

# 草莓灰黴病菌對殺菌劑百克敏、貝芬替、白克列及邁克尼 抗藥性之分子檢測

陳冠穎<sup>1</sup>、段中漢<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 農業部農業藥物試驗所農藥應用組，臺灣臺中市。

\* 聯絡作者，E-mail: chduan1@hotmail.com

## 摘要

陳冠穎、段中漢。2023。草莓灰黴病菌對殺菌劑百克敏、貝芬替、白克列及邁克尼抗藥性之分子檢測。植物醫學65(4): 139-148。

*Botrytis cinerea*引起的灰黴病是台灣許多作物的重要病害，為防治灰黴病需頻繁且大量施用化學藥劑，常造成嚴重的抗藥性問題。為評估灰黴病菌抗藥性分子檢測的可行性，乃以2018~2019年採自全台各草莓產區的36株灰黴病菌單胞菌株，用菌絲半抑制有效濃度 (effect concentration for 50% inhibition, EC<sub>50</sub>) 評估其對百克敏、貝芬替、白克列及邁克尼等4種不同作用機制殺菌劑的感受性，並以聚合酶連鎖反應及基因定序技術分析各菌株對上述4種藥劑抗藥相關基因特定密碼子的變異。結果顯示，抗百克敏、貝芬替、白克列及邁克尼菌株分別具以下4類基因點突變：G143A (*cytB*)、E198A/V (*β-tubulin*)、N230I及H272R/Y (*sdhB*) 及Y136F (*CYP51*)，且例外極少，證實灰黴病菌抗藥性分子檢測具可行性。此外，供試36株菌中抗百克敏、貝芬替、白克列及邁克尼者分別有31、32、25及1株；同時抗百克敏及貝芬替者有31株，同時抗百克敏、貝芬替及白克列者有25株，這警示灰黴病菌多重抗藥性問題很嚴重。

關鍵詞：灰黴病菌、抗藥性、半抑制有效濃度、分子檢測

## 前言

*Botrytis cinerea* Persoon引起的灰黴病是臺灣地區常見的作物病害，本菌在台灣已記錄107種寄主作物，遍及果樹、蔬菜、雜糧、特用作物、林木、花卉及觀賞植物等，但以感染草莓果實最受矚目<sup>(1)</sup>。灰黴病菌常在作物感染部位造成壞疽，是典型的壞死性真菌 (necrotrophic fungus)。在冷涼潮濕的氣候下，本菌大量分生孢子 (conidia) 藉由風和雨水傳播而迅速蔓延，是國內外許多作物的重大威脅。灰黴病菌曾被國際植病學

者票選為十大病原真菌第二名，僅次於稻熱病菌，就是看中其在經濟與學術層面的重要性<sup>(11)</sup>。由於灰黴病菌寄主植物種類多且為害嚴重，需仰賴大量殺菌劑進行防治，這類藥劑統稱為botryticides，總量約佔全球10%殺菌劑市場<sup>(38)</sup>，殺菌劑頻繁且大量使用易衍生抗藥性問題<sup>(28)</sup>。事實上，殺菌劑抗藥性是全球性的問題，根據殺菌劑抗藥性行動委員會 (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC) 資料，75%以上作用機制 (mode of action) 的殺菌劑已有抗藥性問題<sup>(20)</sup>，此構成植物病害防治的嚴峻挑戰，而殺菌劑作用標的部位 (target site) 發生變異是病原菌發生抗藥性的機制之一<sup>(46)</sup>。

抗藥性管理首重發生前的偵測 (detection) 與發生後的監測 (monitoring)，期能掌握病原菌抗藥性的動態變化，適時提供有效防治藥劑，避免抗藥性問題更趨惡化。在病原真菌抗藥性的偵測與監測上，最常使用的方法就是半抑制有效濃度 (effect concentration for 50% inhibition, EC<sub>50</sub>)<sup>(2)</sup>，除可用以建立病原菌對藥劑的感受性基準線 (baseline sensitivity)，作為後續抗藥性發展的比較基準<sup>(31)</sup>，也能用以即時監測病原菌抗藥性的現況。本方法的優點是可提供具體數據，供植物保護人員了解病原菌對藥劑產生抗性的真實程度，並將這些數據與在不同時空背景監測的結果進行比較。此法雖操作容易，但耗時費力，做法各異且易生人為誤差。

病原菌抗藥性是一種遺傳現象，涉及基因層次的改變，基因序列改變會決定其所編碼的胺基酸種類，進而導致蛋白質或酵素結構的改變。殺菌劑依其作用機制均有其特定的作用標的，這些標的常為病原菌的結構蛋白質或酵素<sup>(20)</sup>。這些結構蛋白的特定部位 (specific site) 或酵素的活性部位 (active site) 常是由少數幾個胺基酸 (amino acid) 所構成，卻是該蛋白或酵素表現活性的關鍵位點。殺菌劑藉由結合這些關鍵位點以抑制其功能而達到殺菌目的<sup>(49)</sup>，但當這些關鍵位點的胺基酸發生改變，將使殺菌劑不能與之結合因而導致藥劑無效，呈現抗藥現象。抗藥性的分子檢測 (molecular detection) 就是針對編碼這些關鍵位點胺基酸的密碼子 (codon) 進行比對以得知是否發生突變，

其應用即屬分子檢測法。分子檢測法的優點在於去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 是穩定的生物分子，相關抗藥基因及密碼子種類明確<sup>(20)</sup>，且聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 及基因定序 (DNA sequencing) 已成常規操作技術，然欲有效執行本方法必須具備相關分子生物學知識、技術及設備。

