

# 豌豆葉枯病菌感染種莢及種子的過程與影響因子

陳美杏<sup>1</sup> 黃振文<sup>1</sup> 顏吉甫<sup>2</sup>

1. 台中市 國立中興大學植病系

2. 台中市 國立中興大學農藝系

接受日期：中華民國 83 年 9 月 26 日

## 摘 要

陳美杏、黃振文、顏吉甫，1994。豌豆葉枯病菌感染種莢及種子的過程與影響因子。植病會刊 3:133-139。

病理組織切片發現豌豆葉枯病菌 (*Mycosphaerella pinodes*) 的菌絲可經由豌豆種莢感染莢內的種子，進而穿過種皮細胞後，再侵入下皮層及薄壁細胞，並蔓延至子葉與胚的細胞。在田間，將 *M. pinodes* 的分生孢子懸浮液 ( $10^5$  孢子 / 毫升) 噴佈接種在豌豆幼莢外表，經 24 小時保濕，病原菌即可直接侵入種莢，隨後在第 14 天的時候，發現種莢內受感染的種子表皮即已出現褐色的病斑。種莢年齡、溫度和相對濕度等因子均可影響 *M. pinodes* 感染豌豆的種莢與種子。台中十一號與十三號兩豌豆品種之幼齡種莢遭受 *M. pinodes* 感染後，種莢內之種子的帶菌率遠較種莢後期遭感染者的比率高；溫度在 24 C 時，葉枯病菌感染豌豆種莢的罹病度最高，其次是 20 C，惟本菌在 12 C 以下和 32 C 以上均無法感染種莢；相對濕度在 75% 以上，隨著相對濕度的提高，*M. pinodes* 感染豌豆種莢的百分率也就越高。

關鍵詞：豌豆、豌豆葉枯病菌、病理組織切片、種子感染。

## 緒 言

豌豆 (*Pisum sativum* L.) 為本省重要蔬菜之一，每年十一月起，平地栽培的豌豆即有零星的葉枯病出現，直到翌年二~五月份，病害就轉趨嚴重；至於山區栽培的豌豆，在七~八月份時，葉枯病菌仍極為猖獗。本省豌豆葉枯病的主要病原菌是 *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Vestergr.，可經由種子傳播至田間(3)。據 Wallen 氏等 (11) 指出攜帶本菌的豌豆種子被播種在田間，可以造成 14% 的缺株率外，還可引起 50% 的產量損失。近年來，筆者利用澱粉-酪蛋白半選擇性培養基 (2) 偵測豌豆種子攜帶 *M. pinodes* 的情形，發現種子帶菌率與植株種植時間及地點有著密切的關係，致使筆者聯想到豌豆品種與環境因子或許可影響 *M. pinodes* 能否有效地感染豌豆種子。因此，本文的主要研究目的在於：(一)瞭解 *M. pinodes* 感染豌豆種子的過程，與(二)探討 *M. pinodes* 感染豌豆種子的影響因子，祈有助於明瞭扼止 *M. pinodes* 感染豌豆種子的方法。

## 材料與方法

### 供試菌源

自本省各地之豌豆栽培田，採回豌豆葉枯病之罹病組織，在實驗室利用 2% 水瓊脂培養基分離可疑病原真菌後，分別再以玻璃針分離單孢，培養於 PDA 斜面上，然後將分離獲得的菌種按柯霍氏法則測定它們的病原性後，選病原性較穩定的 *M. pinodes* MP-61 菌株，作為本研究的供試菌源。

### 接種源的製備

將 *M. pinodes* MP-61 菌株培養在澱粉-酪蛋白培養基 (SC 培養基：其組成成分含有澱粉 30 公克、酪蛋白 3 公克、磷酸氫二鉀 1 公克、氯化鉀 0.5 公克、硫酸鎂 0.5 公克、硫酸鐵 0.01 公克、洋菜 15 公克及蒸餾水 1 公升)(2) 平板上，於 24 C，十天後，每皿加入 10 毫升的無菌水，藉以配製孢子懸浮液，並使孢子濃度調整為  $10^5$  孢子 / 毫升。

## 供試植物

自農友種苗公司購得莢豌豆台中十一號(TC-11)和甜豌豆台中十三號(TC-13)，分別在八十二年十一月播種於中興大學農藝試驗田中，待豌豆開花後，每隔一星期以不同顏色的膠帶在花梗處標記，作為接種時辨識莢齡之用。

