

# 甜瓜白粉病菌之繁殖、接種及保存<sup>1</sup>

黃晉興<sup>2,3</sup> 陳純葳<sup>2</sup> 蘇俊峰<sup>2</sup>

## 摘 要

黃晉興、陳純葳、蘇俊峰。2009。甜瓜白粉病菌之繁殖、接種及保存。台灣農業研究 58:176–184。

以挑單一孢子的方式可將甜瓜白粉病純化培養於甜瓜葉圓片 (直徑 1.5 cm) 上，於 20–24°C 培養 14–16 天可獲得大量可吹落之分生孢子 ( $4.5 \times 10^4$ – $6.8 \times 10^4$  conidia/leaf disc)，發芽率 24.8–42.3%，而 16°C 培養 16–19 天可產生  $3.2 \times 10^4$ – $3.5 \times 10^4$  conidia/leaf disc 之分生孢子，發芽率 22.5–33.5%，12 及 28°C 產孢量較少且發芽率較低，而 8 及 32°C 的環境下無法產孢。以直接吹落分生孢子方式較噴佈分生孢子懸浮液之接種方式為佳，分生孢子發芽率分別為 42.0 及 23.3%，而以  $(10 \pm 1)$  conidia/cm<sup>2</sup> 的接種源密度接種於盆栽離葉之發病度分別為 70.5 及 44.5%，均有顯著差異。在 24 及 4°C 的環境下，白粉病菌分生孢子分別僅能維持 7 或 30 天的活力，在 -30°C 或液態氮中 (-196°C) 的低溫下，未乾燥之分生孢子均無法存活，而乾燥後的分生孢子持續保存 180 天後，仍可再感染葉圓片。

**關鍵詞：**甜瓜、白粉病菌、繁殖、接種、保存。

## 前 言

白粉病是甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 主要的真菌病害之一，在台灣甜瓜白粉病主要由 *Podosphaera xanthii* (Castag.) Braun & N. Shish [syn. *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Poll; *S. fusca* (Fr.) Blumer emend. Braun] 所引起 (Huang & Wang 2007; Tsay & Tung 1994)。在法國 (Pitrat *et al.* 1998)、美國 (Zitter *et al.* 1996)、以色列 (Cohen *et al.* 1996)、西班牙 (Alvarez *et al.* 2000) 及日本 (Hosaya *et al.* 1999) 等地均有許多 *P. xanthii*

生理小種的報告，在台灣至少有 2 個生理小種，依季節或栽培地區之不同而有不同的生理小種出現，且有時 2 種生理小種同時存在於同一栽培區 (Huang & Wang 2007)。由於瓜類作物白粉病菌是屬於絕對寄生菌 (obligate parasites)，只能利用寄主活體的養分，無法於人工培養基生長及繁殖，故菌株純化培養是進行相關研究的重要關鍵 (Nicot *et al.* 2002)。

利用葉圓片培養白粉病菌的方法廣受使用，主要因為一個葉圓片即可繁殖一個甜瓜白粉病菌分離株，所需要的資材及空間較

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2364 號。接受日期：98 年 8 月 4 日。
2. 本所植物病理組助理研究員、聘用助理研究員、助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：jhhuang@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302803。

少。除了做為菌株純化培養之外，也可做為抗感病性測定的接種材料 (Bardin *et al.* 1997; Bertrand 1991; Cohen 1993; Epinet *et al.* 1993; Huang *et al.* 2002; Nicot *et al.* 2002)。然而甜瓜葉圓片僅有數週的活力，特別是接種白粉病菌後容易褐化，可能會影響分生孢子的活力，就筆者所知，這方面並未有詳細之相關研究，僅 Bertrand (1991) 以甜瓜子葉培養白粉病菌 *P. xanthii* 及 *Golovinomyces cichoracearum* (D. C.) Huleta 進行研究，其所使用之接種源為於 18–22°C 培養 10–14 天的分生孢子。本研究藉由葉圓片進行甜瓜白粉病菌之純化培養及保存方法，探討做為接種源分生孢子之產量及活力，以供相關研究之基礎。

