DOI:10.6716/JPM.202303_65(1).0004

稻熱病菌分子鑑定、配對型及對殺菌劑之感受性
Molecular identification, mating type, and fungicide sensitivity of *Pyricularia oryzae* isolates from Taiwan

段中漢[1*]、陳冠穎[1]

[1] 農業藥物毒物試驗所農藥應用組，臺灣 臺中市。
[*] 聯絡作者，E-mail: chduan@tactri.gov.tw

摘　要

段中漢、陳冠穎。2023。稻熱病菌分子鑑定、配對型及對殺菌劑之感受性。植物醫學65(1): 33-42。

稻熱病為臺灣水稻主要病害之一，常對水稻產量造成損失。本研究以分離自全臺各地水稻葉片之28株稻熱病菌單孢菌株分別探討其分子分類、配對型及對殺菌劑之感受性。供試菌株以核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS)、肌動蛋白基因 (*ACT*) 及鈣調蛋白基因 (*CAL*) 等三種核酸序列鏈結作親緣關係分析，結果顯示其均為*Pyricularia oryzae*並與*P. grisea*分屬不同演化支。藉聚合酶連鎖反應（PCR）測其配對型，證實供試菌株全屬Mat1-1。以微量滴定板法測試稻熱病菌對殺菌劑及酸性化食品防腐劑之感受性，則顯示各種藥劑對抑制孢子發芽、菌絲生長及附著器形成等功效存有明顯差異。在抑制孢子發芽方面，鋅錳乃浦及三種酸性化食品防腐劑：苯甲酸鈉、丙酸鈣及己二烯酸鉀，均能完全抑制各菌株之孢子發芽；依普座效果亦佳，丙基喜樂松及撲殺熱也能抑制半數以上菌株之孢子發芽。在抑制菌絲生長方面，三種酸性化食品防腐劑、依普座、鋅錳乃浦及撲克拉等藥劑均具完全抑制作用；貝芬替、克熱淨及得克利也能抑制大部分菌株之生長，護粒松、丙基喜樂松及百克敏能抑制約三分之一菌株生長。三賽唑及芬諾尼對稻熱病菌已發芽孢子的附著器形成具完全抑制作用。

關鍵詞：稻熱病菌、配對型、殺菌劑

前　言

稻 (*oryza sativa* L.) 為一年生禾本科 (Poaceae) 作物，是世界穀物生產量僅次於玉米及小麥的第三大糧食作物，全球有半數人口以其為主要熱量來源[26, 31]。稻米生產與消費主要集中在亞洲，臺灣亦為水稻生產與消費地區，其栽培面積、總產值及稻農人數均居所有作物之冠[7]。臺灣水稻栽培歷史悠久，長期肩負軍糈民食之供應，為確保糧食安全，具有難以取代的重要地位；稻田湛水涵養地下水，廣袤禾田鋪陳大地美景，因而造就水稻種植成為兼具生產、生態及生活等多重功能的典範農業。近年稻作面積雖減，但兩期作總面積仍達26萬餘公頃，以西部平原之彰化、雲林及嘉義等縣分列前三名，其他各縣市亦有面積不等的種植[7]。在臺灣已知水稻病害計有67種，相關病原真菌、細菌、病毒及寄生性線蟲等有96種之多[5, 6]。稻熱病 (rice blast) 為臺灣水稻主要病害之一，是每年必然發生的風土病 (endemic)，但亦可能因天候氣象、水稻品種及病原菌菌系等因素而成為當年的流行病 (pandemic)。根據往年統計 (1966~1988)，稻熱病為害一期作較烈，平均發病面積約占一成，稻穀損失達年產量1.5~5.0%[47]。

稻熱病由病原菌*Magnaporthe oryzae* (無性世代：*Pyricularia oryzae*) 所引起，然2011年於澳洲墨爾本召開第18屆國際植物學大會通過決議廢除允許雙名制 (binary nomenclature) 的特許規約Article 59，並自2013年元旦起生效[37]。終止雙名制後，就是一真菌菌種僅能有一學名 (one fungus one name)。在分子親緣演化樹中，稻熱病菌 (*M. oryzae* / *P. oryzae*) 因與*M. grisea* / *P. grisea*位在同一演化支 (clade)，而*P. grisea*又為*Pyricularia*的模式種 (type species)，從而決定了該演化支各菌須以模式種的屬名*Pyricularia*為屬名。*Magnaporthe*的模式種*M. salvinii*則與其無性世代*Nakataea oryzae* (亦為*Nakataea*模式種) 歸在另一演化支，且因*Magnaporthe*命名較晚，此演化支需使用*Nakataea*為屬名，而*Magnaporthe*僅能作為*Nakataea*屬的同物異名[12, 32]。基於上述情況，乃確立*P. oryzae*作為稻熱病菌唯一學名[15, 32]。稻熱病菌深具學術價值與經濟重要性，曾被分子植物病理學期刊 (Molecular Plant Pathology) 票選為十大病原真菌之首[18]。關於本菌的分類單位 (taxon) 曾迭生爭議，近年則因分子生物學的應用而有定論。在上個世紀末，稻熱

病菌的學名常在*P. grisea*與*P. oryzae*之間爭論不休，兩者曾被視為同物異名 (synonym)，且應稱為*P. grisea*，因其在命名規則上具優先性[43]。但有研究者就世界各地分離自禾本科植物的*Pyricularia* spp.菌株，以肌動蛋白 (actin, ACT)、微管蛋白 (β-tubulin, TUBB) 及鈣調蛋白 (calmodulin, CAL) 等3種蛋白基因序列單獨或鏈結成多基因序列，均可於所建構的親緣關係樹 (phylogenetic tree) 明確區分為兩個演化支[14]。其一演化支的菌株主要源自馬唐屬 (*Digitaria* spp.) 雜草，名為*P. grisea*；另一演化支的菌株則因源自稻及其他禾本科雜草或牧草，而稱*P. oryzae*。兩者形態雖無差異，卻無法交配 (interfertile)[14]。惟單靠寄主植物尚難以做為這兩個菌種 (species) 區別的依據，因有些植物包括馬唐屬植物及稻均可作為這兩個菌種的共同寄主，且源自不同寄主菌株的病原性亦非專一[13, 32, 42]。因此，上述多種基因親緣性分析 (multilocus phylogenetic analysis) 應用於*Pyricularia* spp.的鑑定仍為重要方法之一。核糖體核酸內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 是物種鑑定常用序列，也曾用於*Pyricularia* spp.親緣關係分析，並具良好的解析度[32]，亦可作為稻熱病菌鑑定的依據。

