

由 *Dickeya zeae* 引起之水稻細菌性基腐病

林靜宜¹ 黃巧雯¹ 楊宏仁² 蔡佳欣³ 許淑麗⁴ 倪蕙芳^{5,*}

摘要

林靜宜、黃巧雯、楊宏仁、蔡佳欣、許淑麗、倪蕙芳。2016。由 *Dickeya zeae* 引起之水稻細菌性基腐病。台灣農業研究 65(2):207–217。

水稻細菌性基腐病為近來陸續在台灣各地發生之水稻新病害，可造成水稻莖基部產生黑褐色腐爛病徵，已於台灣新竹縣、嘉義縣、苗栗縣、雲林縣及台南市等地發現。本研究自嘉義疑似水稻罹病株經分離純化一種細菌分離株，經水稻接種試驗可產生與田間相似之病徵，並完成柯霍氏法則，確認為此細菌引起。此細菌經 Biolog 鑑定系統鑑定及多種基因 (16S rDNA、*gyrB* 及 *dnaX*) 之序列比對，確認為 *Dickeya zeae*。將此病原菌接種至不同作物，發現除了水稻之外，亦對玉米、馬鈴薯、蘿蔔、白菜及洋蔥等作物具有致病性。該菌於不同溫度下進行液態培養，結果發現此菌可於 10–40°C 生長，30–35°C 為最適溫度。此外，選用 26 種不同的水稻品種進行對水稻細菌性基腐病菌之感受性試驗，結果顯示所有品種皆可被感染，其中以「台稉 8 號」最為感病，罹病率可達 94.44%。利用濾紙圓盤法測試 10 種市售藥劑對此病原菌之生長抑制能力，結果以 20% 歐索林酸可濕性粉劑之抑制效果最佳。而溫室藥效試驗結果也顯示，以 20% 歐索林酸可濕性粉劑 1,000× 稀釋液，於接種前施用可有效防治水稻細菌性基腐病，顯示歐索林酸可做為農政單位未來推廣防治水稻基腐病藥劑之參考。

關鍵詞：水稻、細菌性基腐病、藥劑篩選。

前言

水稻 (*Oryza sativa*) 為禾本科單子葉植物，是世界重要糧食作物之一。依國際農糧組織 Rice Market Monitor 之資料顯示，2014 年全球稻的栽培面積約為 1.6×10^9 ha，稻米生產約為 7.4×10^9 Mg (<http://www.fao.org/3/a-i4147e.pdf>)，亞洲、南美洲、中美洲、非洲等地區皆有種植。其中，以亞洲為最大生產地區，約占全球產量之 90%，具有充沛降雨之季風氣候型態的國家幾乎都是生產稻米的大國，如中國、印度、印尼等國家。在台灣，水稻亦是重要的糧食作物，根據行政院農委會 2013

年農業年報 (<http://www.afa.gov.tw/Public/GrainStatistics/20144241424285334.pdf>) 統計，全台稻作栽種面積約為 270,264 ha，產量約為 1,275,456 Mg，栽種面積及產量都是以稈稻最多，秈稻次之。

台灣氣候高溫多濕，病蟲害繁多，根據台灣植物病害名彙 (Hsu *et al.* 2002) 及相關研究報告紀錄，台灣目前已記載 80 種病原，其中水稻栽培期發生之細菌性病害有水稻白葉枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、細菌性穀枯病 (*Burkholderia glumae*)、細菌性條斑病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) (2007 年發現) (Chen *et al.* 2008) 等 3 種病害。自 2009

投稿日期：2015 年 7 月 31 日；接受日期：2015 年 10 月 6 日。

* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣嘉義市。

² 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣嘉義市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣台中市。

⁴ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣嘉義市。

⁵ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣嘉義市。

年起，新竹、嘉義及彰化等地區之水稻栽植田發現部分水稻根節部和莖基部，最初於土表附近之莖基部引起水浸狀橢圓形病斑，逐漸擴展為不規則形之黑褐色病斑，剝開葉鞘可見罹病處變黑褐色，繼之腐爛，且有惡臭，嚴重時，植株心葉變黃枯死。經比對文獻資料後，懷疑是由細菌性軟腐病菌所造成之水稻細菌性基腐病 (rice bacterial foot rot)，類似病害又於 2013 年於苗栗縣、雲林縣、嘉義縣及台南市等多處水稻田發現，發生範圍已有擴散的趨勢。

水稻細菌性基腐病最早於 1977 年在日本靜岡發現 (Goto 1979)，之後於中國、菲律賓、印度、印尼、孟加拉等東南亞國家皆有發生，部分地區危害較嚴重，現已成為印度重要之水稻細菌性病害 (Amarjit *et al.* 2009; Liu *et al.* 2013)。此外，2011 年於歐洲之水稻栽培區亦發現水稻細菌性基腐病之零星發生 (Bertani *et al.* 2013)。水稻細菌性基腐病在中國發生甚為廣泛，已於中國大陸 15 個省區先後發現此病害之危害，並有擴展蔓延及逐年嚴重的趨勢 (Liu *et al.* 2013)。由於此病害可於水稻不同生長時期感染，水稻分蘖期至孕穗期皆可發病，罹病水稻植株之分蘖減少、莖基部腐爛、產生白穗，嚴重者可造成水稻大面積無法收成。此病害於中國大陸造成水稻產量減少 5–30%，嚴重時可達 50% 以上 (Zhou *et al.* 2009)，對水稻生產影響甚大。

