

對賽普護汰寧不同感受性草莓灰黴病菌之生理與生化特性

段中漢^{1*}、陳冠穎¹

摘要

段中漢、陳冠穎。2021。對賽普護汰寧不同感受性草莓灰黴病菌之生理與生化特性。臺灣農藥科學 10 : 91-107。

草莓灰黴病菌為高風險易產生抗藥性的植物病原真菌，賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) 則是國內外常用於防治灰黴病的殺菌劑。供試 12 株草莓灰黴病菌對賽普護汰寧具不同感受性，GX2 菌株對藥劑感受性最低 ($EC_{50}=2.986 \mu\text{g/mL}$)，D9 菌株最高 ($EC_{50}=0.023 \mu\text{g/mL}$)，兩者感受性差異倍數比達 129.8。低感藥菌株 GX2 具多重生理生化特性，包括在 12~28°C 溫度試驗中生長速率最慢，細胞膜通透性最高及對過氧化氫最不敏感。在抗滲透壓試驗中，於添加 0.8 M 山梨糖醇的培養基中，多數高感藥菌株所受生長抑制率較高，但在添加 0.5 M 氯化鉀的培養基中，高低感藥菌株間的生長抑制率未有明顯差異。在過氧化氫培養基試驗中，高感藥菌株受過氧化氫抑制程度，明顯高於低感藥菌株。供試菌株的相對電導度均隨著測定時間而漸次增加，高感藥菌株的最終相對電導度介於 38~56%，低感藥菌株則為 59~69%，顯示低感藥菌株的細胞膜通透性較高感藥菌株為高。供試菌株細胞的草酸含量以高感藥菌株較高，甘油含量則在高低感藥菌株間多寡互見，而胞外多糖含量在高低感藥菌株間差異亦不明顯。

關鍵詞：草莓、灰黴病菌、藥劑感受性、護汰寧、生理生化特性

緒言

草莓灰黴病是由 *Botrytis cinerea*

Persoon 所引起，為草莓結果期常見的病害。本病原菌寄主範圍廣泛，為世界各地普遍存在且重要的植物病原真菌⁽⁸⁾，臺灣已紀錄受其危害的作物超過數十種，涵蓋

接受日期：2021 年 8 月 17 日

* 通訊作者。E-mail: chduan@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

果樹、蔬菜及花卉等⁽⁴⁾。目前灰黴病的防治仍以施用化學藥劑為主，但由於灰黴病菌遺傳變異大，生長快速且產孢量多，是抗藥性風險較高的病原菌之一^(17, 18, 21)。由於灰黴病菌已對多種作用機制 (mode of action) 殺菌劑產生抗藥性，且抗藥族群發展迅速，致使全球各地的灰黴病防治均面臨巨大挑戰^(5, 21, 24, 32)。護汰寧 (fludioxonil) 屬苯吡咯類 (phenylpyrroles) 藥劑，為一種廣效型殺菌劑⁽²⁶⁾，在臺灣也常用於灰黴病的防治⁽¹⁾，惟以賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) 混合劑販售。護汰寧的殺菌機制係抑制病原真菌經由絲裂原所活化之蛋白質激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 的活性，此類蛋白質激酶參與滲透調節有關的訊息傳遞 (osmotic signal transduction)⁽³⁾。組胺酸蛋白質激酶 (histidine protein kinases, HPKs) 即屬此類廣泛存在於真菌中的訊息傳遞酵素，主要功能為催化磷酸根 (phosphate) 由腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 轉移至蛋白質上的組胺酸殘基 (histidine residue)⁽³³⁾。真菌的組胺酸蛋白質激酶尚影響其他多種生理功能，不但參與抗滲透壓力 (osmotic stress) 與抗氧化壓力 (oxidative stress) 反應，且與菌絲生長、抗藥性及致病性均有關⁽¹¹⁾。例如，由菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) *Shk1* 基因編碼 (encode) 產生的一種組胺酸蛋白質激酶 (putative class III HPK)，即參與調節菌核病菌細胞中甘油的累積量，該基因如被破壞

