

中部地區水稻徒長病 發病情形、病原檢測與抗藥性分析¹

郭建志²、廖君達²、黃冬青²、陳又嘉³、鍾嘉綾³

摘 要

由病原真菌*Gibberella fujikuroi*所引起的水稻徒長病(Bakanae disease of rice)為水稻重要種子傳播病害之一，近年來在中部地區普遍發生，並呈現嚴重的趨勢。為瞭解此病害在田間的分佈情形及發生原因，本場於2012年與2013年進行相關研究。試驗內容包含調查田間育苗期與本田期發病情形，檢測稻種帶菌率與溫室播種罹病率之關係，並利用分子檢測技術輔助病原菌鑑定，同時進行徒長病菌之抗藥性測試。於轄內12處大型育苗中心自2012年收集1、2期採種田種子，共52批稻種；2013年收集1、2期採種田、原種田與原原種種子，共36批稻種。稻種帶菌率檢測方面，以台南11號、台梗9號、台梗16號與台農71號普遍帶菌；調查秧苗期與本田期之罹病率，一期作明顯高於二期作，罹病率高的水稻品種包括台南11號、台中秈10號與台梗16號。大部分育苗中心於2013年改用25.9%得克利水基乳劑進行稻種消毒，結果可降低帶菌率與秧苗罹病率皆低於1%以下，田間每500叢水稻罹病株也降至1叢以下。另檢測2012年二期原原種種子及2013年原種種子，稻種帶菌、秧苗及本田皆未檢出徒長病菌。利用半選擇性培養基鑑定形態特徵與利用真核轉譯延長因子(translation elongation factor 1- α , TEF 1- α)序列鑑定，以兩組引子對tef-1/tef-2與Fftf-F/Fftf-R進行PCR檢測，可增幅出約700 bp及350 bp之專一性DNA片段，定序後可確認為*G. fujikuroi*。田間共分離與鑑定徒長病菌共137株，選定42株菌株為供試菌株，進行抗藥性測試。結果顯示供試之42株菌株皆可被25%撲克拉水基乳劑1,000倍、25%撲克拉水基乳劑500倍、25.9%得克利水基乳劑2,000倍等藥劑抑制生長，後續將試驗之菌絲塊回分於不含藥劑之PDA培養基上，結果顯示以得克利藥劑2,000倍可完全殺死徒長病菌，撲克拉500倍及1,000倍僅能抑制徒長病菌之生長。顯示若稻種消毒不完全，徒長病菌仍可殘存於稻種上，並造成後續之危害。鑒於目前中部地區育苗中心稻種消毒藥劑皆已選用24.9%得克利水基乳劑，應可有效降低徒長病之發生與危害。

關鍵字：水稻徒長病、半選擇性培養基、稻種

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0843號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員、副研究員、研究助理。

³ 臺灣大學植物病理與微生物學系碩士班研究生、助理教授。

前 言

水稻徒長病是我國水稻重要的種子傳播性病害之一，最早記錄於1912年由學者澤田氏所記載報告^(25,26)，當時在臺灣造成水稻嚴重的產量損失，後續學者根據徒長病的無性世代特徵誤以為與玉米穗腐病的病原相同，進而取名為*Fusarium moniliforme*，因此誤用了數十年，直到1976年，Nirenburg將造成水稻徒長病之病原定名為*Fusarium fujikuroi*, Nirenburg，而有性世代名稱則維持為*Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber⁽⁸⁾。此病菌自根部侵入，同時分泌激勃素，促使稻株徒長⁽²⁰⁾。臺灣的農友一般稱此病為「稻公」，在日本則是稱作馬鹿苗病(bakanae disease)。本病害入侵水稻後，會在苗期與本田期發病，在苗期罹病之秧苗較健康苗高出1/3~1/2以上，病苗纖細黃綠色，葉幅變小，葉片與葉鞘之著生角加大⁽¹⁾，大部分之罹病苗在移植後會枯死，而移植後未死之病株病徵常會消失，外觀與正常植株無異，到本田期之分蘗盛期又陸續再表現病徵⁽²⁴⁾。許等人研究推論稻種受到徒長病菌感染後，病原菌存在於植物體內的時間長短會影響病徵的表現，水稻幼苗發生徒長病後，部分幼苗會死亡，有些外觀恢復正常但地基部呈現不正常分蘗，部分不正常分蘗植株會在抽穗期發病⁽⁶⁾。罹患徒長病之病株與健康植株可明顯辨別，病株比健株高，當陽光照射及微風吹動時，極易辨別徒長病株⁽¹⁴⁾。罹病葉片下垂而呈現淡黃色，莖節處部位會長出不定根，之後節上生出白色菌絲，最後全株被暗白色至淡紅色的菌絲及孢子覆蓋，此為徒長病菌之菌絲及小型分生孢子，此時分生孢子可隨風及雨傳播感染至鄰近抽穗後的稻穗上，繼續殘存及危害下一期的水稻。目前並無明顯證據顯示徒長病菌可藉由土壤傳播至水稻植株，而此病害被認定為單循環病害。水稻徒長病之發生與水稻品種並無絕對關係，而是與育苗業者是否取得乾淨的稻種、及浸種時消毒是否確實，存在較大的關聯性⁽¹⁶⁾。郭等人研究發現，不同來源之相同品種稻種，其帶菌率有顯著差異⁽¹⁰⁾。朱等人針對徒長病菌進行藥劑篩選試驗，發現稻種以25.9%得克利水基乳劑2,000倍浸泡24小時後換清水催芽，育苗箱每盤罹病株數僅0.9株，較25%撲克拉乳劑1,000倍處理更為優異^(3,15)。

稻種帶菌是徒長病的主要傳播途徑，傳播方式可分為徒長病株上的秕粒及健穀被污染二種方式。當病株上的秕粒內外含大量之病菌，浸種催芽時病秕長出菌絲及孢子感染鄰接之稻種^(13,16)；健穀稻殼除收穫時會被污染外，因田間環境不同，感染稻殼的徒長病菌孢子型態也有所不同，病菌在田間稻株基部高濕度環境下容易形成有性世代，病菌利用子囊孢子污染稻殼^(2,4,11)。而在較乾之環境，徒長病菌不容易形成有性世代，但病株高度超過健株，健株抽穗時，病株上的分生孢子很容易污染健穀⁽¹²⁾。目前針對種子傳播性病害的檢測方法，最常用的方式為利用選擇性培養基與專一性引子對的偵測。而在水稻種子上亦常發現許多*Fusarium*屬真菌⁽²³⁾，與徒長病之型態極為相似，例如*F. proliferatum*與*F. verticillioides*⁽²¹⁾等，在型態與分子序列皆與水稻徒長病菌難以區分，許等人研究證實*F. proliferatum*與*F. verticillioides*僅造成水稻幼苗之矮化，並不會造成徒長現象⁽⁷⁾；而*F. fujikuroi*會產生激勃素及鐮孢菌酸兩種代謝產物^(9,20)。現今針對鐮孢菌屬之病原菌已有多種選擇性培養基的開發，如Komada培養基⁽²²⁾、SSM培養基⁽²⁷⁾等，但仍然無法專一性的辨別出水稻徒長病菌*F. fujikuroi*，且製備培養基的過程中