稻熱病菌 (*P. oryzae*) 屬異絲型子囊菌 (heterothallic Ascomycetes)，有兩種配對型 MAT1-1及MAT1-2；個別菌株均須受相反配對型菌株之誘導始能產生子囊殼 (perithecium)、子囊 (ascus) 及子囊孢子 (ascospore)[49]。本菌產生有性世代的樣態多元且複雜，茲臚列說明如下。凡受相反配對型菌株誘導後，能產生子囊殼的菌株具雌性功能 (as female)，能誘導相反配對型菌株產生子囊殼者則具雄性功能 (as male)。菌株如為雌雄同體 (hermaphroditic)，不但其自身經誘導後能產生子囊殼，且亦能誘導相反配對型菌株產生子囊殼。有些菌株僅自身能產生子囊殼，但不能誘導相反配對型菌株產生子囊殼 (female fertile and male sterile)，或菌株自身不能產生子囊殼，但能誘導相反配對型菌株產生子囊殼 (female sterile and male fertile)；也有菌株之雌性及雄性功能皆無 (completely sterile)，或即便產生子囊殼亦可能空無子囊及子囊孢子 (barren)[50]。由於稻熱病菌不同配對型菌株即使經由交配試驗 (cross) 也未必能產生子囊殼，致單靠此方法難以確知菌株的配對型[17, 30, 38, 39, 50]。為此，乃開發出配對型引子對經聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 來鑑別菌株配對型的方法[36, 40]。但菌株是否能產生子囊殼及子囊孢子，仍需經交配試驗驗證。臺灣地區稻熱病菌的配對型分布，尚無任何資料，但是否產生有性世代關乎稻熱病菌族群的演化能力，是值得探究的課題。

稻熱病的防治雖以栽培抗病品種為最佳方法，但因病原菌菌系變化快速，氣候因子又常助長病害傳播，致藥劑防治仍為不得不然的措施。根據農業藥物毒物試驗所網站資訊，臺灣現有用於水稻葉稻熱病、穗稻熱病、稻種處理及育苗箱秧苗稻熱病之防治藥劑計有單劑 27種，含蓋13種作用機制 (mode of action)；此外，並有多種結合兩種單劑之混合藥劑[8]。這些藥劑經過數年乃至數十年的使用，其藥效是否已有變化，對現行田間稻熱病防治有著決定性的影響。除上述已登記之化學藥劑，本研究室近年開發數種食品防腐劑作為殺菌劑之替代藥劑，包括酸性化苯甲酸鈉 (sodium benzoate)、酸性化己二烯酸鉀 (potassium sorbate) 及酸性化丙酸鈣 (calcium propionate) 等，這些製劑對果樹炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 及草莓灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*) 的孢子發芽及菌絲生長均有良好抑制作用[22, 23, 24]，其對稻熱病菌的作用如何，頗值得探討。由於水稻在臺灣為種植面積最大的作物，防治藥劑種類亦多，為確保藥效試驗結果能具代表性，供試菌株應廣及全臺各水稻產區，而試驗方法則須包括對孢子發芽及菌絲生長的抑制作用。此外，芬諾尼 (fenoxanil) 及三賽唑 (tricyclazole) 等二藥劑的作用機制均為抑制真菌細胞壁黑色素合成 (melanin synthesis in cell wall)[9]，黑色素亦為稻熱病菌分生孢子發芽後侵入稻組織前產生附著器 (appressorium) 的必要物質。因而這兩種藥劑的作用即為抑制附著器形成，以達到防治效果，在評估此類藥劑時，需檢視其對附著器形成的抑制作用。為能回應上述各項問題，本研究的目標設定為1). 稻熱病菌菌株的分子鑑定、2). 稻熱病菌之配對型分布、3). 殺菌劑及食品防腐劑對稻熱病菌分生孢子發芽、菌絲生長及附著器形成之抑制作用。我們冀望這些試驗結果能對臺灣稻熱病菌的分類鑑定、配對型分布及對防治藥劑感受性等能獲得一些了解，以期對本病防治管理有所裨益。

材料與方法

一、菌株採集與核酸萃取

自2019年起訖2021年，分別前往臺灣各縣市採集罹稻熱病之水稻葉片，一及二期稻作均為採樣對象。於田間採得具稻熱病典型病斑之稻葉，攜返實驗室後，先以自來水沖洗葉片並拭乾，再剪取含病斑之稻葉片段置於載玻片，放入經噴水潤濕之9-cm玻璃培養皿，於室內 (24~28℃) 靜置至次日以待其產孢。將病斑上新產生的稻熱病菌分生孢子以移植針刮至裝有2%水瓊脂 (water agar) 平板之9-cm培養皿，於立體顯微鏡下以玻璃針單孢分離法獲得單孢菌株。單孢菌株培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA, DifcoTM, USA) 平板，在24℃黑暗定溫箱歷經5日。培養所得之菌種以直徑5 mm打孔器切取菌落周邊菌絲塊，放入內裝1 mL無菌水之2-mL冷凍小管 (cryogenic vial, Nalge Co., USA)，置16℃定溫箱作長期保存。為獲得試驗菌株所需基因組去氧核醣核酸 (genomic DNA)，乃選取代表全臺各縣市之28株供試株菌 (表一)，將其菌絲塊自冷凍小管移植於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板，在24℃黑暗定溫箱培養5日。刮取培養所生菌絲，再以核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit，百歐生技公司，臺灣) 抽取基因組去氧核醣核酸供後續試驗之用。

表一、本研究所用稻熱病菌菌株列表

TABLE 1. Isolates of rice blast fungus used in this study

Isolate ID	Geographical origin	Date collected
RB4	Xitun, Taichung	Sep. 2019
RB9	Zhushan, Nantou	Apr. 2020
RB29	Qingshui, Taichung	May 2020
RB30	Zhutang, Changhua	May 2020
RB38	Erlin, Changhua	May 2020
RB80	Xiluo, Yunlin	Sep. 2020
RB82	Huwei, Yunlin	Sep. 2020
RB105	Xinwu,Taoyuan	May 2021
RB107	Xinwu,Taoyuan	May 2021
RB112	Xinpu,Hsinchu	May 2021
RB123	Beitou,Taipei	Jun. 2021
RB129	Zaoqiao, Miaoli	Jun. 2021
RB132	Kanding, Pingtung	Jan. 2019
RB134	Linyuan, Kaohsiung	Mar. 2019
RB135	Wandan, Pingtung	Apr. 2019
RB137	Xingang, Chiayi	Oct. 2021
RB140	Guantian,Tainan	Oct. 2021
RB142	Houbi,Tainan	Oct. 2021
RB144	Taibao, Chiayi	Oct. 2021
RB146	Changzhi, Pingtung	Oct. 2021
RB148	Chishan, Taitung	Oct. 2021
RB151	Luye, Taitung	Oct. 2021
RB152	Jian, Hualien	Oct. 2021
RB157	Yuli, Hualien	Oct. 2021
RB159	Linnei, Yunlin	Nov. 2021
RB167	Sansing, Yilan	Mar. 2021
RB168	Wujie, Yilan	Mar. 2021
RB169	Toucheng, Yilan	May 2021