(disruption)，將導致菌核病菌對苯吡咯及二羧酰亞胺 (dicarboximides) 等類殺菌劑產生抗藥性並增加對高滲透壓逆境 (hyperosmotic stress) 及由過氧化氫所造成的氧化壓力逆境 (H_2O_2 -induced oxidative stress) 的敏感性 (sensitivity)，且基因突變株的菌絲生長明顯減緩又不形成菌核^(11,12)。而在 *B. cinerea* 亦有類似功能的基因 *Daf1*，如發生突變會導致菌株對二羧酰亞胺類殺菌劑的抗藥性及對滲透壓敏感⁽⁷⁾。此外，亦有報告指出，抗護汰寧菌株會在一些生理、生化特性項目上，例如菌絲的甘油 (glycerol)、胞外多糖 (exopolysaccharide) 及草酸 (oxalic acid) 等的含量，以及細胞膜通透性 (cell membrane permeability)、抗滲透壓及抗氧化逆境等生理特性上與野生菌株 (wild type) 存有差異，且係肇因於組胺酸蛋白質激酶基因突變，而這也是病原菌產生抗藥性的分子生物學因子及生化學現象^(11, 12)。

賽普洛為賽普護汰寧混合劑的另一成分，屬蛋胺酸生合成 (methionine biosynthesis) 抑制劑⁽³⁾。國外有報告指出，灰黴病菌對賽普洛有較嚴重的抗藥性，但對護汰寧則否^(13, 14, 16)，亦有報告稱其已對護汰寧產生抗藥性^(2, 18, 20, 27)。由於賽普護汰寧是臺灣許多作物灰黴病防治用藥，因而灰黴病菌對賽普護汰寧的抗藥性問題勢須面對。事實上，臺灣草莓灰黴病菌對賽普護汰寧的抗藥性應已發生⁽²⁾。為面對此抗藥性挑戰，我們有必要就灰黴病菌對賽普護汰寧的感受性現況，及菌株

因感受性降低而隨之改變的生理及生化特性進行探討，因這與抗藥性機制 (mechanism) 密切關聯 (6, 27)。本研究因無法獲得護汰寧單劑成品，因而各項試驗均使用賽普護汰寧混合劑，劑量亦以混合劑的主成分 (active ingredient, a.i.) 計算。本研究之目標設定為 (i) 草莓灰黴病菌對賽普護汰寧感受性調查，(ii) 比較對賽普護汰寧不同程度感受性菌株在生理及生化特性的差異，包括溫度、滲透壓及氧化壓力等環境因子對菌絲生長之影響，菌絲細胞膜通透性，以及菌絲細胞的甘油、草酸和胞外多醣含量之差異等，期待這些試驗結果對灰黴病菌抗藥性機制的理解及田間抗藥性族群的管理能有所助益。

材料與方法

一、菌株採集及對賽普護汰寧之感受性調查

為採集供試菌株於2018年3月及2019年3月，分別前往臺灣各草莓產地採集罹灰黴病之果實供分離病原菌。灰黴病菌的分離、培養及保存等方法悉參照作者已發表之報告 (2)。供試藥劑賽普護汰寧為混合劑，內含賽普洛及護汰寧兩種成分 (37.5% cyprodinil+25% fludioxonil，臺灣先正達)，劑型為水分散性粒劑 (water dispersible granules, WG)。前述分離所得菌株計67株，逢機選取其中12支菌株供試 (表一)，而以半數抑制濃度 (median

表一、草莓灰黴病菌對賽普護汰寧的半數抑制濃度

Table 1. EC₅₀ values of cyprodinil+fludioxonil of *Botrytis cinerea* strawberry isolates

Isolate	EC ₅₀ ¹⁾	RF ²⁾	Origin	Date collected
D1	0.353	15.3	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D9	0.023	1.0	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D11	1.086	47.2	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D13	0.073	3.2	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D17	1.068	46.4	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D20	0.239	10.4	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D24	0.192	8.3	Dahu, Miaoli	2019.03.12
G3	0.469	20.4	Guoxing, Nantou	2018.03.19
G5	1.101	47.9	Guoxing, Nantou	2018.03.19
GX2	2.986	129.8	Guanxi, Hsinchu	2019.03.12
GX7	0.074	3.2	Guanxi, Hsinchu	2019.03.12
W1	0.104	4.5	Wufeng, Taichung	2019.03.05