百克敏 (pyraclostrobin) 是對苯醌外部抑制劑 (quinone outside inhibitor, QoI)，其殺菌機制是藉其結合在灰黴病菌細胞色素 *bcl* 酵素複合物 (cytochrome *bcl* enzyme complex) 的 Qo 位點，阻擋電子在 cytochrome *b* 與 cytochrome *c1* 間傳遞，以抑制粒腺體呼吸作用，阻斷能量生成<sup>(4)</sup>。對苯醌外部抑制劑的抗藥菌株常見其編碼膜蛋白 cytochrome *b* 的 *cytb* 基因發生點突變，頻率最高者為該基因第 143 (G143A) 密碼子，此與高抗藥性相關<sup>(35, 45)</sup>；其次為第 129 (F129L) 密碼子，但頻率較低，再次為第 137 (G137R) 密碼子，頻率更低，且後兩者僅與中等抗藥性有關<sup>(19, 21)</sup>。貝芬替 (carbendazim) 屬苯并咪唑類 (benzimidazole) 藥劑，其殺菌機制是藉結合微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin)，阻斷染色體分離與移動以抑制細胞分裂<sup>(9)</sup>。灰黴病菌對貝芬替的抗藥性與微管蛋白基因的點突變有關，這包括第 198 (E198K/V/A) 密碼子為主及第 200 (F200Y) 為次的密碼子突變<sup>(13, 25, 48)</sup>。白克列 (boscalid) 屬苯甲醯胺 (carboxamides) 藥劑，藉抑制灰黴病菌琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 以達殺菌目的，此酵素在細胞能量循環中扮演重要角色<sup>(34)</sup>。在琥珀酸脫氫酶基因 (*sdhB*) 序列的第 272 (H272R/Y) 密碼子為抗藥主要突變點，此外，第 225 (P225L/F/T) 及 230 (N230I) 密碼子突變亦與對白克列的抗藥性有關，但此類突變菌株在田間罕見<sup>(10, 30, 37, 44)</sup>。邁克尼 (myclobutanil) 屬固醇去甲基抑制劑 (sterol demethylation inhibitor, DMI)，藉抑制灰黴病菌甾醇-14-去甲基酶 (sterol 14  $\alpha$ -demethylase)，阻斷固醇合成，此酵素是由 *CYP51* 基因所編碼<sup>(36)</sup>。*CYP51* 基因的多個點突變導致其與固醇去甲基抑制劑結合能力降低，是抗藥機制之一，這至少包括第 136 (Y136F)、147 (K147Q) 及 347 (P347S) 等 3 個密碼子的突變<sup>(5, 24, 29, 43)</sup>。

在臺灣已登記用於防治草莓灰黴病的化學單劑及混合劑共 14 種<sup>(32)</sup>，這些藥劑經長期使用後，部分灰黴病菌可能已有抗藥性<sup>(12)</sup>。本研究擬就國內外常用於該病防治的四類化學殺菌劑各選一藥劑進行菌絲半抑制有效濃度測定，並依其作用標的，定序灰黴病菌相關基因 (百克敏/*cytb*、貝芬替/ $\beta$ -*tubulin*、白克列/*sdhB* 及邁克尼/*CYP51*)，分析其特定密碼子及其與各菌株對此 4 種藥劑半抑制有效濃度的關聯性。本研究之目的，一則用以評估灰黴病菌抗藥性分子檢測法的可行性，一則可得知該菌的抗藥性現況，藉供後續相關研究之參考。

## 材料與方法

### 菌株來源與核酸萃取

於 2018 年 3 月及 2019 年 3 月分別前往台灣各草莓產地採集罹灰黴病果實上的病原菌，共採得 70 株；菌株之分離、培養及保存等方法悉參照筆者已發表之報告<sup>(12)</sup>。自採得的菌株中逢機選取代表各產區的菌株計 36 株，供本研究各項試驗之用。這些菌株分別源自苗栗縣大湖鄉 (代碼：D) 16 株及獅潭鄉 (代碼：ST) 4 株、台北市內湖區 (代碼：N) 2 株、新竹縣關西鎮 (代碼：GX) 5 株、南投縣國姓鄉 (代碼：G) 5 株、台中市霧峰區 (代碼：W) 1 株及台南市善化區 (代碼：S) 3 株等。為獲得試驗所需之基因組去氧核糖核酸 (genomic deoxyribonucleic acid, gDNA)，將前述選取之菌株分別以其菌絲塊移植於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA, Difco<sup>TM</sup>, USA) 平板，於 24°C 黑暗定溫箱培養 5 日。刮取其菌絲後，用核糖核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit, 百歐生技公司，臺灣) 抽取基因組去氧核糖核酸供後續基因增幅及定序之用。

### 殺菌劑半抑制有效濃度 (effect concentration for 50% mycelial inhibition, EC<sub>50</sub>)

本研究以百克敏 (pyraclostrobin 10% CS，台灣巴斯夫)、貝芬替 (carbendazim 50% SC，安旺特)、白克列 (boscalid 42.4% SC，台灣巴斯夫) 及邁克尼 (myclobutanil 40% WP，台灣日產) 等 4 種殺菌劑分別代表 quinone outside inhibitor (QoI) (FRAC code 11、Target site code C3)、benzimidazole (FRAC code 1、Target site code B1)、succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) (FRAC code 7、Target site code C2) 及 sterol demethylation inhibitor (DMI) (FRAC code 3、Target site code G1)<sup>(20)</sup> 等 4 作用機制藥劑為供試藥劑。藥劑來源為農藥廠商送請農業藥物試驗所檢驗合格之成品農藥剩餘樣品。將供試殺菌劑以系列稀釋濃度分別混入滅菌後的基礎培養基 (表一)，基礎培養基為含量減半之馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (19.5 g PDA + 7.5 g agar/L, Difco<sup>TM</sup>, USA)。配製完成的培養基，倒入直徑 9-cm 之塑膠培養皿；而在全量馬鈴薯葡萄糖洋菜平板經 24°C，無光照定溫箱培養 5 日的菌落為接種用菌種。接種時，以直徑 5-mm 打孔器切取菌落周緣的菌絲塊，移植至上述混有各種殺菌劑不同劑量的洋菜平板。接種後的平板置 24°C、無光照之定溫箱培養 3 日。以通過菌落中心點之兩條垂直線為準，量取菌落直徑，並以二者平均值為該菌落的直徑度量，所得數據供後續分析之用。每菌株每藥劑濃度 3 重複。供試殺菌劑的半抑制有效濃度 (EC<sub>50</sub>) 是以各殺菌劑系列濃度的對數值 (log value) 及各菌株在不同藥劑濃度下的菌落抑制百分率 [(不加藥劑處理之菌落直徑-藥劑處理之菌落直徑)/不加藥劑處理之菌落直徑]×100% 為變數，經簡單線性迴歸分析 (simple linear regression analysis) 計算獲得。本計算係於 Microsoft Excel 2016 (KB3178673) 64-Bit Edition 活頁簿中完成。

表一、草莓灰黴病菌之殺菌劑半抑制有效濃度試驗用劑量

**TABLE 1.** Fungicide concentrations used to determine the EC<sub>50</sub> of *Botrytis cinerea* isolates

Fungicide	Chemical group	Concentration (a.i. µg/mL) in agar medium
Pyraclostrobin	Quinone outside inhibitor (QoI)	0, 10, 100, 250, 500
Carbendazim	Benzimidazole	0, 0.1, 1, 5, 10, 100, 250, 500
Boscalid	Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI)	0, 10, 100, 250, 500
Myclobutanil	Sterol demethylation inhibitor (DMI)	0, 5, 10, 50, 100, 250, 500