水稻細菌性基腐病是由 *Dickeya* 屬之軟腐細菌所引起，此屬細菌原歸類於 *Erwinia chrysanthemi*，由於 Hauben *et al.* (1998) 利用 16S rDNA 序列分析將原屬於 *Erwinia* 屬之軟腐細菌，歸類於 *Pectobacterium* 屬中，因而使 *E. chrysanthemi* 重新歸屬於 *Pectobacterium chrysanthemi*；此外，Samson *et al.* (2005) 依據 DNA-DNA 雜合反應、16S rDNA 序列、血清特性及表現型的結果進行分析後，再將 *P. chrysanthemi* 歸類於新屬 *Dickeya* 中。*Dickeya* 屬之病原細菌為格蘭氏陰性菌、兼性嫌氧菌，可藉由傷口侵入寄主組織，並可產生果膠分解酵素，分解植物細胞壁與中膠層中之果膠物質，造成植物組織之軟化與崩解。因此，往

往造成寄主植物產生軟腐病徵，有些則可造成黑腳 (black-leg)、萎凋 (wilting) 等病徵。此病原菌可侵染雙子葉及單子葉植物，重要經濟作物除了水稻之外，其他如玉米、馬鈴薯、香蕉等皆為其寄主 (Samson *et al.* 2005)，已成為目前世界重要植物病原細菌，且其發生範圍不斷擴大 (Stead *et al.* 2010)。

在台灣，針對水稻細菌性基腐病並無進行相關研究，防治上亦無使用的推薦藥劑，為避免未來造成大量經濟損失，因此本研究將探討台灣之水稻細菌性基腐病菌之特性及評估其對台灣不同水稻品種之抗感病性，同時亦進行防治藥劑之篩選，以提供該病害管理防治參考。

材料與方法

菌株來源

自嘉義地區採集罹病之水稻植株，洗淨瀝乾後，切取病健部組織，經 0.5% 次氯酸鈉 (NaOCl) 及 70% 酒精表面消毒各 30 s，再以無菌水漂洗 3 次後，將組織切碎置入無菌水中震盪均勻。利用移植環沾取懸浮液劃線塗於 NA (Nutrient agar) (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, France) 培養基平板上，置於 27°C 定溫箱中培養 2–3 d 待細菌長出後，挑選單一菌落移植至新的 NA 培養基平板，重複 3 次以純化細菌。純化後之菌株保存於生理食鹽水中，以供日後試驗使用。

病原性試驗

接種試驗選用種植 2 個月之水稻品種「台稈 8 號」作為試驗植物，供試植物種植於長方形塑膠盆中 (54 cm × 43.5 cm × 13 cm)，每盆種植 20 株水稻，共 3 重複。選用細菌分離株 Ech-1218 作為接種菌株。接種原製備方法為將保存分離株活化培養於 NA 培養基，接種前 1 d 大量更新分離菌株於 YDC 培養基 (yeast extract dextrose calcium carbonate) 培養基 (Wilson *et al.* 1967)，再以無菌蒸餾水配置成細菌懸浮液，並將濃度調整約為 10^8 cfu mL⁻¹。接種方式如下：水稻植株先以滅菌過之牙籤針刺水稻莖基部 1 cm 處，再倒入 1,300 mL 之菌液至上述種有水稻之塑膠盆中進行接

種。另設不接種之水稻作為對照組，置於溫室中觀察發病情形，之後再自接種植株之罹病組織分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

Biolog Identification System 鑑定菌株

將 Ech-1218 供試菌株利用 Biolog 鑑定系統進行分析，菌株先培養於 5.7% BUGTM agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., CA, USA) 培養基，於 30°C 下培養 16–24 h。再以 IF-A 接種液 (Biolog Inc., CA, USA) 將細菌懸浮，並調整其濃度至 90–98% T (Turbidity) 後，加入 Biolog GEN III 反應盤 (Biolog Inc., CA, USA) 中，每孔加入 100 μL 之懸浮液。培養 20–24 h 後，以光譜儀測讀，將所得資料與 Biolog GEN III 資料庫 (2.6.1 版) 比對，以鑑定細菌種類。

菌株分子鑑定

參考 Wang *et al.* (1993) 之方法並略加修改後進行核酸萃取，將培養於 NA 培養基上之純化菌株 Ech-1218 以滅菌牙籤沾取單一菌落，放入 50 μL 之 0.5 N NaOH。劇烈震盪後短暫離心，再加入 150 μL 之 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 混合均勻。取 10 μL 加入無菌水稀釋 10 倍，再以此製備液 2 μL 作為模板。利用 16S rDNA 序列設計的廣效性引子對 (fD1/rP1) (Weisburg *et al.* 1991) 以及針對 *Dickeya* 屬之 DNA gyrase gene (*gyrB*) 與 DNA polymerase III gamma subunit gene (*dnaX*) 設計之引子對 *gyrB*f1/*gyrB*r1 (Pu *et al.* 2012)、*dnaX*f/*dnaX*r (Slawiak *et al.* 2009) 進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，並將其產物進行定序及序列比對以鑑定細菌種類。

病原菌對不同作物之致病性

接種試驗利用株高約為 20 cm 之飼料玉米品種「台農 1 號」作為供試植物，供試植物種植於 45 圓孔穴盤，內含泥炭土。接種方法以滅菌之牙籤沾取細菌懸浮液 (濃度為 10^8 cfu mL^{-1}) 後，穿刺玉米植株莖基部，並以沾取無菌水之牙籤穿刺接種處理作為對照組。接種後植株套上塑膠袋保濕 24 h 後，除去塑膠袋置網室中觀察病徵發展，每種處理分別接種 8

棵，之後再自接種植株之罹病組織分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。此外，胡蘿蔔塊根、洋蔥鱗莖、馬鈴薯塊莖及包心白菜則利用針筒注射方式，將 50 μL ，濃度為 10^8 cfu mL^{-1} 之細菌懸浮液注射入供試植物組織中，每處理 2 重複。放入密封之保鮮盒中保濕，並置於 27°C 定溫箱中觀察病徵發展，另以無菌水接種處理作為對照組。