¹⁾ EC₅₀: median effective concentration, unit: µg a.i./mL

²⁾ RF = resistance factor; a ratio which shows the EC₅₀ value of each isolate relative to the EC₅₀ value of D9 (the lowest EC₅₀ value in this study)

effective concentration, EC_{50} , unit: $\mu\text{g}/\text{mL}$) 為指標區分菌株對藥劑之感受性。供試菌株先接種於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA, Difco™, USA) 於 24°C 無光照定溫箱培養 3 日作為後續試驗的接種源 (以下同)。供試藥劑以其有效成分 (a.i.) 為 0、0.01、0.1、1、10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之最終劑量加入融溶之半量馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (half-strength potato dextrose broth (1/2 PDB) + 2% agar, Difco™, USA), 再倒入直徑 9 cm 培養皿備用。以直徑 5 mm 圓形打孔器切取接種源菌落周緣之菌絲塊置於前述加藥培養基平板中央, 另以未加藥劑者為對照處理, 上述處理均置於 24°C 無光照定溫箱培養 3 日。以通過菌落中心點之兩條垂直線為準, 量取菌落直徑, 並以二者之平均值為該菌落直徑度量 (單位: mm)。每菌株每藥劑濃度 4 重複。試驗結果以半數抑制濃度 (50% effective concentration, EC_{50}) 表示菌株對藥劑之感受性, 半數抑制濃度得自以菌落直徑相對於各藥劑濃度所導出的直線迴歸方程式 (linear regression)。另以最感藥菌株之 EC_{50} 為分母, 而以其他各菌株之 EC_{50} 為分子, 計算各菌株之抗性倍數比 (resistance factor, RF) ⁽⁶⁾, 作為評估菌株對藥劑感受性程度的指標。

二、溫度對菌絲生長之影響測定

本試驗先以前述方法製備供試菌株之接種源, 再以打孔器切取菌落周緣之菌絲

塊, 置於直徑 9 cm 之馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (PDA) 平板中央, 於 8 至 32°C, 間隔 4°C 之無光照定溫箱培養 3 日。再以通過菌落中心點之兩條垂直線為準, 量取菌落直徑, 並以二者之平均值作為該菌落之直徑度量。每菌株每溫度 4 重複。

三、菌株對滲透壓及氧化壓力之感受性測定

先以馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(PDA) 為基礎培養基, 分別製作最終劑量為 0.5 M 氯化鉀 (KCl)、0.8 M 山梨糖醇 (D-sorbitol) 及 0.05 M 過氧化氫 (H_2O_2) 之各種供試培養基, 另以無添加物之基礎培養基為對照 ^(6, 11, 27)。將供試菌株的菌絲塊接種於上述培養基, 於 24°C 無光照定溫箱培養 3 日, 再以上述方法量取菌落直徑。每菌株每處理 4 重複。上述處理對供試菌株菌絲生長之抑制百分率計算式為 $[1 - (\text{試驗處理之菌落直徑} / \text{對照處理之菌落直徑})] \times 100\%$ 。

四、菌絲細胞膜通透性測定

切取供試菌株接種源菌落周緣菌絲塊放入裝有 50 mL 馬鈴薯葡萄糖液體培養基 (PDB) 之 125 mL 三角瓶, 於轉速 175 rpm 之 24°C 黑暗定溫箱培養 5 日。將培養所得之菌絲以布氏漏斗 (Büchner funnel) 搭配真空幫浦 (vacuum pump, LAB-300, Uni-Crown, Taiwan) 收集之。收集所得菌絲先

以無菌之二次蒸餾水清洗 2 次，再以真空幫浦抽 10 min，以去除水分。秤取 0.5 克菌絲並將之懸浮於 20 mL 之二次蒸餾水，以電導度計 (electrical conductivity meter, IQ 170, IQ Scientific Instruments, Inc., USA) 量測菌絲塊之細胞膜通透性，自 0 分鐘起，每次量測間隔 60 min，計量測 4 次，歷時 180 min。最後以 100°C 沸水煮 5 min，待冷卻後量測最終電導度。相對電導度 (relative electrical conductivity, RC) 百分率之計算式為 $RC = [\text{conductivity of each time interval} / \text{final (boiled) conductivity}] \times 100\%$ 。每菌株 3 重複^(12, 34)。

五、菌絲細胞甘油含量測定

將供試菌株菌絲塊分別接種於馬鈴薯葡萄糖液體培養基 (PDB)，依前述液體培養條件培養 5 日。取培養所得之 0.5 g 菌絲加入 20 mL 無菌二次蒸餾水及 0.2 g 石英砂 (quartz sand) 於研鉢中研磨。研磨液裝入 50 mL 離心管並於 80°C 水浴槽加熱 15 min，復於桌上型高速冷凍離心機 (Refrigerated bench-top centrifuge 3K30, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany) 以 24°C，8,500 rpm 離心 10 min。取 10 mL 上清液，加入 1 mL 硫酸銅水溶液 (CuSO_4 , 0.05 g/mL) 與 3.5 mL 氫氧化鈉水溶液 (NaOH , 0.05 g/mL)，再用同一離心機以 15,000 rpm 離心後，取其上清液以分光光譜儀 (spectrophotometer, DU 730, Beckman Coulter, Inc., USA) 之 630 nm 波