### 材料與方法

#### 供試作物之栽培、葉圓片及盒栽離葉之製備

將各 IRAN-H 及金輝品種甜瓜之種子置於盛有潮濕濾紙之玻璃培養皿中催芽，待發芽後種植於盛有泥炭土之 5 吋塑膠盆中，於日夜溫 28/22°C 光照 12 小時之生長箱中栽培 4–6 週，甜瓜植株長有 4–8 片完全展開葉，取植株之中上位展開葉以自來水洗淨，再經消毒水 (1% 次氯酸鈉，並於 200 mL 消毒水加入數滴 Tween-20 界面活性劑攪拌) 表面消毒 1 分鐘，無菌水漂洗 3 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 1.5 cm 葉片圓片，正面朝上，置於盛有 2 層濾紙之塑膠培養皿內 (直徑 6 或 9 cm)，添加適量含有 50 ppm tetracyclin 之 M-solution (mannitol 10,000 ppm 及 benzimidazole 30 ppm 之水溶液) 使濾紙完全濕潤並有游離水產生，以維持葉圓片之活力及避免細菌污染影響試驗結果 (Epinet *et al.* 1993; Huang *et al.* 2002)。

取上述於生長箱栽培之金輝甜瓜展開葉，以自來水洗淨，將葉柄插入離葉栽培盒內密封

栽培，栽培盒為兩組直徑 14 cm × 高 5.5 cm 之有蓋塑膠盒上下連接，連接層穿孔以供葉柄伸過至下盒，上盒放葉片，下盒盛有未滅菌之 250 mL 地下水，並摻入適量的珍珠石以供葉柄維持伸展、長根及吸收水分。培養初期 2 天保持密閉，爾後於盛有葉片之上盒蓋開 2 個直徑 0.5 cm 之小孔以避免水珠累積，於 24–28°C 培養 6–10 天可長根，並可維持 2 個月之活力 (Huang & Wang 2007)。

#### 甜瓜白粉病菌菌株之純化培養

於農業試驗所之甜瓜試驗田，取回感染白粉病菌並有分生孢子之甜瓜葉片，於解剖顯微鏡下以單根毛髮夾於竹筷為工具，挑取單一孢子沾黏於上述葉圓片 (IRAN-H 品種)，置於盛有沾濕養液濾紙片之培養皿內 (直徑 6 cm) 進行單孢培養；或以挑針刮取田間甜瓜葉片上的少量分生孢子沾於葉圓片上，待其長出分生孢子後，再以上述方法挑取單一孢子培養。共取 3 塊試驗田，每塊試驗田各取 4 片葉片，每葉片挑取 10 個單孢。每個培養皿內就僅放 1 片葉圓片以繁殖 1 個甜瓜白粉病菌分離株，於 24/20°C (日夜溫) 光照 12 小時的條件下培養，待葉圓片出現菌落長出分生孢子，再將孢子吹落於另一新鮮葉圓片上，培養大量分生孢子，以菌株編號 Px-001 (*Podosphaera xanthii* race 1, 農委會農試驗所植物病理組蔬菜花卉病害研究室) 為爾後試驗之供試菌株。

#### 甜瓜白粉病菌分生孢子發芽率檢測及離葉接種之病害記錄

**孢子發芽率檢測：**玻片上塗抹溶於丙酮之 2% 醋酸纖維 (acetate cellulose, Sigma, USA)，將分生孢子吹佈或噴佈於其上，置於濕室內 (盛有潮濕濾紙之培養皿)，24°C 黑暗培養 48 小時後，於顯微鏡下觀察 100 顆分生孢子，記錄其發芽率 (Tsai & Tung 1994)，每處理 3 重複。

**離葉接種：**將葉圓片繁殖之分生孢子以空氣壓縮機 (air compressor) 釋出之氣體將分生

孢子吹落，或孢子懸浮液以噴霧器噴佈於上盒栽離葉，於旁置放一塊  $1\text{ cm}^2$  之水瓊脂塊計量單位面積之的孢子量，以吹落或噴佈少量而累積數次孢子之方式控制分生孢子濃度於  $(10 \pm 1)\text{ conidia/cm}^2$ ，置於日夜溫  $24/20^\circ\text{C}$  光照 12 小時之定溫箱培養 12 天後，記錄發病面積佔該盒栽離葉之比例 (%) 視為發病度 (Huang *et al.* 2006)。

#### 溫度與培養時間對白粉病菌培養於葉圓片之孢子數量與活力之影響

接種  $50\text{--}60\text{ conidia/cm}^2$  白粉病菌分生孢子於葉圓片上，培養於盛有沾濕養液濾紙之  $6\text{ cm}$