## *M. pinodes* 感染豌豆種子的過程

在田間將莢齡一星期的豌豆種莢噴霧接種 *M. pinodes* 的孢子懸浮液 ( $10^5$  孢子 / 毫升)，經保濕 24 小時後，取下小塑膠袋，每隔七天，摘取種莢以 FAA 固定 (70% 酒精：冰醋酸：福馬林 = 18:1:1)，再以 TBA (t-butanol alcohol) 系列脫水、滲臘、與包埋 (7) 後，利用石蠟切片機 (Reichert-Jung Co. 820) 切取厚度 10-15  $\mu\text{m}$  的組織，經 0.05% 棉藍 (cotton blue) 染色後 (1)，以光學顯微鏡觀察照相之。

## 不同品種與莢齡對 *M. pinodes* 感染豌豆種子的影響

將 TC-11 與 TC-13 兩豌豆品種之不同莢齡的種莢 (開花後第七、十四和二十一天) 同時分別噴霧接種 *M. pinodes* 的孢子懸浮液 ( $10^5$  孢子 / 毫升)，隨後套上三號小塑膠袋 (11.5 × 7.0 公分) 保濕 24 小時後，取下小塑膠袋，直至種莢成熟 (莢齡 28 天) 時，每處理逢機摘下 10 個種莢，隨即利用 SC 半選擇性培養基 (2) (在 SC 培養基添加普拔克 25 ppm、免賴得 10 ppm、滅普寧 50 ppm、草脫淨 300 ppm、鏈黴素 100 ppm 及新黴素 200 ppm)，偵測豌豆種子有無攜帶 *M. pinodes*，其中各處理均有三重複。

## 不同莢齡之豌豆種莢對 *M. pinodes* 的抗感病測定

將不同莢齡的 TC-11 及 TC-13 兩豌豆品種之種莢採回實驗室，分別置於含有濕濾紙的培養皿中 (內徑 15 公分)，隨即在每一種莢上噴霧接種 *M. pinodes* 的孢子懸浮液 ( $10^5$  孢子 / 毫升) 後，移置於 24 °C 的定溫箱中，經六天後，記錄各種莢的受害面積。其中每一處理各有三重複，每一重複接種十個種莢。

## 不同莢齡之豌豆種莢附著 *M. pinodes* 分生孢子之數量的比較

在田間將不同莢齡的 TC-11 與 TC-13 兩豌豆品種之種莢 10 個，同時分別噴霧接種等量的 *M. pinodes* 孢子懸浮液。接種用的孢子懸浮液分成兩組，其中一組加有 0.01% (v/v) 展著劑 Tween 20；而另一組則不加展著劑作為對照組。田間接種病原菌後，待種莢自然風乾 1 小時，每一處理隨即逢機採種莢 10 個，加入 100 毫升的無菌水中，經 150 rpm 的振盪器振盪 10 分鐘後，

作系列的稀釋，將每一種稀釋倍液取 0.5 毫升滴在 SC 半選擇性培養基平板上，均勻塗佈後，在 24 °C，五天後計算 *M. pinodes* 的菌落數。同時，利用面積測定儀 (Licor 3100 area meter) 量取面積，並以 *M. pinodes* 出現之總數除以種莢之總面積，即可求得每平方公分種莢所附著的菌量數。各處理有三重複，每重複測定豌豆種莢 10 個。

## 溫度對 *M. pinodes* 為害豌豆種莢的影響

由田間採回莢齡一星期的豌豆種莢，置於含有濕濾紙的培養皿 (內徑 15 公分) 內，隨即於每一種莢噴霧接種等量的 *M. pinodes* 之孢子懸浮液 ( $10^5$  孢子 / 毫升)，然後分別移置於 12、16、20、24、28 及 32 °C 之培養箱中，六天後，記錄種莢的罹病面積。

## 相對濕度對 *M. pinodes* 感染種莢的影響

在 24 °C，利用不同飽和鹽類溶液在密閉的燒杯 (500 ml) 內，分別控制相對濕度為 50.5%、75%、85%、90%、95% 及 100% 等 (13)。隨後將一星期莢齡的豌豆種莢噴霧接種 *M. pinodes* 的孢子懸浮液 ( $10^5$  孢子 / 毫升)，經風乾後，分別放入不同相對濕度的燒杯中，在 24 °C，六天後，記錄各種莢的罹病面積。