長測其吸光值。每菌株 3 重複。另以濃度分別為 0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 之甘油水溶液，依上述方法測其吸光值，以製作標準曲線 (standard curve)。各菌株之甘油含量則依據標準曲線推算之^(11, 12, 27, 34)。

六、菌絲細胞草酸含量測定

將供試菌株以前述方法經馬鈴薯葡萄糖液體培養基 (PDB) 培養 5 日所得之培養液，以孔徑 0.2 μm 過濾膜 (disposable syringe filter unit, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) 過濾後，取其濾液 (supernatant) 供後續處理。以 1 mL 濾液加入 2 mL 氯化鐵水溶液 (FeCl_3 , 0.5 mg/mL) 與 20 mL 氯化鉀緩衝液 (HCl-KCl buffer solution, KCl 50 mM, pH=2)，並加入 1.2 mL 磺基水楊酸水溶液 (sulfosalicylic acid, 5 mg/mL)，震盪 10 sec 後，靜置於 24°C 定溫箱 30 min，再以分光光譜儀之 510 nm 波長測其吸光值。每菌株 3 重複。另以濃度分別為 0、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL 之 1 mL 草酸鈉水溶液 ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 以同上之方法測其吸光值並製作標準曲線，菌株培養液之草酸含量係依據標準曲線推算之⁽¹²⁾。

七、菌絲細胞外多糖含量測定

將供試菌株以前述方法經馬鈴薯葡萄糖液體培養基 (PDB) 培養 5 日所得之培養液，以孔徑 0.2 μm 過濾膜過濾後之濾液

供後續處理。取 1 mL 濾液加 7 mL 二次蒸餾水，混合後取其 2 mL 並加入 1 mL 酚水溶液 (5% phenol) 震盪均勻，再加 5 mL 濃硫酸 (H_2SO_4) 混合，靜置於 24°C 定溫箱 30 min，而後以分光光譜儀之 490 nm 波長測其吸光值。每菌株 3 重複。另以葡萄糖含量分別為 0、0.05、0.5、1、2、3 mg/mL 之水溶液以相同之方法測其吸光值並製作標準曲線，菌株培養液之胞外多糖含量係依據標準曲線推算之⁽¹²⁾。

八、統計分析

各項試驗所得數據，分別以 Microsoft Office, Excel 2019 (Microsoft Corporation, USA) 及 SPSS Statistics 22.0 (IBM, USA) 套裝軟體作統計分析。各項試驗之數據凡需比較處理間差異者，先進行顯著性分析 (one-way analysis of variance, ANOVA)，差異達 5% 顯著水準，則對處理間作費雪最小顯著差異測驗 (Fisher's protected least significant difference test, LSD, 5%)。分析結果並依需要以 Microsoft Office Excel 軟體繪圖。

結果

一、灰黴病菌菌株對賽普護汰寧之感受性

供試 12 株草莓灰黴病菌對賽普護汰寧呈現不同感受性，半數抑制濃度 (EC_{50})

大於 2.000 $\mu\text{g/mL}$ 者有 1 株，介於 1.000~2.000 $\mu\text{g/mL}$ 者有 3 株，介於 0.100~0.999 $\mu\text{g/mL}$ 者有 5 株，小於 0.100 $\mu\text{g/mL}$ 者有 3 株。供試菌株對藥劑之高感受性 (較感) 菌株的數量比低感受性 (較抗) 菌株為多。D9 菌株感受性最高，GX2 菌株感受性最低。以 D9 之 $EC_{50}=0.023$ $\mu\text{g/mL}$ 為分母，而以其他各菌株之 EC_{50} 為分子，可得出各菌株之抗性倍數比 (RF)。抗性倍數比以 D13 最低，為 3.2，GX2 最高，達 129.8，多數低於 50，超過 1/3 菌株在 10 以下 (表一)。

二、溫度對菌絲生長之影響

各菌株在 8~28°C 均可生長，生長速率由低溫向高溫逐漸增加，至 24°C 達於高峰，至 28°C 又急遽下降，32°C (含) 以上則完全不生長，最適生長溫度均介於 20~24°C。就溫度對菌株生長之影響而言，大多數菌株間並無顯著差異，但對藥劑感受性最低之 GX2 菌株在各溫度 (8°C 除外) 的生長速率均較其他菌株為慢，尤以 24~28°C 最為明顯 (表二)。