二、稻熱病菌之分子鑑定

為鑑定本研究分離所得稻熱病菌菌株的分類單位，爰採用3種稻熱病菌常用於鑑定之核酸序列於上述供試菌株的鑑定。此3種核酸序列分別為肌動蛋白基因 (*ACT*)、鈣調蛋白基因 (*CAL*) 及核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS) 等之核酸序列，用於增幅各核酸序列的引子對 (primer set) 詳如表二。聚合酶連鎖反應 (PCR) 的反應液總量為25 µL，包含主混合液 (master mix) PowerAmp 2X PCR mix-Green 12.5 µL (慧眾生技公司，臺灣)，正反向引子各1µL (10 µM)，及去離子水9.5 µL。聚合酶連鎖反應以基因擴增儀 (Thermal Cycler) Biometra TAdvanced (Analytic Jena GmbH, Germany) 進行核酸序列增幅。增幅條件先為95℃，10 min，接著進入35次增幅循環，每一循環開始為95℃，30 sec，引子黏合溫度 (annealing temperature) 依不同引子對而異，分別為*ACT* (55℃)、*CAL* (56℃) 及ITS (55℃)，均作用30 sec，延伸溫度 (extension temperature) 為72℃，1 min，最後再以72℃，7 min結束反應。聚合酶連鎖反應產物接續進行核酸雙向定序。聚合酶連鎖反應產物經以聚合酶連鎖反應產物純化試劑套組 (EasyPure PCR Cleanup Kit, 慧眾生物科技公司，臺灣) 進行純化及核酸定序 (源資國際生物科技公司，臺灣)，定序結果整理成序列重疊群 (sequence contig)[44]。序列比對所用之套裝軟體為BioEdit 3.3.19.0 (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)。菌株親緣性分析是以肌動蛋白基因、鈣調蛋白基因及核糖體核酸內轉錄間隔區等3種核酸序列鏈結之多種核酸序列進行之 (multilocus sequence analysis, MLSA)[33]。分析之菌株並加入*P. grisea*及*P. oryzae*參考菌株的相同序列供比較 (表三)。多核酸序列分析係先將全部供試菌株及參考菌株的各種序列分別並列切齊，再將同一菌株的3種序列鏈結成多種核酸序列，並將分析結果以系統發生樹 (phylogenetic tree) 呈現。核酸序列之編輯 (edit) 及排列 (align)，分別使用 Lasergene software package之SeqBuilder module及MegAlign Pro (DNASTAR, USA)，分析方法及系統發生樹建構均採用最大似然分析法 (maximum likelihood analysis in MEGA7) 及1000次重複取樣之bootstrap test檢驗關係樹各分枝的可信度[33]。本研究並選定代表菌株RB30之三種核酸序列上傳至基因銀行 (GenBank)，以取得其核酸序列代碼供後續研究之參考。

三、配對型鑑定

為得知本研究供試菌株之配對型，乃以聚合酶連鎖反應增幅菌株之配對型基因，兩種配對型基因*MAT1-1*及*MAT1-2*所用之引子對名稱及序列詳如表二。聚合酶連鎖反應所用之反應液及基因擴增儀同於前項試驗，反應增幅條件亦基本相同，先為95℃，10 min，接著進入35次增幅循環，每一循環開始為95℃，30 sec，兩種配對型引子對黏合溫度俱為60℃，均作用30 sec，延伸溫度 (extension temperature) 為72℃，1 min，最後再以72℃，7 min結束反應。增幅後之產物以1.2% 瓊脂精電泳膠片 (agarose gel) 呈現條帶 (band) 位置。

四、殺菌劑及食品防腐劑對稻熱病菌分生孢子發芽之影響

依據農委會農業藥物毒物試驗所網站之「植物保護資訊系統」[8]，選取國內稻熱病登記用藥12種，另加國內未登記但國外已用於該病害之藥劑7種，合計19種殺菌劑 (均為單劑) 作為本研究之供試藥劑，藥劑來源為廠商送請藥毒所檢驗之合格成品農藥剩餘樣品。供試藥劑及其廠牌如下：免賴得 (benomyl) (興農)、貝芬替 (carbendazim) (臺灣馬斯德)、培丹 (cartap hydrochloride) (臺灣三合)、護粒松 (edifenphos) (興農)、依普座 (epoxiconazole) (嘉泰)、芬諾尼 (fenoxanil) (雋農)、克熱淨 (iminoctadine tris albesilate) (臺灣住友)、丙基喜樂松 (iprobenfos) (臺灣庵原)、亞賜圃 (isoprothiolane) (正農)、嘉賜黴素 (kasugamycin) (大勝)、鋅錳乃浦 (mancozeb) (惠光)、

表二、本研究所用引子對序列與來源

TABLE 2. Primers used in this study, with sequences and sources

Gene	Product name	Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Reference
ITS	Internal transcribed spacer	ITS-1F	Forward	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes and Bruns 1993
		ITS-4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990
ACT	Actin	ACT-512F	Forward	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Carbone and Kohn 1999
		ACT-783R	Reverse	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	Carbone and Kohn 1999
CAL	Calmodulin	CAL-228F	Forward	GAG TTC AAG GAG GCC TTC TCC C	Klaubauf et al. 2014
		CAL-737R	Reverse	CAT CTT TCT GGC CAT CAT GG	Klaubauf et al. 2014
MAT1-1	MAT1-1	MAT1-1F	Forward	TGC GAA TGC CTA CAT CCT GTA CCG C	Takan et al. 2012
		MAT1-1R	Reverse	CGC TTC TGA GGA ACG CAG ACG ACC	Takan et al. 2012
MAT1-2	MAT1-2	MAT1-2F	Forward	TCT GCT TGA AGC TGC AAT ACA ACG G	Takan et al. 2012
		MAT1-2R	Reverse	CAT GCG AGG GTG CCA TGA TAG GC	Takan et al. 2012

表三、本研究參考菌株及代表菌株基因序列代號列表

TABLE 3. GenBank accession numbers of reference strains of ***Pyricularia*** and ***Xenopyricularia*** species and the representative isolate used in this study

Isolate ID[2]	Species	GenBank accession number[1]		
		ITS	*ACT*	*CAL*
JP0034	*P. grisea*	KM484883	KM485186	KM485257
CBS128304	*P. grisea*	KM484881	KM485184	KM485255
BR0029	*P. grisea*	KM484880	DQ240874	DQ240890
US0043	*P. grisea*	KM484885	KM485187	KM485258
PH0014	*P. oryzae*	KM484911	DQ240888	DQ240904
Guy11	*P. oryzae*	KM484904	KC167438	AF396024
CBS433.70	*P. oryzae*	KM484892	KM485193	KM485264
CBS657.66	*P. oryzae*	KM484893	KM485194	KM485256
RB30	*P. oryzae*	OP389047	OP394143	OP394144
CBS132356	*X. zizaniicola*	KM484946	AB274444	AB244480

1. ITS: internal transcribed spacer, ***ACT***: actin, and ***CAL***: calmodulin.
2. RB30 is the representative isolate of ***P. oryzae*** in our culture collections.