培養皿內，每皿 4 個葉圓片，各於  $8\text{、}12\text{、}16\text{、}20\text{、}24\text{、}28$  及  $32^\circ\text{C}$  定溫箱培養，並於  $6\text{、}9\text{、}12\text{、}14\text{、}16\text{、}19\text{、}22$  及  $26$  天後，每皿取出一個葉圓片以空氣壓縮機釋出之氣體將分生孢子吹落於底部面積  $200\text{ cm}^2$  之圓錐形管座中 (圖 1D–1F)，使其自然落至錐形管座底的 3 片面積  $1\text{ cm}^2$  水瓊脂塊及前述之醋酸纖維玻片上，於顯微鏡下計量該水瓊脂塊之平均孢子量 (每平方公分孢子數)，再乘以  $200\text{ cm}^2$  面積，即為該葉圓片所被吹落的分生孢子量，並於醋酸纖維玻片測發芽率。由於孢子發芽並不代

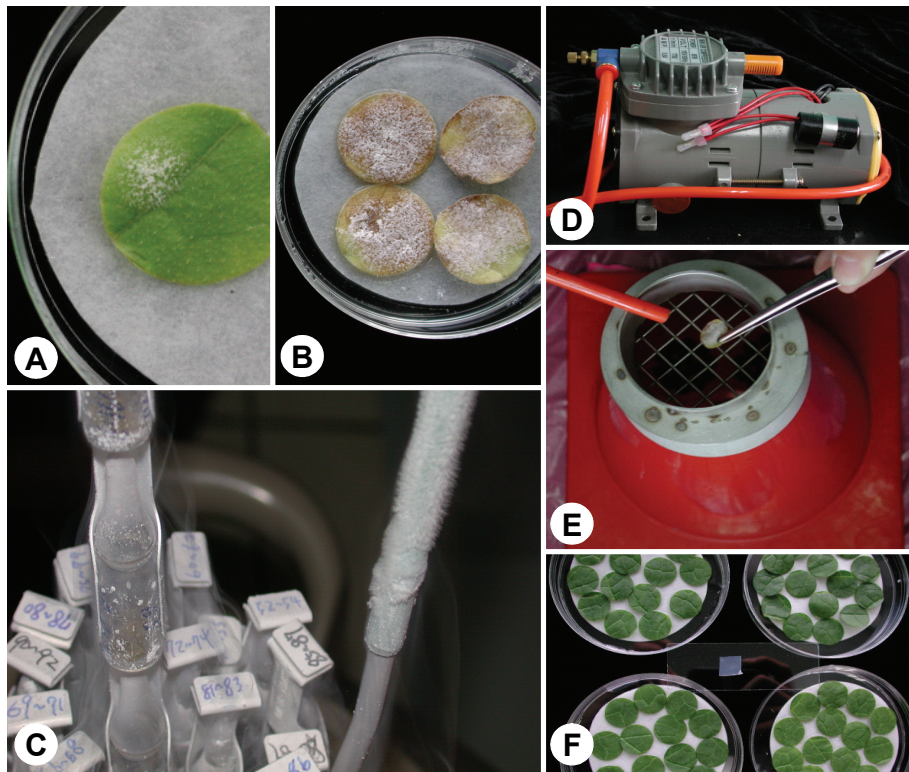


圖 1. 以甜瓜葉圓片單孢培養甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* (A)；甜瓜白粉病菌分生孢子吹佈於葉圓片在  $24^\circ\text{C}$  培養 16 天產生大量的甜瓜白粉病菌分生孢子(B)；白粉病菌貯放於密封的玻璃安瓶內，保存於液態氮桶中 (C)；利用空氣壓縮機釋出空氣吹散孢子以接種白粉病菌分生孢子 (D、E、F)。

**Fig. 1.** Single-spore culture of *Podosphaera xanthii* on muskmelon leaf disks (A). Conidia propagation on leaf disks at  $24^\circ\text{C}$  for 16 days with air-blow inoculation (B). Vials of conidia of *P. xanthii* stored in a liquid nitrogen tank (C). Equipment (air compressor) (D, E) used for inoculation of conidia of *P. xanthii* on leaf disks of muskmelon by the air-blow method (F).

表可以順利感染寄主葉片而繁殖，故另需將各處理的孢子進行接種測試，故取 16、20、24 及 28°C 培養 14 及 22 天的分生孢子，並以前述方法接種於盆栽離葉記錄發病度，每處理 4 重複 (Ⅲ)，相同試驗重複進行一次。

#### 甜瓜白粉病菌之接種方法比較

取上述繁殖有大量白粉病菌分生孢子 (日夜溫 24/20°C，光照 12 小時) 之葉圓片，接種方式為：(1) 直接吹落孢子：於圓錐形管口上方 (底管口直徑 60 cm，上管口直徑 6 cm，高 120 cm) 以加壓氣流將分生孢子吹落於圓錐管內之盆栽離葉；(2) 孢子懸浮液：分生孢子吹落於盛有無菌水之培養皿內獲得孢子懸浮液，以噴霧器噴佈於盆栽離葉。2 種接種方式之接種量皆為  $(10 \pm 1)$  conidia/cm<sup>2</sup>，置於日夜溫 24/20°C 光照 12 小時之定溫箱中，記錄發病度 (Huang *et al.* 2002)，每處理 6 重複，相同試驗重複進行一次。上述方式取得之分生孢子吹佈或噴佈於塗抹有 2% 醋酸纖維之玻片上，於顯微鏡下觀察記錄其發芽率，每處理 4 重複，相同試驗重複進行一次。

