

蔬菜及花卉立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*) 對 FRAC C 類殺菌劑之感受性分析

李敏郎^{1*}

摘要

李敏郎。2022。蔬菜及花卉立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*) 對 FRAC C 類殺菌劑之感受性分析。臺灣農藥科學 13 : 1-17。

本研究探討臺灣蔬菜及花卉等 13 種植物上所分離之 15 株立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*) 菌株，對 FRAC C 類及其混合劑等 22 種殺菌劑之感受性分佈情形，據此分析立枯絲核菌對同群作用機制殺菌劑是否存在交叉抗藥性，並檢視現行登記之殺菌劑劑量產生抗藥性之相對風險。供試菌株對 C2 類賽氟滅與福多寧，以及 C3 類百克敏最敏感，其 EC_{50} 分別為 0.13 ± 0.09 、 0.22 ± 0.11 及 0.18 ± 0.19 mg/L，C5 類扶吉胺之 EC_{50} 為 0.37 ± 0.55 mg/L，而 C4 類殺菌劑 EC_{50} 均超過 1,000 mg/L；在混合劑部份，亞托環克座及三氟得克利抑制菌絲生長的效果最佳，其 EC_{50} 分別為 0.07 ± 0.03 及 0.08 ± 0.07 mg/L，其主要抑制作用來自 G1 類環克座及得克利。本研究首次應用集群分析 (cluster analysis) 方式，分析立枯絲核菌是否具備群內交叉抗藥性，結果顯示在不同群標的部位間不存在交叉抗藥性。另也首次應用列聯性分析 (contingency analysis) 方式，探討立枯絲核菌對現行登記殺菌劑劑量之相對抗藥性風險，結果顯示 C2+M5 混合劑之抗藥性風險最低，登記之最高劑量均可抑制供試菌株之菌絲生長，其次為 C3+G1 及 C2+C3 混合劑，其抗藥性風險值分別為 10.0% 及 13.3%；單劑部份，C4 及 C3 群則有 100% 及 91.67% 抗藥性風險，其概度比檢定與皮爾森卡方檢定之 χ^2 統計值分別為 193.424 及 161.829， P 值均小於 0.001 ($N=329$)，綜言之，福多寧、四氯福多寧、四氯托敏及得克利之抗藥性風險最低，其次為亞托環克座、白克列及白列克收欣，均有 6.67% 抗藥性風險，而安美速、賽座滅、亞托敏、克收欣及三氟敏均為 100% 抗藥性風險。本研究首次以集群分析探討 *R. solani* 交叉抗藥性，以及應用列聯性分析探討 *R. solani* 相對抗藥性風險。

接受日期：2022 年 9 月 7 日

* 通訊作者。E-mail: mllee@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

關鍵詞：立枯絲核菌、呼吸作用抑制劑、感受性、集群分析、交叉抗藥性、關聯性分析、相對風險

緒言

立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 菌絲交接處呈現直角，第一橫膈前之菌絲有縊縮情形，不產生分生孢子，而是產生菌核，其有性世代為擔子菌 *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk.⁽¹²⁾。立枯絲核菌為害之寄主範圍廣泛，國內至少有 49 科 130 種植物紀錄⁽¹⁾。立枯絲核菌之菌核可殘存於土壤或植株殘體，為害植物根部與地基部，造成根腐、猝倒與基腐等病徵，係土壤傳播病原真菌。由於這類土壤傳播之病原真菌大都殘存在土壤中或植物殘體中，當環境條件適合時，會迅速蔓延至附近植株根部及地基部，為避免此類病害蔓延，田間常用於發病初期，以登記藥劑噴施於罹病株附近地面及根部，藉此遏止本類病害蔓延，達到防治目的。

目前已知福多寧 (flutolanil)、滅普寧 (mepronil) 等殺菌劑，常用於防治立枯絲核菌引起之立枯病⁽²⁾，而福多寧及滅普寧等之作用機制為呼吸作用抑制劑，屬殺菌劑抗藥性行動委員會 (Fungicide Resistance Action Committee) 分群之 FRAC 7、C2 類殺菌劑，部份植物病原真菌對 C2 類殺菌劑已於田間產生抗藥性菌

株，屬於中等到高風險抗藥性等級^(6,7)。

中國曾以水稻紋枯病菌對白克列 (boscalid)、滅普寧感受性進行分析，兩者室內生物檢定結果顯示其 EC₅₀ 分別為 0.094±0.02 及 2.04±0.36 mg/L，以滅普寧野生感受性菌株及抗藥性突變菌株，同時進行白克列、克收欣 (kresoxim-methyl)、亞托敏 (azoxystrobin) 等藥劑之室內生物檢定試驗，結果指出滅普寧抗性菌株對白克列仍保持敏感性，顯示滅普寧與白克列雖屬 FRAC 7、C2 類殺菌劑，其交叉抗藥性情形並不顯著⁽¹⁶⁾。而另一試驗結果顯示，立枯絲核菌對 FRAC 7、C2 之賽氟滅產生抗藥性風險，屬於低度到中度風險^(11,17)。

美國曾以 1999 年前尚未登記亞托敏於甜菜前，所搜集之 27 株 *R. solani*，做為基礎感受性菌株 (baseline isolates)，並以 1999 年甜菜登記亞托敏後所搜集之 78 株菌株，做為非基礎感受性菌株 (nonbaseline isolates)，藉此分析感受性變化情形，試驗結果指出亞托敏、三氟敏 (trifloxystrobin) 及百克敏 (pyraclostrobin) 抗性比分別為 6.0、3.5 及 3.0，雖然感受性已經偏移，然而依美國登記之防治劑量而言，這些殺菌劑仍具防治效果⁽³⁾。

印度以菲克利 (hexaconazole)、待克利 (difenoconazole)、得克利 (tebuconazole)