撲殺熱 (probenazole) (億豐)、撲克拉 (prochloraz) (日產)、百克敏 (pyraclostrobin) (巴斯夫)、得克利 (tebuconazole) (聯利)、克枯爛 (tecloftalam) (正農)、甲基多保淨 (thiophanate-methyl) (嘉農)、三賽唑 (tricyclazole) (聯利) 及維利黴素 (validamycin) (萬得發)等19種。又為篩選稻熱病替代性防治資材，乃以我國衛生福利部食品藥物管理署所公告之食品添加用防腐劑經初步篩選後，選出苯甲酸鈉 (sodium benzoate) (天津東大化工)、丙酸鈣 (calcium propionate) (臺灣華祥理化) 及己二烯酸鉀 (potassium sorbate) (山東昆達生技) 等3種供試，另購用於調整溶液酸鹼度 (pH value) 之冰醋酸 (glacial acetic acid) (臺灣長春化工)。

本試驗以微量滴定板法[19]測試19種稻熱病防治用殺菌劑 (表四) 及上述3種食品防腐劑對供試之28株稻熱病菌分生孢子發芽的抑制作用。分生孢子之獲得係將供試菌株培養於添加蕎麥粉之半量馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板 [buckwheat powder 12g + PDA (Difco) 19.5g + agar (Difco) 7.5g + tannic acid (Sigma-Aldrich) 1g + water 1L]，於24℃全時光照之定溫箱培養10日，或以浸濕且經殺菌釜滅菌之稻穀置於上述培養基2日，待菌絲長至稻穀後，將穀粒移到2%水瓊脂平板上，於室溫 (24~28℃) 及無光照環境下經隔夜，亦可於穀粒上產生所需之孢子。

藥劑之配製是將藥劑溶於無菌蒸餾水，並稀釋該藥劑至田間使用的標稱劑量 (label rate) (表四)，以作為對供試菌株抑制與否的試驗濃度。三種食品防腐劑則以每公升無菌蒸餾水加入2克食品防腐劑，待溶解後再以冰醋酸調降水溶液酸鹼度 (pH) 至4作為供試藥液。測試時，取49 µL供試藥液分別滴入微量滴定板之盤穴 (well)，再加入1 µL供試菌株之孢子懸浮液 (1×10^6 spores / mL)，均勻混合。另以供試菌株孢子加入無菌水之處理為對照。處理後之微量滴定板覆以封口膜 (Parafilm, PM-996, PARAFILM, USA) 以防水分蒸散並靜置於實驗室 (24~28℃)。2小時後，將盤穴內的混合液分別塗布於直徑9公分之2%洋菜平板，置於24℃之黑暗定溫箱。24小時後，於光學顯微鏡下計數孢子發芽率。每處理4重複，每重複計數200個孢子，以百分率表示孢子發芽率。供試菌株在不同藥劑處理下，其孢子發芽抑制率 (inhibition rate) 之計算是依據以下公式：

Inhibition rate (%)=1-(control-treatment/control)×100%。

由於三賽唑及芬諾尼的作用機制均為抑制細胞壁黑色素之合成[9]，故另以兩藥劑同前之最終劑量 (278及133 µg a.i./mL) 加入熔融之2%洋菜並倒入9-cm培養皿製成平板。將供試稻熱病菌分生孢子塗佈於添加三賽唑或芬諾尼的平板並覆以蓋玻片，24小時後觀察孢子發芽及附著器形成，以不加藥劑之2%洋菜平板處理作為對照。

五、殺菌劑及食品防腐劑對稻熱病菌菌絲生長之影響

為測試前述19種殺菌劑及3種食品防腐劑對供試之28株稻熱病菌菌絲生長之影響，乃以同上微量滴定板法進行本試驗[19]。以供試菌株生長於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基3日之菌落為

表四、本研究所用殺菌劑及食品防腐劑之種類、劑型、作用機制代碼及使用劑量

TABLE 4. Fungicides and food antiseptics used in this study

Fungicide[1]	Formulation[2]	FRAC Code[2,3]	Label rate (μg a.i./mL)[4]
Benomyl	50% WP	1, B1	333
Carbendazim	41.7% SC	1, B1	417
Cartap hydrochloride	50%SP	14	500
Edifenphos	50%EC	6, F2	500
Epoxiconazole	7.5%EC	3, G1	750
Fenoxanil	20%SC	16.2, I2	133
Iminoctadine tris (albesilate)	40%WP	M7	500
Iprobenfos	48%EC	6, F2	480
Isoprothiolane	40%SC	6, F2	400
Kasugamycin	5%SL	24, D3	25
Mancozeb	80%WP	M2	1600
Probenazole	6%GR	P, P2	120
Prochloraz	25%EC	3, G1	250
Pyraclostrobin	23.6%EC	11, C3	94.4
Tebuconazole	25.9%EC	3,G1	129.5
Tecloftalam	10%WP	34, un03	100
Thiophanate-methyl	40%SC	1, B1	400
Tricyclazole	41.7%SC	16.1, I1	278
Validamycin A	10%SL	U18	400
Calciun propionate	N/A	N/A	2000
Potassium Sorbate	N/A	N/A	2000
Sodium benzoate	N/A	N/A	2000

1. The three food antiseptics were acidified with glacial acetic acid to pH 4 before use.
2. N/A: not applicable.
3. FRAC: Fungicide Resistance Action Committee.
4. Label rate represents the recommended active ingredient concentration on a product label for disease control, and the food antiseptics concentrations were all set at 2000 μg/mL.

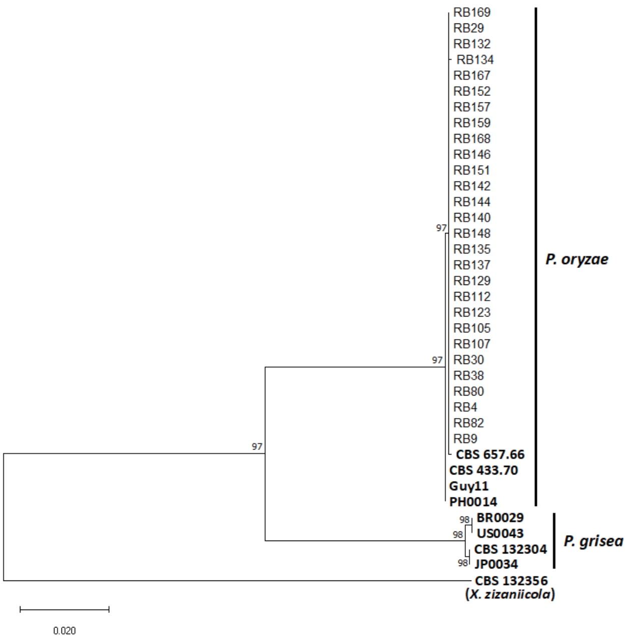
接種源，先以直徑5 mm打孔器切取菌落周緣之菌絲塊，將之分別放入注有200 μL供試藥液之微量滴定板盤穴內。另以菌絲塊加入無菌水的處理為對照。供試藥劑之稀釋方法及濃度同於前項試驗。上述處理於室溫下 (24~28℃) 進行2小時，再以移植針將菌絲塊挑出，置於經滅菌之擦手紙將藥液吸乾，再移置於直徑9 cm之馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板中央，於24℃ 黑暗之定溫箱培養5日。以通過菌落中心點之兩條垂直線為準，量取菌落直徑，並以二者之平均值為該菌落之直徑度量，以比較各藥劑抑制菌絲生長的效果。每菌株每藥劑處理4重複。供試菌株在不同藥劑處理下，其菌絲生長抑制率計算是以對照處理之菌落直徑減各藥劑處理之菌落直徑作為分子，而以對照處理之菌落直徑為分母，根據以下公式計算各藥劑對菌絲生長之抑制率Inhibition rate (%)=1-(control-treatment/control)×100%。

