

# 臺灣茶赤葉枯病菌族群對免賴得及甲基多保淨之感受性分析

林秀榮<sup>1,2</sup>、張育京<sup>2</sup>、林盈宏<sup>3</sup>、鍾嘉綾<sup>1\*</sup>、洪挺軒<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 國立臺灣大學植物病理與微生物學系，臺灣臺北市。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會茶業改良場，臺灣桃園。

<sup>3</sup> 國立屏東科技大學植物醫學系，臺灣屏東。

聯絡作者，E-mail: clchung@ntu.edu.tw；thhung@ntu.edu.tw

## 摘要

林秀榮、張育京、林盈宏、鍾嘉綾、洪挺軒。2022。臺灣茶赤葉枯病菌族群對免賴得及甲基多保淨之感受性分析。植物醫學 64(4): 139-148。

赤葉枯病菌主要危害茶樹葉片與幼嫩枝條，造成茶葉品質及產量下降，茶農主要依賴化學藥劑進行防治，然近十年茶農開始反應登記之殺菌劑藥效不佳。為瞭解臺灣茶赤葉枯病菌族群是否已對methyl benzimidazole carbamate (MBC) 類藥劑產生抗藥性，本研究對來自臺灣8個主要產茶縣市之37株 *Colletotrichum camelliae*、3株 *C. fructicola* 及1株 *C. aenigma*，測試在含有有效成分1,000 ppm (mg a.i./L)、100 ppm、10 ppm、1 ppm 的免賴得及甲基多保淨藥劑之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基上菌絲生長情形，結果顯示除了分離自屏東之 *C. camelliae* 菌株皆有抗藥性外，其他縣市之 *C. camelliae* 菌株可分為對藥劑呈敏感性及高抗性兩群，而 *C. fructicola* 及 *C. aenigma* 菌株則皆對藥劑呈敏感性。41株受測菌株對兩藥劑的感受性有相同趨勢，且抗性菌株對甲基多保淨的感受性更低。針對不同縣市之15株 *C. camelliae*，分析  $\beta$ -tubulin 基因中已知最常發生抗藥性突變之區段，發現高及低感受性菌株僅在第860個核苷酸具有差異，此一點突變造成第198胺基酸由glutamic acid (GAG) 變成alanine (GCG)，符合文獻中造成高度抗藥性之機制。茶赤葉枯病菌對兩藥劑之感受性與田間管理方式具相關性，高抗性菌株皆分離自慣行茶園，而分離自有機管理或用藥較少的茶園之菌株，對測試藥劑皆呈敏感性。本研究顯示臺灣各茶產區已普遍存在對MBC類藥劑具抗性之 *C. camelliae* 菌株，建議應落實不同作用機制藥劑之輪替或混合使用，並結合整合性管理措施，以有效防治本病。

關鍵詞：抗藥性、點突變、適應性、致病力、*Colletotrichum camelliae*、*Colletotrichum fructicola*、*Colletotrichum aenigma*

## 緒言

茶是世界上僅次於水之最受歡迎的飲料<sup>(20)</sup>，也是最受歡迎的非酒精健康飲料之一，廣泛種植於熱帶及亞熱帶國家，如大陸、印度、日本及斯里蘭卡等<sup>(26)</sup>。茶樹 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 為多年生常綠灌木至小喬木，其嫩芽葉經過加工成為嗜好性飲料，因其清香深受國人喜愛而大面積種植，根據農委會109年統計資料顯示茶樹種植面積約一萬二千公頃，年產量約一萬四千公噸，年產值約新臺幣82億元（農業統計資料 <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx> Accessed on 11 Aug 2022）。

茶赤葉枯病主要為 *Colletotrichum* 屬真菌引起之病害，在臺灣其病原菌包括 *C. camelliae*、*C. fructicola* 及 *C. aenigma*<sup>(22, 23, 40)</sup>，國外報導會造成茶赤葉枯病（或稱炭疽病）之病原菌則包括有 *C. gloeosporioides*、*C. acutatum*<sup>(1, 10)</sup>、*C. camelliae*<sup>(13, 14, 25, 26, 30, 42)</sup>、*C. fructicola*<sup>(25, 26, 42)</sup>、*C. henanense*、*C. jiangxiense*<sup>(25)</sup>、*C. aenigma* 及 *C. endophytica*<sup>(42)</sup> 等，本病害主要危害葉片與幼嫩枝條，葉片上的病徵初期為黃綠色小點，擴大後顏色漸漸加深呈赤褐色，病斑面積隨之擴大，最終病斑呈灰色，且在灰色病斑上出現灰黑色小點，即為本菌之子囊盤<sup>(25)</sup>；嫩芽上的病斑為褐色，後期轉為黑褐色，罹病嫩芽容易折斷<sup>(38)</sup>。*Colletotrichum* 屬病原菌具有潛伏感染特性<sup>(32, 43)</sup>，侵染初期不會出現病徵，於 20 - 30°C 及高濕度之適合環境下，病徵會在幼嫩組織出現並且病勢發展迅速<sup>(22)</sup>。由於農友無法由植物外部病徵有效掌握防治時間，一般仰賴化學藥劑對本病害進行控制，但化學藥劑經長期連續使用，容易在田間出現耐藥甚至抗藥性菌株。

臺灣核准登記使用的茶赤葉枯病防治藥劑包括 methyl benzimidazole carbamate (MBC) 殺菌劑中的苯并咪唑類 (benzimidazoles) 及硫脲甲酸類 (thiophanate)<sup>(2, 3)</sup>、三唑類 (triazole)、史托比類 (strobilurins)、醌類 (quinones)、胍類 (guanidines) 及吡喃六碳醣類抗生素 (hexopyranosyl antibiotic) 等，然而尚未有研究詳細調查臺灣茶赤葉枯病族群對各類藥劑