及普克利 (propiconazole) 等 4 個三唑類 (triazoles) 殺菌劑，對水稻紋枯病菌進行生物檢定，其 EC₅₀ 分別為 0.062、0.160、0.304 及 0.450 mg/L，對水稻紋枯病菌的菌絲抑制效果不一，其抑制菌核產生數量與菌絲乾重的效果也不一致，顯示同一作用機制下的殺菌劑，對於 *R. solani* 仍有不同的防治效果⁽⁴⁾。

目前國內登記福多寧、滅普寧、待克利等殺菌劑，用於防治 *R. solani* 引起之水稻、甜椒、甘藍、萵苣、菠菜等種作物紋枯病、立枯病、猝倒病等病害⁽²⁾。然而卻少有相關研究系統性地探討不同作用機制殺菌劑對立枯絲核菌菌株之感受性分佈情形，以及抗藥性之風險評估。因此，本研究擬探討蔬菜及花卉立枯絲核菌對 FRAC C 類與其混合劑等成品農藥之感受性分佈，並分析供試菌株對相同作用機制之感受性是否一致，以及評估其可能之相對抗藥性風險，以為將來防治立枯絲核菌引起植物病害時之重要參考基準。

材料與方法

一、供試菌株來源與接種源製備

供試立枯絲核菌菌株，係分別自甘藍 (cabbage)、萵苣 (iceberg lettuce, leafy lettuce)、菠菜 (spinach)、胡瓜 (cucumber)、番茄 (beef tomato)、芋 (taro)、甘藷 (sweet potato)、百合 (lily)、金花石蒜 (garden spider lily)、巴西野牡丹 (Asian

melastome)、日日春 (periwinkle)、金魚花 (goldfish grass) 與地毯草 (carpetgrass) 等蔬菜與花卉等 13 種植物之罹病根部及植株地基部分離與純化，經培養鑑定確認為 *Rhizoctonia solani*，共得 15 菌株 (表一)，所有菌株以含有滅菌後之 9 mL PDA (Potato dextrose agar, Difco Lab.) 斜面試管保存於 24°C 定溫箱⁽⁵⁾。

接種源則將前述保存菌株自 PDA 斜面移植到滅菌過之 10 mL PDA 培養皿 (petri dish, 9 cm, Greiner Bio-one International)，於 24°C 定溫箱中培養 2~3 天後，以消毒過之 0.4 cm 直徑打孔器，切取菌落邊緣之菌絲塊，做為藥劑試驗之接種源。

二、供試藥劑種類

為瞭解立枯絲核菌對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之感受性，供試藥劑種類係以 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑等成品農藥為試驗藥劑種類，包括 C2 群之白克利 (boscalid)、福多寧 (flutolanil)、滅普寧 (mepronil)、嘉保信 (oxycarboxin) 及賽氟滅 (thifluzamide)，C3 群之亞托敏 (azoxystrobin)、克收欣 (kresoxim-methyl)、百克敏 (pyraclostrobin)、三氟敏 (trifloxystrobin)，C4 群之安美速 (amisulbrom) 及賽座滅 (cyazofamid)，C5 群之扶吉胺 (fluazinam)，C 群混合劑之亞托環克座 (azoxystrobin + cyproconazole)、三氟得克利 (trifloxystrobin + tebuconazole)、達滅克敏

(pyraclostrobin + dimethomorph)、四氯福多寧(flutolanil + chlorothalonil)、四氯托敏(chlorothalonil + azoxystrobin)、白列克收欣(boscalid + kresoxim-methyl)、白列克敏(boscalid + pyraclostrobin), 以及 C 群混合劑另一成份 G1 群之環克座(cyproconazole) 與得克利(tebuconazole), 以及 M5 群之四氯異苯腈(chlorothalonil) 等共 22 種(表二)。

三、室內藥效檢定

立枯絲核菌係以菌絲及其形成之侵入墊(infection cushion) 進行侵染⁽¹⁰⁾,

故就其對藥劑感受性分析, 係採用藥劑平板法進行菌絲生長抑制試驗⁽⁵⁾, 藉此評估供試菌株對前述供試藥劑之感受性。

藥劑平板製備, 係將供試藥劑加入滅菌後維持在 55°C 之定量 PDA 液體中, 使 PDA 中所含之藥劑有效成份濃度分別為 10⁻³、10⁻²、10⁻¹、1、10¹、10² 及 10³ mg/L, 混合均勻後倒入 9 cm 培養皿中, 每皿約 20 mL 含藥劑 PDA 培養基, 置於無菌操作臺中冷卻, 第 2 天進行接種試驗。另以不加藥劑之 PDA 平板為對照組, 共 8 處理, 每處理(包括不同藥劑劑量處理組及對照組) 3 重複(皿)。

表一、立枯絲核菌供試菌株清單

Table 1. List of tested *Rhizoctonia solani* isolates used in this study

Isolate	Host common name, scientific name	Isolation tissue	City/ County	Township/ Dist.	Collection date
R12	Lily, <i>Lilium</i> spp.	Root	Taichung	Houli	02/25/2008
RS001	Iceberg lettuce, <i>Lactuca sativa</i>	Leaf base	Nantou	Puli	03/21/2008
RS002	Leafy lettuce, <i>Lactuca sativa</i>	Leaf base	Taoyuan	Zhongli	04/09/2008
RS004	Leafy lettuce, <i>Lactuca sativa</i>	Leaf base	Taoyuan	Daxi	04/09/2008
RS009	Beef tomato, <i>Solanum lycopersicum</i>	Stem	Nantou	Xinyi	03/29/2008
RS010	Garden spider lily, <i>Lycoris aurea</i>	Bulb	Changhua	Yuanlin	04/01/2008
RS011	Taro, <i>Colocasia esculenta</i>	Stem base	Taichung	Dajia	04/21/2008
RS012	Sweet potato, <i>Ipomoea batatas</i>	Stem base	Taichung	Shengang	09/09/2008
RS013	Asian melastome, <i>Melastoma candidum</i>	Stem base	New Taipei	Sanzhi	09/10/2008
RS014	Periwinkle, <i>Catharanthus roseus</i>	Root	Taichung	Wufeng	09/17/2008
RS015	Goldfish grass, <i>Antirrhinum majus</i>	Stem base	Yilan	Yuanshan	10/31/2008
RS016	Carpetgrass, <i>Axonopus affinis</i>	Root	Nantou	Caotun	12/02/2008
RS017	Cabbage, <i>Brassica oleracea</i>	Leaf base	Tainan	Madou	12/22/2008
RS018	Spinach, <i>Spinacia oleracea</i>	Leaf base	Yunlin	Xiluo	04/09/2009
RS019	Cucumber, <i>Cucumis sativus</i>	Stem base	Nantou	Zhushan	06/01/2009