仍需添加五氯硝基苯(Pentachloronitrobenzene, PCNB)，其成分具致癌症，多國以明令禁止使用加上取得不易，因此許⁽⁹⁾以Komada培養基為基礎，試驗許多藥劑可替代PCNB之作用，進而研發出鑑別性培養基FFC medium以供本研究種子帶菌率檢測之用。在真菌的分子鑑定與親緣關係的PCR檢測部分，一般常使用的片段為核糖體RNA上的內轉錄區間片段(internal transcribed spacer, ITS)。但針對鐮孢菌屬之真菌，目前研究學者較常利用的片段為轉譯延長因子片段(translation elongation factor 1- α , TEF 1- α)，此片段具有識別性的區域，能有效的區隔親緣相近的種類^(17,19)。Amatulli等人於2012年發表引子對Fuji1F/TEF1R與Proli1F/TEF1R可以在罹病組織與種子有效區分與偵測*F. fujikuroi*與*F. proliferatum*⁽¹⁸⁾。在本研究中則利用了David等人針對TEF 1- α 片段所發表的ef-1/ef-2引子對⁽¹⁹⁾；另，鐘與陳等人依據Amatulli等之文獻重新設計之Fftef-F/Fftef-R引子對進行徒長病的分子鑑定與檢測工作⁽⁵⁾。

本研究針對中部地區水稻進行水稻徒長病之種子帶菌率檢測、溫室秧苗罹病率調查，另至育苗中心調查秧苗罹病率與追蹤至本田期之罹病率調查，以了解田間水稻徒長病之發生情況；同時利用兩組引子對針對所分離之徒長病菌進行PCR檢測與解序比對；另就徒長病抗藥性分析部分，以現有稻種消毒藥劑撲克拉與得克利兩組化學藥劑，利用不同濃度進行室內抗藥性篩選試驗，以了解是否有抗藥性菌株出現，以供後續擬定防治策略之用。

材料與方法

一、水稻稻種之稻種來源、稻種帶菌率檢測與溫室罹病率調查

(一)供試水稻品種

於2012年與2013年在水稻1期作及2期作耕作前至轄內大安、大雅、霧峰、烏日、草屯、名間、伸港、秀水、員林、溪州、埤頭、二林，共12家大型育苗中心收集臺南11號(TN 11)、臺稈16號(TK 16)、台稈9號(TK 8)、臺中秈10號(TCS 10)、臺農71號(TNG 71)、臺中192號(TC 192)、臺中秈糯2號(TCSG 2)等7種稻種，稻種的來源包含採種田、原種田與原原種田種子，詳如(表一~五)。

(二)稻種帶菌率檢測

稻種帶菌率檢測方式，每1批稻種為1個樣品，每1樣品3重覆，每重複100粒種子，將稻種直接擺放於水稻徒長病菌之半選擇性培養基上，製備方法如下：每皿培養基上擺10粒種子，培養於28°C生長箱中，照光12小時，黑暗12小時，7天後觀察培養基中種子邊緣是否有徒長病特有之色素產生。檢測2012年之稻種帶菌率，使用修正Komada培養基之半選擇性培養基，配製之方法如下：將下列之藥劑「L-Asparagine (MP Biomedicals) 2 g、D-Galactose (ACROS ORGANICS) 20 g、KCl (聯工化學試藥) 0.5 g、MgSO₄·7H₂O (J. T. Baker) 0.5 g、K₂HPO₄ (Riedel-deHaen) 1 g、Fe (EDTA) (Sigma) 5 mg、Cycloheximide 放線菌酮 (Sigma-Aldrich) 10 mg (1%)、chloramphenicol 氯黴素(sigma) 200 ppm、Na₂B₄O₇·10H₂O (Sigma-Aldrich) 溶於1 L蒸餾水中，完全溶解後，以10%磷酸(Sigma-Aldrich)調整溶液至pH 4.5，再加入20 g洋菜粉(光惠股份有限公司)後滅菌。經121°C、1.5磅氣壓，滅菌15分鐘後，

待培養基溫度降至 50~60 °C，則加入 Ovgall 牛膽汁 (Difco) 0.5 g 與五氯硝苯 Pentachloronitrobenzene (PCNB, 中興大學提供) 1 g，混合均勻後，倒入 9 cm 之塑膠培養皿中，平均每 300 ml 可製備 18 皿平板。因半選擇性仍需要利用 PCNB，但此藥品不易購買且具有致癌性，後續利用許⁽⁹⁾開發之 FFC medium 半選擇性培養基，藉以取代 PCNB 的使用並抑制其他 *Fusarium spp.* 的生長。製備方式如下：將下列之藥劑 (L-Asparagine 2 g、D-Galactose 20 g、KCl 0.5 g、MgSO₄·7 H₂O 0.5 g、K₂HPO₄ 1 g、Fe-(EDTA) 5 mg、Na₂B₄O₇·10H₂O 1 g) 溶於 1 L 蒸餾水中，完全溶解後，以 10% 磷酸調整溶液至 pH 7.0，再加入 20 g 洋菜粉後滅菌，待培養基溫度降至 50~60 °C，則加入 Cycloheximide 1 mg、1% Iprodine 依普同 (大成化學工業股份有限公司) 0.1 ml、1% Dicloran 大克爛溶液 (Sigma-Aldrich) 0.2 ml、1% Thiabendazole 腐絕溶液 (世大農化學工業股份有限公司) 0.5 ml、1% Flutolanil 福多寧溶液 (日佳農藥股份有限公司) 1 ml、10% Lithium Chloride 氯化鋰溶液 (林純藥) 10 ml 與 2% chloramphenicol 溶液 10 ml。混合均勻後，倒入 9 cm 之塑膠培養皿中，待凝固後即可使用。

(三) 溫室秧苗罹病率調查

每 1 批稻種樣品分別育苗 3 箱，為 3 重複，每箱播重量為 250 g。將稻種以一般慣行浸種催芽方式，將秧盤置於溫室中，待秧苗生長至 10 cm 時調查一次，同時將罹病株拔除，15 cm 時再調查一次罹病株數，後將其株數總加後再平均，即為每箱育苗盤之罹病株數。

表一、中部地區 12 家育苗業者所提供之 2012 年 1 期共 26 批稻種

Table 1. The 26 batch of rice seeds of the rice first cropping season, 2012 from 12 nursery centers in central Taiwan

Collection area	Nursery center	Rice variety	Sample
Taichung City	Daan (大安)	Tainan 11, Taichung Sen 10	2
	Daya (大雅)	Tainan 11, Taikeng 16	2
	Wurih (烏日)	Tainan 11, Tainong 71	2
	Wufeng (霧峰)	Tainan 11, Taikeng 9, Tainong 71	3
Nantou County	Caotun (草屯)	Tainan 11, Taikeng 9	2
	Mingjian (名間)	Tainan 11	1
Changhua County	Shenkang (伸港)	Tainan 11	1
	Xiushui (秀水)	Tainan 11, Taichung 192, Taichung Sen 10	3
	Yuanlin (員林)	Tainan 11, Taichung Sen 10, Taikeng 16	3
	Pitou (埤頭)	Tainan 11, Taikeng 9	2
	Hsichou (溪州)	Tainan 11, Taikeng 9, Taikeng 16	3
	Erlin (二林)	Tainan 11, Taikeng 9	2
Total			26

表二、中部地區 12 家育苗中心所提供之 2012 年 2 期作共 26 個稻種

Table 2. The 26 batch of rice seeds of the rice second cropping season, 2012 from 12 nursery centers in central Taiwan