之感受性。MBC類藥劑為殺菌劑抗藥性行動委員會 (Fungicide resistance action committee, FRAC) 所訂定作用機制中B1類之藥劑，其作用位點為 $\beta$ -tubulin，可抑制 $\beta$ -tubulin聚合成微管蛋白 (microtubule)，進而抑制真菌之有絲分裂及細胞分裂<sup>(6)</sup>。已有報導指出，多種真菌對MBC類藥劑產生抗藥性<sup>(6, 12, 27)</sup>，其抗藥性機制主要為 $\beta$ -tubulin (*TUB2*) 基因上核苷酸突變造成胺基酸變異<sup>(9, 17, 18, 19, 21, 27, 28)</sup>，例如第 6、50、167、198、200及240胺基酸之變異均曾被報導為造成抗藥性之原因<sup>(27, 31)</sup>，其中又以點突變造成第 198 (GAG → GCG) 與第 200 (TTC → TAC) 胺基酸發生變異機率最高<sup>(2, 17, 27)</sup>，可使真菌分別產生高度抗藥性與中度抗藥性<sup>(11)</sup>。MBC類藥劑中之免賴得 (benomyl) 及甲基多保淨 (thiophanate-methyl) 普遍使用於茶赤葉枯病防治，然而筆者時常接獲茶農反應防治效果不佳，顯示田間可能已有抗藥性菌株。

近十年間，筆者於田間觀察發現，茶赤葉枯病的發生率及嚴重度均顯著增加，不僅造成茶葉產量降低，更影響了成茶品質。為了提供茶農更精準有效的藥劑防治建議，本研究由臺灣茶赤葉枯病菌族群中選擇41株代表性菌株，測試其對甲基多保淨及免賴得之感受性，以釐清不同地區田間抗感性菌株存在情形，並進一步探討抗感性菌株 $\beta$ -tubulin基因上高突變風險區段之序列變異，以作為未來抗藥性監測之基礎。

## 材料與方法

### 病原菌來源

本研究由茶業改良場病害管理研究室所蒐集之全臺139株茶赤葉枯病菌菌株中<sup>(22)</sup>，依據不同菌種、茶樹品種、取樣縣市及茶園海拔高度等選取41株代表菌株進行測試 (詳如表一)，菌株來自33處不同茶園，部分菌株來自同一處茶園。供試菌株包括*Colletotrichum camelliae* 37株、*C. fructicola* 3株及*C. aenigma* 1株 (*C. fructicola*及*C. aenigma*僅蒐集到少量菌株，因此全部使用於本研究)；取樣茶樹品種包括‘青心烏龍’、‘青心大有’、‘黃心大有’、‘大葉烏龍’、‘四季春’、‘臺茶8號’、‘臺茶12號’、‘臺茶17號’、‘臺茶18號’及‘臺茶20號’等10個品種；取樣地點為來自臺灣主要產茶縣市包括新北市、桃園市、新竹縣、苗栗縣、南投縣、嘉義縣、屏東縣及臺東縣等8縣市，其中包括高海拔之嘉義梅山茶區、中海拔之南投魚池茶區、低海拔之新竹關西茶區等。

### 供試藥劑

選取核准登記使用於茶赤葉枯病之MBC殺菌劑，包括50%免賴得可濕性粉劑 (富農化學工業股份有限公司) 及70%甲基多保淨可濕性粉劑 (瑞總股份有限公司)。

### 藥劑對茶赤葉枯病菌菌絲生長之影響

茶赤葉枯病菌之培養及保存參照Lin等 (2022) 之方法<sup>(22)</sup>，

表一、茶赤葉枯病菌寄主品種及採集地點資訊

TABLE 1. The host tea cultivars and collection sites of *Colletotrichum* spp. isolates

Species	Isolate	Tea cultivar	GPS coordinates	Location	Altitude (m)
<i>Colletotrichum aenigma</i>	HC23	TTES No.17	N24°49'31", E121°10'18"	Hsinchu County	333
<i>C. camelliae</i>	NP01	Chin-shin Oolong	N24°56'28", E121°43'29"	New Taipei City	222
	NP03	Chin-shin Oolong	N24°56'28", E121°43'29"	New Taipei City	222
	NP07	Chin-shin Oolong	N24°56'28", E121°43'29"	New Taipei City	222
	NP08	Chin-shin Oolong	N24°56'28", E121°43'29"	New Taipei City	222
	NP16	TTES No.12	N24°57'39", E121°43'22"	New Taipei City	570
	TY21	TTES No.12	N24°48'55", E121°17'37"	Taoyuan City	294
	TY30	Chin-shin Da Mo	N25°1'52", E121°21'04"	Taoyuan City	207
	TY32	TTES No.12	N24°48'55", E121°17'37"	Taoyuan City	294
	TY38	Chin-shin Da Mo	N25°1'52", E121°21'04"	Taoyuan City	207
	TY46	TTES No.20	N24°49'38", E121°11'34"	Taoyuan City	294
	HC08	TTES No.12	N24°52'09", E121°5'22"	Hsinchu County	228
	HC09	Chin-shin Da Mo	N24°49'20", E121°10'37"	Hsinchu County	297
	HC11	TTES No.17	N24°49'31", E121°10'18"	Hsinchu County	322
	HC13	TTES No.1	N24°49'20", E121°10'37"	Hsinchu County	297
	HC26	Chin-shin Da Mo	N24°49'31", E121°10'18"	Hsinchu County	322
ML01	Huang-shin Da Mo	N24°26'37", E120°45'29"	Miaoli County	388	
ML07	TTES No.12	N24°26'59", E120°46'15"	Miaoli County	320	