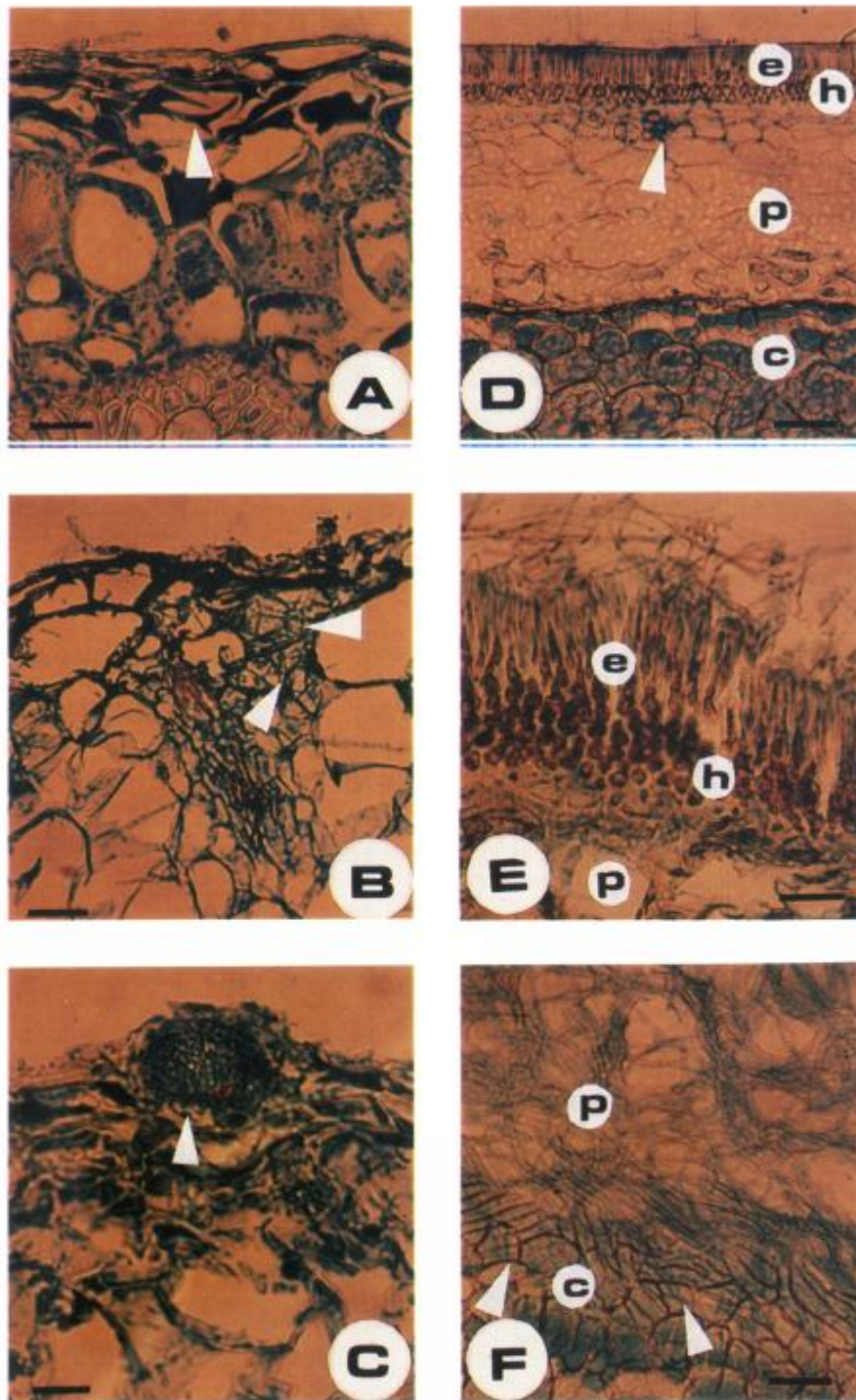
## 結 果

### *M. pinodes* 感染豌豆種子的過程

種莢接種病原菌一星期後，種莢第一及第二層的細胞呈現褐化壞死的現象 (圖一 A)；二星期後，病原菌的菌絲已感染至種莢內的薄壁細胞 (圖一 B)，並在種莢表面形成柄子殼 (圖一 C)。此外，甚至有些菌絲已侵入種子的表皮及下皮層 (hypodermis) 細胞，並在薄壁細胞內纏繞成菌絲團 (圖一 D)，使得受害的種子表皮及下皮層細胞產生褐化崩解的現象 (圖一 E)；三星期後，菌絲已由種皮的薄壁細胞向子葉及胚感染蔓延 (圖一 F)。

