

# 引起水稻與茭白筍胡麻葉枯病之 *Bipolaris* 屬病原菌特性比較

陳淑媚<sup>1</sup>、陳以錚<sup>1</sup>、鍾文全<sup>2</sup>、郭章信<sup>3</sup>、鍾文鑫<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學植物病理學系

<sup>2</sup> 農業委員會種苗繁殖改良場

<sup>3</sup> 國立嘉義大學植物醫學系

\* 通訊作者，電子郵件：wenchung@nchu.edu.tw

## 摘要

陳淑媚、陳以錚、鍾文全、郭章信、鍾文鑫\*。2018。引起水稻與茭白筍胡麻葉枯病之 *Bipolaris* 屬病原菌特性比較。植物醫學60(1): 9-22。

前人指出引起水稻 (*Oryza sativa*) 與茭白筍 (*Zizania latifolia*) 胡麻葉枯病之病原菌分別為 *Bipolaris oryzae* 與 *B. zizaniae*，而兩種病原菌之形態學差異在分生孢子基部臍的構造。為釐清引起臺灣水稻與茭白筍胡麻葉枯病兩種 *Bipolaris* 屬菌株間之相互關係，本研究針對兩者分生孢子形態、親和性配對、病原性測定及分子特性進行分析。形態觀察結果顯示，來自水稻與茭白筍之 *Bipolaris* 屬分生孢子形態相似，且孢子基部以直角狀臍構造為主。親和性配對試驗得知，於光照環境下，水稻與茭白筍菌株可配對產生有性世代。另接種試驗證實，分離自水稻與茭白筍之菌株均可交互感染，產生典型胡麻葉枯病病徵。分析 ITS (internal transcribed spacer) 與 GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 序列區間之分子親緣性，指出水稻與茭白筍之菌株於 ITS 序列分析形成同一分子群；而分析 GPDH 序列顯示水稻之菌株可分為兩群，其中一群與茭白筍菌株形成同一分子群。根據上述結果證實，引起水稻與茭白筍胡麻葉枯病之病原菌應屬同種，且分子親緣分析顯示，臺灣水稻與茭白筍胡麻葉枯病之菌株與 GenBank 中的 *B. oryzae* 具有高度親緣性，應屬 *B. oryzae*。

關鍵詞：水稻、茭白筍、胡麻葉枯病菌、分子親緣性

## 前言

水稻 (*Oryza sativa* Linn) 為半水生的一年生禾本科 (Gramineae) 植物，於全世界糧食作物中的總產量僅次於玉

米和小麥，全球一半的人口均賴以維生，且 90 % 以上的水稻栽種與消費都集中於亞洲地區<sup>(24)</sup>。地處亞熱帶的台灣適合水稻生長，全島各縣市均可種植，依行政院農委會統計，水稻無論是栽種面積、產量或產值皆為五穀雜糧之冠，是台灣最重要的糧食作物<sup>(13)</sup>。由於栽培環境之特異性，使水稻可受多種微生物的危害，如真菌、細菌、病毒及線蟲等，其中有害真菌種類更是多樣，包括 *Magnaporthe oryzae* 所引起的稻熱病 (rice blast)、*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker 引起的胡麻葉枯病 (brown spot)、*Rhizoctonia solani* Kühn 引起的紋枯病 (sheath blight)、*Sclerotium rolfsii* Sacc., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. 引起的秧苗立枯病 (seedling blight)、*Fusarium fujikuroi* Nirenberg 引起的徒長病 (bakanae disease)、*Nakataea oryzae* (Catt.) J. Luo & N. Zhang 引起的小粒菌核病 (stem rot) 等。其中水稻胡麻葉枯病菌 [*B. oryzae* (syn. *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan; teleomorph: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito and Kurib.) Drechsler ex. Dastur] 常感染水稻幼苗，於 1942 年曾引起孟加拉水稻嚴重減產造成大饑荒，導致 150 萬人死於飢餓；經由統計，當時水稻損失的產量高達 50-90 %<sup>(28, 38, 42)</sup>。此病害目前於全球水稻栽種地區都會發生，包括亞洲、美洲及非洲等地<sup>(37)</sup>。另水稻胡麻葉枯病菌可藉由種子帶菌，導致 11-37 % 的種子發芽率降低<sup>(4)</sup>；而水稻幼苗葉片易受病原菌感染，常造成 10-58 % 的幼苗因被感染而死亡<sup>(1, 36, 49)</sup>；此外遭受感染之稻米品質降低，於每次發生時常導致 4-40 % 的產量損失<sup>(4, 14)</sup>。

茭白筍 (*Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz. ex Stapf) 為禾本科、菰屬 (*Zizania*) 的多年生宿根性草本水生植物<sup>(46)</sup>，又名菰、菰筍、茭筍、茭瓜、水筍 (water bamboo)、腳白筍或美人腿等<sup>(21, 25)</sup>。茭白筍原生於亞洲地區，主要食用受黑穗菌 (*Ustilago esculenta* Henn.) 感染而膨大似筍狀的莖部<sup>(46, 56)</sup>。根據行政院農業委員會農糧署 101 年的統計資料顯示，全台茭白筍

栽種面積為1,835公頃，總產值達20億以上，為台灣重要的蔬菜作物之一<sup>(13)</sup>。栽培品種主要有3種，分別為早生青殼 (Green Shell Early)、赤殼 (Red Shell) 及白殼 (White Shell)，以早生青殼的栽培面積最廣<sup>(26)</sup>，主要分布於南投縣的埔里鎮與魚池鄉<sup>(27)</sup>。茭白筍栽培過程中常見的病害包括，*Pythiogeton zizaniae* 引起的基腐病 (basal stem rot)、*Uromyces coronatus* Miyabe et Nishida ex Diet.引起的銹病 (rust)、*B. zizaniae*引起的胡麻葉枯病 (brown leaf spot)、*Meliola* sp.引起的煤黴病 (sooty mold) 及 *N. oryzae* (Catt.) J. Luo & N. Zhang引起的小粒菌核病 (stem rot) 等，其中茭白筍胡麻葉枯病的病徵與水稻胡麻葉枯病相類似，由 *B. zizaniae* (syn. *Helminthosporium zizaniae* Nisikado) 所引起<sup>(21)</sup>。*Bipolaris zizaniae* 感染茭白筍葉片後引起與 *B. oryzae* 感染水稻葉片的相似病徵，且亦可感染水稻，兩者最大的差異在於分生孢子的基部構造、臍 (hilum) 的形態及分生孢子的大小<sup>(35)</sup>。依前人研究指出，*B. oryzae* 分生孢子的臍呈現淡色的乳突狀 (papillate)<sup>(2, 44)</sup>，而 *B. zizaniae* 分生孢子的臍呈深色的矩形 (rectangular)<sup>(35)</sup>。然後續研究指出，將來自茭白筍與水稻之胡麻葉枯病菌分別接種於水稻與茭白筍植株，且測量分生孢子大小，結果認為兩者可能屬於同一種<sup>(55)</sup>。另 Chang 氏 (1974)<sup>(10)</sup> 蒐集台灣地區引起水稻與茭白筍之胡麻葉枯病菌株進行有性世代的配對，證實來自不同寄主之菌株可配對產生子囊果、子囊及子囊孢子；進一步測試病原性指出，來自水稻與茭白筍的菌株可交互感染水稻與茭白筍並產生相同病徵，被認為同屬 *B. oryzae*<sup>(11)</sup>。

雖前人研究認為，依孢子大小、病原性及配對試驗，來自水稻與茭白筍之胡麻葉枯病菌屬同一種，然他們的研究並未測試更多菌株，且於孢子形態特徵中，亦未說明臍的特徵是否可作為分類依據。另田間調查過程中得知茭白筍罹病葉具典型與長條形兩種病徵；近年來生物技術蓬勃發展，利用DNA序列可幫助釐清生物學家對於分類、鑑定及親緣演化關係。如 Berbee 等人 (2000)<sup>(5)</sup> 利用 internal transcribed spacer (ITS) 與 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 將 *Bipolaris* 屬真菌區分為 *Bipolaris* 及 *Curvularia* 兩屬，其中 *Bipolaris* 屬可分為兩大群；Manamgoda 氏等人 (2012) 再增加 translation elongation factor 1-alpha gene (TEF 1) 與 GPDH 序列分析亦得到相似的結果，並指出 GPDH 序列適合用於 *Bipolaris* 屬的種間區分<sup>(31, 32)</sup>。因此，本研究目的為 (1) 蒐集台灣引起水稻與茭白筍之胡麻葉枯病菌；(2) 觀察來自水稻與茭白筍胡麻葉枯病菌的分生孢子形態、進行有性世代配對及測試病原性；(3) 利用所增幅之 ITS 與 GPDH 序列，分析來自水稻與茭白筍之胡麻葉枯病菌親緣關係。

## 材料與方法

### 胡麻葉枯病菌之蒐集與保存

2012年6月至2013年9月期間，自台中市大甲區 (Dajia, 代號

DJ)、清水區 (Qingshui, 代號CS)、外埔區 (Waipu, 代號WP) 和彰化縣北斗鎮 (Beidou, 代號BD) 與大村鄉 (Dachun, 代號DC) 等地之水稻田蒐集胡麻葉枯病病徵的葉片。而茭白筍罹病葉則蒐集自南投埔里鎮 (Puli, 代號PL) 與新北市三芝區 (Sanchih, 代號SC)，埔里鎮蒐集之病葉中，除具典型胡麻葉枯病病徵之葉片外，亦蒐集中央呈灰白色之長條形病斑的罹病葉。水稻或茭白筍罹病葉片攜回實驗室後切取上之單一胡麻葉枯病典型病斑或是長條形病斑，以6%次氯酸鈉 (NaOCl) 混合95%酒精 (ethanol) (v : v = 1:1) 的溶液消毒15 sec，接著以無菌水漂洗三次，將病斑上多餘的水分以滅菌濾紙片吸乾後，放置於水瓊脂培養基 (water agar, 20 g agar, 1 L dH<sub>2</sub>O) 並於室溫 (24-28°C) 中培養2週，產孢後以玻璃挑針挑取單孢培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂斜面培養基 (potato dextrose agar, PDA, 20 g dextrose, 20 g agar, 1 L potato infusion) 上進行純化。本研究共自水稻及茭白筍分離純化得到167個胡麻葉枯病菌株 (表一)，並依採集地名之代號編輯所分離菌株之編號後，以PDA斜面培養基保存於4°C 供後續實驗使用。