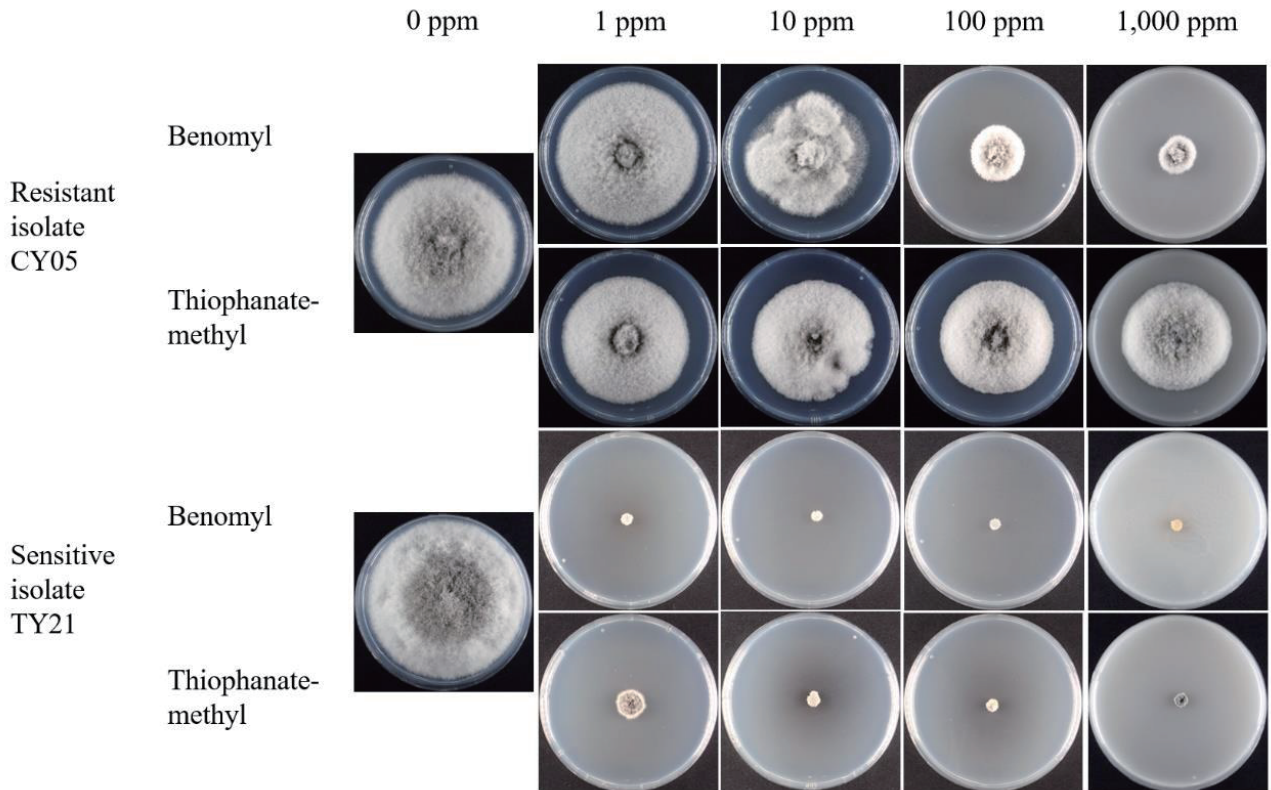
Species	Isolate	Tea cultivar	GPS coordinates	Location	Altitude (m)
<i>C. fructicola</i>	ML18	Chin-shin Da Mo	N24°27'33", E120°46'30"	Miaoli County	240
	ML21	Chin-shin Da Mo	N24°27'35", E120°46'33"	Miaoli County	206
	ML37	Shy Jih Chuen	N24°27'31", E120°46'25"	Miaoli County	282
	NT03	Shy Jih Chuen	N23°46'23", E120°41'36"	Nantou County	166
	NT09	Shy Jih Chuen	N23°46'14", E120°41'45"	Nantou County	157
	NT23	Chin-shin Oolong	N23°45'26", E120°47'06"	Nantou County	303
	NT26	TTES No.18	N24°11'1", E121°13'26"	Nantou County	714
	NT28	Chin-shin Oolong	N24°23'27", E120°56'59.7"	Nantou County	1,300
	CY01	TTES No.12	N23°33'10", E120°40'25"	Chiayi County	1,060
	CY05	Chin-shin Oolong	N23°33'41", E120°40'19"	Chiayi County	1,286
	CY14	Chin-shin Oolong	N23°26'42", E120°29'52"	Chiayi County	600
	PT04	Shy Jih Chuen	N22°40'42", E120°37'13"	Pingtung County	138
	PT06	TTES No.20	N22°40'52", E120°37'22"	Pingtung County	138
	PT11	TTES No.17	N22°40'52", E120°37'22"	Pingtung County	138
	PT16	TTES No.8	N22°40'52", E120°37'22"	Pingtung County	138
	TT02	TTES No.20	N22°54'19", E121°7'43"	Taitung County	179
	TT16	TTES No.8	N22°54'19", E121°7'43"	Taitung County	179
	TT20	Wu Yi	N22°53'58", E121°6'13"	Taitung County	155
	TT26	Da-Yeh Oolong	N22°54'26", E121°7'3"	Taitung County	221
	TT30	Da-Yeh Oolong	N22°54'32", E121°7'5"	Taitung County	199
	TY22	TTES No.12	N24°48'55", E121°17'37"	Taoyuan City	351
	HC29	Chin-shin Da Mo	N24°49'20", E121°10'37"	Hsinchu County	297
	ML63	Chin-shin Da Mo	N24°27'24", E120°46'29"	Miaoli County	190

將41株供試菌株由保存管移植至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA, BD Difco™)，於25°C定溫箱培養7天後，以滅菌之打孔器 (直徑7 mm) 切取菌落邊緣，將菌絲塊移至含有有效成分1,000 ppm (mg a.i./L)、100 ppm、10 ppm、1 ppm等不同濃度藥劑之培養基中心，將試驗培養基置入紙箱中避光，並於室溫下 (25 ± 2°C) 培養7天後，觀察菌絲生長情形，並測量菌落生長直徑，對照處理為不添加任何農藥。本實驗共進行三次獨立試驗，每次試驗每株菌每藥劑共4盤培養皿。計算不同藥劑濃度下之菌絲生長抑制率，菌絲生長抑制率 (%) = [(對照組平均菌落直徑 - 藥劑處理組菌落直徑) / 對照組平均菌落直徑] × 100。利用 “log<sub>10</sub> (藥劑濃度)” 及 “probit (菌絲生長抑制率)” 進行線性迴歸分析，以內插法推估抑制率為50%時之 “log<sub>10</sub> (藥劑濃度)” 數值，再進行反對數 (anti-log<sub>10</sub>) 轉換，即可獲得半效應濃度 (median effective concentration, EC<sub>50</sub>)<sup>(13)</sup>。參考Chung等 (2006) 對菌株抗藥性之分級標準EC<sub>50</sub>值 < 1 ppm為敏感性 (sensitive, S)，1 ppm < EC<sub>50</sub>值 < 10 ppm為低敏感性 (less sensitive, LS)，10 ppm < EC<sub>50</sub>值 < 100 ppm為中度抗性 (intermediately resistant, IR)，EC<sub>50</sub>值 > 100 ppm為高度抗性 (highly resistant, HR)<sup>(12)</sup>。