表二、供試殺菌劑種類

Table 2. List of FRAC group C fungicides and mixtures analyzed in this study

MOA ¹⁾	Target site	Fungicide	a.i. ²⁾ content (%)	Formulation ³⁾	Commercial name in Chinese
C	C2	Boscalid	50	WG	威力旺
	C2	Flutolanil	50	WP	萬佳多
	C2	Mepronil	75	WP	百賜達克
	C2	Oxycarboxin	20	EC	瑞加福
	C2	Thifluzamide	21	SC	雄勇
	C3	Azoxystrobin	23	SC	稱無限
	C3	Kresoxim-methyl	50	WG	好運到
	C3	Pyraclostrobin	23.6	SL	總司令
	C3	Trifloxystrobin	50	WG	福臨
	C4	Amisulbrom	17.7	SC	網春豐
	C4	Cyazofamid	9.4	SC	蘭蔓
	C5	Fluazinam	39.5	SC	福農帥
	C + G	C3 + G1	Azoxystrobin + Cyproconazole	28	SC
C3 + G1		Trifloxystrobin + Tebuconazole	27.3	SC	乎粒勇
C + H	C3 + H5	Pyraclostrobin + Dimethomorph	18.7	WG	總發
C + M	C2 + M5	Flutolanil + Chlorothalonil	48.9	SC	勁豪
	C3 + M5	Chlorothalonil + Azoxystrobin	56	SC	剋歐
C + C	C2 + C3	Boscalid + Kresoxim-methyl	27.3	SC	金旺
	C2 + C3	Boscalid + Pyraclostrobin	38	WG	祥威豐
G	G1	Cyproconazole	8.8	SL	天王
	G1	Tebuconazole	25.9	EW	獲達多
M	M5	Chlorothalonil	75	WP	達克靈

¹⁾ MOA, mode of action according to the Fungicide Resistance Action Committee

²⁾ a.i., active ingredient

³⁾ Formulation, EC, emulsifiable concentrate; EW, oil-in-water emulsion; SC, suspension concentrate; SL, soluble concentrate; WG, water dispersible granules; WP, wettable powder

菌絲接種，係將前述 0.4 cm 直徑之接種源菌絲塊，移植到前述藥劑平板上，以石蠟膜封好培養皿後，移入 24°C 定溫箱，每天測試菌落直徑。當處理組菌落長滿時，即中止記錄，以試驗終止日前一天之菌落直徑，作為該處理之感受性分析之初始數據。不同濃度處理組之菌絲生長抑制率 (%)，係以 [(C-0.4)-(T-0.4)]/(C-0.4)

$\times 100\%$ 方式進行運算，其中 C 為對照組菌落直徑，T 為該濃度處理組菌落直徑。

處理所得之菌絲生長抑制率，其試驗之藥劑濃度經 \log_{10} 轉換後，菌絲抑制率為線形時，以簡單線性迴歸法進行統計⁽⁹⁾，當決定係數 R^2 (coefficient of determination) 大於 0.8 時，依該迴歸方程式計算半數抑制濃度 (Effective concentration for 50% inhibition, EC_{50})、最低抑制濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 及無效抑制濃度 (No effective concentration, NEC) 等重要統計值⁽⁸⁾，其中 EC_{50} 及 MIC 值，為立枯絲核菌對該藥劑之感受性指標 (Sensitivity index)。

四、立枯絲核菌菌株對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之感受性分佈情形

上述迴歸分析所得之 EC_{50} 及 MIC 值以表單呈現，藉此了解立枯絲核菌對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之感受性分佈情形。

五、立枯絲核菌菌株對不同作用機制、標的部位及供試藥劑種類之感受性集群分析

將生物檢定所得之 EC_{50} 及 MIC 值，以作用機制 (mode of action, MOA)、標的部位 (Target site, TS) 進行分群後，計算

各別菌株在相同 MOA、TS 分群下之均值 (mean) 與中位數 (median)，做為集群分析 (cluster analysis)⁽¹³⁾ 之參數，集群分析係以階層式分群法 (hierarchical clustering) 之華德最小變異法 (Ward's Minimum Variance Method) 進行分析⁽¹⁵⁾，其感受性分群結果以樹狀圖 (dendrogram) 方式呈現，探討各供試菌株之藥劑感受性，是否對 MOA 與 TS 之間存在群集現象，此一結果有利於後續在田間管理之做為選擇防治藥劑種類之參考依據。

六、立枯絲核菌菌株對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之相對抗藥性風險評估

為了解立枯絲核菌是否對供試藥劑產生抗藥性風險，以立枯絲核菌對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之 MIC 值，和該藥劑現行登記之最高劑量進行比對，當試驗所得之 MIC 值大於該藥劑之登記劑量時，該菌株計為對該藥劑具抗藥性風險 (H, High risk for resistance)，否則納入不具抗藥性風險 (L, Low risk for resistance)，以 $H/(H+L)$ 比值，做為供試藥劑對立枯絲核菌之相對抗藥性風險值 (relative risk for resistance)，並以 MOA、TS、供試藥劑等因子進行列聯表分析 (contingency analysis)⁽¹⁴⁾，探討前述因子與立枯絲核菌供試菌株抗藥性之關聯性，以為未來田間害物管理之藥劑選擇依據。

