

水稻徒長病菌鑑別培養基之研發¹

許晴情²、陳啟予³、黃振文³

摘 要

由病原真菌*Fusarium fujikuroi*所引起的水稻徒長病(Bakanae disease of rice)是重要的水稻病害之一，雖以播種前進行種子消毒為主要的防治方式，然此病害仍不時在田間普遍發生。本病主要透過種子傳播，若能在稻種播種前即時偵測其帶菌率，進一步與秧苗期之發病率連結，便能預先排除帶菌率高者進入苗盤種植，減少秧苗期與本田期的危害。為了能夠偵測出稻穀之帶菌情形，本研究開發的水稻徒長病菌鑑別培養基，定名為FFC培養基，其配方為20 g Galactose、2 g L-asparagine、1 g K₂HPO₄、0.5 g MgSO₄·7H₂O、0.5 g KCl、0.01 g Fe-Na-EDTA、1 g Na₂B₄O₇·10H₂O、20 g agar 與1 L 水。將其pH值調整為4.5，經高溫高壓滅菌後添加1 ppm 放線菌酮、2 ppm大克爛、5 ppm腐絕、10 ppm福多寧、1 ppm依普同、1,000 ppm氯化鋰及200 ppm氯黴素。本鑑別培養基可鑑別出稻種上常見的*Fusarium* 種類，甚至可區別形態上極為相似的*F. proliferatum*。

關鍵詞：水稻徒長病、水稻徒長病菌、鑑別性培養基、五氯硝基苯

前 言

水稻徒長病最早於1828年於日本已有本病害記載⁽¹⁵⁾，如今在全球各地水稻主要產區皆有危害。危害嚴重的稻田，可減產達40%⁽²⁴⁾。近幾年來，在臺灣東西部均造成嚴重危害，尤以臺東與花蓮地區最為嚴重，抽穗期田間可見許多「高人一等」的病株。由於種子帶菌為最主要之感染途徑，種子消毒為長久以來控制本病害之策略，並慣行施用化學藥劑(如撲克拉、得克利等)或微生物⁽¹⁷⁾進行種子消毒來防治此病害。然而此病仍是一而再的復發。前人研究顯示，臺灣水稻徒長病菌株可能已對常用的稻種消毒藥劑(撲克拉及得克利)產生抗藥性^(2,5,6,7)，而追溯本源，若能在種植前先一步進行種子檢查，偵測其徒長病菌之存在多寡，進一步預測種子播種至苗盤之發病率，即能預先避免播種高帶菌率之種子，以降低秧苗期的危害，並減少田間徒長病株發生率。根據目前水稻良種繁殖三級制度，稻種提供流向為：中央主管機關管轄的原原種田生產原原種種子(foundation seed)；再由縣(市)政府輔導優良農民設置原種田，育出原種種子(registered seed)；最後由鄉鎮農會委託經驗良好之育苗業者設置採種田，以原種

¹行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 1014 號。

²行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

³國立中興大學植物病理學系副教授、教授。

生產採種種子(certified seed)，各主管機關將針對原原種、原種及採種三者進行種苗檢查。從種子傳播病害防堵的角度而言，若能於種苗檢測時及時偵測病原菌，則可以對原原種子與原種子及採種種子進行把關，生產健康無病菌之種子。偵測種子病原菌常用的方法是利用選擇性培養基進行偵測與專一性引子進行偵測。Amatulli等人⁽⁹⁾利用水稻徒長病菌在Transcription elongation factor 1 α (TEF 1- α)片段上具有識別性的區域，設計水稻徒長病菌的專一性引子對，能偵測存在於水稻罹病組織與種子內的病原菌，但此法針對大量的種子進行檢測時，僅能測出有無大量病原菌的存在，無法反應受到污染的種子所占比例。此外，能否預測育苗盤上秧苗的發病狀況不得而知。若能發展偵測水稻徒長病菌鑑別性培養基，取得帶菌率與苗期發病率的關係，則可進一步在源頭端對種子品質把關，應可阻絕病害在育苗盤上發生。

在水稻種子上亦常出現許多和水稻徒長病菌同屬之*Fusarium*真菌⁽²¹⁾，如*F. graminearum*、*F. semitectum*、*F. oxysporum*、*F. solani*等，甚至包括有和水稻徒長病菌形態相似，同屬於*F. fujikuroi* species complex(FFSC)複合種之*F. proliferatum*與*F. verticillioides*⁽¹²⁾，其中又以*F. proliferatum*和水稻徒長病菌無論是形態上或是DNA序列上皆極為相似而難以區分。目前已有針對鐮孢菌*Fusarium*屬開發許多選擇性培養基，如Nash-Snyder培養基^(22,23)、Malachite Green Agar⁽¹¹⁾、PDID (Potato Dextrose Iprodione Dichloran Agar)⁽⁸⁾、Rb-UG (Rose Bengal-Glycerine-Urea Medium)⁽²⁸⁾及CZID (Czapek Dox Iprodione Dichloran Agar)⁽⁸⁾等。然而這些針對*Fusarium*所設計出的選擇性培養基僅能簡易分辨出此屬之真菌，無法專一的辨別出水稻徒長病菌*Fusarium fujikuroi*，只有Komada培養基⁽¹⁹⁾可以偵測分離出*F. oxysporum*；SSM (Specific Screening Medium)⁽²⁹⁾可以偵測分離出*F. pseudograminearum*。所以針對水稻徒長病菌，仍有必要另行開發出能專一性選擇分離該病菌之培養基。在前述慣用之*Fusarium*選擇性培養基中，Nash-Snyder培養基、Komada培養基及Rose Bengal-Glycerine-Urea agar皆使用五氯硝基苯(Pentachloronitrobenzene, PCNB)，其致癌性已遭多國明令禁用^(14,27)，目前已不易取得，造成研究上之困難。

本研究希望能夠從前人發展成熟的多種*Fusarium* spp.選擇性培養基中，找尋適合水稻徒長病菌生長的基礎培養基，而後測試能抑制其他快速生長的*Fusarium* spp.的藥劑以替代五氯硝基苯，進而評估多種水稻上常出現之*Fusarium* spp.生長狀況，最後找出合適的基礎培養基與藥劑配方，完成培養基之開發。

材料與方法

一、菌株來源、收集及鑑定

本試驗供試菌株之來源及收集方式分為兩種：

(一)自罹病組織分離：採集水稻徒長病株，切取褐化莖稈片段約1 cm²大小，浸泡1%次氯酸鈉溶液30秒後，以滅菌過的蒸餾水漂洗30秒，再以無菌濾紙吸乾，置於Komada 培養基上，於每日12小時光照，28°C下置於培養箱中培養，四天後可觀察到菌絲自罹病組織上長出，切取單一菌絲進行分離。

(二)自稻穀分離：自全臺各農業試驗改良場取得之100年第二期稻作稻穀，置於1.5%水瓊脂(water agar, WA)上，於每日12小時光照，28°C，5天後切取單菌絲獲得的菌株。

前述方式獲得的菌株，依據The *Fusarium* Laboratory Manual⁽²⁰⁾之物種描述，將菌株移植至Spezirller Nahrsypffarmer Agar (SNA) 與Carnation Leaf Agar (CLA)，以觀察其微觀之產孢構造；移植至Potato Dextrose Agar (PDA)以觀察其巨觀之菌落形態。除形態鑑定外，針對*Fusarium* spp.之translation elongation factor (TEF 1- α)序列，以EF-1 and EF-2引子對，依照Amatulli等人發表⁽⁹⁾之增幅條件進行PCR後定序，並與美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)網站之核酸基因庫序列群組分析程式(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)與基因庫中的序列進行相似度比對。