#### β-tubulin抗藥性突變高風險區段之序列分析

根據前述藥劑測試結果，由採自8個縣市之 *C. camelliae* 菌株中，每縣市選取對兩藥劑感受性為敏感性及高度抗性之菌株各一株，針對轉譯後可涵蓋 β-tubulin第198及200胺基酸 (最常發生抗藥性突變) 的區段，進行PCR增幅及解序。由於採自屏東之菌株皆屬高度抗性，故共有15菌株，其中高度抗性菌株為NP01、TY46、HC08、ML07、NT26、CY05、PT16及TT26，敏感性菌株為NP07、TY21、HC09、ML37、NT23、CY01及TT02。供試菌株於PDA、室溫下培養7天後，刮取菌絲，利用Taco™ Prep 微珠震盪均質機 (GeneReach Biotechnology Corp., Taichung, Taiwan) 進行樣本破碎前處理，後續以Taco™ mini 迷你核酸自動萃取儀 (GeneReach Biotechnology Corp., Taichung, Taiwan) 搭配參考Plant DNA/RNA Extraction Kit (GeneReach Biotechnology Corp., Taichung, Taiwan) 試劑配方進行核酸萃取<sup>(24)</sup>，將DNA回溶至0.1X Tris-EDTA (TE) buffer (1 mM Tris-HCl和0.1 mM EDTA, pH 8.0)，並保存於-20°C冰箱。

參考NCBI上 *C. fructicola* CMM3208之β-tubulin序列 (GenBank accession no. MF111054)(41) 設計引子對TUBC-F (5'-TCGAGCCCTACAACGCCA-3') (nt 806-823) 及TUBC-R (5'-ACGCATGCAAATGTCGTAGA-3') (nt 887-906)，並針對供試菌株DNA進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅，反應條件為：95°C 3分鐘；95°C 30秒、65°C 30秒、



圖一、*Colletotrichum camelliae*抗感性菌株在含有不同濃度免賴得及甲基多保淨之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基上菌絲生長情形。

**Fig. 1.** Mycelial growth of resistant and sensitive isolates of *Colletotrichum camelliae* on potato dextrose agar containing different concentrations of benomyl and thiophanate-methyl.

72°C 1 分鐘，總共30個循環；72°C 5分鐘。PCR 產物於2%洋菜凝膠 (agarose) 中以100V 30分鐘進行電泳分析，並利用 Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories., Co., Ltd., Hercules, CA, USA) 照膠系統觀察。後續將 PCR 產物委由明欣生物科技股份有限公司 (Taipei, Taiwan) 進行單端定序，利用Vector NTI software v. 10.0 (InforMax, California, USA) 將定序結果與*C. fructicola*之  $\beta$ -tubulin核苷酸及胺基酸序列 (GenBank accession no. MF111054 及QBA17676) 進行比對，確認抗感性菌株間是否具有差異。

#### 抗感性*C. camelliae*菌株致病力之比較

參考Lin等 (2022) 之接種方法<sup>(22)</sup>進行*C. camelliae*低感受性菌株NP01、ML07、CY05及高感受性菌株TY21、ML37、TT02之致病力比較。取20年生‘青心烏龍’嫩枝條上無病徵之第三/第四位葉之葉片，以無菌水進行表面清洗3次，待葉面風乾後，將消毒後之葉片以消毒針頭 (將5個針頭固定在同一小木棍上) 輕刺葉表，避免刺穿葉片，再由培養7天之菌落邊緣取直徑7 mm菌絲塊，移至傷口上進行接種，對照組為傷口接種7 mm無菌PDA塊，接種後之葉片置於濕潤的擦手紙上，並於保鮮盒中密封保濕，常溫 (25 ± 2°C) 下培養7天後測量病斑直徑。本實驗共進行三次獨立試驗，每次試驗每種處理4重複 (4葉片)。使

用 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc.) 進行統計分析，首先進行變異數分析 (analysis of variance, ANOVA)，瞭解菌株及試驗區集效應 (blocking effect) 對病斑直徑的影響，再以 Tukey's honestly significant difference (HSD) ( $P < 0.05$ ) 分析菌株間的致病力差異。

## 結 果

#### 茶赤葉枯病菌菌株對免賴得及甲基多保淨之藥劑感受性

來自8縣市之41株茶赤葉枯病菌菌株對免賴得及甲基多保淨之 $EC_{50}$ 值如表二，*C. camelliae*菌株之感受性明顯分成敏感性及高度抗性兩群，而*C. fructicola*及*C. aenigma*之菌株則皆屬於敏感性菌株。同一菌株對二供試藥劑之感受性趨勢相同，唯在甲基多保淨實驗結果中，高度抗性菌株對甲基多保淨之 $EC_{50}$ 值皆大於1,000 ppm，對免賴得之 $EC_{50}$ 值則介於206.2 - 637.4 ppm之間。以地理區域而言，高度抗藥性菌株在取樣的8個縣市茶園中均有出現，佔該區受測菌株之比例為：新北市 1/5、桃園市 1/6、新竹縣 1/7、苗栗縣 3/6、南投縣 3/5、嘉義縣 2/3、屏東縣 4/4及臺東縣 3/5。菌株對藥劑之感受性與茶樹品種無關聯

