

利用葉片圓盤接種法篩選甜瓜抗白粉病品種¹

黃晉興^{2,4} 王毓華³ 羅朝村²

摘要：本研究利用接種白粉病菌於甜瓜葉片圓盤上，來快速檢測甜瓜品系對白粉病菌之抗感病性。其檢測方法如下：取苗齡 3 或 4 星期無病原菌感染之甜瓜植株上半部之新葉，經 1%次氯酸鈉溶液表面消毒 2~3 分鐘，無菌水漂洗三次後，以打孔器取下直徑 1.5 公分之葉片圓盤，正面朝上，置於盛有二層滅菌濾紙之容器中，添加適量之 M-solution 養液使濾紙完全濕潤並有游離水產生，以維持葉片圓盤之活力，以吹落分生孢子方式接種每平方公分 50~100 個孢子濃度之白粉病菌(*Sphaerotheca fuliginea* race 1)，容器加蓋密封置於 24°C / 18°C (Day / night)光照 12 小時之定溫箱中，培養 10 天後記錄發病指數。在室內採用葉片圓盤法測試不同甜瓜品種對白粉病之抗感病性，並對照生長箱中幼苗接種及田間植株自然感染之結果，經分析顯示其兩者之相關性高(相關係數分別為 $r^2=0.9709$ 及 $r^2=0.7924$, $p=0.05$)。因此葉片圓盤接種法可應用於測定甜瓜品系對白粉病菌之抗感病性。

關鍵詞：甜瓜、白粉病、葉片圓盤接種法、抗病品種。

前 言

台灣甜瓜白粉病主要由 *Sphaerotheca fuliginea* Schlecht. ex Fr. 所引起⁽¹⁾；發生期間常見在甜瓜葉片、葉柄及莖部產生白粉狀病斑，影響作物光合作用，降低瓜果風味、品質及產量^(1, 19)；施用化學藥劑是栽培者最常使用的防治方法，但栽培期間施用次數頻繁，易導至病菌抗藥性的產生^(1, 13, 19, 20)，故育成抗白粉病之甜瓜品種，以減少白粉病的危害與化學藥劑的使用，已成為育種人員之重要課題。

傳統抗病品種之選育工作常於田間種植各品系作物，以自然感染或人為接種病原菌的方式來選取抗病品系，然而此種方法常會遭受其它病害及環境因子干擾^(3, 17)，而影響甜瓜抗白粉病品種之選育，因此國外有研究人員於溫室內接種白粉病菌以檢測甜瓜幼苗來篩選抗病品系⁽⁸⁾，雖較田間方便，但仍受限於溫室內之空間與環境條件。利用葉片圓盤接種法篩選抗病品系已被應用在大麥、馬鈴薯、咖啡及白楊木^(2, 6, 10, 11)，且已有許多學者利用切離葉或葉片圓盤接種法測定甜瓜白粉病菌生理小種及檢測抗感病甜瓜品種^(4, 7, 9, 12, 14)，然而各學者使用之接種源濃度、接種溫度及時間各有差異。故本研究乃參考前人之方法，開發適合台灣甜瓜抗白粉病品種選育之葉片圓盤接種法，以作為未來育種人員快速篩選之參考。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2133 號。接受日期：91 年 11 月 20 日。

2. 本所植病系助理研究、副研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

3. 本所園藝系助理研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

4. 通訊作者，電子郵件：jhhuang@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

材料與方法

供試甜瓜

將金輝、銀輝、秋蜜、蜜世界、秋香、MR-1、PI-124112 及 IRAN-H 等各品種之甜瓜種植於盛有泥炭土(Bio-mix)之五吋塑膠盆(後三個品種來自法國 INRA 機構)，置於 28°C / 22°C (Day / night) 光照 12 小時(3500 lux)之生長箱中栽培，取植株之展開葉以自來水洗淨，再經消毒水(1%次氯酸鈉，並於 200ml 消毒水加入數滴 Tween-20 界面活性劑攪拌)表面消毒二~三分鐘，無菌水漂洗三次，吸乾游離水，再以經高溫滅菌後之金屬圓柱器具切取直徑 1.5cm 葉片圓盤，置於盛有二層濾紙之耐熱密盒(20×15×5cm)，或直徑 9 或 5cm 塑膠培養皿內，添加適量含有 50ppm tetracyclin 之 M-solution(mannitol 10,000ppm 及 benzimidazole 30ppm 之水溶液)⁽⁹⁾使濾紙完全濕潤並有游離水產生，以維持葉片圓盤之活力。先前試驗顯示各品種 4 星期苗齡之第一及 5 星期苗齡之第二、三位葉之葉片圓盤於接種 10 天後易褐化，不易調查，而同一品種各位葉之抗感病性反應無差異，3 星期苗齡雖可測試相同之抗感病反應，但葉片太小，不易取得；故以苗齡 5 星期之第 4~7 葉及苗齡 4 星期之第 3、4 葉片(即整株植株上半部之新展開葉片)為爾後供試材料。

