

葡萄銹病病菌夏孢子之發芽及侵入過程

呂理燾、吳宏國

臺灣植物保護中心植物病理組

(接受日期：民國 72 年 3 月 11 日)

摘 要

葡萄銹病病菌於 16~30°C 定溫箱內接種摘葉 5~6 天後即表現病徵，12°C 時則需 15~20 天。光線、溫度及濕度為影響本菌夏孢子發芽之重要因子。光線會抑制本菌夏孢子之發芽，強度在 200 呎燭光及較強光照射下，經 6 小時仍未發芽，但在 100 呎燭光及較弱光下則可正常發芽；綠光及其它波長較短的可見光會抑制夏孢子發芽，黃光及其它波長較長的可見光下則可正常發芽，而以黑暗下發芽情形最好。夏孢子在 24°C 及高濕、無光照之定溫箱內 2 小時即可發芽，6 小時後之發芽率達 69%，24 小時後則達 86%，發芽溫度範圍為 8—32°C，而以 24°C 為最適溫。相對濕度在 75.3% 以上時發芽良好，53.8—11.0% 時仍可發芽，但發芽率較低且發芽管較短，相對濕度為 0% 或在自由水中則無法發芽。多數夏孢子於接種後 12 小時內已發芽並經由氣孔侵入，爾後菌體在葉片組織內吸取養份並擴展為其營養期，6 天後即有小泡 (Pustule) 形成，並在其內產生夏孢子堆 (Uredium) 為本菌之繁殖期，病菌藉此傳播並行二次感染。

(關鍵字：葡萄銹病、夏孢子發芽、氣孔感染、侵入過程、光線抑制、*Phakopsora ampelopsidis*)

ABSTRACT

Leu, L. S. and H. G. Wu 1983. Uredospore germination, infection and colonization of grape rust fungus, *Phakopsora ampelopsidis*. Plant Prot. Bull. (Taiwan, R.O.C.) 25: 167~175

(Plant Pathology Division, Plant Protection Center, Taiwan. Wufeng, Taichung, Taiwan 431, R. O. C.)

The incubation period of grape rust on the detached leaves was 5-6 days at 16—30°C and 15-20 days at 12°C. Light inhibited uredospore germination. Uredospore did not germinate within 6 hr at 24°C under 200 foot-candle of light intensity and above, while at 100 foot-candle and less intensity uredospore did germinate. Darkness favored uredospore germination up to 85.3%. Green light and shorter visible wavelength light significantly inhibited uredospore germination, while yellow light and longer visible wavelength light did less.

Uredospore initiated to germinate 2 hr after incubation at 24°C under high moisture and darkness. Germination percentage was 0, 14.8, 68.9, and 85.9% after incubation for 1, 2, 6 and 24 hr, respectively. Cardinal temperature for uredospore germination was 8-24-32°C. Uredospores germinated well when relative humidity was 75.3% and above, but it declined at 53.8-11.0% and did not germinate at 0% or in free water. Infection peg penetrated through the stomatal aperture 12 hr after inoculation and colonized the leaf tissue within 0.5-5 days. Finally, uredia were initiated 6-7 days after inoculation.

(Key words: grape rust, *Phakopsora ampelopsidis*, uredospore germination, stomatal infection, infection path, light inhibition)

Research paper No.39. Plant Pathology Division, Plant Protection Center, Taiwan.

