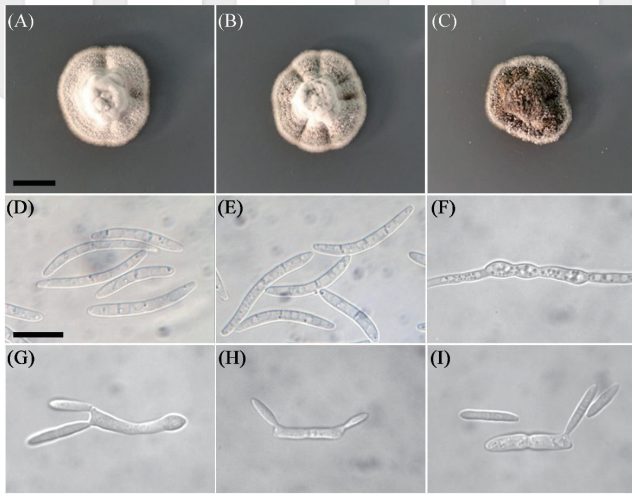
固態培養*S. passifloricola*時，菌絲生長及產孢均緩慢，遂進行液態培養試驗，觀察菌絲生長及產孢之情形。PDA上培養14天之菌落大小約為1.5-3.0 cm，菌落正面為灰白色至紅褐色，中央隆起，菌落表面及外圍平鋪緻密之氣生菌絲，柄子殼形成量及產孢量隨菌落型態變化 (圖二A-C)。以PDA培養可形成柄



圖一、溫度和相對溼度對*Septoria passifloricola* PLS-R 及PLS-S2分生孢子發芽之影響。(A) 溫度及(B) 相對溼度之分生孢子發芽率以平均值表示，誤差線為標準差。

Fig. 1. Effect of relative humidity (25°C) and temperatures on conidial germination of *Septoria passifloricola* PLS-R and PLS-S2 isolates. (A) Temperature and (B) Relative humidity. Conidial germination as presented by mean and the error bars indicated standard deviations.





圖二、*Septoria passifloricola* PLS-R和PLS-S2菌落和孢子形態。(A-C) PDA上具白色氣生菌絲或橘色孢子堆之菌落，比例尺=1 cm。(D-E) PDA上產生之絲狀及柱狀，多隔之分生孢子，*S. passifloricola* PLS-R (D) 及PLS-S2 (E)。(F) PLS-S2發芽之分生孢子。(G-I) PLS-S2分生孢子於PDB (G) 和YEPD (H-I) 液態培養時之微循環產孢。(D-I) 比例尺=10 μm

**Fig. 2.** Colonies and conidial morphology of *Septoria passifloricola* PLS-R and PLS-S2 isolates. (A-C) Colonies on PDA with aerial mycelium, or with pink or orange conidia mass. Bar =1 cm. (D-E) *Septoria passifloricola* on PDA produced filiform to cylindrical multi-septate conidia. (D) PLS-R and (E) PLS-S2. (F) conidial germination of isolate PLS-S2. (G-I) Conidia were generated through microcycle conidiation from PDB (G) and YEPD (H-I) liquid cultures. (D-I) Bar =10 μm.

子殼，柄子殼產生之分生孢子形態為長條狀、微彎或桿狀，無色透明，具有1-3隔，隔間無明顯縮，大小約為 $13.4-28.6 \times 1.2-2.9 \mu\text{m}$  (圖二D-E)。以PDB (圖二G) 或YEPD (圖二H-I) 液態培養基培養，發現分生孢子可進行微循環產孢，分生孢子不形成菌絲及分生孢子梗，直接產生分生孢子。YEPD液態培養基中分生孢子形態為桿棒狀，無色透明，孢子大小約為 $7.3-15.9 \times 1.3-4.8 \mu\text{m}$ ，具有0-1隔。

### 三、固態和液態培養基產孢量之差異

為製備大量接種源，比較PDA(固態)、PDB(液態)、YEPD-

A(固態)及YEPD (液態) 等四種培養基產孢量之差異，培養7天後，總產孢量由高到低依次為YEPD、PDB、PDA及YEPD-A (表一)。YEPD液態培養基總產孢量為 $1.6 \times 10^8$  conidia，為YEPD-A固態培養基的1000倍，PDA固態培養基之100倍，PDB液態培養基之10倍。PDB及YEPD兩種培養基皆是液態培養基，產生之分生孢子量均較相同培養基成分之固態培養基多，此外若單論固態培養時，PDA產孢量高於YEPD-A；液態培養時，YEPD則高於PDB。