Collection area	Nursery center	Rice variety	Sample
Taichung City	Daan	Tainan 11	1
	Daya	Tainan 11, Taikeng 16	2
	Wurih	Tainan 11, Tainong 71	2
	Wufeng	Tainan 11, Tainong 71	2
Nantou County	Caotun	Tainan 11, Taikeng 9, Taichung 192	3
	Mingjian	Tainan 11	1
Changhua County	Shenkang	Tainan 11, Tainong 71	2
	Xiushui	Tainan 11, Taichung 192, Taichung Sen 10	3
	Yuanlin	Tainan 11, Taichung Sen 10	2
	Pitou	Tainan 11, Taikeng 9	2
	Hsichou	Tainan 11, Taikeng 9, Taikeng 16	3
	Erlin	Tainan 11, Taikeng 9, Taichung Sen glutinous 2	3
Total			26

表三、中部地區 12 家育苗中心所提供之 2013 年 1 期作共 26 個稻種

Table 3. The 26 batch of the rice seeds of the rice first cropping season, 2013 from 12 nursery centers in central Taiwan

Collection area	Nursery center	Rice variety	Sample
Taichung City	Daan	Tainan 11	1
	Daya	Tainan 11, Taikeng 16	2
	Wurih	Tainan 11, Tainong 71	2
	Wufeng	Tainan 11, Tainong 71	2
Nantou County	Caotun	Tainan 11, Taikeng 9	2
	Mingjian	Tainan 11	1
Changhua County	Shenkang	Tainan 11, Taichung Sen 10	2
	Xiushui	Tainan 11, Taichung 192, Taichung Sen 10	3
	Yuanlin	Tainan 11, Taichung Sen 10	2
	Pitou	Tainan 11	2
	Hsichou	Tainan 11, Taikeng 9, Taikeng 16, Taichung 192	4
	Erlin	Tainan 11, Taikeng 9, Taichung Sen glutinous 2	3
Total			26

表四、中部地區 3 家育苗中心及本場所提供之 2013 年 1 期作 5 個水稻原種種子

Table 4. The 5 batch of the rice breeder's seed of the rice first cropping season, 2013 from 3 nursery centers and TDARES in central Taiwan

Rice type	Nursery center	Rice variety	Sample
Breeder's seed (原原種)	Xiushui	Taichung Sen 10, Taichung Sen glutinous 2	2
	Pitou	Tainan 11	1
	Hsichou	Taikeng 16	1
	TDARES (臺中農改場)	Taichung 192	1
Total			5

表五、中部地區 4 家育苗中心所提供之 2013 年 2 期作共 5 個水稻原種種子

Table 5. The 5 batch of the rice foundation seeds of the rice second cropping season, 2013 from 4 nursery centers in central Taiwan

Rice type	Nursery center	Rice variety	Sample
Foundation seeds (原種)	Xiushui	Taichung Sen 10, Taichung Sen glutinous 2	2
	Pitou	Tainan 11	1
	Hsichou-1	Taikeng 16	1
	Hsichou-2	Taichung 192	1
Total			5

二、育苗場及本田期之徒長病罹病率調查

(一)育苗場秧苗罹病率調查

於2012與2013年間，自轄內臺中、南投與彰化共12育苗場進行秧苗期徒長病調查，於水稻1期作及2期作育苗時期，至育苗場進行秧苗期之發病調查並調查稻種消毒使用之藥劑與用量。秧苗期調查方式為選擇出秧前1~2天之秧苗，各育苗場每個品種逢機選擇3小區，每小區調查30箱秧苗，計算每箱之發病株數，取其平均數罹病株數。

(二)本田期罹病率調查

將育苗場調查時選定之秧苗追蹤至本田期，於孕穗期調查1次，各育苗場每個品種選定1個田區調查，每塊田區選取田區4個角落與中央共5點進行調查，每1點調查100叢，總計500叢稻株，紀錄徒長株數，發病輕微田區則估算面積後紀錄全區罹病株數。

三、徒長病菌分子生物鑑定

(一)供試菌株之DNA核酸抽取

將自種子、苗期及本田期分離而來之水稻徒長病菌菌株共65株，進行DNA核酸之抽取，試驗採用tace之Plant DNA / RNA Extraction Kit之方法，步驟如下：取邊長約0.3~0.5 cm之菌絲塊3塊，置入已裝有6顆小鋼珠(直徑2.5 mm)之管子中(tace之Pre-loaded steel bead tubes)，加入600 µl之lysis buffer，置入tace之震碎機中以cycle2之轉速震碎，震碎後靜置片

刻，待管內泡沫消失，以轉速13,000 rpm離心5分鐘後，取上清液400 μ l置入96孔盤中1號孔盤中，再加入400 μ l之Isopropanol。2號及3號孔盤則加入750 μ l之washA、4號及5號孔盤則加入750 μ l之washB、6號孔盤則加入50 μ l~150 μ l之Eluting buffer，在2號孔盤中再加入50 μ l之磁珠。待皆準備就緒後，將96孔盤放入tace之自動抽DNA之機器中，在機器中之磁棒上套上塑膠套後，即可啟動。約50分鐘儀器停止後，將第6號孔盤內之buffer吸出至於1.5 ml之離心管中，至於-20°C中保存。

(二)水稻徒長病分子鑑定與檢測

將已萃取之徒長病菌DNA核酸，利用David等人針對*Fusarium* spp.之translation elongation factor (TEF 1- α)基因序列所發表之引子對ef-1/ef-2⁽¹⁷⁾，所添加之引子濃度約10 μ M，分別加入PCR各反應物，總反應體積20 μ l，進行PCR反應。增幅TEF-1 α 區域序列之條件為：先以95°C反應5 min，之後進行94°C 45 sec，52°C 45 sec，72°C 2 min，共30個循環，最後再進行72°C 7 min 1個循環；此外鍾與陳等人重新設計之引子對Fftef F/Fftef R進行PCR檢測，反應總體積為10 μ l，包含1 μ l之模板DNA、0.2 μ M的引子、5 μ l之2X聚合酶連鎖反應套組(2X GoTaq Green Master Mix)等。PCR增幅條件先以94°C反應5 min之後，進行94°C 30 sec、72°C 30 sec、74°C 30 sec，共40個循環，最後再進行74°C 5 min 1個循環。增幅後之產物則以1.5% agarose進行電泳分析，本研究所有之PCR反應均於GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)中進行，之後PCR產物以1.5% (w/v) TAE (40 mM Tris, 20 mM Sodium Acetate, 1 mM EDTA, pH 7.5) 瓊脂凝膠進行電泳分析，預期以ef1/ef2與Fftef F/Fftef R引子對PCR檢測後分別可增幅獲得約700 bp與350 bp之專一性DNA條帶。另將PCR產物委託源資生物科技公司進行解序後利用NCBI (National Center for Biotechnology Information)之BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)資料庫進行具病原性菌株之序列分析比對。所利用之引子對序列如下：

ef-1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') /

ef-2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3')

Fftef-F (5'-ATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTATATCTCA-3') /

Fftef-R (5'-GCTCAGCGGCTTCCTATTGTCGAATGTTTAGTTTG-3')