緒 言

葡萄銹病由 *Phakopsora ampelopsidis* Diet et Syd. 所引起。本病危害葡萄葉片，影響光合作用進行，受害輕微時，在葉下表皮產生大小約 1mm 橙黃色的散生夏孢子堆。嚴重危害時，受害葉片提早落葉，而使果粒着色不良，糖度降低，且往往於次年產生新梢及節間縮短現象⁽⁷⁾，因而植株衰弱，影響品質至鉅。

光線對銹病菌夏孢子發芽有不同之反應，一些銹病菌夏孢子發芽會受到光線抑制者，前人已有報導⁽⁸⁾，但光線對 *Puccinia striiformis* 反而有促進之作用⁽⁶⁾，至於光線是否會影響葡萄銹病菌夏孢子發芽則未見任何報導。

Shear 氏⁽⁷⁾認為不同葡萄品種對銹病菌有不同程度的抗病性。田間觀察本省主要栽培品種：巨峰、金香及意大利均相當感病，若無法減少本病之危害，將影響本省葡萄之品質，因此除了抗病品種之育成及有效化學藥劑之推出外，針對本病發病生態條件之了解，將可更有效控制本病之蔓延。本研究之目的在探討影響夏孢子發芽之因子及其侵入、感染過程。

材 料 與 方 法

人工接種：本試驗供試葡萄品種為巨峰，接種及發芽試驗供試之夏孢子源均採自田間新鮮之病葉，以稍濕潤的毛筆沾取夏孢子，輕輕而均勻塗抹分別接種於溫室健株及摘葉之葉下表皮，並將接種後的摘葉置於襯以濕潤的濾紙

培養皿中，分置於 4-36°C 無光照的定溫箱中。另以採自同一枝條上不同成熟度的葉片，於 Nachet 解剖顯微鏡 128× 觀察葉下表皮氣孔着生情形，取該葉片接種後置於 24°C 定溫箱中，爾後定期觀察病徵發展情形並記錄之。

影響夏孢子發芽之因子：本研究以光線、溫度及濕度探討其對本菌夏孢子發芽之影響，進行本試驗時皆以毛筆將夏孢子均勻塗抹於 2% 水瓊脂 (2% W.A.) 平板上，定時取出觀察並以溶有 Cotton blue 的 Lactophenol 液固定之。

A. 光線：將塗有夏孢子的 2%WA 平板分別以同一質料之紅、黃、綠、藍、白色透明五種不同顏色玻璃紙及鋁箔紙分別包裹，置於 24°C 定溫箱高濕處理下，400 呎燭光 (Foot candle) 光強度下照射 (光源為 GENERAL ELECTRIC F20 T12 CW COOL WHITE, 20WATT) 3 及 6 小時後固定，並計算其發芽率。各式玻璃紙及鋁箔紙均以 JASCO UNIDEC-1 Digital Double-Beam Spectrophotometer 在 400-700nm 可見光波長範圍內掃描，測其在不同波長下之吸收度 (Absorbance)，並以 JASCO RC-200 Desktop Recorder 自動記錄其吸收光譜。以同一光源，用 LIM 2300 Light Intensity Meter 測定 400, 200, 100 及 0⁺ (0⁺ 表示該儀器無法偵測者) 呎燭光之不同光強度，期能了解不同光強度對夏孢子發芽之影響。

B. 溫度：取塗有夏孢子之 2%WA 培養

皿蓋上襯以濕潤濾紙保持濕度，分置各無光照之定溫箱中，經 24 小時後取出固定，計算夏孢子發芽率。並以夏孢子發芽最適溫度，測該溫度下不同時間發芽率及其發芽管長度。

C. 濕度：於室溫下預先配製下列不同相對濕度 (Relative humidity 簡稱 RH) 之鹽類飽和溶液^(8,9)：H₂O (RH=100%)，K₂SO₄ (96.9%)，KNO₃ (92.0%)，(NH₄)₂SO₄ (80.3%)，NaCl (75.3%)，Na₂Cr₂O₇·2H₂O (53.8%)，MgCl₂·6H₂O (33.0%)，LiCl (11.0%) 及 Silica gel (0%)。塗有夏孢子稍經乾燥的 2% WA，置於上述各不同相對濕度之鹽類飽和溶液濕室中 (容器為 250 ml 燒杯)，放置 25°C 無光照定溫箱中 6 小時後取出固定並計算其發芽率。