### 四、微循環分生孢子之病原性

為了解微循環產生之分生孢子的病原性及致病力，比較固態及液態培養產生之分生孢子之致病力差異，收集上述二種方式產生之分生孢子以切離葉進行接種。經傷口處理的葉片，葉之近軸面及遠軸面分別接種相同濃度之分生孢子懸浮液，於21天後固態及液態培養產生之分生孢子均能形成明顯病斑，發病率100%，且病斑大小與形態均無明顯差異 (圖三)。無傷口處理之葉片，接種於近軸面時，發病情形不穩定，固態培養分生孢子的三個接種點中，發病率約30%；接種液態培養分生孢子均無病斑產生，僅於葉表接種點上形成白色菌絲。接種於無傷口處理葉片遠軸面時，普遍能產生病斑，發病情形較近軸面接種穩定，接種固態培養分生孢子發病率為66%，接種液態培養分生孢子發病率為100%，但相較有傷口遠軸面之接種處理，病徵發展較慢。

### 五、殺菌劑對分生孢子發芽率之影響

自登記於植物保護手冊之百香果推薦用殺菌劑中篩選可應用之藥劑。計算白星病菌分生孢子於含有藥劑的PDA培養基中的發芽率，百克敏及三氟派瑞在1 ppm下即能完全抑制分生孢子發芽，三氟敏、亞托敏、亞托待克利及得克利等在1 ppm下即能達到60%以上的分生孢子發芽抑制率；亞托待克利在10 ppm下能完全抑制分生孢子發芽；得克利及克熱淨等在100 ppm下能完全抑制分生孢子發芽；亞托敏則在500 ppm下能完全抑制分生孢子發芽。甲基多保淨對PLS-S2及PLS-R分生孢子發芽無直接抑制的能力，賽普護汰寧需要較高劑量才能抑制PLS-S2及PLS-R之分生孢子發芽 (圖四)。

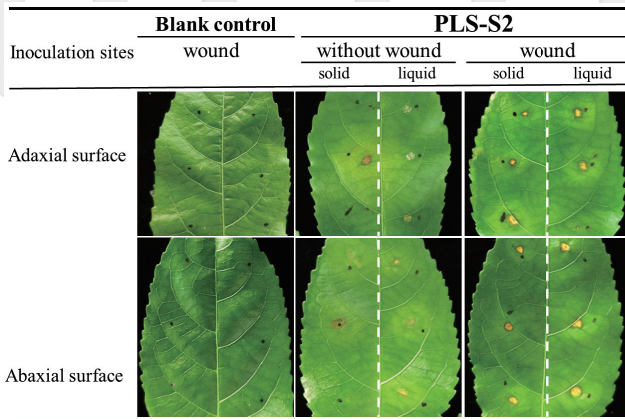
表一、固態和液態培養基培養*Septoria passifloricola*產孢量之差異。

**TABLE 1.** Conidiation comparison of *Septoria passifloricola* on solid and liquid cultures.

Medium	Culture type	Numbers of conidia (conidia/ml)				Total volume (ml)	Total conidia (number) <sup>2</sup>
		Repetition 1	Repetition 2	Repetition 3	Average		
YEPD-A <sup>1</sup>	Solid	$7.5 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$6.2 \pm 1.3 \times 10^4$	1.5	$9.3 \times 10^4$ b
YEPD	Liquid	$4.3 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$	$8.0 \pm 6.1 \times 10^6$	20	$1.6 \times 10^8$ a
PDA	Solid	$2.8 \times 10^5$	$6.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^6$	$1.2 \pm 1.3 \times 10^6$	1.5	$1.8 \times 10^6$ b
PDB	Liquid	$3.0 \times 10^4$	$8.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6$	$7.4 \pm 6.9 \times 10^5$	20	$1.5 \times 10^7$ a

<sup>1</sup> YEPD-A: YEPD medium with 2% agar.

