

小麥赤黴病之病原鑑定及防治藥劑篩選

郭建志、林訓仕、廖君達、黃冬青

摘 要

小麥為國內冬季裡作的作物之一，生育期間會受到許多病蟲害的威脅，造成產量上的損失。尤以在小麥抽穗開花期間，遭逢氣候高溫高濕，且多霧的條件下，容易誘發小麥赤黴病的感染，直接感染小麥穗部，嚴重時造成小麥穗枯黃死亡。本研究針對小麥赤黴病(Wheat Fusarium Head Blight)之病原鑑定及室內防治藥劑之篩選，期能擬定小麥赤黴病的管理對策。利用病原菌特徵及分子生物技術鑑定所分離之小麥赤黴病菌，確認係由*Gibberella zeae*所引起。同時利用可檢測嘔吐毒素(deoxynivalenol, DON)之引子對針對具有病原性之*G. zeae*株進行PCR偵測，結果可增幅出約282 bp之DNA片段，顯示供試菌株具有產生嘔吐毒素之能力。另進行室內藥劑篩選試驗，以8種藥劑、16種濃度進行平板抑菌測試，初步結果以克熱淨等4種藥劑可以抑制小麥赤黴病菌菌絲的生長，菌絲生長抑制率平均可達80%以上。後續將評估藥劑對於小麥赤黴病的田間防治成效。

中英文關鍵字：小麥Wheat、赤黴病Fusarium Head Blight、嘔吐毒素Deoxynivalenol。

前 言

小麥為禾本科小麥屬植物，為溫帶栽培作物，往年以臺中市大雅區為主要的栽培產區，以冬季裡作的方式栽培，面積約70公頃。近年來因為提升國內糧食自給率，小麥種植面積逐年增加，目前粗估約280公頃，而栽培地區擴至全臺其他鄉鎮，包含臺中市大雅區、臺南市學甲區、苗栗縣苑裡鄉、花蓮縣玉里鎮及嘉義縣東石鄉等地。隨著栽培面積的增加，伴隨而來的是病蟲害發生的問題⁽²⁾。根據本場於2011年及2012年的調查發現，在小麥開花期後，多霧濕氣情況下，容易誘發小

麥穗部枯黃的病害，初期會由小麥穗部的某一處開始發病，接著整株枯黃並死亡，濕度高時在穗殼及穗軸上會產生粉紅色病兆，初步經由分離與孢子形態鑑定，我們推測由鐮孢菌屬 (*Fusarium* spp.)⁽³⁾之病原真菌引起之小麥赤黴病。本文乃分為兩部分，第一部分為小麥赤黴病之病原分離與鑑定；第二部分為化學藥劑對於病原菌之影響結果，以期能提供應用於小麥病蟲害之管理策略中。

內 容

一、小麥赤黴病之病原鑑定

1. 小麥赤黴病之發生與病原菌分離

小麥赤黴病在田間發生的主要時期為小麥抽穗開花期後，環境氣候為多濕多霧的情況下，持續此氣候數天，潛伏在田間的病原菌則容易侵入小麥穗部，進而造成感染。初期在穗殼上產生水浸狀淡褐色斑點，逐漸擴大到整個穗部，氣候潮溼的情況下，穗軸與穗殼交界之基部會產生粉紅色之黴狀物，嚴重時，整穗枯死。利用組織分離法，分離轄內小麥發病田區之病株，共收集15株之可疑菌株，此15株菌株皆培養於PDA及CMA (corn malt agar)上，以備後續鑑定使用。

2. 小麥赤黴病之病原鑑定

將分離之菌株培養於PDA培養皿上生長，生長初期為白色氣生菌絲，後期菌絲轉為粉紅或深紅色，經培養6天後，由光學顯微鏡鏡檢，可觀察到大孢子形態之分生孢子，大多具有3~6個隔膜，厚壁，孢子兩端略微彎曲，孢子梗為分枝枝瓶狀枝。計算孢子大小，平均為 $8.5\sim 75 \times 2.5\sim 5.0 \mu\text{m}$ ，經由孢子形態鑑定由鐮孢菌屬之病原真菌 *Fusarium graminearum* 所引起之小麥赤黴病⁽³⁾。此外利用核糖體DNA (rDNA)之內轉錄間隔區之引子對ITS1/ITS4及國外學者發表之鑑定*F. graminearum*氧化酶之引子對GOF/GOR，共2組進行生子生物鑑定^(5,7,9)，經由聚合酵素連鎖反應技術(Polymerase chain reaction, PCR)檢測，利用膠體電泳進行分