表二、本研究用引子對序列

**TABLE 2.** Primer sets used in this study

Gene	Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Reference
<i>cytB</i>	cytB129F	Forward	AGAGTTTGATTATGCGTG	This study
	cytB129R	Reverse	ATTCCACTTAAACCTCTT	ditto
	Qo13ext	Forward	GGTATAACCCGACGGGGTTATAGAATAG	Fernández-Ortuño, et al. 2012
	Qo14ext	Reverse	AACCATCTCCATCCACCATACCTACAAA	ditto
$\beta$ - <i>tubulin</i>	TubF1	Forward	GCTTTTGATCTCCAAGATCCG	Banno et al. 2008
	TubR1	Reverse	CTGGTCAAAGGAGCAAATCC	ditto
<i>sdhB</i>	IpBcBeg	Forward	CCACTCTCCATAATGGCTGCTCTCCgC	Leroux et al. 2010
	IpBcEnd	Reverse	CTCATCAAGCCCCCTATTGATATC	ditto
<i>CYP51</i>	BcCYP51F	Forward	TGCGATGGGGATTCTTGAAG	Zhang et al. 2021
	BcCYP51R	Reverse	TTATCGTCGCTCCCAAGCTAC	ditto

## 抗藥基因定序與分析

灰黴病菌的抗藥相關基因隨殺菌劑種類而異。為得知對上述4種殺菌劑不同感受性菌株的抗藥相關基因序列是否發生變異，爰就供試菌株所抽取的基因組去氧核糖核酸以聚合酶連鎖反應 (PCR) 分別增幅細胞色素b基因 (*cytB*)、 $\beta$ -微管蛋白基因 ( $\beta$ -*tubulin*)、琥珀酸脫氫酶次單位B基因 (*sdhB*) 及甾醇-14-去甲基酶基因 (*CYP51*) 等4種基因的部分序列並定序。引子對詳如表二，其中*cytB*基因序列較長，須分別使用兩組引子對<sup>(3, 16, 30, 47)</sup>。四種殺菌劑對應的抗藥相關基因分別為：百克敏 (*cytB*)、貝芬替 ( $\beta$ -*tubulin*)、白克列 (*sdhB*) 及邁克尼 (*CYP51*)。聚合酶連鎖反應總體積為25 µL，內含12.5 µL PowerAmp 2X PCRmix-Green (慧眾生技公司，臺灣)，其成分含1.25 units Taq DNA polymerase、0.4 mM 4種dNTP及3mM MgCl<sub>2</sub>。反應前加入各基因前後向引子各1 µL (10 µM) 及2 µL (10 ng) 之各菌株基因體核酸，並補水至總體積25 µL。聚合酶連鎖反應條件先為95°C，5 min，接著進入35次增幅循環，每一循環起始溫度為95°C，30 sec，接著以引子黏合溫度 (annealing temperature) 55°C (各基因均同)，作用30 sec，延伸溫度 (extension temperature) 為72°C，90 sec，最後再以72°C，5 min結束反應。聚合酶連鎖反應產物接續進行基因雙向定序，定序結果整理成序列重疊群 (sequence contig)。各菌株所增幅的4種基因序列與基因庫 (GenBank) 中相同基因序列以套裝軟體 BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)<sup>(23)</sup> 作核

酸與胺基酸序列比對，以獲知各基因特定密碼子所對應的胺基酸是否產生變異。

## 殺菌劑抗感藥菌株的決定

為區別菌株對不同殺菌劑的抗感性，本研究依據菌株對不同藥劑的EC<sub>50</sub>與各抗藥相關基因點突變的有無定義之。在發生抗藥相關基因點突變的菌株中，以EC<sub>50</sub>數值最低者作為菌株抗藥的下限值，凡菌株的EC<sub>50</sub>大於或等於該數值者視為抗藥菌株；而在未發生基因點突變的菌株中，則以EC<sub>50</sub>數值最高者作為感藥的上限值，凡菌株的EC<sub>50</sub>小於或等於該數值者視為感藥菌株；中等抗性 (moderate resistance, MR) 的EC<sub>50</sub>則介於上述二者之間。

## 結果

### 百克敏半抑制有效濃度與*cytB*基因變異

供試灰黴病菌*cytB*基因序列之獲得是以兩組引子對分別增幅該基因的兩段序列，此係因這兩段序列間插有長約1360 bp 的內含子 (intron)，但在菌株D1及N3的3' 端尚有長約150 bp 的缺失 (deletion)。第一段序列以cytB129F / R為引子對，增幅長度約為440 bp，此段序列包括第129密碼子；第二段序列以

Qol3ext / 14ext為引子對，增幅長度約為560 bp，此段序列包括第137及143密碼子，但菌株GX2卻為1765 bp (因含有長約1200 bp內含子Bcbi-143/144)<sup>(45)</sup>。供試之36株灰黴病菌對百克敏的EC<sub>50</sub>介於12.5至308.1 µg/mL。cytb基因序列之第129及第137密碼子均無突變，分別為TTC及GGG，其編碼之胺基酸分別為苯丙胺酸 (phenylalanine) 及甘胺酸 (glycine)。但第143密碼子多數菌株突變為GCT，編碼之胺基酸為胺基丙酸 (alanine)，其EC<sub>50</sub>均高於58 µg/mL，屬抗藥菌株。少數未突變菌株仍為GGT，其編碼之胺基酸為甘胺酸 (glycine)，未突變菌株的半抑制有效濃度均低於40 µg/mL，屬感藥菌株；在未突變菌株中有一例外GX2，其EC<sub>50</sub>=144.5 µg/mL，為抗藥菌株 (表三)。

### 貝芬替半抑制有效濃度與β-tubulin基因變異

供試灰黴病菌β-tubulin基因是以TubF1 / TubR1引子對增幅該基因部分序列，增幅長度約為380 bp，此段序列包括抗藥基因突變點第198及200密碼子，但僅198密碼子有突變且具極高抗藥性。供試之36株灰黴病菌對貝芬替的EC<sub>50</sub>分屬兩個極端值，<0.001或>500 µg/mL，前者為感藥菌株，在最低藥劑濃度0.1 µg/mL，菌株生長也幾近完全受到抑制，其β-tubulin基因序列第198密碼子均為GAG，編碼為麩胺酸 (glutamic acid)。後者則為抗藥菌株，即使在最高藥劑濃度500 µg/mL，菌株生長也幾與不加藥之對照處理相同，其198密碼子有28支菌為GCG，4支菌為GTG，分別編碼為胺基丙酸 (alanine) 及纈胺酸 (valine)。β-tubulin基因序列之第200密碼子無突變，皆為TTC，其編碼的胺基酸為苯丙胺酸 (表四)。