表二、免賴得及甲基多保淨對41株茶赤葉枯病菌代表性菌株之半效應濃度

**TABLE 2.** The median effective concentrations (EC<sub>50</sub>) of thiophanate-methyl and benomyl on 41 representative isolates of *Colletotrichum* spp. causing brown blight of tea

	Isolate	Benomyl		Thiophanate-methyl		Farming style
		EC <sub>50</sub> (ppm)	Response <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> (ppm)	Response	
<i>Colletotrichum aenigma</i>	HC23	< 1	S	< 1	S	Organic
<i>C. camelliae</i>	NP01	299.7	HR	> 1000	HR	Conventional
	NP03	< 1	S	< 1	S	Conventional
	NP07	< 1	S	< 1	S	Conventional
	NP08	< 1	S	< 1	S	Conventional
	NP16	< 1	S	< 1	S	Organic
	TY21	< 1	S	< 1	S	Organic
	TY30	< 1	S	< 1	S	Organic
	TY32	< 1	S	< 1	S	Organic
	TY38	< 1	S	< 1	S	Organic
	TY46	247	HR	> 1000	HR	Conventional
	HC08	298.5	HR	> 1000	HR	Conventional
	HC09	< 1	S	< 1	S	Organic
	HC11	< 1	S	< 1	S	Conventional
	HC13	< 1	S	< 1	S	Conventional
	HC26	< 1	S	< 1	S	Organic
	ML01	< 1	S	< 1	S	Conventional
	ML07	261.9	HR	> 1000	HR	Conventional
	ML18	611.9	HR	> 1000	HR	Conventional
	ML21	299.7	HR	293.5	HR	Conventional
	ML37	< 1	S	< 1	S	Conventional
	NT03	326.4	HR	> 1000	HR	Conventional
	NT09	356.2	HR	> 1000	HR	Conventional
	NT23	< 1	S	< 1	S	Organic
	NT26	< 1	S	< 1	S	Organic
	NT28	248.5	HR	> 1000	HR	Conventional
	CY01	< 1	S	< 1	S	Conventional
	CY05	621.5	HR	> 1000	HR	Conventional
	CY14	348.3	HR	> 1000	HR	Conventional
	PT04	210.2	HR	> 1000	HR	Conventional
	PT06	439.1	HR	> 1000	HR	Conventional
PT11	206.2	HR	> 1000	HR	Conventional	
PT16	395.7	HR	> 1000	HR	Conventional	
TT02	< 1	S	< 1	S	Organic	
TT16	< 1	S	< 1	S	Organic	
TT20	< 1	S	< 1	S	Organic	
TT26	637.4	HR	> 1000	HR	Conventional	
TT30	607.5	HR	> 1000	HR	Conventional	
<i>C. fruticola</i>	TY22	< 1	S	< 1	S	Organic
	HC29	< 1	S	< 1	S	Organic
	ML63	< 1	S	< 1	S	Conventional

<sup>a</sup> S = sensitive; HR = highly resistant.

性，但與田間耕作管理模式有相關，所有分離自有機管理茶園之茶赤葉枯病菌對供試藥劑敏感性皆高，對藥劑高度抗性之菌株亦皆來自慣行管理茶園。

抗感性*C. camelliae*菌株之  $\beta$ -tubulin 序列差異

針對普遍發生之茶赤葉枯病菌 *C. camelliae*，分析來自不同縣市、對免賴得及甲基多保淨呈現高及低感受性菌株之  $\beta$ -tubulin基因之806-906 bp區段 (對應GenBank accession no. MF111054)，其中定序訊號穩定的區段為841-900 bp，如表三。所有高感受性菌株、所有低感受性菌株在該841-900 bp區段序列一致，高及低感受性菌株僅在第860個核苷酸具有差異，此一點突變造成低感受性菌株之  $\beta$ -tubulin蛋白第198個胺基酸由 glutamic acid變成alanine (密碼子GAG  $\rightarrow$  GCG)。然而，此區段內另一個常見的抗藥性變異—第200個胺基酸由phenylalanine變成tyrosine (密碼子TTC  $\rightarrow$  TAC)，於本試驗中並未發現。

抗感性*C. camelliae*菌株之致病力比較

對免賴得及甲基多保淨藥劑呈現敏感性及高度抗性之 *C. camelliae*菌株，以菌絲塊接種於有傷口之葉片，結果如表四。ANOVA結果顯示，菌株對病斑直徑有顯著影響。對兩藥劑呈高度抗性之菌株NP01、ML07、CY05造成的病斑 (直徑分別為21.2 mm、18.8 mm及17.6 mm) 皆大於敏感性菌株TY21、ML37、TT02造成之病斑 (直徑分別為12.3 mm、13.0 mm、12.4 mm)，其中NP01及ML07之病斑顯著大於TY21及TT02，CY05及ML37之間則無顯著差異。

表四、對免賴得及甲基多保淨具抗性之*Colletotrichum camelliae*菌株之致病力

TABLE 4. Virulence of *Colletotrichum camelliae* isolates resistant and sensitive to benomyl and thiophanate-methyl

	Isolate	Lesion diameter (mm) <sup>a</sup>
Resistant isolates	NP01	21.2 $\pm$ 1.0 a
	ML07	18.8 $\pm$ 0.9 a
	CY05	17.6 $\pm$ 1.3 ab
Sensitive isolates	TY21	12.3 $\pm$ 1.0 c
	ML37	13.0 $\pm$ 1.2 bc
	TT02	12.4 $\pm$ 1.4 c

<sup>a</sup> Data (mean  $\pm$  standard error) with different letters are significantly different according to Tukey's HSD test at  $P < 0.05$ .