三、菌絲細胞對滲透壓及氧化壓力之感受性

供試菌株對山梨糖醇及氯化鉀兩種化合物所構成的滲透壓生長逆境的反應不同。在添加 0.8 M 山梨糖醇的培養基生長試驗中，多數高感藥菌株的生長抑制率較

高，表示其受到滲透壓的影響而生長速率減緩，又以 G3 菌株最為明顯，而低感藥菌株所受抑制程度相對較低 (圖一)。但在添加 0.5 M 氯化鉀的試驗中，高低感藥菌株間的生長抑制率未具規則性 (圖二)。此外，屬高感藥的 D1 菌株在兩種培養基中的生長均有被促進作用 (圖一、二)。在過氧化氫培養基的試驗中，高感藥菌株所受之

表二、溫度對草莓灰黴病菌菌絲生長之影響

Table 2. Effect of temperature on the growth of *Botrytis cinerea* strawberry isolates

Temperature (°C)	Colony diameter (mm) ¹⁾			
	D1	D9	D11	D13
8	25.0±0.6 e	27.3±0.8 e	32.8±0.8 e	15.5±0.6 d
12	51.0±1.2 c	31.8±0.8 d	48.8±0.8 c	33.0±3.0 c
16	63.8±0.6 b	37.3±0.3 c	57.3±0.6 b	44.5±1.3 b
20	71.0±0.4 a	48.8±0.5 a	76.0±0.9 a	69.5±2.2 a
24	72.3±1.5 a	50.3±0.9 a	75.0±0.8 a	64.0±1.4 a
28	43.8±0.9 d	40.3±1.0 b	41.5±0.6 d	40.8±0.9 b
32	0.0±0.0 f	0.0±0.0 f	0.0±0.0 f	0.0±0.0 e

表二、(續)

Table 2. (continued)

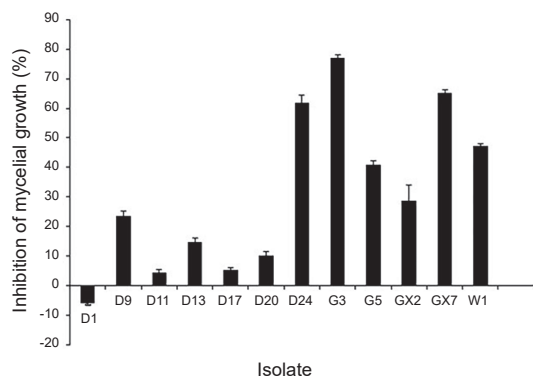
Temperature (°C)	Colony diameter (mm) ¹⁾			
	D17	D20	D24	G3
8	27.8±0.5 d	28.8±0.6 f	23.5±0.3 d	15.0±0.9 e
12	45.0±1.8 b	51.5±1.7 d	41.5±2.2 c	31.3±0.9 d
16	48.8±1.7 b	60.8±1.1 c	55.3±1.0 b	44.3±1.3 b
20	70.5±0.6 a	71.3±0.6 b	66.8±1.6 a	64.0±0.4 a
24	72.4±0.3 a	78.5±0.5 a	67.8±2.3 a	64.0±0.7 a
28	39.5±1.2 c	44.0±0.9 e	56.5±0.5 b	41.3±0.5 c
32	0.0±0.0 e	0.0±0.0 g	0.0±0.0 e	0.0±0.0 f

表二、(續)

Table 2. (continued)

Temperature (°C)	Colony diameter (mm) ¹⁾			
	G5	GX2	GX7	W1
8	28.8±0.9 d	21.3±0.5 c	13.5±0.6 e	10.8±0.3 e
12	43.5±0.6 c	16.3±0.3 d	28.3±0.6 d	35.5±1.3 c
16	52.5±1.7 b	33.5±0.3 a	36.3±0.3 c	52.8±0.5 b
20	75.5±0.5 a	34.5±1.3 a	62.8±1.4 b	73.0±0.4 a
24	72.8±0.5 a	29.0±1.2 b	66.3±0.6 a	73.5±0.3 a
28	49.3±1.3 b	12.8±1.1 e	28.8±0.5 d	30.3±0.5 d
32	0.0±0.0 e	0.0±0.0 f	0.0±0.0 f	0.0±0.0 f