溫度對病原菌生長之影響

以無菌蒸餾水將供試菌株配置成細菌懸浮液，並將濃度調整約為 10^5 cfu mL^{-1} ，取 100 μL 之細菌懸浮液加入 5 mL 之 LB Broth (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, USA) 中，分別置於 10°C 至 40°C，間隔 5°C 之不同溫度之震盪培養箱中 (轉速 100 rpm)，每處理 2 重複。24 h 後取出，以系列稀釋平板法計算菌落數後，推估菌株生長濃度。

病原菌對不同水稻品種 (系) 之抗病性測定

自優良水稻推廣品種、曾在台灣種植面積達前 10 大之水稻品種或是嘉義農業試驗分所育成、保存之品種 (系) 中，共選取 26 個水稻品種 (系) 進行測定，其中包含梗稻 18 種：「台農 67 號」(‘TNG67’)、「台農 70 號」(‘TNG70’)、「台農 72 號」(‘TNG72’)、「台農 74 號」(‘TNG74’)、「台農 75 號」(‘TNG75’)、「台梗 2 號」(‘TK2’)、「台梗 4 號」(‘TK4’)、「台梗 8 號」(‘TK8’)、「台梗 9 號」(‘TK9’)、「台梗 14 號」(‘TK14’)、「台梗 16 號」(‘TK16’)、「高雄 139 號」(‘KH139’)、「台南 11 號」(‘TN11’)、「桃園 3 號」(‘TY3’)、「台東 30 號」(‘TD30’)、「台中 192 號」(‘TC192’)、嘉農育 941001 (CNY941001) 與嘉農育 941002 (CNY941002)，秈稻 4 種：「台中秈 10 號」(‘TCS10’)、「台農秈 14 號」(‘TNGS14’)、「台農秈 19 號」(‘TNGS19’)、「台農秈 22 號」(‘TNGS22’) 及秈糯稻 4 種：嘉農秈糯育 892220 號 (CNSY892220)、嘉農秈糯育 892229 號 (CNSY892229)、嘉農秈糯育 892233 號 (CNSY892233) 與嘉農秈糯育 892234 號 (CNSY892234)。各品種及品系利用種子播種發芽後，於網室生長 2 mo 後供接種試驗。接種方法如

上述病原性試驗所述，每品種接種 3 株，各 3 重複，試驗重複 2 次。另設不接種之對照組，接種 2 wk 調查罹病率 (disease incidence)。

藥劑感受性測定

供試藥劑：選用植物保護手冊推薦於防治水稻細菌性病害及其他作物細菌性軟腐病之推薦藥劑作為供試藥劑，共 10 種，包括：77% 氫氧化銅可濕性粉劑 (copper hydroxide, 瑞芳農藥植物保護股份有限公司)、40% 銅快得寧可濕性粉劑 (copper hydroxide + oxine-copper, 瑞芳農藥植物保護股份有限公司)、2% 嘉賜黴素溶液 (kasugamycin, 大勝化學工業股份有限公司)、81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 (kasugamycin + copper oxychloride, 大勝化學工業股份有限公司)、20% 歐索林酸可濕性粉劑 (oxolinic, 立農化學股份有限公司)、10% 鏈四環黴素 (streptomycin + tetracycline, 全台農藥有限公司)、10% 克枯爛可濕性粉劑 (tecloftalam, 大勝化學工業股份有限公司)、14% 嘉賜克枯爛可濕性粉劑 (tecloftalam + kasugamycin, 大勝化學工業股份有限公司)、30.3% 四環黴素可溶性粉劑 (tetracycline, 全台農藥有限公司) 及 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑 (thiophanate methyl + streptomycin, 瑞芳農藥植物保護股份有限公司)。以上供試藥劑之濃度為 10、100 及 1,000 mg L⁻¹。

根據 Tsai *et al.* (2001) 之方法，將直徑 0.8 cm 之濾紙圓盤 (TOYO ADVANTEC) 置於上述各藥劑之不同稀釋倍數之溶液中，於室溫下浸漬 24 h 後將濾紙圓盤取出陰乾，再放置於已塗佈有 0.1 mL 細菌懸浮液 (濃度約為 10⁸ cfu mL⁻¹) 之 NA 培養基平板上 (直徑 9 cm)。每 1 培養平板放 4 個濾紙圓盤，並以無菌水處理之濾紙圓盤作為對照組。將各處理之培養平板放置於 27°C 無光照定溫箱內，培養 2 d 後，取出觀察細菌生長情形，並測量抑制圈大小 (扣除濾紙圓盤直徑 8 mm)。每處理 3 重複，試驗重複 2 次。

溫室藥效試驗

藥效試驗選用種植 1 mo 之水稻品種「台南 11 號」作為試驗植物，供試植物種植於方

型塑膠盆中 (17 cm × 17 cm × 8 cm)，每盆 3 株，置於溫室中生長。供試藥劑以室內藥劑篩選對病原細菌生長較具抑制能力之 20% 歐索林酸可濕性粉劑，及不具生長抑制能力之 77% 氫氧化銅可濕性粉劑作為對比，另以不施藥作為對照。每處理 3 株，各 3 重複。接種方式為利用滅菌牙籤針刺植株莖基部後，將濃度約為 10⁸ cfu mL⁻¹ 之細菌懸浮液，每盆定量 200 mL，倒入盆中。施藥方式是將 20% 歐索林酸可濕性粉劑以 1,000× 稀釋，77% 氫氧化銅可濕性粉劑以 800× 稀釋後，分別將稀釋藥劑每盆定量 200 mL 加入盆中。施藥時間分為 2 種，一為接種前 1 d 進行第 1 次施藥，另一為接種後 1 d 進行第 1 次施藥，之後兩者均於第 1 次施藥 7 d 後再進行第 2 次施藥。於第 2 次施藥後 7 d 進行病害調查，依病斑之大小分為 0–4 級，0：無病斑；1：病斑長度 < 1 cm；2：1 cm ≤ 病斑長度 < 2 cm；3：2 cm ≤ 病斑長度 < 3 cm；4：病斑長度 ≥ 3 cm，或植株莖部褐化、腐爛，並依下列公式算出罹病度：

