

葡萄銹病夏孢子發芽之影響因子與殺菌劑抑制效果評估¹

何湧峰²、許晴情^{2*}

摘 要

葡萄銹病(Grapevine rust)常導致植株提早落葉，嚴重影響果實品質及來年產量。由於化學防治仍是目前主要的管理手段，本研究旨在優化環境因子(光暗時序、溫度、產孢起始後天數與瓊脂來源)，建立穩定之葡萄銹病菌(*Neophysopella meliosmae-myrianthae*)藥劑評估平臺。實驗結果顯示，夏孢子於溫度 28℃ 搭配先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序(12 hr D/L)處理下，發芽率可達 75.0%，顯著高於連續黑暗處理。在孢子活性方面，以產孢起始後第 1-2 天之新鮮孢子發芽活性最強，另使用高級洋菜粉製備之培養基表現優於 Bacto Agar。進一步透過離體葉片圓盤接種試驗發現，雖然孢子發芽最適溫為 28℃，但病斑發展則以 22℃ 最為穩定；在藥劑感受性試驗中，四氯異苯腈、克熱淨、護汰芬、得克利、百克敏、鋅錳乃浦及改良式硫黃等參試藥劑能 100.0% 抑制孢子發芽。在葉片圓盤防治效果評估中，四氯異苯腈、克熱淨、護汰芬、三泰隆、菲克利、百克敏及改良式硫黃展現極佳防護效果，抑制率均達 100.0%。本研究釐清了葡萄銹病感染初期的關鍵環境參數，並完成多種化學與友善防治資材藥劑感受性評估，其結果可作為田間防治策略更具科學性之依據。

關鍵字：葡萄銹病、葡萄銹病菌、夏孢子發芽、殺菌劑、葉片圓盤接種法

前 言

葡萄(*Vitis* spp.)為葡萄科(Vitaceae)的溫帶果樹，是臺灣重要的果樹作物之一。根據 113 年農情調查統計(https://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp)，總栽培面積達 2,278 ha、總生產量為 60,771 ton，年產值為 44 億元。中部地區為主要臺灣鮮食葡萄生產地，其中臺中、彰化及南投這三個縣市種植的葡萄面積即占全臺約八成。

¹ 農業部臺中區農業改良場研究報告第 1124 號。

² 農業部臺中區農業改良場計畫助理、助理研究員。

*通訊作者：許晴情，Email: hsuching@tcdares.gov.tw

臺灣屬亞熱帶氣候，平均溫度較高，配合修剪催芽技術，可發展一年二收，分別為夏果(6-8月)及冬果(12-1月)，或採一年一收秋果(9-11月)生產模式(葉，2021)，致此，使得葡萄在栽培期間容易發生許多病害。包含白粉病、露菌病、銹病、晚腐病、房枯病、白腐病、苦腐病、灰斑病、灰黴病、黑痘病、葉斑病、褐斑病、白絹病、枝枯病、褐根病、白紋羽病、線蟲及病毒等病害(黃，2004；賴，2006)。在眾多的葡萄病害中，葡萄銹病為常見的葉部病害之一。本病原菌在分類學上經歷多次變動：早期常被鑑定為 *Phakopsora ampelopsidis*，後經 Ono(2000)重新鑑定為 *Ph. euvitis*。然而，最新的分子系統發育學研究(Ji *et al.*, 2019)指出，葡萄銹病與大豆銹病(*Ph. pachyrhizi*)親緣關係遙遠，應獨立為新屬 *Neophysopella*，而 *Ph. euvitis* 則被視為 *Neophysopella meliosmae-myrianthae* (Henn. & Shirai) Jing X. Ji and Kakish.之異名。根據針對東亞地區的族群遺傳鑑定，來自臺灣臺中(樣本編號 IBAR 10240)的病原菌已被證實屬於 *N. meliosmae-myrianthae* 支系(異名：*Phakopsora meliosmae-myrianthae*)(Pota *et al.*, 2015；Ono *et al.*, 2020)。該菌在東亞地區廣泛感染「Kyoho 巨峰」等商業栽培品種，是造成商業葡萄園葉部病害的主要原因(Okane *et al.*, 2025)。葡萄銹病於葡萄生育後期發生，於6月後及10-12月間發生較多，主要為害成熟葉，發病初期於葉表形成黃色斑點，葉背則呈現多數小突起，隨後破裂出現橘黃色粉狀夏孢子堆，藉風傳播，是銹病最重要的傳播感染源(余與楊，2010)。近期研究顯示，銹病造成的傷害遠超其病斑本身，包括光合作用效率下降、改變葉內碳水化合物代謝、根部儲糖減少，造成葡萄植株的整體生長力下降，進而影響次年萌芽及果穗形成，顯示銹病對葡萄植株的影響，並非僅是當季的產量減低，反而可能是慢性、系統性的影響(Nogueira Júnior *et al.*, 2017)。

孢子發芽為感染初期的關鍵步驟，並受環境因子調控，包括溫度、相對濕度及光照條件(Tapsoba & Wilson, 1997；Mueller & Buck, 2003)。早期研究已針對 *N. meliosmae-myrianthae*(文中標註為 *Ph. ampelopsidis*)在不同溫度梯度、光質處理(不同光質、連續光照或連續黑暗)及濕度對夏孢子發芽率的影響，結果顯示最適發芽條件約為 24℃，且在完全黑暗下發芽率最高(呂與吳，1983)。

然而本研究前期試驗發現，即便採用文獻建議的最佳條件，夏孢子發芽表現仍不穩定，難以作為藥劑感受性之基準。此差異顯示實驗系統存在環境變異，可能為溫度及光照以外的未知因子干擾孢子發芽，值得進一步探討。因此，本研究除重新檢視光照處理模式及溫度梯度外，亦將產孢起始後天數(反映不同孢子日齡之生理活性)及不同來源的水瓊脂培養基納入評估，作為試驗因子，以釐清其對夏孢子發芽率可能造成的影響，並建立穩定的體外發芽條件。

在建立穩定的發芽試驗條件後，考量到葡萄銹病菌為絕對寄生性真菌(Biotrophic fungus)，單純的離體水瓊脂培養(In vitro)難以評估其在寄主組織上建立感染的真實情況。此外，傳統的田間或溫室植株藥效試驗，除耗時外成本亦高，其發病情況更易受不同栽培系統所產生的微氣候差異影響(Naruzawa *et al.*, 2006)。為此，本研究除了優化體外發芽條件外，進一步利用葡萄葉片圓盤接種法(Leaf disc assay)，建立一套兼具生物代表性且環境受控的藥劑感受性評估系統。同時針對現行之銹病防治藥劑進行抑制效果評估，並擴大藥劑感受性評估範疇，納入數種已登記於葡萄其他病害之常用藥劑，旨在評估其對 *N. meliosmae-myrianthae* 夏孢子之生理活性與抑制表現，以期對葡萄產業常用藥劑之抑菌譜有更全面的瞭解。

材料與方法

一、葡萄銹病夏孢子接種源之製備

葡萄銹病菌(*N. meliosmae-myrianthae*)夏孢子接種源取自臺中區農業改良場(彰化縣大村鄉)果園內葡萄‘巨峰’(*Vitis vinifera* × *V. labrusca* 'Kyoho')的罹病成熟葉片。為進行離體增菌，採集健康無病斑之成熟葉片，修剪後以葉背朝上置於鋪有濕潤濾紙之 9 cm 培養皿中。使用毛筆輕刷受 *N. meliosmae-myrianthae* 感染葉片以取得夏孢子，再均勻塗佈於健康葉片的葉背表面，置於 22-24℃ 生長箱培養。經觀測其潛伏期(Latent period)約為 9 天，於葉背可觀察到橘黃色夏孢子堆形成，作為後續試驗之接種源。

二、影響夏孢子發芽之因子評估

本研究評估光暗時序、溫度、產孢起始後天數與瓊脂來源對夏孢子發芽之影響。試驗參考黃等(2002)之試驗方法，以吹佈方式將夏孢子均勻散佈於 2%水瓊脂(water agar, WA)平板表面，培養 24 hr 後利用光學顯微鏡(Leica DM750, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)記錄發芽率。夏孢子發芽之判定標準定義為發芽管長度大於或等於孢子之直徑。各發芽試驗中，每一重複均以 100 顆夏孢子計算其發芽率，各試驗之重複數依試驗類型而有所不同，詳述如下。