### 白克列半抑制有效濃度與sdhB基因變異

供試灰黴病菌sdhB基因是以IpBcBeg / IpBcEnd引子對增幅該基因部分序列，增幅長度約為950 bp，此段序列包括抗藥基因突變點第225、230及272密碼子，但僅230及272密碼子有突變且具抗藥性。供試之36株灰黴病菌對白克列之EC<sub>50</sub>介於0.004至986.4 µg/mL。sdhB基因序列之第225密碼子無突變，均為CCC，編碼之胺基酸為脯胺酸 (proline)。第230密碼子僅一菌株G10突變為ATC，編碼為異白胺酸 (isoleucine)，其EC<sub>50</sub> = 222.2 µg/mL，為抗藥菌株；其他菌株均為AAC，編碼為天門冬醯胺 (asparagine)。第272密碼子則有3種序列，分別為CAC及CGC與TAC，分別編碼為組織胺酸 (histidine)、魚精胺酸 (arginine) 及酪胺酸 (tyrosine)，後兩者為抗藥突變。除G3及W1外，凡菌株第272密碼子為CAC者，其EC<sub>50</sub> <10.0 µg/mL，屬感藥菌株，其餘菌株之該密碼子則為CGC或TAC，EC<sub>50</sub>均大於100 µg/mL，屬抗藥菌株。G3及W1的EC<sub>50</sub> 分別為37.2及60.7 µg/mL，呈中等抗藥性 (moderate resistance, MR)，但其3個位點均無突變 (表五)。

表三、草莓灰黴病菌對百克敏不同感受性菌株之細胞色素b基因突變表

**TABLE 3.** EC<sub>50</sub> of *Botrytis cinerea* isolates against pyraclostrobin and deduced amino acid substitutions in cytb gene sequence at three codons

Isolate	EC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>1</sup> of pyraclostrobin	Response <sup>2</sup>	Amino acid in codon <sup>3</sup>		
			129	137	143
S2	217.2	R	Phe	Gly	Ala
S3	93.6	R	Phe	Gly	Ala
S4	123.7	R	Phe	Gly	Ala
N1	200.5	R	Phe	Gly	Ala
N3	232.1	R	Phe	Gly	Ala
G1	73.7	R	Phe	Gly	Ala
G3	58.6	R	Phe	Gly	Ala
G5	142.5	R	Phe	Gly	Ala
G8	125.0	R	Phe	Gly	Ala
G10	124.4	R	Phe	Gly	Ala
D1	263.0	R	Phe	Gly	Ala
D3	308.1	R	Phe	Gly	Ala
D5	135.3	R	Phe	Gly	Ala
D7	130.7	R	Phe	Gly	Ala
D9	192.8	R	Phe	Gly	Ala
D10	136.7	R	Phe	Gly	Ala
D11	233.1	R	Phe	Gly	Ala
D13	169.3	R	Phe	Gly	Ala
D15	208.4	R	Phe	Gly	Ala
D17	30.0	MR	Phe	Gly	Gly
D19	87.6	R	Phe	Gly	Ala
D20	13.7	S	Phe	Gly	Gly
D21	12.5	S	Phe	Gly	Gly
D23	61.7	R	Phe	Gly	Ala
D24	118.6	R	Phe	Gly	Ala
D25	79.7	R	Phe	Gly	Ala
W1	167.0	R	Phe	Gly	Ala
GX1	162.8	R	Phe	Gly	Ala
GX2	144.5	R	Phe	Gly	Gly
GX3	128.1	R	Phe	Gly	Ala
GX5	37.9	MR	Phe	Gly	Gly
GX7	223.1	R	Phe	Gly	Ala
ST1	26.9	S	Phe	Gly	Gly
ST4	85.1	R	Phe	Gly	Ala
ST6	134.3	R	Phe	Gly	Ala
ST7	154.7	R	Phe	Gly	Ala

<sup>1</sup> EC<sub>50</sub> was obtained by the mycelial growth inhibition method.

<sup>2</sup> S: sensitive, EC<sub>50</sub> ≤13.7 µg/mL; MR: moderate resistance, EC<sub>50</sub> =14~58 µg/mL; R: resistance, EC<sub>50</sub> ≥58.6 µg/mL.

<sup>3</sup> Ala: alanine, Gly: glycine, Phe: phenylalanine.

表四、草莓灰黴病菌對貝芬替不同感受性菌株之  $\beta$  微管蛋白基因突變表**TABLE 4.** EC<sub>50</sub> of *Botrytis cinerea* isolates against carbendazim and deduced amino acid substitutions in  $\beta$ -tubulin gene sequence at two codons

Isolate	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) <sup>1</sup> of carbendazim	Response <sup>2</sup>	Amino acid in codon <sup>3</sup>	
			198	200
S2	>500	R	Ala	Phe
S3	>500	R	Ala	Phe
S4	>500	R	Ala	Phe
N1	>500	R	Ala	Phe
N3	>500	R	Ala	Phe
G1	>500	R	Ala	Phe
G3	>500	R	Ala	Phe
G5	>500	R	Ala	Phe
G8	>500	R	Val	Phe
G10	>500	R	Ala	Phe
D1	>500	R	Ala	Phe
D3	>500	R	Ala	Phe
D5	>500	R	Ala	Phe
D7	>500	R	Ala	Phe
D9	>500	R	Ala	Phe
D10	>500	R	Ala	Phe
D11	>500	R	Ala	Phe
D13	>500	R	Val	Phe
D15	>500	R	Ala	Phe
D17	<0.001	S	Glu	Phe
D19	>500	R	Ala	Phe
D20	<0.001	S	Glu	Phe
D21	<0.001	S	Glu	Phe
D23	>500	R	Ala	Phe
D24	>500	R	Ala	Phe
D25	>500	R	Ala	Phe
W1	>500	R	Val	Phe
GX1	>500	R	Ala	Phe
GX2	>500	R	Val	Phe
GX3	>500	R	Ala	Phe
GX5	>500	R	Ala	Phe
GX7	>500	R	Ala	Phe
ST1	<0.001	S	Glu	Phe
ST4	>500	R	Ala	Phe
ST6	>500	R	Ala	Phe
ST7	>500	R	Ala	Phe

<sup>1</sup> EC<sub>50</sub> was obtained by the mycelial growth inhibition method.<sup>2</sup> S: sensitive, EC<sub>50</sub>  $\leq$ 0.001  $\mu$ g/mL; R: resistance, EC<sub>50</sub>  $\geq$ 500  $\mu$ g/mL.<sup>3</sup> Ala: alanine, Glu: glutamate, Phe: phenylalanine, Val: valine.