二、測試最適基礎培養基

以既有的*Fusarium*選擇性培養基(去除抑菌物質)進行測試，包含Nash-Snyder 培養基⁽²²⁾、Komada 培養基⁽¹⁹⁾、Tochinai培養基⁽¹⁶⁾、Bilai培養基、D.B.G培養基⁽³²⁾、Park培養基⁽¹⁶⁾、Selective *Fusarium* agar (SFA)、Rose Bengal-Glycerine-Urea 培養基(RbGU)及PDA培養基。測試菌株為*F. fujikuroi* IL01、TJ01、*F. semitectum* 菌株FSEM1(分離自斗六的臺農84號穀粒)、*F. verticillioides*菌株FVR及*F. proliferatum* 菌株FP1。單孢培養於1.5%水瓊脂(water agar, WA)上培養七天後，以1號打孔器切取菌落邊緣的菌絲塊(直徑4 mm)，再將菌絲塊置於不同的基礎培養基平板中央，每1培養基平板為1重複，每處理有4重複。平板置於每日12小時光照的28°C定溫箱中培養五天後，以數位相機(D80, Nikon Ltd, Japan)拍照記錄菌落的形態，並同時以下列方式量取菌落的大小：

$$\text{菌落大小} = \frac{(\text{最短菌落直徑} + \text{最長菌落直徑})}{2} - \text{菌絲塊直徑}(4 \text{ mm})$$

三、篩選具抑制非*F. fujikuroi*菌株之他種*Fusarium*屬菌株之抑制劑

選擇共計十二種藥劑抑菌物質：十六烷基三甲基溴化銨(cetyl trimethylammonium bromide, CTAB)、放線菌酮(cycloheximide)、撲克拉(Prochloraz)、免賴得(Benomyl)、腐絕(Thiabendazole)、五氯硝基苯(pentachloronitrobenzene, PCNB)、賓克隆(Pencycuron)、福多寧(Flutolanil)、孔雀綠(malachite green)、玫瑰紅(rose bengal)、腐絕(Thiabendazole)及大克爛(Dicloran)。以前述Komada基礎培養基(後以dKomada培養基簡稱)，內含20 g Galactose、2 g L-asparagine、1 g K₂HPO₄、0.5 g MgSO₄·7H₂O、0.5 g KCl、0.01 g Fe-Na-EDTA、1 g Na₂B₄O₇·10H₂O、20 g agar

與1L水，利用10%磷酸將pH值調整為4.5，經高壓滅菌(121°C，15 lb，15 min)後，當培養基溫度降至約為50-60°C時，將上述藥劑以1 ppm 與10 ppm最終濃度配置成為培養基平板。將水稻徒長病IL01與TJ01菌株、*F. semitectum* FSEM1菌株、*F. verticillioides* FVR菌株及 *F. proliferatum* FP1菌株單孢培養於1.5% WA上，每日12小時光照，28°C於定溫箱中培養七天，再以1號打孔器切取菌落邊緣的菌絲塊(內直徑4 mm)，再將菌絲塊置於不同的基礎培養基平板中央，每一培養基平板為1重複，每處理有4重複。平板置於每日12小時光照的28°C定溫箱中培養四天後，並量測菌落大小，計算方式同前述。

依據前述篩選出腐絕及大克爛於不同濃度下對水稻徒長病菌發芽管長度之影響：dKomada培養基經高溫高壓滅菌並冷卻後，分別製成含1、2、3、4或5 ppm的大克爛或腐絕培養基平板，隨後取徒長病菌IL01與TJ01兩菌株的孢子懸浮液(濃度約 5×10^5 spores/mL)20 μ L滴到受測培養基平板上。對照組則以無添加腐絕或大克爛之dKomada培養基做對照。上述試驗培養於28°C中光照培養12小時，切取平板的瓊脂塊置於載玻片上並以蓋玻片壓平，至於光顯微鏡下鏡檢，同時以數位相機(D5200, Nikon, Japan)拍攝，再以軟體Image J測量數位影像中病原菌發芽管的長度，每重複逢機測量25個分生孢子，每處理有4重複。

四、測試氯化鋰(Lithium chloride)與氯黴素(Chloramphenicol)之適合濃度

依參考文獻⁽³¹⁾中所使用之氯化鋰(Lithium chloride)濃度，於dKomada培養基中添加氯化鋰並調整至1,000-5,000 ppm;而氯黴素同樣添加於dKomada培養基中，並調整最終濃度為50、100、150或200 ppm，並將水稻徒長病菌株IL01與TJ01之菌絲塊放置兩培養基上。培養條件及菌落量測大小同前述。

五、比較所開發出之FFC鑑別性培養基與Komada 培養基之效果

設計出選擇性培養基之配方為20 g Galactose、2 g L-asparagine、1g K_2HPO_4 、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.5 g KCl、0.01 g Fe-Na-EDTA、1 g $Na_2B_4O_7 \cdot 7H_2O$ 與1 L水。將pH值調整為4.5後，經高溫高壓滅菌冷卻過後加入1 ppm 放線菌酮、2 ppm大克爛、5 ppm腐絕、10 ppm福多寧、1 ppm依普同、1,000 ppm氯化鋰、及200 ppm氯黴素，將此培養基命名為FFC培養基，並與普遍使用於分離*Fusarium*的Komada培養基進行比較。將水稻上分離的*F. fujikuroi* (L01、TJ01、TNTN1132、TNKH14559及SDB2菌株)、*F. semitectum*(FSEM1菌株)、*F. verticillioides*(FVR、FVC菌株)及*F. proliferatum*(FPA2、FPA3及FP01菌株)培養於1.5% WA上七天後，以4 mm 打孔器打成菌絲塊，置在上述兩種培養基配方中，置於每日12小時光照的28°C定溫箱中培養5天後進行記錄，並以數位相機(D80, Nikon, Japan)拍照記錄菌落的形態。

六、FFC鑑別性培養基對*F. fujikuroi*菌株回收效能測試

將IL01菌株配製成濃度為 1×10^5 spores / mL的孢子懸浮液，取60 mL後，加入120顆水稻(臺南11號，TN11)種子進行浸泡。連續搖瓶以120 r.p.m. 於28°C下浸泡30分鐘後，除去多餘的菌液，將種子陰乾1小時，取60顆種子，以40 ml無菌水在28°C、120 r.p.m震盪15分鐘。取5 μ L前述種子震盪液，計算其孢子數，重複3次取其平均，回推500 μ L種子震盪液中含有之水稻徒長病菌量作為原始菌量。回收菌量計算則由種子震盪液另取500 μ L均勻塗佈在FFC培養基、Komada培養基、dKomada培養基平板上，於28°C，12小時光照下培養四天後計數每一平板培養基上的水稻徒長病菌落數與雜菌落數(細菌與真菌)，每處理5重複。回收率(Recovery efficiency)的計算方式為：

$$\text{回收率(\%)} = (\text{回收菌量} \div \text{原始菌量}) \times 100$$

七、徒長病菌於自然帶菌種子與人工帶菌種子在FFC鑑別性培養基上之形態

以人工帶菌種子製備：參考Kato等人⁽¹⁸⁾製備人工帶菌種子。將人工帶菌種子，隨機取種子置FFC鑑別性培養基上，每皿14顆種子，共放置140顆。由行政院農業委員會臺南區改良場所提供之水稻(臺南11號，TN11)自然種子，隨機取種子置FFC鑑別性培養基上，每皿14顆種子，共放置140顆。種子放置完成，將培養基置於28°C下、12小時光照培養5天後，記錄其形態。