#### 乾燥與溫度對保存甜瓜白粉病菌菌株之影響

取上述繁殖有大量白粉病菌分生孢子之葉圓片 (日夜溫 24/20°C，光照 12 小時培養 14–16 天)，切成寬 2 mm 之條狀片，置於內盛無水硫酸銅之乾燥箱乾燥 2 天 (室溫 24–28°C)，或未經乾燥過程，再置於 2 mL 玻璃安瓶內，以高溫氫氧火焰將瓶口密封，分別於 24、4 及 -30°C 定溫箱與盛有液態氮之鋼桶內保存，在保存後 7、14、30、60 及 180 天，取出甜瓜葉條狀片以前述方法於醋酸纖維玻片測發芽率。由於孢子發芽並不代表可以順利感染寄主葉片而繁殖，故另需將各保存處理的孢子進行感染繁殖的測試，取同瓶甜瓜葉條狀片上的分生孢子沾抹於前述方法之葉圓片上，

每個葉圓片約可沾有該葉條片上 500–1000 個分生孢子，測試是否可生長產生菌落，每個處理 4 重複，相同試驗重複進行一次。

## 結果

#### 甜瓜白粉病菌菌株之純化與培養

以夾於竹筷的毛髮為工具，較金屬挑針較易挑取單一孢子進行菌株純化培養，將單一孢子置於葉圓片上培養，但並非每一單孢皆能長出菌落，數次的單孢培養過程中，若直接挑取田間甜瓜葉片上的白粉病菌分生孢子，每塊試驗田之葉片取樣可長出菌落的比率為 0–15%，但先培養於葉圓片再挑單孢培養則每塊試驗田之葉片取樣可長出菌落的比率為 20–50%。

#### 溫度與培養時間對白粉病菌培養於葉圓片之孢子數量與活力之影響

由表 1 數據顯示，最適合甜瓜白粉病菌分生孢子繁殖之溫度為 20–24°C，8 及 32°C 於試驗過程中皆未見產生孢子。以孢子吹落法將白粉病菌分生孢子繁殖在葉圓片上，在 20 或 24°C 溫度環境中，9 天後即獲得大量分生孢子 (可吹落之分生孢子)，分別為  $1.9 \times 10^3$  或  $7.1 \times 10^3$  conidia/leaf disc，14–16 天後孢子量即達到高點，分別約為  $4.4 \times 10^4$ – $4.5 \times 10^4$  或  $5.3 \times 10^4$ – $6.8 \times 10^4$  conidia/leaf disc，而發芽率以培養 14 天最高，分別為 33.0 或 42.3%，爾後孢子量不再增加，甚至孢子黏於褐化崩腐之葉圓片不易吹落，孢子發芽率則持續降低，於 26 天後，發芽率分別為 8.0 及 0.0%。16°C 環境則於第 9 天產生可吹落的分生孢子，16–19 天孢子量最多 ( $3.2 \times 10^4$ – $3.5 \times 10^4$  conidia/leaf disc) 且發芽率達 22.5–35.0%，26 天後發芽率仍有 10.3%。28°C 環境下亦於 9 天後開始有可吹落之孢子，孢子量或發芽率最高為培養 14 天之  $1.1 \times 10^4$  conidia/leaf disc 或 21.3%。12°C 遲至 16 天產孢，而孢子量亦

表 1. 溫度及培養時間對甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 於甜瓜葉圓片繁殖之分生孢子量及孢子活力之影響  
**Table 1.** Effect of temperature and culture period on sporulation and vitality of conidia of *Podosphaera xanthii* cultivated on leaf disks of muskmelon