¹⁾ Mean±standard error (n=4). Mean values within the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level according to Fisher's protected least significant difference test. Data were obtained following three days of growth on PDA



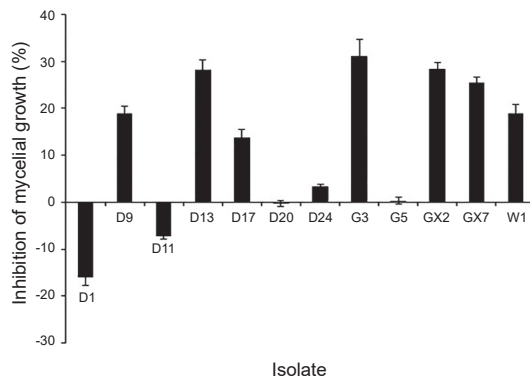
圖一、草莓灰黴病菌對山梨糖醇構成滲透壓之感受性。

Fig. 1. Sensitivity of *Botrytis cinerea* strawberry isolates to osmotic stress generated by 0.8 M D-sorbitol. Inhibition percentage = $[1 - (\text{colony diameter of treatment} / \text{colony diameter on PDA})] \times 100\%$. Data were obtained following three days of growth on PDA. Values are means \pm S.E. Bars denote the standard error of 4 replications.

抑制，大多較低感藥菌株為高，亦即高感藥菌株的生長受到過氧化氫抑制的程度較大，因而生長速率較慢（圖三）。

四、菌絲細胞膜通透性

供試菌株的菌絲細胞膜通透性以相對電導度 (RC, %) 表示，百分率愈高則通透性愈高。各菌株的相對電導度均隨著測定時間而逐漸增加，前期增速快，後期增速慢。低感藥菌株的最終 (180 min) 相對電導度介於 59.0~68.5%，均較高感藥菌株的 38.2~56.1% 為高。且此一趨勢在各時



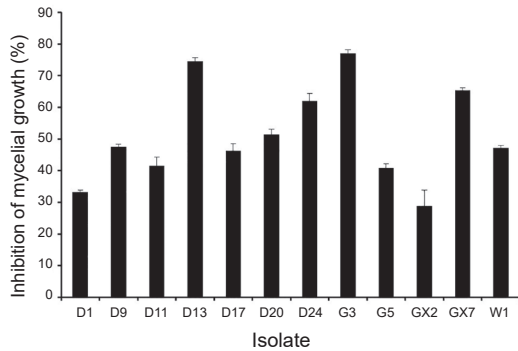
圖二、草莓灰黴病菌對氯化鉀構成滲透壓之感受性。

Fig. 2. Sensitivity of *Botrytis cinerea* strawberry isolates to osmotic stress generated by 0.5 M KCl. Inhibition percentage = $[1 - (\text{colony diameter of treatment} / \text{colony diameter on PDA})] \times 100\%$. Data were obtained following three days of growth on PDA. Values are means \pm S.E. Bars denote the standard error of 4 replications.

段大致相同。感藥程度最低的菌株 GX2 亦有最高相對電導度，顯示低感藥菌株的細胞膜通透性普遍高於高感藥菌株（圖四）。

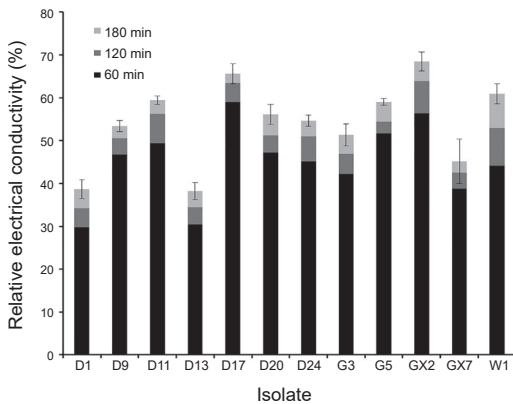
五、菌絲細胞甘油含量

供試菌株的菌絲細胞甘油含量最高者為 G3，最低者為 D24，均屬高感藥菌株，低感藥菌株的細胞甘油含量則高低互見，亦即菌株細胞之甘油含量未因其對賽普護汰寧之感受性差異而具規則性，且絕大部分菌株重複間變異大（圖五）。