(一)光暗時序處理對夏孢子發芽率之影響

接種後的 2% WA (光惠貿易有限公司)平板置於 24℃、相對濕度 90%之生長箱中進行培養。試驗分為全黑暗處理組(D)與光暗時序處理組(12D: 12L)。全黑暗組以鋁箔紙完全包覆培養皿以達遮光效果。為確保各處理間之初始生理條件一致，所有平板於培養初期均先置於黑暗環境 12 hr，隨後 12D:12L 組依序轉入光照環境 12 hr。培養共

24 hr 後記錄夏孢子發芽率，本試驗每一處理設 4 個重複。

(二)不同溫度處理對夏孢子發芽率之影響

為評估溫度對夏孢子發芽之調控，接種後的 2% WA(光惠貿易有限公司)平板置於具備梯度溫度設定之生長箱中。光照模式統一設定為先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序(12D: 12L)，測試分別為溫度為 16°C、20°C、24°C、28°C 及 32°C。培養 24 hr 後記錄發芽率，本試驗中，每一溫度處理 8 個重複。

(三)產孢起始後天數對夏孢子發芽率之影響

為瞭解夏孢子於病斑上自然累積時間(即孢子日齡，Spore age)對其發芽活力之影響，本實驗於 22-24°C 條件下進行。經觀測其潛伏期(Latent period)平均為 9 天，故自接種後第 9 天開始，分別依據產孢起始後天數 1、2、3、4 天進行夏孢子收集(對應總天數第 9 至 12 天)進行發芽試驗。收集前不預先刷除葉片上既有之孢子，以獲取於病斑表面自然累積之混合日齡夏孢子群體。所得之夏孢子吹佈於 2% WA(光惠貿易有限公司)平板，置於 28°C、相對濕度 90%及先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序(12D:12L)條件下培養 24 hr，並記錄發芽率。本試驗中，每一處理設有 4 個重複。

(四)不同瓊脂來源對夏孢子之發芽率之影響

本研究選用兩種不同純化等級之瓊脂材料。其一為實驗級瓊脂 Bacto Agar (Difco, BD, Sparks, MD, USA)，屬細菌學等級(bacteriological grade)，依據其技術手冊 Difco™ & BBL™ Manual 所述，該產品經過嚴格純化，使外來物質、色素及鹽類含量降至最低，並降低鐵、銅等有害金屬離子含量，同時相對缺乏可被微生物利用之礦物質與化合物。其二為高級洋菜粉(Premium Agar Powder；原產地：智利；光惠貿易有限公司，臺中市，臺灣)，屬食品級(food-grade)規格，其純化程度相較實驗級瓊脂較低。兩者皆製備 2% WA 平板。接種後將平板置於 28°C、相對濕度 90%及先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 光暗時序(12D:12L)之生長箱中培養 24 hr，並記錄發芽率，本試驗中，每一瓊脂來源處理 8 個重複。

三、藥劑抑制效果測試

(一)體外試驗 (In vitro)

1.殺菌劑對夏孢子發芽之影響

供試的殺菌劑及其配置之稀釋倍率如表一所列，包含氟殺克敏(Fluxapyroxad + Pyraclostrobin；臺灣巴斯夫股份有限公司)、三氟敏(Trifloxystrobin；臺灣拜耳股份有限公司)、四氯異苯腈(Chlorothalonil；安旺特股份有限公司)、貝芬普寧

(Carbendazim + Mepronil；臺灣庵原農藥股份有限公司)、克熱淨(Iminoctadine triacetate；億豐農化廠股份有限公司)、護汰芬(Flutriafol；臺灣富美實有限公司)、賽福座(Triflumizole；日本曹達株式會社)、三泰隆(Triadimenol；聯利農業科技股份有限公司)、菲克利(Hexaconazole；高事達農化有限公司)、白列克敏(Pyraclostrobin + Boscalid；臺灣巴斯夫股份有限公司)、得克利(Tebuconazole；臺灣拜耳股份有限公司)、亞托敏(Azoxystrobin；臺灣先正達股份有限公司)、百克敏(Pyraclostrobin；臺灣巴斯夫股份有限公司)、鋅錳乃浦(Mancozeb；臺灣道禮股份有限公司)、貝芬替(Carbendazim；聯利農業科技股份有限公司)及改良式硫黃(Sulfur；臺中區農業改良場)，共 16 種。配置含前述藥劑之 2% WA (Bacto Agar) 平板，並以無添加藥劑者作為對照組。將銹病夏孢子吹佈於平板上，隨即置於 28°C 定溫箱、先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 光暗時序(12D:12L)光暗時序中培養 24 hr 後，觀察孢子發芽的情形，並計算孢子發芽率(%)。處理組再與對照組比較，換算成孢子發芽抑制率(conidiospore germination inhibition rate, %)。計算孢子發芽抑制率(%) = [(對照組孢子發芽率 - 不同藥劑處理所得之孢子發芽率) / (對照組孢子發芽率)] × 100。每一藥劑處理 12 個重複。

(二)離體葉片圓盤試驗(Ex vivo / Detached leaf disc assay)

1. 葡萄葉片圓盤製備與接種操作流程

本研究採用葉片圓盤接種法，參考黃等(2002)之方法並予以修改：選取葡萄「巨峰」頂端算起第 5-6 片完全展開葉，葉片以自來水洗淨後，浸泡於含 1% 次氯酸鈉(NaOCl)並添加 Tween-20(數滴)的消毒液中進行表面消毒 30 s，隨後以無菌水漂洗兩次，並以滅菌衛生紙吸乾表面水分。使用經高溫滅菌之金屬打孔器取直徑 1.4 cm 之葉圓盤，將葉片背面朝上置於鋪有濕潤濾紙之塑膠培養皿(直徑 9 cm)中備用。接種方式採吹落分生孢子法，並參考前人於接種環境放置水瓊脂塊之定量技術，於葉圓盤旁放置 1 cm²水瓊脂塊以估算單位面積之孢子密度，控制接種量約為 1,000 conidia/cm²。

2. 葉圓盤接種之最適溫度篩選

為確立葡萄銹病穩定發病條件，比較 22°C 與 28°C 對病斑面積擴展之影響。接種後之葉圓盤維持 12D:12L 光暗時序與相對濕度 90-95% 持續培養。於第 12 天以數位相機記錄發病情形，並使用 ImageJ 軟體(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; Schneider *et al.*, 2012)分析病斑面積，每一溫度處理設 10 個重複。

3.藥劑對離體(Ex vivo)葉片圓盤接種銹病菌之防護效力

製備完成的葉片圓盤分別浸泡於不同藥劑溶液(表一)中 30 s，對照組則以無菌水處理。處理後之葉片圓盤置於 22℃ 黑暗條件下避光培養約 24 hr，以利藥劑吸收。藥劑處理 24 hr 後，再以吹佈接種後，將葉片圓盤置於 22℃、光週期為(12D:12L)之培養箱中培養。培養 10 d 後，以數位相機記錄葉片圓盤發病情形，並使用 ImageJ 軟體分析病斑面積，並轉換成藥劑抑制率。藥劑抑制率(Inhibition rate, %)依下列公式計算：藥劑抑制率(%) = [(對照組發病面積－不同藥劑處理所得之發病面積) / (對照組發病面積)] × 100。每一藥劑處理 6 個葉片圓盤重複。

表一、本研究使用之殺菌劑種類

Table 1. The list of fungicides used in this study

Fungicide	Formulation Type ¹	Dilution	FRAC Code ²	Chemical Group
25% Fluxapyroxad + 25% Pyraclostrobin	SC	6,000	C3+C2	QoI + SDHI
50% Trifloxystrobin	WG	6,000	C3	QoI
75% Chlorothalonil	WP	600	M5	Chloronitrile
20% Carbendazim + 55% Mepronil	WP	1,500	B1+C2	MBC + SDHI
25% Iminoctadine triacetate	SL	800	M7	Guanidine
11.8% Flutriafol	SC	2,000	G1	DMI (Triazole)
30% Triflumizole	WP	3,000	G1	DMI (Imidazole)
23% Triadimenol	DC	5,500	G1	DMI (Triazole)
10% Hexaconazole	EC	6,000	G1	DMI (Triazole)
12.78% Pyraclostrobin + 25.2 % Boscalid	WG	1,200	C3+C2	QoI + SDHI
25.9% Tebuconazole	EW	1,500	G1	DMI (Triazole)
25% Azoxystrobin	SC	2,000	C3	QoI
23.6% Pyraclostrobin	EC	3,000	C3	QoI
33% Mancozeb	SC	600	M3	Dithiocarbamate
41.7% Carbendazim	SC	2,000	B1	MBC
18% Sulfur	SL	500	M2	Sulfur

¹ SC: suspension concentrate; WG: water dispersible granules; WP: wettable powder; SL: soluble concentrate; DC: dispersible concentrate; EC: emulsifiable concentrate; EW: emulsion, oil in water.