罹病度 (%) =

$$\left[\frac{\sum (\text{指數} \times \text{該指數罹病株數})}{(4 \times \text{總調查株數})} \right] \times 100\%。$$

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 或 1% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

病原性試驗

自罹病植株分離之 Ech-1218 作為供試菌株，以牙籤針刺法接種「台梗 8 號」之水稻莖基部後，於接種後 2 wk 發現接種水稻植株之莖基部出現水浸狀之褐色橢圓形或不規則形病斑 (圖 1A)，並有腐爛、惡臭的情形產生，與田間罹病株具有相似之病徵，由發病植株之病

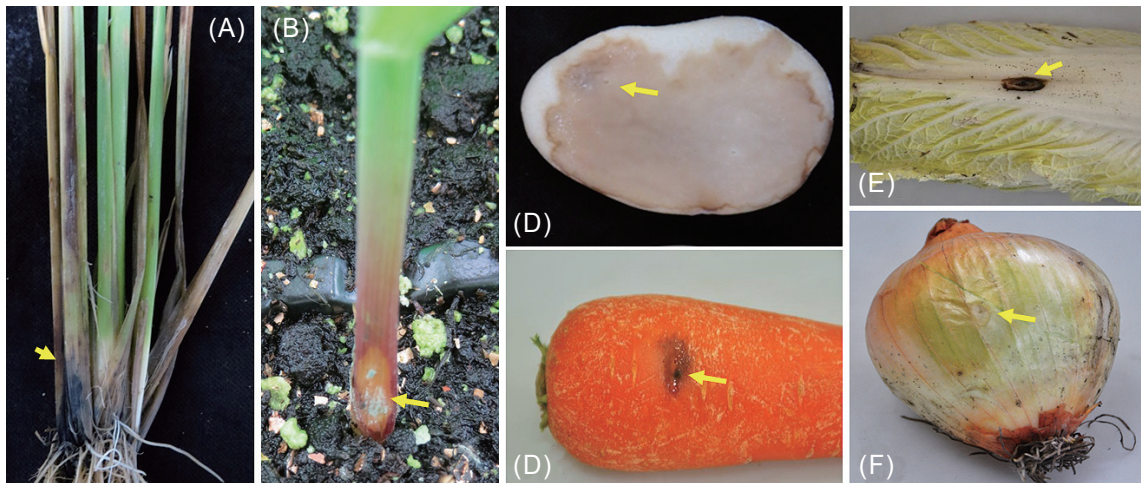


圖 1. 不同作物接種水稻基腐病菌 Ech 1218 後之病徵。(A) 水稻接種 2 wk 後之病徵；(B) 玉米接種 4 d 後之病徵；(C) 馬鈴薯切片接種 1 d 後之病徵；(D) 胡蘿蔔接種 4 d 後之病徵；(E) 包心白菜接種 1 d 後之病徵；(F) 洋蔥接種 3 d 後之病徵。箭頭為接種點之位置。

Fig. 1. Symptoms of different crops inoculated with *Dickeya Zeae* strain Ech1218. (A) Two weeks after inoculation on rice seedlings; (B) four days after inoculation on maize; (C) one day after inoculation on potato slices; (D) four days after inoculation on carrots; (E) one day after inoculation on Chinese cabbages; and (F) three days after inoculation on onion. Arrows indicate the inoculation sites.

斑處可再分離出相同的細菌。而以無菌水接種之對照組植株則無病徵產生。

菌株之 Biolog Identification System 鑑定與分子鑑定

將供試菌株 Ech-1218 於 Biolog Identification System 分析對 95 種碳素源的利用情形，並將分析結果於 Biolog GEN III 資料庫 (2.6.1 版) 比對後，結果顯示供試菌株屬於 *Dickeya chrysanthemi*，相似值為 0.685。此外，供試菌株亦以細菌 16S rDNA 之廣效性 fD1/rP1 引子對進行 PCR 增幅，可增幅出 1 段約 1.5 kb 之 DNA 片段，利用引子對 *gyrBf1/gyrBr1* 與 *dnaXf/dnaXr* 則分別可增幅出約 2,412 bp 及 536 bp 之 DNA 片段。此 3 基因區域之 DNA 片段經定序後，將之與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫進行分析比對，結果供試菌株均與 *D. zeae* EC1 strain 之 16S rDNA (CP006929)、*gyrB* (JQ284042) 及 *dnaX* (JQ284041) 之序列相似度達 99% 以上。

病原菌對不同作物之致病性

除了利用水稻進行病原性試驗外，亦使用不同種之作物進行致病性試驗，包括同屬禾本科之玉米及其他不同科之胡蘿蔔塊根、洋蔥鱗莖、馬鈴薯塊莖及包心白菜。結果顯示，上述之作物經接種後皆可出現病徵，其中玉米、胡蘿蔔塊根於接種後 4 d，即可於接種處發現褐色水浸狀病斑 (圖 1B、1D)；馬鈴薯塊莖切片及包心白菜則於接種後 1 d 即出現褐色病斑 (圖 1C、1E)；洋蔥鱗莖於接種後 3 d 於接種處附近之組織出現水浸狀、軟腐之病徵 (圖 1F)。顯示此病菌除禾本科之水稻、玉米之外，亦對蔬菜類之馬鈴薯及包心白菜等作物具有致病性。