表五、草莓灰黴病菌對白克列不同感受性菌株之琥珀酸脫氫酶基因突變表

**TABLE 5.** EC<sub>50</sub> of *Botrytis cinerea* isolates against boscalid and deduced amino acid substitutions in *sdhB* gene sequence at three codons

Isolate	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) <sup>1</sup> of boscalid	Response <sup>2</sup>	Amino acid in codon <sup>3</sup>		
			225	230	272
S2	1.6	S	Pro	Asn	His
S3	175.4	R	Pro	Asn	Arg
S4	142.0	R	Pro	Asn	Arg
N1	308.0	R	Pro	Asn	Arg
N3	167.1	R	Pro	Asn	Arg
G1	238.6	R	Pro	Asn	Tyr
G3	37.2	MR	Pro	Asn	His
G5	960.7	R	Pro	Asn	Arg
G8	0.1	S	Pro	Asn	His
G10	222.2	R	Pro	Ile	His
D1	651.8	R	Pro	Asn	Arg
D3	374.9	R	Pro	Asn	Arg
D5	603.6	R	Pro	Asn	Tyr
D7	218.7	R	Pro	Asn	Arg
D9	171.2	R	Pro	Asn	Tyr
D10	160.6	R	Pro	Asn	Arg
D11	986.4	R	Pro	Asn	Arg
D13	168.1	R	Pro	Asn	Arg
D15	203.3	R	Pro	Asn	Arg
D17	1.4	S	Pro	Asn	His
D19	116.1	R	Pro	Asn	Arg
D20	3.6	S	Pro	Asn	His
D21	0.004	S	Pro	Asn	His
D23	9.76	S	Pro	Asn	His
D24	62.1	R	Pro	Asn	Tyr
D25	6.2	S	Pro	Asn	His
W1	60.7	MR	Pro	Asn	His
GX1	238.0	R	Pro	Asn	Arg
GX2	1.0	S	Pro	Asn	His
GX3	416.9	R	Pro	Asn	Tyr
GX5	4.5	S	Pro	Asn	His
GX7	471.3	R	Pro	Asn	Arg
ST1	0.1	S	Pro	Asn	His
ST4	132.3	R	Pro	Asn	Arg
ST6	291.3	R	Pro	Asn	Arg
ST7	297.2	R	Pro	Asn	Arg

<sup>1</sup> EC<sub>50</sub> was obtained by the mycelial growth inhibition method.<sup>2</sup> S: sensitive, EC<sub>50</sub>  $\leq$ 9.76  $\mu$ g/mL; MR: moderate resistance, EC<sub>50</sub> =10~62  $\mu$ g/mL; R: resistance, EC<sub>50</sub>  $\geq$ 62.1  $\mu$ g/mL.<sup>3</sup> Arg: arginine, Asn: asparagine, His: histidine, Ile: isoleucine, Pro: proline, Tyr: tyrosine.

## 邁克尼半抑制有效濃度與CYP51基因變異

供試灰黴病菌CYP51基因是以BcCYP51F / BcCYP51R引子對增幅該基因部分序列，增幅長度約為1570 bp，此段序列包括抗藥基因突變點第136、147及347密碼子，但僅136密碼子有突變且具抗藥性。供試之36株灰黴病菌對殺菌劑邁克尼的EC<sub>50</sub>介於0.1至81.5 µg/mL。D19是唯一具CYP51基因密碼子變異的菌株，其第136密碼子為TTC，編碼為苯丙胺酸，EC<sub>50</sub>為81.5 µg/mL，是供試菌株中最高者，屬抗藥菌株；其他菌株均為TAC，其編碼之胺基酸為酪胺酸，EC<sub>50</sub>多低於20 µg/mL，屬感藥菌株。所有菌株之第147及347密碼子均無變異，分別為AAG及CCT，編碼之胺基酸分別為離胺酸 (lysine) 及脯胺酸 (表六)。

## B. cinerea的多重抗藥性

供試36株灰黴病菌對百克敏、貝芬替、白克列及邁克尼等4種殺菌劑具抗藥性者分別為31、32、25及1株。對百克敏及貝芬替等2種殺菌劑具雙重抗藥性有31株，對百克敏、貝芬替及白克列等3種殺菌劑具參重抗藥性者有25株，同時對上述4種殺菌劑均具抗藥性者僅有1菌株，D19。對供試各藥劑均感藥者則有D17、D20、D21及ST1等4株，以上5菌株 (含D19) 均源自苗栗大湖及其鄰接之獅潭地區。(表三~六)。

## 討 論

本研究分析草莓灰黴病菌對4種殺菌劑的半抑制有效濃度 (EC<sub>50</sub>) 與各抗藥相關基因點突變間的關係，結果得出兩者確實存有顯著關聯性。例如，在灰黴病菌對百克敏的試驗，*cytB*基因序列具第143 (G143A) 密碼子突變者均為抗藥菌株；在貝芬替的試驗，*β-tubulin*基因序列具第198 (E198A/V) 密碼子突變者亦均為抗藥菌株；在白克列的試驗，*sdhB*基因序列具第230 (N230I) 及272 (H272R/Y) 密碼子突變者也全是抗藥菌株；而在邁克尼的試驗，CYP51基因序列具第136 (Y136F) 密碼子突變者，雖僅1株菌，仍屬抗藥菌株 (表三~六)。基於上述結果，可證明應用分子技術檢測灰黴病菌抗藥性是可行的。而基因序列改變與抗藥性緊密扣合，也為抗藥性屬遺傳現象提供具體證據。但擁有相同抗藥基因的不同菌株卻能表現懸殊的抗藥程度 (表三、五)，則是有待探討的研究課題。本研究曾以EC<sub>50</sub>與各抗藥相關基因點突變共同定義菌株對該藥劑的抗感性，雖有些例外，如GX2的*cytB*基因未突變，卻為抗藥菌株 (表三)；或G3及W1已呈現中等抗藥性，但其*sdhB*基因亦無突變 (表五)，惟總體而言，此規則基本可行，但也要注意可能的例外。我們推測變異基因雖使得抗藥性得以傳至子代，但變異基因的不穩定性卻可能導致菌株對藥劑感受性與其基因變異不一致的現象 (27)。

表六、草莓灰黴病菌對邁克尼不同感受性菌株之甾醇-14-去甲基酶基因突變表

TABLE 6. EC<sub>50</sub> of *Botrytis cinerea* isolates against myclobutanil and deduced amino acid substitutions in CYP51 gene sequence at three codons

Isolate	EC <sub>50</sub> (µg/mL) of myclobutanil <sup>1</sup>	Response <sup>2</sup>	Amino acid in codon <sup>3</sup>		
			129	137	143
S2	10.7	S	Tyr	Lys	Pro
S3	21.0	S	Tyr	Lys	Pro
S4	9.2	S	Tyr	Lys	Pro
N1	13.2	S	Tyr	Lys	Pro
N3	14.3	S	Tyr	Lys	Pro
G1	7.1	S	Tyr	Lys	Pro
G3	2.5	S	Tyr	Lys	Pro
G5	12.6	S	Tyr	Lys	Pro
G8	4.1	S	Tyr	Lys	Pro
G10	4.6	S	Tyr	Lys	Pro
D1	12.7	S	Tyr	Lys	Pro
D3	17.2	S	Tyr	Lys	Pro
D5	6.1	S	Tyr	Lys	Pro
D7	7.3	S	Tyr	Lys	Pro
D9	4.5	S	Tyr	Lys	Pro
D10	3.2	S	Tyr	Lys	Pro
D11	7.8	S	Tyr	Lys	Pro
D13	6.5	S	Tyr	Lys	Pro
D15	1.4	S	Tyr	Lys	Pro
D17	0.5	S	Tyr	Lys	Pro
D19	81.5	R	Phe	Lys	Pro
D20	6.9	S	Tyr	Lys	Pro
D21	12.8	S	Tyr	Lys	Pro
D23	17.8	S	Tyr	Lys	Pro
D24	5.0	S	Tyr	Lys	Pro
D25	10.7	S	Tyr	Lys	Pro
W1	0.1	S	Tyr	Lys	Pro
GX1	2.5	S	Tyr	Lys	Pro
GX2	9.1	S	Tyr	Lys	Pro
GX3	0.7	S	Tyr	Lys	Pro
GX5	19.5	S	Tyr	Lys	Pro
GX7	2.2	S	Tyr	Lys	Pro
ST1	6.4	S	Tyr	Lys	Pro
ST4	15.0	S	Tyr	Lys	Pro
ST6	16.3	S	Tyr	Lys	Pro
ST7	16.3	S	Tyr	Lys	Pro

<sup>1</sup> EC<sub>50</sub> was obtained by the mycelial growth inhibition method.