病菌侵入過程：取接種後的葉子，定期採樣，以 McBryde 法⁽⁵⁾ 經一系列透化、染色、脫色、一次對照染色 (以 2% Bismarck brown 溶於 70% 酒精為對照染色液)，脫水及二次對照染色 (以 8% Picric acid 溶於 Wintergreen oil 為二次對照染色液) 過程，再以加拿大膠 (Canada balsam) 封片後即可觀察。

結 果

人工接種：在溫室中，健葉接種 5-6 天後，葉下表皮出現不很明顯的水浸狀斑點，但仍未產孢，第 7 天可見明顯的橙黃色大小約 1 mm 之夏孢子堆 (Uredium)，夏孢子堆相對的葉上表皮處有時出現大小約 1-2 mm 褐色壞死斑點。於無光照的定溫箱內摘葉接種得知 12-30°C 範圍內皆可發病，而以 24°C 為最適溫，一般言之，於 16-30°C 定溫箱內接種後 5-6 天即可表現病徵，但 12°C 下則需 15-20 天，且摘葉接種所表現之病徵於葉上表皮不產生褐色壞死斑點。以同一枝條不同成熟度葉片接種結果顯示於未具氣孔分化的幼葉無法發病，一旦氣孔開始分化，則本菌即可侵入為害 (表一)。

影響夏孢子發芽之因子：

A. 光線：以光譜分析儀測定不同顏色玻璃紙吸收光譜，顯示各式色紙有其一定吸收範圍。夏孢子於不同色紙透光下經 3 小時皆未發芽，但以鋁箔紙行暗處理者該時發芽率為 22%；以鋁箔紙、紅色及黃色色紙處理後 6 小時其發芽率分別為 43.4，21.5 及 6.5%，但以綠、

表一、同一枝條不同成熟度葉片接種葡萄銹病結果。

Table 1: Susceptibility of grape leaves with different maturity on the same shoot inoculated with uredospores of *Phakopsora ampelopsidis*

Item	Shoots and leaves ^{a)}															
	A				B				C				D			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Stomata ^{b)}	-	±	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	±	+	+	+
Symptoms ^{c)}	N	S	S	S	N	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S

a) A~D represent different grape shoots.

1~4 represent different position of the leaves on the same shoot.

Leaf 1: the youngest, Leaf 2~3: the intermediate

Leaf 4: the elder.

b) Stomata: “-” no stomata observed, “±” stomata developed in the initial stage, “+” stomata well developed.

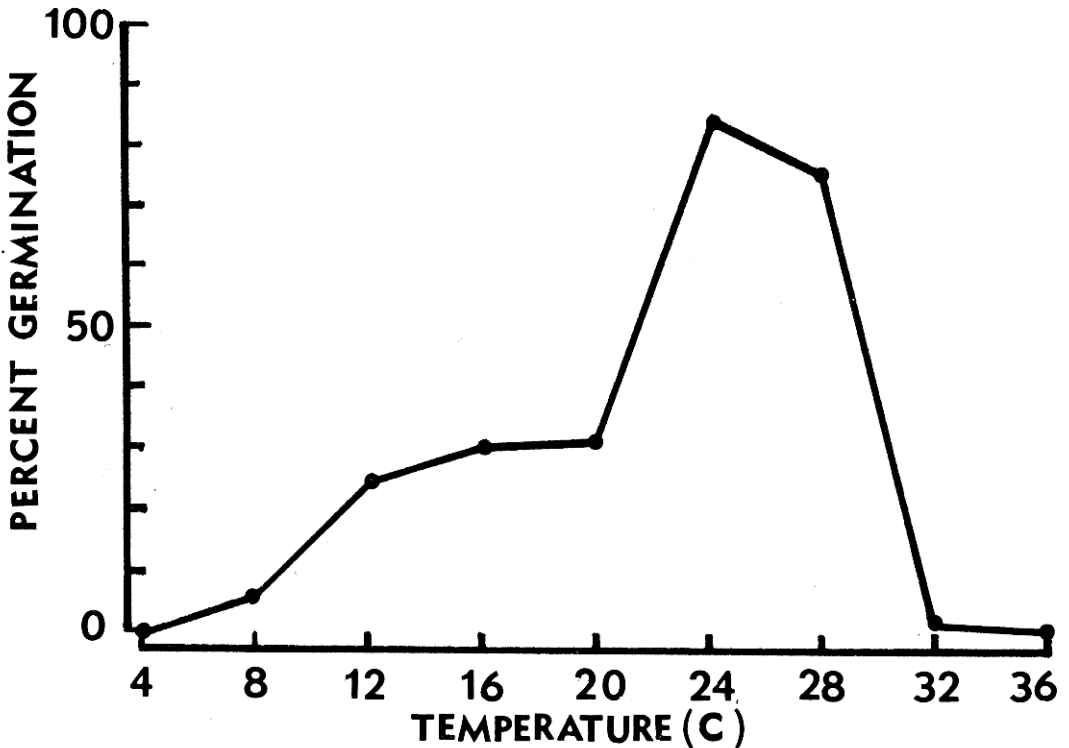
c) “N” no symptoms observed 7 days after inoculation.