² FRAC, Fungicide Resistance Action Committee.

四、統計分析

本研究使用楊(2022)所開發的 R 的完全隨機設計(completely randomized design, CRD)函數，進行單因子完全隨機設計分析(CRD)，若處理差異顯著，則使用最小顯著性差異測驗(least significant difference, LSD)比較處理間差異是否已達到 5%之顯著性($P<0.05$)，以及圖表繪製與部分資料整理則使用 EXCEL 2016 軟體進行統計及繪圖。

結 果

一、影響夏孢子發芽之因子

(一)光暗時序處理

將戶外採集之新鮮銹病夏孢子接種於 2%水瓊脂(WA)後，以鋁箔紙進行遮光處理，在 24℃ 連續黑暗 24 hr 的條件下，其發芽率為 5.0%。相較之下，若先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序(12D:12L)處理組，其發芽率為 18.5%(圖一)。數據顯示，12D:12L 處理組之夏孢子發芽率高於持續黑暗組。

(二)溫度

在有全黑暗處理組(D)與光暗時序處理組(12D:12L)兩種條件下，夏孢子在 16℃、20℃、24℃、28℃ 及 32℃ 均可觀察到發芽現象。發芽率隨溫度上升而增加，在 28℃ 達到最高，其中黑暗條件下的發芽率為 56.6%，而光暗時序處理組(12D:12L)則為 75.0%。當溫度升至 32℃ 時，黑暗組與光暗時序組之發芽率分別降至 3.9%與 0.3%(圖二)。

(三)產孢起始後天數

在光暗時序條件(12D:12L)下，葡萄銹病夏孢子在 1-4 天的產孢起始後天數(Days after onset of sporulation)的發芽率均高於 50.0%。數據顯示，夏孢子發芽率隨產孢起始後天數增加而降低。產孢後第 1-2 天(對應接種後第 9-10 天)之發芽率最高，分別為 75.3%與 72.3%，第 3 天與第 4 天則分別降至 61.5%與 50.3%。相較之下，全黑暗(D)處理組的發芽率較低，且其隨天數增加而下降之幅度與光暗時序組不同：產孢起始後第 1-3 天(對應接種後第 9-11 天)發芽率介於 30.0-45.0%之間，至第 4 天(對應接種後第 12 天)則降至 6.8%(圖三)。

(四)瓊脂來源

在光暗時序條件(12D:12L)、28℃ 以及相同孢子日齡的培養條件下，不同來源的瓊脂基質對夏孢子發芽率有顯著差異。使用高級洋菜粉製備的水瓊脂平板，其孢子發芽率為 80.8%；相較之下，以 Bacto Agar 製備的平板則為 53.9%(圖四)。

二、殺菌劑對葡萄銹病夏孢子發芽影響

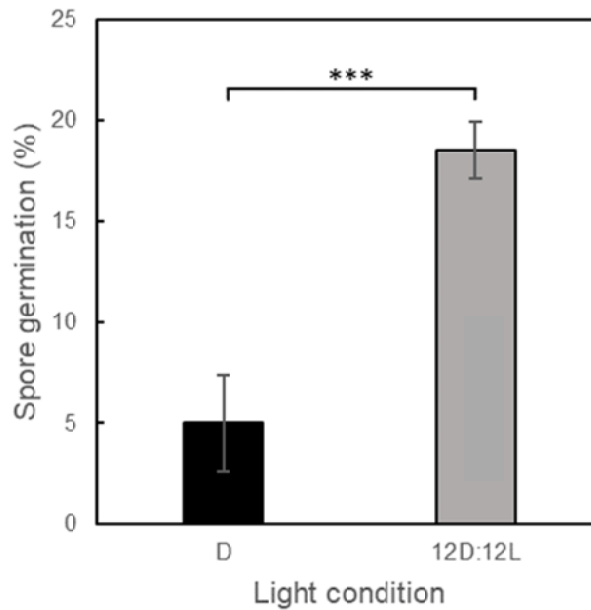
在本試驗中，選用 16 種常用之殺菌劑評估其對葡萄銹病夏孢子在處理後 24 hr 之發芽抑制效果。結果如表二顯示，在各藥劑之建議使用濃度下，四氯異苯腈、克熱淨、護汰芬、得克利、百克敏、鋅錳乃浦及改良式硫黃，其抑制率均達 100.0%。其次，氟殺克敏、貝芬普寧、賽福座及亞托敏之抑制率介於 90.3%至 99.8%之間。相較之下，貝芬替與白列克敏之抑制率較低，分別為 80.2%與 72.7%，而菲克利之抑制率僅 12.6%。三氟敏與三泰隆處理之發芽率高於對照組，其抑制率分別為-76.3%與-92.8%。

三、培養溫度對銹病接種於離體葉片圓盤之發病病斑面積之影響

為建立適合葡萄銹病於離體葉片圓盤上穩定發病之培養條件，比較接種後於 22℃ 與 28℃ 培養之發病表現。結果顯示，於 22℃ 培養之葉片圓盤，其罹病面積整體分布明顯大於 28℃ 處理(圖五)。相較之下，28℃ 條件下之病斑面積較小，且變異幅度較低。基於此結果，後續葉片圓盤藥劑防治試驗皆採用 22℃ 作為培養溫度。

四、殺菌劑對葡萄銹病在葡萄葉片圓盤上感染之影響

本研究針對 16 種葡萄登記藥劑進行離體葉片圓盤藥效篩選測試。結果如表三顯示，四氯異苯腈、克熱淨、護汰芬、三泰隆、菲克利、百克敏及改良式硫黃等 7 種藥劑能完全抑制銹病病徵產生(抑制率達 100.0%)。其餘參試藥劑抑制率均在 80.0%以上。此外，得克利處理組因造成葉片圓盤明顯黃化(藥害反應)，干擾病原菌之正常感染程序，故該項數據不列入藥效評估之最終分析。

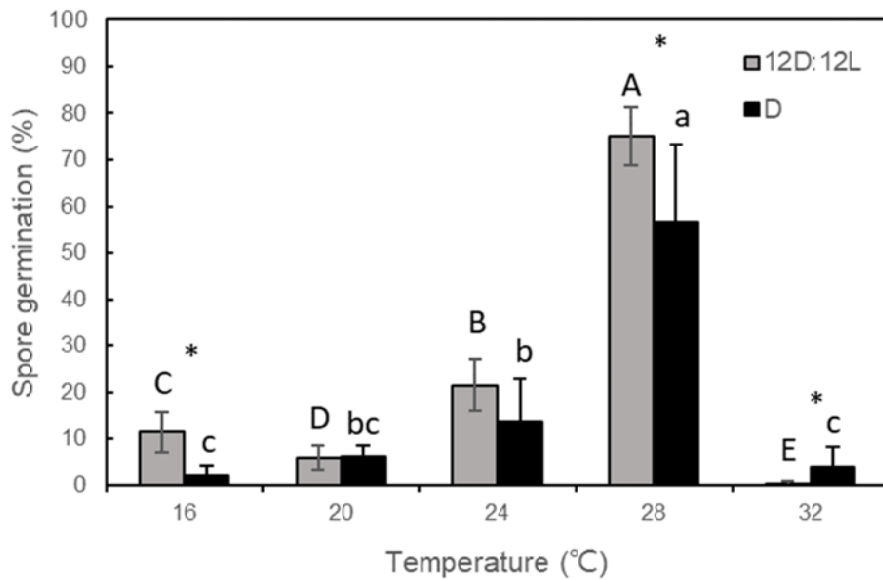


圖一、24°C 下不同光照時序與對葡萄銹病夏孢子發芽率之影響。

比較連續黑暗與先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序 (12D:12L) 處理，在 24°C 定溫環境下培養 24 hr 之夏孢子發芽率表現。誤差線表示標準差(SD)，*** 表示在 $P < 0.001$ 下達顯著差異。

Fig. 1. Effect of light treatment at 24°C on the germination rate of urediniospores of grapevine rust (*Neophysopella meliosmae-myrianthae*) at 24°C.