溫度對病原菌生長之影響

溫度與病菌的生長關係試驗方面，利用分離株 Ech-1218 分別於 10、15、20、25、30、35 及 40°C 進行測定，結果顯示供試菌株可於 10–40°C 等不同溫度下生長，10–35°C 之間菌株生長濃度隨溫度升高而漸增；從 35°C 至 40°C，

菌株生長濃度則隨溫度上升而緩慢下降(圖 2)。其中以 30 及 35°C 下之菌株平均生長濃度可達 $8 \text{ Log}_{10} \text{ cfu mL}^{-1}$ 以上, 且兩者之間於 5% 顯著水準下無顯著差異, 但與其他溫度處理者具有顯著差異, 表示菌株最適宜的生長溫度為 30–35°C。

病原菌對不同水稻品種(系)之抗病性測定

利用 26 種水稻品種以傷口接種法進行接種, 於 2 wk 後觀察不同品種(系)之罹病率, 結果發現所有的供試水稻品種(系)之莖基部皆出現褐色橢圓形或不規則形病斑之病徵, 顯示所有 26 個品種(系)均可被感染。其中, 有 14 個品種(系)之平均罹病率 > 72%, 皆屬於稈稻品種(系), 罹病率最高的為「台梗 8 號」, 可達 94.44%, 其次為嘉農育 941001 號與「台中 192 號」, 罹病率皆為 83.33% (表 1)。而有 7 個品種(系)之罹病率 < 60%, 包括 1 個稈稻品種(「台梗 2 號」)、3 個秈稻品種(「台中秈 10 號」、「台農秈 14 號」及「台農秈 19 號」)及 3 個秈糯稻(嘉農秈糯育 892220 號、嘉農秈糯育 892229 號及嘉農秈糯育 892233 號), 其中罹病率最低的品種(系)為「台農秈 14 號」與嘉農秈糯育 892229 號, 其罹病率皆為 44.44% (表 1)。

室內藥劑感受性測定

利用濾紙圓盤法在 NA 培養基上測定 10 種藥劑對水稻細菌性基腐病菌分離株 Ech-1218 之生長抑制能力, 結果顯示供試藥劑中以 20% 歐索林酸可濕性粉劑、10% 鏈四環黴素與 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑等 3 種供試藥劑之藥效最佳。此 3 種藥劑均為抗生素或其混合劑, 當藥劑濃度為 $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ 時, 抑制圈大小為 30.25–19.08 mm; 藥劑濃度為 100 mg L^{-1} 時, 抑制圈大小為 29.08–16.17 mm; 藥劑濃度為 10 mg L^{-1} 時, 抑制圈大小為 24.33–3.88 mm (表 2)。其他供試之銅劑與抗生素藥劑類, 包括 40% 銅快得寧可濕性粉劑、2% 嘉賜黴素溶液、81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑、及 14% 嘉賜克枯爛可濕性粉劑等 4 種對此病原菌亦有稍許的生長抑制能力, 除了 2% 嘉賜黴素溶液於濃度 100 mg L^{-1} 時, 對其抑制圈大小為 2.00 mm 之外, 其他 3 種藥劑僅於 $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ 時具有產生 10 mm 以下抑制圈之抑制病原菌生長之能力。此外, 供試藥劑中有 3 種藥劑對水稻基腐病菌的生長完全沒有抑制能力, 此藥劑分別為 77% 氫氧化銅可濕性粉劑、10% 克枯爛可濕性粉劑與 30.3% 四環黴素可溶性粉劑 (表 2)。

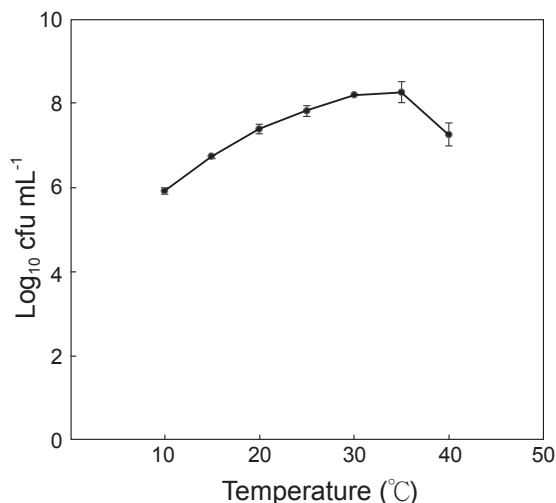


圖 2. 溫度對水稻基腐病菌生長之影響。

Fig. 2. Effect of temperatures on the growth of *Dickeya Zeae* strain Ech1218.

表 1. 水稻基腐病菌 Ech1218 菌株不同水稻品種 (系) 之致病性測定。

Table 1. Pathogenicity test of *Dickeya zea* strain Ech1218 on different rice varieties.