結 果

一、供試菌株分離及鑑定

(一)菌株的分離與形態鑑定

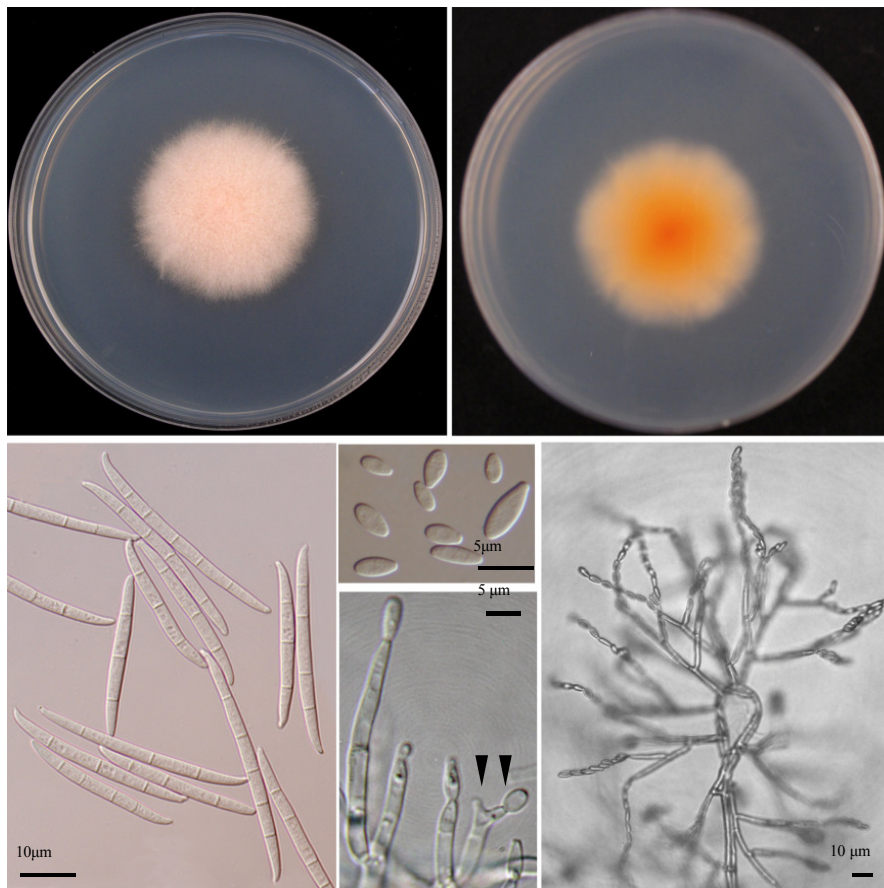
針對水稻及其他基質上所分離的菌株共12株(表一)。經形態學、分子學鑑定之結果，其中得到*F. fujikuroi*菌株共5株、*F. proliferatum*之菌株共3株、*F. verticillioides*共2株及*F. semitectum* 1株。

*F. fujikuroi*的菌株在PDA上會產生淡粉紅色氣生菌絲(圖一A)，背面色素為淡橘色(圖一B)，少數為紫色。有些菌株具黏膜狀的菌落形態，產孢能力差，氣生菌絲減少。於Spezirller Nahrspffarmer Agar (SNA)上，其小分生孢子為呈卵形至棍棒狀(圖一D)，一端扁平，無隔膜，長為4.8-10.5 μ m，平均值為6.0 μ m；寬為2.6-5.2 μ m，平均值為3.5 μ m；小孢子著生於單瓶狀枝或多瓶狀枝的分生孢子梗上，呈中短鏈或呈假頭狀排列(圖一E及F)。大多數菌株會產生大分生孢子(圖一C)，大孢子長為33-52 μ m，平均值為41 μ m；寬為5.0-13.5 μ m，平均值為8.9 μ m，形狀瘦長且兩端為內彎，頂細胞(apical cell)呈彎曲狀，基細胞(basal cell)形

狀較不明顯，隔膜數3-5，且未觀察到厚膜孢子。培養久後會在培養基上產生肉眼可見的淡橘色分生孢子褥。

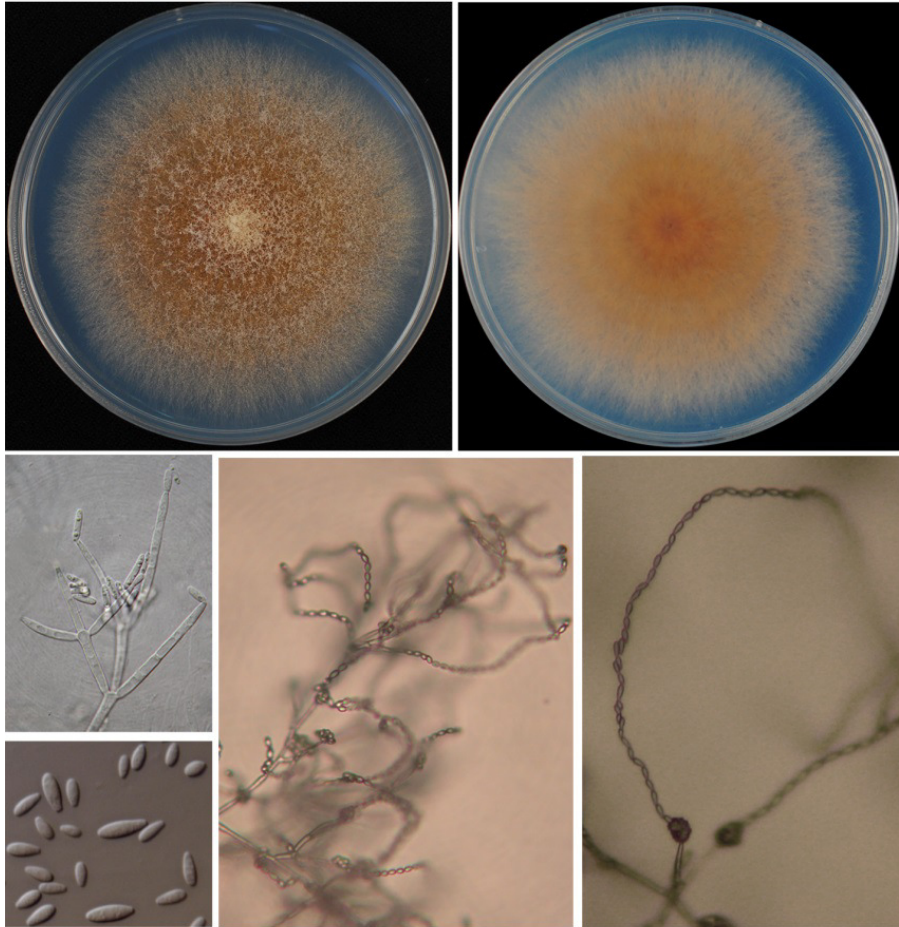
*F. proliferatum*於PDA上生長較*F. fujikuroi*快，菌落氣生菌絲茂密，常有不規則的菌落邊緣。背面色素多呈紫灰色至白色。

*F. verticillioides*於PDA上生長較*F. fujikuroi*快，菌落可見氣生菌絲，背面色素呈橘色、淡紫色至白色(圖二A及B)。其小孢子著生於單瓶狀枝的產孢細胞上，以極長鏈方式鏈狀(>30顆小孢子)排列於產孢梗上，此外，亦有假頭狀累積之產孢梗散生其中，幾乎不產生大孢子(圖二C-F)。



圖一、*Fusarium fujikuroi* IL01 菌株型態。(A)培養於 PDA 之菌落正面；(B)培養於 PDA 之菌落背面；(C)大孢子；(D)小孢子；(E)複瓶狀枝產孢梗(箭頭指處)；(F)小分生孢子短鏈狀著生。

Fig. 1. Morphology of *Fusarium fujikuroi* isolate IL01(A)Colony on PDA medium; (B)Reverse side of colony on PDA medium; (C)Macroconidia; (D)Microconidia; (E)Polyphialidic conidiogenous cell (arrowhead); (F)Microconidia in short chains.



圖二. *F. verticillioides* FVR菌株型態。(A)培養於PDA之菌落正面；(B)培養於PDA之菌落背面；(C)小孢子長鏈狀著生；(D)小孢子；(E-F)小孢子以長鏈狀排列於產孢梗。

Fig. 2. Morphology of *F. verticillioides* isolate FVR (A) Colony on PDA medium; (B) Reverse side of colony on PDA medium; (C) Monophialidic conidiogenous cell; (D) Microconidia; (E-F) Microconidia in long chains.

