

臺灣植物病原真菌抗藥性菌系之調查與研究

(二) 菊花白銹病菌 (*Puccinia horiana*) 對 Oxycarboxin 之抗藥性研究

裴家隆¹ 孫守恭¹

(接受日期：民國71年2月22日)

摘 要

埔里地區菊花白銹病 (*Puccinia horiana*) 已出現抗 Oxycarboxin 之菌系，且抗藥性菌系分離頻率高達 100%；而田尾地區迄今尚未發現抗藥菌系。於 1980 及 1981 年自埔里分離之二株抗藥性菌系，其對 Oxycarboxin 之百分五十致死濃度為 114.6 及 118.4 ppm，感藥性菌系（自田尾分離）之百分五十致死濃度僅為 1.4 ppm。Maneb (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 即可完全抑制抗藥性菌系之冬孢子及小生子發芽。此外，Tridemorph (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及 Triforine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 亦能控制抗藥性菌系。抗藥性菌系之致病力雖略遜於感病性菌系，但經 Oxycarboxin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 處理菊花植株後，唯有抗藥性菌系仍能產生冬孢子層引起病斑，致使病勢蔓延而趨嚴重。

(關鍵字：菊花白銹病菌，*Puccinia horiana* P. Hennings, 百分五十致死濃度，抗藥性比值)

緒 言

菊花白銹病乃起源於日本及中國大陸之古老病害，由 *Puccinia horiana* P. Hennings 引起⁽¹⁰⁾。另外，英國⁽⁶⁾、美國⁽¹³⁾、南非、紐西蘭及大多數歐洲國家⁽¹⁰⁾ 亦有發生，經由帶菌菊花苗相互傳播。本省於 1975 年首先在陽明山地區發現本病，如今已蔓延至中部地區，尤以埔里發生最為嚴重，每年歲末至翌年春初必然發病，形成風土病 (Endemic disease)。埔里菊花乃以外銷日本為主，作為插花材料，一旦菊花葉片感染本病造成白銹色病斑，即失去商品價值，威脅花農利益甚鉅。

Oxathiins 於 1964 年間世後⁽¹⁷⁾，對擔子菌引起之病害深具防治效果^(2,3,14,16)。1971 年在日本即以 Oxycarboxin (Plantvax) 防

治菊花白銹病^(2,3)，隨即在 1973 年出現抗藥性之 *P. horiana* 菌系⁽⁵⁾。埔里自 1977 年亦以 Oxycarboxin 防治本病，大量施用二年後，1979 年歲末本病發生猖獗，Oxycarboxin 再也無法控制，花農收益減少 50% 以上。筆者前往調查並採回病菌在室內測試，證實已有抗藥性菌系出現。茲將研究結果發表，期作一妥善規劃，達到藥劑防治之最佳效果。

材 料 與 方 法

抗藥性檢定 將溶於 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 之各種藥劑 (表一) 母液 (10⁴ $\mu\text{g}/\text{ml}$) 予以稀釋，以定量吸管 (Hunpipette) 取適量加入尚未凝固 (45°C) 之 water agar (W. A.) 中，混合均勻，倒入殺菌之培養皿中

1. 國立中興大學植物病理學系研究生及教授。

表一、供試殺菌劑

Table 1. Fungicides used in this study

Chemical group	Generic name	Chemical name	Formulations ^{a)}
Oxathiins	Oxycarboxin	5,6-Dihydro-2-methyl-1,4-oxathiin-3-carboxanilide-4,4-dioxide	75% W. P.
Morpholines	Tridemorph	2,6-Dimethyl-4-tridechlomor-pholine	84.2% E. C.
Piperazines	Triforine	N, N-bis (1-formamido-2,2,2-trichloroethyl)-piperazine	18.6% E. C.
Carbamates	Maneb	Manganese ethylenebisdithio-carbamate	80% W. P.