白粉菌菌株之分離、保存及接種源備製

從台中縣霧峰鄉農業試驗所各品種甜瓜栽培田取回感染白粉病菌之葉片，將孢子吹落於附有水瓊脂塊之玻片上，再將玻片放入培養皿濕室內，二十四小時後，於解剖顯微鏡下挑取已發芽之單一白粉病菌孢子，移植於前述培養皿之葉片圓盤上(IRAN-H 品種)，於 16°C (光照 12 小時)之定溫箱中培養 12~16 天，使白粉菌長滿整個葉片圓盤作為接種源。而長滿白粉菌之葉片圓盤於 16°C 定溫箱自然乾燥 4 天後，密封於 2.5ml 之玻璃安瓶中，於-25°C 之冷凍櫃或液態氮容器內長期保存。本試驗以分離自金輝品種之白粉菌分離株 9912-WF-A1 為供試菌株，由菌絲生長情形、吸器、分生孢子柄、足細胞(foot-cell)、產孢細胞(generative cell)，孢子串外緣、分生孢子形態大小、皿狀物(fibrosin body)及發芽管之特性鑑定為 *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.)^(1,5,16,18,20)。本供試菌於 IRAN-H 及 Vedrantaïs 品種產生感病現象，而 PMR-45、PMR-5、Edisto-47、MR-1、PI-124112 則呈抗病反應，確定為 race 1^(14,15)。

接種方法及病害調查

將上述盛有葉片圓盤之密盒或培養皿置於高 70cm、底 28cm 之圓椎管底部，並於葉片旁放置有數塊 1cm² 水瓊脂平板之載玻片，於圓椎管上管口以加壓氣流將培養於葉片圓盤之白粉病菌孢子直接吹落於盛於容器之葉片圓盤上(供試孢子之發芽率 50~65%)，而載玻片上之水瓊脂塊置於光學顯微鏡下計量接種源濃度(每平方公分之孢子量)，爾後置於 24°C / 18°C (Day / night) 光照 12 小時(或其他溫度)之定溫箱中培養，定時記錄發病指數。發病指數分為 0~9 共 10 級^(9,14)：0 級-無病斑；1 級-病斑佔葉面積 10%；3 級-病斑佔葉面積 50%；5 級-病斑佔葉面積 80%；7 級-病斑佔葉面積 100%但孢子量稀薄；9 級-病斑佔葉面積 100%而孢子量厚實且葉片圓盤褐化，未詳述之級數依病害嚴重程度酌訂定。若接種整株植物則調查接種葉，於田間自然感染，果實採收前，每株由老葉至新展開葉均勻選取 10 葉調查(若少於 10 葉則全數選取)，以調查葉之平均病斑面積視為該植株之發病度。

接種源濃度及接種時間對甜瓜葉片圓盤白粉病之影響

盛於密閉盒之甜瓜葉片圓盤(金輝品種)接種白粉病菌供試菌株 9912-WF-A1，接種源濃度為 10、50、100 或 300 spore/cm²(誤差 10%)，置於 24°C / 18°C (日/夜溫)，光照 12 小時之定溫箱中，經 2、4、6、8、10、12 及 14 天後記錄發病指數，每處理三重複，以不接種白粉病菌為對照。

接種溫度對甜瓜葉片圓盤白粉病之影響

取甜瓜(金輝、銀輝、秋蜜、蜜世界、秋香、MR-1 及 PI-124112)苗齡 4 或 5 星期植株之上半部展開葉，接種白粉病菌 9912-WF-A1 供試菌株 50~100 spore/cm²，置於 8~36°C (每 2 或 4°C 為間隔)，及