表一、本研究所使用的菌株與分離來源

Table 1. *Fusarium* spp. used in this study

<i>Fusarium</i> species	Isolate designation	Source	GenBank	
			Identity(%)	Species
<i>Fusarium fujikuroi</i>	IL01	Diseased rice stem	100.0	<i>F. fujikuroi</i>
	TJ01	Diseased rice stem	100.0	<i>F. fujikuroi</i>
	TNTN1132	Diseased rice stem	100.0	<i>F. fujikuroi</i>
	TNKH14559	Diseased rice stem	99.8	<i>F. fujikuroi</i>
	SDB2	Nature rice seed	100.0	<i>F. fujikuroi</i>
<i>F. semitectum</i>	FSEM1	Nature rice seed	99.0	<i>F. semitectum</i>
<i>F. proliferatum</i>	FPA2	Nature rice seed	100.0	<i>F. proliferatum</i>
	FPA3	Nature rice seed	100.0	<i>F. proliferatum</i>
	FP1	Orchid	100.0	<i>F. proliferatum</i>
<i>F. verticillioides</i>	FVR	Nature rice seed	100.0	<i>F. verticillioides</i>
	FVC	unknown	100.0	<i>F. verticillioides</i>

表二、不同*Fusarium*屬種類在不同培養基上之菌落半徑Table 2. Effect of different media on the growth of different *Fusarium* species

Basal medium ²	Colony size (mm) ¹				
	IL01 ³	TJ01	FSEM1	FVR	FP1
dKomada	26.0 ± 0.6 b	29.2 ± 0.2 a	25.8 ± 0.3 b	29.7 ± 0.4 a	25.6 ± 0.4 b
NSBM	28.1 ± 0.4 c	27.0 ± 0.2 c	37.3 ± 0.2 b	46.5 ± 0.6 a	44.3 ± 0.5 a
Tochinai	31.0 ± 0.2 c	31.7 ± 0.3 c	37.5 ± 2.2 b	46.6 ± 0.3 a	43.5 ± 0.2 a
Bilai	24.6 ± 0.3 c	26.0 ± 0.4 b	43.0 ± 0.2 a	43.8 ± 0.6 a	28.3 ± 1.2 b
D.B.G	18.6 ± 0.2 c	22.1 ± 0.2 b	28.8 ± 0.6 a	26.7 ± 0.9 a	27.4 ± 0.8 a
Park	13.4 ± 0.3 d	13.5 ± 0.1 d	19.6 ± 0.6 c	32.1 ± 0.3 a	21.2 ± 0.7 b
SFA	30.4 ± 0.2 d	26.6 ± 0.2 d	50.7 ± 0.3 a	47.7 ± 0.2 b	33.3 ± 0.9 c
Rb-UG	33.0 ± 0.6 c	29.1 ± 0.6 d	34.8 ± 1.3 c	42.3 ± 0.4 a	38.3 ± 0.7 b
PDA	21.1 ± 0.4 c	23.7 ± 0.3 c	48.2 ± 1.3 a	45.4 ± 0.7 a	39.6 ± 0.4 b

¹ Mean ± standard error (n=5) Means within a row followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

² Antimicrobial agents are excluded.

³ IL01 and TJ01= *Fusarium fujikuroi*, FSEM1= *Fusarium semitectum*, FVR= *Fusarium verticillioides*, FP1= *Fusarium proliferatum*.

(二)分子生物學鑑定

所有水稻上分離得菌株之TEF 1- α 序列與美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)核酸資料基因庫比對結果，形態鑑定為*Fusarium fujikuroi*之菌株，與基因庫中之*F. fujikuroi*相似度約為99%-100%；形態鑑定為*F. proliferatum*之菌株，與基因庫中之*Fusarium proliferatum*相似度皆為100%；形態鑑定為*F. verticillioides*之菌株，與基因庫中之*F. verticillioides*相似度皆為100%。*F. semitectum*比對結果最接近為*F. semitectum*，相似度為99%。選擇IL01(*F. fujikuroi*)、TJ01(*F. fujikuroi*)、FP1(*F. proliferatum*)、FSEM1 (*F. semitectum*)、FVR (*F. verticillioides*)作為開發*F. fujikuroi*鑑別性培養基時的主要測試菌株。*F. fujikuroi*菌株TNTN1132、TNKH14559及SDB2，*F. proliferatum* 菌株FPA2與FPA3，*F. verticillioides* 菌株FVC則後續用於鑑別性培養基上的存活能力測試(表一)。

二、不同基礎培養基對水稻徒長病菌菌絲生長的影響

F. fujikuroi IL01與TJ01菌株在dKomada培養基上的菌落大小(26.0 ± 0.6 mm、 29.2 ± 0.2 mm)與FSEM1菌株(25.8 ± 0.3 mm)、FVR菌株(29.7 ± 0.4 mm)及FP1菌株(25.6 ± 0.4 mm)相當，而培養於其他供試培養基上時的菌落大小，IL01、TJ01較FSEM1、FVR及FP1小。Komada基礎培養基(dKomada)上，IL01與TJ01菌株菌落背面為淡橘色，氣生菌絲茂盛，而*F. semitectum*則菌絲茂密，形態上較為蓬鬆，顏色為淡黃色。故選取dKomada培養基，進行後續測試(表二)。

三、不同抑菌物質對水稻徒長病菌菌絲生長影響

為使鑑別培養基方便觀察目標菌種並抑制雜菌生長，將初步檢視各抑菌物質於不同濃度下之抑菌效果，作為鑑別培養基配方成分選擇依據，包含(1)對目標IL01與TJ01菌株生長抑制率 $<20\%$ 與(2)對FP1、FSEM1及FVR生長抑制率 $>70\%$ 。在抑菌物質為1 ppm的濃度之下，放線菌酮、腐絕、撲克拉、依普同、玫瑰紅對FP1抑制率達85%以上，考量於1 ppm濃度下玫瑰紅與撲克拉對IL01與TJ01菌株抑制率過高，且玫瑰紅於菌落形態觀察不易，因此選擇1 ppm放線菌酮及依普同作為鑑別培養基配方成分。1 ppm的孔雀綠對IL01與TJ01菌株抑制率達80%以上，不予考慮(表三)。腐絕對1 ppm時對IL01、TJ01、抑制率低於10%，而FP1無法生長，達10 ppm時則可完全抑制TJ01、IL01及FP1菌株(表三及表四)，進一步測試腐絕對水稻徒長病菌發芽管長度之影響，腐絕對IL01菌株於5 ppm時與對照組無差異，對TJ01菌株則是2 ppm與對照組無差異(表六)。大克爛於1 ppm時對IL01與TJ01菌株皆低於15%以下，後續再進一步提高測試濃度檢測其對水稻徒長病發芽管之影響，發現大克爛對IL01與TJ01菌株於2 ppm時的發芽管長度與對照組無差異。確認其對目標菌株生長抑制有無差異後，再選擇最適配方濃度。用於抑制擔子菌生長之福多寧、賓克隆不論於1 ppm或10 ppm時，對IL01與TJ01菌株抑制率低於20%，但福多寧能使FP1菌株無法生長而賓克隆能促進其生長，因而選擇10 ppm福多寧。

表三、不同抑菌物質 1 ppm 下對不同 *Fusarium* 種類菌落生長半徑的影響Table 3. Effect of different antimicrobial agents at 1ppm on the growth of different *Fusarium* species

Antimicrobial agent	Colony size (Inhibition %)				
	IL01 ¹	TJ01	FSEM1	FVR	FP1
CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide)	20.2 (14.4)	20.3 (-5.4)	24.1 (15.4)	22.9 (18.3)	25.3 (-4.1)
Cycloheximide	19.4 (17.5)	15.8 (18.3)	17.1 (39.9)	21.1 (24.9)	0.0 (100.0)
Dicloran	20.5 (12.8)	18.0 (6.5)	25.0 (12.3)	22.0 (21.6)	24.0 (1.2)
PCNB (Pentachloronitrobenzene)	21.6 (8.5)	16.4 (14.8)	24.1 (15.4)	18.7 (33.5)	10.3 (58.8)
Thiabendazole	22.5 (4.6)	20.2 (-4.9)	28.4 (0.1)	26.1 (7.2)	0.0 (100.0)
Rosebengal	20.5 (13.1)	12.2 (36.9)	26.6 (6.5)	25.7 (8.6)	3.4 (86.0)
Malachite Green	3.0 (87.3)	0.3 (98.5)	22.5 (20.9)	19.3 (31.4)	21.0 (13.8)
Flutolanil	19.8 (16.1)	18.5 (4.2)	28.7 (-0.9)	23.5 (16.3)	0.0 (100.0)
Pencycuron	22.5 (4.5)	21.1 (-9.4)	28.5 (-0.2)	26.5 (5.5)	36.9 (-51.7)
Benomyl	13.4 (43.2)	13.0 (32.5)	25.8 (9.4)	25.8 (8.0)	10.6 (56.5)
Prochloraz	14.3 (39.3)	11.7 (39.4)	7.7 (72.9)	2.0 (93.0)	0.0 (100.0)
Iprodione	19.9 (15.6)	17.0 (11.7)	25.6 (10.2)	25.6 (8.9)	24.1 (100.0)
Control	23.6 (0.0)	19.3 (0.0)	28.5 (0.0)	28.1 (0.0)	24.3 (0.0)
LSD _{0.05} ²	1.0	1.8	1.8	2.1	2.3

¹ values of at least significant difference are for comparisons of means of mycelial growth within pesticides at 5% level.