四、徒長病菌抗藥性測試

自2012年與2013年度共分離與鑑定之菌株共137株，選定不同地區來源與水稻品種之徒長病菌共46株菌株，利用單孢分離的方式，培養於PDA平板上。約7天後，利用直徑0.5 cm之打孔器於菌落邊緣挖取菌絲塊，放置於已添加3種不同藥劑成分之PDA平板中央。藥劑成分包含25%撲克拉水基乳劑(臺聯實業股份有限公司) 1,000倍、25%撲克拉水基乳劑500倍、25.9%得克利水基乳劑(臺聯實業股份有限公司) 2,000倍，置於25°C培養箱不照光下培養7天；另以不添加藥劑之PDA做為對照組，每個處理4重覆，待對照組7天後菌絲長滿至培養基周圍時，開始測量菌絲直徑與菌絲生長抑制率。抑制率(%) = 「(對照組菌落直徑 - 試驗組菌落直徑) / 對照組菌落直徑 - 0.5 cm」 × 100%。抗藥性級數訂定如後，菌絲生長抑制率80%以上為0級、

50~80%之間為1級與50%以下為2級。待測量完畢後，3種試驗組之菌絲塊再移回不含任何藥劑之PDA平板上，檢測藥劑抑制徒長病菌之作用方式。

五、統計分析

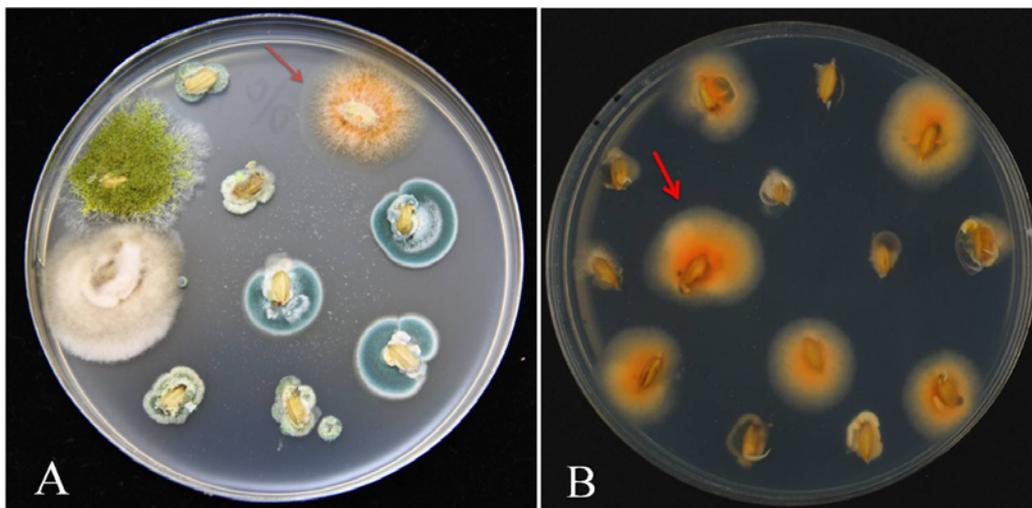
上述所得數據使用Microsoft office Excel 2010及SAS 9.0進行統計分析，並以LSD進行最小顯著差異分析(least significant difference, LSD)，判定各處理間有無顯著差異。

結 果

一、水稻稻種帶菌率檢測與秧苗罹病率調查

(一)水稻稻種帶菌率之檢測

以修正之Komada半選擇性培養基(2012年使用)與FFC半選擇性培養基(2013年使用)檢測稻種帶菌率，若為徒長病菌之特定菌落，培養7~10天後會有明顯的橘色且菌絲稀疏之菌落出現(圖一AB)。經測試後，其結果顯示，2012年1期稻作中以臺梗16號(TK16)之帶菌率最高(2%)、2期作以臺南11號(TN11)之帶菌率為最高(1.91%)；2012年2期作以臺農71號(TNG71)帶菌率最高(1.67%)，臺中秈10號(TCS10)則未檢測出徒長病菌(圖二)，另原原種與原種之種子均未檢測出徒長病菌。

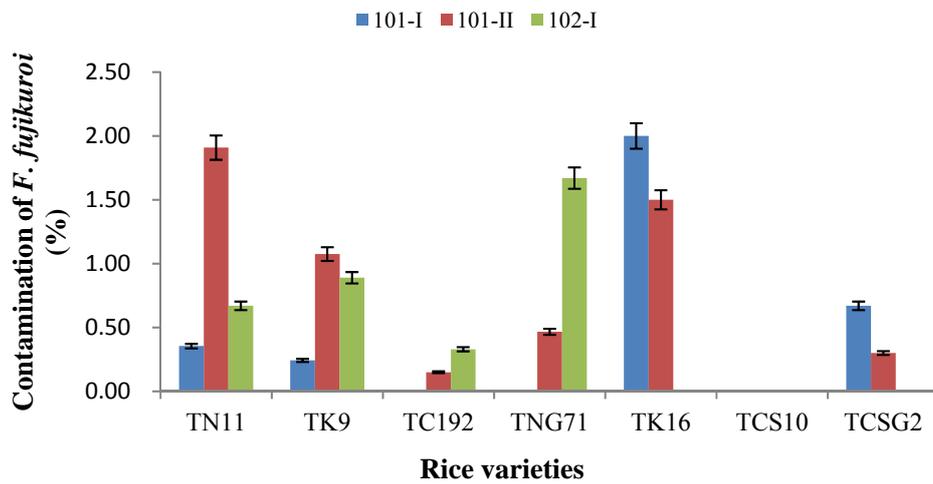


圖一、以修正之 Komada 半選擇性培養基(A)與 FFC (B)半選擇性培養基檢測水稻徒長病稻種帶菌率
Fig. 1. Used modified Komada semi-selective medium (A) and FFC (B) semi-selective medium to detect rice seeds contamination of *F. fujikuroi*.

(二)溫室秧苗罹病率調查

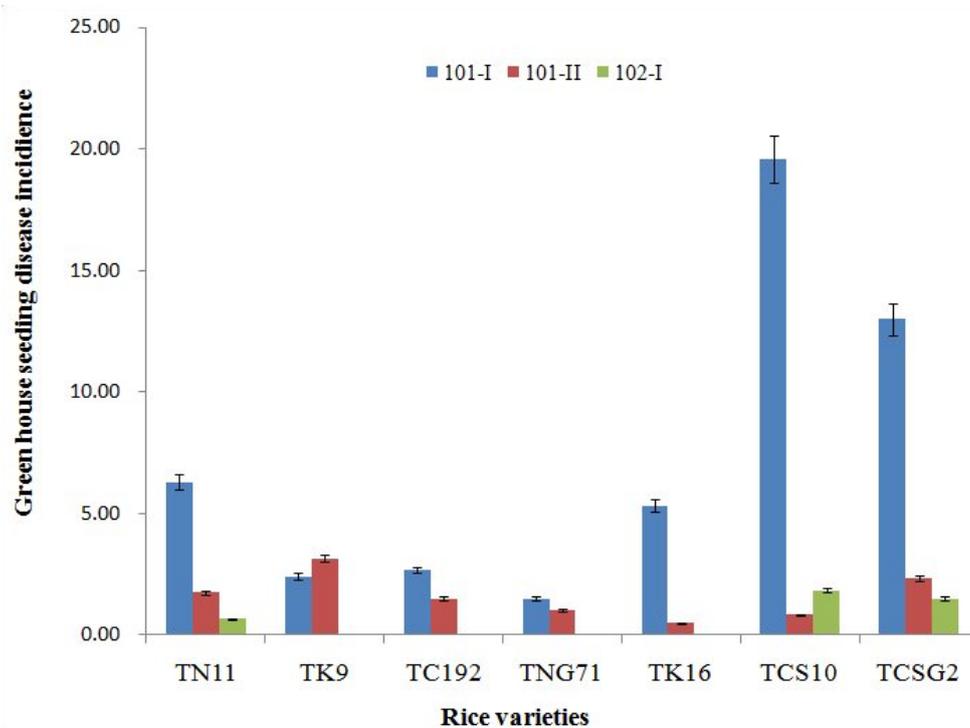
將上述2012年之1期作的稻種以慣行育苗方式，育苗箱放置於溫室中，於秧苗高10 cm與15 cm時各調查1次罹病率，之後加總後再平均。結果顯示以臺南11號、臺梗16號、臺中秈10號與臺中秈糯2號之2012年1期作秧苗罹病率較高，每盤罹病株數介於5~20株，其餘品種之罹病率皆低於5株以下。2012年1期作來源之稻種發生秧苗徒長病，至2013年1期作檢