Germination rates were compared between sequential dark-light treatment (12 hr dark followed by 12 hr light, 12D:12L) and continuous darkness (D) over a 24-hr incubation period. Error bars represent standard deviation (SD). *** indicates significant differences at $P < 0.001$.

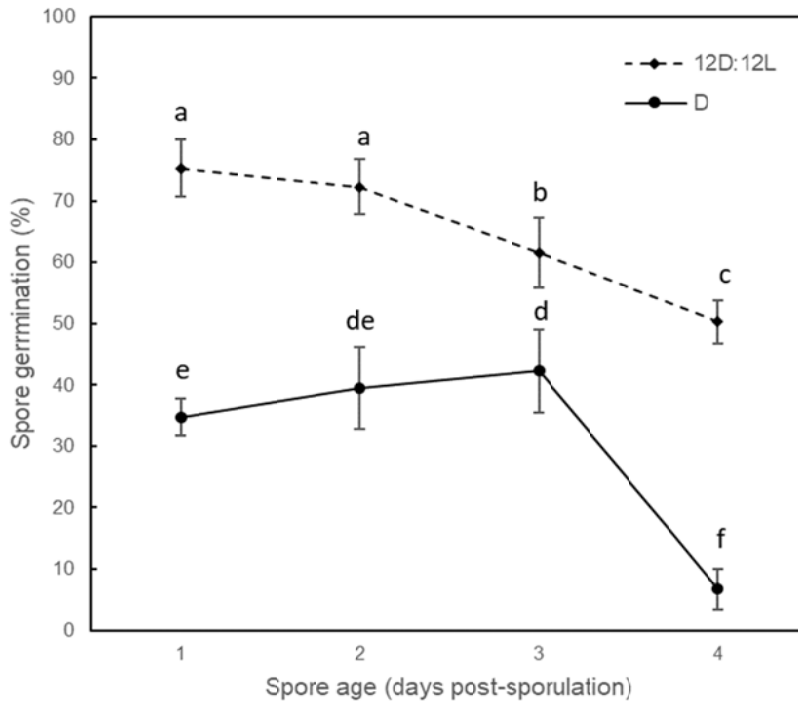


圖二、溫度對葡萄銹病夏孢子發芽率之影響。

比較不同溫度條件下，先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序 (12D:12L) 處理與全黑處理(D)對夏孢子發芽率之影響。誤差線表示標準差(SD)。不同大小寫字母分別表示 12D:12L 與 D 處理內溫度間之顯著差異；* 表示相同溫度下兩處理間差異達顯著水準($P < 0.05$)。

Fig. 2. Effect of temperature on the germination rate of urediniospores of grapevine rust (*Neophysopella meliosmae-myrianthae*).

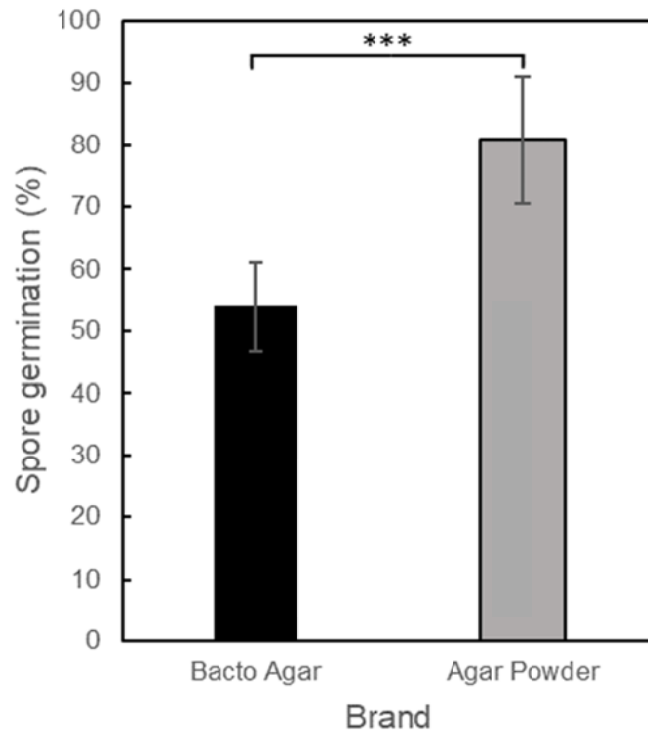
Germination rates were compared under different temperatures, between sequential dark-light treatment (12 hr dark followed by 12 hr light, 12D:12L) and continuous darkness (D) over a 24-hr incubation period.. Error bars represent standard deviation (SD). Uppercase and lowercase letters indicate significant differences among temperatures within 12D:12L and D treatments, respectively. Asterisks (*) indicate significant differences between 12D:12L and D at the same temperature ($P < 0.05$).



圖三、28°C下不同產孢起始後天數對葡萄銹病夏孢子發芽率之影響。

比較 28°C下不同產孢起始後天數之夏孢子於先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序 (12D:12L)與全黑處理(D)下之發芽率表現。誤差線表示標準差(SD)，不同字母表示處理間差異達顯著水準($P < 0.05$)。

Fig. 3. Effect of different days after onset of sporulation on the germination rate of urediniospores of grapevine rust (*Neophytophthora meliosmae-myrianthae*) at 28°C. Germination rates of spores with different ages (days after onset of sporulation) were compared under sequential dark-light treatment (12 hr dark followed by 12 hr light, 12D:12L) and continuous darkness (D) over a 24-hr incubation period. Error bars represent standard deviation (SD). Different letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

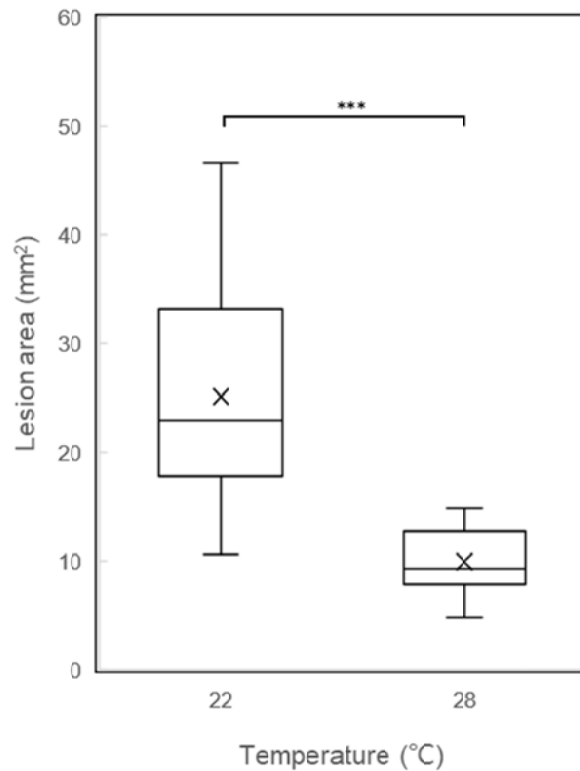


圖四、28℃下不同來源之瓊脂粉對葡萄銹病夏孢子發芽率之影響。

比較不同來源之 2%水瓊脂培養基於於先黑暗 12 hr 後光照 12 hr 之光暗時序 (12D:12L)下對夏孢子發芽率之影響。誤差線表示標準差(SD)，*** 表示在 $P < 0.001$ 下達顯著差異。

Fig. 4. Effect of water agar from different sources on the germination rate of urediniospores of grapevine rust (*Neophysopella meliosmae-myrianthae*) at 28°C.