² IL01 and TJ01 = *Fusarium fujikuroi*, FSEM1 = *Fusarium semitectum*, FVR = *Fusarium verticillioides*, FP1 = *Fusarium proliferatum*.

表四、不同抑菌物質 10 ppm 下對不同 *Fusarium* 種類菌落生長半徑的影響Table 4. Effect of different antimicrobial agents at 10ppm on the growth of different *Fusarium* species

Antimicrobial agent	Colony size (Inhibition %)				
	IL01 ¹	TJ01	FSEM1	FVR	FP1
CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide)	16.7 (29.4)	17.7 (8.3)	18.2 (36.1)	22.5 (19.9)	22.6 (7.0)
Cycloheximide	15.7 (33.5)	13.6 (29.5)	8.5 (70.3)	18.0 (35.9)	0.0 (100.0)
Dicloran	13.3 (43.7)	10.5 (45.6)	8.8 (69.0)	23.5 (16.3)	22.8 (6.2)
PCNB (Pentachloronitrobenzene)	17.8 (24.4)	14.6 (24.4)	14.3 (49.6)	25.1 (10.7)	8.7 (67.3)
Thiabendazole	12.7 (46.2)	0.0 (100.0)	22.9 (19.5)	0.0 (100.0)	0.0 (100.0)
Rosebengal	16.0 (32.2)	10.9 (43.5)	16.0 (43.7)	15.8 (43.9)	0.0 (100.0)
Malachite Green	0.0 (100.0)	0.0 (100.0)	5.7 (79.9)	14.0 (50.2)	13.5 (44.3)
Flutolanil	21.1 (10.6)	17.7 (8.5)	26.7 (6.2)	12.6 (55.1)	0.0 (100.0)
Pencycuron	21.2 (10.0)	19.5 (-0.9)	27.3 (4.0)	14.7 (47.6)	37.7 (-55.1)
Benomyl	8.5 (63.8)	0.0 (100.0)	13.1 (54.1)	0.0 (100.0)	0.0 (100.0)
Prochloraz	10.8 (54.4)	6.0 (69.1)	2.4 (91.4)	0.0 (100.0)	0.0 (100.0)
Iprodione	9.5 (59.7)	8.8 (54.3)	17.4 (39.0)	12.6 (55.1)	18.1 (25.4)
Control	23.6 (0.0)	19.3 (0.0)	28.5 (0.0)	28.1 (0.0)	24.3 (0.0)
LSD _{0.05} ²	0.8	1.4	0.8	1.3	0.3

¹ values of at least significant difference are for comparisons of means of mycelial growth within pesticides at 5% level.

² IL01 and TJ01=*Fusarium fujikuroi*, FSEM1=*Fusarium semitectum*, FVR=*Fusarium verticillioides*, FP1=*Fusarium proliferatum*.

四、測試氯化鋰(Lithium chloride)與氯黴素(Chloramphenicol)之適合濃度

可抑制木黴菌生長的LiCl，1,000 ppm以下對IL01與TJ01菌株的生長與控制組比較無顯著差異，抑制率低於5%(表五)；常用於抑制細菌生長的氯黴素於200 ppm以下，對IL01與TJ01菌株的菌絲生長無影響(表五)。

綜合上述，配置成水稻徒長病鑑別性培養基配方供後續使用：FFC培養基(Koamada's basal medium amended with 1 ppm cycloheximide, 2 ppm Dichloran, 1 ppm Iprodione, 5 ppm Thiabendazole, 10 ppm Flutolanil, 200 ppm chloramphenicol, 1,000 ppm lithium chloride)

表五、不同濃度的氯黴素與氯化鋰對 *F. fujikuroi* IL01 與 TJ01 菌株生長之影響Table 5. Effect of different concentrations of Chloramphenicol and Lithium Chloride on colony size of *F. fujikuroi* isolates IL01 and TJ01

Antimicrobial agent ¹	Conc. (ppm)	Colony size (mm)	
		IL01	TJ01
Chloramphenicol	0	29.8	26.5
	50	28.8	23.6
	100	31.5	23.3
	150	30.4	20.6
	200	29.7	26.7
	LSD _{0.05} ²	2.0	1.9
Lithium Chloride	0	29.8	26.5
	1000	25.7	25.2
	2000	24.3	24.5
	3000	23.3	21.9
	4000	18.2	22.4
	5000	13.3	18.0
	LSD _{0.05}	2.0	1.1

¹ The antimicrobial agent is amended to 20g Galactose, 2g L-asparagine, 1g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 20 g agar and 1L distilled water (adjust to pH 4.5 before autoclaving) after autoclaving.

² values of at least significant difference are for comparisons of means of mycelial growth within pesticides at 5% level.

表六、不同濃度的腐絕與大克爛對 *F. fujikuroi* IL01 與 TJ01 菌株發芽管長度之影響
 Table 6. Effect of different concentrations of Thiabendazole and Dichloran on germ tube length of *Fusarium fujikuroi* isolates IL01 and TJ01

Antimicrobial agent ¹	Conc. (ppm)	Germ tube length (µm)	
		IL01	TJ01
Thiabendazole	0	42.4	36.2
	1	40.3	35.8
	2	40.6	33.2
	3	38.8	33.8
	4	37.1	31.7
	5	36.8	30.3
	LSD _{0.05} ²	7.8	8.7
Dichloran	0	42.4	36.2
	1	41.3	35.4
	2	39.7	34.0
	3	36.3	31.7
	4	30.5	27.0
	5	25.6	21.2
	LSD _{0.05}	5.1	4.5

¹ The antimicrobial agent is amended to 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 20 g agar and 1 L distilled water (adjust to pH 4.5 before autoclaving) after autoclaving.

² values of at least significant difference are for comparisons of means of mycelial growth within pesticides at 5% level.

五、比較所開發之選擇性FFC培養基與Komada 培養基之效果

依前項結果，配置成FFC鑑別性培養基，測試在水稻上分離之常見镰孢菌的生長情形(圖三、表七)；*F. fujikuroi*、*F. verticillioides*、*F. proliferatum*及*F. semitectum*在Komada培養基皆會生長，但FFC培養基上，*F. verticillioides*及*F. proliferatum*無法生長。故後續將以FFC medium (20 g Galactose、2 g L-asparagine、1 g K₂HPO₄、0.5 g MgSO₄ · 7H₂O、0.5 g KCl、0.01 g Fe-Na-EDTA、1 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O、20 g agar 與1L 水，將pH值調整為4.5，經高溫高壓滅菌後添加1 ppm 放線菌酮、2 ppm大克爛、5 ppm腐絕、10 ppm福多寧、1 ppm依普同、1,000 ppm 氯化鋰與200 ppm氯黴素)作後續回收率測試與效率評估。

六、FFC培養基對*F. fujikuroi*菌株回收率

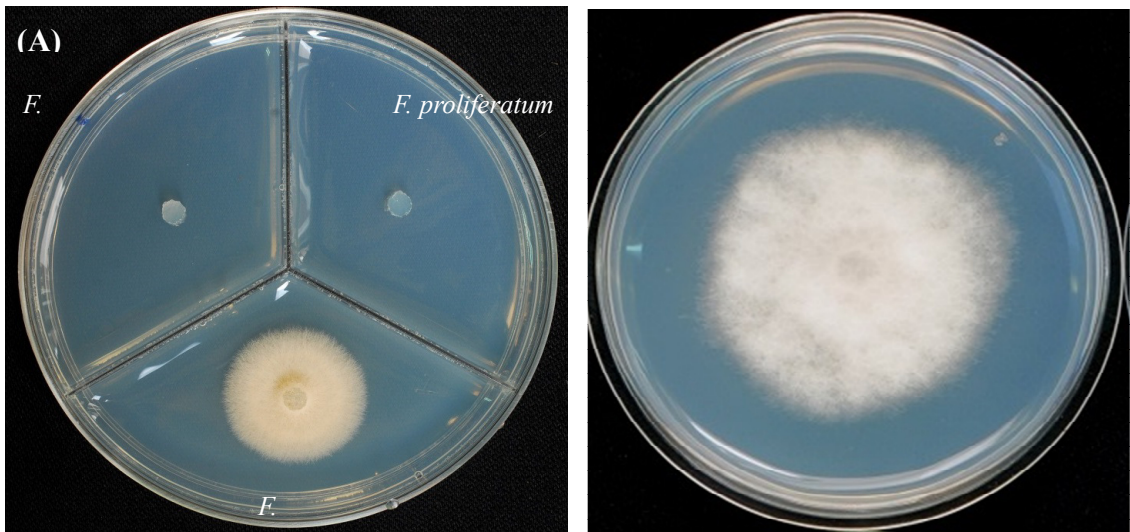
FFC培養基、Komada培養基及dKomada培養基間水稻徒長病菌的回收率無差異(圖四)，雜菌率則以未添加任何抑菌物質的dKomada培養基明顯高於FFC培養基與Komada培養基，而FFC培養基與Komada培養基間則無統計差異(圖五)。