Variety	Disease incidence (%) ²		
	Exp. I	Exp. II	Average
TNG67 (台農 67 號)	77.78	66.67	72.22
TNG70 (台農 70 號)	77.78	66.67	72.22
TNG72 (台農 72 號)	66.67	77.78	72.22
TNG74 (台農 74 號)	77.78	55.56	66.67
TNG75 (台農 75 號)	88.89	55.56	72.22
TK2 (台梗 2 號)	55.56	55.56	55.56
TK4 (台梗 4 號)	88.89	66.67	77.78
TK8 (台梗 8 號)	88.89	100.00	94.44
TK9 (台梗 9 號)	88.89	55.56	72.22
TK14 (台梗 14 號)	66.67	55.56	61.11
TK16 (台梗 16 號)	88.89	55.56	72.22
KH139 (高雄 139 號)	88.89	66.67	77.78
TN11 (台南 11 號)	66.67	88.89	77.78
TY3 (桃園 3 號)	66.67	66.67	66.67
CNY941001 (嘉農育 941001)	77.78	88.89	83.33
CNY941002 (嘉農育 941002)	77.78	66.67	72.22
TCS10 (台中秈 10 號)	66.67	44.44	55.56
TNGS14 (台農秈 14 號)	33.33	55.56	44.44
TNGS19 (台農秈 19 號)	55.56	55.56	55.56
TNGS22 (台農秈 22 號)	66.67	55.56	61.11
CNSY892220 (嘉農秈糯育 892220 號)	55.56	44.44	50.00
CNSY892229 (嘉農秈糯育 892229 號)	55.56	33.33	44.44
CNSY892233 (嘉農秈糯育 892233 號)	44.44	66.67	55.56
CNSY892234 (嘉農秈糯育 892234 號)	66.67	66.67	66.67
TD30 (台東 30 號)	88.89	66.67	77.78
TC192 (台中 192 號)	88.89	77.78	83.33

² Disease incidence (%) = (number of plants with symptoms/number of inoculated plants) × 100%.

溫室藥效試驗

室內藥劑篩選抑制水稻細菌性基腐病菌效果最佳之藥劑為 20% 歐索林酸可濕性粉劑，因此選用 20% 歐索林酸可濕性粉劑 1,000× 稀釋液進行溫室藥效試驗。另外，亦選用銅劑中之 77% 氫氧化銅可濕性粉劑 800× 稀釋液進行試驗。經施用 2 次之後的結果發現，若於接種前施用 20% 歐索林酸可濕性粉劑稀釋液，其罹病度為 25.0%，若於接種後施用，則其罹病度為 100.0% (表 3)。而 77% 氫氧化銅可濕

性粉劑稀釋液於接種前及接種後施用後之罹病度，分別為 90.3% 及 97.2% (表 3)。只有接種前施用 20% 歐索林酸可濕性粉劑稀釋液者與對照無藥劑處理者 (罹病度為 95.9%) 在 1% 顯著水準下即有顯著差異，其他處理之間則無顯著差異 (表 3)。

討論

Dickeya 屬原名 *E. chrysanthemi* 或 *P. chrysanthemi* (Hauben *et al.* 1998; Gardan *et*

表 2. 不同化學藥劑對水稻基腐病菌 *Ech1218* 之生長抑制效果。Table 2. Growth inhibition of *Dickeya zae* strain Ech1218 treated with different agrochemicals.

Agrochemical	Inhibition zone (mm in diam.) ^z		
	1,000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
Copper hydroxide (77.0% WP)	0.00 f ^z	0.00 d	0.00 d
Copper hydroxide + oxine-copper (40.0% WP)	6.78 d	0.00 d	0.00 d
Kasugamycin (2% SL)	7.67 d	2.00 c	0.00 d
Kasugamycin + copper oxychloride (81.3% WP)	1.33 e	0.00 d	0.00 d
Oxolinic (20% WP)	30.25 a	29.08 a	24.33 a
Streptomycin + tetracycline (10.0% SP)	19.08 c	16.17 b	14.17 b
Tecloftalam (10% WP)	0.00 f	0.00 d	0.00 d
Tecloftalam + kasugamycin (14% WP)	7.33 d	0.00 d	0.00 d
Tetracycline (30.3% SP)	0.00 f	0.00 d	0.00 d
Thiophanate methyl + streptomycin (68.8% WP)	20.22 b	16.45 b	3.88 c
CK (dH ₂ O)	0.00 f	0.00 d	0.00 d
LSD	1.05	1.31	0.34

^z The inhibition zone did not include the diameters of paper disks (8 mm).

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 3. 化學藥劑於溫室防治水稻基腐病之效果。

Table 3. Efficacy of agrochemicals on the control of rice bacterial foot rot in the greenhouse.

Agrochemical	Fold of dilution	Initial usage time	Disease index (%) ^z
Copper hydroxide (77.0% WP)	800	Before inoculation	90.3 b ^y
Copper hydroxide (77.0% WP)	800	Post inoculation	97.2 b
Oxolinic (20% WP)	1,000	Before inoculation	25.0 a
Oxolinic (20% WP)	1,000	Post inoculation	100.0 b
None (CK)	-		95.9 b
LSD	1%		11.489

^z Disease index (%) = $[\Sigma(\text{index} \times \text{diseased plants}) / (4 \times \text{total inoculated plants})] \times 100\%$.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 1% by least significant difference (LSD) test.

al. 2003), 為近年所建立的新屬, 此屬包含 5 個種, 包括 *D. chrysanthemi*、*D. dadantii*、*D. dianthicola*、*D. dieffenbachiae* 及 *D. zae* (Samson *et al.* 2005)。早期鑑定之水稻細菌性基腐病原菌屬於 *E. chrysanthemi* pv. *zae*, 現今則更名為 *D. zae*。本研究自嘉義疑似水稻基腐病病徵之水稻罹病株經分離純化及水稻接種試驗確認為細菌所引起。此細菌經由 Biolog 鑑定系統測試, 結果為 *D. chrysanthemi*, 相似值為 0.685, 顯示此細菌屬於 *Dickeya* 屬, 由於 Biolog GN 資料庫 (Biolog 6.01 版) 內無 *D. zae* 之分類, 且兩者之親緣關係近似, 不易

以生化特性及單一基因序列分析區分 (Marrero *et al.* 2013)。因此, 本研究利用分子鑑定法以多種基因 (包含 16S rDNA、*gyrB* 及 *dnaX*) (Pu *et al.* 2012) 之序列與 NCBI 基因資料庫進行比對, 結果發現均與 *D. zae* EC1 strain 序列相同度達 99% 以上, 依上述資料鑑定該菌為 *D. zae*, 本篇研究報告亦為 *D. zae* 在台灣引起水稻細菌性基腐病之首篇研究報告。