Incubation time (d)	Conidia/leaf disc <sup>z</sup> (Germination rate %) <sup>y</sup>						
	Temperature (°C)						
	8	12	16	20	24	28	32
3	0 (ND)	0 d <sup>x</sup> (ND)	0 c (ND)	0 e (ND)	0 f (ND)	0 c (ND)	0 (ND)
6	0 (ND)	0 d (ND)	0 c (ND)	0 e (ND)	480 f (ND)	0 c (ND)	0 (ND)
9	0 (ND)	0 d (ND)	280 c (ND)	1880 de (10.2 d)	7140 ef (34.8 a)	5230 b (12.0 b)	0 (ND)
12	0 (ND)	0 d (ND)	2260 c (8.5 d)	8940 cd (16.8 bcd)	16640 d (41.0 a)	6895 ab (15.8 ab)	0 (ND)
14	0 (ND)	0 d (ND)	10140 b (32.5 a)	44620 a (33.0 a)	53300 b (42.3 a)	10985 a (21.3 a)	0 (ND)
16	0 (ND)	160 cd(ND)	31880 a (33.5 a)	45000 a (25.5 ab)	68000 a (24.8 b)	10415 a (17.8 a)	0 (ND)
19	0 (ND)	540 c (ND)	35000 a (22.5 b)	46760 a (21.3 bc)	53940 b (15.3 c)	7615 ab (15.8 ab)	0 (ND)
22	0 (ND)	2260 b (12.5 a)	28100 a (18.3 bc)	31200 b (14.0 cd)	38135 c (4.7 d)	4435 b (3.0 c)	0 (ND)
26	0 (ND)	2850 a (11.0 a)	13750 b (10.3 cd)	16050 c (8.0 d)	13350 de (0.0 d)	3670 bc (0.0 c)	0 (ND)

<sup>z</sup> The mean value of conidia number of one leaf disc.

<sup>y</sup> The germination rates on acetate-cellulose glass slide were examined after 48 h at 24°C.

<sup>x</sup> Means followed by the same letters within each column are not significantly different at  $p < 0.05$  according to the LSD Test.

不多，僅於培養 22–26 天之處理中產生  $2.3 \times 10^3$ – $2.9 \times 10^3$  conidia/leaf disc，發芽率最高僅 12.5%。將於 16、20、24 及 28°C 培養 14 及 22 天的分生孢子接種於盒栽離葉上（接種量皆為  $(10 \pm 1)$  conidia/cm<sup>2</sup>），發現 20、24 及 28°C 培養 22 天之孢子較 14 天之孢子發芽率低且造成病害輕，而 16°C 培養 22 天之孢子較 14 天之孢子發芽率低但發病度無顯著差異（表 2）。

#### 甜瓜接種白粉病菌菌株之方法比較

以直接吹落分生孢子方式獲得之接種源與噴佈分生孢子懸浮液比較，分生孢子發芽率分別為 42.0 與 23.3%，而分別接種於盒栽離葉之發病度為 70.5 及 44.5%，均有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

#### 乾燥與溫度對保存甜瓜白粉病菌菌株之影響

表 3 的結果顯示，新鮮的甜瓜白粉病菌分生孢子的發芽率為 36.7%，而乾燥後則僅為

4.5%，在常溫（24°C）的環境下，以葉圓片所培養的甜瓜白粉病菌孢子無論新鮮或經過乾燥處理，7 天後雖發芽率低（0.3–1.3%），但將該處理之分生孢子沾於新鮮葉圓片（500–1000 conidia/leaf disc）可順利感染而繁殖，然而第 14 天皆失去活力，無法發芽，也無法感染、繁殖於新鮮葉圓片，而 4°C 處理分生孢子之活力則可延長至 30 天；在 -30°C 或液態氮中的低溫下，新鮮孢子均無法存活，然而乾燥後的孢子持續保存 180 天後，部分孢子仍有活力，可再感染新鮮葉圓片。

## 討 論

建立純化接種源的製備體系，最方便的方法即是選取白粉病單一菌落，挑取該菌落之孢子於新鮮葉片上培養（single-colony culture）以純化菌株（Moseman *et al.* 1965; O'Brien *et al.* 1988; Huang *et al.* 1995），亦有學者利用挑取單一孢子串培養（single-conidial-chain culture）

表 2. 以葉圓片於不同溫度及培養時間下所繁殖之甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 分生孢子對接種於甜瓜盒栽離葉白粉病之影響

Table 2. Effect of incubation period and temperature on conidia germination and pathogenicity of *Podosphaera xanthii* harvested from leaf disks of muskmelon

Culture days	Conidia germination % <sup>z</sup> (Disease severity % on detached leaves) <sup>y</sup>			
	Conidia culture temperature (°C)			
	16	20	24	28
14	32.5 a <sup>x</sup> (73.0 a)	33.5 a (81.7 a)	42.3 a (83.3 a)	21.3 a (31.3 a)
22	18.3 b (68.3 a)	14.0 b (25.0 b)	4.7 b (15.0 b)	3.0 b (2.3 b)

<sup>z</sup> The germination rates on acetate-cellulose glass slide were examined after 48 h at 24°C.