<sup>2</sup> S: sensitive, EC<sub>50</sub> ≤ 21 µg/mL; R: resistance, EC<sub>50</sub> ≥ 81.5 µg/mL.

<sup>3</sup> Lys: lysine, Phe: phenylalanine, Pro: proline, Tyr: tyrosine.

此外，我們也發現了灰黴病菌普遍存在的多重抗藥性問題，大多數菌株 (31/36, 86.1%) 同時對百克敏及貝芬替具抗藥性，多數菌株 (25/36, 69.4%) 則同時對百克敏、貝芬替及白克列具抗藥性 (表三~六)。顯然，在灰黴病的防治上，多重抗藥性已是一個令人憂心的問題，因它將大幅限縮可用藥劑的種類，最終可能導致無藥可用的窘境。甚且，有研究稱，多重抗藥性菌株對個別藥劑的抗藥性程度要高於僅抗該單一藥劑者<sup>(22)</sup>。事實上，草莓灰黴病菌的多重抗藥性問題在其他地區亦普遍存在。例如，在美國加州的草莓園，其灰黴病菌對百克敏、白克列及環酰菌胺 (fenhexamid) 等藥劑具雙重或參重抗藥性<sup>(33)</sup>；在德國的草莓園，340株 *Botrytis* spp. 菌株中有10.3%同時對三氟敏 (trifloxystrobin)、白克列、賽普洛 (cyprodinil)、護汰寧 (fludioxonil) 及環酰菌胺等5種藥劑具多重抗藥性<sup>(41)</sup>；而在中國、西班牙及澳洲等地亦見草莓灰黴病菌的多重抗藥性問題<sup>(13, 18, 24)</sup>。

本研究在灰黴病菌對百克敏的試驗中，*cytb*基因序列是經由兩組引子對分別增幅此基因的兩段序列，這是在這兩段序列間插有長約1360 bp的內含子，經比對，此序列類同於核酸內切酶基因 (putative intron-encoded endonuclease, XM\_037342774)<sup>(42)</sup>。

此外，菌株GX2的*cytb*基因獨有長約1200 bp內含子，名為Bcbi-143/144，位置在第143密碼子之後<sup>(45)</sup>。GX2的 $EC_{50}$ =144.5  $\mu$ g/mL，應為抗藥菌株，但其*cytb*基因與抗藥相關的密碼子卻均無變異，是本研究中僅有的例外。我們參閱相關報告得知，在美國華盛頓州蘋果園所分離到的灰黴病菌中，凡對百克敏具抗藥性者均無Bcbi-143/144內含子，但卻都有G143A突變，亦即此內含子與G143A突變不並存，該文推測此內含子會抑制因G143A突變導致的抗藥性<sup>(45)</sup>。本研究得到的是有該內含子，但無G143A突變的抗藥菌株。似乎，此內含子是抑制了143密碼子的突變，但何以該菌仍具抗藥性，則無解答，且僅此一株菌也難下定論。在台灣，陳氏等曾針對草莓灰黴病菌對史托比類 (strobilurins) 亦即QoIs藥劑的感受性進行研究，其試驗菌株對百克敏所作的菌絲 $EC_{50}$ 均低於25  $\mu$ g/mL，但對亞托敏 (azoxystrobin) 及克收欣 (kresoxim-methyl) 的試驗，其 $EC_{50}$ 分別高達477及283  $\mu$ g/mL，應屬抗藥菌株，但其*cytb*基因第129及143密碼子均無突變<sup>(7)</sup>。儘管真菌*cytb*基因的G143A突變與抗史托比類藥劑的聯結是常見的現象<sup>(6)</sup>，但也非必然；因有研究發現菌株雖抗藥卻無G143A點突變，或雖感藥卻有此點突變，這有可能導因於*cytb*具粒線體基因異質化 (heteroplasmy) 特性<sup>(27)</sup>。

在灰黴病菌對貝芬替的試驗中，試驗數值呈現兩極化，有4支菌對貝芬替極感 ( $EC_{50} < 0.001$   $\mu$ g/mL)，其餘32支菌則極抗 ( $EC_{50} > 500$   $\mu$ g/mL)；且在抗藥菌株中僅有  $\beta$ -*tubulin*基因的第198密碼子發生突變 (E198A/V) (表四)。許多報告顯示，蔬菜及莓果類作物的灰黴病菌，其抗苯并咪唑類藥劑菌株的  $\beta$ -*tubulin*基因亦僅具E198A/K/V突變<sup>(8, 14, 15, 25)</sup>。另有報告指出，在中國山東省抗貝芬替的蔬菜灰黴病菌中，其  $\beta$ -*tubulin*基因

的E198V菌株數漸減而具E198A者漸增，具E198K者更減至完全消失；在其對貝芬替的感受性試驗亦顯示抗感藥程度上有極大落差，感藥菌株的 $EC_{50}$ 均低於1.0  $\mu$ g/mL，而抗藥菌株則大於100  $\mu$ g/mL<sup>(25)</sup>。以上報告均與我們的研究結果若合符節，那就是抗藥菌株  $\beta$ -*tubulin*基因點突變以E198A為主，E198V次之，E198K則未見，且抗感藥菌株間的 $EC_{50}$ 數值呈現兩極化。