表七、不同 *Fusarium* 種類在 FFC 與 Komada 培養基上的存活能力Table 7. The viability of different *Fusarium* species on FFC and Komada media

<i>Fusarium</i> species	Isolate designation	Growth media	
		FFC	Komada ¹
<i>Fusarium fujikuroi</i>	IL01	+ ²	+
	TNTN1132	+	+
	TNKH14559	+	+
	TJ01	+	+
	SDB2	+	+
<i>F. semitectum</i>	FSEM1	+	+
<i>F. proliferatum</i>	FPA2	-	+
	FPA3	-	+
	FP01	-	+
<i>F. verticillioides</i>	FVR	-	+
	FVC	-	+

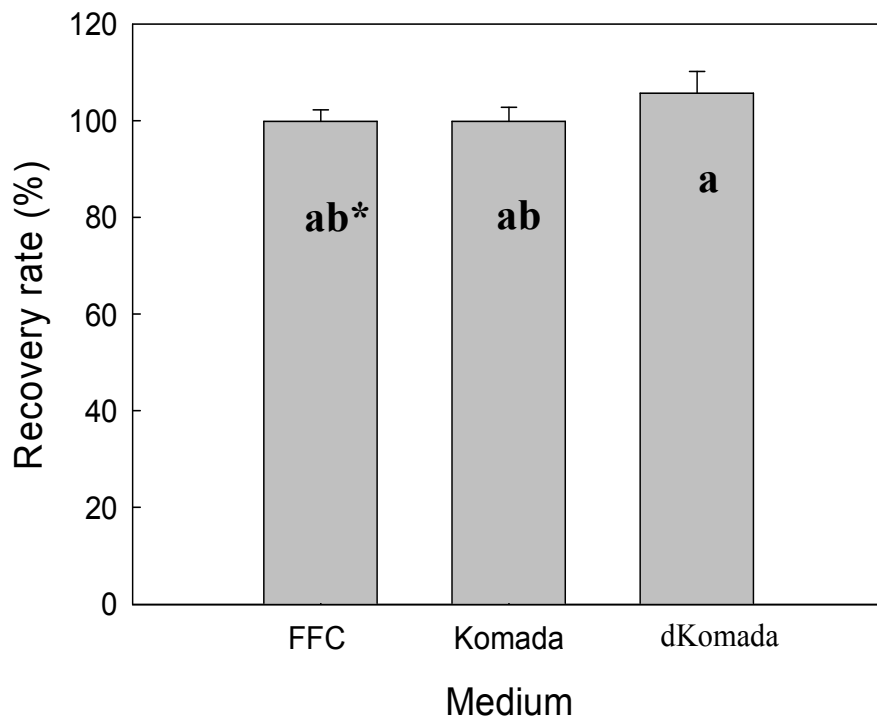
¹ Komada : 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 20 g agar and 1 L distilled (adjust to pH 4.5 before autoclaving). After autoclaving, 1 g PCNB (Pentachloronitrobenzene), 0.5 g Oxgall, 0.3 g streptomycin sulfate are amended. FFC : 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 20 g agar and 1 L distilled (adjust to pH 4.5 before autoclaving). After autoclaving 1 ppm cycloheximide, 2 ppm Dichloran, 1 ppm Iprodione, 5 ppm Thiabendazole, 10 ppm Flutolanil, 1,000 ppm lithium chloride, 200 ppm chloramphenicol are amended.

² + = viable, - = inviable.



圖三、*F. fujikuroi* IL01 菌株、*F. verticillioides* FVC 菌株、*F. proliferatum* FPA3 菌株與 *F. semitectum* FSEM1 菌株於 FFC 培養基 (A 與 B) 上的生長情形。

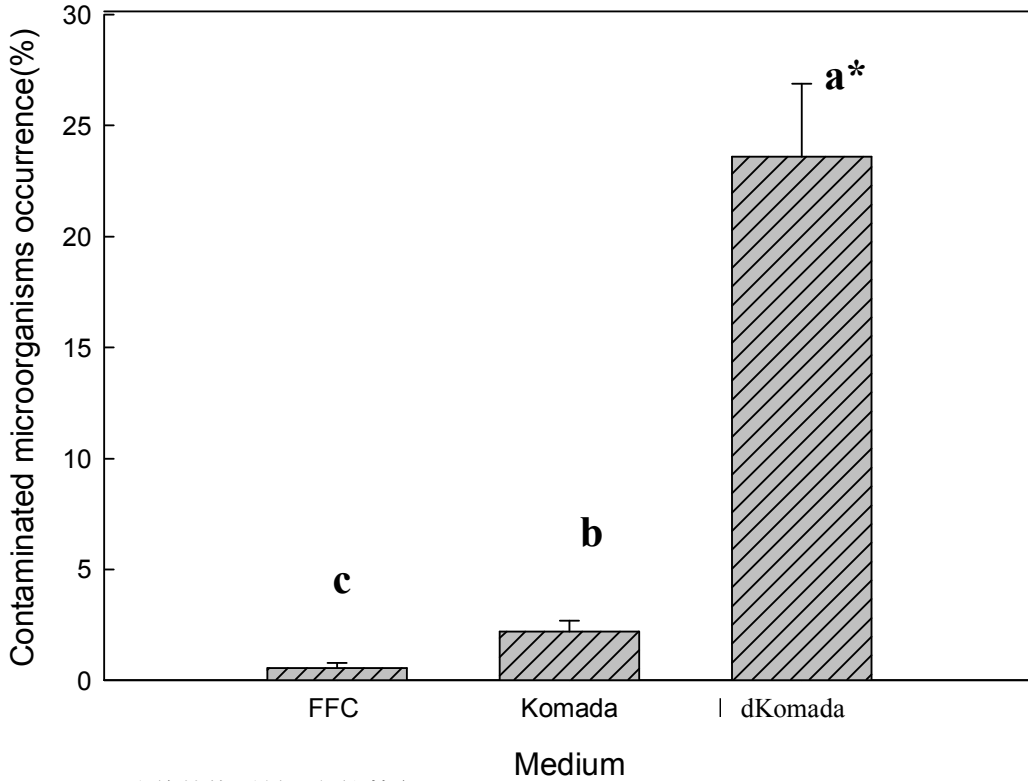
Fig. 3. The appearance of *F. fujikuroi* isolate IL01, *F. verticillioides* isolate FVC, *F. proliferatum* isolate FPA3, and *F. semitectum* isolate FSEM1 cultured on FFC medium (A and B) at 28°C for 5 days. FFC medium : 20 g Galactose, 2g L-asparagine, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01g Fe-Na-EDTA, 1 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 20 g agar and 1 L distilled water (adjust to pH 4.5 before autoclaving). After autoclaving 1 ppm cycloheximide, 2 ppm Dichloran, 1 ppm Iprodione, 5 ppm Thiabendazole, 10 ppm Flutolanil, 1000 ppm lithium chloride, 200 ppm chloramphenicol are amended.