<sup>2</sup> Numbers followed by different letter are significantly different at  $P \leq 0.05$  by Tukey's HSD.



圖三、液態培養產生之百香果白星病分生孢子之切離葉病原性試驗。以YEPD液態培養產生之孢子與PDA固態培養基之孢子，接種於有傷口處理及無傷口處理的切離葉，有傷口處理的接種點發病穩定且明顯。代表圖片為葉片接種後的近軸面，顯示兩種接種源產生之病徵無明顯差異。當分別接種於葉部近軸面及遠軸面，以遠軸面接種發病率較穩定而明顯。

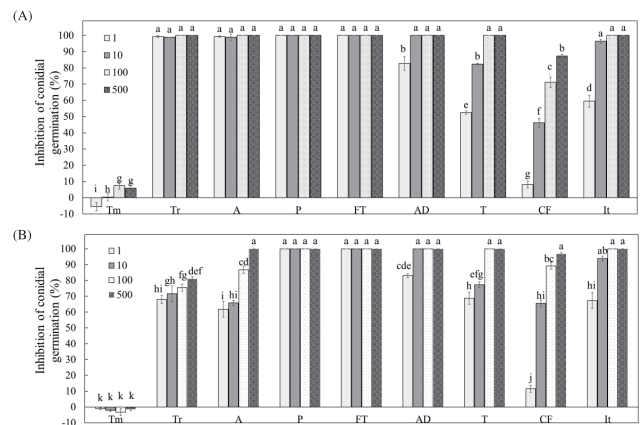
**Fig. 3.** Pathogenicity test of microcycle conidia from liquid cultures on detached leaves. When inoculated on wounded and unwounded leaves with conidia from YEPD broth and PDA solid medium, *S. passifloricola* consistently caused lesion on the wounded leaves. The representative photos showing the adaxial surface of inoculated leaves indicates that conidia from YEPD broth induced the same symptoms as conidia from PDA solid medium. When the adaxial and abaxial surface were inoculated, the abaxial surface developed symptoms in higher frequency.

## 六、接種前及後施用殺菌劑防治黃色種百香果白星病之效果

選擇上述對分生孢子發芽率抑制效果較佳的殺菌劑進行防治試驗，試驗結果顯示水處理對照組的罹病度87.8%為最高，每株植株均有兩片落葉；防治效果最差之兩處理為接種前及接種後施用克熱淨，罹病度分別為78.1%及77.5%，兩處理間無顯著差異；防治效果最佳者為接種前施用三氟派瑞（罹病度22.3%）、接種後施用三氟派瑞（罹病度22.8%）及接種前施用亞托待克利（罹病度22.1%），三處理間無顯著差異，平均病害抑制率為75%，接種點呈現退綠黃暈，無壞疽斑產生。四種殺菌劑僅有百克敏接種後施用（罹病度30.0%）效果較接種前施用（罹病度39.0%）佳，其餘殺菌劑接種前及後施用無顯著差異（圖五）。

## 討論

台灣百香果白星病發生於嫁接苗之育苗時期，甚少發生於露天栽種之百香果樹上，筆者僅曾於南投縣國姓鄉之一處百香果園採集到此病害。本研究首先了解環境條件與病害發生的關係，進行溫度和相對溼度對分生孢子發芽率的試驗，供試菌株 *S. passifloricola* PLS-S2及PLS-R分生孢子最適合發芽的溫度為