結　果

一、稻熱病菌之分子鑑定與配對型測定

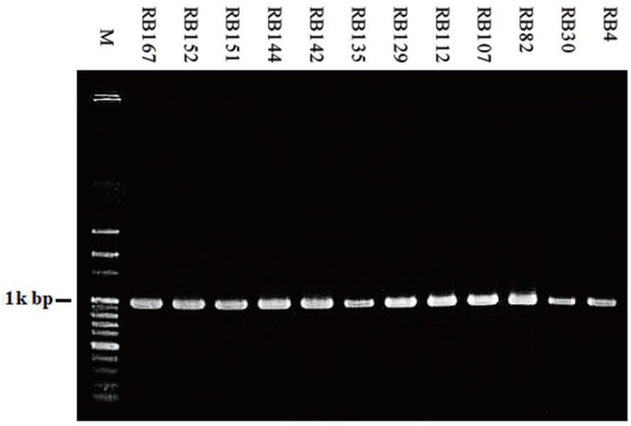
供試之28株稻熱病菌以核糖體核酸內轉錄間隔區 (ITS)、肌動蛋白基因 (*ACT*) 及鈣調蛋白基因 (*CAL*) 等3種核酸序列鏈結之多種序列分析結果顯示，稻熱病菌供試菌株與*P. oryzae*參考菌株均屬同一演化支，而*P. grisea*各菌株則構成另一演化支。供試稻熱病菌菌株之各種核酸序列間無差異，並與其參考菌株CBS657.66並列 (相似度99.9%)，而與該菌種其他參考菌株相似度為99.8%；至於供試菌株與*P. grisea*的4支參考菌株相似度則均為90.7% (圖一)。

供試菌株的配對型測定以Takan et al. (2012)[46] 開發的*MAT1-1*及*MAT1-2*基因專一性引子對 (表二) 進行試驗。經聚合酶連鎖反應，*MAT1-1*引子對增幅產生序列長度約960 bp之產物 (圖二)，而*MAT1-2*引子對則無增幅產物生成。依據此試驗結果推論，本研究所用菌株應均屬MAT1-1配對型。



圖一、稻熱病菌多種核酸序列親緣關係圖。

Fig. 1. Phylogenetic analysis of the isolates of rice blast pathogen *Pyricularia oryzae* and its related species *P. grisea* based on the concatenate sequences of internal transcribed spacer (ITS), actin (*ACT*), and calmodulin (*CAL*) genes. Reference strains are highlighted in bold type. *Xenopyricularia zizaniicola* was included as an outgroup. This analysis was performed by maximum likelihood (ML) method with MEGA7 software. The numbers beside nodes are ML bootstrap values. Bar represents the expected number of substitutions per site.



圖二、稻熱病菌配對型基因*Mat1-1*增幅片段膠片圖。

Fig. 2. Gel electrophoretic profile of PCR amplification of the mating type gene of *Pyricularia oryzae* isolates. The bands are PCR products of Mat1-1 (ca. 960 bp) performed on 1.2% agarose gel. Code names on the top of the gel represent the isolate IDs. M is DNA marker.

二、殺菌劑與食品防腐劑對孢子發芽之影響

供試殺菌劑對源自全臺各縣市之28株菌株的分生孢子發芽率呈現不同的抑制效果，表現最佳的是鋅錳乃浦及3種酸性化食品防腐劑 (苯甲酸鈉、丙酸鈣及己二烯酸鉀)，幾能完全抑制各菌株之孢子發芽。此外，依普座效果亦佳，丙基喜樂松及撲殺熱也能抑制半數以上菌株的孢子發芽。其他藥劑對供試菌株之孢子發芽抑制率多在25%以下，藥效不佳 (表五)。在三賽唑對附著器抑制試驗部分，該藥劑不但可完全抑制部分菌株 (RB4、9、107、112、123、132、134、137、142、146、152 及 159) 的孢子發芽，對其他菌株也有使其孢子發芽率降低的效應，而已發芽孢子則發芽管較短且均無附著器形成。在芬諾尼的部分，該藥劑濃度雖不能抑制供試菌株的孢子發芽，但均能使其不能產生附著器；即使有極少數發芽管末端膨大，但因乏黑色素，也不能形成正常的附著器。

三、殺菌劑與食品防腐劑對菌絲生長之影響

供試殺菌劑對28株供試菌株的菌絲生長抑制效果因不同藥劑而異，3種酸性化食品防腐劑具有完全的菌絲抑制率，依普座、鋅錳乃普及撲克拉等藥劑亦能完全抑制全部菌株的菌絲生長。貝芬替、克熱淨及得克利也能抑制大部分菌株之生長，而護粒松、丙基喜樂松及百克敏等約能抑制約３分之１菌株的生長。其餘藥劑對供試菌株的菌絲生長抑制率多在25%以下，藥效不佳 (表六)。

表五、殺菌劑對稻熱病菌孢子發芽之抑制率

TABLE 5. Fungicide activity against *Pyricularia oryzae* conidial germination in in vitro evaluations

	No. of isolate in each inhibition range (%)[1]					
Fungicide a.i.	0.0	0.1~ 25.0	25.1~ 50.0	50.1~ 75.0	75.1~ 99.9	100.0
Benomyl	0	12	7	6	1	2
Carbendazim	0	14	8	5	0	1
Cartap hydrochloride	2	25	1	0	0	0
Edifenphos	0	3	4	9	5	7
Epoxiconazole	0	0	1	3	3	21
Fenoxanil	3	23	2	0	0	0
Iminoctadine tris (albesilate)	0	20	2	0	1	5
Iprobenfos	0	0	0	1	11	16
Isoprothiolane	2	24	2	0	0	0
Kasugamycin	0	16	4	3	3	2
Mancozeb	0	0	0	0	0	28
Probenazole	1	5	1	3	3	15
Prochloraz	2	20	4	2	0	0
Pyraclostrobin	0	21	2	1	0	4
Tebuconazole	0	22	4	1	1	0
Tecloftalam	6	21	0	0	0	1
Thiophanate-methyl	3	25	0	0	0	0
Tricyclazole	3	18	3	0	2	2
Validamycin A	5	23	0	0	0	0
Calciun propionate	0	0	0	0	0	28
Potassium Sorbate	0	0	0	0	1	27
Sodium benzoate	0	0	0	0	0	28

[1.] Inhibition rate (%)=1- (control-treatment / control) ×100%. The treatment or control of conidial germination percentages were averages of 4 replications on water agar plates after-24-hour (24°C) following treatments.