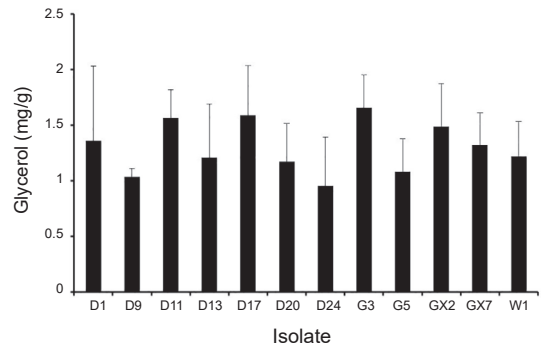
圖三、草莓灰黴病菌對過氧化氫構成氧化壓力之感受性。

Fig. 3. Sensitivity of *Botrytis cinerea* strawberry isolates to oxidative stress generated by 0.05 M H₂O₂. Inhibition percentage = [1 - (colony diameter of treatment/colony diameter on PDA)] × 100%. Data were obtained following three days of growth on PDA. Values are means ± S.E. Bars denote the standard error of 4 replications.



圖四、草莓灰黴病菌菌絲的相對電導度。

Fig. 4. Relative electrical conductivity of mycelia from *Botrytis cinerea* strawberry isolates at various time intervals. Values are means ± S.E. Bars denote the standard error of 4 replications of last measurement.



圖五、草莓灰黴病菌菌絲的甘油含量。

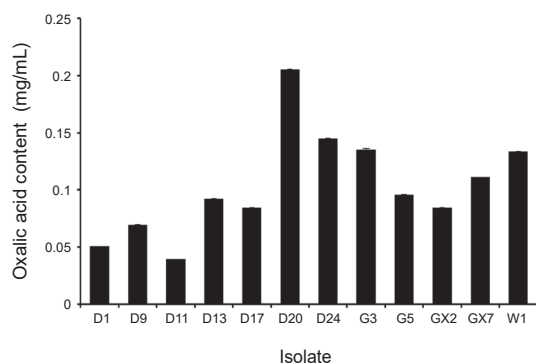
Fig. 5. Mycelial glycerol content of *Botrytis cinerea* strawberry isolates. Glycerol content was measured following five days of growth on PDB. Values are means ± S.E. Bars denote the standard error of 3 replications.

六、菌絲細胞草酸含量

供試菌株菌絲細胞的草酸含量普遍以高感藥菌株較高，尤以 D20 為最，其次為 D24, G3 及 W1 等菌株，均屬高感藥性菌株，而低感藥菌株的草酸含量普遍較低 (圖六)。

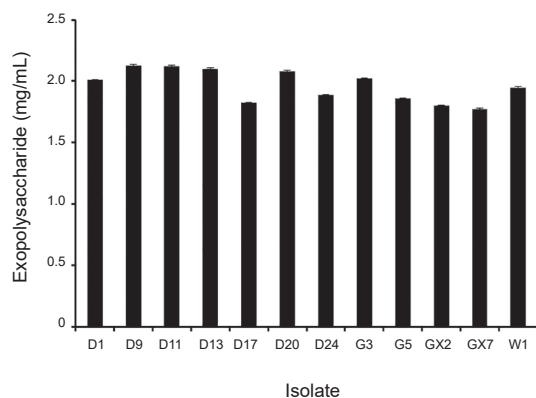
七、菌絲細胞外多糖含量

供試菌株中，多數高感藥菌株的菌絲細胞外多糖含量比低感藥菌株略高，其中尤以高感藥菌株 D9 為最，但測試中亦得知其他低感藥菌株如 D11 也有很高的胞外多糖。總體言之，高低感藥菌株間的胞外多糖含量並未有明顯差異 (圖七)。



圖六、草莓灰黴病菌菌絲的草酸含量。

Fig. 6. Mycelial oxalic acid content of *Botrytis cinerea* strawberry isolates. Oxalic acid content was measured following five days of growth on PDB. Values are means \pm S.E. Bars denote the standard error of 3 replications.



圖七、草莓灰黴病菌菌絲的胞外多糖含量。

Fig. 7. Mycelial exopolysaccharide content of *Botrytis cinerea* strawberry isolates. Exopolysaccharide content was measured following five days of growth on PDB. Values are means \pm S.E. Bars denote the standard error of 3 replications.