表一、自水稻與茭白筍胡麻葉枯病罹病葉上所分離純化之菌株

**TABLE 1.** Fungal isolates obtained from diseased leaves of rice and water bamboo

Host	Collected site (number of isolates)
<i>Oryza sativa</i>	Changhua County: Beidou (2), Dachun (53)
	Taichung City: Dajia (18), Qingshui (14), Waipu (34)
<i>Zizania latifolia</i>	Nantou County: Puli (48)
	New Taipei City: Sanchih (1)
Total	167

### 分生孢子形態觀察

切取PDA斜面保存管中之菌絲塊，培養於pH 6且置有已滅菌稻稈的PDA培養基，於25°C 黑暗條件下培養4-7天後，以無菌的秤藥匙將菌絲壓平，再以12小時近紫外燈 (near-ultraviolet, PHILIPS TLD 18W/BLB) 與12小時黑暗循環下培養2週。挑取分生孢子於顯微鏡下觀察分生孢子形態與臍 (hilum) 的構造，拍攝照片後利用Axio Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss Microimaging Inc., German) 量測孢子的長度、寬度並計算隔膜的数量，每株菌株觀察30顆孢子，並與Nisikado氏 (1929)<sup>(35)</sup> 與 Drechsler 氏 (1934)<sup>(16)</sup> 所描述特徵比較。所測得之孢子長度、寬度及隔膜數量等數值以IBM SPSS Statistics 20軟體中進行主成份分析 (principal component analysis, PCA) 並繪製散佈圖。

### 供試菌株之DNA萃取

本研究使用taco™ Plant DNA/RNA Extraction Kit (GeneReach

Biotechnology Corp., Taiwan) 抽取真菌DNA，步驟如下：取直徑0.3-0.5 cm的菌絲塊3塊，置入已裝有6顆小鋼珠(直徑2.5 mm)的管(Pre-loaded steel bead tubes)中，加入600  $\mu$ l之溶菌緩衝液(lysis buffer)，置入震碎機(taco™ Prep Bead Beater, GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan)中以cycle 2之轉速震碎，震碎後靜置片刻，待管內泡沫消失，以轉速13,000 rpm離心5 min後，取上清液400  $\mu$ l置入96孔盤1號孔盤中，再加入400  $\mu$ l之異丙醇(isopropanol)。2號與3號孔盤加入750  $\mu$ l之藥劑A(Wash A)，4號及5號孔盤加入750  $\mu$ l之藥劑B(Wash B)，而6號孔盤則加入50-150  $\mu$ l之淋洗緩衝液(eluting buffer)，另在2號孔盤中再加入50  $\mu$ l之磁珠。待所需物質填充完畢，將96孔盤放入自動抽DNA機器(taco™ Nucleic Acid Automatic Extraction System)中，於機器中之磁棒套上塑膠套後，即可啟動。約50 min儀器停止後，將第6號孔盤內之buffer吸出置於1.5 ml之離心管中，置於-20°C中保存備用。

### 有性世代配對

將滅菌過的稻稈放置於Sach's agar (1.0 g  $\text{Ca}[\text{NO}_3]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g KCl, 0.25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.85 g  $\text{CaCO}_3$ , 20 g agar, 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$ )<sup>(20)</sup>的中央，兩邊放置要進行配對菌株的菌絲塊。為快速確定所分離胡麻葉枯病菌株之配對型，本研究利用Arie氏等人(1997)<sup>(3)</sup>所發表，可增幅多種*Cochliobolus*屬第二配對型(MAT-2)之引子對進行測試，若屬於MAT-2型菌株，則可被增幅出約300 bp的DNA條帶。此外為測試光照對胡麻葉枯病菌有性世代產生的影響，移殖後之培養基分別放置於25°C 照光12小時與不照光的培養箱中培養30天後，觀察是否有子囊果與子囊孢子的產生。

### 病原性測定

本研究係採用切離葉接種方式進行各菌株對水稻及茭白筍之病原性。水稻試驗將台梗2號水稻種子浸泡在2%的次氯酸鈉進行表面消毒2 min，再以無菌水漂洗3次後浸泡在無菌水中催芽3天。在直徑14 cm高15 cm的塑膠圓桶中裝入赤玉土(Akadama)(綠誼公司，台灣)，放入已發芽的水稻種子後再覆蓋一層薄赤玉土，置於28°C 照光12小時之定溫箱中，4週後選擇第1或第2位葉以進行接種。茭白筍試驗則是先將紅殼種茭白筍植株種植於長、寬、高分別為40 cm、30 cm、11 cm且裝有填土的方形塑膠桶中，於溫室環境(28-32°C)中生長，切取長20 cm寬0.5-0.8 cm的葉片進行接種。

切取後之水稻及茭白筍葉片切口以含1%蔗糖溶液的棉花保濕<sup>(11)</sup>後；將43株採自水稻及30株採自茭白筍菌株分別培養於PDA培養基，12-16天後洗下菌株分生孢子成為孢子懸浮液，再以無菌水調整懸浮液孢子濃度為 $5 \times 10^4$  spors/ml；調整後吸取10  $\mu$ l懸浮液(約50顆分生孢子)滴於直徑為3 mm的濾紙片上，

再將滴有孢子懸浮液的接種原面分別緊貼於切取後之水稻及茭白筍葉面，每株菌株3重複，以無菌水做為對照組。接種後放入保鮮盒中密封保濕，並置於28°C 照光12小時之定溫箱中，3天後計算罹病度。罹病度計算將發病葉片以相機拍攝後，以Scandium (Olympus) 軟體進行分析計算，分析範圍以接種點為中心，長1.2 cm內的病斑面積，依病斑面積訂定罹病級數0-VI級：0級代表無病徵；I級代表病斑面積介於1-3%；II級代表病斑面積介於4-10%；III級代表病斑面積介於11-25%；IV級代表病斑面積介於26-50%；V級代表病斑面積介於51-75%；VI級代表病斑面積介於76-100%。再依下列公式計算罹病度：

$$\text{罹病度(Disease severity, \%)} = \frac{\sum(\text{罹病級數} \times \text{該級數之葉片數})}{\text{總調查葉數} \times 6} \times 100$$

### 核苷酸序列增幅

本研究以內轉錄區間(internal transcribed spacer, ITS)及3-磷酸甘油脫氫酶基因(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH)兩序列分析來自水稻及茭白筍的胡麻葉枯病菌的親緣性。利用可增幅ITS序列的引子對ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (10  $\mu$ M) (54) 各0.5  $\mu$ l，加入17  $\mu$ l  $\text{dH}_2\text{O}$ 、5  $\mu$ l PCR Master Mix II (0.75 U Taq DNA polymerase, reaction buffer, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 250  $\mu$ M dNTPs, enzyme stabilizer, GeneMark, Taichung, Taiwan)及2  $\mu$ l DNA 樣本(50-100  $\mu$ g/ml)，PCR反應液總體積為25  $\mu$ l。接著放入聚合酶連鎖反應儀中，反應條件為95°C 2 min，95°C 30 sec、55°C 30 sec、72°C 2 min 共35個循環，72°C 5 min。GPDH片段增幅則使用可增幅的引子對GPD1 (5'-CAACGGCTTCGGTTCGATTG-3') / GPD2 (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') (10  $\mu$ M) (6) 各0.5  $\mu$ l，加入17  $\mu$ l  $\text{dH}_2\text{O}$ 、5  $\mu$ l PCR Master Mix II (0.75 U Taq DNA polymerase, reaction buffer, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 250  $\mu$ M dNTPs, enzyme stabilizer, GeneMark, Taichung, Taiwan)及2  $\mu$ l DNA 樣本(50-100  $\mu$ g/ml)，PCR反應液總體積為25  $\mu$ l。接著放入聚合酶連鎖反應儀中，反應條件為96°C 2 min，96°C 2 min、57°C 1 min、72°C 45 sec 30個循環，72°C 10 min。兩種引子增幅後的產物利用1.5%水瓊脂凝膠(agrose gel)於0.5  $\times$  TAE緩衝液中以100伏特進行電泳分析30 min，結束後以溴化乙錠(ethidium bromide)染色1 min，並以自來水褪染10 min，再以紫外燈照相系統觀察結果。增幅後的PCR產物由明欣生物科技有限公司解序，所得DNA序列以GENETYX-WIN/ATSQ將正反2股序列組合(assembly)後去除2端引子的序列，將序列輸入美國生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)與資料庫進行比對。確認所屬序列後，利用Clustal X 1.81排序(alignment)<sup>(47)</sup>，接著使用Se-A1 v1.01a1軟體客觀修正序列<sup>(40)</sup>，修正後以PAUP\*4.0b (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)中的近鄰結

表二、用於ITS或GPDH序列分析之GenBank中*Bipolaris*與*Curvularia*菌株資料TABLE 2. Information of reference isolates (*Bipolaris* and *Curvularia*) deposited in GenBank used for ITS or GPDH analysis