a) Key: WP=wettable powder, EC=emulsifiable concentrate

，作成平板（直徑 9 cm 培養皿，經 6 小時後方能使用）。分別於 1980 及 1981 年自埔里及田尾採回罹白銹病之菊花葉片，每一病葉取單一叢生冬孢子層之病斑，其病齡約 15 天，先以無菌水洗滌病斑，移去已發芽冬孢子所生成之小生子 (Sporidia)，再切下病斑進行切片（縱切），將冬孢子層組織塊（1 mm × 1 mm × 0.1 mm）各一片，分別移植於含有 5,50 μg/ml Oxycarboxin 及不含 Oxycarboxin 之 W. A. 平板上，培養於 20°C 黑暗中^(10, 19) 18 小時後，鏡檢（150 X）冬孢子發芽及小生子形成 (Sporidial formation)，經 36 小時後，再鏡檢（150 X）小生子發芽，並計算發芽率（計取 300 個小生子）。若冬孢子及小生子於含有 Oxycarboxin 之 W. A. 平板上能正常發芽（即與對照組相若），則為抗藥性⁽⁵⁾。

LC₅₀ 測定 前述抗藥性檢定中，取抗藥性（來自埔里）及感藥性（來自田尾）各一株，分別接種於菊花健株葉片上，供作藥效測定之用。取抗藥及感藥性菌系之病斑切片，移植至不含藥劑之 W. A. 方塊上（大小 1 cm²），再將此 W. A. 方塊倒置於含有兩組不同 Oxycarboxin 劑量（1、2、5、10、20、50、100 μg/ml 及 0.1、0.3、0.5、0.7、1、2、5 μg/ml）及不含 Oxycarboxin 之 W. A. 平板（5 cm）之皿蓋上方，待冬孢子發芽，所產生之小生子會灑落在含有藥劑之 W. A. 培養基上，培養於 20°C 黑暗中，經 36 小時，

計數孢子發芽率（每種處理各三皿，各皿取 300 個小生子）及抑制率（= 對照組孢子發芽率 - 藥劑處理之孢子發芽率 / 對照組孢子發芽率 × 100%）。分別將抑制率及藥劑濃度轉換成機率值 (Probit) 及對數 (Log) 值，進一步予以統計分析，求得相關迴歸直線方程式，繪於對機數表格紙 (Log-probit paper) 上，經代入法即可得到 LC₅₀ 之值^(1, 9)，作為藥效參考。而抗藥及感藥性菌系 LC₅₀ 之比值，即為 RR 值 (Resistant ratio)，由此值之大小可知抗藥性之程度⁽⁴⁾。

抗藥及感藥性菌系對其他藥劑之感受性 (Susceptibility) 將抗藥及感藥性菌系之冬孢子層切片，各取三片分別移入含有 1、10 及 100 μg/ml 之 Oxycarboxin. Maneb. Tridemorph. Triforine 及不含任何藥劑之 W. A. 平板上，經培養於 20°C 黑暗中 18 小時後，鏡檢（150 X）冬孢子發芽及小生子形成，小生子發芽測試方法同前。

抗藥性與病原性之關係 取抗藥及感藥性菌系含有多數冬孢子層之病斑置於 20°C 濕室中，經 5 小時後，待冬孢子發芽產生大量小生子，予以切碎並與定量無菌水混合（加入 0.1 ml Tween 20, 2 × 10⁴ Sporidia/ml），噴霧接種於 10 株健康菊花植株上（株齡 16 片葉大），其中五株於 2 4 小時前事先以 Oxycarboxin 100 μg/ml 處理，然後均培養於 20°C 濕室中

48小時，再移至溫室，待15天後出現病斑時，計算發病率(%)。

結 果

抗藥性檢定及田間抗藥性菌系發生頻率

在埔里菊花園中，連續兩年(1980、1981)調查結果，白銹病菌(*Puccinia horiana*)抗 Oxycarboxin 菌系出現頻率皆高達100%、而田尾迄今尚未發現抗藥性菌系(表二)。5 $\mu\text{g/ml}$ 之 Oxycarboxin 即完全抑制感藥性菌系之冬孢子發芽及小生子生成，而抗藥性菌系縱於 50 $\mu\text{g/ml}$ 之 Oxycarboxin 下，其冬孢子發芽及小生子形成均與對照組相若(圖一)。