討 論

茶赤葉枯病菌可同時危害茶樹葉片及嫩芽，直接造成茶菁減產，是茶葉生產中重要限制因子。目前茶農仰賴化學藥劑進行本病害之防治，其中核准登記使用在茶赤葉枯病之防治藥劑中，MBC類藥劑由於具有廣效性，不僅茶農在茶園中經常使用，在扦插穗之母樹培育及茶苗育苗場更是使用頻繁，但主要以慣行農法耕作的農民漸漸反應部分藥劑出現藥效下降情形。為了解此現象之成因，本研究利用自臺灣主要茶葉產區中不同茶樹品種上分離所得之茶赤葉枯病菌，針對MBC藥劑中免賴得

表三、對免賴得及甲基多保淨具抗性之*Colletotrichum camelliae*菌株之  $\beta$ -tubulin序列分析

TABLE 3. Analysis of the sequences of  $\beta$ -tubulin in the isolates of *Colletotrichum camelliae* resistant (R) and sensitive (S) to benomyl and thiophanate-methyl

Phenotype	Isolate	Sequences (upper: nucleotide; lower: amino acids) <sup>a</sup>
R	NP01	CTGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCCCTCTACGACATTTGC L V E N S D A T F C I D N E A L Y D I C
	TY46	
	HC08	
	ML07	
	NT26	
	CY05	
	PT16	
	TT26	
S	NP07	CTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC L V E N S D E T F C I D N E A L Y D I C
	TY21	
	HC09	
	ML37	
	NT23	
	CY01	
	TT02	

<sup>a</sup> Nucleotide and amino acid positions referred to the  $\beta$ -tubulin sequences of *Colletotrichum fructicola* (GenBank accession nos. MF111054 and QBA17676).

及甲基多保淨之感受性進行調查，結果顯示抗藥性菌株廣泛分布在臺灣各重要茶葉產區，其中抗藥性菌株佔各地區受測菌株之14% - 100% (但由於每縣市僅挑3-5株菌進行測試，故無法代表該縣市實際田間抗藥情形)。其中屏東取樣茶園皆為施用相同藥劑管理，菌株來源差異僅為來自不同茶樹品種，故顯示菌株對藥劑之感受性與茶樹品種無關聯性，但與田間耕作管理模式有相關。

國內外曾針對不同作物上炭疽病菌族群，調查對於FRAC B1類作用機制藥劑之抗藥性，同樣發現抗藥性菌株已普遍存在。國內研究發現，貝芬替與腐絕對芒果與文旦炭疽病菌之孢子發芽與菌絲生長抑制效果不佳<sup>(39)</sup>；葡萄、木瓜、番石榴及芒果上分離之炭疽病菌，部分菌株對免賴得、腐絕及貝芬替呈現抗藥性<sup>(4, 5, 7, 8, 11)</sup>。國外研究發現，日本靜岡茶園之茶赤葉枯病菌*C. camelliae*對免賴得產生抗藥性<sup>(14)</sup>；日本秋田等地區的日本梨、葡萄、蘋果及草莓之*C. gloeosporioides*及*C. acutatum*對甲基多保淨出現不敏感情形<sup>(12)</sup>；在美國、巴西及南非亦針對柑橘、酪梨及芒果上的*C. gloeosporioides*報導對免賴得具有抗藥性<sup>(31, 34)</sup>。

真菌對B1類藥劑產生抗藥性之機制，主要為 $\beta$ -tubulin基因突變。本研究中*C. camelliae*抗藥性菌株出現點突變的位置為第860個核苷酸，造成第198個胺基酸由glutamic acid轉變為alanine。Katan等(1989)及Koenraadt等(1992)均指出，第198個胺基酸從glutamic acid變成alanine或lysine時會產生抗性極強之菌株<sup>(16, 17)</sup>，本研究中第198個胺基酸為alanine的菌株，對甲基多保淨之EC<sub>50</sub>值皆大於1,000 ppm，屬於高度抗性，符合前人研究之觀點。過去曾有研究發現，芒果及草坪炭疽病菌之測試菌株，對多種FRAC B1類作用機制藥劑，包括貝芬替、腐絕及甲基多保淨等呈現交互抗性(cross resistance)<sup>(44, 45)</sup>。雖然本研究僅測試免賴得及甲基多保淨兩種藥劑，但推測抗藥性菌株對於其他B1類藥劑，如國內推薦於茶樹上的嘉賜貝芬及貝芬四克利中之貝芬替，可能已有交互抗性。此外，國內茶赤葉枯病菌抗藥性菌株在 $\beta$ -tubulin基因其他位置是否還有突變，仍有待進一步釐清。

菌株之抗藥性突變若同時影響其他生理機制，可能改變其在寄主或環境中的適應性(fitness)，進而使抗藥性菌株在田間族群中具備高或低競爭優勢。本研究挑選對免賴得及甲基多保淨具抗性及感性之*C. camelliae*菌株各三株進行離葉接種，發現抗性菌株呈現致病力較佳之趨勢。然而許多研究指出，病原菌因 $\beta$ -tubulin第198胺基酸變異而產生抗藥性之菌株，其致病性與感性菌株無顯著差異<sup>(33, 36)</sup>，故本研究觀察到之致病性差異，可能與第198胺基酸變異無關。未來可測試更多菌株，並對抗感性菌株進行其他遺傳分析，深入了解造成致病力差異之原因。

本研究所測試之茶赤葉枯病菌代表性菌株中，對供試藥劑感受性低之抗性菌株皆來自慣行茶園，而來自有機管理或用藥

較少的茶園，對測試之藥劑感受性皆高。然而有不少敏感菌株亦來自慣行管理茶園，經訪談調查發現，該等慣行茶園皆少量使用或不使用MBC類藥劑，顯示田間出現抗藥性菌株與用藥管理方式直接相關。以優勢菌種*C. camelliae*而言，雖然本研究僅由8個縣市各選取3-5株菌進行測試，已發現每個縣市均有高度抗藥性菌株存在。抗藥性菌株一旦在田間出現，即不容易降低其族群<sup>(15, 37)</sup>，故未來應落實不同作用機制藥劑之輪用、混合殺菌劑之使用及導入害物整合性管理(IPM, integrated pest management)等措施<sup>(29, 35)</sup>，才能防範因連續使用單一藥劑造成抗藥性菌株之產生與擴散。未來也應持續進行茶赤葉枯病菌對不同核准登記使用藥劑之感受性測試，才能提供完整的藥劑使用建議，有效防治本病害。