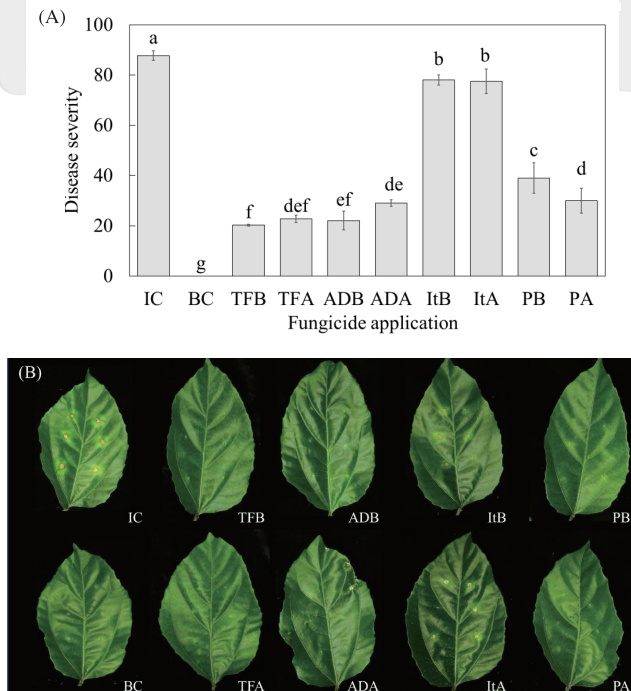
圖四、殺菌劑對 *Septoria passifloricola* 代表菌株分生孢子發芽之影響。(A) PLS-S2及 (B) PLS-R。數據以平均值表示發芽抑制率，誤差線為標準差，以Tukey's HSD統計差異顯著水準 ( $P < 0.05$ )。Tm: 甲基多保淨; Tr: 三氟派瑞; A: 亞托敏; P: 百克敏; FT: 三氟派瑞; AD: 亞托待克利; T: 得克利; CF: 賽普護汰寧; It: 克熱淨。圖表內的數字代表試驗藥劑使用之有效成分濃度分別為1、10、100及500 ppm。

**Fig. 4.** Effects of fungicides on conidial germination of *Septoria passifloricola*. (A) PLS-S2 and (B) PLS-R. Data represent the means of the inhibition percentage of conidial germination and error bars indicate standard deviations. Letters followed by are significant difference which calculated by Tukey's HSD at  $P < 0.05$ . Tm: Thiophanate-methyl, Tr: Trifloxystrobin, A: Azoxystrobin, P: Pyraclostrobin, FT: Fluopyram + Trifloxystrobin, AD: Azoxystrobin + Difenconazole, T: Tebuconazole, CF: Cyprodinil + Fludioxonil, It: Iminoctadine triacetate. The applied concentrations of fungicide active ingredients are 1, 10, 100 and 500 ppm.

24-28°C (圖一A)；相對溼度為97%以上，而92%以下幾乎不發芽 (圖一B)，顯示濕度條件對孢子發芽之影響遠較溫度條件顯著，推測高濕度的環境為決定白星病菌孢子發芽的重要環境因子，此結果與育苗場的環境相呼應，百香果嫁接苗多為 '台農一號' 嫁接黃色種砧木，嫁接後的癒合期會放置於高溼的環境降低蒸散以利苗株生存，苗圃灌溉水蒸發或緊密排列的苗株的蒸散作用，均會造成容易發病的高濕度微氣候。

在切離葉接種試驗中，發現無傷口處理時，遠軸面接種明顯較近軸面容易發病，近軸面接種微循環分生孢子雖可產生白色表生菌絲，但不產生壞疽斑，推測為近軸面上氣孔數量極少，而遠軸面上氣孔的數量較多，可供 *S. passifloricola* 侵入產生病害。小麥葉斑病的研究指出 *Septoria tritici* Desm. 主要經由氣孔入侵小麥，經纏繞後於氣孔下方的空腔逐漸形成柄子殼<sup>(7)</sup>。龍膽草葉枯病的研究亦發現，感病品種較抗病品種有較多的氣孔密度於葉表，經epidermal patterning factor-like 9 胜狀處理之龍膽草，氣孔密度增加後，對 *Septoria gentianae* Thüm. 更為感病<sup>(18)</sup>。但無論葉之近軸面及遠軸面，本研究結果顯示經傷口處理後均可產生病徵 (圖三)，說明傷口可以增加 *S. passifloricola* 侵入寄主的機會，因此於苗圃或田間栽培時，有





圖五、接種前及後施用殺菌劑防治百香果白星病之效果。數據以平均值表示罹病度，誤差線為標準誤，以Fisher's LSD統計差異顯著水準。IC：無殺菌劑對照組（水處理）；BC：無接種對照組；TFB：接種前施用三氟派瑞；TFA：接種後施用三氟派瑞；ADB：接種前施用亞托待克利；ADA：接種後施用亞托待克利；ItB：接種前施用克熱淨；ItA：接種後施用克熱淨；PB：接種前施用百克敏；PA：接種後施用百克敏。