日 24°C 夜 18°C 之定溫箱中，每日光照 12 小時，接種後 10 天記錄發病指數，每處理三重複，以不接種白粉病菌為對照。

葉片圓盤接種法與甜瓜幼苗生長箱接種及田間自然感染之相關性

將甜瓜品種(金輝、銀輝、秋蜜、蜜世界、秋香、MR-1 及 PI-124112)於生長箱中栽培 4 星期(約有 3 或 4 片真葉)，取第一片真葉以前述方法做成葉片圓盤，並以 50~100 spore/cm² 之濃度接種 9912-WF-A1 菌株，於 24°C / 18°C (Day / night) 光照 12 小時之定溫箱中 10 天後記錄發病指數；該葉片所屬之植株以相同方式於高 120cm、底 60cm 之圓椎管內接種相同接種濃度，接種後，栽植盆再套上 45cm 高、上下露空之塑膠套，避免白粉病菌飛散，置於 24°C / 18°C (Day / night) 光照 12 小時之生長箱中 14 天後記錄接種葉片之發病度，每處理四重複。另將六十個甜瓜品系育苗於生長箱中，在苗期每一株取一展開葉，每一葉二~三個葉片圓盤，利用葉片圓盤接種法測試對供試白粉病菌之抗感病性，將各品種 6 株之平均發病指數視為該品種之發病指數，取葉後之幼苗於 2000 年春季種植於台中縣霧峰鄉農業試驗所試驗田，每品種 6 株，讓植株自然感染白粉病，二個月後於採收期，每株由新展開葉至老葉均勻選取 10 葉調查(若少於 10 葉則全數選取)，記錄其發病度，將各品種 6 株之平均發病度視為該品種之發病度，以迴歸統計方法分析葉片圓盤接種法與生長箱幼苗接種及田間自然感染白粉病菌之相關性。

結 果

接種源濃度、時間對甜瓜葉片圓盤白粉病之影響

甜瓜葉片圓盤接種後 4 天時無法以肉眼看到病斑；接種 6 天時高濃度病原之處理出現明顯白粉病斑，可見在 24°C / 18°C (Day / night) 之環境中，甜瓜白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea* (菌株代號 9912-WF-A1) 在 6 天內即可繁殖產孢至肉眼可見的程度；10 天後接種 300 spore/cm² 之處理發病指數達 9 (最高)，接種 50、100 spore/cm² 發病指數分別為 7.3 及 8.0，但兩者無統計上之差異(圖 1)；12 天以後大部分的葉片圓盤褐化，不易調查，而對照組亦輕微褐化。

接種溫度對甜瓜葉片圓盤白粉病之影響

接種 10 天後，白粉病菌在 16°C~28°C 於各品種甜瓜之葉片圓盤能造成病斑，以 18~24°C 較嚴重，金輝、秋蜜、蜜世界等發病指數 6.5~8.3，銀輝及秋香則為 3.3~5.5，MR-1 及 PI-124112 品種之發病指數為 0~0.2，出現輕微病徵(表 1)。24/18°C (日/夜溫) 之環境中病害指數穩定，且葉片圓盤較易維持翠綠。12°C 之環境中，金輝、蜜世界、秋蜜、秋香及銀輝品種於接種 3 星期後僅有輕微之病斑出現，因此本研究以接種孢子濃度 50~100 spore/cm² 於 24/18°C 下經 10 天後調查，作為接種試驗之標準。

甜瓜葉片圓盤接種法與甜瓜幼苗生長箱接種及田間自然感染之相關性測定

利用葉片圓盤接種法與盆栽植株接種法所獲得之病害嚴重程度兩者相關性極高，由葉片圓盤接種法之罹病指數(disease index)與盆栽接種呈現之發病度(disease severity)間之直線迴歸分析得知，兩者呈顯著正相關(圖 2， $r^2=0.9709$ ， $p=0.05$)，其中金輝、秋蜜、蜜世界呈現感病現象，MR-1 及 PI-124112 呈現抗病，而銀輝、秋香病勢中等。於田間栽培之六十個測試品系中，有二十八個品系於葉片圓盤接種法發病指數 <3 ，且於田間栽培呈現抗病現象；於葉片圓盤接種法有五個品種發病指數 3~6，而於田間栽培則多數呈現中感及部分品種呈感病現象；於葉片圓盤接種法發病指數 >6 ，田間栽培也多呈現感病現象，部分品種中感。由葉片圓盤接種法之罹病指數與田間自然感染呈現之發病度間之直線迴歸分析呈顯著正相關($r^2=0.7924$ ， $p=0.05$)。