“S”: symptoms observed 7 days after inoculation.

表二、不同顏色色紙的可見光吸收(透過)光譜及其對夏孢子發芽之影響。

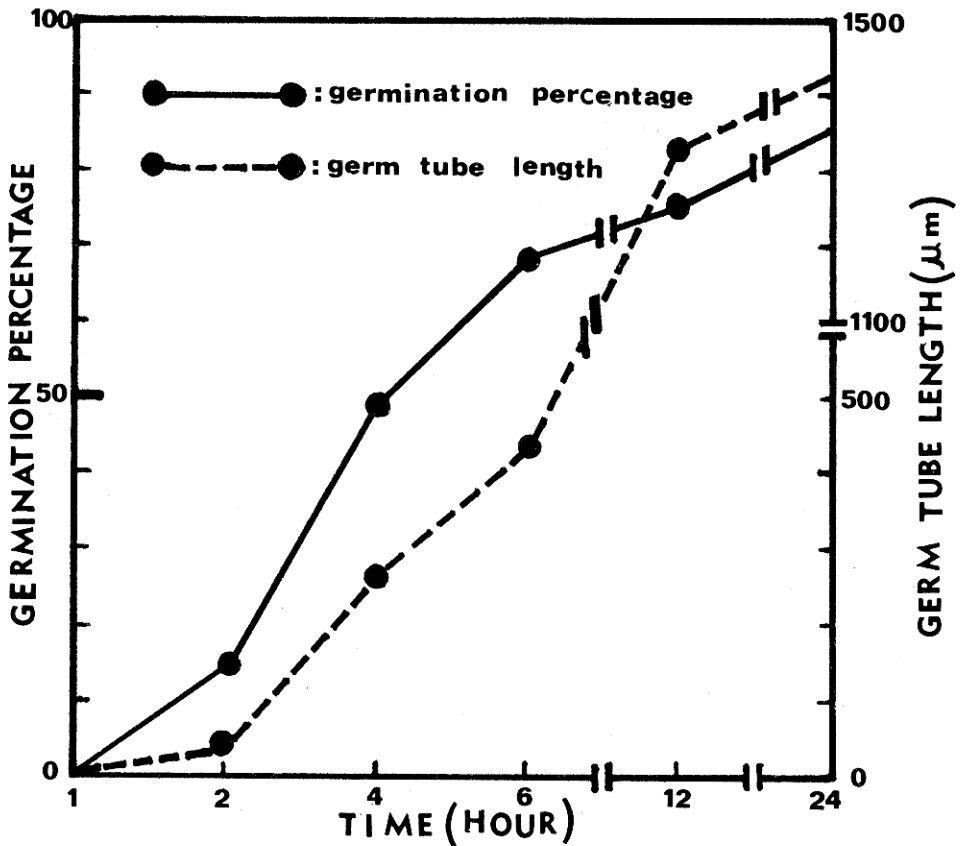
Table 2. Visible light absorbant (transmittant) spectrum of different cellophane-color-paper and its effect on uredospore germination of *Phakopsora ampelopsidis*