Species	Strain	Host	Location	Accession No.	
				ITS	GPDH
<i>Bipolaris chloridis</i>	CBS 242.77	<i>Chloris gayana</i>	Australia	JN192372	JN600961
<i>B. cynodontis</i>	ICMP 6128	<i>Cynodon dactylon</i>	New Zealand	JX256412	JX276427
	A63	<i>Oryza sativa</i>	Iran	KC315930	KC333443
<i>B. maydis</i>	C5 (141-1-2)	— <sup>a</sup>	—	AF071325	AF081380
	C4	—	—	EF452445	EF513207
<i>B. melinidis</i>	BRIP 12898	<i>Melinis munitiflora</i>	Australia	JN601035	JN600972
	Alcorn 8795-6	—	—	AF071319	AF081373
<i>B. microlaenae</i>	CBS 280.91	<i>Microlaenae stipoidis</i>	Australia	JN601032	JN600974
	BRIP 15613	—	—	JN192378	JN600973
<i>B. oryzae</i>	MFLUCC 10-0694	<i>Oryza sativa</i>	Thailand	JX256413	JX276428
	Bo038NY-07	<i>Panicum virgatum</i>	USA	JF693910	JF521650
	R31	<i>Oryza sativa</i>	Iran	KC315929	KC333442
	K34A	<i>Oryza sativa</i>	Iran	KC315918	KC333431
<i>B. peregianensis</i>	BRIP 12790	<i>Cynodon dactylon</i>	Australia	JN601034	JN600977
	Alcorn 7656-3	—	—	AF071328	AF081384
<i>B. sorokiniana</i>	A20	—	—	AF071329	AF081385
	CS1	—	—	JX145649	JX145648
<i>B. victoriae</i>	Briggs HV013	—	—	AF071330	AF081416
	HVW	—	—	EF452448	EF513210
<i>B. zeae</i>	Alcorn 8641	—	—	AF081452	AF081407
<i>B. zeicola</i>	Leonard NI1243	—	—	AF071326	AF081382
<i>Curvularia alcornii</i>	MFLUCC 10-0703	<i>Zea mays</i>	Thailand	JX256420	JX276433
	MFLUCC 10-0705	<i>Panicum sp.</i>	Thailand	JX256421	JX276434
<i>C. asianensis</i>	MFLUCC 10-0687	<i>Oryza sativa</i>	Thailand	JX256422	JX276435
	MFLUCC 10-0711	<i>Panicum sp.</i>	Thailand	JX256424	JX276436
<i>C. coicis</i>	CBS 192.29	<i>Coix lacryma</i>	Japan	AF081447	AF081410
<i>C. cymbopogonis</i>	88109-1	—	—	AF071351	AF081403
<i>C. ellisii</i>	CBS 193.62	Air	Pakistan	JN192375	JN600963
<i>C. gladioli</i>	ICMP 6160	<i>Gladiolus sp.</i>	New Zealand	JX256426	JX276438
	DAOM164725	—	—	AF071337	AF081392
<i>C. graminicola</i>	BRIP 23186	—	Australia	JN192376	JN600964
<i>C. gudauskasii</i>	DAOM165085	—	—	AF071338	AF081393
<i>C. hawaiiensis comb.nov</i>	MFLUCC 10-0730	<i>Panicum sp.</i>	Thailand	JX256427	JX276439
	BRIP 10971	<i>Chloris gayana</i>	Australia	JN601030	JN600967
<i>C. heteropogonis</i>	CBS 284.91	<i>Heteropogon contortus</i>	Australia	JN192379	JN600969
<i>C. ischaemi</i>	ICMP 6172	<i>Ischaemum indicum</i>	Solomon Islands	JX256428	JX276440
<i>C. lunata</i>	CBS 730.96 (Neo type)	<i>human lung biopsy</i>	USA	JX256429	JX276441
	MFLUCC 10-0706	<i>Oryza sativa</i>	Thailand	JX256431	JX276443
<i>C. ovariicola comb.nov</i>	CBS 470.90	<i>Eragrostis interrupta</i>	Australia	JN192384	JN600976
	BRIP 15882	—	—	JN601031	JN600971
<i>C. ravenelii comb.nov</i>	BRIP 13165	<i>Sporobolus fertilis</i>	Australia	JN192386	JN600978
<i>C. spicifera</i>	CBS 274.52	Soil	Spain	JN192387	JN600979
<i>C. trifolii</i>	ICMP 6149	<i>Setaria glauca</i>	New Zealand	JX256434	JX276457
<i>C. tripogonis comb.nov</i>	BRIP 12375	Unknown	Australia	JN192388	JN600980
<i>C. tuberculata</i>	CBS 146.63	<i>Zea mays</i>	Rajasthan	JX256433	JX276445

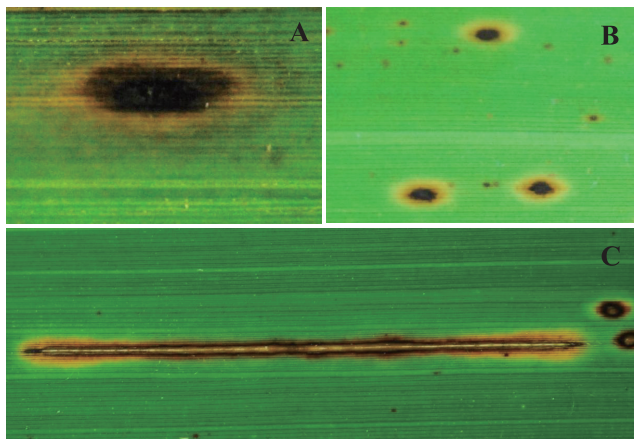
<sup>a</sup> Unknown

合法 (Neighbor-joining method, NJ) (41) 進行親緣性分析。本研究加入20種 *Curvularia* 與10種 *Bipolaris* 菌株共同分析 (表二)，另以 *Alternaria alternata* (Accession no. ITS: AF071346, GPDH: AF081400) 作為外群 (outgroup)。

## 結 果

### 罹病葉與菌株之蒐集

本研究自台中市大甲區、清水區、外埔區和彰化縣北斗鎮、大村鄉等地水稻田，蒐集具卵圓形褐色病斑且外圍黃暈之典型胡麻葉枯病罹病葉片 (圖一A)，經分離純化後得118株菌株 (表一)。茭白筍之罹病葉則蒐集自南投縣埔里鎮與新北市三芝區田區，除典型褐色卵圓形病徵外，亦採集到中央呈灰白色之長條形病徵之罹病葉 (圖一B、C)，結果自2種病徵共分離純化得49株菌株，其中44株由典型病斑分離而來，ZPLL401、ZPLL402、ZPLL405、ZPLL1001及ZPLL1005等5株菌株分離自長條形病斑。



圖一、田間蒐集之水稻與茭白筍胡麻葉枯病罹病葉的病徵型態。(A) 水稻與 (B) 茭白筍胡麻葉枯病之典型病徵為卵圓形褐色病斑，外圍具黃暈；(C) 田間茭白筍病葉亦可產生長條形褐色病斑。

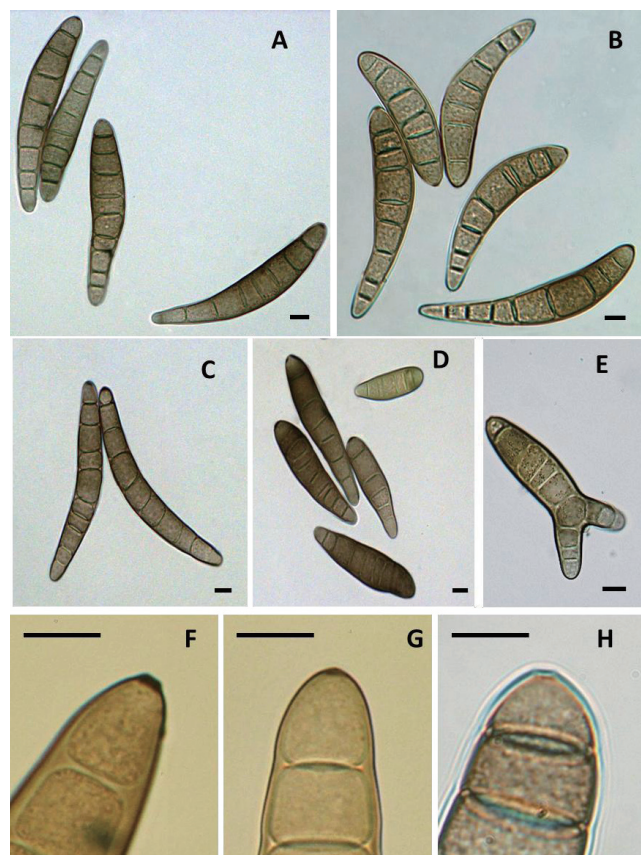
**Fig. 1.** Symptoms of brown spot shown on rice and water bamboo in field. (A) Rice and (B) water bamboo showed typical brown spot with yellow halo; (C) the untypical brown spot with long size spot shown on water bamboo.