測結果，僅臺南11號、臺中秈10號與臺中秈糯2號(TCSG2)之秧苗發病，其餘則未發生秧苗徒長病(圖三)，原原種與原種之種子同樣均未發生秧苗徒長病。



圖二、來自不同期作之不同稻種帶菌率檢測結果

Fig. 2. Contamination of *F. fujikuroi* in various rice seeds from different cropping season.

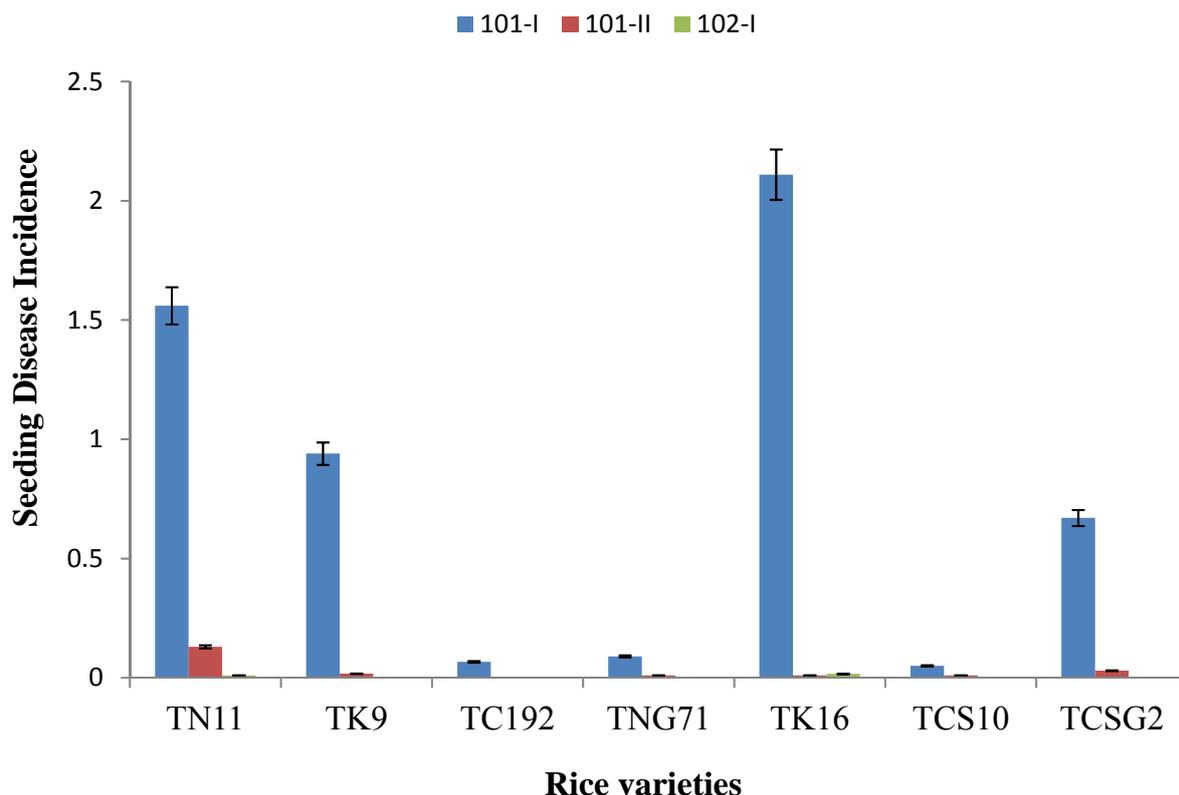


圖三、2012年與2013年一期作不同品種水稻徒長病之溫室秧苗罹病率調查

Fig. 3. Incidence of the bakanae disease on different varieties of rice seedling in greenhouse for first cropping in 2012 and 2013.