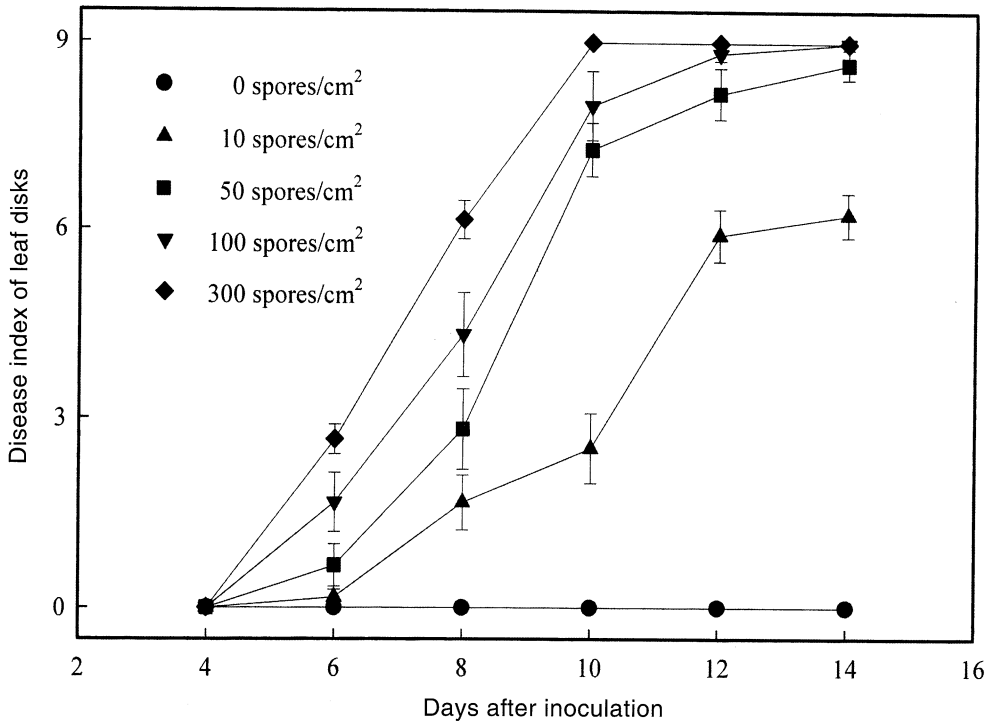


圖 1. 以葉片圓盤測試接種源濃度與金輝甜瓜白粉病病勢進展的關係。

Fig. 1. Effect of concentration of *Sphaerotheca fuliginea* race 1 on development of powdery mildew on Zinhue melon leaf discs.

表 1. 溫度對葉片圓盤接種白粉病菌後發病之影響

Table 1. Effect of temperatures on the disease index of powdery mildew on melon leaf-discs inoculated with *Sphaerotheca fuliginea* race 1

Temp.(°C)	Disease index ^z						
	Zinhue	Mihsije	Cheomi	Inhue	Cheohsian	MR-1	PI-124112
8°C	0	0	0	0	0	0	0
12°C	0	0	0	0	0	0	0
16°C	3.8 c	5.4 b	4.0 c	2.8 b	1.5 b	0.2 a	0.1 a
18°C	6.5 b	7.9 a	7.3 a	3.3 ab	5.3 a	0	0.1 a
20°C	7.5 a	7.8 a	8.2 a	4.5 a	5.5 a	0.1 a	0.2 a
24°C	8.3 a	8.1 a	7.4 a	4.7 a	5.3 a	0.2 a	0
28°C	2.9 c	1.4 c	4.0 c	1.6 c	1.4 b	0	0
32°C	0	0	0	0	0	0	0
24/18°C ^y	7.7 a	7.9 a	8.1 a	4.1 a	5.5 a	0	0

^z 1.5 cm in diam. Leaf disks were inoculated with 50-100 spores/cm², data were taken at the 10 days after inoculation, and disease index was classified from 0 to 9, depend on the leaf-disc from health to completely infected. Means in the same column followed by the same letter are not significantly different (p=0.05) according to Duncan's multiple range test.