**Fig. 5.** The control efficacy of fungicide applications on *Septoria* leaf blotch of *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*. Data represent means of disease severity and error bars indicate standard errors. Letters indicate significant difference which calculated by Fisher's LSD. IC: the inoculation control without fungicide applications; BC: the blank control without inoculation; TFB: Fluopyram + Trifloxystrobin application before inoculation; TFA: Fluopyram + Trifloxystrobin application after inoculation; ADA: Azoxystrobin + Difenconazole application after inoculation; ADB: Azoxystrobin + Difenconazole application before inoculation; ItB: Iminoctadine triacetate application before inoculation; ItA: Iminoctadine triacetate application after inoculation; PB: Pyraclostrobin application before inoculation; PA: Pyraclostrobin application after inoculation.

害動物、農務操作或惡劣天氣事件在植株上產生傷口，如適逢溫暖高濕的天氣，將有利於百香果白星病發生。

*Septoria passifloricola* PLS-R和PLS-S2之菌落在PDA上生長緩慢，在PDA培養可見柄子殼產生需7-14天不等，產孢時間及產孢量較不穩定，不易取得高濃度的分生孢子作為接種源；但以液態培養時，可進行微循環產孢產生大量分生孢子，惟同處理之不同重複試驗間的產孢量變異頗大。在固態及液態培養基上產孢量變異之現象，推測為菌株的變異所導致，雖各重複試驗皆使用同一菌株進行，但於固態培養試驗時，可觀察到不同批次的接種源所培養形成的菌落型態，於氣生菌絲的多寡有些

微不同，經驗上當氣生菌絲較多時產孢量較少，因此以氣生菌絲量與野生型相似的菌落進行試驗。由於*S. passifloricola*在固態培養基上菌落發展緩慢，菌落的變異不若生長快速的菌容易察覺，因此如何減少*S. passifloricola*生長變異性可為未來的探討方向。

液態培養時發芽管在形成後立即分化為新生之分生孢子，不形成產孢梗或其他產孢構造，產孢方式類似出芽生殖(圖2 G-I)，此微循環產孢模式與Jung等人歸納之四種類型相比，微循環產生的環境條件與植物病原真菌代表的第二種類型相同，但微循環產孢方式與蟲生真菌為代表的第三種類型最為相似<sup>(10)</sup>。此外，前人研究亦提出影響微循環產孢之因子，如碳氮源、pH值、溫度、單位面積上的孢子濃度或其他環境逆境等，不同菌種對相同的因子也可能有不同的反應，如碳源是*A. niger*分生孢子膨大的重要因子，但*B. bassiana*可在碳源不存在的環境下進行微循環產孢<sup>(4)</sup>。而銨鹽(NH<sup>4+</sup>)可抑制*C. zeaemaydis*微循環產孢，但硝酸鹽、胺基酸及簡單醣類不影響微循環產孢<sup>(12)</sup>；*B. bassiana*在氮源受限的環境下促進微循環產孢<sup>(4)</sup>。本研究的目的是在建立接種及病害防治方法，因此未針對*S. passifloricola*微循環產孢的環境因子進行探討，但測試了不同類型的培養基，其中液態培養的產孢模式均以微循環產孢為主，比較二種配方，YEPD之產孢量高於PDB約10倍(表一)，此二種配方均為營養豐富之培養基，故營養充足不會抑制*S. passifloricola* PLS-S2進行微循環產孢，與*C. zeaemaydis*及*B. bassiana*需營養缺乏之特性不同，可能與液態培養時的低氧環境或其他特性有關；而YEPD含氮源又較PDB高，故提高氮源也可能提高總產孢量，確切影響*S. passifloricola*微循環產孢之環境因子有待進一步探討。