### 分生孢子形態觀察

本研究觀察分離自水稻之菌株分生孢子形態，結果顯示多數菌株之分生孢子呈現微彎，中央膨大，兩端漸細的紡錘形 (圖二A)；而部分菌株如CS409、DJ512、TCW196.2、TCW196.3及TKW5.1的分生孢子彎曲且細長，似圓柱狀 (圖二C)。分離自茭白筍的菌株中，形態特徵與水稻上的菌株類似，分生孢子亦呈微彎，中央膨大，兩端漸細的紡錘形 (圖二B)；少數菌株如ZPLL502、ZPLL503、ZPLL603及ZPLL705之分生孢子呈棍棒狀，直

立或微彎 (圖二D)。某些分離自水稻或茭白筍菌株之分生孢子中具有尾端分岔者 (圖二E)。

進一步挑取水稻19株與茭白筍13株菌株進行基部特徵觀察，結果顯示基部特徵可歸納為分為3種形態，分別為直角形臍 (rectangular hilum)、乳突狀臍 (papillate hilum) 及無明顯臍的構造 (圖二 F、G、H)。19株水稻菌株中，14株之分生孢子基部形態以直角狀臍為主，佔67-100 %；5株基部形態以乳突狀臍的比例較高，佔57-100 %，其中TCW196.2菌株之孢子基部皆為乳突狀臍，以乳突狀臍為主的CS409、DJ512、TCW196.2、TCW196.3及TKW5.1菌株，分生孢子皆呈細長狀 (圖二B)。



圖二、引起水稻與茭白筍胡麻葉枯病菌株之分生孢子形態。分離自 (A) 水稻與 (B) 茭白筍的 *Bipolaris* 菌株分生孢子多數呈微彎紡錘狀。(C) 部分水稻菌株孢子呈彎曲細長；(D) 部分茭白筍菌株孢子呈直立或微彎的棍棒狀；(E) 少數孢子尾端具分支。菌絲分生孢子基部臍的構造：(F) 直角狀；(G) 乳突狀；(H) 無明顯hilum構造。比例尺為10  $\mu\text{m}$ 。

**Fig. 2.** Conidial morphology of *Bipolaris* isolates obtained from rice and water bamboo brown spot. Conidia of *Bipolaris* isolates from (A) rice and (B) water bamboo with usually slightly curved and fusoid. (C) Some conidia from rice with long, slender and curved; (D) some conidia from water bamboo with obclavate, straight or slightly curved; (E) small number of conidia obtained from rice and water bamboo are branched at the end. The hilum structure of conidia basal part of *Bipolaris* spp. (F) rectangular; (G) papillate; (H) no hilum structure. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

株茭白筍菌株中，除ZPL603菌株之分生孢子中有53 %呈乳突狀臍，且孢子呈棍棒狀，無明顯彎曲（圖二D），其餘12株菌株的分生孢子基部有90-100 %呈直角狀臍。觀察32株供試菌株中，僅來自茭白筍之ZPL106、ZPL404及ZPL405菌株的分生孢子中有3-10 %無明顯臍的構造。

### 分生孢子之測量與主成份分析

由上述形態學之初步鑑定得知，有159株菌株分生孢子形態與*Bipolaris*屬的真菌類似，進一步自159株菌株中挑選71株並測量分生孢子的長度 (length)、寬度 (width) 及隔膜數量 (number of distoseptate)。其中39株來自水稻之菌株的分生孢子長度介於22.64 (64.42) ~ 143.1 (115.45)  $\mu\text{m}$ 、寬度介於10.08 (13.03) ~ 27.74 (20.24)  $\mu\text{m}$ 、隔膜數量介於1 (5) ~ 12 (10) 個；32株來自茭白筍之菌株的分生孢子長度介於28.66 (69.21) ~ 137.8 (108.34)  $\mu\text{m}$ 、寬度介於11.82 (17.09) ~ 26.67 (23.8)  $\mu\text{m}$ 、隔膜數量介於2 (6) ~ 12 (9) 個 (表三)。

自水稻菌株與茭白筍菌株中各挑選39株與32株*Bipolaris*菌株，以長度、寬度及隔膜數量為因子進行主成份分析，結果得知3個成份之變異數百分比分別為64.48 %、29.39 %及6.13 %，且第1與第2成份的累積比率達93.847，因此取前2個成份當成第1主成份 (Fac 1) 與第2主成份 (Fac 2)。主成份結合成份矩陣後，以數學式表達即Fac 1 = length  $\times$  0.936 + width  $\times$  0.477 + number of distoseptate  $\times$  0.911；Fac 2 = length  $\times$  (-0.169) + width  $\times$  0.878 + number of distoseptate  $\times$  (-0.286)。根據第一主成份計分與第二主成份計分繪製成散佈圖，分析結果指出來自兩寄主的菌株無明顯分群現象，主要集中於X、Y軸正負各1單位的區域內 (圖三)。

表三、比較已發表菌株與本研究所用水稻與茭白筍*Bipolaris*屬菌株之分生孢子特性

**TABLE 3.** Comparison of conidial characteristics of *Bipolaris* spp. from published isolates and collected isolates used in the study

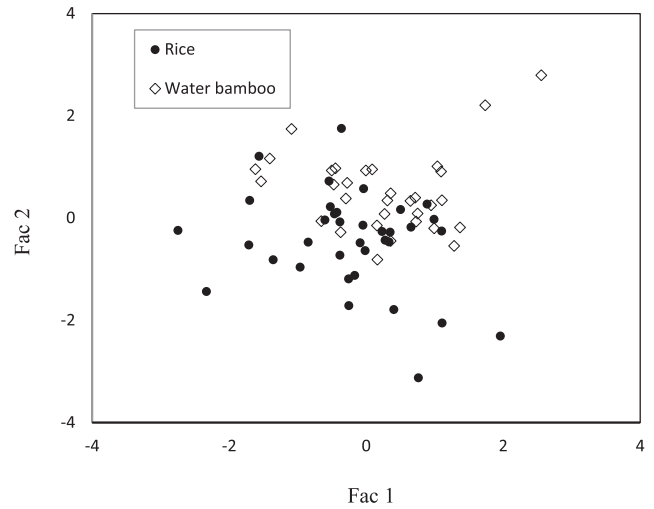
Source	Length ( $\mu\text{m}$ )	Width ( $\mu\text{m}$ )	Number of Distoseptate
<i>Oryza sativa</i>	22.64 - 143.10	10.08 - 27.74	10.08 - 27.74
<i>Zizania latifolia</i>	28.66 - 137.80	11.82 - 26.67	11.82 - 26.67
<i>B. oryzae a</i>	35.00 - 170.00	11.00 - 17.00	11.00 - 17.00
<i>B. zizaniae b</i>	25.50 - 165.80	12.75 - 29.33	12.75 - 29.33

<sup>a</sup> Published by Drechsler (1934)

<sup>b</sup> Published by Nishikado (1929)

### 有性世代配對

本研究隨機挑選可被增幅出300 bp條帶的ZPL1103與ZPL201菌株與無法被增幅出條帶的DJ102、ZPL204及ZPL205菌株，培養在添加稻稈的Sach's agar上進行配對。比較光照與黑



圖三、以71株本研究中之*Bipolaris* sp.分生孢子之長度、寬度及隔膜數量為因子進行主成份分析，並繪製之散佈圖。(●：水稻菌株，◇：茭白筍菌株)。

**Fig. 3.** Two-dimension plot by principal component analysis of 71 isolates of *Bipolaris* sp. in this study based on length, width and distoseptate. (●: Isolates from rice, ◇: isolates from water bamboo).

暗環境影響產生有性世代結果得知，於黑暗環境下，DJ102與ZPL201菌株配對後，只產生球形具長喙的黑色子囊果，然子囊果內卻無子囊或子囊內無孢子形成；而於照光12小時條件下，DJ102與ZPL201菌株配對後，可產生數量較多的子囊果與子囊孢子。於相同條件下，ZPL1103與ZPL204或ZPL205無法在黑暗下形成有性世代；而照光下ZPL1103可與ZPL204和ZPL205菌株形成配對，產生有性世代，且子囊果內可形成細長圓柱形或棍棒狀之子囊，並產生具隔膜之長絲狀子囊孢子 (圖四；表四)。此結果證實，照光有助於*Bipolaris*屬菌株間有性世代的生成，後續配對測試皆於照光12小時條件下進行。

依上述結果，隨機挑選可被增幅出300 bp條帶，推測為MAT-2的水稻菌株WP607、WP203及BD9.2與茭白筍菌株ZPL301、ZPL401，和無法被增幅出條帶的水稻菌株CS105、CS401、CS404、CS406、CS409、CS410、CS603、DJ508及WP112與茭白筍菌株ZPL104、ZPL302、ZPL501、ZPL703及ZPL902相互配對，結果如表五所示。即供試之水稻菌株中有部份菌株可與茭白筍菌株成功配對，並產生子囊果；而供試茭白筍菌株中，亦有部份菌株可與水稻菌株成功配對，並產生子囊果。另部分水稻菌株與茭白筍菌株可相互配對，但僅產生子囊果，內無成熟之子囊孢子。

### 病原性測定

自159株*Bipolaris*菌株中挑選73株進行病原性測定，將供試菌株之50顆分生孢子懸浮液滴於圓形濾紙片，以覆蓋方式接種於水稻與茭白筍離葉，3天後觀察病徵並計算長度1.2 cm面積

表四、光照對*Bipolaris*屬菌株有性世代生成之影響TABLE 4. Effect of light on sexual reproduction of *Bipolaris* spp.