七、統計分析

前述試驗之盒鬚圖、集群分析與關聯分析等統計分析，係以 SAS JMP® (SAS Institute Inc., v. 13.2, 2016) 軟體進行。

結果

一、立枯絲核菌菌株對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之感受性分佈情形

以供試殺菌劑之標的部位 (Target site, TS) 分類方式檢視 C2、C3、C4 及 C5 類殺菌劑試驗結果，C2 類殺菌劑中，以 EC_{50} 而言，供試菌株對賽氟滅最敏感，其次為福多寧；以 MIC 而言，供試菌株對福多寧最敏感，其次為賽氟滅。C3 類殺菌劑中，供試菌株對百克敏最敏感。C4 類殺菌劑裡，供試菌株對 C4 類殺菌劑無感受性，其 EC_{50} 及 MIC 值均大於 1,000 mg/L，無防治效果。供試菌株對 C5 類殺菌劑扶吉胺之 EC_{50} 為 0.37 ± 0.55 mg/L，但 MIC 值則大於 1,000 mg/L (表三)。

在供試菌株對 FRAC C 類混合劑之試驗結果中，以 EC_{50} 而言，供試菌株對亞托環克座及三氟得克利最敏感，其 EC_{50} 值分別為 0.07 及 0.08 mg/L，亞托環克座由亞托敏及環克座組成，其 EC_{50} 值分別為大於 1,000 mg/L 及 0.11 mg/L，三氟得克利由三氟敏及得克利組成，其 EC_{50} 值分別為 22.26 及 0.05 mg/L，由此可知這 2 個混合

劑之主要抑制作用，均來自 G1 類之環克座及得克利；以 MIC 而言，供試菌株對亞托環克座及四氯福多寧最敏感，其 MIC 值分別為 30.86 及 47.74 mg/L，亞托環克座由亞托敏及環克座組成，其 MIC 值分別為大於 1,000 mg/L 及 30.86 mg/L，四氯福多寧由四氯異苯腈及福多寧組成，其 MIC 值分別為大於 1,000 mg/L 及 4.57 mg/L，可知前 2 種混合劑之主要抑制作用，分別來自環克座及福多寧如表三。

綜合前述試驗結果，其結果顯示供試菌株對 C5 及 C2 群最敏感，其 EC_{50} 值分別為 0.37 ± 0.55 及 3.62 ± 6.42 mg/L。FRAC C 類混合劑試驗結果顯示，供試菌株對 FRAC C3 + G1 及 FRAC C2 + C3 混合劑最敏感，其 EC_{50} 值分別為 0.08 ± 0.05 及 0.27 ± 0.27 mg/L，其者抑制效果來自 FRAC G1 類殺菌劑，後者來自 FRAC C2 類殺菌劑，以 MIC 值而言，供試菌株對 FRAC C2 + M5 及 FRAC C3 + G1 混合劑最敏感，MIC 值分別為 47.74 ± 63.28 及 54.78 ± 71.42 mg/L 如表三。

二、立枯絲核菌菌株對作用機制、標的部位及供試藥劑種類之感受性集群分析

探討不同立枯絲核菌菌株對不同作用機制 (MOA) 的群聚現象，以 EC_{50} 與 MIC 之平均值與中位數 (median) 進行集群分析 (cluster analysis)，其結果呈現 2 種樣態：(1) 對 FRAC C 及 FRAC M 單獨成

群，如 RS001 (高苳，南投埔里)、RS002 (高苳，桃園中壢) 及 RS018 (菠菜，雲林西螺) 等 3 菌株。(2) 對 FRAC C 群單獨 成群，如其餘 12 菌株。兩者分析結果顯示，所有供試立枯絲核菌菌株對 C 類感受性較為集中。

表三、立枯絲核菌對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之感受性分布

Table 3. Sensitivity distribution of *Rhizoctonia solani* to FRAC group C fungicides and mixtures

Target site code	Fungicide	EC ₅₀ (mg/L) ¹⁾				MIC (mg/L) ²⁾			
		Median	Mean	SD ³⁾	Range	Median	Mean	SD	Range
C2	Boscalid	5.43	6.72	5.97	0.21 - 21.26	> 1,000	> 1,000	> 1,000	168.36 - > 1,000
	Flutolanil	0.22	0.22	0.11	0.05 - 0.44	3.64	4.57	1.98	2.42 - 8.09
	Mepronil	0.63	0.83	0.54	0.28 - 2.29	144.5	255.2	334.9	8.25 - > 1,000
	Oxycarboxin	9.83	10.55	9.53	1.64 - 38.64	661.6	679.2	275.0	354.10 - > 1,000
	Thifluzamide	0.14	0.13	0.09	0.00 - 0.31	134.0	158.6	95.92	63.97 - 320.11
C3	Azoxystrobin	144.3	> 1,000	> 1,000	0.07 - > 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
	Kresoxim-methyl	555.7	> 1,000	> 1,000	4.49 - > 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
	Pyraclostrobin	0.08	0.18	0.19	0.01 - 0.67	186.5	274.9	309.8	0.14 - 929.84
	Trifloxystrobin	8.38	22.26	25.58	0.64 - 74.64	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
C4	Amisulbrom	236.3	> 1,000	> 1,000	54.21 - > 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
	Cyazofamid	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	1.9x10 ⁵ - > 1,000
C5	Fluazinam	0.19	0.37	0.55	0.03 - 2.06	488.5	> 1,000	> 1,000	24.59 - > 1,000
C3 + G1	Azoxystrobin + Cyproconazole	0.06	0.07	0.03	0.01 - 0.14	21.49	30.86	34.46	2.57 - 121.9
	Trifloxystrobin + Tebuconazole	0.06	0.08	0.07	0.01 - 0.21	49.82	78.71	90.29	18.92 - 379.97
C3 + H5	Pyraclostrobin + Dimethomorph	0.6	1.21	1.43	0.09 - 5.21	567.0	> 1,000	> 1,000	143.69 - > 1,000
C2 + M5	Flutolanil + Chlorothalonil	0.31	0.37	0.22	0.14 - 1.07	28.77	47.74	63.28	7.78 - 223.93
C3 + M5	Chlorothalonil + Azoxystrobin	0.18	0.27	0.21	0.08 - 0.78	25.14	98.22	130.9	4.91 - 428.08
C2 + C3	Boscalid + Kresoxim-methyl	0.22	0.35	0.31	0.04 - 1.2	36.32	152.1	337.0	81.54 - > 1,000
	Boscalid + Pyraclostrobin	0.1	0.19	0.2	0.02 - 0.64	7.47	447.9	> 1,000	0.57 - > 1,000
	Cyproconazole	0.1	0.11	0.07	0.02 - 0.27	28.85	40.29	32.67	3.22 - 122.3
G1	Tebuconazole	0.02	0.05	0.07	0.00 - 0.21	19.46	20.28	9	7.09 - 46.31
	Chlorothalonil	1.34	7.05	18.64	0.24 - 74.06	> 1,000	> 1,000	> 1,000	154.41 - > 1,000