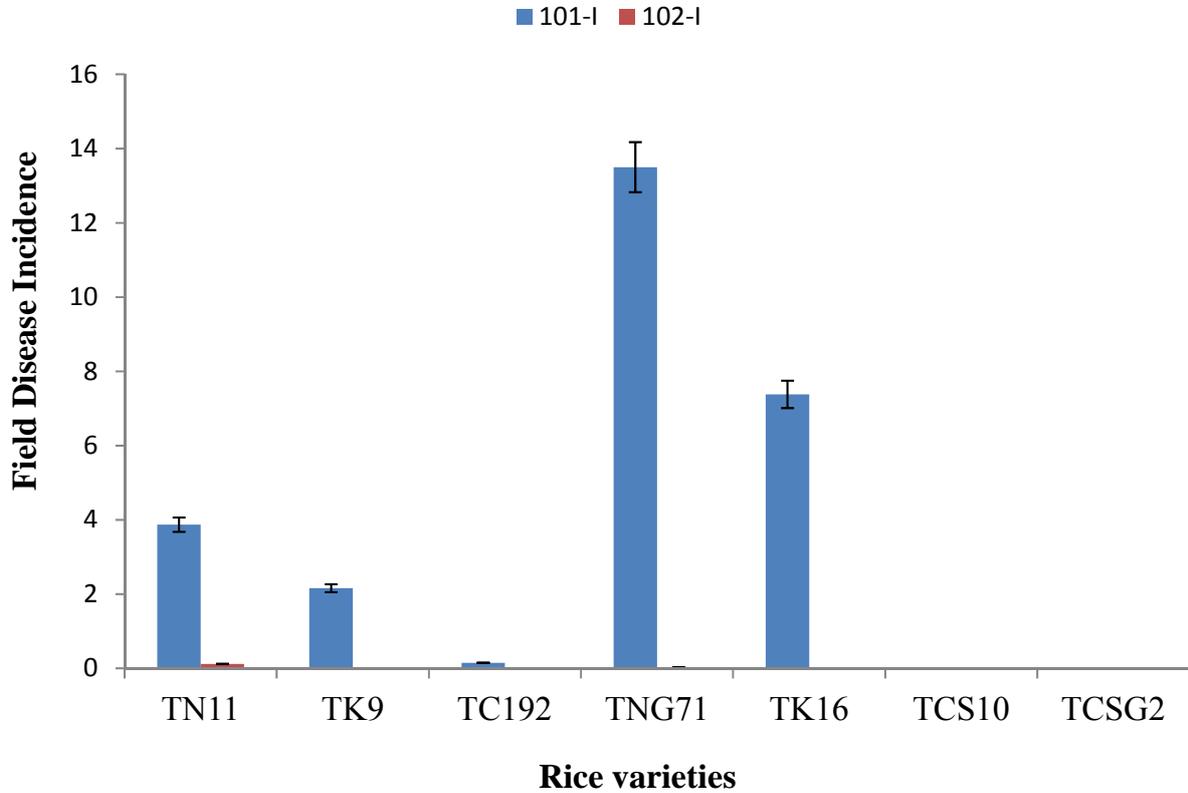
二、育苗場之秧苗期與本田期徒長病罹病率調查

至轄內12家育苗中心，調查2012年1、2期作與2013年1期作之秧苗期徒長病罹病率，仍以臺南11號與臺稈16號罹病率相對高於其他品種，每箱平均罹病株數介於1~2株，僅2012年1期作之秧苗普遍徒長病，至2013年1期作則發生相當輕微(圖四)。追蹤育苗場之秧苗插秧於本田期後，於水稻分蘖盛期進行調查，2012年1期作以臺南11號、台稈9號、臺農71號與臺稈16號發病，平均每500叢之罹病株數介於2~14株之間，以臺農71號為最高。而2013年1期作調查結果則是普遍未發生，僅臺南11號之罹病株數低於1叢以下(圖五)。比較2012年與2013年各期作育苗中心使用稻種消毒藥劑後，秧苗期與本田期之徒長病罹病率表現。2012年僅秧苗期表現出差異，而2013年起大多數之育苗中心皆改用得克利藥劑進行稻種消毒，且秧苗期與本田期之罹病率皆低於1叢以下(表六)，顯示此藥劑可以有效抑制徒長病的發生。另外，在原原種與原種的調查部分，育苗場秧苗期與田間本田期均未發生徒長病菌。



圖四、不同水稻品種於育苗場秧苗期徒長病罹病率調查

Fig. 4. Incidence of the bakanae disease on different varieties of rice seedling in rice seedling nursery centers.



圖五、不同水稻品種於田間水稻分蘗盛期徒長病罹病率調查

Fig. 5. Incidence of the bakanae disease on different rice varieties during rice tillering period in the field.

表六、利用撲克拉與得克利進行稻種消毒後，育苗期至本田期之徒長病罹病率之比較

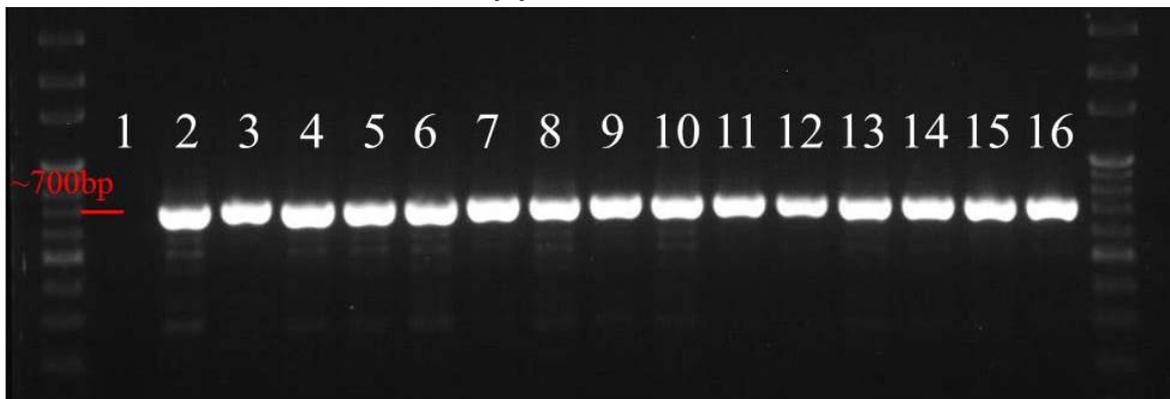
Table 6. Incidence of the bakanae disease in rice seedling and field after sterilizing rice seeds by Prochloraz EW and Tebuconazole EW

Year	Cropping season	Fungicide	Seedling disease incidence	Field disease incidence
2012	I	Prochloraz	1.78a ¹	3.67a
		Tebuconazole	0.14b	3.17a
	II	Prochloraz	0.1b	0c
		Tebuconazole	0.01c	0c
2013	I	Prochloraz	0.13b	0.161b
		Tebuconazole	0.002c	0.004c
	II	Prochloraz	0c	0c
		Tebuconazole	0c	0c

¹ Means with the same letter in each column are not significantly different at 5% probability level by LSD test.

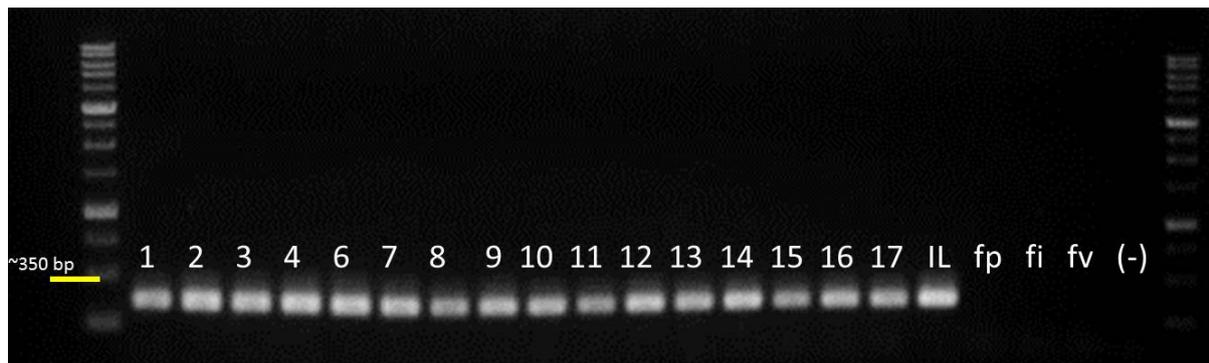
三、水稻徒長病菌之分子生物鑑定與檢測

利用ef-1/ef-2及Fftf F/Fftf R兩組引子對，對代表供試16株徒長病菌之核酸分別可以增幅出約700 bp及362 bp大小之專一性DNA片段(圖六、七)，其他種的*Fusarium* spp.則無此專一性DNA片段，因此上述兩組引子對可作為水稻徒長病菌的分子檢測工具。將兩片段委請源資生物科技公司進行解序分析，解序後之序列上傳於NCBI基因庫中比對，與*Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber (1931) (JN092355.1/KF208627.1)的序列相似度均達99%以上，結果顯示可以確定所分離之病原真菌菌株皆為*F. fujikuroi*。



圖六、以引子對 ef-1/ef-2 進行 PCR 檢測不同來源之水稻徒長病菌

Fig. 6. Polymerase chain reaction pattern from genomic DNA of *Fusarium* isolates, lane2~lane16 are *F. fujikuroi* isolates from rice field, lane 1 is negative control.



圖七、以引子對 Fftf F/Fftf R 進行 PCR 檢測不同來源之水稻徒長病菌及其相似菌株

Fig. 7. Polymerase chain reaction pattern from genomic DNA of *Fusarium* isolates, lane1~17 *F. fujikuroi* isolates from rice field, lane IL is control isolate, lane fp is *F. proliferatum*, lane fi is *F. incarnatum* and lane fv is *F. verticillioides*.