在灰黴病菌對白克列的試驗中，*sdhB*基因的第225密碼子均無變異 (表五)，相關研究亦證此突變罕見<sup>(44)</sup>。第230密碼子則有1菌株G10具N230I突變，這唯一菌株的另一與抗藥性有關的272密碼子則未變，因此，可認定此抗藥菌株 ( $EC_{50}$ =222.2  $\mu$ g/mL) 係肇因於N230I的變異 (表五)。在本研究中，灰黴病菌抗白克列菌株的*sdhB*基因主要突變點應為密碼子272，且具有兩種突變型，多數 (18/23) 為H272R，少數 (5/23) 為H272Y，這二種突變型與抗藥程度 (levels of resistance) 並無關聯，此與相關研究亦類同<sup>(26, 44)</sup>。至於有報告稱，H272R/Y菌株對白克列僅具中等抗藥性<sup>(39)</sup>，本研究則未見此現象。除卻G3及D24兩菌株，凡有密碼子230及272突變的菌株，其 $EC_{50}$ 介於116至986  $\mu$ g/mL，而未具上述點突變的菌株，其 $EC_{50}$ 均在10  $\mu$ g/mL以下，菌株對白克列的抗感性表現分明 (表五)。至於G3及D24兩菌株，其 $EC_{50}$ 分別為37.2及62.1  $\mu$ g/mL，屬中等抗藥性，但其相關密碼子均無突變。我們認為這種情況可能是菌株在抗藥演化過程中的一種過渡現象，菌株先是對藥劑產生生理上的適應，或可稱為耐藥 (tolerance)，惟尚未有基因上的改變；但這些菌株未來如不能產生基因上的改變以提高其抗藥性，則可能會在後續的藥劑選汰壓力下消失，因為本研究顯示， $EC_{50}$ 在100  $\mu$ g/mL以上的菌株均具*sdhB*基因點突變，而此藥劑濃度曾被用為草莓灰黴病菌對白克列抗感藥的區別劑量 (discriminatory dose)<sup>(17)</sup> (表五)。

在灰黴病菌對邁克尼的試驗中，各菌株的 $EC_{50}$ 數值除D19外，其餘均在21  $\mu$ g/mL以下，屬感藥菌株，其*CYP51*基因各密碼子亦均無突變。D19的 $EC_{50}$ 為81.5  $\mu$ g/mL，且具Y136F突變 (表六)。我們推測絕大多數灰黴病菌*CYP51*基因無變異的原因應是這些菌株尚未產生抗藥性，而唯一具此基因變異的菌株D19，則屬抗藥菌株，這樣的結果仍勉可支持抗邁克尼菌株的分子檢測。但在中國，以同屬固醇去甲基抑制劑的待克利 (difenoconazole) 為供試藥劑測其對番茄灰黴病菌的抗藥性，其抗藥菌株並未見*CYP51*基因變異<sup>(47)</sup>。相關報告又稱，在人體及植物病原真菌固醇去甲基抑制劑的機制甚為多元，*CYP51*基因變異僅是其中之一<sup>(29)</sup>。因而，灰黴病菌對固醇去甲基抑制劑抗藥菌株的檢測恐難單以*CYP51*基因變異的分子檢測為準。

本研究報告草莓灰黴病菌對4種殺菌劑的抗藥性概況，其中以抗百克敏及貝芬替最為嚴重，其次為抗白克列，對邁克尼的抗藥性最輕微，這些結果亦反映本菌多重抗藥性的普遍性 (表三~六)。由於上述各種藥劑仍持續用於草莓灰黴病的防治，田間抗藥菌株的監測工作勢須持續進行，以掌握田間抗藥

性的發展狀況。面對寄主範圍廣且傳播快速的灰黴病菌及其既存或潛存的交互抗藥性與多重抗藥性風險，輪用不同作用機制藥劑、使用混合藥劑、微生物藥劑或多點作用機制藥劑及限制單一藥劑使用次數，特別是已產生抗藥性的高風險藥劑等均為延緩灰黴病菌抗藥性的必要作為。

## 謝 辭

本研究承前行政院農業委員會（現農業部）108農科-8.4.1-藥-P2及109農科-8.4.1-藥-P2計畫經費補助，謹此致謝。

## 引用文獻

- Anonymous, 2019. List of Plant Diseases in Taiwan 5th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taichung, 329 pp. (in Chinese)
- Baggio, J. S., Peres, N. A., and Amorim, L. 2018. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, and thiophanate-methyl. *Plant Dis.* 102:1803-1810.
- Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, A., Okada, K., Uekusa, H., Kimura, M., and Fujimura, M. 2008. Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 98:397-404.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58:649-662.
- Bernhardta, A., Meyer, W., Rickerts, V., Aebischer, T., Tintelnot, K. 2018. Identification of 14- $\alpha$ -lanosterol demethylase (*CYP51*) in *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62:e02599-17.
- Bolton, M. D., Rivera, V., Secor, G. 2013. Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. *Pest Manag Sci.* 69(1):35-39.
- Chen, L. S., Chun, W. C., and Chung, W. H. 2009. Sensitivity of *Botrytis cinerea* of strawberry to strobilurins (QoIs) in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 18:89-99. (in Chinese)
- Cosseboom, S., and Hu, M. 2021. Identification and characterization of fungicide resistance in *Botrytis* populations from small fruit fields in the Mid-Atlantic United States. *Plant Dis.* 105:2366-2373.
- Davidse, L. C. 1986. Benzimidazole fungicides: Mechanisms of action and biological impact. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:43-65.
- De Miccolis Angelini, R. M., Habia, W., Rotolo, C., Pollastro, S., and Faretra, F. 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *Eur. J. Plant Pathol.* 128:185-199.
- 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.
- Duan, C.-H., and Chen, G.-Y. 2020. Sensitivity to fungicides and food antiseptics in *Botrytis cinerea* from strawberry in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 9:99-116. (in Chinese)
- Fan, F., Hamada, M. S., Li, N., Li, G. Q., Luo, C. X. 2017. Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei province, China. *Plant Dis.* 101:601-606.
- Fan, F., Li, N., Li, G. Q., and Luo, C. X. 2016. Occurrence of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse tomato in Hubei Province, China. *Plant Dis.* 100:2414-2421.
- Fan, F., Li, X.-B., Yang, Y.-Y., Zhang, J.-Y., Zhu, Y.-X., Yin, W.-X., Li, G.-Q., Luo, C.-X. 2022. Benzimidazole-resistant isolates with E198A/V/K mutations in the  $\beta$ -tubulin gene possess different fitness and competitive ability in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 112:2321-2328.
- Fernández-Ortuño, D., Chen, F., and Schnabel, G. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Dis.* 96:1198-1203.
- Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, Chamorro M, de la Peña E, de Vicente A, Torés J. A. 2017. Resistance to the SDHI Fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain. *Plant Dis.* 101:1306-1313.
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., Chamorro, M., Pérez-García, A., and de Vicente, A. 2016. Characterization of resistance to six chemical classes of site-specific fungicides registered for gray mold control on strawberry in Spain. *Plant Dis.* 100:2234-2239.
- Fungicide Resistance Action Committee. 2006. Mutations associated with QoI resistance. Retrieved from <http://www.frac.info>. (Jul. 20, 2023)
- Fungicide Resistance Action Committee. 2022. FRAC Code List ©\*2022: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC groups