離葉接種試驗中發現，經YEPD液態培養產生之分生孢子，與PDA培養產生之分生孢子均有相當的致病能力，皆可於有傷口處理及無傷口處理的葉片上造成病徵(圖三)。此外於無傷口處理葉片遠軸面的接種中，液態培養產生之分生孢子相較固態培養產生之分生孢子有較高的發病率，然而兩種孢子的致病能力是否有所不同，需進一步試驗考慮產生孢子的培養基營養成分，及比較不同的孢子濃度接種後的病害發生率。其他病害的研究亦指出*C. zeaemaydis*、*B. bassiana*及*M. acridum*微循環產生之分生孢子與一般條件下產生之分生孢子具相同的致病效率<sup>(4, 12, 20)</sup>。一般推測微循環產孢可能是微生物克服逆境所衍生的殘存方式，可以合理推測，病原菌亦可能以微循環產孢產生之分生孢子進行殘存，之後成為病害的初次接種源(primary inoculum)，以微循環產孢之分生孢子作為接種源，於病害生態上亦具合理性。此外在YEPD液態培養下*S. passifloricola*可產生較固態培養100 - 1000倍的分生孢子量，未來可利用液態培養製備大量接種源以克服固態培養生長緩慢、產孢量不足的問題。

百香果白星病的化學防治，國外文獻提出可利用甲基多保

淨+四氯異苯腈 (thiophanate-methyl + chlorothalonil) 或苯并咪唑類 (benzimidazole)，如腐絕 (Thiabendazole)<sup>(8)</sup>。國內百香果化學殺菌劑的登記用藥包含甲基多保淨但不含四氯異苯腈，苯并咪唑類殺菌劑僅有免賴得 (benomyl)，不含腐絕。另外，國外已發現對免賴得具有抗性的菌株<sup>(15)</sup>，因此實務上宜使用混和藥劑及輪替用藥以降低抗藥性的產生。目前百香果登記用藥中除甲基多保淨無明顯抑制效果，賽普護汰寧須達100 ppm才可抑制分生孢子發芽達60%(圖四)，三氟派瑞、亞托待克利及百克敏等具較佳的抑菌效果，在葉表製造傷口的強勢接種條件下可控制白星病發生(圖五)，又分屬於FRAC C2+C3、C3+G1及C3等作用機制，因此，三氟派瑞、亞托待克利及百克敏可輪替使用於苗圃或田間，尤其需在植株可能處於高感染風險環境時進行預防性用藥，降低病害發生或避免挾帶病原，惟使用時宜採取預防性用藥及著重葉背施用。由於*S. passifloricola*菌絲生長緩慢，不易顯著評估生長差異，故本研究以分生孢子發芽抑制率評估培養皿上對殺菌劑之敏感性，不排除登記用藥中有對*S. passifloricola*菌絲生長具抑制作用的殺菌劑。

## 謝 辭

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫：107農科-1.2.7-科-aD及108農科-1.2.1-科-a2、教育部高教深耕計畫特色領域研究中心計畫及永續農業創新發展中心經費補助得以順利完成，謹此致謝。本文為第一作者碩士論文部分內容改寫而成。