討　論

稻熱病及其病原菌的研究一直是臺灣各農業試驗改良場所及大學農學院常見的研究課題，早期的研究著重在抗病育種及病原菌生理小種的研究以及流行病學、病害預測、化學防治及產量損失估計等[1, 2, 3, 4, 5]。儘管臺灣在稻熱病相關研究已累積了許多成果，但仍有不少工作尚待進行，特別是自分子生物學興起，研究工具增加，使得部分研究課題轉向基因層次的探討。本研究以分離自全臺各地28支稻熱病菌，探討其分子分類、配對型及對防治藥劑的感受性等即運用了一些分子技術，並獲得期待的結果。由於稻熱病菌曾有學名的爭議[14, 32, 42, 43]，為釐清臺灣地區稻熱病菌的分類單位，我們採用鏈結核糖體核酸內轉錄間隔區、肌動蛋白基因及鈣調蛋白基因等多種核酸序列進行親緣性分析。其結果顯示，供試稻熱病菌的這些核酸序列完全相同，且與模式菌株序列有極高相似度。但*P. grisea*與*P. oryzae* 在這些核酸序列則存有顯著差異 (圖一)，此與相關研究結果一致[14, 42]。由於上述分析結果可清楚區別這兩個菌種，亦使得稻熱病菌的分類爭議不再。且因上述序列差異明顯，單獨採用任一序列即能有效鑑別其菌種，這也為日後各種禾本科

表六、殺菌劑對稻熱病菌菌絲生長之抑制率

TABLE 6. Fungicide activity against *Pyricularia oryzae* mycelial growth in in vitro evaluations

Fungicide a.i.	No. of isolate in each inhibition range (%)[1]					
	0.0	0.1~ 25.0	25.1~ 50.0	50.1~ 75.0	75.1~ 99.9	100.0
Benomyl	0	6	9	4	7	2
Carbendazim	0	0	0	1	4	23
Cartap hydrochloride	8	19	0	1	0	0
Edifenphos	0	0	2	5	10	11
Epoxiconazole	0	0	0	0	0	28
Fenoxanil	7	20	1	0	0	0
Iminoctadine tris (albesilate)	0	0	0	0	3	25
Iprobenfos	0	0	4	3	10	11
Isoprothiolane	1	15	9	3	0	0
Kasugamycin	8	15	5	0	0	0
Mancozeb	0	0	0	0	0	28
Probenazole	6	21	1	0	0	0
Prochloraz	0	0	0	0	0	28
Pyraclostrobin	0	1	3	6	10	8
Tebuconazole	0	0	0	1	8	19
Tecloftalam	5	23	0	0	0	0
Thiophanate-methyl	10	18	0	0	0	0
Tricyclazole	10	18	0	0	0	0
Validamycin A	9	19	0	0	0	0
Calciun propionate	0	0	0	0	1	27
Potassium Sorbate	0	0	0	0	0	28
Sodium benzoate	0	0	0	0	0	28

1. Inhibition rate (%)=1- (control-treatment / control) ×100%. The treatment or control of colony diameters were averages of 4 replications after-5-day-growth (24°C) on potato dextrose agar plates following treatments.

作物或雜草上的*Pyricularia* spp.鑑定提供簡便可靠的方法。而本研究各菌株在這些核酸序列的一致性，則可能因具有相同的遺傳背景 (genetic background)，甚或源自共同的祖先 (common ancestor)。

根據世界各稻作產地的研究，稻熱病菌兩種配對型的分布變化很大，且不具規則性。例如，在非洲各地 (東非、西非及馬達加斯加) 採集的245株菌經試管交配 (in vitro cross)，雖兩種配對型均有，但比例懸殊，以Mat1.2 (MAT1-2) 為主要配對型，但所有菌株經交配試驗均無子囊殼產生[39]。而在推斷為稻熱病菌起源地之一的中國雲南省，252株稻熱病菌經聚合酶連鎖反應，其MAT1-1及MAT1-2配對型分別佔37.3及62.7%，比例尚屬接近[36]。另有研究收集全球34國水稻產區之467株稻熱病菌，約有半數可經配對試驗獲知其配對型，其MAT1-1型 (佔32%) 略多於MAT1-2 型 (佔20%)，另半數菌株則因無子囊殼生成而不確定其配對型；此外，大部分地區僅有一種配對型，而在中國、南韓及臺灣等地的菌株，其MAT1-1型菌株數量大幅高於MAT1-2型菌株[38]。本研究菌株全數為MAT1-1的結果，適可為之印證。據此推測，臺灣稻熱病菌可能尚無有性生殖，菌株變異應源自突變，但宜有更多相關研究，以支持這項推論。

化學藥劑經過長期使用，即有產生抗藥性的風險。例如在巴西，連續收集26年的稻熱病菌測其對3種不同作用機制殺菌劑的反應，結果指出，無論是菌株的分生孢子發芽率、附著器形成率以及菌絲生長等均隨菌株採集年份而逐年提升，顯示抗藥性的產生與藥劑使用時間具有正相關，但也因藥劑種類而有程度差異[16]。亞托敏及普克利對澳洲水稻稻熱病仍具良好的防治效果，則係因尚未有任何殺菌劑使用於該國稻熱病之防治，稻熱病菌因未接觸藥劑而未產生抗藥性[41]。另根據義大利的報告，當地稻熱病菌即使經過三賽唑及亞托敏的多年防治，病原菌對藥劑的敏感性均未降低[34]，這可能與藥劑使用的方法有關，例如，輪用不同作用機制藥劑，以降低抗藥性風險。本研究顯示，多數供試藥劑已呈現藥效不佳之狀況，但卻未必關乎藥劑的使用年代，例如，鋅錳乃浦及撲克拉雖經長期使用，藥效仍佳；而三賽唑也一直是國內稻熱病的主要防治用藥，推測應與藥劑作用機制或其化學結構有關。

在本研究中，三種酸化食品防腐劑：苯甲酸鈉、丙酸鈣及己二烯酸鉀對28株稻熱病菌的孢子發芽及菌絲生長的抑制率幾達100% (表五、六)，這樣的結果同於其對果樹炭疽病菌及草莓灰黴病菌的試驗結果[23, 24]。由於上述食品防腐劑並非針對病原菌單一標的部位 (target site) 作抑制，其作用點可能擴及病原菌許多代謝路徑，並對許多參與代謝的酵素具抑制作用，屬多作用點之接觸活性 (multi-site contact activity)，因其不易有抗藥性問題，值得進行田間藥效試驗以便日後推廣應用。作者曾以醋酸調降蒸餾水之處理進行抑菌試驗，結果並無效果[24]。而在先前的試驗中，因確知苯甲酸鈉及己二烯酸鉀需添加0.2及0.3% V/V醋酸以調降其酸鹼度，故在預備試驗中曾單獨以上述濃度醋酸水進行試驗，得知對稻熱病菌的孢子及菌絲並無抑制作用 (作者，未發表)。除上述食品防腐劑外，鋅錳乃浦及依普座對稻熱病菌之孢子與菌絲亦具極佳的抑制效果 (表五、六)。鋅錳乃浦為多點作用機制藥劑，具不易產生抗藥性之特性。依普座屬固醇去甲基酶抑制劑 (14α-demethylation inhibitor, DMI)，該藥劑於20多年前即已登記為水稻紋枯病的防治用藥，但本研究證實其對稻熱病亦具防治潛力，且兼有抑制其菌絲及孢子的功效，是唯一可與鋅錳乃浦並論的有效藥劑，其原因可能與抗藥菌株存活力遠低於感藥菌株有關[10]。克熱淨雖亦為多點作用機制藥劑，但僅對稻熱病菌菌絲生長有良好抑制作用，對孢子發芽則否，藥效與撲克拉類似，國內亦有研究支持這項結果[29]，而撲克拉僅抑制菌絲生長卻不抑制孢子發芽的特性也證之於其對果樹炭疽病菌及草莓灰黴病菌的作用[23, 24]。另有得克利與百克敏對稻熱病菌菌絲生長有較佳的抑制率，但對孢子發芽則較差，原因不明。撲殺熱的作用與水楊酸類似，可提升作物抗病性，但應不止於此，因本研究證實其藥效亦表現在對稻熱病菌