^y 24/18°C=day/night temperature.

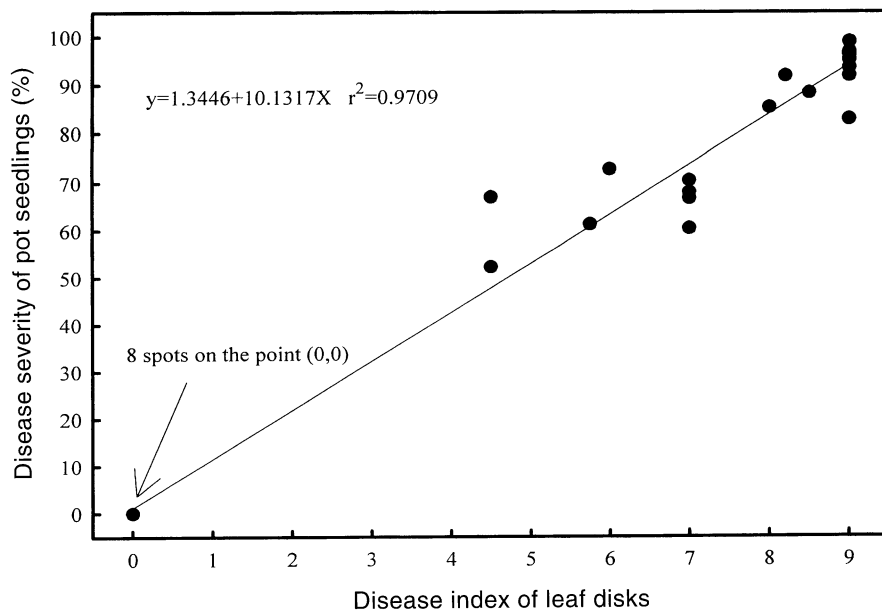


圖 2. 甜瓜葉片圓盤之白粉病發病指數與生長箱接種幼苗之發病度間的相關性。

Fig. 2. The correlation between disease index using leaf-disks assay and disease severity using the method of seedlings inoculation in growth chamber.

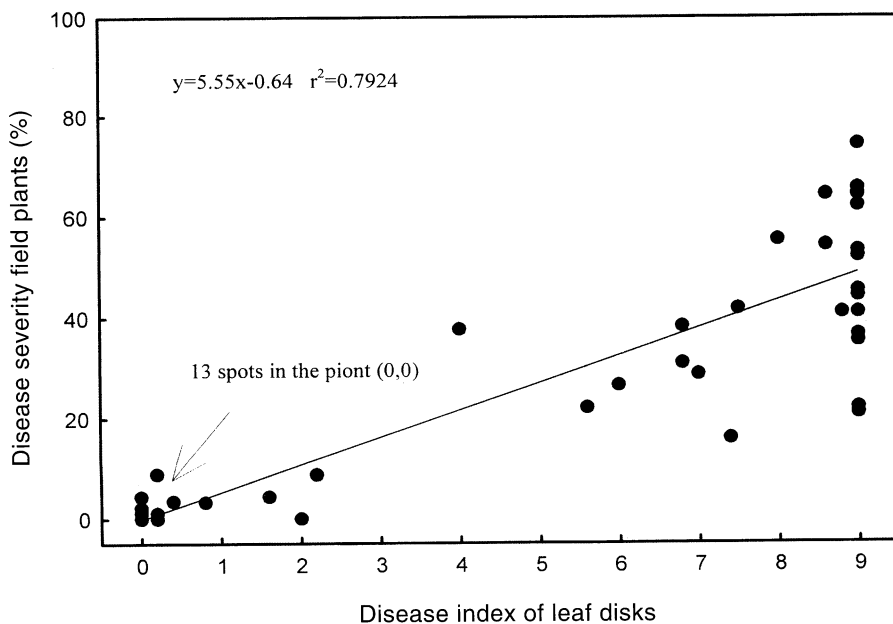


圖 3. 甜瓜葉片圓盤之白粉病發病指數與田間植株自然感染之發病度間的相關性。

Fig. 3. The correlation between disease index of Leaf disk and disease severity of plants naturally infected in the field.