LC₅₀ 測定 感藥性菌系(分離自田尾)對 Oxycarboxin 之 LC₅₀ 僅為 1.4 ppm，而另二株抗藥性菌系(分離自埔里)之 LC₅₀ 分別高達 114.6 及 116.8 ppm(圖二)。RR 值為 80。

抗藥性及感藥性菌系對其他藥劑之感受性(Response) 僅須 1 $\mu\text{g/ml}$ Maneb 即可同時抑制抗藥及感藥性菌系之冬孢子發芽或小生子發芽，而 Triforine 及 Tridemorph 10 $\mu\text{g/ml}$ 亦能有效地阻碍抗藥性菌系(表三)。

抗藥性與病原性之關係 菊花植株接種感藥性及抗藥性菌系後，其發病率分別為 66.7 及 62.2%，若接種前先處理 Oxycarboxin (100 $\mu\text{g/ml}$)，則感藥性菌系僅引起 6.7% 發病，而抗藥性菌系仍能造成 68.8% 之發病率(表四)。

討 論

在日本，使用 Oxycarboxin 二年後即發現白銹病菌抗藥性菌系⁽⁵⁾，在臺灣埔里地區，也是使用 Oxycarboxin 二年後出現抗藥性菌系。由於埔里地區氣候非常適合白銹病菌之繁殖生長，加以農民提高 Oxycarboxin 之使用濃度，故埔里地區白銹病菌抗藥程度(RR=80)約為日本(RR=20)之四倍，抗藥性菌系分離頻率高達 100%。彰化縣田尾地區冬季乾旱而氣溫較高，菊花白銹病發生並不嚴重，Oxycarboxin 使用次數不多，故迄今田尾地區尚未出現抗藥性菌系。

抗藥性菌系之出現，可能因藥劑之選擇力而來⁽¹¹⁾。Oxycarboxin 為系統性殺菌劑⁽¹⁷⁾且是位置專一選擇性化學毒劑(Site-specific toxicant)，當其滲透至菌體細胞中，作用於粒腺體上琥珀酸脫氫酵素(Succinic dehydrogenase)，阻碍電子傳遞系統，使呼吸作用不能正常進行⁽¹⁸⁾。Georgopoulos 等人⁽¹²⁾及 Ben-Yephet 等人⁽⁷⁾以 UV 誘變，極易獲得抗 Oxycarboxin 之 *Ustilago maydis* 及 *U. hordei* 菌系，由此突變菌系得知其菌體中琥珀酸脫氫酵素之組成亦改變⁽¹²⁾或是其呼吸作用改以 Glyoxylate cycle 進行⁽⁹⁾，使 Oxycarboxin 之毒效消失，而表現抗藥性。

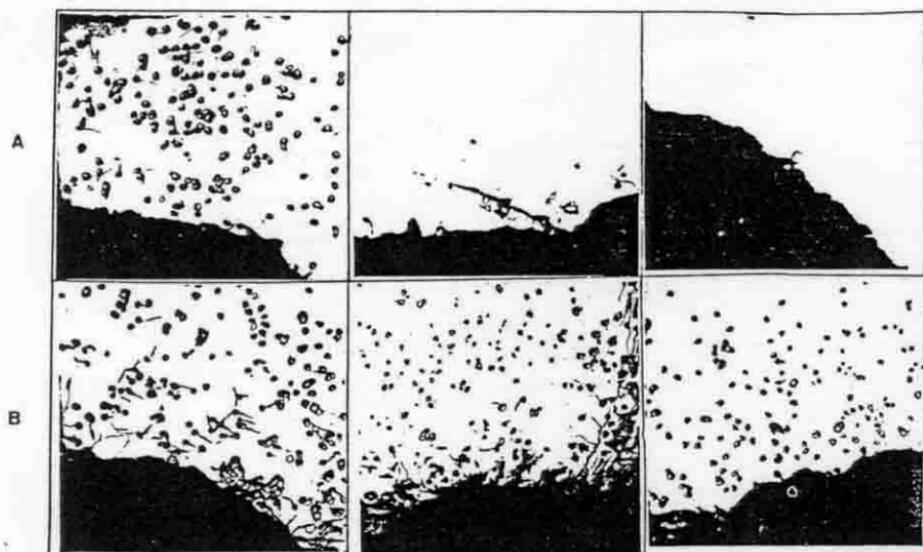
由接種試驗證明，抗藥性菌系之病原性略遜於感藥性之野生型(表四)。溫室中，白銹病菌抗 Oxycarboxin 菌系之競爭存活力遠不如野生型感藥菌系，停止使用 Oxycarboxin