	Cellophane-color-paper					
	red	yellow	green	blue	white (transparent)	dark (aluminum foil)
Transmittant range (nm)	585-700	460-700	470-600	400-540	400-700	—
Absorbant range (nm)	400-585	400-460	400-470 600-680	540-700	—	400-700
Germination percentage (3hr)	0	0	0	0	0	22.0
Germination percentage (6hr)	21.5	6.5	0	0	0	43.4



圖一、不同溫度對葡萄銹病菌夏孢子發芽之影響 (24 小時)

Fig. 1. Effect of temperature on uredospore germination of *Phakopsora ampelopsidis* (24 hr.)



圖二、不同時間內葡萄銹病菌夏孢子發芽率及發芽管長度 (24°C)

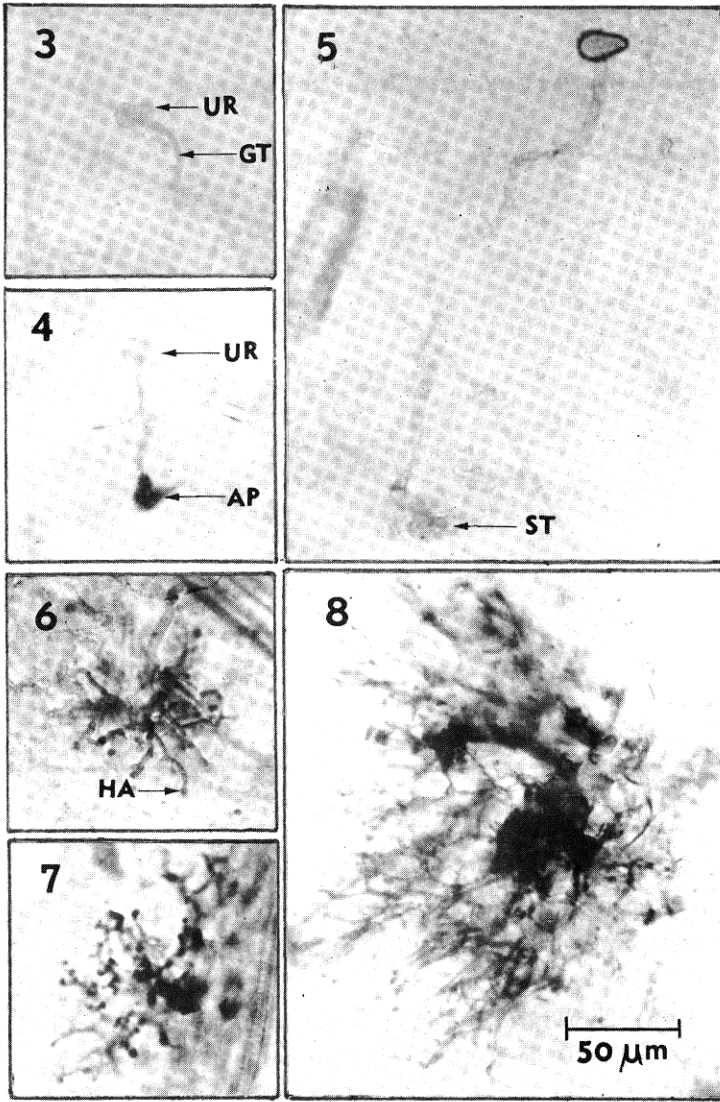
Fig. 2. Uredospore germination percentage and germ tube length of *Phakopsora ampelopsidis* within 24 hr. (24°C)