討 論

本試驗以金輝品種為範例，探討整個葉片圓盤之接種模式為：取苗齡 3 或 4 星期之甜瓜植株上半部展開葉之葉片圓盤，以 50~100 spore/cm² 之濃度接種，置於 24°C / 18°C (Day / night) 光照 12 小時之定溫箱中 10 天後記錄發病指數(1—9 級)最佳。在葉片表面消毒之過程中，浸漬於 1% 次氯酸鈉溶液以 2—3 分鐘最為恰當，時間太短則消毒不完全，太長則容易傷害葉片；而葉片正反面皆可感染白粉病菌，但以正面之白粉病斑較為明顯，且較易判讀。

許多學者利用切離葉或葉片圓盤接種法測定甜瓜白粉病菌生理小種及檢測抗感病甜瓜品種^(4, 7, 9, 12, 14)，然而使用之接種源濃度、接種溫度及時間各有差異，如接種源濃度 100~500 spore/cm²，接種時間 7~10 天範圍差異甚大，而接種溫度有 24°C/18°C (day/night) 及定溫 25°C 等模式，經筆者測試發現接種源濃度及接種時間會影響發病指數判讀(圖 1)，在適合發病的環境下，接種條件應予以固定，否則對於中抗甜瓜品種之抗感病性判讀有所影響。

雖然有試驗⁽⁷⁾指出部分抗病品系 3~4 星期苗齡的第一及第二片真葉之葉片圓盤會呈現感染的情形，但病斑不易由肉眼視別，而本研究發現以植株上半部之新葉為材料可避免干擾。試驗結果發現以葉片圓盤接種甜瓜白粉病菌，通常會造成比田間自然感染病害更嚴重之反應(圖 3)，可能因為葉片圓盤接種法之環境因子(溫度 18~24°C 及高濕度，表 1)較田間適合發病，或切離葉本身較感病，故部分於葉片圓盤接種法檢測為感病之品種，於田間卻出現病害較輕之現象，但以此法所測定抗病反應者，於田間對該測定病原菌之生理小種均呈現抗病反應。

台灣甜瓜白粉病菌(*Sphaerotheca fuliginea*)之生理小種一直未被探討⁽¹⁾，主要原因是沒有適當的甜瓜鑑別品種及準確而簡單的接種方法，利用葉片圓盤接種法可簡單而快速測定白粉病菌之生理小種。作者於 1999 至 2001 年間，採集農試所試驗田間 18 個菌株，經來自法國的甜瓜鑑別品種檢測後，確定皆為 race 1，且 PMR-45 品種(抗 race 0 及 1^(14, 15))於 2000~2001 年三個栽培季中皆呈現抗病反應(未發表之資料)，顯示試驗田於試驗期間出現的白粉病菌為 race 1，而所選育之抗病品種能抗 race 1，對於其它生理小種之抗感病反應則需進一步測定才能得知，至於台灣其它甜瓜栽培區是否有不同的生理小種的存在，可在蒐集病菌後，利用葉片圓盤接種法進一步檢定。

誌 謝

本研究係行政院農委會補助部分經費，法國 INRA 機構 Dr. Pitrat、Dr. Dogimont 及 Dr. Bardin 提供甜瓜鑑別品種及葉片圓盤接種資訊，農委會防檢局郭克忠博士、嘉義大學蔡竹固博士提供白粉菌保存及培養資訊，一併誌謝。

引用文獻

1. 蔡竹固、童伯開。1995。瓜類白粉病。p.135-146。瓜類作物保護技術研討會專刊。中華植物保護學會編印。嘉義。
2. Arabi, M. I., A. Sarrafi, G. Barrault, and L. Albertini. 1991. An improved technique for determining net blotch resistance in barley. *Plant Dis.* 75:703-706.
3. Aust, H. J. 1986. Microclimate in relation to epidemics of powdery mildew. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:491-510.
4. Bardin, M., P. C. Nicot, P. Normand, and J. M. Lemaire. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. *Eu. J. Plant Pathol* 103:545-554.