四、徒長病菌抗藥性測試

自臺南11號、臺梗16號、台梗9號、臺中秈10號、臺農71號、臺中192號、臺中秈糯2號等7個品種，分離之徒長病菌株，選擇不同來源之42株菌株為供試菌株，測試其對藥劑之抗藥

性情形。經7天培養後，結果顯示此供試之42株菌株皆可被25%撲克拉水基乳劑1,000倍、25%撲克拉水基乳劑500倍、25.9%得克利水基乳劑2,000倍等藥劑抑制，所有測試菌株之菌絲生長抑制率皆達94.12%以上，顯示所測試之藥劑對於所有供試菌株之抗藥性級數皆於0級(表七)。待測量完畢後，將所測試的菌絲塊移回未添加任何藥劑的PDA上，以同樣溫度條件下培養後，處理撲克拉後的菌絲塊可以恢復生長，而處理得克利藥劑後之菌絲塊則無法生長。

表七、以撲克拉與得克利測試 42 株不同品種來源之水稻徒長病菌株之抗藥性

Table 7. The fungicide resistance test of 42 *F. fujikuori* strains were isolated from different rice varieties by Prochloraz EW and Tebuconazole EW.

Rice varieties	Efficacy of fungicide								
	Prochloraz 500X			Prochloraz 1000X			Tebuconazole 2000X		
	fungicide resistance index			fungicide resistance index			fungicide resistance index		
	0 ¹	1 ²	2 ³	0	1	2	0	1	2
TN11	14	0	0	14	0	0	14	0	0
TK9	9	0	0	9	0	0	9	0	0
TCS10	5	0	0	5	0	0	5	0	0
TK16	5	0	0	5	0	0	5	0	0
TNG71	4	0	0	4	0	0	4	0	0
TCSG2	3	0	0	3	0	0	3	0	0
TC192	2	0	0	2	0	0	2	0	0
Total	42	0	0	42	0	0	42	0	0

¹ inhibited mycelial growth higher than 80%

² inhibited mycelial growth between 50%~80%

³ inhibited mycelial growth lower than 50%

討 論

水稻徒長病菌在臺灣普遍性的發生，尤其近年在花蓮、臺東地區之徒長病菌發生日趨嚴重，近年來在中部地區也越常普遍看到徒長病菌的發生，除了會造成產量上的減損外，對於水稻田的整體景觀亦造成影響。良好的採種田管理決定稻種的品質，採種農戶應慎選採種田，避免設於曾經罹患徒長病之稻田，若在田間發現少量徒長病菌罹病株，應隨時拔除以減少感染源。此外，採種農戶應加強收穫之稻種去偽去雜與風選作業，如此可避免含有大量病菌之病秕在浸種催芽過程中感染鄰近健康的稻種⁽¹⁶⁾。故防治水稻徒長病之策略著重在採種田的管理、藥劑的選擇與徹底執行稻種消毒。

本研究於2012年至2013年於轄內調查徒長病的發生情形，自12家大型育苗中心提供之2012年1, 2期與2013年1、2期之稻種，其中包含原原種與原種，進行徒長病菌稻種帶菌率調查、溫室秧苗罹病率檢測；調查育苗中心之秧苗罹病率，並追蹤至本田期，調查其罹病率。綜合兩年作稻種徒長病帶菌分析結果：不同的品種在稻種帶菌率皆有差異，僅臺中秈10號未檢出；溫室苗期徒長病在每個供試品種皆普遍發生，來自2012年1期之稻種，以臺南11號、臺

中秈10號、臺梗16號與臺中秈糯2號平均罹病株數最高，介於5~20株之間。2012年2期作與2012年1期作之稻種每箱平均罹病株數皆低於5株以下。育苗中心綠化場秧苗罹病率發生情形，2012年1期作之罹病率以臺南11號與臺梗16號相對高於其他品種，2012年2期作與2013年1期作之秧苗罹病率皆相當輕微，均低於1株以下。追蹤至本田期之罹病率調查結果，以2012年1期作之臺南11號、台梗9號、臺農71號與臺梗16號每500叢之罹病率介於2~14株。2013年1期作之罹病率皆低於1株以下。對照不同品種之帶菌率與溫室、田間罹病率比較，臺梗16號於2012年1、2期作種子帶菌率高，符合溫室與田間罹病率；臺中秈10號種子未測得帶菌情形，而在2012年1期作徒長病罹病率高；臺南11號、台梗9號與臺農71號於2012年2期作及2013年1期作之帶菌率高，而溫室與田間罹病率則很低。說明種子帶菌率之結果並無法完全符合徒長病在田間之罹病率，可能原因為測試結果僅呈現水稻種子之帶菌比率，無法評估在水稻種子上之帶菌量所致。綜合以上結果顯示，2012年1期作大多數育苗業者仍選用25%之撲克拉水基乳劑進行稻種消毒，而自2013年1期作起，大部份的育苗中心已改用25.9%得克利水基乳劑進行稻種消毒，顯示此藥劑確實可以有效防治徒長病的發生。除藥劑的選擇以外，利用半選擇性培養基的檢測，也可降低罹患徒長病的風險。以往研究對鐮孢菌屬*Fusarium*之病原菌，常使用Komada或是SSM medium^(22,27)，但仍無法區分*F. fujikuroi*與其他型態相似的*Fusarium*屬之真菌，應用許⁽⁹⁾所研發之FFC medium，可以有效的區分*F. fujikuroi*與其他真菌。在分子檢測的部份，利用David等人與鍾等人研發之引子對ef-1/ef-2⁽¹⁷⁾與Fftf F/Fftf R，以PCR方式可增幅出專一性之DNA條帶，經解序後皆為*G. fujikuroi*，顯示此兩組引子對可以作為偵測徒長病菌之工具。本研究分離與鑑定的菌株為137株，其中選擇不同品種來源的徒長病菌株共42株，進行抗藥性檢測試驗，以25%撲克拉水基乳劑500倍與1,000倍，25.9%得克利水基乳劑2,000倍檢測對徒長病菌之菌絲生長抑制率，結果抑制率均達94.2%以上，顯示目前分離的菌株未產生抗藥性，但將測試的菌絲塊回分於不含藥劑的馬鈴薯瓊脂培養基後，撲克拉處理的菌絲塊可以恢復生長，但得克利處理後的菌絲塊則無法生長，推測撲克拉藥劑僅能抑制徒長病的菌絲生長，而得克利藥劑可以殺死菌絲的作用。綜合以上結論，水稻徒長病的防治策略可採用：取得乾淨的稻種、正確藥劑的選擇得宜、浸種消毒時的濃度與步驟確實，方能保障產生健康的秧苗，有效降低田間徒長病之發生與危害。

誌 謝

本研究承行政院農委會動物植物防疫檢疫局「水稻病害防疫技術開發與疫情整合管理(101農科-14.2.1-檢-B3)」與「水稻病害安全防疫技術開發與疫情整合管理(102農科-14.2.1-檢B3(2)」計畫支持，特致謝忱。本試驗承蒙彰化、臺中與南投水稻育苗中心提供稻種給予研究；本場水稻研究室楊嘉凌博士給予統計結果的指導；生物資材應用研究室鄭景峰先生、吳巧凌與洪玉玲小姐在試驗上的協助，以及中興大學植物病理系陳啟予老師與許晴情小姐在半選擇性培養基的研究指導，謹此誌謝。