半數以上菌株的孢子發芽具抑制效果 (表五、六)。又，本研究顯示，兩種黑色素合成抑制劑 (melanin biosynthesis inhibitor) 三賽唑及芬諾尼對供試稻熱病菌已發芽孢子的附著器具完全抑制作用，而三賽唑更有抑制部份菌株孢子發芽的能力，這兩種藥劑藥效均甚佳，國內亦早有溫室盆栽試驗支持三賽唑的防治潛力[35]。據日本的報告，芬諾尼等黑色素合成抑制劑在引進使用後3年即有抗藥性菌株出現，但停用後隔年抗藥菌株的頻率即大幅下降，可能肇因於抗藥菌株的生存適應力又稱適合度代價 (fitness cost) 低於感藥菌株以及族群結構的快速改變[45]，這表示此類藥劑仍潛存抗藥性問題。謝氏等報告，三賽唑及加普胺 (carpropamid) 分別在1及4 ppm的濃度下即能完全抑制稻熱病菌附著器之黑色素合成[27]，這是在實驗室內的試驗，藥劑易於發揮其效用。但謝氏在另一研究稱：「三賽唑對所有供試菌株之半數有效抑制濃度 (EC_{50}) 值介於14.63±15.40 μg/mL至179.34±16.08 μg/mL之間；而加普胺對所供試稻熱病菌株的EC_{50}值介於52.47±5.33 μg/mL至463.71±202.72 μg/mL之間或 >500 μg/mL」[28]。本文在三賽唑及芬諾尼的試驗濃度分別為278及133 μg/mL，與前述謝文可互相參證。上述結果表示，試驗方法及作用標的等因素會使藥劑在劑量上有極大差異。本研究為使試驗方法一致，全部藥劑均使用標稱濃度，雖藥劑濃度甚高，但就抑制孢子發芽與菌絲生長而言，尚屬合理。綜觀藥效試驗的結果表示，稻熱病菌不同菌株間對藥劑的感受性差異較大，這與果樹炭疽病菌及草莓灰黴病菌對藥劑多呈現一致性的反應不同[20, 21, 23]，其原因則待後續研究。

謝　辭

本研究承行政院農業委員會110農科-5.3.1-藥-P2及111農科-5.3.1-藥-P2計畫經費補助，復承農業試驗所陳繹年助理研究員及高雄區農業改良場曾敏南課長慨贈部分菌株，謹此一併致謝。

引用文獻

1. Anonymous, 1971. Rice Diseases. Proceedings of a Symposium on Rice Diseases at JCRR. R.-J. Chiu ed. Joint Commission on Rural Reconstruction, Taipei, 371 pp. (in Chinese)
2. Anonymous, 1990. Rice Blast. Proceedings of a Symposium on Forecasting of Rice Pests. C.-C. Tu, C.-W. Tsai, C.-C. Chien, W.-H. Tsai, and Y.-C., Chang, eds. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, 119 pp. (in Chinese)
3. Anonymous, 1991. Proceedings of a Symposium on Rice Diseases. C.-C. Tu, C.-W. Tsai, C.-C. Chien, W.-H. Tsai, and Y.-C., Chang, eds. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, 413 pp. (in Chinese)
4. Anonymous, 2007. Compendium of Rice Protection. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, 457 pp. (in Chinese)
5. Anonymous, 2009. Proceedings of a Symposium on Achievements and Perspectives of Rice Protection in Taiwan. H. F. Ni and H. R. Yang eds. Chiayi Agricultural Research Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, 161 pp. (in Chinese)
6. Anonymous, 2019. List of Plant Diseases in Taiwan 5th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taichung, 329 pp. (in Chinese)
7. Anonymous, 2020. Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan R.O.C., Taipei, 340 pp. (in Chinese)
8. Anonymous, 2021. Plant Protection Information System. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung. Retrieved from https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/ (July 07, 2022). (in Chinese).
9. Anonymous, 2022. Melanin synthesis in cell wall. Retrieved from https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/by-fungicide-common-name (July 07, 2022).
10. Cai, M., Miao, J., Chen, F., Li, B., and Liu, X. 2021. Survival cost and diverse molecular mechanisms of *Magnaporthe oryzae* isolate resistance to epoxiconazole. Plant Dis. 105:473-480.
11. Carbone, I., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553-556.
12. Chen, Y.-S., Ou, J.-H., and Chen, C.-Y. 2022. Naming and Identifying Plant Pathogenic Fungi. Pages 222-240 in: Proceedings of the Symposium on 2022 the Application of Crop Pest Classification and Identification Technology in Plant Health Inspection and Quarantine. S.-P. Chen, J.-N. Tsai, Y.-J. Dong, C.-Y. Lee, and S.-C. Chang eds. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, 336 pp. (in Chinese)
13. Choi, J., Park, S.-Y., Kim, B.-R., Roh, J.-H., Oh, I.-S., Han, S.-S. and Lee, Y.-H. 2013. Comparative analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe grisea* species complex. PLoS ONE 8(2): e57196.
14. Couch, B. C., and Kohn, L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. Mycologia 94:683－693.
15. Crous, P. W., Carris, L. M., Giraldo, A. Groenewald, J. Z., Hawksworth, D. L., Hemández-Restrepo, M., Jaklitsch, W. M., Lebrun, M.-H., Schumacher, R. K., Stielow, J. B., van der Linde, E. J., Vilcāne, J., Voglmayr, H., and Wood, A. R.

2015. The Genera of Fungi - fixing the application of the type species of generic names – G 2: ***Allantophomopsis***, ***Latorua, Macrodiplodiopsis***, ***Macrohilum***, ***Milospium***, ***Protostegia, Pyricularia***, ***Robillarda***, ***Rotula***, ***Septoriella***, ***Torula***, and ***Wojnowicia***. IMA Fungus 6:163 – 198.