¹⁾ EC₅₀, effective concentration for 50% inhibition of the active ingredient in each tested fungicide

²⁾ MIC, minimum inhibitory concentration of the active ingredient in each tested fungicide

³⁾ SD, standard deviation of the mean

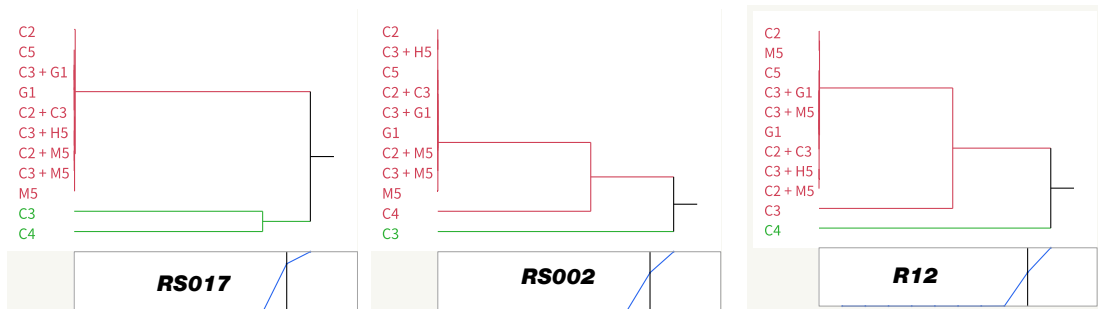
進一步探討不同立枯絲核菌菌株對不同標的部位 (TS) 的群聚現象，分析結果呈現 3 種樣態：(1) 對 FRAC C3 及 FRAC C4 群感受性單獨成群，如 RS017 (甘藍，臺南麻豆)。(2) 對 FRAC C3 感受性單獨成群，如 RS002、RS013、RS014 等 3 菌株。(3) 對 FRAC C4 殺菌劑感受性單獨成群，如 R12、RS001 等其餘 11 個供試菌株 (圖一)。

探討不同立枯絲核菌菌株對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑的群聚現象，分析結果呈現 6 種樣態，其中：(1) RS002 及 RS013 等 2 菌株對亞托敏單獨形成一群。(2) RS001、RS004、RS010、RS011 及 RS016 等 5 菌株對賽座滅單獨形成一群。(3) RS012、RS015 及 RS019 等 3 菌株對克收欣及賽座滅單獨形成一群。(4) R12、RS009 及 RS018 等 3 菌株對亞托敏及賽座滅單獨成群。(5) RS014 對亞托敏及克收欣單獨成群。(6) RS017 對亞托敏、克收

欣及賽座滅單獨成群 (圖二)。

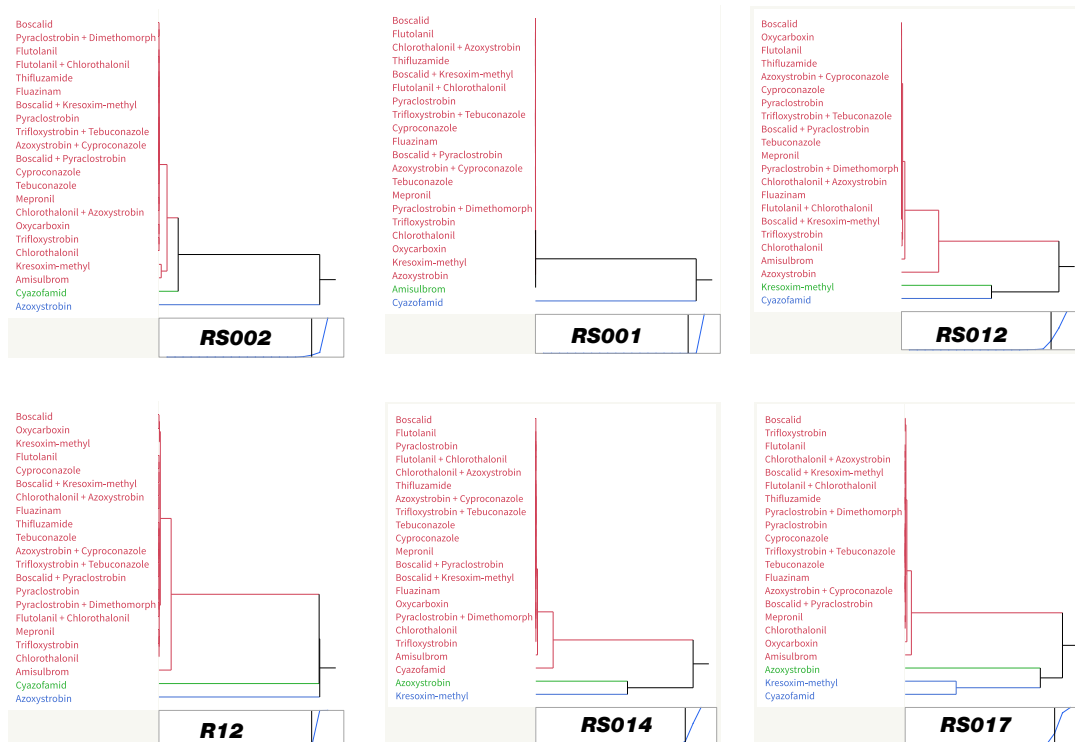
三、立枯絲核菌菌株對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之相對抗藥性風險評估