圖四、不同培養基對種子上 *F. fujikuroi* 之回收率。

Fig. 4. Recovery efficiency of *Fusarium fujikuroi* isolate IL01 on different media. FFC medium : 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 20 g agar and 1 L distilled water (adjust to pH 4.5 before autoclaving). After autoclaving 1 ppm cycloheximide, 2 ppm Dichloran, 1 ppm Iprodione, 5 ppm Thiabendazole, 10 ppm Flutolanil, 1,000 ppm lithium chloride, 200 ppm chloramphenicol are amended. Komada medium : 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 20 g agar and 1 L distilled water, then adjust pH to 4.5 with 10 % phosphoric acid. After autoclaving, PCNB 1 g, Oxgall 0.5 g, Streptomycin sulfate 0.3 g are amended. dKomada : Komada medium excluded antimicrobial agents.

* Columns with the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.



圖五、以不同培養基偵測種子之雜菌率。

Fig. 5. Frequency of contamination in different media.

FFC medium : 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 20 g agar and 1 L distilled water (adjust to pH 4.5 before autoclaving). After autoclaving 1 ppm cycloheximide, 2 ppm Dichloran, 1 ppm Iprodione, 5 ppm Thiabendazole, 10 ppm Flutolanil, 1,000 ppm lithium chloride, 200 ppm chloramphenicol are amended. Komada medium : 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 20 g agar and 1 L distilled water, then adjust pH to 4.5 with 10 % phosphoric acid. After autoclaving, PCNB 1 g, Ovgall 0.5 g, Streptomycin sulfate 0.3 g are amended. dKomada : Komada medium excluded antimicrobial agents.

* Columns with the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.



圖六、人工帶水稻徒長病菌(IL01 菌株)種子與自然帶菌種子於 FFC 鑑別性培養基上之形態(A)人工帶菌種子(箭頭所指即為帶水稻徒長病菌 IL01 菌株之種子)(B)自然種子(C)帶有水稻徒長病菌之自然種子於 FFC 鑑別性培養基上的形態(D)帶有水稻徒長病菌之自然種子於 FFC 鑑別性培養基上的背面形態。

Fig. 6. The appearance of artificial inoculated seeds and natural seeds grown on FFC differential medium. (A)Artificial inoculated seeds (arrow: indicating seeds artificially inoculated with *F. fujikuroi* isolate IL01) (B)Natural seeds (arrow: indicating seeds naturally infested by *F. fujikuroi*) (C)The upper side of colony of seed infested by *F. fujikuroi* (D)The reverse side of colony of seed infested by *F. fujikuroi*.

七、徒長病菌人工帶菌種子與自然帶菌種子在FFC鑑別性培養基上之形態

徒長病菌自人工帶菌種子上生長出的形態正面為具稀疏氣生菌絲，背面為粉橘色色素之菌落(圖六A箭頭指示處)，與自然帶原種子上觀察到的結果類似。

討 論

選擇性培養基建立原則是使目標微生物生長不受影響，而非目標微生物生長則受抑制⁽²⁶⁾。在開發水稻徒長病的鑑別性培養基過程當中，應用多種前人建立的基礎培養基篩選出適合水稻徒長病菌生長且抑制其他生長快速的 *Fusarium* spp. 的基礎培養基。然而種子上仍有許多快速生長的雜菌恐影響帶菌率的觀測，且因五氯硝基苯具致癌疑慮，需進一步尋找可以有效替代五氯硝基苯作為抑制細菌及其他真菌生長之化學藥劑配方，且配方需能抑制與水稻徒長病菌親緣關係之菌種生長。

取水稻種子上常出現的 *Fusarium* spp. 種類與水稻徒長病菌，並以前人建立的選擇性培養基(抑菌物質)進行生長測試。其中，在Komada基礎培養基上測試的 *Fusarium* 菌株間生長速率差異性不大，因而以此為基礎進一步測試所添加之藥劑。五氯硝基苯是許多 *Fusarium* 選擇性

培養基⁽²⁶⁾常使用的抑菌劑，如Komada培養基⁽¹⁹⁾及Nash-Snyder培養基⁽²²⁾；然而五氯硝基苯已被國際癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)分類於第三群致癌因子(Group 3)⁽¹⁴⁾，美國環境保護署也於2008年將此化學物質列為人體致癌物⁽²⁷⁾，在許多國家已明令禁止使用，因此，尋找五氯硝基苯的替代用藥是勢在必行，許多相關研究朝此方向進行。在被拿來測試其抑菌能力之藥劑中，如大克爛、孔雀綠、依普同^(8,11,25)，其中大克爛曾被報導是具有替代五氯硝基苯潛力的抑菌劑；以2 ppm之大克爛與25 ppm Rose Bengal共同添加後製成培養基可應用於食品真菌偵測上，如抑制*Rhizopus spp.*與*Mucor spp.*種類的生長，來提高對*Aspergillus spp.*與*Penicillium spp.*等毒素產生真菌的選擇性⁽¹⁷⁾。孔雀綠也曾被報導以2.5 ppm的濃度添加於培養基中能有效提高*Fusarium spp.*的回收率，並抑制雜菌生長且毒性較低，或能替代五氯硝基苯⁽¹¹⁾。在上述曾被提及能替代五氯硝基苯的化學藥劑中，經過本研究測試，相較於Rose bengal與孔雀綠的高抑制率，大克爛濃度於2 ppm以下時，對水稻徒長病菌的生長影響較小，顯示大克爛2 ppm可用來替代五氯硝基苯之使用。

利用培養基偵測目標菌種的含量或者分離，常會受到生長快速的雜菌影響觀測的結果⁽³¹⁾。因此，在選擇性培養基中額外添加各種化學物質或染劑，常被用來抑制非目標雜菌的生長^(10,11,17,30)。除了使用大克爛抑制接合菌的生長外，水稻種子上也有許多常見的且生長快速真菌如*Fusarium spp.*、*Trichoderma spp.*、*Cladosporium spp.*、*Alternaria spp.*、*Aspergillus spp.*、*Penicillium spp.*、*Bipolaris spp.*、*Curvularia spp.*、*Drechslera spp.*及*Rhizoctonia spp.*等⁽²¹⁾，在偵測水稻徒長病菌之存在時，亦會受到上述雜菌快速生長而影響觀測。氯化鋰曾被報導具抑制*Trichoderma spp.*的孢子發芽與菌絲生長，進而能提高選擇性培養基的選擇效能。腐絕(Thiabendazole)則曾被報導能抑制*Fusarium spp.*、*Penicillium spp.*等菌之生長；依普同能抑制*Alternaria spp.*、*Bipolaris spp.*、*Curvularia spp.*、*Drechslera spp.*之生長。福多寧能抑制擔子菌如紋枯病菌*Rhizoctonia spp.*之生長。放線菌酮則能抑制廣泛真菌生長，於本實驗證實能對*F. proliferatum*之FP1、FPA2、FPA3菌株完全抑制生長。以Komada基礎培養基高溫高壓滅菌過後，添加1 ppm放線菌酮、2 ppm大克爛、1 ppm依普同、5 ppm腐絕、10 ppm福多寧、1,000 ppm氯化鋰及200 ppm氯黴素能夠有效抑制雜菌生長，亦具有替代五氯硝基苯的使用並使與水稻徒長病菌形態相似的病原菌不生長。

本鑑別性培養基建立完成後，已應用於國內各重要水稻產區水稻種子之帶菌檢測^(5,6,7)或罹病株病原菌拓殖情形⁽³⁾。鄭等人⁽⁷⁾測試於苗栗地區水稻種帶菌率與秧苗盤發病率具有相關性，然蔡氏等⁽⁶⁾、郭氏等⁽⁵⁾於宜花地區及中部地區測試則觀察到，種子帶菌率結果不一定能反應徒長病在秧苗期的罹病情形，推論可能因稻種帶菌率僅能呈現稻種個別有無帶菌，但無法反映出個別稻種帶菌量高低，而帶菌量高低亦可能影響秧苗病徵類型。水稻徒長病於秧苗期的病徵分級，Amatulli等人⁽⁹⁾與Hsuan等人⁽¹²⁾分別將水稻之徒長病發病程度區分出五級與四級，即是依照其不同之病徵表現，包括主要之植株不正常抽高及黃化；高度雖與健康植株無異，