## 謝 辭

本研究承行政院農業委員會科技計畫【110農科-5.4.6-藥-P4(9)、111農科-5.4.6-藥-P4(9)】經費支持，特致謝忱。

## 引用文獻

1. 沈大航、喬文君、劉智、童華榮、陳應娟。2018。茶樹炭疽菌*Colletotrichum gloeosporioides*和*C. acutatum*的生物學特性比較及致病性初探。西南農業學報 31(5):980-985。
2. 李敏郎。2009。植物殺菌劑之使用介紹。pp. 61-89。作物診斷與農藥安全使用手冊。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。臺灣臺中。
3. 許如君。2018。殺菌劑作用機制分類。pp. 20-21。農用藥劑分類及作用機制檢索(第三版)。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。臺灣臺北。
4. 楊怡真、陳以錚、方柏元、鍾文鑫。2014。台灣番石榴瘡痂病菌對苯并咪唑類(benzimidazoles)殺菌劑之感受性探討。植物病理學會刊 23:271-275。
5. 裴家隆、孫守恭。1981。臺灣植物病原真菌抗藥性菌系之調查與研究(一)炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)對Benomyl之抗藥性研究。植物保護學會會刊 23:207-220。
6. 戴肇鋒、蘇秋竹、張瑞璋。2020。殺菌劑抗藥性行動委員會(Fungicide Resistance Action Committee)簡介與臺灣殺菌劑抗藥性研究進展。臺灣農業科學 9:37-54。
7. 謝文瑞、段中漢。1984。葡萄晚腐病菌對滅紋、四氯丹、免賴得及撲克拉之抗藥性。中華植物保護學會會刊 26:33-39。
8. 羅珮昕、黃盈潔、鍾文全、鄭安秀、鍾文鑫。2010。利用PCR-RFLP調查臺南地區抗苯并咪唑類(benzimidazoles)殺菌

- 劑芒果炭疽病菌的發生。植物病理學會刊 19:255-260。
9. Chen, C. J., Yu, J. J., Bi, C. W., Zhang, Y. N., Xu, J. Q., Wang, J. X., and Zhou, M. G. 2009. Mutations in a beta-tubulin confer resistance of *Gibberella zeae* to benzimidazole fungicides. *Phytopathology* 99:1403-1411.
  10. Chen, Y., Qiao, W., Zeng, L., Shen, D., Liu, Z., Wang, X., and Tong, H. 2017. Characterization, pathogenicity, and phylogenetic analyses of *Colletotrichum* species associated with brown blight disease on *Camellia sinensis* in China. *Plant Dis.* 101:1022-1028.
  11. Chung, W. H., Chung, W. C., Peng, M. T., Yang, H. R., and Huang, J. W. 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. *New Biotechnol.* 27:17-24.
  12. Chung, W. H., Ishii, H., Nishimura, K., Fukaya, M., Yano, K., and Kajitani, Y. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Dis.* 90:506-512.
  13. He, L., Li, X., Gao, Y., Li, B., Mu, W., and Liu, F. 2019. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. from different host in Shandong, China. *Plant Dis.* 103:34-43.
  14. Horikawa, T. 1986. Occurrence of benomyl-resistant isolates of *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et Schrenk in tea fields. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:858-859.
  15. Ishii, H. 2006. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Jpn. Agric. Res. Q.* 40(3):205-211.
  16. Katan, T., Elad, Y., and Yunis, H. 1989. Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 38:86-92.
  17. Koenraadt, H., Somerville, S. C., and Jones, A. L. 1992. Characterization of mutations in the  $\beta$ -tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82:1348-1354.
  18. Koller, W. 1999. Chemical approaches to managing plant pathogens. Pages 373-376 in: *Handbook of Pest Management*. J. R. Ruberson, ed., Marcel Dekker, New York.
  19. Kongtragoul, P., Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Izumi, Y., and Akimitsu, K. 2011. Mutation at codon 198 of *TUB2* gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. *J. Plant Prot. Res.* 51:377-384.
  20. Kumar, S., and Deshmukh, R. 2022. Tea market report. <https://www.alliedmarketresearch.com/tea-market> Accessed on 23 Jan 2022.
  21. Li, H., Zhou, G., Zhang, H., Liu, J., and Peng, K. 2012. Resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* to benzimidazole fungicide carbendazim in *Camellia oleifera* nurseries. *Acta Phytopathol. Sin.* 42(2):206-213.
  22. Lin, S. R., Lin, Y. H., Ariyawansa, H. A., Chang, Y. C., Yu, S. Y., Tsai, I., Chung, C. L., and Hung, T. H. 2022. Analysis of the pathogenicity and phylogeny of *Colletotrichum* species associated with brown blight of tea (*Camellia sinensis*) in Taiwan. *Plant Dis.* doi: 10.1094/PDIS-03-22-0509-RE.
  23. Lin, S. R., Yu, S. Y., Chang, T. D., Lin, Y. J., Wen, C. J., and Y. H. Lin. 2021. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola* on tea in Taiwan. *Plant Dis.* 105:710.
  24. Lin, Y. H., and Lin, Y. J. 2016. Recent developments in the molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *J. Nat. Sci.* 2(10):e239.
  25. Liu, F., Weir, B. S., Damm, U., Crous, P. W., Wang, Y., Liu, B., Wang, M., Zhang, M., and Cai, L. 2015. Unravelling *Colletotrichum* species associated with Camellia: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* 35:63-86.
  26. Lu, Q., Wang, Y., Li, N., Ni, D., Yang, Y., and Wang, X. 2018. Differences in the characteristics and pathogenicity of *Colletotrichum camelliae* and *C. fructicola* isolated from the tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Front. Microbiol.* 9:3060.
  27. Ma, Z. H., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24:853-863.
  28. Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., and Freeman, S. 2006. Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96:542-548.
  29. Moyo, P., Cook, G., Basson, E., Steyn, C., Bester, R., Olivier, C., and Fourie, P. H. 2022. Monitoring benzimidazole resistance in *Phyllosticta citricarpa* using a molecular assay targeting mutations in codons 198 and 200 of the  $\beta$ -tubulin gene. *Plant Dis.* 106:1374-1380.
  30. Orrock, J. M., Rathinasabapathi, B., and Richter, B. S. 2020. Anthracnose in U.S. tea: pathogen characterization and susceptibility among six tea accessions. *Plant Dis.* 104:1055-