析後，分別可增幅出700 bp與435 bp之專一性DNA條帶。經此PCR產物委託源資生物科技公司進行定序分析與NCBI (National Center for Biotechnology Information)之資料庫進行序列分析比對。其結果與*Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, (1936)序列相似度分別為98%及100%，確定小麥赤黴病係由*G. zeae*所引起⁽¹⁾，其無性世代則為*F. graminearum*。

3. 小麥赤黴病之毒素檢測

文獻上均有記載小麥赤黴病會產生脫氧雪腐鏟刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)，一般稱為Vomitoxin，簡稱嘔吐毒素。而*F. graminearum*和*F. culmorum*是主要產DON毒素之菌株^(4,6,8,10,11)。因此利用Chlander等人在2003年所發表針對可增幅赤黴病菌產生DON的基因，所設計的引子對Tri13F/Tri13DONR⁽⁵⁾。選取赤黴病菌代表菌株共7株，並利用植物基因體DNA純化試劑組(Plant Genomic DNA Purification kit, GeneMark)，抽取真菌基因體核酸，最後抽取之核酸溶於1.5 ml滅菌之離心管內。利用上述之引子對Tri13F/Tri13DONR，以7株赤黴病菌之DNA為模板，進行PCR檢測，經膠體電泳分析後，預期可增幅獲得約282 bp的專一性DNA條帶，顯示出此7株赤黴病菌，皆具有產生DON毒素之能力。

二、化學藥劑對小麥赤黴病菌絲之影響

以市售8種不同殺真菌劑做為室內藥劑篩選試驗之供試藥劑。供試藥劑包括70%甲基多保淨可濕性粉劑1,000倍與1,500倍、25%普克利乳劑1,000倍與2,000倍、30%賽福座可濕性粉劑2,000倍與4,000倍、25%克熱淨溶液500倍與1,000倍、25.9%得克利水基乳劑2,000倍與3,000倍、44.2%克收欣水懸劑2,000倍與2,500倍、23.6%百克敏乳劑2,500倍3,000倍、23%亞托敏水懸劑2,000倍與3,000倍(表一)，共16種濃度配製成混有藥劑的PDA培養基。本次試驗利用*F. graminearum*分離株TC-D01、TC-D03、TC-D10與TC-03為試驗菌株，利用打孔器挖取直徑0.5 cm菌絲塊大小，放置於含有藥劑之PDA中央，對照組以無菌水取代藥劑，每日測量1次菌絲長度，待對照組處理之菌絲長至PDA邊緣時停止測量，並測量菌絲長度。經7天後對照組

菌絲長滿至培養皿邊緣時，量測藥劑抑制結果。藥劑對赤黴病菌之菌絲抑制率計算方式為： $[\text{對照組菌絲生長半徑(mm)} - \text{試驗組菌絲生長半徑(mm)} / \text{對照組菌絲生長半徑}] \times 100$ 。量測結果發現，有4組藥劑之菌絲抑制率可達80%以上，分別為普克利乳劑、賽福座可濕性粉劑、克熱淨溶液與得克利水基乳劑，其中克熱淨與得克利之抑制率可達100% (表二)，顯示此4種藥劑具有防治小麥赤黴病之潛力，後續將針對不同地區來源之赤黴病菌進行藥劑防治評估。

表一. 小麥赤黴病室內篩選藥劑之劑型與使用稀釋倍數

Table 1. Formulation and dilution factor of 8 fungicides used in the experiments

Fungicide	Formulation	Dilution factor
Thiophanate methyl (甲基多保淨)	70% WP	1000
		1500
Propiconazole (普克利)	25% EC	1000
		2000
Triflumizole (賽福座)	30% WP	2000
		4000
Guazatine (克熱淨)	25% SL	500
		1000
Tebuconazole (得克利)	25.9% EW	2000
		3000
kresoxim methyl (克收欣)	44.2% SC	2000
		2500
Pyraclostrobin (百克敏)	23.6% EC	2000
		3000
Azoxystrobin (亞托敏)	23% SC	2000
		3000

表二 8種藥劑,16種稀釋濃度添加於PDA平板中,對小麥赤黴病分離株TC-D01、TC-D05、TC-D10與TC-03菌絲於28°C生長之影響

Table 2. Inhibition rate of fungicides on mycelial growth of *Fusarium graminearum* isolates TC-D01、TC-D05、TC-D10 and TC-03 for 7 days at 28°C