表二、菊花白銹病菌抗 Oxycarboxin 菌系出現頻率

Table 2. Frequency of Oxycarboxin-resistant strains of *Puccinia horiana* in Taiwan

Locality	Total No. of lesions assayed	No. of lesions showing resistance at			Resistant frequency (%)
		0 ^{a)}	10	100	
Pu-Li (1980)	50	0	50	0	100
Pu-Li (1981)	50	0	50	0	100
Tien-Wei (1980)	50	50	0	0	0

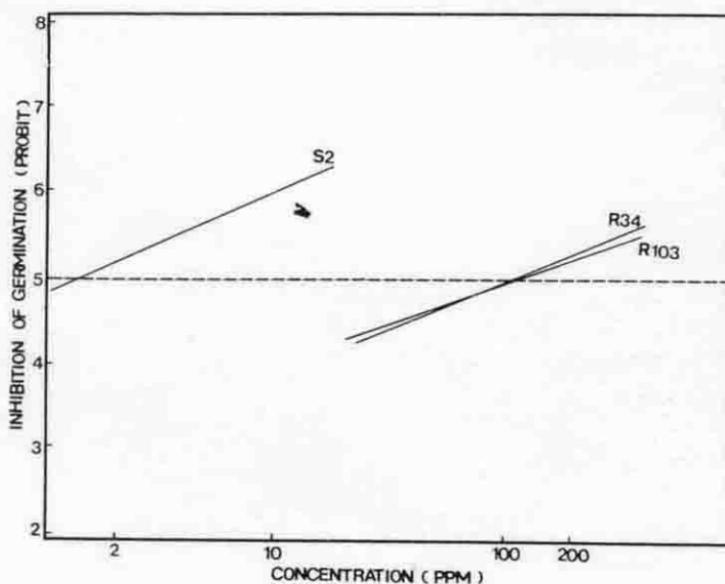
a) Concentration ($\mu\text{g/ml}$) of oxycarboxin in water agar (2%)。



圖一、菊花白銹病菌在含有 Oxycarboxin 之水瓊脂培養基 (2%) 上之冬孢子發芽及小生子形成。

A: 感藥性菌株, B: 抗藥性菌株。左欄—對照組, 中欄—5 微毫克/毫升, 右欄—50 微毫克/毫升。

Fig 1. The germination of teleutospore and sporidia formation of *Puccinia horiana* on water agar (2%) containing oxycarboxin. A: Susceptible strain-S2, B: Resistant strain-R103, Left column-CK, Middle column-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Right column-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



圖二、Oxycarboxin 對菊花白銹病菌小生子發芽之藥效。

Fig. 2. Dosage response curves for germination of sporidia of oxycarboxin resistant (R34, R103) and susceptible (S2) strains of *Puccinia horiana* in the presence of oxycarboxin.