<sup>y</sup> The disease severity on detached leaves was calculated 12 days after inoculating with surveyed on detached leaves which inoculated with approximate 10 conidia/cm<sup>2</sup> of *Podosphaera xanthii*. The ratio of patch area on the detached leaves caused by the pathogen were surveyed as the disease severity.

<sup>x</sup> Means followed by the same letters within each column are not significantly different at  $p < 0.05$  according to the LSD Test.

表 3. 保存溫度、時間及保存時的孢子乾濕狀態對孢子活力之影響

Table 3. Effect of sources of conidia, storage temperature, and storage period on viability of conidia of *Podosphaera xanthii*

Storage condition	Source of conidia	Conidia germination rate (%) <sup>z</sup>					
		Storage period (d)					
		0	7	14	30	60	180
24°C	Fresh	36.7 a <sup>y</sup>	1.3 bc	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
	Dry	4.5 b	0.3 c	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
4°C	Fresh	-	8.7 a	4.7 a	3.7 a	0.0 b	0.0 c
	Dry	-	0.7 c	1.7 c	0.3 c	0.0 b	0.0 c
-30°C	Fresh	-	0.0 c	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
	Dry	-	2.7 b	2.6 b	1.7 b	3.0 a	2.0 b
N <sub>2</sub> (L)	Fresh	-	0.0 c	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
	Dry	-	2.7 b	2.1 bc	2.3 b	2.7 a	3.0 a

<sup>z</sup> The germination rates on acetate-cellulose glass slide were examined after 48 h at 24°C.

<sup>y</sup> Means followed by the same letters within each column are not significantly different at  $p < 0.05$  according to the LSD Test.

來達到菌系純化的目的 (Smith 1970; Evans *et al.* 1996); 連續數次的單一菌落分離雖可達到菌株純化的效果, 但仍未能如單一孢子培養 (single-spore culture) 進行純化菌株較佳 (Bertrand 1991; Huang & Wang 2007; Nicot *et al.* 2002)。本研究在蒐集田間甜瓜白粉病菌菌株時, 直接取回病葉於顯微鏡下挑取單孢培養於葉圓片上, 有時無法培養出菌落, 推測其原因可能為直接從田間葉片所挑取之白粉

菌單孢活力已喪失, 或極易摻雜其他微生物而不易純化培養; 若先將田間甜瓜白粉病菌孢子塗抹培養於葉圓片上, 待長出新的分生孢子後, 再挑單孢培養, 則較容易獲得菌落, 然而所使用之葉圓片應對所有 *Podosphaera xanthii* 生理小種皆感病之品種, 如 IRAN-H, 或較無抗病性的甜瓜子葉 (Bertrand 1991), 才能避免漏失田間確實存在的生理小種。

本研究發現不同溫度及不同培養時間的條件下，甜瓜白粉病菌分生孢子的產量與發芽率有所不同，16–24°C 為繁殖分生孢子的最適溫度，最高可繁殖  $6.8 \times 10^4$  conidia/leaf disc 可吹落接種之分生孢子量 (表 1)，若培養天數超過 22 天孢子易黏著於褐化崩腐之葉圓片上而不易吹落，且發芽率降低，不易感染葉片造成病斑 (表 2)，這些失去活力的孢子相信與其年齡有關 (Nicot *et al.* 2002)，故試驗所使用的甜瓜白粉病菌分生孢子應予以固定其繁殖條件，本研究於 20–24°C 培養 14–16 天或 16°C 培養 16–19 天可獲得大量發芽率高之分生孢子 ( $3.2 \times 10^4$ – $6.8 \times 10^4$  conidia/leaf disc，發芽率 22.5–42.3%)，為爾後試驗的接種源來源 (表 1)。有報告指出 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* 與 *Golovinomyces cichoracearum* 年齡 1 日的分生孢子發芽率可達 80%，若混雜生長 5–8 日的分生孢子則發芽率降為 18–68% (Sommers & Horsfall 1966)，顯示新鮮的分生孢子發芽率較高，而本試驗所測試的甜瓜白粉菌為培養數日的孢子，如 24°C 培養 14 天之分生孢子為第 9–14 天產生分生孢子的集合，孢子發芽率可能較低。