Germination rates were compared on 2% WA plates prepared from different agar sources under sequential dark-light treatment (12 hr dark followed by 12 hr light, 12D:12L). Error bars represent standard deviation (SD). *** indicates significant differences at $P < 0.001$.



圖五、培養溫度對葡萄銹病於離體葉片圓盤上發病表現之影響。

葉片圓盤接種 *Neophytophthora meliosmae-myrianthae* 夏孢子後，於不同溫度條件下培養，並比較病斑面積之差異。盒狀圖顯示中位數(盒內橫線)、平均值(X)及第25與第75百分位數，*** 表示在 $P < 0.001$ 下達顯著差異。

Fig. 5. Effect of incubation temperature on disease development of grapevine rust on detached leaf discs.

Leaf discs inoculated with urediniospores were incubated under different temperature conditions, and lesion areas were compared. Boxplots indicate median (line within the box), mean (X), and the 25th and 75th percentiles. *** indicates significant differences at $P < 0.001$.

表二、不同藥劑對葡萄銹病菌夏孢子發芽抑制率之影響

Table 2. Effects of various fungicides on the germination inhibition of *Neophysopella meliosmae-myrianthae* urediniospores

Fungicide	Conidiospore germination inhibition rate (%) ¹
Fluxapyroxad + Pyraclostrobin	93.5 ± 1.1 b ²
Trifloxystrobin	-76.3 ± 2.8 f
Chlorothalonil	100.0 ± 0.0 a
Carbendazim + Mepronil	90.3 ± 2.6 b
Iminoctadine triacetate	100.0 ± 0.0 a
Flutriafol	100.0 ± 0.0 a
Triflumizole	93.6 ± 1.3 b
Triadimenol	-92.8 ± 1.8 g
Hexaconazole	12.6 ± 4.8 e
Pyraclostrobin + Boscalid	72.7 ± 1.7 d
Tebuconazole	100.0 ± 0.0 a
Azoxystrobin	99.8 ± 0.2 a
Pyraclostrobin	100.0 ± 0.0 a
Mancozeb	100.0 ± 0.0 a
Carbendazim	80.2 ± 3.0 c
Sulfur	100.0 ± 0.0 a

¹ Inhibition rate (%) = [(Mean of spore germination of the control – Mean of spore germination of the treatment)]/mean of spore germination of the control × 100.

² Mean ± standard error (n = 12). Means within a column followed by the same letters are not significantly different at P = 0.05 based on least significant difference (LSD) test.

表三、不同藥劑對葡萄銹病於葉片圓盤上之保護效力評估

Table 3. Protective efficacy of various fungicides against grape rust (*Neophytophthora meliosmae-myrianthae*) on leaf discs

Fungicide	Inhibition rate (%) ¹
Fluxapyroxad + Pyraclostrobin	98.5 ± 0.9 a ²
Trifloxystrobin	83.6 ± 3.7 d
Chlorothalonil	100.0 ± 0.0 a
Carbendazim + Mepronil	89.4 ± 2.9 c
Iminoctadine triacetate	100.0 ± 0.0 a
Flutriafol	100.0 ± 0.0 a
Triflumizole	83.6 ± 4.0 d
Triadimenol	100.0 ± 0.0 a
Hexaconazole	100.0 ± 0.0 a
Pyraclostrobin + Boscalid	96.8 ± 1.2 ab
Tebuconazole	ND ³
Azoxystrobin	96.2 ± 1.7 ab
Pyraclostrobin	100.0 ± 0.0 a
Mancozeb	98.3 ± 1.0 a
Carbendazim	92.0 ± 3.1 bc
Sulfur	100.0 ± 0.0 a

¹ Inhibition rate (%) = [(Mean of lesion area of the control – Mean of lesion area of the treatment)]/mean of lesion area of the control × 100.

² Mean ± standard error (n = 6). Means within a column followed by the same letters are not significantly different at P = 0.05 based on least significant difference (LSD) test.

³ ND = No data.

討 論

本研究首先針對葡萄銹病菌(現更名為 *Neophytophthora meliosmae-myrianthae* ; 異名 *Phakopsora euvitis*)夏孢子萌發率偏低之瓶頸進行優化。結果顯示, 現有菌株的培養條件上與早期紀錄(呂與吳, 1983)存在顯著差異, 環境因子如光暗時序、溫度、產孢起始後天數與瓊脂來源, 對孢子活力均具顯著影響。建立此穩定之發芽條件後, 本研究進一步透過體外(In vitro)孢子發芽抑制與離體(Ex vivo)葉片圓盤(Leaf disc assay)進行藥劑感受性試驗, 評估了不同防治藥劑對該菌之抑制效力, 為現行葡萄銹病藥劑防治提供了更具

實務參考價值的資訊。

在病原鑑定方面，溫帶亞洲地區的葡萄銹病主要由 *Neophytophthora meliosmae-myrianthae* 與 *N. montana* 引起。根據 Okane 等人(2025) 的調查，儘管人工接種實驗證實兩者均具備感染商業品種之潛力，但在日本田間的實際分布具有顯著的宿主特異性：*N. meliosmae-myrianthae* 為商業栽培品種(如'Delaware'與 'Kyoho')的主要病原，而 *N. montana* 則主要侷限於野生的山葡萄(*Vitis coignetiae*)。該研究更進一步確認，在具發病症狀的商業葡萄樣本中，僅能檢出 *N. meliosmae-myrianthae*。由於臺灣商業葡萄生產高度集中於「巨峰」品種，且過往針對臺中鑑定樣本(IBAR 10240)經分子鑑定已證實屬於 *N. meliosmae-myrianthae* (Pota et al., 2015 ; Ono et al., 2020)，此一寄主偏好與臺灣的產業現況高度吻合。考量到兩地栽培品種的一致性與商業環境的高強度選擇壓力，顯示 *N. meliosmae-myrianthae* 較 *N. montana* 具備更高的競爭優勢，為目前臺灣商業產區的主要病原。因此，本研究選用場內巨峰葡萄樣本進行防治藥劑篩選，對產業實務提供了充分的代表性。此外，近年研究將東南亞與澳洲族群鑑定為新種 *N. tropicalis* (Ono et al., 2020)。參考 Santos 等人(2021)在巴西的發現，該國已證實 *N. meliosmae-myrianthae* 與 *N. tropicalis* 同時存在，但呈現明顯的地理區隔：*N. tropicalis* 主要分佈於氣候較多樣的中南部，而 *N. meliosmae-myrianthae* 則侷限於東北部。這說明兩者可能由不同來源獨立引進，且皆能在商業生產體系下造成重大損失。綜合上述研究，*N. tropicalis* 主要分佈於熱帶區域，而 *N. meliosmae-myrianthae* 則廣泛存在於溫帶亞熱帶。由於台灣地跨亞熱帶與熱帶，具備這兩類病原菌生存的氣候條件，因此未來除了監測現有的 *N. meliosmae-myrianthae* 族群外，亦需防範熱帶種 *N. tropicalis* 的入侵風險。

在光線影響方面，本研究顯示，在光暗時序處理組(12D:12L)條件下，葡萄銹病夏孢子的平均發芽率於 24-28°C 時高於完全黑暗處理。此結果與過去研究指出光照對該屬菌種具有顯著抑制作用(如 6 hr 連續光照下)之結論不同(呂與吳，1983 ; Naruzawa et al., 2006)。過去多數研究因觀察到光照會降低發芽率，而將光線視為一種強烈的環境壓力因子。然而，本研究在建立藥劑評估平臺的初期測試中發現，若重複前人文獻作法採取連續 24 hr 黑暗處理，其發芽率僅約 5.0% (以 24°C 為例)，導致後續藥劑抑制試驗難以獲得穩定且可信的結果。實驗結果顯示，當調整為「先黑暗 12 hr 後轉入光照 12 hr 的時序處理」後，其 24 hr 後之發芽率可顯著提升至 18.5% (24°C)，後續溫度試驗中在 28°C 下更可達 75.0%，表現明顯優於持續黑暗處理。這說明光線對發芽之影響並非單向抑制，而是受到「光暗時序」調控。推測孢子在萌發初期先經歷充足的黑暗預處理後，可能已完成關鍵的生理調整，使隨後的光照不再產生抑制作用，反而有助於提升整體的