表三、菊花白銹病菌不同菌系對四種殺菌劑不同濃度之感受性

Table 3. Response of oxycarboxin-resistant (R34, R103) and susceptible (S2) strains of *Puccinia horiana* to varied concentrations of four fungicide. (20°C incubation)

Treatment	μg/ml	Spore germination after 18hr					
		S2		R34		R103	
		T ^{a)}	B ^{b)}	T	B	T	B
No fungicide		+++	89.5	+++	90.6	+++	91.8
Oxycarboxin	1	+	67.2	+++	88.3	+++	89.4
	10	-	0	+++	74.5	+++	76.7
	100	-	0	-	20.2	-	25.1
Calixin	1	+	61.4	+	65.8	+++	86.2
	10	-	0	-	0	++	47.8
	100	-	0	-	0	-	0
Saprol	1	+	46.5	+	50.2	+++	83.6
	10	-	0	-	0	+++	0
	100	-	0	-	0	-	0
Dithane-22	1	+	0	+	0	+	0
	10	-	0	-	0	-	0
	100	-	0	-	0	-	0

a) Germination of teleutospore observed on the water agar plates.

b) Values represent the average percent sporidia germination per 300 spores observed on the five water agar plates.

表四、接種菊花白銹病菌不同菌系所造成白銹病斑之程度

Table 4. Incidence of white rust spot on chrysanthemum leaves inoculated with oxycarboxin-resistant (R34) and susceptible (S2) strains of *Puccinia horiana*

Inoculated strain	Untreatment		Oxycarboxin treatment (100 μg/ml)	
	Diseased leaves ^{a)} (%)	No. of teleutospore pustules per leaf ^{b)}	Diseased leaves ^{a)} (%)	No. of teleutospore pustules per leaf ^{b)}
Control	0	0	0	0
S2	66.7	5.5	6.7	0.3
R34	62.2	5.2	68.8	5.7

a) Values are means of five replications.

b) Average of ten leaves.

後，抗藥性菌系即逐漸消失⁽¹⁵⁾。

室內測試證實 Maneb 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 Triforine (Saprol) 及 Tridemorph (Calixin) 各 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 均能抑制 *P. horiana* 抗藥及感藥菌系之孢子發芽 (表三)，而 Abiko⁽⁵⁾ 亦指出 Captan, Maneb, Triforine 及 Wettable sulfur 皆能抑制抗 Oxycarboxin 之 *P. horiana* 之孢子發芽。在埔里地區已發生抗 Oxycarboxin 之 *P. horiana* 菌系，應停止使用 Oxycarboxin，另一 Oxathiins—Carboxin (Vitavax) 亦不可使用，因有交互抗藥性也⁽⁵⁾，應以 Maneb, Triforine, Tridemorph, Captan 及 Wettable sulfur 等藥劑代替，但 Triforine 及 Tridemorph 亦多少有系統性，故不宜單獨使用，應與傳統多目標殺菌劑交替或混合使用，以免另一種抗藥性菌系發生。在埔里地區，停止使用 Oxycarboxin 後，則抗 Oxycarboxin 之 *P. horiana* 菌系族群逐漸減少至完全消失後，可再將 Oxycarboxin 與其他多目標之藥劑配合使用，則 Oxycarboxin 對菊花白銹病之優異防治效果將不再受抗藥性菌系之威脅。

謝 辭

本試驗係農發會補助計畫 (69農建—1·2一產—053) 之一部分。試驗過程中，承中興大學昆蟲學系孫志寧教授指導，臺灣植物保護中心借用計算器整理資料，謹此誌謝。

引 用 文 獻

1. 古德業，1974。農藥毒性及昆蟲抗藥性之概念與測定法。臺灣省植物保護中心。農藥毒理組教材第二號。
2. 朱山伸吾、菅田重雄、飯島勉。1971，キク白さび病の藥劑防除。日本植物病理學會報 37:401。
3. 夏目孝男、小塚宅右工門、井上好之利。1971。Plantvax, Vitavax のキク白さび防除に對する作用性の検討。日本植物病理學會報 37:400~401。
4. 孫志寧，1977。害蟲抗藥性問題，臺灣農業研究中心專刊第8號。