以乾孢子吹佈於寄主表面為最貼近自然感染的接種方法，於錐形塔物頂端散佈分生孢子較能使接種源均勻散佈 (Bertrand & Pitrat 1989; Epinat *et al.* 1993)，但不易事先精準預估接種量 (Epinat *et al.* 1993)，即使很小的估算也會有少許的誤差 (Huang *et al.* 2006)。故有學者以孢子懸浮液來接種 (Bohn & Whitaker 1964; Reeser *et al.* 1983)，不過本研究與文獻顯示水會降低甜瓜白粉病菌之孢子發芽率及病勢發展 (Sivapalan 1993; Yarwood 1978)，故筆者認為孢子懸浮液不適合用於甜瓜白粉病菌的接種。

白粉病菌的分生孢子或菌絲在無活寄主組織的條件下不易存活，故一旦分生孢子脫

離活寄主不久後即失去活力，本研究的結果顯示，分生孢子保存於密封的安瓶內，在 24 或 4°C 的環境下，分生孢子的活力僅能分別維持 7 或 30 天左右，且以未經乾燥的分生孢子較易再繁殖，然而要長期保存則需於低溫下，即使無抗凍劑的保護，貯於密封安瓶內之乾燥分生孢子於 -30°C 或液態氮中 (-196°C)，於 180 天後仍具有活力，但未乾燥之分生孢子則無法於 -30°C 或液態氮中保存 (表 3)。許多學者也以低溫 (-70°C) 或液態氮來保存白粉病菌 (Dahmen *et al.* 1983; O'Brien & Wienert 1994; Stummer *et al.* 1999)，筆者亦有保存超過 2 年之甜瓜白粉病菌菌株仍具可再繁殖的活力，故乾燥的甜瓜白粉病菌可貯放於密封的安瓶內而長期保存於液態氮中，雖然發芽率均低於 3%，但取出 500–1000 個分生孢子沾於葉圓片上，均能順利繁殖。

### 引用文獻 (Literature cited)

- Alvarez, J. M., M. L. Gomez-Guillamon, N. A. Tores, I. Canovas, and E. Floris. 2000. Virulence differences between two Spanish isolates of *Sphaerotheca fuliginea* race 2 on melon. *Acta Hort.* 510:67–69.
- 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.
- Bertrand, F. 1991. Les Oidiums des Cucurbitacees: Maintien en Culture Pure, Etude de Leur Variabilite et de la Sensibilite Chez le Melon. Ph. D. thesis. University of Paris XI. Rrsay, France. 259 pp. (in French with English abstract)
- Bertrand, F. and M. Pitrat. 1989. Screening of a muskmelon germplasm for susceptibility to 5 pathotypes of powdery mildew. p.140–142. *in*: Cucurbitaceae 89: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm. (Thomas, C. E., ed.) Dep. Agric., Agric. Res. Serv., Charleston S. C., France.
- Bohn, G. W. and T. W. Whitaker. 1964. Genetics of resistance to powdery mildew race 2 in muskmelon. *Phytopathology* 54:587–591.