### 不同品種與莢齡對 *M. pinodes* 感染豌豆種子的影響

將 TC-11 和 TC-13 兩豌豆品種之不同莢齡的種莢，同時分別噴霧接種 *M. pinodes* 的孢子懸浮液後，待豌豆種莢成熟時，以 SC 半選擇性培養基偵測種子帶菌的百分率。結果發現莢齡七天的豌豆種莢，經接種 *M. pinodes* 後，約有 8.5-14.0% 的豌豆種子感染病原菌 (表一)。至於莢齡十四天的種莢，經接種 *M. pinodes* 之後，卻偵測不到任何種子攜帶有病原菌。雖然莢齡二十一天者，亦有 1-4% 的種子遭受 *M. pinodes* 的感染，但大多經由種莢裂開處侵入。此外，台中十一號



圖一 A-F、豌豆葉枯病菌感染豌豆台中十一號品種之種莢與種子的病理組織切片。(A) 豌豆種莢接種 *Mycosphaerella pinodes* 後，經過一星期，種莢表皮細胞出現壞死的現象；(B) 接種後二星期，病原菌菌絲蔓延至種莢的薄壁細胞；(C) 種莢表面形成孢子殼；(D) 病原菌菌絲蔓延至種子的種皮薄壁細胞；(E) 病原菌的菌絲感染種皮後，造成種皮細胞的壞死；(F) 接種後三星期，病原菌的菌絲由種皮的薄壁細胞蔓延至子葉的部位。  
**Fig. 1A-F.** Histopathological sections of pod and seed infections of garden pea (cv. TC-11) by *Mycosphaerella pinodes*. A, Necrotic pod cells (arrow) infected with *M. pinodes*. B, Hyphae (arrows) of *M. pinodes* within parenchyma cell layers of a pod 2 weeks after inoculation. C, Cross section of a pod infected with *M. pinodes* for 2 weeks showing a pycnidium (arrow) in the epidermis. D, Cross section of a seed infected with *M. pinodes* for 2 weeks showing hyphae (arrow) in the parenchyma cells of seed coat. (e=epidermis, h=hypodermis, p=parenchyma cells, c=cotyledon). E, Cell necrosis of seed coat invaded by hyphae (arrows) of *M. pinodes* 2 weeks after inoculation. F, Cell layers of cotyledon (arrows) of a seed invaded by hyphae of *M. pinodes* 3 weeks after inoculation. Bars in A, B, and D=80  $\mu\text{m}$ ; Bars in C, E, and F=30  $\mu\text{m}$ .



表一、在田間不同莢齡對 *Mycosphaerella pinodes* 感染台中十一號 (TC-11) 與台中十三號 (TC-13) 品種之豌豆種子的影響

TABLE 1. Effect of pod ages on seed infection by *Mycosphaerella pinodes* in two cultivars, TC-11 and TC-13, of garden peas planted in the field

| Pod age at inoculation (days) | Infected seeds/<br>noninfected seeds <sup>1</sup> |        |
|-------------------------------|---|--------|
|                               | TC-11   | TC-13  |
| 21                            | 2/152   | 6/155  |
| 14                            | 0/150   | 0/150  |
| 7                             | 14/165  | 20/140 |

<sup>1</sup> Seeds were harvested from 28-day-old pods and inspected with SC semiselective medium (2) to determine if the seeds were infected or not.

表二、不同莢齡之豌豆種莢接種 *Mycosphaerella pinodes* 後，分生孢子附著於各齡期種莢的數量比較

TABLE 2. Comparison of population densities of *Mycosphaerella pinodes* adhering to the pod surfaces of garden peas (cultivars TC-11 and TC-13) inoculated with spore suspensions of the pathogen at different pod stages

| Pod age at inoculation (days) | Spores/cm <sup>2</sup> of pod surface area |                |       |       |
|-------------------------------|--|----------------|-------|-------|
|                               | TC-11                                      |                | TC-13 |       |
|                               | - <sup>1</sup>                             | + <sup>1</sup> | -     | +     |
| 21                            | 260 <sup>2</sup> B <sup>3</sup>            | 587 C          | 60 B  | 102 C |
| 14                            | 34 A                                       | 59 A           | 25 A  | 27 A  |
| 7                             | 28 A                                       | 90 B           | 28 A  | 68 B  |

<sup>1</sup> Spore suspensions were applied with (+) or without (-) addition of 0.01% (v/v) Tween 20.