- 1059.
31. Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* 88:125-130.
  32. Rao, S., and Nandineni, M. R. 2017. Genome sequencing and comparative genomics reveal a repertoire of putative pathogenicity genes in chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. *PLoS ONE* 12: e0183567.
  33. Ratanacherdchai, K., Wang, H. K., Lin, F. C., and Soyong, K. 2010. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. *Afr. J. Microb. Res.* 4(1):76-83.
  34. Sanders, G., Korsten, L., and Wehner, F. C. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:745-752.
  35. Singh, S. B., Mukherjee, I., Kumar, P., Gopal, M., and Kulshretha, G. 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). *J. Environ. Sci.* 43(4):300-306.
  36. Suwan, N. and Na-Lampang, S. 2013. Characterization and evaluation of carbendazim-resistance response of *Colletotrichum* species. *J. Agri. Tech.* 9(7):1883-1894.
  37. Tashiro, N., Manabe, K., and Ide, Y. 2012. Emergence and frequency of highly benzimidazole-resistant *Colletotrichum gloeosporioides*, pathogen of Japanese pear anthracnose, after discontinued use of benzimidazole. *J. Gen. Plant Pathol.* 78:221-226.
  38. Thseng, F. M. 2004. Tea Brown Blight. Pages 91-92 in: *Plant Protection Illustration 4- Tea Protection*. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan.
  39. Tsai, J. N., Ann, P. J., Hu, C. Y., and Cheng, S. F. 2006. Evaluation of fungicides for suppression of mycelial growth and conidial germination of *Colletotrichum* species isolated from mango, pomelo and banana fruit. *Plant Pathol. Bull.* 15:39-54.
  40. Tzean, S. S., Tzeng, K. C., Chang, C. A., Tsay, T. T., and Yen, H. F. 2019. *List of Plant Diseases in Taiwan*. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taiwan.
  41. Veloso, J. S., Cãmara, M. P., Lima, W. G., Michereff, S. J., and Doyle, V. P. 2018. Why species delimitation matters for fungal ecology: *Colletotrichum* diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. *Fungal Biol.* 122:677-691.
  42. Wang, Y. C., Hao, X. Y., Wang, L., Xiao, B., Wang, X. C., and Yang, Y. J. 2016. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. *Sci. Rep.* 6:35287.
  43. Weir, B. S., Johnston, P. R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73:115-180.
  44. Wong, F. P., Cerda, K. A., Hernandez-Martinez, R., and Midland S. L. 2008. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. *Plant Dis.* 92(2):239-246.
  45. Zhang, L. H., Li, M., Gao, Z. Y., Zhang, F. Z., Xie Y. X., Hu, M. J., and Yang, Y. 2013. Screening and cross-resistance analysis of alternative fungicides against carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from mango (*Mangifera indica* L.). *Acta Hort.* 992:415-422.

## ABSTRACT

Shiou-Ruei Lin, Yu-Ching Chang, Ying-Hong Lin, Chia-Lin Chung\*, and Ting-Hsuan Hung\*. 2022. Analysis of the sensitivity to benomyl and thiophanate-methyl for *Colletotrichum* spp. associated with brown blight of tea in Taiwan. *J. Plant Med.* 64(4): 139-148.

\*Corresponding author, E-mail: clchung@ntu.edu.tw ; thhung@ntu.edu.tw

Brown blight disease mainly damages tea leaves and young branches, resulting in a decline in tea quality and yield. Tea farmers mainly rely on chemical control, however, in the past ten years, they have reported that the registered fungicides are not effective. To understand whether the population of the pathogen associated with brown blight of tea in Taiwan has emerged resistance to methyl benzimidazole carbamate (MBC) fungicides, 37 isolates of *Colletotrichum camelliae*, three isolates of *C. fructicola*, and one isolate of *C. aenigma* from eight major tea-producing counties and cities in Taiwan were tested for mycelial growth on potato dextrose agar containing 1000 ppm (mg a.i./L), 100 ppm, 10 ppm, and 1 ppm of benomyl and thiophanate-methyl. While *C. camelliae* isolates highly and lowly sensitive to the fungicides were found in each county/city (except that *C. camelliae* from Pingtung County were all resistant), the isolates of *C. fructicola* and *C. aenigma* were

all highly sensitive. All 41 isolates tested showed similar trend of sensitivity or resistance to the two fungicides, and the sensitivity of the resistant isolates to thiophanate-methyl was lower. For 15 isolates of *C. camelliae* from different counties and cities, a segment of  $\beta$ -*tubulin* that is known to have the most frequent fungicide resistance mutations was sequenced. The sensitive and resistant isolates differed only at the 860th nucleotide, which caused the 198th amino acid changed from glutamic acid (GAG) to alanine (GCG). The phenomenon conforms to the mechanism of the emergence of high fungicide resistance in the literature. The fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. associated with brown blight of tea was related to the modes of management in the field. The resistant isolates were all from conventional tea plantations, and the isolates from the plantations organically managed or with less fungicide application showed high sensitivity. This study indicated that *C. camelliae* isolates resistant to MBC fungicides have been widely present in many tea-growing areas across Taiwan. It is recommended that rotation or mixed use of fungicides with different modes of action, together with integrated pest management measures should be implemented to effectively control the disease.

**Keywords:** resistance, point mutation, fitness, virulence, *Colletotrichum camelliae*, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum aenigma*