發芽活性。因此，相較於極端黑暗條件，此種光暗切換的時序安排更適合建立穩定的葡萄銹病研究系統。

進一步而言，不同銹病菌對光的敏感性具有物種特異性。以 *Puccinia graminis* var. *tritici* 為例，其孢子發芽受光抑制之現象為可逆反應，當轉入黑暗後仍可恢復發芽能力 (Givan & Bromfield, 1964)。Buck 等人(2010)比較八種銹病菌後亦指出，在光照 0-10 hr 後再進入 24 hr 黑暗處理下，*P. sorghi*、*P. triticea*、*P. pelargonii-zonalis* 與 *P. iridis* 的發芽率相對不受光照影響；然而屬於層銹菌屬(*Phakopsora*)之大豆銹病菌(*Ph. pachyrhizi*)則對光極為敏感，顯示即使同為銹病菌，對光仍存在反應差異。再者，光照時間長短亦可能影響銹病菌之發芽反應。Buck 等人(2010)指出，雖部分物種之發芽率在短時間光照下不受影響，但其發芽管生長仍普遍受到抑制，而當光照時間延長至 18 hr 以上時，孢子之發芽能力與發芽管生長即便再轉入黑暗亦難以恢復。此結果顯示光照時間長短可能影響銹病菌之發芽反應與後續發芽管生長表現。綜合文獻比較，本研究與過去結果之差異，可能與「光暗時序」有關。在 12 hr 暗/12 hr 光處理中，孢子萌發初期先經歷 12 hr 黑暗，可能已完成萌發前之生理調整，使後續長時間光照(12 hr)未產生抑制作用。Khan(1977)亦指出，短時間光照不論安排於黑暗前或後，皆可促進 *Aspergillus niger* 孢子發芽，顯示光可扮演刺激訊號角色。類似地，本研究的 12 hr 光週期模式，可能因孢子已先經歷萌發初期之黑暗調整階段，使後續長時間光照未產生抑制，並在光暗節律交替條件下呈現較高的發芽表現。

值得注意的是，光照的刺激作用顯著調節了產孢起始後天數對孢子發芽率的影響。本研究觀察到，隨著孢子日齡增加，夏孢子發芽能力呈現下降趨勢，這與前人研究指出孢子老化會導致發芽時間增加及生理活力衰退的趨勢一致(Dantigny & Nanguy, 2009)。然而，本研究發現光照能顯著延緩此一衰退過程。數據顯示，產孢起始後第 4 天(接種後第 12 天)的夏孢子在光週期(12D:12L)下仍維持>50.0%的發芽率，顯著優於黑暗組(僅 6.8%)。此一結果與 Naruzawa 等人(2006)觀察到孢子在自然環境下 7 天內發芽率趨近於零的現象有所差異，這可能是因為自然陽光包含高能光譜且強度極高，具備較強的殺菌速度(Buck et al., 2010)；相比之下，本研究將離體葉片圓盤培養於人工光源下穩定的濕潤環境。這暗示了在排除極端致死強度的前提下，規律的光暗切換對衰老孢子具有生理喚醒或補償效果，能延緩因日齡增加而導致的發芽力衰退。因此，光對孢子發芽的影響受特定物種、光強度、光暗時序、時間尺度等因子共同決定。本研究建議，評估葡萄銹病孢子發芽條件時，應考慮更接近田間自然的光週期模式，而非僅限於短時間或極端黑暗的恆定條件。

在溫度方面，本研究發現 *N. meliosmae-myrianthae* 夏孢子在 28°C 呈現最高的發芽率。早期研究(當時鑑定為 *Ph. euvitis*)指出 24-25°C 為孢子最適發芽溫度(Naruzawa *et al.*, 2006)，而後續相關研究亦顯示在 26-29°C 的條件下仍可維持高發芽率(Magalhães *et al.*, 2011)，顯示該病原菌對較高溫度具有良好的適應性。本研究結果與上述研究趨勢相近，顯示夏孢子在接近 30°C 的條件下仍能維持良好的萌發能力。

除了光照與溫度等環境因子，瓊脂來源亦會影響孢子的發芽率。本研究發現，同樣 2% 水瓊脂培養基(Water Agar)配製濃度下，採用不同純度等級的瓊脂粉製成並進行培養時，銹病夏孢子的發芽率仍有顯著差異。雖然研究指出食品級和細菌學級的瓊脂膠在膠體特性、毒性、代謝惰性及穩定性方面表現相當(Petrovski & Tillett, 2012)，但本實驗結果顯示，選用光惠洋菜膠的發芽率明顯高於 Bacto Agar。誠如材料方法所述，Bacto Agar 由於經過高度純化，相對缺乏具有代謝用途之礦物質；而食品級洋菜則保留了天然海藻萃取過程中殘留的微量礦物質與離子，如 Ca^{2+} 與 Mg^{2+} (Petrovski & Tillett, 2012)。在水瓊脂中添加特定濃度的大豆葉片萃取成分能顯著促進大豆銹病夏孢子萌發，證實了微量營養物質的促進作用(Blum *et al.*, 2015)。據此推論，食品級洋菜中殘留的雜質可能扮演了類似的營養輔助角色，進而提升夏孢子的萌發能力。綜合上述結果，在建立標準化藥劑評估流程時，除了控制光照與溫度條件外，維持孢子來源的一致性與培養基規格(如瓊脂膠等級)亦為確保實驗可重複性的關鍵因素。

為進一步評估葡萄銹病菌對藥劑的感受性，除針對夏孢子進行體外最適發芽條件試驗外，考量到僅觀測「體外發芽抑制」難以全面反映病原菌於寄主組織建立感染的真實情況，亦難以評估藥劑進入植物組織後的系統性影響。許多單一作用點殺菌劑(如三唑類)的主要機制是阻礙菌絲生長階段的固醇生物合成，而非直接殺死孢子，因此在發芽初期往往無法完全抑制發芽管萌發(Pontzen & Scheinpflug, 1989)。另一方面，雖然過去在評估葡萄銹病的藥效時多依賴大規模田間試驗或溫室盆栽試驗，但針對大量藥劑進行感受性評估時，往往面臨成本高、耗時且受空間限制等挑戰。此外，Naruzawa 等人(2006)的研究亦指出，田間試驗的結果極易受到不同栽培系統(如棚架式與直立式)所產生的微氣候差異影響，進而干擾藥效評估的準確度。綜合上述體外發芽試驗的侷限性與田間試驗的不可控變因，為了更真實地模擬感染過程，並準確、客觀地比較植體吸收藥劑後對病原菌擴展的抑制效果，宜採用標準化且具再現性之離體(Ex vivo)葉片圓盤法(leaf disc assay)進行藥劑感受性評估(Angelotti *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2019)。

筆者先前試驗，若在孢子「體外最適發芽溫度」下進行葉片圓盤接種，其病斑罹病面積顯著偏低($<10 \text{ mm}^2$)，若以此條件進行葉片圓盤藥劑感受性試驗，可能使處理組與

對照組間的數據差異縮小進而放大試驗誤差，亦難以客觀評估藥劑在組織上的防治效能。因此，在進行藥劑敏感性試驗前，本研究先針對離體葉片圓盤在不同溫度下的病勢擴展測定。結果顯示，在相同接種條件下，葉片圓盤於接種後培養於 22°C 可顯著提升發病面積，顯示相對低溫更有利於病原菌在植體組織內的擴展，此結果說明孢子發芽與侵入後感染建立的最適溫度並不一定相同。前人研究亦指出，高溫(如 30°C)會抑制感染建立，而在約 20°C 且葉面濕潤 12-24 小時的條件下，罹病程度最高(Angelotti *et al.*, 2013)，此趨勢與本研究觀察一致。綜合上述考量，後續之藥劑感受性試驗，將分別以 28°C 及 22°C 作為藥劑對「孢子發芽抑制」與「葉片圓盤保護效力評估」的試驗條件。