5. Boesewinkel H. J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). Bot. Rev. 46:167-224.
6. Bussey, M. J., and W. R. Stevenson. 1991. A leaf disk assay for detection resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. Plant Dis. 75:385-390.
7. Cohen, R. 1993. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Plant Dis. 77:513-517
8. Cohen, S., and Y. Cohen. 1986. Genetics and nature of resistance to race 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in *Cucumis melo* PI 124111. Phytopathology 76:1165-1167.
9. Epinet, C., M. Pitrat, and F. Bertrand. 1993. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildew. Euphytica 65:135-144.
10. Eskes, A. B., 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Neth. J. Plant Pathol. 88: 127-141.
11. Hamelin, R. C., R. S. Ferriss, L. Shain, and B. A. Thielges. 1994. Prediction of poplar leaf rust epidemics from a leaf-disk assay. Can. J. For. Res. 24:2085-2088.
12. Kaur, J., and J. S. Jhooty. 1986. Presence of race 3 of *Sphaerotheca fuliginea* on muskmelon in Punjab. Indian Phytopathol. 39:297-299.
13. Khadar, A. S., and Y. A. Abdou 1972. Comparison of systemic and contact fungicides for control of powdery mildew on squash and cucumber. Plant Dis. Rep. 56:878-881.
14. Mohamed, Y. F., M. Bardin, P. C. Nicot, and M. Pitrat. 1995. Causal agents of powdery mildew of cucurbit in Sudan. Plant Dis. 79:634 –636.
15. Pitrat, M., C. Dogimont, and M. Bardin. 1998. Resistance to fungal diseases of foliage in melon. Cucurbitaceae 98:167-173.
16. Reifschneider, F. J. B., L. S. Boiteux, and E. M. Occhiena. 1985. Powdery mildew of melon (*Cucumis melo*) caused by *Sphaerotheca fuliginea* in Brazil. Plant Dis. 69:1069-1070.
17. Schnathorst, W. C. 1965. Environmental relationships in the powdery mildews. Annu. Rev. Phytopathol. 3:343-363.
18. Shin, H. D., and Y. J. La. 1993. Morphology of edge lines of chained immature conidia on conidiophores in powdery mildew fungi and their taxonomic significance. Mycotaxon 46:445-451.
19. Sitterly, W. R. 1978. Powdery mildew of cucurbits. p. 359-377. in : The Powdery Mildews. Spencer, D. M. (ed). Academic Press, New York. 565 pp.
20. Zitter, T. A., Hopkins, D. L., and Thomas, C. E. 1996. Compendium of Cucurbit Disease. APS. USA. 87 pp.

Development of Leaf-Disk Method for Screening Melon Varieties Resistant to *Sphaerotheca fuliginea* Race¹

Jin-Hsing Huang^{2,4}, Yu-Hwa Wang³ and Chaur-Tsuen Lo²

Summary

A leaf-disk method was developed for disease assessment of melon powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Melon seedlings grown in growth chamber for 4 to 5 weeks were used to prepare leaf disks. The new spread leaves of melon seedling were surface-sterilized by dipping in 1% sodium hypochlorite solution for 2—3 minutes, and rinsed in sterile distilled water three times. The surface-sterilized leaves were individually cut into 15-mm diameter leaf disks with a sterile cork border. The abaxial-up leaf disks were then placed in container with 2 pieces of sterilized filter papers. Suitable volume of M-solution was added to the filter papers to maintain vitality of the leaf disks. The leaf disks were inoculated with conidia (50~100 spores/cm²) of the pathogen, and then were incubated at 24°C/18°C (day/night) with a 12 hrs photoperiod for 10 days. For disease severity evaluation, results showed that there be a positive correlation among leaf-disk assay, seedling inoculation in growth chamber, and melon plants infected naturally in field. The relative coefficients (r^2) between leaf-disks assay and seedling inoculation, and naturally infected plants were 0.9709 and 0.7924, respectively ($p=0.05$).

Key words : Melon, Powdery mildew, Leaf disk, Resistant varieties.

-
1. Contribution No.2133 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted : November 20, 2002.
 2. Assistant Researcher and Senior Plantpathologist, Department of Plant Pathology, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher, Department of Horticulture, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: jhhuang@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23302806.