5. Abiko, K., K. Kishi and A. Yoshioka. 1977. Occurrence of oxycarboxin-tolerant isolates of *Puccinia horiana* P. Hennings in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 43:145~150.
6. Baker, J. J. 1967. Chrysanthemum white rust in England and Wales 1963~1966. Plant Pathol. 16:162~166.
7. Ben-Yepphet, Y., Y. Henis and A. Dinooor. 1974. Genetic studies on tolerance of carboxin and benomyl at the asexual phase of *Ustilago hordei*. Phytopathology 64:51~56.
8. Ben-Yepphet, Y., A. Dinooor and Y. Henis. 1975. The physiological basis of carboxin sensitivity and tolerance in *Ustilago hordei*. Phytopathology 65:936~942.
9. Finney, D. J. 1962. Probit analysis. Cambridge University Press, 318 pp.
10. Firman, I. D. and P. H. Martin. 1968. White rust of chrysanthemums. Ann. appl. Biol. 62:429~442.
11. Georgopoulos, S. G. 1977. Pathogen become resistant to chemicals. Page 327~345. In: J. G. Horsfall and E. B. Cowling, eds. Plant Disease. Vol. I. Academic Press, New York, 465 pp.
12. Georgopoulos, S. G., M. Chrysai and G. A. White. 1975. Carboxin resistance in the haploid, the heterozygous diploid, and the plant-parasite dicaryotic phase of *Ustilago maydis*. Pestic. Biochem. Physiol. 5:543~551.
13. Peterson, J. L., S. H. Davis, Jr. and Paul, V. V. Webser. 1978. The occurrence of *Puccinia horiana* on chrysanthemum in New Jersey. Plant Dis. Repr. 62:357~360.
14. Rowell, J. B. 1967. Control of leaf and stem rust of wheat by an 1, 4-oxathiin derivative. Plant Dis. Repr. 51:336~339.
15. Uesugi, Y. 1978. Resistance of phytopathogenic fungi to fungicides. Jap. Pestic. Inform. 35: 5~9.
16. Venkata Ram C. S. 1969. Systemic

- control of *Exobasidium vexans* on tea with 1, 4-oxathiin derivatives. *Phytopathology* 59:125~128.
17. von Schmeling, B. and M. Kulka. 1966. Systemic fungicidal activity of 1, 4-oxathiin derivatives. *Science* 152:659~660.
18. White, G. A. and G. D. Thorn. 1975. Structure activity relationships of carboxamide fungicides and the succinic dehydrogenase complex of *Cryptococcus laurenti* and *Ustilago maydis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 5:380~395.
19. Yamada, S. 1956. Experiments on the epidemiology control of chrysanthemum white rust, caused by *Puccinia horiana* P. Henn. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 20:148~156.

INVESTIGATION ON FUNGICIDE-TOLERANT STRAIN OF PATHOGENIC FUNGI IN TAIWAN

(2) OCCURRENCE OF OXYCARBOXIN-RESISTANT STRAINS OF *Puccinia horiana* P. HENNINGS, THE WHITE RUST OF CHRYSANTHEMUM

Chia-Lung Pei¹ and Shou-Kung Sun¹

Oxycarboxin-resistant strains of *Puccinia horiana* were detected on chrysanthemum nursery in Pu-Li area which lies in the central part of Taiwan. The frequency of isolating a resistant strain was as high as 100%, while no oxycarboxin-resistant strains were obtained on chrysanthemum nursery in Tien-Wei of Changhwa Prefecture. The LC_{50} of the two oxycarboxin-resistant strains of *P. horiana* isolated from Pu-Li in 1980 and 1981 were 114.6 ppm and 118.4 ppm, respectively, while the LC_{50} of the sensitive strain of *P. horiana* isolated from Tien-Wei in 1980 was only 1.4 ppm. Manbe (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) triforine (10 $\mu\text{g}/$

ml) and tridemorph (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were able to inhibit germination of both teleutospores and basidiospores of oxycarboxin-resistant strains completely. In general, the oxycarboxin-resistant strains of *P. horiana* is less pathogenic to chrysanthemum than a sensitive strain. However, the resistant strain could induce spot symptoms on chrysanthemum leaves which were sprayed with oxycarboxin at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24 hrs. before inoculation, whereas the susceptible strain could not.

(Key words: White rust of chrysanthemum, *Puccinia horiana* P. Hennings, LC_{50} , RR, Resistant ratio)

1. Graduate student and professor, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.