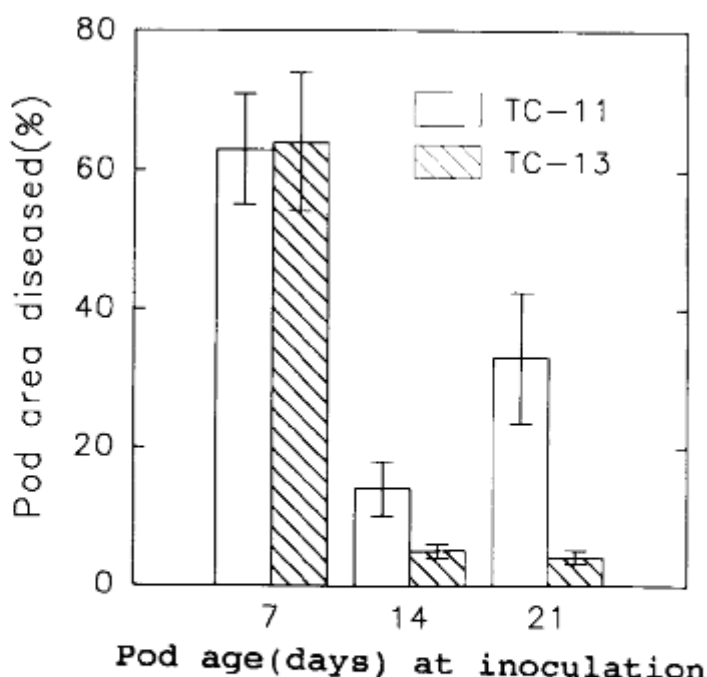
<sup>2</sup> The pathogen was recovered from pod surface one hour after spore suspension was sprayed and air-dried.

<sup>3</sup> Means (n=3) within a column followed by the same letter are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

和台中十三號兩品種間，種子的帶菌百分率並無顯著的差異。

### 不同莢齡對 *M. pinodes* 為害豌豆種莢的影響

不同莢齡的豌豆種莢，分別接種 *M. pinodes* 的孢子懸浮液，六天後，計算種莢的罹病面積。豌豆 TC-11 及 TC-13 兩品種均以開花後七天的幼齡種莢最為罹病，種莢受感染的面積均在 60% 左右 (圖二)。至於兩品種開花後第十四天的中齡期種莢則均呈現些微的抗病。TC-13 品種在開花後第十四天和二十一天的種莢罹病面積間並無顯著的差異，然而 TC-11 品種在開



圖二、不同莢齡對 *Mycosphaerella pinodes* 為害台中十一號 (TC-11) 與台中十三號 (TC-13) 品種之豌豆種莢的影響。

Fig. 2. Effect of pod ages at inoculation on disease severity of pod surfaces of garden peas (cultivars TC-11 and TC-13) caused by *Mycosphaerella pinodes* at 24 C for 6 days.