- on product labels). Retrieved from <http://www.frac.info>. (Jul. 20, 2023)
21. Gisi, U, Sierotzki, H, Cook, A and McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58: 859-867.
  22. Grabke, A., and Stammler, G. 2015. A *Botrytis cinerea* population from a single strawberry field in Germany has a complex fungicide resistance pattern. *Plant Dis.* 99:1078-1086.
  23. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
  24. Harper, L. A., Paton, S., Hall, B., McKay, S., Oliver, R. P., and Lopez-Ruiz, F. J. 2022. Fungicide resistance characterized across seven modes of action in *Botrytis cinerea* isolated from Australian vineyards. *Pest Manag. Sci.* 78:1326-1340.
  25. He, L., Cui, K., Tongtong Li, T., Song, Y., Liu, N., Mu, W., and Liu, F. 2020. Evolution of the resistance of *Botrytis cinerea* to carbendazim and the current efficacy of carbendazim against gray mold after long-term discontinuation. *Plant Dis.* 104:1647-1653.
  26. Hu, M.-J., Fernández-Ortuño, D., and Schnabel, G. 2016. Monitoring resistance to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea* from strawberry fields. *Plant Dis.* 100:959-965.
  27. Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W.-H., Kansako, M., Nishimura, K., Takahashi, K., and Oshima, M. 2009. Characterization of QoI-resistance field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Manag. Sci.* 65:916-922.
  28. Leroch, M., Kretschmer, M. and Hahn, M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *J. Phytopathol.* 159:63 – 65.
  29. Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M. and Walker, A.-S. 2007. Mutations in the *CYP51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14  $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest. Manag. Sci.* 63: 688-698.
  30. Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., and Walker, A. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:6615-6630.
  31. Myresiotis, C. K., Bardas, G. A., and Karaoglanidis, G. S. 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Dis.* 92:1427-1431.
  32. Plant Protection Information System. 2023. Retrieved from <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/> (Jul. 20, 2023) (in Chinese)
  33. Pokorny, A., Smilanick, J., Xiao, C.-L., Farrar, J. J., and Shrestha, A. 2016. Determination of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry in the Central Coast region of California. *Plant Health Prog.* 17:30-34.
  34. Ruprecht, J., Yankovskaya, V., Maklashina, E., Iwata, S., and Cecchini, G. 2009. Structure of *Escherichia coli* succinate: quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site. *J. Biol. Chem.* 284:29836-29846.
  35. Samuel, S., Papayiannis, L.C., Leroch, M., Veloukas, T., Hahn, M. and Karaoglanidis, G.S. 2011. Evaluation of the incidence of the G143A mutation and *cytb* intron presence in the *cytochrome bc-1* gene conferring QoI resistance in *Botrytis cinerea* populations from several hosts. *Pest. Manag. Sci.* 67:1029-1036.
  36. Senior, I. J., Hollomon, D. W., Loeffler, R. T., and Baldwin, B. C. 1995. Sterol composition and resistance to DMI fungicides in *Erysiphe graminis*. *Pestic.Sci.* 45:57-67.
  37. Stammler, G. 2008. Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. Pages 30-43 in: *Abstr. 18th Symp. Res. Committee on Fungicide Resistance. The Phytopathological Society of Japan, Matsueshi, Japan.*
  38. UIPP. 2002. Annual Report. Paris, France: Union des Industries de la Protection des Plantes.
  39. Veloukas, T., Markoglou, A. N., and Karaoglanidis, G. S. 2013. Differential effect of *SdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 97:118-122.
  40. Wang N., and Scherm, H. 2023. Key discoveries in plant pathology during the past half century: impacts on the life sciences and on plant disease management. *Phytopathology* 113:588-593.
  41. Weber, R. W. S., Entrop, A.-P. 2017. Recovery of fungicide-resistant *Botrytis* isolates from strawberry nursery plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 149:739-742.
  42. Wu, Y., Saski, C. A., Schnabel, G., Xiao, S. and Hu, M. 2021. A high-quality genome resource of *Botrytis fragariae*, a new and rapidly spreading fungal pathogen causing strawberry gray mold in the United States. *Phytopathology* 111:496-499.
  43. Wyand R. A., Brown, J. K. 2005. Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 42(8):726-735.
  44. Yin, Y. N., Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101:986-995.
  45. Yin, Y. N., Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2012. Molecular characterization of pyraclostrobin resistance and structural

- diversity of the cytochrome *b* gene in *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 102:315-322.
46. Yin, Y., Miao, J., Shao, W., Liu, X., Zhao, Y., and Ma, Z. 2023. Fungicide resistance: Progress in understanding mechanism, monitoring, and management. *Phytopathology* 113:707-718.
47. Zhang, C., Imran, M., Xiao, L., Hu, Z., Li, G., Zhang, F., and Liu, X. 2021. Difenconazole resistance shift in *Botrytis cinerea* from tomato in China associated with inducible expression of *CYP51*. *Plant Dis.* 105:400-407.
48. Zhang, C. Q., Liu, Y. H. & Zhu, G. N. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. *Eur. J. Plant Pathol.* 126:509 – 515.
49. Zhang, Z., Huang, L., Shulmeisters, V. M., Chi, Y.-I., Kim, K. K., Hung, L.-W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S.-H. 1998. Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc1*. *Nature* 392:677 – 684.

and carbendazim) and three (plus boscalid) were 31 and 25, respectively.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, EC<sub>50</sub>, fungicide insensitivity, molecular detection

## ABSTRACT

Chen, G.-Y. and Duan, C.-H.\* 2023. Molecular detection of insensitivities to the fungicides pyraclostrobin, carbendazim, boscalid and myclobutanil in *Botrytis cinerea* in Taiwan. *J. Plant Med.* 65(4): 139-148.

\*Corresponding author, E-mail: chduan1@hotmail.com

*Botrytis cinerea* is one of the most devastating fungal pathogens on many crops in Taiwan. Thirty-six single-conidium isolates collected from strawberry fields during 2018~2019 were investigated for fungicide sensitivity in this study. We evaluated the effective concentrations for 50% mycelial growth inhibition (EC<sub>50</sub>) of four fungicides for each isolate and determined possible association with target site mutations in the *cytb*, *β-tubulin*, *sdhB* and *CYP51* genes responsible for insensitivity to the fungicides pyraclostrobin (quinone outside inhibitor), carbendazim (benzimidazole), boscalid (succinate dehydrogenase inhibitor) and myclobutanil (sterol demethylation inhibitor), respectively. The results indicated that fungal insensitivities to the respective fungicides were highly associated with previously published genotypes, including G143A in *cytb*; E198A/V in *β-tubulin*; N230I and H272R/Y in *sdhB*; and Y136F in *CYP51*. Accordingly, molecular detection of fungicide insensitivity of *B. cinerea* is practicable. Furthermore, the numbers of isolates with insensitivity to pyraclostrobin, carbendazim, boscalid and myclobutanil were 31, 32, 25 and 1, respectively. The numbers of isolates with multifungicide insensitivities of two (pyraclostrobin