Dickeya spp. 之病原菌寄主範圍大, 包括 11 目 16 科之雙子葉植物及 5 目 10 科之單子葉植物, 其中 *D. zae* 主要寄主有玉米、馬鈴薯、香蕉及菸草等 (Samson *et al.* 2005; Ma *et*

al. 2007)。本研究於不同寄主上進行水稻細菌性基腐病菌致病性試驗，結果發現此病菌除禾本科之水稻、玉米之外，亦對蔬菜類之馬鈴薯及包心白菜等作物具有致病性，且其病害發展迅速，多數於 3–4 d 內即可觀察到組織褐化及水浸狀等病徵出現。此外，研究指出水稻細菌性基腐病菌為高溫菌，最適生長溫度為 36°C，最高生長溫度為 43°C (Goto 1979)，本研究亦有相似的發現，經試驗發現於 10–40°C 不同溫度下皆具生長活性，菌株最適生長溫度為 30–35°C。隨著全球氣候變遷的影響下，台灣氣候暖化，溫度明顯上升，有利於此病原菌大量生長。此外，極端天氣的頻率增加及發生強度增強，如大雨、颱風等經常夾帶強風豪雨，有利於造成植株傷口，可助長細菌性病害之蔓延及傳播。並且強風豪雨易造成水稻倒伏及田區淹水，而颱風過後，經常有溫度升高的現象，高溫高濕的環境更可增加病害發生的嚴重性 (Hung *et al.* 2010)。特別是雨水淹沒之水稻田，此病害之發生會更為猖獗。

水稻細菌性基腐病為近年來新興之水稻病害，已於中國及一些東南亞國家的水稻栽培與生產造成不同程度的影響，中國之研究報告顯示不同的水稻品種之間對水稻基腐病之抗性差異顯著。Wang *et al.* (1987) 對 622 種水稻品種進行水稻基腐病之抗性分析，篩選出 127 個品種為高抗、210 個品種為中抗，並發現抗病品種中多為秈稻及糯稻，稈稻較少，且稈稻罹病度高於秈稻。本研究選用 26 種水稻品種，包含秈稻、秈糯稻及稈稻，進行水稻基腐病菌接種試驗。結果顯示，所有供試品種皆可被感染，其中以稈稻之發病率較秈稻、秈糯稻品種略高。供試之 18 個稈稻品種中，其中 14 個稈稻品種發病率皆高於 72%，尤其以「台稈 8 號」發病最為嚴重；而秈稻與秈糯稻共 8 個品種之發病率則為 44.44–66.7%，其中罹病率最低的品種(系)為「台農秈 14 號」與嘉農秈糯育 892229 號，其罹病率皆為 44.44%。由此可知，台灣不同水稻品種之間具有抗性差異，整體以秈稻、秈糯稻品種較稈稻抗病，而秈稻及秈糯稻彼此間之抗性差異並不顯著，此結果與 Wang *et al.* (1987) 之相似。

細菌性病害之防治，除了使用抗病品種之外，亦需輔以藥劑防治以降低病害危害程度。水稻細菌性基腐病目前並無推薦藥劑，因此為提供可參考使用之防治藥劑，本試驗進行病原菌之室內藥劑試驗，結果發現測試之 10 種藥劑中以抗生素類之 20% 歐索林酸可濕性粉劑抑制細菌生長之抑制圈最大，其次為 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉與 10% 鏈四環黴素。其中，10% 鏈四環黴素亦為防治水稻白葉枯病之推薦藥劑，可提供作為共同防治此 2 種水稻細菌性病害之藥劑參考。此外，作為水稻細菌性穀枯病推薦藥劑之 2% 嘉賜黴素溶液及其抗生素混合藥劑與 3 種含銅類之藥劑 (包含 40% 銅快得寧可濕性粉劑、81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑及 77% 氫氧化銅可濕性粉劑)，對本菌之生長抑制效果不佳，須於高劑量 (1,000 mg L⁻¹) 時始具有抑制病原菌生長之能力。由此可知，此病原菌已對嘉賜黴素及銅劑具有高忍受度，因此應避免於田間頻繁使用含嘉賜黴素及銅類的藥劑，以避免產生抗藥性。本研究於溫室進行 20% 歐索林酸 1,000× 稀釋液及 77% 氫氧化銅可濕性粉劑 800× 稀釋液之藥效試驗，結果發現僅 20% 歐索林酸 1,000× 稀釋液於接種前施用，才能有效減少水稻細菌性基腐病之發生，為預防性藥劑，其田間藥劑防治之關鍵為施用時機。由於在台灣此病害之發生侷限在大水淹沒過之稻田，因此建議於被水淹沒的稻田於退水后立即施藥，以有效降低病害發生。然而，此藥劑目前並非水稻之推薦用藥，其適用性仍需經農政單位進一步評估及通過審查後，才可供農民田間正式使用，以符合安全用藥之宗旨。

水稻細菌性基腐病已於新竹縣、嘉義縣、苗栗縣、雲林縣及台南市等多處水稻田發現，本研究報告首次證實在台灣 *D. zeae* 為引起此病害之病原菌之一。此外，此病原菌亦對玉米、馬鈴薯、蘿蔔及白菜等不同經濟作物具有致病性，具有潛在的威脅性。而台灣之多數水稻品種對此病害皆為感病，不適合利用抗病品種進行防治，而藥劑防治則以 20% 歐索林酸可濕性粉劑對水稻細菌性基腐病菌之抑制效果最佳，為預防性藥劑。以上資訊可提供相關