花後第二十一天的果莢罹病面積卻較第十四天者大而嚴重。

### 不同齡期種莢附著 *M. pinodes* 之菌量比較

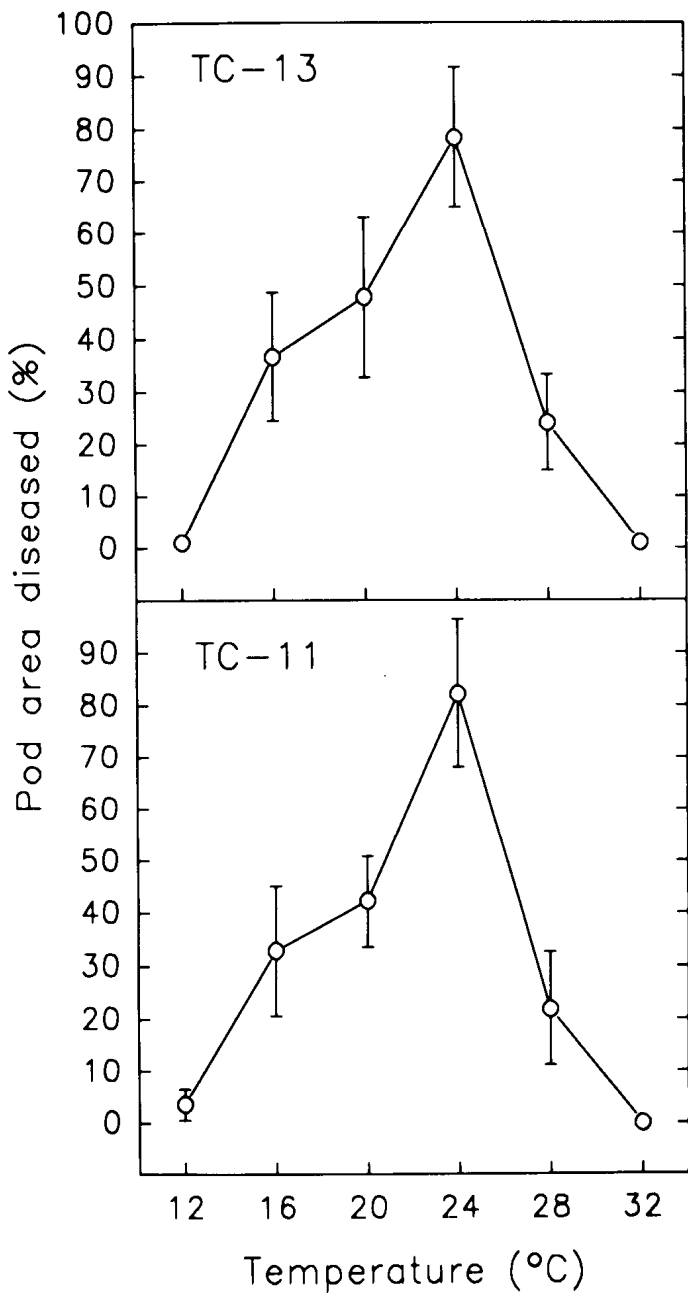
豌豆種莢接種不添加展著劑 Tween 20 的 *M. pinodes* 孢子懸浮液，莢齡七天的種莢和莢齡十四天者黏著病原菌之密度間並無顯著的差異；惟孢子懸浮液添加展著劑後，可顯著地提高 *M. pinodes* 附著於種莢的數量。然而，孢子懸浮液添加有展著劑者，經噴佈接種試驗證明，發現莢齡十四天的種莢較不易黏著 *M. pinodes* 之分生孢子 (表二)。

### 溫度對 *M. pinodes* 感染種莢的影響

在 24 C 時，豌豆 TC-11 與 TC-13 兩品種之種莢遭受 *M. pinodes* 為害的百分率最高，致使兩者的受害面積均達 80% 左右 (圖三)；至於溫度在 20 C 或 28 C 時，種莢受害的面積均漸小，直到溫度降到 12 C 以下或高達 32 C 以上，*M. pinodes* 便無法再感染種莢。