Fungicide	Times	Inhibition (%) ¹			
		TC-D01	TC-D05	TC-D10	TC-03
Thiophanate methyl	1000	64.0d ²	71.8c	64.0d	70.6d
	1500	67.1c	67.8c	66.4d	61.6
Propiconazole	1000	99.8a	100.0a	97.6a	97.6a
	2000	98.0a	100.0a	96.0a	96.9a
Triflumizole	2000	82.8b	84.2b	81.9b	84.7b
	4000	85.2b	80.0b	82.8b	81.9b
Guazatine	500	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a
	1000	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a
Tebuconazole	2000	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a
	3000	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a
kresoxim methyl	2000	62.4e	61.6d	70.1c	70.1d
	2500	60.0e	57.6d	74.8c	76.2c
Pyraclostrobin	2000	70.1c	71.1c	73.4c	74.1c
	3000	67.5c	64.7cd	64.7d	72.7cd
Azoxystrobin	2000	58.4e	25.4e	42.8e	40.0e
	3000	41.2f	29.4e	44.2e	37.6e
Check	-	0.0g	0.0f	0.0f	0.0f

¹ Inhibition rate was calculated according to the following formula: (colony diameter in check) – (colony diameter in treatment)/(colony diameter in check) × 100.

² Means with the same letter in each column are not significantly different at 5% probability level by LSD test.

結 語

小麥為冬季裡作之作物,由於近年糧食安全議題及活化休耕地的政策下,小麥栽植的面積日益增加,2012年的種植面積估計約為280公頃,而經本場近幾年的

調查發現，有數種病蟲害可危害小麥，而直接感染小麥穗部，影響其產量的病害為小麥赤黴病，此病害原先於1919年在臺灣已有記錄，由澤田兼吉教授所發現並記錄，但往後的研究僅只有黃振文教授等人記錄其病原菌形態特徵，之後並無太多相關研究。故此本場針對小麥赤黴病菌，經分離後，以傳統形態與PCR分子生物技術進行病原鑑定，確認小麥赤黴病菌係由*Gibberella zeae*所引起，其無性世代為*Fusarium graminearum*。此病菌除了危害小麥以外，同時會產生DON毒素，一般稱為vomitoxin，簡稱嘔吐毒素。利用國外所發表之檢測DON毒素之PCR引子對Tri13F/Tri13DONR，檢測本場所分離到的赤黴病菌菌株，均可獲得約282 bp之專一性DNA片段，顯示國內的赤黴病菌菌株，確實具有產生嘔吐毒素之能力。國內對於小麥赤黴病，並無適當的推薦藥劑，因此參考美國與日本針對此病害之防治藥劑，選擇8種國內有販售劑型相同之化學藥劑進行室內藥劑篩選，初步試驗結果顯示：普克利乳劑、賽福座可濕性粉劑、克熱淨溶液與得克利水基乳劑等4種藥劑對於赤黴病菌菌絲具有優異抑制能力，後續將持續針對此4種藥劑進行不同來源之赤黴病菌防治評估，以建立田間防治試驗之基礎資料。

參考文獻

1. 中華民國植物病理學會 2002 臺灣植物病害名彙第四版 p.263。
2. 郭建志、廖君達 2013 小麥常見病蟲害介紹及防治策略 臺中區農業改良場農情月刊 151: 4。
3. 黃振文、孫守恭 1995 臺灣產鐮孢菌 p. 62-66 世維出版社。
4. 黃錦城 2010 黴菌毒素之危害及控制 食品工業 42 (4): 1-3。
5. Chandler, E. A., D. R. Simpson, M. A. Thomsett, and P. Nicholson. 2003. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62(6): 355-367.
6. Desjardins, A. E. 2007. *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, genetics, and biology*. St. Paul, MN 259pp APS Press.

7. 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.
8. Goswami, R. S. and H. C. Kistler. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant Pathol. 5(6): 515-525.
9. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. 1990. PCR protocols : A guide to methods and applications. Acad. Press. NY.
10. Prescott, J. M., P. A. Burnett, E. E. Saari, J. Ransom, J. Bowman, W. Milliano, R. P. Singh and G. Bekele. 1986. Wheat Diseases and Pests: A Guide for Field Identification. Mexico, D. F. CIMMYT. pp. 34-35.
11. William, W. B., L. B. Robert, M. H. Robert, L. M. Wendell, D. M. Timothy, and W. S. Richard. 2010. Compendium of wheat diseases and pests, 3rd ed. pp. 171.