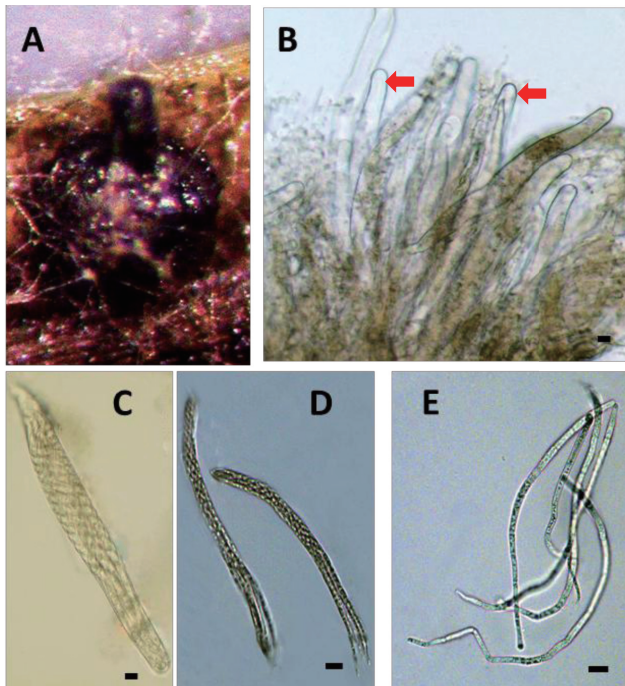
Isolate	Sexual reproduction			
	DJ102		DJ102	
	12 h light	Dark	12 h light	Dark
ZPL201	+ <sup>b</sup>	+ <sup>*d</sup>	—	—
ZPL204	— <sup>c</sup>	—	—	—
ZPL205	—	—	+	—

<sup>a</sup> Isolates of ZPL204, ZPL205 and DJ102 belong to MAT-1 type, whereas isolates of ZPL201 and ZPL1103 is MAT-2 type

<sup>b</sup> Ascumata formed with asci and ascospores

<sup>c</sup> No ascumata formed

<sup>d</sup> Only ascumata formed



圖四、引起水稻與茭白筍胡麻葉枯病之*Bipolaris* spp.其有性世代配對產生之子囊果、子囊及子囊孢子: (A) 子囊果形成; (B) BD9.2與CS404菌株配對產生的子囊 (部分子囊果內無子囊孢子產生, 紅色箭頭); (C&D) 子囊呈圓柱形或棍棒狀; (E) 子囊孢子長絲狀, 具隔膜, 相互盤旋於子囊中。比例尺為10 μm。比例尺為10 μm。

**Fig. 4.** Ascumata, asci and ascospores formed after intercross fertilization. (A) Ascumata on the PDA; (B) ascospore filiform, multiseptate, usually coiled in a helix in the ascus; isolate BD9.2 and CS404 could mate with each other and some ascumata without ascospore production (red arrow); (C, D) asci are cylindrical or obclavate; (E) ascospores. Bar = 10 μm.

表五、來自水稻與茭白筍*Bipolaris*菌株有性世代之配對TABLE 5. Intercross fertility test of *Bipolaris* spp. from rice and water bamboo

Host	Isolate	Sexual reproduction				
		<i>Oryza sativa</i>			<i>Zizania latifolia</i>	
		WP203	WP607	BD9-2	ZPL301	ZPL401
<i>Oryza sativa</i>	CS105	—	+	—	—	—
	CS401	—	—	—	—	—
	CS404	—	+	+	—	+
	CS406	—	—	—	ND	—
	CS409	—	+	+	—	—
	CS410	+	+	—	—	ND
	CS603	+	—	—	—	—
	DJ508	—	+	—	+	—
	WP112	+	—	+	ND	ND
	<i>Zizania latifolia</i>	ZPL104	—	—	—	+
ZPL302		—	—	—	—	—
ZPL501		+	+	+	+	—
ZPL703		—	—	—	—	—
ZPL902		+	+	—	—	+

<sup>a</sup> Ascumata formed with asci and ascospores

<sup>b</sup> No ascumata formed

<sup>c</sup> Ascumata with or without asci forming

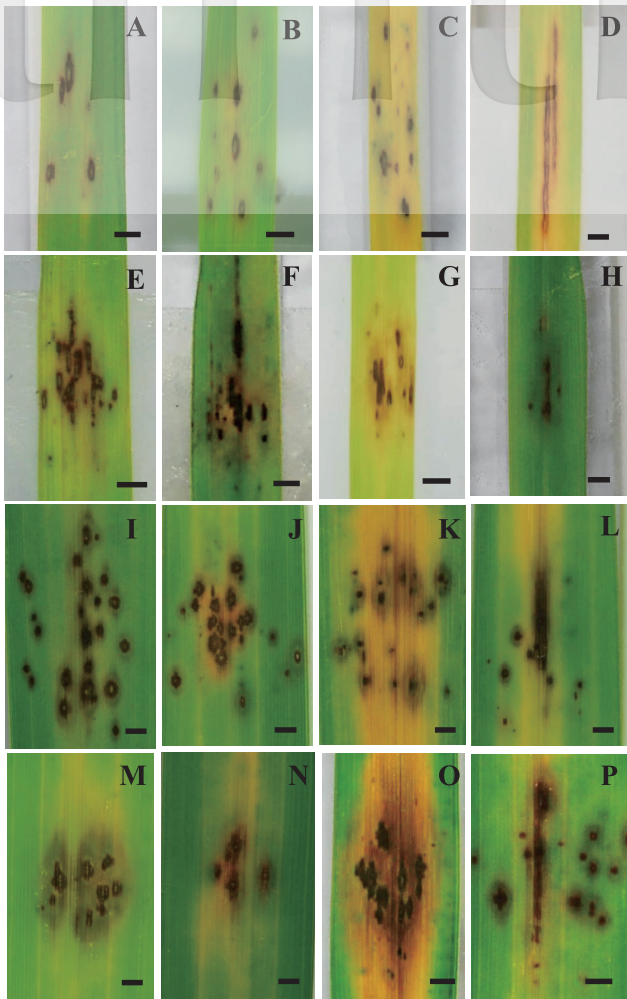
<sup>d</sup> No data

下罹病度。接種結果顯示, 43株水稻*Bipolaris*屬菌株均可感染水稻與茭白筍葉片, 罹病度分別介於6.7-46.7%與6.7-53.3%。於病徵表現方面, 多數菌株可引起褐色至黑褐色的圓形或橢圓病斑 (圖五A、D), 部分菌株可引起病斑外圍形成黃暈 (圖五B、J) 或葉枯 (圖五C、K), 少數菌株如自田間水稻典型胡麻葉枯病斑所分離之WP302、WP403、WP602及KS147.2菌株於水稻葉片與TD30.1菌株於茭白筍葉片可引起長條形病斑 (圖五D、L)。

另挑選茭白筍30株*Bipolaris*菌株同樣可感染兩種寄主之葉片, 於水稻葉片之罹病度介於13.3-40%, 茭白筍葉片之罹病度介於6.7-86.7%。茭白筍菌株引起之病徵與水稻菌株相似, 產生褐色至黑褐色的圓形或橢圓病斑 (圖五E、M), 病斑外圍形成黃暈 (圖五F、N) 或葉枯 (圖五G、O)。

#### 核苷酸序列增幅與親緣性分析

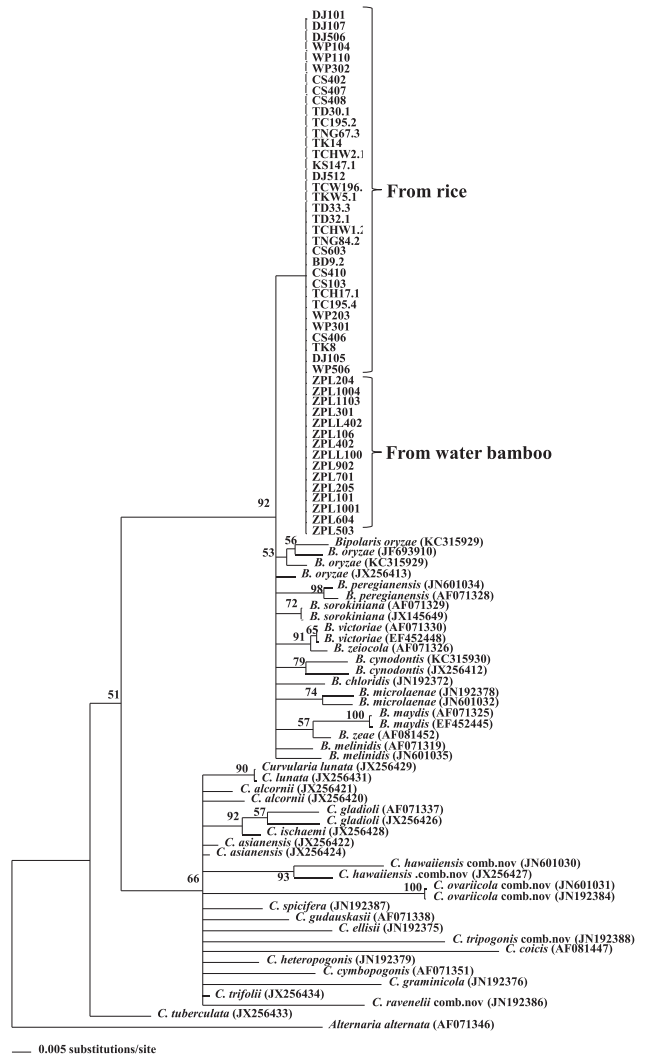
利用ITS1 / ITS4引子對可將159株菌株增幅出551-552 bp的DNA條帶, 解序後將所有菌株的ITS基因序列與NCBI資料庫比對, 結果得知供試菌株與*B. oryzae*的相似度達99-100%。利用Clustal X 1.81排序比較159株*B. oryzae*菌株的ITS基因序列, 得



圖五、以切離葉接種水稻或茭白筍胡麻葉枯病之 *Bipolaris* spp. 菌株所產生的病徵。水稻菌株 (A-D、I-L) 與茭白筍菌株 (E-H、M-P) 感染水稻 (A-H) 或茭白筍 (I-P) 葉片產生圓形至橢圓形之黑褐色病斑 (A、E、I、M)，外圍具黃暈 (B、F、J、N) 或葉枯 (C、G、K、O)，少數引起長條形病徵 (D、H、L、P)。比例尺為 1 mm。

**Fig. 5.** Symptom of detached leaves of rice and water bamboo inoculated by *Bipolaris* spp. (A-D, I-L) isolates from rice; (E-H, M-P) isolates from water bamboo; (A-H) isolates inoculated on rice leaves; (I-P) isolates inoculated on water bamboo leaves; (A, E, I, M) produced round to oval black spot; (B, F, J, N) spot with yellow halo; (C, G, K, O) leaf blight; (D, H, L, P) long lesion. Bar = 1 mm.