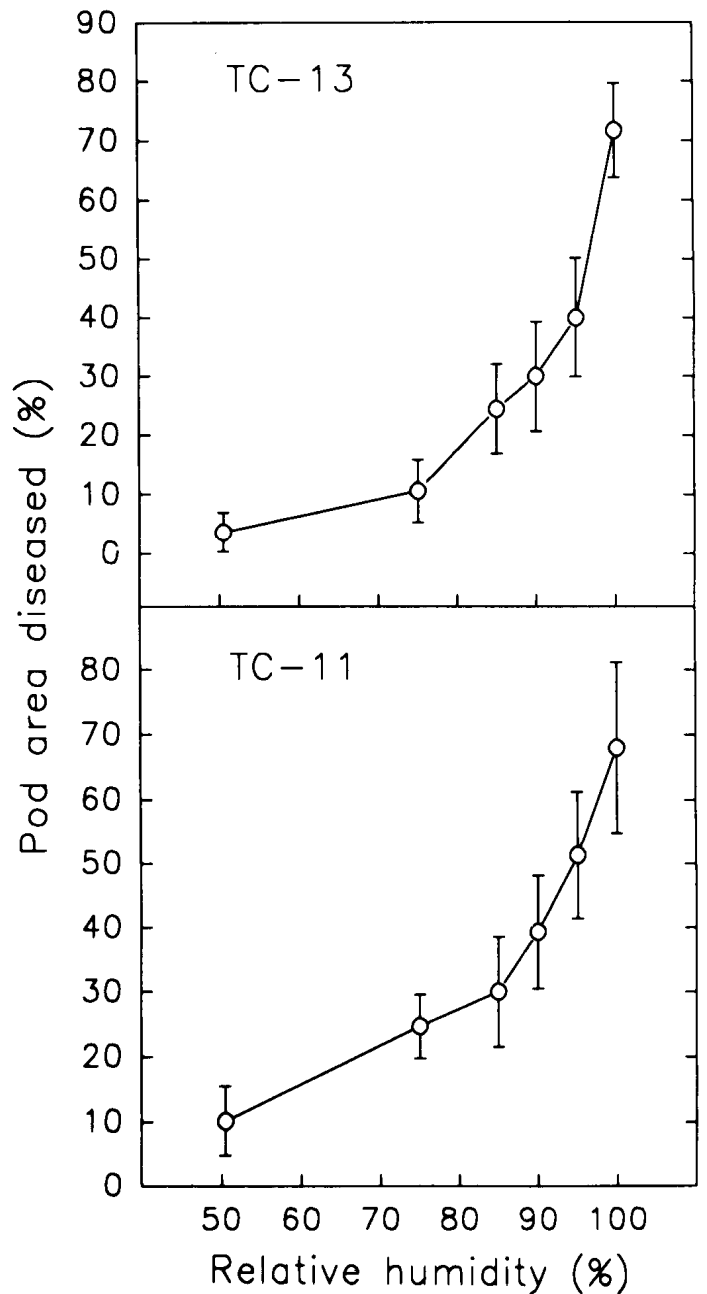
### 相對濕度對 *M. pinodes* 感染種莢的影響

隨著相對濕度的提高，豌豆種莢罹病率也就越嚴重。在相對濕度 100% 時，豌豆 TC-11 與 TC-13 兩品種



圖三、不同溫度對 *Mycosphaerella pinodes* 感染台中十一號 (TC-11) 與台中十三號 (TC-13) 品種之豌豆種莢面積的影響。

Fig. 3. Effect of temperatures on disease severity of pod surfaces of garden peas (cultivars TC-11 and TC-13) caused by *Mycosphaerella pinodes* for 6 days.



圖四、不同相對濕度對 *Mycosphaerella pinodes* 感染台中十一號 (TC-11) 與台中十三號 (TC-13) 品種之豌豆種莢面積的影響。

Fig. 4. Effect of relative humidity on disease severity of pod surfaces of garden peas (cultivars TC-11 and TC-13) caused by *Mycosphaerella pinodes* at 24 C for 6 days.

的種莢罹病面積均達 80% 左右，至於相對濕度在 50.5% 時，種莢雖仍有少數的病斑，惟罹病面積約在 10% 上下 (圖四)。

### 討 論

豌豆葉枯病菌與菜豆炭疽病菌 *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Br. et Car. (12) 及四季豆葉枯病菌 *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (5) 感染寄主植物之種子的過程相似，三者均是經由種莢而感

染種子。本研究發現 *M. pinodes* 之分生孢子掉落在豌豆種莢表皮後，隨即發芽侵入表皮細胞，並引起種莢細胞的壞死；然後病原菌會再由受害之種莢與種子的接觸點繼續侵入種子的種皮及子葉等部位。顯然，本菌為害豌豆種莢的各種干擾因子，也一定是左右本菌能否有效感染豌豆種子的主要條件。因此，本文採用種莢接種感染的影響因子作為探討本菌感染種子的指標。

許多豆類植物的種莢，隨著它們不同的生育階段，在形態結構和組織成份上，均會有顯著的差異。

Laviolette 等氏 (8,9) 指出大豆在幼莢期較成熟莢期容易遭受 *Cercospora kikuchii* (Mastsum. et Tomoy.) Sawada 的感染。本研究也發現豌豆莢齡可影響 *M. pinodes* 為害豌豆種莢。將 *M. pinodes* 之分生孢子接種在豌豆不同齡期的種莢，發現中齡期的果莢(莢齡十四天者)比幼齡期果莢(莢齡七天者)具有較高的抗病性(圖二)。此外，接種用的 *M. pinodes* 之孢子懸浮液不添加展著劑時，發現幼齡果莢和中齡果莢附著本菌分生孢子的數量間，並無顯著差異；惟孢子懸浮液添加展著劑者，豌豆中齡期果莢所附著的菌量數卻明顯較幼齡果莢少(表二)，然而，中齡期的種莢接種 *M. pinodes* 之分生孢子後，其所收穫的豌豆種子卻偵測不到病原菌的存在，顯然中齡期果莢的表面構造除異於幼齡期之果莢外，它可能尚存在有不利於 *M. pinodes* 之分生孢子附著感染的成分。至於中齡期果莢的組織構造或生化成份是否異於幼齡期果莢，致使其存在有較高的抗病性，則有待進一步的探討。