經前述試驗將條件確立後，進一步評估 16 種常用殺菌劑對葡萄銹病菌之孢子發芽抑制」與「葉片圓盤保護效力評估」。在夏孢子發芽抑制方面，四氯異苯腈、克熱淨、護汰芬、得克利、百克敏、鋅錳乃浦及改良式硫黃，均能 100.0% 抑制夏孢子發芽。其中，得克利、護汰芬與百克敏的強效抑制表現，與過去研究指出 DMI 類(三唑類, Triazoles) 與 QoI 類(史托比類, Strobilurins) 藥劑能顯著降低夏孢子活力的結果吻合(Angelotti *et al.*, 2014)。而亞托敏與氟殺克敏等藥劑亦具備 90.0% 以上的高抑制率。

而葉片圓盤法進行藥劑感受性評估測試中，四氯異苯腈、克熱淨、護汰芬、三泰隆、菲克利、百克敏及改良式硫黃等 7 種藥劑能完全阻止銹病感染(抑制率 100.0%)，而其餘藥劑的抑制效果則至少 80.0% 以上。其中，菲克利與三泰隆雖然在第一階段的孢子發芽實驗中抑制效果較弱(抑制率分別僅為 12.6% 與 -92.8%)，但在葉片圓盤試驗中卻展現了卓越的防護效果，這與先前文獻提到三唑類之作用機制特性有關(Pontzen & Scheinpflug, 1989)，由於銹病孢子含有足夠固醇儲備，且在發芽管生長末期(約 6-8 hr)才啟動固醇生物合成路徑，因此儘管三唑類藥劑能迅速進入孢子並抑制目標酵素，但在發芽初期因孢子尚無需合成新固醇，導致離體發芽實驗出現藥效較弱的偽陰性結果，這同時也揭示藥劑感受性測試不應僅依賴發芽試驗，應結合活體或離體葉片圓盤法才能更準確評估三唑類藥劑的實際防護潛力。

而值得關注的是，本研究中三唑類的三泰隆與史托比類的三氟敏在離體孢子發芽試驗中，抑制率卻呈現顯著之負值(分別為 -92.8% 與 -76.3%)，而葉片圓盤試驗則分別達 100.0% 及 83.6% 的優異防治效果，此結果顯示，在本試驗條件下，此二藥劑於所設定之濃度未達抑制效果，甚至可能對孢子發芽產生促進作用。此結果打破一般傳統的農藥藥效與毒理評估中，多習慣以「線性無閾值模型 (Linear no-threshold model, LNT)」作為直觀的解釋基礎，亦即預期藥劑濃度與抑制力呈絕對正相關，施用田間推薦高濃度理應能全面抑制病原菌 (Calabrese & Baldwin, 2003)。針對此一「體外促進、離體葉片圓盤

抑制」現象，推測可能與殺菌劑的毒物興奮效應(Hormesis)及藥劑理化性質特性使其於基質間的擴散限制有關。首先，相關毒理文獻指出當病原真菌遭遇低於「無觀察到不良反應劑量(NOEL)」的亞抑制劑量(Subinhibitory doses)殺菌劑時，可能會因恆定性(Homeostasis)受干擾而啟動過度補償機制(Overcompensation)。此機制打破傳統 LNT 模型的線性預期，表現出「低劑量刺激」的雙相劑量反應，導致發芽率異常增強(Garzón & Flores, 2013; Calabrese, 2014; Dharma & Widiastuti, 2024)。此外，藥劑之理化性質方面，三氟敏與三泰隆皆為高親脂性(Log P 分別為 4.5 及 3.2)，而疏水性化合物在親水性水瓊脂介質中難以自由均勻擴散，易導致實際接觸病原菌的生物可利用率(Bioavailability)大幅下降(Klancnik *et al.*, 2010; Balouiri *et al.*, 2016; Vines *et al.*, 2023)。

綜合上述文獻，推估此兩種藥劑在本研究體外孢子發芽抑制試驗中，因其理化特性難以溶於親水性固態基質中致擴散受限，使其在水瓊脂培養基無法達到有效致死濃度，進而可能形成亞抑制環境並誘發 Hormesis 效應產生假性促進；反之，在葉片圓盤試驗中，藥劑得以透過植物表皮蠟質順利附著或溶入組織，從而發揮其原有的抑制效力。本研究使用田間推薦濃度進行感受性測試，雖觀察到此一特殊之表現落差並推論可能之毒理機制與藥劑理化特性，然其實際之交互作用，仍有待未來研究透過多濃度梯度或使用藥劑原體對照試驗進一步驗證與釐清。

綜合兩項藥劑試驗結果，針對葡萄銹病化學防治，本研究顯示推薦藥劑中以四氯異苯腈與克熱淨的抑制效果最為顯著。此外，數種原登記於防治白粉病(如護汰芬、三泰隆、菲克利)或晚腐病(如得克利、百克敏)的藥劑，在葡萄銹病夏孢子離體試驗中，亦展現顯著的抑制活性。在藥劑選擇策略上，三唑類殺菌劑為目前防治銹病的主流且效果優異，多作用點藥劑則次之，建議優先納入輪替使用以延緩抗藥性。然而，在追求病害控制的同時，必須審慎評估藥害風險。本研究觀察到得克利處理組會導致葉片圓盤產生明顯黃化現象，顯示該藥劑在特定濃度或環境下可能對植物生理造成負面影響。值得注意的是，在葉片圓盤試驗結果顯示，單劑(如百克敏、貝芬替)的病害抑制率略優於其相應的合劑(如氟殺克敏、白列克敏、貝芬普寧)，雖未達統計顯著差異，但這暗示了藥劑混合後可能存在拮抗作用或干擾效果，值得後續深入探討。除了上述化學藥劑的感受性與風險評估，開發低風險的友善資材以符合當前減農藥栽培趨勢，亦為本研究之重點。在葡萄病害的友善防治體系中，如何全面涵蓋四大主要病害(露菌病、白粉病、晚腐病及銹病)為整合性管理能否成功的關鍵。過去本場研究指出，亞磷酸在防治露菌病與白粉病上已具備顯著成效，然而對於晚腐病與銹病則無顯著防效(劉等人，2010)，這顯示在目前的友善防治體系中，銹病防治仍存在技術缺口。針對此一缺口，本研究進一步證實

改良式硫黃對於葡萄銹病夏孢子具有優異的抑制效果。儘管過去硫黃多被歸類為防治白粉病的傳統資材(Grădilă *et al.*, 2020)，但本研究結果顯示其具備開發為銹病友善資材之潛力，能有效補足亞磷酸的防治侷限。藉由整合亞磷酸(針對露菌、白粉病防治)與改良式硫黃(針對銹病、白粉病防治)之應用，將可提供有機轉型或減農藥栽培業者更為系統性且全面的病害防治選擇。

參考文獻

1. 余思葳、楊秀珠。2010。害物管理手冊(葡萄篇)，頁 1。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局、行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所編印。
2. 呂理桑、吳宏國。1983。葡萄銹病病菌夏孢子之發芽及侵入過程。植保會刊，25，167-175。
3. 黃秀華。2004。葡萄病害整合性管理技術。臺中區農業改良場特刊，67，127-153。
4. 黃晉興、王毓華、羅朝村。2002。利用葉片圓盤接種法篩選甜瓜抗白粉病品種。中華農業研究，51，49-56。
5. 葉文彬。2021。臺灣鮮食葡萄品種與產期調節技術發展。臺中區農業專訊，114，1-4。
6. 楊滿霞。2022。使用程式語言 R 輕鬆完成試驗設計分析(一)完全隨機設計。農業試驗所技術服務季刊，33，32-37。
7. 劉興隆、趙佳鴻、沈原民、吳世偉。2010。評估亞磷酸防治葡萄主要病害之效果。臺中區農業改良場研究彙報 106，55-64。
8. 賴守正。2006。葡萄主要病害發生與安全用藥。苗栗區農業專訊，33，12-13。
9. Agathokleous, E., Calabrese, E. J. 2021. Fungicide-induced hormesis in phytopathogenic fungi: A critical determinant of successful agriculture and environmental sustainability. J Agric Food Chem. 69, 4561-4563.
10. Angelotti, F., Scapin, C. R., Tessmann, D. J., Vida, J. B., Canteri, M. G. 2013. The effect of temperature, leaf wetness and light on development of grapevine rust. Australas. Plant Pathol. 43, 593-600.
11. Angelotti, F., Buffara, C. R. S., Tessmann, D. J., Vieira, R. A., Vida, J. B. 2014. Protective, curative and eradicated activities of fungicides against grapevine rust. Cienc. Rural. 44, 1367-1370.
12. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 6, 71-79.

13. Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 649-662.
14. Blum, M. M. C., Reis, E. M., Vieira, F. T., Carlini, R. 2015. In vitro effect of substrate, temperature and photoperiod on *Phakopsora pachyrhizi* urediniospore germination and germ tube growth. *Summa Phytopathol.* 41, 101-106.
15. Buck, J. W., Dong, W., Mueller, D. S. 2010. Effect of light exposure on in vitro germination and germ tube growth of eight species of rust fungi. *Mycologia.* 102, 1134-1140.
16. Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. 2003. Toxicology rethinks its central belief. *Nature.* 421, 691-692.
17. Calabrese, E. J. 2014. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb Cell.* 1, 145-149.
18. Dantigny, P., Nanguy, S. P.-M. 2009. Significance of the physiological state of fungal spores. *Int J Food Microbiol.* 134, 16-20.
19. Dharma, K. S., Suryanti, Widiastuti, A. 2024. Hormesis in pathogenic and biocontrol fungi: From inhibition to stimulation. *Caraka Tani J Sustain Agric.* 39, 281-296.
20. Garzón, C. D., Flores, F. J. 2013. Hormesis: Biphasic dose-responses to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture. In *Fungicides-Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World.* pp. 311-328. InTech
21. Givan, C. V., Bromfield, K. R. 1964. Light inhibition of uredospore germination in *Puccinia graminis* var. *tritici*. *Phytopathology.* 54, 382-384.
22. Gomes, B. R., Bogo, A., Copatti, A., Guginski-Piva, C. A., de Moraes, A. C., Zanghelini, J. A., Bitencourt, C., Stefen, D., Orsi, N., Paixão, C. A., Dal Vesco, L. L., Ritschel, P. S., Welter, L. J. 2019. Assessment of grapevine germoplasm collection for resistance to grape leaf rust (*Phakopsora euvis*) using a leaf disc assay. *Euphytica.* 215, 1-11.
23. Grădilă, M., Jalobă, D., Vasile, J. 2020. Control of powdery mildew in vineyards using several applications of unpollutant treatments of sulphur fungicides in Romania. *J Int Sci Publ Agric Food.* 8, 81.
24. Ji, J.-X., Li, Z., Li, Y., Kakishima, M. 2019. Life cycle of *Nothoravenelia japonica* and its phylogenetic position in Pucciniales, with special reference to the genus *Phakopsora*. *Mycol Prog.* 18, 855-864.

25. Khan, M. 1977. Light stimulation of fungus spore germination. *Z. Pflanzenphysiol.* 81, 374-376.
26. Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., Mozina, S. S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods.* 81, 121-126.
27. Magalhães, E. E., Angelotti, F., Peixoto, A. R., Fernandes, H. A., Barbosa, L. G., Pinheiro, G. S. 2011. Germinação de urediniósporos de *Phakopsora euvitidis* sob diferentes aumentos da temperatura. *Trop Plant Pathol.* 36, 1253.
28. Mueller, D., Buck, J. 2003. Effects of light, temperature, and leaf wetness duration on daylily rust. *Plant Dis.* 87, 442-445.
29. Naruzawa, E. S., Celoto, M. I. B., Papa, M. F. S., Tomquelski, G. V., Boliani, A. C. 2006. Estudos epidemiológicos e controle químico de *Phakopsora euvitidis*. *Fitopatol Bras.* 31, 41-5.
30. Nogueira Júnior, A. F., Ribeiro, R. V., Appezzato-da-Glória, B., Soares, M. K. M., Rasera, J. B., Amorim, L. 2017. *Phakopsora euvitidis* causes unusual damage to leaves and modifies carbohydrate metabolism in grapevine. *Front Plant Sci.* 8, 1675.
31. Okane, I., Kurita, A., Ono, Y. 2025. Is the co-occurrence of *Neophysopella meliosmae-myrianthae* and *N. montana* (Pucciniales) common on grapevines in Japan? *J Fungi.* 11, 193.
32. Ono, Y. 2000. Taxonomy of the *Phakopsora ampelopsidis* species complex on vitaceous hosts in Asia including a new species, *P. euvitidis*. *Mycologia.* 92, 154-173.
33. Ono, Y., Okane, I., Chatasiri, S., Pota, S., Unartngam, J., Ayawong, C., Nguyen, H. D., Le, C. T. M. 2020. Taxonomy of Southeast Asian-Australasian grapevine leaf rust fungus and its close relatives. *Mycol Prog.* 19, 905-919.
34. Petrovski, S., Tillett, D. 2012. Back to the kitchen: Food-grade agar is a low-cost alternative to bacteriological agar. *Anal Biochem.* 429, 140-141.
35. Pontzen, R., Scheinpflug, H. 1989. Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Neth J Plant Pathol.* 95, 151-160.
36. Pota, S., Chatasiri, S., Unartngam, J., Yamaoka, Y., Hosaka, K., Ono, Y. 2015. Taxonomic identity of a *Phakopsora* fungus causing the grapevine leaf rust disease in Southeast Asia

- and Australasia. *Mycoscience*. 56, 198-204.
37. Santos, R. F., Primiano, I. V., Amorim, L. 2021. Identification and pathogenicity of *Neophysopella* species associated with Asian grapevine leaf rust in Brazil. *Plant Pathol.* 70, 74-86.
38. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 9, 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
39. Tapsoba, H., Wilson, J. P. 1997. Effects of temperature and light on germination of urediniospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. *indica*. *Plant Dis.* 81, 1049-1052.
40. Vines, P. L., Hoffmann, F. G., Tomaso-Peterson, M. 2023. In vitro fungicide sensitivity and effect of organic matter concentration on fungicide bioavailability in take-all root rot pathogens. *Plant Health Prog.* 24, 205-212.

Optimization of Urediniospore Germination Conditions of Grapevine Rust for Fungicide Efficacy Evaluation¹

Yung-Feng Ho² and Ching-Ching Hsu^{2*}

ABSTRACT

Grapevine rust (*Neophysopella meliosmae-myrianthae*) commonly causes premature defoliation, severely affecting fruit quality and yield in the following season. As chemical control remains the primary management strategy, this study aimed to optimize environmental factors, including light, temperature, spore age, and culture media, to establish a stable fungicide sensitivity assessment platform for *N. meliosmae-myrianthae*. Experimental results showed that urediniospores incubated at 28°C under sequential dark-light treatment (12 hr dark followed by 12 hr light, 12D:12L) achieved a germination rate of up to 75.0%, which was significantly higher than that under continuous darkness. Regarding spore viability, fresh spores collected 1-2 days after the onset of sporulation (9-10 days post-inoculation) exhibited the highest germination activity. In addition, culture media prepared with premium agar powder performed better than those made with Bacto Agar. In fungicide sensitivity assays, 7 out of the 16 tested fungicides, namely chlorothalonil, iminoctadine triacetate, flutriafol, tebuconazole, pyraclostrobin, mancozeb, and sulfur, completely inhibited spore germination (100.0% inhibition). Further detached leaf disc inoculation assays revealed that although 28°C was optimal for spore germination, lesion development was most stable at 22°C. In efficacy evaluations, chlorothalonil, iminoctadine triacetate, flutriafol, triadimenol, hexaconazole, pyraclostrobin, and sulfur exhibited excellent protective activity, all achieving 100.0% disease suppression. This study clarifies the key environmental parameters during the early infection stage of grapevine rust and identifies

¹ Contribution No. 1124 from Taichung DARES, MOA.

² Project Assistant and Assistant Researcher of Taichung District Agricultural Research and Extension Station, MOA.

*Corresponding Author: Ching-Ching Hsu, Email: hsuching@tcdares.gov.tw

promising chemical and eco-friendly control materials, providing a scientific basis for field disease management strategies.

Key words: grapevine rust, *Neophysopella meliosmae-myrianthae*, urediniospore germination, fungicide, leaf disc assay