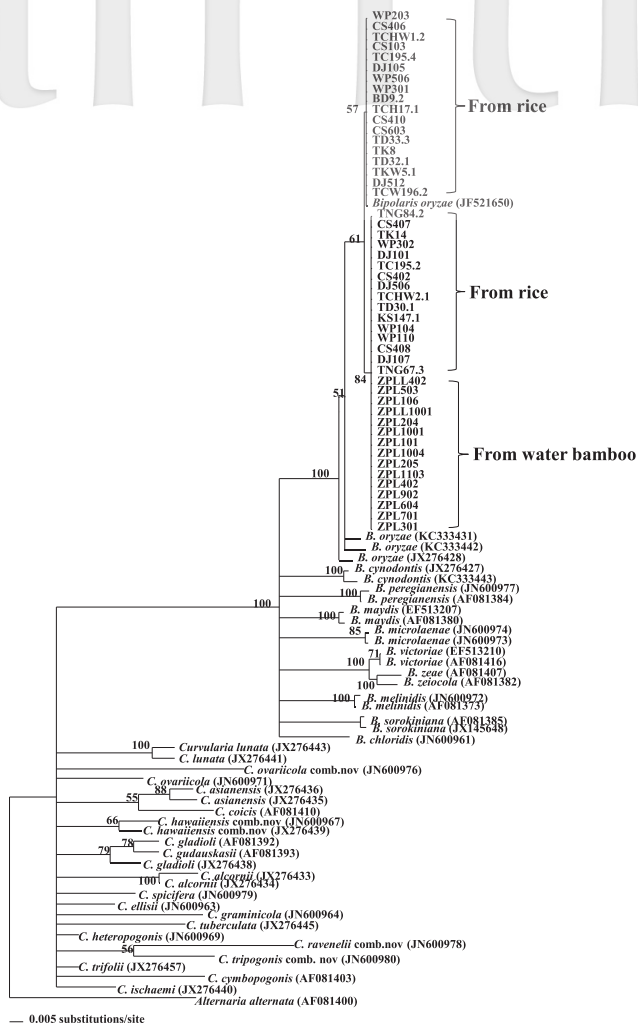
知部分供試菌株於ITS1區域具有1 bp的差異，可將水稻菌株分成2類，且分佔供試菌株數目的47 %與53 %；而茭白筍供試菌株皆無核苷酸序列的差異。此外，茭白筍的菌株序列與佔47 %水稻菌株序列相同，且分離自典型胡麻葉枯病斑或長條形病斑的茭白筍菌株，在ITS基因序列間沒有差異。本研究挑選不同群的34株水稻與15株茭白筍 *Bipolaris* sp. 菌株共49株，並加入GenBank中的20種 *Curvularia* 與10種 *Bipolaris* 菌株 (表二)。以近鄰結合法 (NJ) 分析結果顯示，本研究所蒐集的 *Bipolaris* 菌株同



圖六、利用近鄰結合法 (NJ) 分析ITS序列並建構之分子親緣樹，以 *Alternaria alternata* (AF071346) 做為外群。  
**Fig. 6.** An ITS sequence-based tree generated by neighbor-joining method. The outgroup is *Alternaria alternata* (AF071346).

屬一分子群，支持率 (bootstrap value) 為98 % (圖六)。  
利用GPD1 / GPD2引子對可將159株菌株增幅出577 bp的DNA條帶，解序後將所有菌株的GPDH序列與NCBI資料庫比對，結果得知所有供試菌株與 *B. oryzae* 的相似度達99%。以Clustal X 1.81排序比較後指出，所有供試菌株之GPDH基因序列在第41與第213鹼基對上具有差異，可將水稻菌株分為2群，分佔供試菌株數目的55 %與45 %；而茭白筍供試菌株皆無序列差異。此外，茭白筍的菌株序列與佔55 %水稻菌株序列相同，且分離自典型胡麻葉枯病斑或長條形病斑的茭白筍菌株，在GPDH基因序列間沒有差異。挑選49株與ITS序列分析相同之菌株以近鄰結合法 (NJ) 分析結果顯示，供試 *Bipolaris* 屬菌株形成2個分子群，34株來自水稻之菌株中，有18株菌株形成同一分

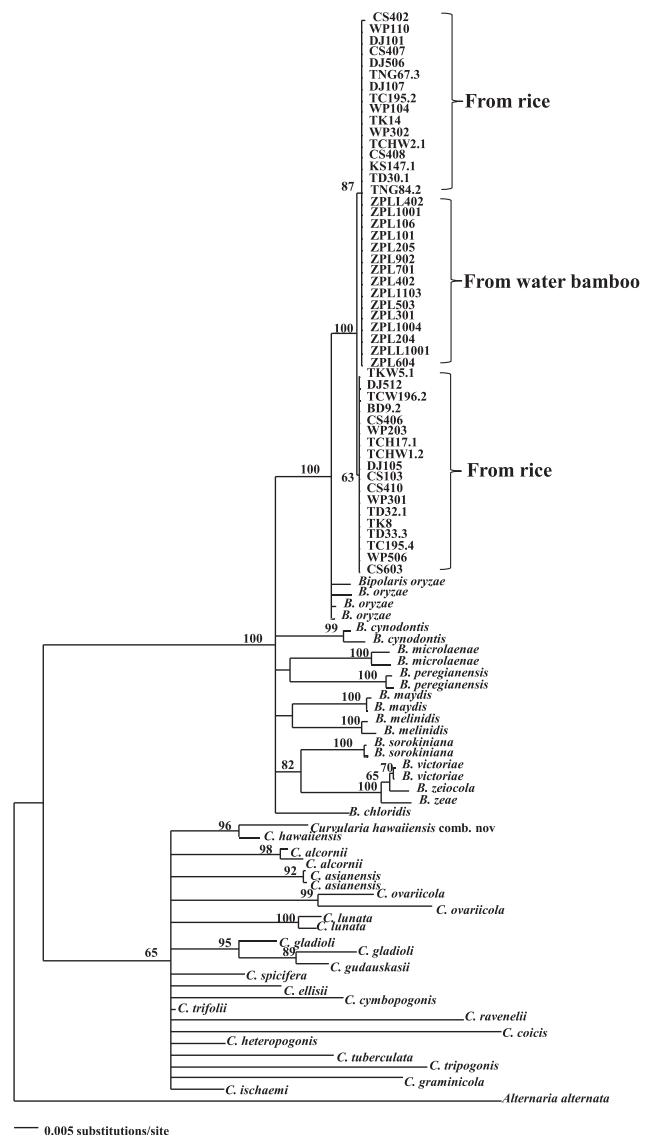




圖七、利用近鄰結合法 (NJ) 分析GPDH序列並建構分子之親緣樹，以 *Alternaria alternata* (AF081400) 做為外群。

Fig. 7. A GPDH sequence-based tree generated by neighbor-joining method. The outgroup is *Alternaria alternata* (AF081400).

子群，支持率為57 %；而其餘16株菌株與茭白筍菌株形成一分子群，支持率為84 %。本研究自GenBank中所挑選之*B. oryzae*中，有一株來自美國地區雜草之*B. oryzae*菌株 (JF521650)，與供試的水稻菌株中的一群同屬一個分子群；然其他來自GenBank中之*B. oryzae*菌株雖與台灣水稻或茭白筍菌株親緣性高，但仍分布於不同之分子群中 (圖七)。本研究供試*Bipolaris*菌株於ITS與GPDH序列上分別具1 bp與2 bp的差異，然ITS序列與茭白筍菌株屬於同一群之水稻菌株，於GPDH序列則與茭白筍菌株分屬不同群；反之，ITS序列與茭白筍菌株相異的水稻菌株，在GPDH序列則與茭白筍菌株屬於同群。此外部分水稻菌株如DJ512、TKW5.1及TCW196.2於兩種序列之分群皆與茭白筍菌株相異；而有一水稻菌株TNG84.2於兩種序列與茭白筍菌株完全相同。此結果顯示，來自水稻的*Bipolaris*菌株於ITS與



圖八、利用近鄰結合法 (NJ) 合併分析ITS與GPDH序列並建構之分子親緣樹，以*Alternaria alternata*做為外群。

Fig. 8. An ITS and GPDH sequence-based tree generated by neighbor-joining method, and the outgroup is *Alternaria alternata*.