豌豆性喜冷涼乾燥的氣候，生長適溫為 15-20 C 左右 (2)。1954 年，Sorgel 和 Unger 兩氏 (10) 指出豌豆葉枯病的最適合發病的溫度是在 20-24 C。本研究證明 *M. pinodes* 感染豌豆種莢的最適溫度是 24 C，其次是 20 C。顯然，適於豌豆生長的溫度範圍，也有利於 *M. pinodes* 感染豌豆種莢。在溼度方面，隨著相對溼度的增加，豌豆種莢受本菌感染的情形也就越嚴重，故在 100% 相對溼度下，種莢的罹病面積可達 80% (圖四)。Carter 和 Moller 兩氏 (6) 雖指出 *M. pinodes* 之分生孢子發芽所需的相對溼度約在 95% 以上，惟本研究發現相對溼度在 75% 時，即有 *M. pinodes* 感染豌豆種莢的跡象。此外，筆者觀察發現連續下雨後，豌豆種莢極易開裂，導致暴露的豌豆種子，容易遭受 *M. pinodes* 孢子的污染(contamination)或感染，因而提高豌豆種子的帶菌率。

## 謝 辭

本研究承農委會 83 科技 -2.4- 糧 -26(2) 計劃經費補助，特誌謝忱。

## 引用文獻

1. 高文清、郭克忠、呂理桑。1990。葡萄苦腐病之病徵、病原菌及侵染過程。植保會刊 32:256-264。
2. 陳美杏。1994。豌豆葉枯病菌的偵測、種子感染與傳播。國立中興大學植物病理學研究所第二十四屆碩士論文。114 頁。
3. 陳美杏、黃振文。1994。影響豌豆種子傳播葉枯病菌的因子。植保會刊 36:189-200。
4. 郭俊毅。1989。豆類蔬菜栽培。八萬農業建設大軍訓練教材。臺灣省政府農林廳編印。中興新村。28 頁。
5. Aliza, H. M. 1970. Infection of chickpea seeds by *Ascochyta rabiei* in Israel. Plant Dis. Rep. 54:442-445.
6. Carter, M. V., and Moller, W. J. 1961. Factors affecting the survival and dissemination of *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Vesterg. in south Australian irrigated pea fields. Aust. J. Agric. Res. 12:878-889.
7. Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry. W. H. Freeman and Co. San Francisco. 408 pp.
8. Laviolette, F. A., and Athow, K. L. 1972. *Cercospora kikuchii* infection of soybean as affected by stage of plant development. Phytopathology 62:771. (Abstr.)
9. Roy, K. W., and Abney, T. S. 1976. Purple seed stain of soybeans. Phytopathology 66:1045-1049.
10. Sorgel, G., and Unger, K. 1954. Über den Befallsverlauf von *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Stone, *Ascochyta pinodes* Jones und *Ascochyta pisi* Lib. an Erbsen am natürlichen Standort. Züchter 24:56-58 (RAM 34:122, 1955).
11. Wallen, V. R., Cuddy, T. F., and Grainger, P. N. 1967. Epidemiology and control of *Ascochyta pinodes* on field peas in Canada. Can. J. Plant Sci. 47:395-403.
12. Whetzel, H. H. 1908. Bean Anthracnose. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Bull. 255:431-447.
13. Winston, P. W., and Bates, D. H. 1960. Saturated solutions for control of humidity in biological research. Ecology 41:232-237.

## ABSTRACT

Chen, M. H.<sup>1</sup>, Huang, J. W.<sup>1</sup>, and Yein, C. F.<sup>2</sup> 1994. The pathway and influence factors in pod and seed infections of garden peas by *Mycosphaerella pinodes*. Plant Pathol. Bull. 3:133-139.  
 (1. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.,  
 2. Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Pod and seed infections of garden peas (cultivars TC-11 and TC-13) by *Mycosphaerella pinodes* in field were examined histopathologically. The presence of fungal mycelium within the pod and seed tissues was found two weeks after the young pods (at 7th day after bloom) of

garden peas were inoculated with spore suspensions ( $10^5$  spores/ml) of the pathogen. The fungus appeared to penetrate into seeds through the infected pods. Inoculation of garden pea pods at different developmental stages was conducted in a field plot at National Chung Hsing University campus from November, 1993 to May, 1994. Young pods (at 7th day after bloom) were found more susceptible to the pathogen than the elder pods (at 14th day after bloom). A higher percentage of seed infection was also detected from the pods which were inoculated at their young stage. Temperature and relative humidity were significant parameters in regard to infection by *M. pinodes*. The optimum temperature and relative humidity for the infection on detached pods were 24 C and 100%, respectively.

Key words: seed infection, garden pea, *Mycosphaerella pinodes*.