經比對現行登記劑量，供試菌株對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之相對抗藥性風險值 (表四)，以 MOA、TS 和供試藥劑等因子進行列聯表分析，MOA 分析結果顯示，C + M 群之抗藥性風險最低，登記之最高劑量可完全抑制立枯絲核菌菌絲生長，其次為 C + G 及 C + C，分別有 10.0% 及 13.3% 抗藥性風險，而 C 群則有 60.34% 抗藥性風險 (圖三 A)，其概度比檢定 (概似比檢定, Likelihood ratio test) 及皮爾森卡方檢定 (Pearson's chi-square test) 之 χ^2 統計值分別為 88.605 及 73.994 ($P < 0.001$, $N = 329$)。



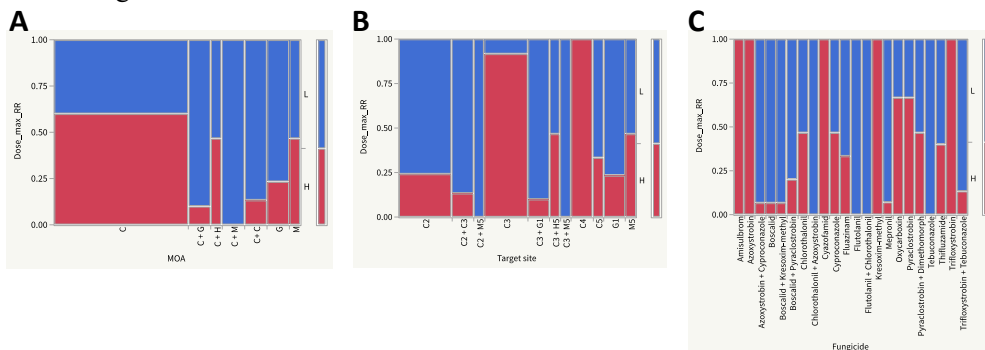
圖一、以 EC_{50} 與 MIC 之平均值與半數值進行集群分析，立枯絲核菌對不同標的部位之 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑呈現 3 種群集現象。

Fig. 1. The mean and median values of EC_{50} and MIC were used for cluster analysis. *Rhizoctonia solani* isolates showed three types of clustering phenomena to FRAC group C fungicides and mixtures with different target sites.



圖二、以 EC₅₀ 與 MIC 之平均值與半數值進行集群分析，立枯絲核菌對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑呈現 6 種群集現象。

Fig. 2. The mean and median values of EC₅₀ and MIC were used for cluster analysis. *Rhizoctonia solani* isolates showed six types of clustering phenomena to FRAC group C fungicides and mixtures.



圖三、應用關聯性分析法，探討立枯絲核菌對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之不同作用機制 (A)、標的部位 (B) 與殺菌劑種類 (C) 的相對抗藥性風險。

Fig. 3. Contingency analysis was applied to assess the relative risk of *Rhizoctonia solani* developing resistance to different modes of action (MOA) (A), target sites (B), and FRAC group C fungicides and mixtures (C).

表四、立枯絲核菌對 FRAC C 類殺菌劑與其混合劑之相對抗藥性風險分析表

Table 4. Relative risk of *Rhizoctonia solani* isolates developing resistance to FRAC group C fungicides and mixtures

MOA	Target site	Fungicides	H ¹⁾	L ²⁾	Total
C	C2	Boscalid	1	14	15
			6.67	93.33	
	C2	Flutolanil	0	15	15
			0.00	100.00	
	C2	Mepronil	1	13	14
			7.14	92.86	
	C2	Oxycarboxin	10	5	15
			66.67	33.33	
	C2	Thifluzamide	6	9	15
			40.00	60.00	
	C3	Azoxystrobin	15	0	15
			100.00	0.00	
	C3	Kresoxim-methyl	15	0	15
			100.00	0.00	
	C3	Pyraclostrobin	10	5	15
66.67			33.33		
C3	Trifloxystrobin	15	0	15	
		100.00	0.00		
C4	Amisulbrom	15	0	15	
		100.00	0.00		
C4	Cyazofamid	15	0	15	
		100.00	0.00		
C5	Fluazinam	5	10	15	
		33.33	66.67		
C + G	C3 + G1	Azoxystrobin + Cyproconazole	1	14	15
			6.67	93.33	
C3 + G1	Trifloxystrobin + Tebuconazole	2	13	15	
		13.33	86.67		
C + H	C3 + H5	Pyraclostrobin + Dimethomorph	7	8	15
			46.67	53.33	
C + M	C2 + M5	Flutolanil + Chlorothalonil	0	15	15
			0.00	100.00	
C3 + M5	Chlorothalonil + Azoxystrobin	0	15	15	
		0.00	100.00		
C + C	C2 + C3	Boscalid + Kresoxim-methyl	1	14	15
			6.67	93.33	
C2 + C3	Boscalid + Pyraclostrobin	3	12	15	
		20.00	80.00		
G	G1	Cyproconazole	7	8	15
			46.67	53.33	
G1	Tebuconazole	0	15	15	
		0.00	100.00		
M	M5	Chlorothalonil	7	8	15
			46.67	53.33	
Total			136	193	329

¹⁾ H, The relative risk of resistance to a fungicide is considered high if the MIC value is larger than the registered field dose

²⁾ L, The relative risk of resistance to a fungicide is considered low if the MIC value is larger than the registered field dose

若以 TS 進行分析，其結果顯示 C2 + M5 及 C3 + M5 群的抗藥性風險最低，其登記之最高劑量可完全抑制立枯絲核菌菌絲生長，其次為 C3 + G1 及 C2 + C3，分別有 10.0% 及 13.3% 抗藥性風險，而 C4 及 C3 群則分別有 100% 及 91.67% 抗藥性風險 (圖三 B)，其概度比檢定及皮爾森卡方檢定之 χ^2 統計值分別為 193.424 及 161.829， P 值均小於 0.001 ($P < 0.001$, $N = 329$)。