GPDH序列上較茭白筍菌株呈現多樣。

進一步將所有菌株之ITS與GPDH序列合併以近鄰結合法 (NJ) 分析親緣性，分析結果顯示所得樹狀圖與GPDH序列分析結果相似，*Bipolaris*菌株可形成2分子群，支持率分別為87 %和63 %，此外國外之*B. oryzae*菌株不與本研究之供試菌株形成同一分子群 (圖八)。

## 討論

本研究自水稻與茭白筍胡麻葉枯病罹病葉，各分離得112

與47株*Bipolaris*屬菌株。分生孢子形態觀察結果顯示，多數分生孢子呈彎曲，紡錘狀，少數為細長圓柱形或棍棒狀。以長度、寬度及隔膜數量做為因子進行主成份分析，並繪製散佈圖，證實來自水稻與茭白筍的*Bipolaris*菌株無法以形態區分。Yamamoto氏等 (1956)<sup>(55)</sup>曾觀察日本產來自水稻與茭白筍之*Bipolaris*菌株，亦指出引起水稻胡麻葉枯病之*B. oryzae*與引起茭白筍胡麻葉枯病之*B. zizaniae*無法以形態區分。於分生孢子基部觀察結果中顯示，本研究來自水稻與茭白筍之*Bipolaris*菌株主要以直角狀臍為主。前人研究曾指出*B. zizaniae*菌株與*B. oryzae*菌株之最大差異為，前者分生孢子基部呈直角狀<sup>(55)</sup>，而*B. oryzae*菌株分生孢子基部臍呈乳突狀<sup>(2, 45)</sup>。推測可能原因為，當時研究人員並未蒐集足夠的菌株詳細觀察兩種菌株之分生孢子基部構造，本研究中雖水稻*Bipolaris*菌株中有部分菌株的分生孢子基部呈乳突狀，然卻非台灣菌株之主要形態。此外，*Bipolaris*屬菌株常因培養條件不一，導致分生孢子出現形態差異<sup>(17)</sup>，此亦可能出現錯誤的形態描述。將來可嘗試對*Bipolaris zizaniae*之模式標本進行觀察，並將其與其他種類*Bipolaris*菌株的親緣性分析來證實相關推論。

Arie氏等人 (1997)<sup>(3)</sup>指出MAT基因可控制真菌之有性世代的產生。本研究以前人發表之引子對分析台灣產水稻與茭白筍胡麻葉枯病菌，得知台灣菌株以MAT-1為優勢，而MAT-2菌株為非優勢。美國曾報導引起明尼蘇達州各地野生稻 (*Z. palustris*) 胡麻葉枯之*B. oryzae*菌株以MAT-2配對型佔多數<sup>(9)</sup>，顯示各地區所出現配對型比例不同的現象，與原族群相異配對型之族群遷移所引起有關<sup>(33)</sup>。雖配對型比例不平衡可能限制真菌各個世代之遺傳重組，兩種配對型同時存在仍使有性生殖有機會產生，造成遺傳多樣性<sup>(8)</sup>。

前人研究曾表明於培養基中添加稻桿可有助於觀察*Bipolaris* spp.不同配對型的親和行為<sup>(22, 48, 50, 51)</sup>；本研究以添加稻桿的Sach's agar測試以PCR所鑑定之可能不同配對型菌株之親和性，結果證實照光有助於*B. oryzae*有性世代的產生與成熟，與Ito和Kuribayashi兩氏 (1931)<sup>(23)</sup>描述，於恆溫條件下，照光適合有性世代產生結果相同。於所挑選的水稻與茭白筍之*Bipolaris*菌株配對中，得知水稻與茭白筍菌株可相互配對產生成熟之有性世代，證實水稻與茭白筍菌株可以互相親合，與Chang氏 (1974)<sup>(10)</sup>所發表兩種菌株可配對產生有性世代結果相同。然配對實驗中，部分菌株相互配對形成雜交 (hybrid) 狀態，亦可產生長喙的子囊果與子囊，但子囊內無孢子生成。前人研究中曾有案例指出，當菌株可相互配對但無法產生完整有性世代時，此兩菌株之親緣性仍不足以產生有性世代，兩者關係屬雜交種<sup>(12, 18, 30)</sup>。雜交種的產生可能加速真菌演化以適應環境或新寄主<sup>(29)</sup>，因此也可能因為人類培育新品種作物之行為而發生；如 *Microbotryum lychnidis-dioicae* 和 *Microbotryum*

*silenes-dioicae* 的雜交種，被發現在利用 *Silene latifolia* 和 *Silene dioica* 兩親本雜交育成的新品種石竹上<sup>(19)</sup>。然自然條件下，真菌物種間的雜交受保護於真菌對彼此的識別、細胞融合的能力和遺傳物質的平衡等而不易發生<sup>(34)</sup>，其他如真菌間避免病毒等有害物的交流也會產生雜交的障礙<sup>(7, 15)</sup>；因此當上述障礙較微弱或是不存在時即會產生雜交現象<sup>(7)</sup>。另外，若培養環境條件不適合，或有些菌株產生成熟之有性世代需要更久的時間，有性世代或雜交種也無法在實驗室中觀察到，本研究後續可再針對培養條件進行測試以釐清雜交現象的產生。本研究得知，部份被PCR反應鑑定為MAT-2 菌株無法與MAT-1菌株相互形成配對。雖前人研究指出MAT基因可控制菌株間的配對情形<sup>(3)</sup>；然Sharon氏等人 (1996) 曾利用*Bipolaris sacchai*之MAT-2缺陷菌株與正常MAT-1菌株產生配對，並形成有缺陷之子囊，進而證實MAT基因並非調控有性生殖的唯一基因<sup>(39, 43)</sup>。因此台灣產來自水稻與茭白筍之*Bipolaris*屬菌株能相互配對的基因或不只有MAT基因。

本研究利用切離葉接種方法，快速檢定水稻與茭白筍*Bipolaris*菌株對2寄主葉片的病原性與毒力，證實所有菌株均可感染水稻與茭白筍離葉，產生相似病徵。Chang氏 (1975)<sup>(11)</sup>與Yamamoto氏等人 (1956)<sup>(55)</sup>曾嘗試將來自水稻與茭白筍之*Bipolaris*菌株接種於兩種作物葉片，結果葉片出現典型之卵圓形褐色病斑，具黃暈，後期病斑中央常呈灰白色等特徵，顯示來自水稻與茭白筍的*Bipolaris*屬菌株對兩寄主皆具病原性。此外接種結果中亦得知，有部份菌株可引起葉枯現象，推測原因應與病原菌產生的毒質有關。目前*Bipolaris*屬菌株已被報告可產生Ophiobolin A與Ophiobolin B毒素，該兩類毒素可抑制寄主防禦反應，造成寄主細胞電解質滲漏，毒害細胞導致死亡<sup>(52, 53)</sup>。

ITS與GPDH核苷酸序列證實，來自水稻與茭白筍之*Bipolaris*屬菌株具有高度分子親緣性，且水稻菌株較茭白筍菌株具有分子多樣性。ITS序列分析中，雖ITS1間的序列有1個核苷酸之差異，然透過近鄰結合法 (NJ) 分析後，來自水稻與茭白筍的*Bipolaris*屬菌株同屬一分子群，顯示ITS1間的單一核苷酸無法將來自兩種作物的*Bipolaris*屬菌株區分，且兩種菌株在ITS序列上具高度分子親緣性。此外，ITS親緣性分析中，指出來自GenBank的*B. oryzae*菌株無法與台灣產菌株形成單一分子群，然彼此間相似性極高，可能無法有效區分。依前人研究指出，ITS序列可有效輔助區分*Bipolaris*屬不同種的菌株<sup>(6)</sup>，然臺灣產菌株與國外菌株仍分屬不同分子群，是否臺灣菌株與國外菌株在ITS序列上有其他差異性，未來需與更多國外菌株比較。於GPDH序列分析結果中，於該基因序列片段中有2處核苷酸的差異，顯示GPDH基因序列較ITS序列有更多之差異，且透過近鄰結合法，可將水稻菌株分成兩個分子群。GPDH基因序

列常用於區別*Bipolaris*與*Curvularia*屬種間之序列<sup>[6, 31]</sup>，由本研究結果得知，GPDH能區分水稻菌株之分子差異性，然兩群中的一群菌株與茭白筍的菌株形成同一分子群，故GPDH基因序列仍無法區分水稻與茭白筍的*Bipolaris*屬菌株。進一步將兩序列合併分析，指出ITS與GPDH序列合併時亦無法有效區分水稻與茭白筍菌株。合併分析中得知，台灣產菌株與國外產菌株未形成單一分子群，此結果說明台灣菌株可能因地理隔閡、氣候環境等因素而自成一特殊菌系，與國外菌株有所差異。此外，分離自水稻的菌株則具有較高之多樣性，可能由於台灣地處熱帶與亞熱帶地區，因應各地區氣候條件、育種學家對水稻之抗病篩選、人民對稻米的用途及食用口感偏好等因素而發展出多種栽培種，病原菌與水稻經長時間演化而造就水稻菌株間於遺傳上具多樣性。而茭白筍之栽培區域少且栽培品系簡單，導致在單一栽培品種與地區的條件限制下，茭白筍分離之菌株遺傳變異小於水稻分離之菌株。

本研究自台灣各主要水稻與茭白筍栽培區蒐集並分離之*Bipolaris*屬菌株，觀察分生孢子形態，顯示來自兩種作物之分生孢子多數為彎曲紡錘狀，以組成份分析亦無法區分，分生孢子基部臍構造以直角狀為主；部分來自兩寄主的菌株可相互配對產生成熟之有性世代；於病原性測試指出，兩種菌株均可感染水稻與茭白筍葉片，產生相似病徵；而ITS與GPDH序列分析結果證實兩種菌株之親緣關係相近。根據上述結果認為，引起臺灣水稻或茭白筍胡麻葉枯病之*Bipolaris*屬菌株應為同一種，且分生孢子基部臍的形態特徵，並非為區別*B. oryzae*或*B. zizaniae*之重要特徵；另臺灣菌株與GenBank中之*B. oryzae*之分子親緣性仍較其他種類高，即引起台灣地區水稻與茭白筍胡麻葉枯病之病原菌應為*B. oryzae*。