參考文獻

1. 宇國勝 1975 影響稻苗徒長病發生因子之研究碩士論文 國立中興大學植病研究所。
2. 宇國勝、孫守恭 1976 稻苗徒長病菌子囊孢子之逸散與稻種污染 植保會刊 18: 319-32。
3. 朱盛祺、蔣夢心、陳致延、黃德昌 2010 臺東地區水稻徒長病發病率調查與防治技術之改進 臺東區改良場研究彙報 20: 57-70。
4. 孫守恭 1978 稻苗徒長病菌*Gibberella fujikuroi*之生態及生殖 pp.303-317。
5. 陳又嘉 2014 臺灣水稻徒長病菌族群之遺傳組成、病原性及藥劑耐受性分析 碩士學位論文 國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程。
6. 許晴情、賴明信、林宗俊、黃振文、陳啟予 2013a 稻種感染徒長病菌與成株水稻發生徒長病之關聯 中華民國植物病理學會刊(submitted)。
7. 許晴情、黃振文、陳啟予 2013b 探討臺灣造成水稻徒長病之病原菌 中華民國植物病理學會刊(submitted)。
8. 許晴情、賴明信、林宗俊、黃振文、陳啟予 2013 水稻徒長病之致病特性及偵測方法 2013 重要作物病原檢測暨管理研討會 75-87。
9. 許晴情 2013 水稻徒長病：開發鑑別性培養基、建立病害評估平臺及探討土壤接種源之角色 碩士學位論文 中興大學植物病理學系。
10. 郭建志、廖君達 2010 中部地區水稻徒長病與線蟲白尖病之發生與調查 臺中區農業改良場研究彙報 108: 13-24。
11. 張義璋 1973 稻苗徒長病菌有性世代及生態之研究 國立中興大學植病研究所第三屆畢業碩士論文。
12. 張義璋、孫守恭 1975 稻苗徒長病病原菌之有性世代 中華農業研究 24: 11-20。
13. 張義璋 1984 稻苗徒長病之傳播途徑 p.26-37 臺灣省政府農林廳編印 稻種消毒研討會專刊。
14. 張義璋 2003 水稻徒長病 植物保護圖鑑系列8—水稻保護：第256-257頁 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版 臺北。
15. 黃德昌、朱盛祺 2009 臺灣水稻徒長病之發生與防治 臺灣水稻保護成果及新展望研討會專刊 p. 29-43。
16. 廖君達、郭建志 2009 水稻稻種及秧苗病蟲害管理 植物種苗 11(2): 1-10。
17. Amatulli, M. T., D. Spadaro, M. L. Gullino and A. Garibaldi. 2010. Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. Plant Pathol. 59: 839-844.

18. Amatulli, M. T., D. Spadaro, M. L. Gullino and A. Garibaldi. 2012. Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. *Eur. J. Plant Pathol.* 134 (2): 401-408.
19. David, M. G., M. M. J. Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau and K. O'Donnell. 2004. Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 473-479.
20. Desjardins, A. E., H. K. Manadhar, R. D. Plattner, G. G. Manadher, S. M. Poling and C. M. Maragos. 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1020-1025.
21. Hsuan, H. M., B. Salleh and L. Zakaria. 2011. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 6722-6732.
22. Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Protect. Res.* 8: 114-125.
23. Mew, T. W. and P. Gonzales. 2002. A handbook of rice seedborne fungi. *Int. Rice Res. Inst. Manila, Philippines.* 83 pp.
24. Mandal, D. N. and S. Chaudhuri. 1988. Survivability of *Fusarium moniliforme* Sheld. under different moisture regimes and soil conditions. *Int. J. Tropical Plant Dis.* 6(2): 201-206.
25. Ou, S. H. 1984. Rice Diseases. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey England. p. 262-272.
26. Sawada, K. 1919. Descriptive catalogue of Formosan fungi. I. Rept. Dept. Agr. Gov. Res. Inst. Formosa. 19: 1-675.
27. Vaidya, R. J., S. L. Macmil, P. R. Vyas, L. V. Ghetiya, K. J. Thakor and H. S. Chhatpar. 2003. Biological control of *Fusarium* wilt of pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Millsp with chitinolytic *Alcaligenes xyloxydans*. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 1469-1472.

Investigation of Rice Bakanae Disease in Central Taiwan: Occurrence, Pathogen Identification, and Fungicide Resistance Assay¹

Chien-Chih Kuo², Chung-Ta Liao², Don-Chin Huang², Yu-Chia Chen³ and Chia-Lin Chung³

ABSTRACT

The bakanae disease is an important rice seedborne disease. It was caused by fungal pathogen *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber. This disease spread in central Taiwan these years and becoming more serious. The aims of this study were to survey the occurrence of bakanae disease in rice seedling nursery and in the field nursing stage, testing the seed contamination rate caused by *G. fujikuroi* and morbidity rate of greenhouse grown seedlings, identification and detection of *G. fujikuroi* by DNA molecular markers, and fungicide resistance assay. The total sums of 52 batches of rice seeds from rice nursery centers in 2012 were collected, and 36 batches of rice seeds in 2013, in which breeder's seed, foundation seed and certified seeds were collected. The rice seeds were collected from 12 rice seedling nursery centers in central Taiwan. The percentage of *G. fujikuroi* contamination for rice varieties Tanan 11, Taikeng 9, Taikeng 16 and Tainong 71 were more than others by using the semi-selective komada and FFC medium. The incidence of the bakanae disease of rice first cropping season was higher than rice second cropping season during rice seedling stage and in the field in survey years. Furthermore, the rice varieties Tanan 11, Taikeng 16 and Taichung Sen 10 contaminated percent of *G. fujikuroi* were more than others. The incidence of bakanae disease during rice seedling stage was below 1%, as most of seedling nursery centers had changed fungicide prochloraz to tebuconazole in 2013. The incidence of bakanae disease on rice plants was below 1 hill per 500 hills in the field. In addition, the breeder's and foundation seeds were not contaminated by *G. fujikuroi*, the bakanae disease was not found in rice

¹ Contribution No. 0843 from Taichung DARES, COA.

² Assistant Researcher, Associate Researcher and Research Assistant of Taichung DARES, COA., respectively.

³ Master's degree student and Assistant Professor of Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University.

seedling and in the field in 2012. The study used the specific primer set ef-1 and ef-2, Fftf F and Fftf R, which were designed to the known special DNA fragment (translation elongation factor 1- α , TEF 1- α) of *Fusarium* spp. and *G. fujikuroi*, respectively. The result showed that 700 bp and 350 bp DNA fragment were amplified by polymerase chain reaction, with the primer set of ef-1 and ef-2, Fftf F and Fftf R, respectively. After sequencing, all strains were identified as the *G. fujikuroi*. We selected 42 strains from 137 *G. fujikuroi* strains to evaluate the fungicide resistance to prochloraz and tebuconazole. Results showed that 42 *G. fujikuroi* strains could be inhibited by 25% prochloraz EW diluted 500 and 1,000 fold, 25.9% tebuconazole EW diluted to 2000 fold. However, the *G. fujikuroi* mycelium could recover on potato dextrose agar by prochloraz treatment. It was shown that rice seeds disinfected incompletely could enhance the outbreak of the bakanae disease. As most seedling nursery centers have used tebuconazole fungicide to disinfect rice seeds, it could decrease incidence of the rice bakanae disease effectively.

Key words: rice bakanae disease, semi-selective medium, rice seed