## 引用文獻

- Ahearn, D. G., Price D., Simmons, R. B., Mayo, A., Zhang, S. T., and Crow, S.A. Jr. 2007. Microcycle conidiation and medusa head conidiophores of aspergilli on indoor construction materials and air filters from hospitals. *Mycologia* 99:1-6.
- Amata, R. L., Otipa, M. J., Waiganjo, M., Wasilwa, L. A., Kinoti, J., Kyamanywa, S. and Erbaugh, M. 2011. Management strategies for fungal diseases in passion fruit production systems in Kenya. *Acta Hort.* 911: 207-213.
- Anderson, J. G., and Smith, J. E. 1971. The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation). *J. Gen. Microbiol.* 69:185-97.
- Bosch, A., and Yantorno, O. 1999. Microcycle conidiation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* bals. (vuill.). *Process Biochem.* 34:707-16.
- Chang, C. A., Huang, L. C., Chen, Y. C., Lin, Y. Y., Lu, H. C. and Lin, D. Y. 2017. A review of the research and control of passionfruit virus diseases in Taiwan. *J. Plant Med.* 59: 1-12.
- Dai, Y. L., Wang, C. C., Lin, H. L., and Wang, C. L. 2021. First report of Septoria blotch of passion fruit caused by *Septoria passifloricola* in Taiwan. *Plant Dis.* 105: 700.
- Duncan, K. E., and Howard, R. J. 2000. Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycol. Res.* 104: 1074-1082.
- Fischer, I. H., and Resende, J. A. M. 2008. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). *Pest Tech.* 2: 1-19.
- Gardner, D. E. 1989. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* to banana poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. *Plant Dis.* 73: 476-478.
- Jung, B., Kim, S., and Lee, J. 2014. Microcycle conidiation in filamentous fungi. *Mycobiology* 42: 1-5.
- Kølmark, H. G. 1984. Mutants with continuous microcycle conidiation in the filamentous fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Mol. Gen. Genet.* 198:12-8.
- Lapaire, C. L., and Dunkle, L. D. 2003. Microcycle conidiation in *Cercospora zea-maydis*. *Phytopathology* 93:193-199.
- Maheshwari, R. 1991. Microcycle conidiation and its genetic basis in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2103-15.
- Pažout, J., and Schröder, P. 1988. Microcycle conidiation in submerged cultures of *Penicillium cyclopium* attained without temperature changes. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2685-2692.
- Peterson, R. A. 1977. Benomyl resistance in *Septoria passiflora* Louw. *APPS Newsletter* 6: 3-4.
- Ploetz, R. C., Manicom, B., Ruggiero, C., and de Goes, A. 2003. Disease of passion fruit. Pages 413-437 in: *Disease of Tropical Fruit Crops*. R. C. Ploetz ed. CABI, Florida, USA. 527 pp.
- Sinclair, J. B. and Dhingra, O. D. 1995. Solutions to maintain constant humidity in a closed atmosphere. Pages 3 97-402 in: *Basic Plant Pathology Methods*. O. D. Dhingra & J. B. Sinclair ed. CRC Press, Boca Raton, 434 pp.
- Tateda, C., Obara, K., Abe, Y., Sekine, R., Nekoduka, S., Hikage, T., Nishihara, M., Sekine, K.-T., and Fujisaki, K. 2019. The host stomatal density determines resistance to *Septoria gentianae* in Japanese gentian. *Mol. Plant Microbe Interact.* 32: 428-436.
- Verkley, G. J. M., Quaedvlieg, W., Shin, H. D., and Crous, P. W. 2013. A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Stud. Mycol.* 75: 213-305.
- Zhang, S., Peng, G., and Xia, Y. 2010. Microcycle conidiation and the conidial properties in the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum* on agar medium. *Biocontrol Sci. Technol.* 20: 809-19.

## ABSTRACT

Yu-Lun Dai, Ching-Chung Wang, Fu-Hsiang Chang, Tsung-Chun Lin, Huey-Ling Lin and Chih-Li Wang\*. 2021. Pathogenicity of microcycle conidia and chemical control of Septoria blotch of passion fruit. J. Plant Med. 63(2): 23-30.

\*Corresponding author, E-mail: clwang@nchu.edu.tw

Passion fruits (*Passiflora edulis*) have high economic values because the fruits could be consumed in multiple ways such as fresh fruit or food processing. *Septoria passifloricola* frequently causes leaf blotches on grafted seedlings of passion fruits at nursery, resulting in defoliation and reduction of survival. Here, the effects of temperature and relative humidity on conidial germination of *S. passifloricola* isolates PLS-S2 and PLS-R were evaluated. The optimal conditions of conidial germination were at 24-28°C and  $\geq 97\%$  of relative humidity. It was found that *S. passifloricola* could undergo microcycle conidiation in submerged cultures and generate abundant conidia. The microcycle conidia were able to produce symptoms at detached leaves when inoculated on adaxial and abaxial surfaces of wounded leaves and abaxial surface of unwounded leaves. Symptoms were also induced by microcycle conidia on wounded leaves attaching on plants. These results suggest that microcycle conidia are infectious propagules. The screening of fungicide sensitivity indicated that isolates PLS-S2 and PLS-R were sensitive to pyraclostrobin, fluopyram + trifloxystrobin, azoxystrobin + difenoconazole, and iminocadine triacetate. The four fungicides were assayed in greenhouse trials. The fluopyram + trifloxystrobin and azoxystrobin + difenoconazole were the most effective on the control of Septoria blotch of passion fruit, and their applications before or after inoculation were no significant difference. The application of pyraclostrobin after inoculation was also effective.

**Keywords:** *Septoria passifloricola*, leaf blotch, liquid culture, fungicide