農政單位管理防治及推薦藥劑之參考，以利防治策略之擬定，並減少水稻細菌性基腐病之發生。

誌謝

本研究工作承嘉義農業試驗分所水稻研究室提供不同品種之水稻種子與賴永昌主任於英文文稿之指正，以及陳幸葵小姐、林江美華小姐及賴素玉小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Amarjit, S., J. S. Brar, I. S. Kang, and S. Daljit. 2009. Plant disease scenario in Punjab. *Pl. Dis. Res.* 24:135–141.
- Bertani, I., D. Passos da Silva, P. Abbruscato, P. Piffanelli, and V. Venturi. 2013. Draft genome sequence of the plant pathogen *Dickeya zae* DZ2Q, isolated from rice in Italy. *Genome Announc.* 1(6):e00905–13.
- Chen, C. W., S. H. Hseu, L. J. Hsieh, and Y. C. Chang. 2008. Bacterial leaf streak of rice: A new disease in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 17:82. (in Chinese)
- Gardan, L., C. Gouy, R. Christen, and R. Samson. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atro-septicum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:381–391.
- Goto, M. 1979. Bacterial foot rot of rice caused by a strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 69:213–216.
- Hauben, L., E. R. B. Moore, L. Vauterin, M. Steenacker, J. Mergaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:384–397.
- Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathol. Society. Taichung. 386 pp. (in Chinese)
- Hung, T. C., Y. T. Hsu, and Y. C. Chou. 2010. Influence of climate change on the incidence of rice diseases and our adaptive strategies. *Plant Prot. Bull.* 52:25–42. (in Chinese with English abstract)
- Liu, Q. G., Z. Qing, and C. D. Wei. 2013. Advances in research of rice bacterial foot rot. *Sci. Agric. Sin.* 46:2923–2931. (in Chinese with English abstract)
- Ma, B., M. E. Hibbing, H. S. Kim, R. M. Reedy, I. Yedidia, J. Breuer, J. D. Glasner, N. T. Perna, A. Kelman, and A. O. Charkowski. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97:1150–1163.
- Marrero, G., K. L. Schneider, D. M. Jenkins, and A. M. Alvarez. 2013. Phylogeny and classification of *Dickeya* based on multilocus sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:3524–3539.
- Pu, X. M., J. N. Zhou, B. R. Lin, and H. F. Shen. 2012. First report of bacterial foot rot of rice caused by a *Dickeya zae* in China. *Plant Dis.* 96:1818.
- Samson, R., J. B. Legendre, R. Christen, M. F. Saux, W. Achouak, and L. Gardan. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and declination of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1415–1427.
- Slawiak, M., J. R. C. M. van Beckhoven, A. G. C. L. Speksnijder, R. Czajkowski, G. Grabe, and J. M. van der Wolf. 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 125:245–261.
- Stead, D. E., N. Parkinson, J. Bew, J. Hennessy, J. K. Wilson, and J. G. Elphinstone. 2010. The first record of *Dickeya zae* in the UK. *Plant Pathol.* 59:401.
- Tsai, J. N., P. J. Ann, C. Y. Lin, Y. F. Wu, and S. J. Peng. 2001. Occurrence, variety resistance and chemical control of bacterial spot of carambola. *Plant Pathol. Bull.* 10:139–145. (in Chinese with English abstract)
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153–4154.
- Wang, J. S., G. Yao, and Z. D. Fang. 1987. Resistance of rice cultivars to foot rot and the pathogenicity differentiation of the pathogen (*Erwinia chrysanthemi* Burkholder). *Sci. Agric. Sin.* 20:93–96. (in Chinese with English abstract)
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.
- Wilson, E. E., F. M. Zeitoun, and D. L. Fredrickson. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. *Phytopathology* 57:618–621.
- Zhou, H. P., J. H. Fan, J. B. Chen, Y. Guan, and L. J. Mu. 2009. Toxicity measurement for thirteen bactericides to the causal organism of rice bacterial foot rot. *J. Yunnan Agric. Univ.* 24:307–311. (in Chinese)

Rice Bacterial Foot Rot Disease Caused by *Dickeya zea* in Taiwan

Ching-Yi Lin¹, Chiao-Wen Huang¹, Hong-Ren Yang², Chia-Hsin Tsai³, Sui-Li Hsu⁴, and Hui-Fang Ni^{5,*}

Abstract

Lin, C. Y., C. W. Huang, H. R. Yang, C. H. Tsai, S. L. Hsu, and H. F. Ni. 2016. Rice bacterial foot rot disease caused by *Dickeya zea* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):207–217.

Rice bacterial foot rot is a new bacterial disease of rice found in Taiwan recently. Symptoms of the disease include brown sheath rot and dark brown decay of the tillers. The diseased samples were collected in Chiayi County and bacteria were isolated from the symptomatic tissues. Pathogenicity of the bacteria was verified by Koch's postulates. The pathogen was further determined as *Dickeya zea* by Biolog identification and multi-gene (16S rDNA, *gyrB*, and *dnaX*) sequence analysis. The pathogen could also infect several important crops such as maize, potato, carrots and Chinese cabbage. It could grow at wide range of temperatures, 10–40°C, with optimal range in 30–35°C. The selected 26 rice varieties were all infected by the pathogen. Among these tested varieties, *japonica* rice variety, 'TK8' was most susceptible to the pathogen, with an average incidence of 94.44%. An *In vitro* agrochemical screening test showed that 20% oxolinic was the most effective inhibitor on bacterial growth. A greenhouse trial showed that the chemical could only protect the rice plants if applied before the pathogen infection. The results suggested that 20% oxolinic could be recommended as an effective chemical to control the rice bacterial foot rot disease in the field.

Key words: Rice, Rice bacterial foot rot, Agrochemical screening.

Received: July 31, 2015; Accepted: October 6, 2015.

* Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Research Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁵ Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.