- Cohen, R. 1993. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. *Plant Dis.* 77:513–517.
- Cohen, R., N. Katzir, S. Schreiber, R. Greenberg, and O. Yarden. 1996. Occurrence of *Sphaerotheca fuliginea* race 3 on cucurbits in Israel. *Plant Dis.* 80:344.
- Dahmen, H., T. Staub., and F. J. Schwinn. 1983. Tehcnique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology* 73: 41–246.
- Epinet, C., M. Pitrat, and F. Bertrand. 1993. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildew. *Euphytica* 65:135–144.
- Evans, K. J., D. L. Whisson, and E. S. Scott. 1996. An experimental system for characterizing isolates of *Uncinula necator*. *Mycol. Res.* 100:675–680.
- Hosaya, K., K. Narisawa, M. Pitrat, and H. Ezura. 1999. Race identification in powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo*) in Japan. *Plant Breed.* 118:259–262.
- Huang, J. H. and Y. H. Wang. 2007. The races of *Podosphaera xanthii* caused melon powdery mildew in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 56: 307–315. (in Chinese with English abstract)
- Huang, J. H., C. T. Lo, and T. F. Hsieh. 2006. Disease assessment of powdery mildew on melon with cultured leaf method. *J. Taiwan Agric. Res.* 55: 91–100. (in Chinese with English abstract)
- Huang, J. H., Y. H. Wang, and C. T. Lo. 2002. Development of leaf-disk method for screening melon varieties resistant to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. *J. Agric. Res. China* 51:49–56. (in Chinese with English abstract)
- Huang, J., J. Kranz, and H. G. Welz. 1995. Selection of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in pure culture and mixed strands of spring barley. *Plant Pathol.* 43: 458–470.
- Moseman, J. G., R. C. F. Macer, and L. W. Greeley. 1965. Genetic studies with cultures of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* virulent on *Hordeum spontaneum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 48:479–489.
- Nicot, P. C., M. Bardin, and A. J. Dik. 2002. Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolations, production and delivery of inoculum, and disease assessment. p.83–99. *in: The Powdery Mildews- A Comprehensive Treatise.* (Belanger, R. R. *et al.* ed.) APS Press.
- O'Brien, R. G. and M. Wienert. 1994. A storage technique for cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*). *Aust. Plant Pathol.* 23:86–87.
- O'Brien, R. G., L. L. Vawdrey, and J. L. Glass. 1988. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) and its effect on field control. *Aust. J. Exp. Agric.* 28:417–423.
- Pitrat, M., C. Dogimont, and M. Bardin. 1998. Resistance to fungal diseases of foliage in melon. *Cucurbitaceae* 98:167–173.
- Reeser, P. W., D. J. Hagedorn, and D. I. Rouse. 1983. Quantitative inoculations with *Erysiphe pisi* to assess variation of infection efficiency on peas. *Phytopathology* 73:1238–1240.
- Sivapalan, A. 1993. Effects of water on germination of powdery mildew conidia. *Mycol. Res.* 97:71–76.
- Smith, C. G. 1970. Production of powdery mildew cleistocarps in a controlled environment. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:355–365.
- Sommers, E. and J. G. Horsfall. 1966. The water content of powdery mildew conidia. *Phytopathology* 56:1031–1035.
- Stummer, B. E., T. Zanker, and E. S. Scott. 1999. Cryopreservation of air-dried conidia of *Uncinula necator*. *Aust. Plant Pathol.* 28:82–84.
- Tsay, J. G. and B. K. Tung. 1994. Powdery mildew of cucurbit crops. p.135–146. *in the Proceeding of Symposium on Techniques of Cucurbits Protection.* Plant Protection Society of the Republic of China. Taichung, Taiwan, ROC. (in Chinese with English abstract)
- Yarwood, C. E. 1978. Water stimulates *Sphaerotheca*. *Mycologia* 70:1035–1039.
- Zitter, T. A., D. L. Hopkins, and C. E. Thomas. 1996. *Compendium of Cucurbit Disease.* APS. USA. 87 pp.

## Propagation, Inoculation and Preservation of *Podosphaera xanthii* Caused Muskmelon Powdery Mildew<sup>1</sup>

Jin-Hsing Huang<sup>2,3</sup>, Chun-Wei Chen<sup>2</sup>, and Junn-Feng Su<sup>2</sup>

### Abstract

Huang, J. H., C. W. Chen, and J. F. Su. 2009. Propagation, inoculation and preservation of *Podosphaera xanthii* caused muskmelon powdery mildew. J. Taiwan Agric. Res. 58:176–184.

Single conidium of *Podosphaera xanthii*, causal agent of powdery mildew of muskmelon, were isolated from colonies on diseased leaves and cultured on the leaf disks of muskmelon for purification and production of conidia. The range of optimum temperature for production and germination of conidia of *P. xanthii* was 20 to 24°C. When conidia were inoculated on the leaf disks (1.5 cm in diam.) by the air-blow method and incubated at 20 or 24°C for 14–16 days, the fungus produced  $4.5 \times 10^4$ – $6.8 \times 10^4$  conidia/leaf disc with the germination rates of 24.8–42.3%. When the inoculated leaf disks were incubated at 16°C for 16–19 days, the number of conidia produced ( $3.2 \times 10^4$ – $3.5 \times 10^4$  conidia /leaf disc) and the rate of conidia germination (22.5–33.5%) were highest at the temperature. The conidia number and germination rate were low for the cultures incubated at 12 or 28°C. The cultures failed to produce conidia on the leaf disks incubated at 8 or 32°C for 14–16 days or longer. Inoculation of conidia of *P. xanthii* on leaf disks of muskmelon by the air-blow method was more effective than the spraying method using conidia suspensions. The germination rates and disease severity were 23.3% and 42.0%, respectively, for the inoculation method of conidia suspensions, compared with 44.5% and 70.5% for the inoculation of air-blow conidia. Fresh conidia remained viable for 7 days at 24°C and 30 days at 4°C but they were unable to survive by storing at -30°C or in liquid nitrogen. However, air-dried conidia stored at -30°C or in liquid nitrogen survived for at least 180 days.

**Key words:** Melon, *Podosphaera xanthii*, Powdery mildew, Propagation, Inoculation, Preservation.

---

1. Contribution No.2364 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: August 4, 2009.

2. Assistant Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.

3. Corresponding author, e-mail: jhhuang@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.