若以供試藥劑進行分析，其結果顯示福多寧、四氫福多寧、四氫托敏及得克利的抗藥性風險最低，其登記之最高劑量可完全抑制立枯絲核菌菌絲生長，其次為亞托環克座、白克列及白列克收欣，均有 6.67% 抗藥性風險，而安美速、亞托敏、賽座滅、克收欣及三氟敏則均為 100% 相對抗藥性風險 (圖三 C)，其概度比檢定及皮爾森卡方檢定之 χ^2 統計值分別為 250.465 及 194.309 ($P < 0.001$, $N = 329$)。

討論

因立枯絲核菌為土壤傳播病原真菌，藉由土壤、介質或幼苗罹病根系感染為害，很難有大面積為害現象，關於土壤傳播病害的防治方面上，首重土壤中病原菌防治與健康種苗作業，當植株產生地基部腐爛倒伏，或感染根系造成植株枯萎現象時，應採取隔離措施，先移除包括根系在內的罹病植株，並以藥劑施用於罹病植株鄰近的植株地基部，限制病害擴散，即可

達到防治與管理目的。

前述藥劑施用之防治效益，涉及藥劑特性、施用部位與施藥技術等因素，就試驗結果呈現 FRAC C 類殺菌劑中，供試 C2 與 C5 類殺菌劑的菌絲抑制效果最佳，C3 類殺菌劑中，僅百克敏的抑制效果最佳，C4 類對立枯絲核菌無抑制作用，由此可見，在 FRAC C 類之同一作用機制中，不同標的部位殺菌劑間，對立枯絲核菌之菌絲抑制效果不同，無交叉抗藥性情形如圖一、二。由於病原真菌對殺菌劑的感受性隨施藥種類變化與施藥壓力而有所差異，比對白克列、滅普寧在不同國家的 EC_{50} 值，呈現當地在作物管理力道與登記上的差異性，如中國水稻紋枯病菌之 EC_{50} 分別為 0.094 及 2.04 mg/L⁽¹⁶⁾，而國內在蔬菜及花卉來源之立枯絲核菌部份，其 EC_{50} 分別為 6.72 及 0.83 mg/L 如表三，另以國內分離之水稻紋枯病菌 EC_{50} 分別為 1.98 及 0.03 mg/L (未發表資料) 比對，也同樣呈現用藥種類與管理所造成之感受性差異情形。此一現象在得克利也得到類似情形，印度水稻紋枯病菌⁽⁴⁾、國內水稻紋枯病菌 (未發表資料) 及國內蔬菜花卉來源之立枯絲核菌對得克利之 EC_{50} 分別為 0.304、0.05 及 0.05 mg/L 如表三。

由於單一作用機制殺菌劑施用過久，容易提高抗藥性族群發生機率，所以，在使用藥劑上，均建議輪用不同作用機制殺菌劑種類進行病害管理，本試驗進行 C 類混合劑試驗結果，與單劑結果進行比較，當 C3 混合 G1 時，其藥效主要來自 G1

類，而 C3 混合 C2 時，其藥效主要來自 C2，此一情形顯示 G1 及 C2 類殺菌劑在防治立枯絲核菌方面，具有良好的抑制效果如表三，後續可持續探討同群 G 類殺菌劑是否對立枯絲核菌之抑制，均具相同效果。

本研究首次利用集群分析，探討供試菌株對 MOA 及 TS 是否呈現群集現象，在 MOA 部份，主要對 C 類殺菌劑具群集現象，向內持續探討 TS 因素時，則呈現 3 種樣態，大都對 C4 類殺菌劑產生偏離情形，這與賽座滅、安美速等 C4 類殺菌劑用於防治疫病菌及露菌之效果佳，對紋枯病菌之防治效果不佳，故其登記範圍常侷限在卵菌綱引起之病害，非紋枯病菌引起之病害，而對含有 C2、G1 與相關混合劑部份，呈現群集現象如圖一，另以殺菌劑進行剖析，發現 6 種樣態，其結果呈現亞托敏、賽座滅與克收欣對立枯絲核菌之抑制效果不佳如圖二。由本研究之 MOA、TS 及殺菌劑種類集群分析結果，說明 FRAC C 群之相同作用機制殺菌劑種類，未必呈現群內交叉抗藥性情形，應就標的部位進行研究較為妥適，這對於防治立枯絲核菌所造成的病害部份，極具應用意義。

另，本研究首次利用列聯表分析模式，探討室內生物檢定結果與國內登記劑量之相對風險，藉此了解目前登記劑量在防治上是否仍具經濟效益，由本研究結果指出，在 FRAC C 類殺菌劑中，C3 與 C4 群呈現相對抗藥性風險高，超過 90%，而 C2 群之相對抗藥性風險值為 25%，當 C3

群殺菌劑應於防治紋枯病菌引起之蔬菜或花卉病害時，應加強抗藥性管理，可與 C2 群或前述混合劑進行輪替使用，可提升田間病害管理效益，以及延緩田間抗藥性組群發生與蔓延機會。

結論

土傳性病害管理策略，因傳播途徑與傳播速率等特性，此類病害之病勢進展具侷限性，故在管理策略上，首重種植前的土壤中病原菌防治，以及種苗健康程度，配合輪作作物種類、此等作物上登記藥劑種類，以及室內生物檢定結果，可擬定作物之用藥管理策略，達到最佳病害管理目標。故基於土傳性病害不易快速擴散特性，本研究成果可據此應用於田間，配合作物整合管理，強化防治效果。

謝辭

本文承蒙農委會 105 農科-10.5.2-藥-P1 等經費補助，並得本研究室江淑幸、鄒雪玲小姐協助菌株蒐集、保存與試驗，得以完成此一研究成果，特此致謝。

引用文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。2021。登記農藥查詢。檢自農藥資訊服務網 <https://pesticide.baphiq.gov.tw/information/Query/Pesticide> (Oct. 26, 2021)