但仔細觀察可發現葉鞘是有抽長的，只是因為葉身傾斜角度較大而看不出高度差異；高度雖與健康植株無異，無葉鞘抽長，但卻有皆葉片黃化及細長的表現；以及矮化及黃化之現象。然而不論是四或五個病害等級，在苗盤上目視判定出「矮化」的病徵並不容易。Hwang等人⁽¹³⁾曾報導，透過qPCR定量水稻罹病植株根部病原菌含量，發現能造成植株矮化之菌株相較於造成徒長病徵者，在根部有較高的*F. fujikuroi* 含量。因此推論若從秧苗盤上調查「徒長」病徵者作為苗期罹病率，可能因無法記錄到矮化病株數量，而造成苗期罹病率與鑑別培養基測得的帶菌率間的數據落差；另一推論，為可能因各水稻品種對水稻徒長病菌之抗感性差異所致^(2,3)。本鑑別培養基未來若持續應用於稻種檢查，可先針對單一感病品系(例如：高雄139號)^(3,4)進行稻種帶菌率與秧苗罹病率的相關性檢測後，再進一步擴大其它推廣品種應用。

誌 謝

本研究感謝行政院農業委員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)」計畫支持，特致謝忱。本試驗承蒙臺中農改場生物資材研究室及臺南農改場植物保護研究室協助提供、收集稻種給予研究、感謝臺東農改場林駿奇助理研究員協助臺東地區水稻徒長病調查及採集，更感謝同屬水稻疫病蟲害研究團隊的鍾嘉綾老師、桃園農改場、苗栗農改場、高雄農改場、花蓮農改場研究人員於本研究期間給予協助。

參考文獻

1. 林漢釗 2006 益生性枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 在水稻栽培與病害管理上之應用性 國立中興大學植物病理學系碩士論文 152 pp。
2. 陳又嘉、賴明信、林宗俊、鍾嘉綾、鄭安秀、吳信郁、朱盛祺、郭建志、吳雅芳、林國詞、曾敏南、蔡依真、林駿奇 2014 臺灣水稻徒長病菌族群之遺傳組成、病原性及抗藥性分析 真菌資源及其永續利用研討會專刊 p145-154。
3. 陳思聿、黃凱均、郭彥甫、賴明信、陳又嘉、鍾嘉綾 2015 以三種改良之評估方法判定水稻幼苗對徒長病之抗感病性 植物病理學會刊 24: 201-210。
4. 許晴情、賴明信、林宗俊、黃振文、陳啓予 2013 建立水稻對徒長病菌之抗感性篩檢流程 植物病理學會刊 22(3): 291-299。
5. 郭建志、廖君達、黃冬青、陳又嘉、鍾嘉綾 2014 中部地區水稻徒長病發病情形、病原檢測與抗藥性分析 臺中區農業改良場研究彙報 125: 11-28。
6. 蔡依真、陳任芳、胡逸琳 2017 宜花地區水稻徒長病發病情形、病原檢測與其對藥劑之感受性 花蓮區農業改良場研究彙報 35: 33-45。
7. 鄭志文、張素貞、朱盛祺 2016 苗栗地區水稻徒長病之發生情形與抗藥性分析 苗栗區農業改良場研究彙報 4: 59-72。

8. Andrews, S. and J. I. Pitt. 1986. Selective medium for the isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hycomycetes from cereals. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1235-1238.
9. 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: 401-408.
10. Bragulat, M. R., M. L. Abarca, M. T. Bruguera and F. J. Cabanes. 1991. Dyes as fungal inhibitors: effect on colony diameter. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2777-2780.
11. Castellá, G., M. R. Bragulat, M. V. Rubiales and F. J. Cabañes. 1997. Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp. *Mycopathologia* 137: 173-178.
12. 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.
13. Hwang, I., W. R. Kang, D. J. Hwang, S. C. Bae, S. H. Yun and I. P. Ahn. 2013. Evaluation of bakanae disease progression caused by *Fusarium fujikuroi* in *Oryza sativa* L. *J. Microbiol.* 51: 858-865.
14. International Agency for Research on Cancer (IARC). 1987. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Suppl. 7, p. 71. Lyon: IARC.
15. Ito, S. and J. Kimura. 1931. Studies on the "bakanae" disease of the rice plant. *Hokkaido National Agric. Exptl. Stn.* 27: 1-95.
16. John, T. 1971. Plant pathological methods. Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University Press.
17. King, A. D., A. D. Hocking and J. I. Pitt. 1979. Dichloran rose-bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 959-964.
18. Kato, A., T. Miyake, K. Nishigata, H. Tateishi, T. Teraoka and T. Arie. 2012. Use of fluorescent proteins to visualize interactions between the bakanae disease pathogen *Gibberella fujikuroi* and the biocontrol agent *Talaromyces* sp. KNB-422. *J. Gen. Plant Pathol.* 78: 54-61.
19. Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soils. *Rev. Plant Prot. Res.* 8: 114-125.
20. Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing: Ames, USA. 400pp.
21. Mew, T. W. and P. Gonzales. 2002. A handbook of rice seedborne fungi. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, and Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA. p.83.

22. Nash, S. M. and W. C. Snyder. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* spp. in field soils. *Phytopathology* 52: 567-72.
23. Nelson, P. E., T. A. Toussoun and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
24. Ou, S. H. 1985. Bakanae disease and foot rot. Pages 262-272. in Rice diseases. 2nd edition Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 380 pp.
25. Thrane, U., O. Filtenborg, J. C. Frisvad and F. Lund. 1992. Improved methods for detection and identification of toxigenic *Fusarium* species. In Modern Methods in Food Mycology ed. Samson, R.A., Hocking, A. D., Pitt, J.I. and King, A.D. pp. 285-291. Elsevier, Amsterdam.
26. Tsao, P. H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8: 157-186.
27. U.S. EPA-OPP United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs (2008) List of Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential. Available at: <http://www.epa.gov/pesticides/carlist/>. Accessed 11 June 2013.
28. Van Wyk, P. S., D. J. Scholtz and O. Los. 1986. A selective medium for the isolation of *Fusarium* spp. from soil debris. *Phytophylactica* 18: 67-69.
29. Vaidya, R. J., S. L. Macmil, P. R. Vyas, L. V. Ghetiya, K. J. Thakor and H. S. Chaptar. 2003. Biological control of *Fusarium* wilt of pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) millsp with chitinolytic *Alcaligenes xylosoxydans*. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 1469-1472.
30. Vujanovic, V., C. Hamel, S. Jabaji-Hare and M. St-Arnaud. 2002. Development of a selective Mycobutanil Agar (MBA) medium for the isolation of *Fusarium* species from asparagus fields. *Can. J. Microbiol.* 48: 841-847.
31. Wildman, H. G. 1991. LiCl as a selective inhibitor of *Trichoderma* species on soil isolation plates. *Mycol. Res.* 95: 1364-1368.
32. Wong, W. C. 1988. A differential medium for the identification of races 1 and 4 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Lett. Appl. Microbiol.* 6: 51-54.

Development of the Differential Medium of *Fusarium fujikuroi*, the Causal Agent of Rice Bakanae Disease¹

Ching-Ching Hsu², Chi-Yu Chen³ and Jenn-Wen Huang³

ABSTRACT

Bakanae disease is one of the most important rice diseases worldwide, and is endemic in Taiwan for the recent years. Typical symptoms are on the primary leaves with slender, chlorotic and elongated appearances, which is caused by the pathogen, *Fusarium fujikuroi*. Infected plants can be observed on the seedbed and in the field. This pathogen has long been considered to be seed-borne. Therefore, seed sterilization is the major approach to control this disease and has been proved effective. However, this disease still outbreaks from time to time and its occurrence is hardly predictable. In order to detect *F. fujikuroi* in seeds, a differential medium, designated as FFC medium, has been developed in this study. FFC medium contains 20 g Galactose, 2 g L-asparagine, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01 g Fe-Na-EDTA, 1 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 20 g agar, 1 ppm Cycloheximide, 2 ppm Dichloran, 1 ppm Iprodione, 5 ppm Thiabendazole, 10 ppm Flutolanil, 1,000 ppm lithium chlororide, 200 ppm chloramphenicol and 1 L distilled water. Although both *F. fujikuroi* and *F. proliferatum* are morphologically indistinguishable, they could be easily separated by FFC medium. *F. proliferatum* can be inhibited on FFC medium.

Key words: bakanae disease, *Fusarium fujikuroi*, differential medium, PCNB

¹Contribution No.1014 from Taichung DARES, COA.

²Assistant Researcher of Taichung DARES, COA.

³Associate Professor, Professor of Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University.