藍及白色透明色紙處理後 6 小時仍無法發芽 (表二)。同時於 400, 200, 100, 0+ 呎燭光不同光強度及鉛箔紙暗處理經 6 小時, 其發芽率分別為 0, 0, 3.2, 19.7 及 39.7%, 此結果顯示本菌夏孢子在 200 呎燭光及更強光照處理下經 6 小時仍未能發芽, 但在 100 呎燭光及以下則隨著光強度轉弱而發芽率相對提高。光處理 6 小時後仍未發芽之夏孢子置於 24°C 無光照之定溫箱中, 經 2-3 小時則仍可恢復正常發芽。

B. 溫度: 夏孢子於高濕、無光照下 24 小時後取出觀察結果 8-32°C 均可發芽(圖一), 而以 24°C 為最適溫, 且其發芽管亦最長。於 24°C 測定 1, 2, 4, 6, 12 及 24 小時後發芽率及其發芽管長度(圖二), 結果顯示本菌於適合條件下經 2 小時即可由夏孢子赤道帶 (Equa-

torial belt) 預先形成之發芽孔 (Pre-formed germ pore) 處伸出寬約 6-8 μm 顏色較深的發芽管, 並於 4 小時後有約半數夏孢子發芽。

C. 濕度: 夏孢子於不同相對濕度之鹽類飽和溶液濕室中經 6 小時結果以 H₂O (RH=100%), K₂SO₄ (96.9%), ·KNO₃ (92.0% 及 NaCl (75.3%) 發芽情形最好, 其發芽率依序為 45.0, 35.7, 33.7 及 43.3%; Na₂Cr₂O₇ ·2H₂O (53.8%), MgCl₂ ·6H₂O (33.0%) 及 LiCl (11.0%) 則發芽情形較差且發芽管亦較短, 其發芽率依序為 29.3, 16.0 及 10.0%; 而 Silica gel (0%) 則皆不發芽, 且有原生質分離現象 (Plasmolysis), 至於 (NH₄)₂SO₄ (80.3%) 其發芽率為 4.0% 則偏低。另以夏孢子懸浮液進行發芽試驗, 結果顯示本菌在自



圖三~十、葡萄銹病菌夏孢子之侵入感染過程。

Figs. 3~10. Penetration and infection process of grape rust uredospore, *Phakopsora ampelopsidis*.

圖三、接種後3小時夏孢子 (UR) 抽出發芽管 (GT)。

Fig. 3. Germ tube (GT) protruded from the uredospore (UR) 3hr. after inoculation.

圖四、接種後6小時可見附着器 (AP) 形成。

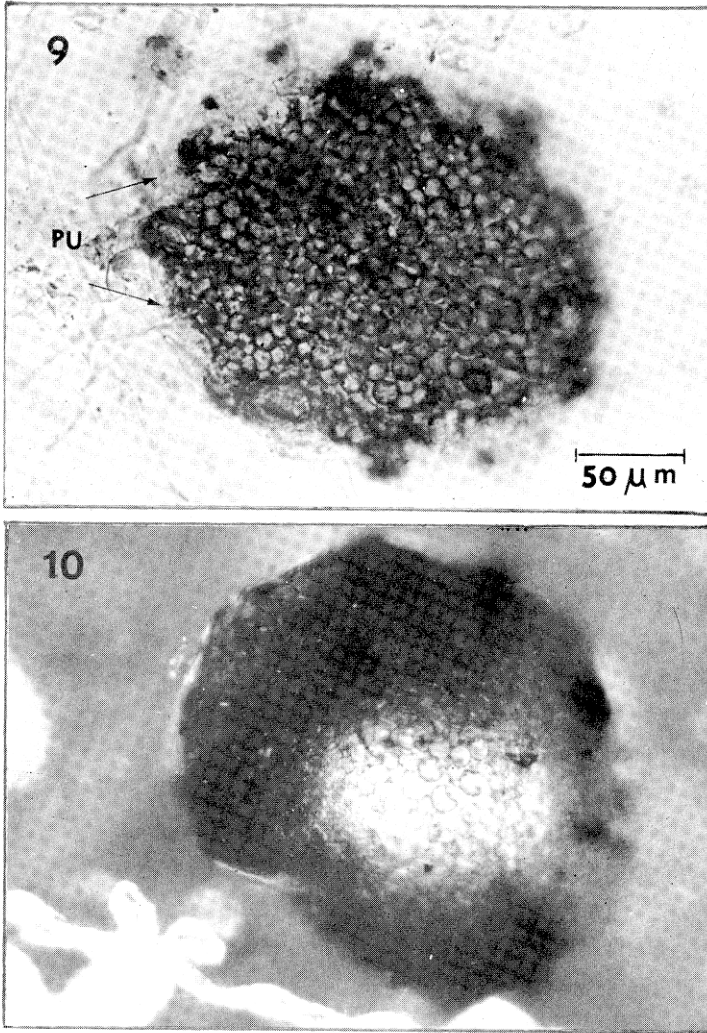
Fig. 4. Appressorium (AP) was observed 6hr. after inoculation.