2. 曾顯雄。2019。台灣植物病害名彙。第五版。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局、行政院農業委員會農業試驗所、中華民國植物病理學會。320 頁。
3. Arabiat, S., and Khan, M. F. R. 2016. Sensitivity of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 from sugar beet to fungicides. *Plant Dis.* 100: 2427-2433.
4. Datta, S., Dey, P., Sarkar, A., Tarafdar, J., and Chowdhury, A. 2016. Comparison among four triazole fungicides on growth and development of sheath blight of rice pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn AG1-1A. *Archives Phytopathol. Plant Protect.* 49: 1-13.
5. Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1995. *Basic plant pathology methods*. 2nd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton. 448 pp.
6. Fungicide Resistance Action Committee. 2019. Pathogen risk list. Retrieved from <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf> (Oct. 25, 2021)
7. Fungicide Resistance Action Committee. 2020. List of first confirmed cases of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. Retrieved from https://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-first-confirmed-cases-of-plant-pathogenic-organisms-resistant-to-disease-control-agents_05_2020.pdf?sfvrsn=7073499a_2 (Oct. 25, 2021)
8. Griffin, D. H. 1994. *Fungal physiology*. 2nd ed. Wiley-Liss Inc. Press. New York. 458 pp.
9. Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J., and Li, W. 2019. *Applied linear statistical methods*. 5th ed. McGraw-Hill/Irwin. New York. 1396 pp.
10. Marshall, D. S., and Rush, M. C. 1980. Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 947-950.
11. Mu, W., Wang, Z., Bi, Y., Ni, X., Hou, Y., Zhang, S., and Liu, X. 2017. Sensitivity determination and resistance risk assessment of *Rhizoctonia solani* to SDHI fungicide thifluzamide. *Ann. Appl. Biol.* 170: 240-250.
12. Parmeter, J. R. 1970. *Rhizoctonia solani*, biology and pathology. Berkeley, Los Angeles and London, University of California Press. 255 pp.
13. Romesburg, C. H. 2004. *Cluster analysis for researchers*. Lulu Press. North Carolina. 334 pp.
14. Skinner, B. F. 2013. *Contingencies of reinforcement. A theoretical analysis*. B. F. Skinner Foundation. USA. 311 pp.
15. Ward, Jr., J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58: 236-244.
16. Zhang, C. Q., Liu, Y. H., Ma, X. Y., Feng,

- Z., and Ma, Z. H. 2009. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. *Crop Prot.* 28: 381-386.
17. Zhang, Y., Lu, J. L., Wang, J. X., Zhou, M. G., and Chen, C. J. 2015. Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Rhizoctonia cerealis* to thifluzamide, a succinate dehydrogenase inhibitor. *Pestic. Biochem. Physiol.* 124: 97-102.

Sensitivity Distribution of *Rhizoctonia solani*, Isolated from Vegetables and Ornamentals, to FRAC Group C Fungicides and Mixtures

Meen-Lang Lee^{1*}

Abstract

Lee, M. L. 2022. Sensitivity Distribution of *Rhizoctonia solani*, Isolated from Vegetables and Ornamentals, to FRAC Group C Fungicides and Mixtures. Taiwan Pestic. Sci. 13: 1-17.

This study investigated the sensitivity distribution of 15 *Rhizoctonia solani* isolates to 22 FRAC group C fungicides and mixtures. Isolates collected from 13 vegetable and ornamental species in central Taiwan and were found to be very sensitive to thifluzamide (FRAC group C, Subgroup C2), flutolanil (C2), pyraclostrobin (C3) and fluazinam (C5), with EC₅₀ values of 0.13±0.09, 0.22±0.11, 0.18±0.19, and 0.37±0.55 mg/L, respectively. Isolates were not sensitive to subgroup C4 fungicides (EC₅₀ values greater than 1,000 mg/L). Among group C mixtures, azoxystrobin + cyproconazole and trifloxystrobin + tebuconazole showed superior inhibitory effects, with EC₅₀ values of 0.07±0.03 and 0.08±0.07 mg/L, respectively. The inhibitory effects of these mixtures were primarily conferred from the FRAC group G, subgroup G1 fungicides, cyproconazole and tebuconazole. In addition, we analyzed the cross-resistance of fungicides as well as the relative risk of *R. solani* isolates developing resistance to fungicides. Specially, we performed a cluster analysis to determine the cross-resistance of *R. solani* to fungicides that target the same sites. Results revealed that there is no cross-resistance between different targeted sites among FRAC group C fungicides. Finally, we performed a contingency analysis to assess the relative risk of *R. solani* developing resistance to currently-registered fungicides. We found that the C2+M5

Accepted: September 7, 2022.

* Corresponding author, E-mail: mlee@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agricultural, Taichung

mixture posed the lowest risk of fungicide resistance, followed by C3+G1 and C2+C3 mixtures, which had resistance risk values of 10.0% and 13.3%, respectively. For the single active ingredient considered in the study, a likelihood ratio test and the Pearson's chi-squared test respectively yielded χ^2 values of 193.424 and 161.829, and *P* values less than 0.001 (N=329). In summary, flutolanil, flutolanil + chlorothalonil, chlorothalonil + azoxystrobin and tebuconazole showed the lowest risk of resistance, followed by azoxystrobin + cyproconazole, boscalid and boscalid + kresoxim-methyl, which had a 6.67% risk of resistance. In contrast, amisulbrom, cyazofamid, azoxystrobin, kresoxim-methyl and trifloxystrobin all had 100% risk of resistance. This is the first study to (1) apply cluster analysis in determining the cross-resistance of *R. solani* and (2) apply a contingency analysis in assessing the relative risk fungicide resistance in *R. solani*.

Key words: *Rhizoctonia solani*, respiration inhibitor, sensitivity, cluster analysis, cross-resistance, contingency analysis, relative risk