16. D'Ávila, L. S., Corsi De Filippi, M. C., and Café-Filho, A. C. 2021. Sensitivity of ***Pyricularia oryzae*** populations to fungicides over a 26-year time frame in Brazil. Plant Dis. 105:1771-1780.
17. Dayakar, B. V., Narayanan, N. N., and Gnanamanickam, S. S. 2000. Cross-compatibility and distribution of mating type alleles of the rice blast fungus ***Magnaporthe grisea*** in India. Plant Dis. 84:700-704.
18. Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13:414-430.
19. Duan, C. H. 2015. Microtiter plate for evaluation of plant extracts and oils against ***Uromyces appendiculatus*** and ***Botrytis cinerea***. Plant Pathol. Bull. 24:67-75. (in Chinese).
20. Duan, C. H., Pan, H. R., and Wang, C. C. 2018. Identification, pathogenicity and fungicide sensitivity of ***Colletotrichum*** isolates from five fruit crops in Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 5:91-111. (in Chinese)
21. Duan, C. H., Pan, H. R., and Wang, C. C. 2019. Molecular identification and fungicides sensitivity of ***Colletotrichum*** isolates from various fruit crops in Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 6:71-104. (in Chinese)
22. Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2020 a. Molecular identification and fungicides sensitivity of ***Colletotrichum*** isolates from grape in Taiwan. J. Plant Med. 62 (4):23-32. (in Chinese)
23. Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2020 b. Sensitivity to fungicides and food antiseptics in ***Botrytis cinerea*** from strawberry in Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 9:99-116. (in Chinese).
24. Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2021. Sensitivity to food antiseptics among ***Colletotrichum*** isolates collected from various fruit crops in Taiwan. J. Plant Med. 63 (2):9-16. (in Chinese)
25. Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:113-118.
26. Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, and S. M., Toulmin, C. 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. Science. 372(5967):812 – 818.
27. Hsieh, C.-H. 2011. Studies on melanin biosynthesis inhibitors (MBIs) and strobilurins (QoIs) sensitivity and population diversity of ***Pyricularia oryzae*** in Taiwan. Master thesis, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, 48 pp. (in Chinese)
28. Hsieh, C.-H., Chung, W.-C., Chen, Y.-N., and Chung, W.-H. 2013. Phylogenetic diversity and sensitivity to MBI and QoI fungicides of ***Magnaporthe oryzae*** in Taiwan. J. Pestic. Sci. 38(4):194 – 199.
29. Huang, W.-H., Lin, Y.-H., Cheng, C.-H., Lin, Y.-R., and Chu, S.-C. 2021. Selection of rice blast resistant varieties and evaluation of control benefits in Miaoli. MDARES Bulletin 10:15-32. (in Chinese)
30. Itoi, S., Mishima, T., Arase, S., and Nozu, M. 1982. Mating behavior of Japanese isolates of ***Pyricularia oryzae***. Phytopathology 73:155-158.
31. Khush, G.S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. Plant Mol. Biol. 59:1-6.
32. Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., de Vries, R. P., and Lebrun, M.-H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of ***Pyricularia*** (Pyriculariaceae). Stud. Mycol. 79:85-120.
33. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33:1870-1874.
34. Kunova, A., Pizzatti, C., Bonaldi, M., and Cortesi, P. 2014. Sensitivity of nonexposed and exposed populations of ***Magnaporthe oryzae*** from rice to tricyclazole and azoxystrobin. Plant Dis. 98:512-518.
35. Leu, L. S., and Yang, H. C. 1979. Comparative effectiveness of ten recommended fungicides in rice blast disease control. Plant Prot. Bull. 21:415-421. (in Chinese)
36. Li, J., Lu, L., Jia, Y., Wang, Q., Fukuta, Y., and Li, C. 2016. Characterization of field isolates of ***Magnaporthe oryzae*** with mating type, DNA fingerprinting, and pathogenicity assays. Plant Dis. 100:298-303.
37. McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme V. R., Smith, G. F., Wiersema, J. H., and Turland, N. J. 2012. International code of nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress. Melbourne, Australia, July 2011. Regnum Vegetabile 154. Gantner, Ruggell, 240 pp.
38. Notteghem, J. L., and Silue, D. 1992. Distribution of mating type alleles in ***Magnaporthe grisea*** population pathogenic on rice. Phytopathology 82:421-424.

39. Odjo, T., Diagne, D., Adreit, H., Milazzo, J., Raveloson, H., Andriantsimialona, D., Kassankogno, A. I., Ravel, S., Gumedzoe, Y. M. D., Ouedraogo, I., Koita, O., Silue, D., and Tharreau, D. 2021. Structure of African populations of *Pyricularia oryzae* from rice Phytopathology 111:1428-1437.
40. Onaga, G., Wydra, K., Koopmann, B., Sere, Y., and von Tiedemann, A. 2015. Population structure, pathogenicity, and mating type distrution of *Magnaporthe oryzae* isolates from East Africa. Phytopathology 105:1137-1145.
41. Pak, D., You, M. P., Lanoiselet, V., and Barbetti, M. J. 2017. Azoxystrobin and propiconazole offer significant potential for rice blast (*Pyricularia oryzae*) management in Australia. Eur. J. Plant Pathol. 148:247-259.
42. Qi, H., Yang, J., Yin, C., Zhao, J., Ren, X., Jia, S., and Zhang, G. 2019. Analysis of *Pyricularia oryzae* and *P. grisea* from different hosts based on multilocus phylogeny and pathogenicity associated with host preference in China. Phytopathology 109:1433-1440.
43. Rossman, A. Y., Howard, R. J., and Valent, B. 1990. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast fungus. Mycologia 82:509-512.
44. Staden, R. 1980. A new computer method for the storage and manipulation of DNA gel reading data. Nucleic Acids Res. 8:3673-3694.
45. Suzuki, F., Yamaguchi, J., Koba, A., Nakajima, T., and Arai, M. 2010. Changes in fungicide resistance frequency and population structure of *Pyricularia oryzae* after discontinuance of MBI-D fungicides. Plant Dis. 94:329-334.
46. Takan, J.P., Chipili, J., Muthumeenakshi, S., Talbot, N. J., Manyasa, E. O., Bandyopadhyay, R., Sere, Y., Nutsugah, S. K., Talhinhas, P., Hossain, M., Brown, A. E., and Sreenivasaprasad, S. 2012. *Magnaporthe oryzae* populations adapted to finger millet and rice exhibit distinctive patterns of genetic diversity, sexuality and host interaction. Mol. Biotechnol. 50:145 – 158.
47. Tsai, W. H. 2009. The review on the studies of rice blast. Pages. 1-12. In: Proceedings of Symposium on Achievements and Perspectives of Rice Protection in Taiwan. H. F., Ni, Yang, H. R. Yang eds. Chiayi Agricultural Research Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, 160 pp. (in Chinese)
48. White, T. J., Bruns, T, Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White eds. Academic, USA, 482 pp.
49. Zeigler, R. S. 1998. Recombination in *Magnaporthe grisea*. Annu. Rev. Phytopathol. 36:249-275.
50. Zeng, J., Feng, S., Cai, J., Wang, L., Lin, F., and Pan, Q. 2009. Distribution of mating type and sexual status in Chinese rice blast populations. Plant Dis. 93:238-24

ABSTRACT

Duan, C.-H.* and Chen, G.-Y. 2023. Molecular identification, mating type, and fungicide sensitivity of *Pyricularia oryzae* isolates from Taiwan. J. Plant Med. Plant. 65(1): 33-42.
*Corresponding author, E-mail: chduan@tactri.gov.tw

Pyricularia oryzae is a filamentous phytopathogen of rice fields worldwide, causing considerable losses to rice production. In the present study, 28 field isolates of rice blast pathogen representing all regions of paddies in Taiwan were assessed for their taxon, mating type, and fungicide sensitivity. All isolates were identified as *P. oryzae* and significantly different from *P. grisea* based on the concatenate sequences of internal transcribed spacer, actin, and calmodulin genes. Only Mat1-1 mating type was present among all test isolates based on polymerase chain reaction assays. According to microtiter plate assays, mancozeb and acidified calcium propionate, potassium sorbate, and sodium benzoate each could completely inhibit conidial germination and mycelial growth of all isolates. In addition, epoxiconazole followed by iprobenfos and probenazole exhibited a good inhibition effect on their spore germination. On the other hand, epoxiconazole and prochloraz could inhibit mycelial growth of all isolates, and carbendazim, iminoctadine tris (albesilate), and tebuconazole inhibit the growth of most isolates. Besides, fenoxanil and tricyclazole inhibited appressorium formation showing great potential in controlling the rice blast.

Keywords: fungicide sensitivity, mating type, *Pyricularia oryzae*