圖五、發芽管於接種後12小時自氣孔 (ST) 侵入。

Fig. 5. Germ tube penetrated through the stoma (ST) opening 12hr. after inoculation.

圖六~八、侵入後於葉片組織內擴展菌落化並以吸器 (HA) 吸取養分。

Figs. 6~8. The rust fungus colonized the leaf tissues and absorbed nutrients by the haustoria (HA).



圖九、接種 5 天後於葉片組織內產生小疱 (PU)。

Fig. 9. Pustule (PU) formed in the leaf tissue 5 days after inoculation.

圖十、夏孢子堆於接種後 6—7 天形式。

Fig. 10. Uredium formed 6—7 days after inoculation.

由水中無法發芽。

病菌侵入過程：取接種後葉子，經 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 96, 120, 144 及 168 小時分別採樣，進行透化染色觀察，結果於接種後 3 小時即有一些夏孢子發芽 (圖三)；6 小時可發現有附着器 (Appressorium) 產生 (圖四)；12 小時發芽管自氣孔侵入 (圖五)；爾後菌絲逐漸在葉組織內擴展形成菌落化 (Colonization)；

3,4 及 5 天後菌落直徑依序為 50-80, 100-150 及 200-300 μm (圖六~八)，並可在菌絲尖端產生吸器 (Haustorium)；6 天後用肉眼仔細觀察即可觀察到周圍略帶水浸狀的小斑點，並未觀察到突起的夏孢子堆，但經透化鏡顯示此時已有小疱 (Pustule) 產生，內有未成熟的夏孢子 (圖九)，至 7 天時肉眼即可觀察到明顯的橙黃色微突起的夏孢子堆，此時夏孢子堆大小約在 300-400 μm 之間 (圖十)。

討 論

定溫箱內接種摘葉得知 12-30°C 範圍內皆可發病，以 24°C 為最適溫，28°C 次之。在本省中部葡萄栽培區，本病發生於六月上旬至翌年一月下旬落葉止，而以九~十一月發病最為猖獗，但在南部葡萄栽培區一直到十二月至一月間發病仍然相當嚴重，就發病溫度因素而言，田間發病情形與定溫箱內摘葉接種結果頗為一致。