## 引用文獻

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5<sup>th</sup>. Elsevier, New York.
- Alcorn, J. L. 1982. New *Cochliobolus* and *Bipolaris* species. Mycotaxon 15: 1-19.
- Arie, T., Christiansen, S., Yoder, O., and Turgeon, B. 1997. Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved *MAT* HMG Box. Fungal Genet. Biol. 21: 118-130.
- Bedi, K., and Gill, H. 1960. Losses caused by the brown leaf spot disease of rice in the Punjab. Indian Phytopathol. 13: 161-164.
- Berbee M. L., Carmean, D. A., and Winka, K. 2000. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the Ascomycota: How many nucleotides are enough? Mol. Phylogenet. Evol. 17: 337-344.
- Berbee, M., Pirseyedi, M., and Hubbard, S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 91: 964-977.
- Brasier, C. 2000. Plant pathology: the rise of the hybrid fungi. Nature 405: 134-135.
- Burt, A., Carter, D. A., Koenig, G. L., White, T. J., and Taylor, J. W. 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. PNAS 93: 770-773.
- Castell-Miller, C., and Samac, D. 2012. Population genetic structure, gene flow and recombination of *Cochliobolus miyabeanus* on cultivated wildrice (*Zizania palustris*). Plant Pathol. 61: 903-914.
- Chang, H. S. 1974. Inter-cross fertility between *Helminthosporium oryzae*, *H. zizaniae* and an unidentified *Helminthosporium* sp. on *Zizania aquatica*. Bot. Bull. Acad. Sinica 15: 29-45.
- Chang, H. S. 1975. *Helminthosporium oryzae*, a heterogeneous plant pathogenic fungus. Plant Protect. Bull. 17: 285-290.
- Chung, W. H., Kim, J. J., Yamaoka, Y., Uzunovic, A., Masuya, H., and Breuil, C. 2006. *Ophiostoma breviusculum* sp. nov. (Ophiostomatales, Ascomycota) is a new species in the *Ophiostoma piceae* complex associated with bark beetles infesting larch in Japan. Mycologia 98: 801-814.
- Council of Agriculture, Executive Yuan. 2011. Agricultural Statistics Yearbook. <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>
- Datnoff, L. E., and Lentini, R. S. 1994. Brown spot in Florida rice. Florida Cooperation Extension Service. University of Florida.
- Dobzhansky, T., and Dobzhansky, T. G. 1937. Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- Drechsler, C. 1934. Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*, *Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus, *Cochliobolus*. Phytopathology 24: 953-983.
- Enomoto, S. 1925. On the variation of the spore shape of *Helminthosporium* effected by the environments. J. Sapporo Soc. Agric. Forest. 76: 301-304.
- Et-Touil, A., Brasier, C. M., and Bernier, L. 1999. Localization of a pathogenicity gene in *Ophiostoma novo-ulmi* and evidence that it may be introgressed from *O. ulmi*. MPMI 12: 6-15.
- Gibson, A., Refregier, G., Hood, M., and Giraud, T. 2014.

- Performance of a hybrid fungal pathogen on pure-species and hybrid host plants. *Int. J. Plant Sci.* 175: 724 – 730.
20. Hebert, T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* 61: 83-87.
  21. Hung, S. T., Huang, C. H., Liao, C. T., Huang, T. C., and Hsu, L. M. 2004. Plant protection technology special issue book series: water bamboo. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taipei. (In Chinese)
  22. Ito, S., and Kuribayashi, K. 1927. Production of the ascigerous stage in culture of *Helminthosporium oryzae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 2: 1-8.
  23. Ito, S., and Kuribayashi, K. 1931. The ascigerous forms of some graminicolous species of *Helminthosporium* in Japan. *J. Facul. Agric. Hokkaido Imp. Univ.* 29: 85-125.
  24. Khush, G. S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol. Biol.* 59: 1-6.
  25. Liao, C. T., Lin, C. S., and Chen, C. C. 2002. Surveys on the disease and pests and their occurrence on water bamboo (*Zizania latifolia* Turcz.) in Taiwan. *Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stn.* 75: 59-72. (In Chinese)
  26. Lin, T. C. 2005. *Coba*. Taiwan agriculture encyclopedia (crop protection - 2). *Harvest Farm Magazine*: 271-276. (In Chinese)
  27. Lin, T. C., and Hong, S. T. 2000. The development of *Coba* New Early Variety --- Taichung No. 1. *Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stn.* 66: 37-56. (In Chinese)
  28. Mahalanobis, P. C., Mukherjea, R., and Ghosh, A. 1946. A sample survey of after-effects of the Bengal famine of 1943. *Indian J. Statist.* 7: 337-400.
  29. Mallet, J. 2007. Hybrid speciation. *Nature* 446: 279 – 283.
  30. Man in't Veld, W. A., Veenbaas-Rijks, W. J., Ilieva, E., de Cock, A. W., Bonants, P. J., and Pieters, R. 1998. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology* 88: 922-929.
  31. Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R. G., Tan, Y. P., and Hyde, K. D. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Divers.* 56: 131-144.
  32. Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, A., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. 2014. The genus *Bipolaris*. *Stud. Mycol.* 79: 221-288.
  33. Milgroom, M.G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Ann. Rev. Phytopathol.* 34: 457-477.
  34. Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., Heitman, J. 2011. Sex in fungi. *Annu. Rev. Genet.* 45: 405-430.
  35. Nisikado, Y. 1929. Studies on the *Helminthosporium* diseases of Gramineae in Japan. *Berichte des Ohara Instituts fur Landwirtschaftliche Biologie, Okayama Universitat* 4: 111-126.
  36. Ocfemia, G. O. 1924. The *Helminthosporium* disease of rice occurring in the southern United States and in the Philippines. *Ann. J. Bot.* 11: 385-408.
  37. Ou, S. H. 1984. *Rice diseases*. 2<sup>nd</sup> ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey, England.
  38. Padmanabhan, S. 1973. The great Bengal famine. *Ann. Rev. Phytopathol.* 11: 11-24.
  39. Pyrzak, W., Miller, K. Y., and Miller, B. L. 2008. Mating type protein *Mat1-2* from asexual aspergillus fumigatus drives sexual reproduction in fertile *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 7: 1029-1040.
  40. Rambaut, A. 2000. *Se-AI: Sequence alignment editor*. Department of Zoology, University of Oxford, UK.
  41. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
  42. Sen, A. 1977. Starvation and exchange entitlements: a general approach and its application to the Great Bengal Famine. *Cambridge J. Econo.* 1: 33-59.
  43. Sharon, A., Yamaguchi, K., Christiansen, S., Horwitz, B. A., Yoder, O., and Turgeon, B. 1996. An asexual fungus has the potential for sexual development. *Molec. Gen. Genet.* 251: 60-68.
  44. Sivanesan, A. 1984. The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. *Cramer. Vaduz.*
  45. Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycol. Papers* 158.
  46. Terrell, E. E., and Batra, L. 1982. *Zizania latifolia* and *Ustilago esculenta*, a grass-fungus association. *Econ. Bot.* 36: 274-285.
  47. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
  48. Tsuda, M., and Ueyama, A. 1976. Distribution of two mating type of *Cochliobolus miyabeanus* in field and a laboratory attempt to produce hybrids between isolates. *Ann. Phytopathol.*

- Soc. Jpn. 42: 7-11.
49. Tucker, C. M. 1927. Report of the plant pathologist. Report Puerto Rico Agric. Exp. Stn. 1925: 24-40.
50. Ueyama, A., and Tsuda, M. 1975. Formation in culture of *Cochliobolus miyabeanus*, the perfect state of *Helminthosporium oryzae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 41: 434-440.
51. Ueyama, A., and Tsuda, M. 1976. Mating type and sexuality of *Cochliobolus miyabeanus* the perfect state of *Helminthosporium oryzae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 42: 1-6.
52. Vidhyasekaran, P., Borromeo, E., and Mew, T. 1984. Host-specific toxin production by *Helminthosporium oryzae*. Philippine Phytopathol. 76: 261-266.
53. Vidhyasekaran, P., Borromeo, E., and Mew, T. 1992. *Helminthosporium oryzae* toxin suppresses phenol metabolism in rice plants and aids pathogen colonization. Physiol. Mol. Plant Pathol. 41: 307-315.
54. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18: 315-322.
55. Yamamoto, W., Maeda, M., and Idono, T. 1956. Studies on the brown spot of *Zizania latifolia* Tuca, with special reference to comparison with the brown spot of rice plants caused by *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan. Science reporter, Hyago University of Agriculture 2. (in Japanese with English abstract)
56. Yang, H., and Leu, L. 1978. Formation and histopathology of galls induced by *Ustilago esculenta* in *Zizania latifolia*. Phytopathology 68: 1572-1576.

## ABSTRACT

Chen, S. M., Chen, Y. J., Chuang, W. C., Kuo, C. H., and Chuang, W. H.\* 2018. Comparison of the characteristics of *Bipolaris* spp. causing brown spot on rice and water bamboo. J. Plant Med. 60(1): 9-22.

\*Corresponding author, W. H. Chuang, E-mail: wenchung@nchu.edu.tw

*Bipolaris oryzae* and *B. zizaniae* are the pathogens to cause brown spot on rice (*Oryza sativa*) and water bamboo (*Zizania latifolia*). Previous studies indicated that *B. oryzae* could be

distinguished from *B. zizaniae* based on the hilum structure of conidia basal part. To understand the relationship of *Bipolaris* spp. causing brown spot on water bamboo and rice, the morphology, cross fertility, pathogenicity and molecular characters of *Bipolaris* spp. were analyzed. The observation of conidia indicated that the *Bipolaris* spp. isolates from rice and water bamboo showed similar morphology and rectangular hilum was the major type. The cross fertility test confirmed that the isolates from rice or water bamboo could mate successfully under light condition and produce ascospores. The pathogenicity test demonstrated that the isolates from rice or water bamboo could infect both with typical brown spot. Molecular phylogenetic analyses showed that *Bipolaris* isolates from rice or water bamboo formed a molecular group based on ITS (internal transcribed spacer) region. The other side, the analysis of GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) sequence showed that isolates from rice could be separated into two molecular groups and one group isolates formed the same molecular group with isolates from water bamboo. Phylogenetic analyses demonstrated that the *Bipolaris* spp. from rice or water bamboo were closely related to *B. oryzae* from GenBank. Our results suggest that the *Bipolaris* spp. from rice and water bamboo are same species of *B. oryzae*.

**Keywords:** rice, water bamboo, brown spot, molecular phylogeny