本文首次報導光線會抑制葡萄銹病菌夏孢子發芽，光強度愈強，其抑制發芽之效果愈顯著。不同光質對本菌夏孢子發芽亦有不同之影響，綠光及其它波長較短的可見光處理後 6 小時仍未發芽，但經黃光及其它波長較長的可見光處理則可發芽，綜合言之，以波長較長（即能量較低）之光質處理夏孢子，其發芽率較不受影響，而以暗處理發芽最好。Givan 及 Bromfield⁽⁴⁾ 探討光線對 *Puccinia graminis* var. *tritici* 夏孢子發芽之影響，於 200 呎燭光下 2 小時內有短暫的抑制作用，但並非永久的或甚至不可恢復的抑制反應，此結果表示光線會降低夏孢子發芽的最初速率，但隨著時間的延長而使光照處理和暗處理的發芽率沒有差別，雖然至今沒有直接的生化證據說明為何光線對一些銹病菌夏孢子有抑制之作用，但據兩氏之推測可能與溫度、酵素及光化學反應有關。

葡萄銹病菌夏孢子發芽除了受光線影響外，溫度和濕度也是影響夏孢子發芽之重要因子，雖然 French 及 Wilson 氏⁽²⁾ 曾報導低濃度菸鹼 (Nicotine) 對一些銹病菌夏孢子發芽有促進作用，但本試驗結果得知葡萄銹病菌於高濕、無光照的 24°C 定溫箱內，不需外加特殊養分，發芽率仍可高達 85.8%。但本菌夏孢子在自由水中則無法發芽。至於 (NH₄)₂SO₄ 其飽和溶液相對濕度雖為 80.3%，但發芽率却偏低，是否有他種因素抑制本菌發芽，仍待詳細探討。

進行接種透化染色觀察得知本菌經氣孔開口侵入感染，和不同成熟度之葉片接種結果一致，在無氣孔分化之幼葉則無法侵入。多數夏孢子於接種後 12 小時內即可由氣孔侵入，並於

接種後 5 天內在葉肉組織內吸取養份，為本菌之營養期 (Vegetative stage)，至第 6 天即有小疱 (Pustule) 形成，為本菌之繁殖期 (Reproductive stage)，而後形成夏孢子堆，並大量產生夏孢子，而為第二次感染源。

Fennell 氏⁽¹⁾ 報導有些葉片終年殘存而未落葉，並可觀察到一年四季病葉上皆為夏孢子世代，並未發現本菌之冬孢子世代。由於本省葡萄栽培環境特殊，一年四季皆可生產葡萄，從 1981 年 8 月至 1983 年 4 月田間觀察並未發現本菌冬孢子世代，此與 Fennell 氏所述結果一致，是否本菌於本省只藉夏孢子越冬存活，而為翌年第一期葡萄作之第一次傳染源則仍待爾後繼續觀察。

引用文獻

1. Fennell, J. L. 1948. Inheritance studies with the tropical grape. J. Hered. 36: 54-64 (Rev. Appl. Mycol. 27:460, 1948).
2. French, R. C. and C. L. Wilson. 1980. Stimulation of uredospore germination and induction of vacuolation by nicotine and related compounds. Phytopathology 70:689 (Abstr.).
3. Givan, C. V. and K. R. Bromfield. 1964. Light inhibition of uredospore germination in *Puccinia recondita*. Phytopathology 54:116-117.
4. Givan, C. V. and K. R. Bromfield. 1964. Light inhibition of uredospore germination in *Puccinia graminis* var. *tritici*. Phytopathology 54:382-384.
5. McBryde, M. C. 1936. A method of demonstrating rust hyphae and haustoria in unsectioned leaf tissue. Amer. J. Bot. 23: 686-688.
6. McCracken, F. I. and J. R. Burleigh. 1962. Influence of light and temperature on in vitro germination of *Puccinia striiformis* uredospores. Phytopathology 52:742 (Abstr.).
7. Shear, C. L. 1924. Grape rust in

- Florida. *Phytopathology* 14:170-171.
8. Stokes, R. H. and R.A. Robinson. 1949. Standard solutions for humidity control at 25C. *Ind. Eng. Chem.* 41:2013.
9. Wexler, A. and S. Hosegawa. 1954. Relative humidity-temperature relationships of some saturated salt solutions in the temperatue range of 0° to 50°C. *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 53:19-26.