討論

由 *B. cinerea* 所感染的作物灰黴病是以施用化學藥劑為主要防治方法，但所引發的抗藥性問題也一直是植物病害防治上的重要課題⁽³⁰⁾。賽普洛與護汰寧單劑或其混合劑是臺灣地區與國外多種作物灰黴病常用的防治藥劑，但灰黴病菌對此二種藥劑卻可能存有不同感受性。多數情況是，對賽普洛的抗藥程度較高，而對護汰寧則較低^(13, 14, 15, 25, 29, 31, 35)，然而抗護汰寧的灰黴病菌族群確已發生^(2, 20, 23, 27, 28)。本研究測定 12 株草莓灰黴病菌對賽普護汰寧的半數抑制濃度 (EC₅₀)，其數值最高與最低者差距近 130 倍，其餘在數倍至數十倍之間 (表一)，顯示本菌對賽普護汰寧的抗藥性正在發展，但低感藥菌株 (對藥劑較具抗性) 仍很少，且其最高的半數抑制濃度僅 2.986 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，遠低於中國江蘇及山東等省抗護汰寧菌株之超過 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁽²⁷⁾，因而其抗藥性程度在臺灣尚非嚴重。筆者曾以同本研究之方法用終量為 50 μg a.i./mL 之賽普洛添加至洋菜培養基 (fungicide-amended agar medium)，測其對本研究各菌株菌絲生長的影响，結果與對照處理相較，幾無抑制作用，亦即灰黴病菌對賽普洛呈現普遍且一致的抗藥性 (筆者，未發表)。據此推測，灰黴病菌對賽普護汰寧的感受性差異，主要應來自其對護汰寧的反應。現既已出現對護汰寧低感藥菌株，就有必要對菌株之感藥性程度及其相關的生理及生化特性作探討，因這些

特性的改變可能源自抗藥性相關基因的改變抑或僅止於生理上的適應 (adaptation)，而這些研究結果將回饋我們對抗藥性機制的理解。

護汰寧作為殺菌劑應可有效抑制灰黴病菌的菌絲生長與孢子發芽，已知其作用機制為阻斷病原菌的滲透調節訊息傳遞^(27, 38)。存在於 *B. cinerea* 的組胺酸激酶 (Group III HK) 是護汰寧作用的標的部位 (target site)⁽³⁷⁾，其基因如發生突變將導致菌株抗護汰寧並增加對滲透壓的敏感性^(7, 19)。真菌組胺酸激酶經由磷酸化過程能感知與傳遞 (sense and transduce) 許多細胞內、外的訊號，而這些訊號的感知與傳遞與真菌的一些生理活動有關⁽⁹⁾。而與此訊息傳遞相關的基因如發生突變，則其菌株在一些生理與生化特性上，如菌絲生長速率、抗滲透壓能力、細胞膜通透性及細胞中的甘油、草酸及胞外多糖含量等俱可能發生改變⁽¹²⁾。由於護汰寧干擾真菌細胞的滲透訊息傳遞，這使抗藥菌株對高滲透甘油絲裂原活化蛋白質激酶代謝路徑 (high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, HOG-MAPK) 的活化能力降低，將影響其對滲透壓的調節能力，因而抗藥菌株對滲透壓逆境較為敏感，在生長上會受到其抑制⁽²⁷⁾。真菌如抗護汰寧亦會對滲透壓敏感，這兩者的關聯性已因分子生物學證據而確定⁽³⁷⁾。在本研究中，灰黴病菌對賽普護汰寧不同程度感藥菌株在 0.8M 山梨糖醇所配製的滲透壓培養基中的生長抑制率有別，但在

0.5M 氯化鉀所配製者則未出現規則性的差異 (圖一、二)，此現象與相關研究不同⁽²⁷⁾。有研究推測這可能是因另有其他訊息傳遞路徑 (signaling pathway) 活化抗藥菌株的蛋白質激酶 (MAPKs)，致其未受滲透逆境的影響⁽³⁶⁾。但亦可能是因本研究所用菌株對藥劑抗性程度不高，致不足以呈現其在一些生理生化特性上的差異。菌株 D1 很特別，該菌屬高感藥菌株，與其他供試菌株相較，其相對電導度最低 (圖四)，亦即細胞通透性應較低；而其對山梨糖醇及氯化鉀二種化合物所構成的滲透壓反應一致，不但未受抑制，反有促進作用 (圖一、二)。但此菌株對過氧化氫亦較不敏感且其細胞草酸含量偏低等特性又同於低感藥菌株 GX2。比較菌株 GX2 與 D1，我們發現對殺菌劑呈現相反反應的菌株，在某些特性上有明顯差異，有些又一致，有些則不具關聯性。

植物病原菌在自然界經長期演化，已發展出一套適應農業環境的本能，但當人類大量且頻繁使用殺菌劑，病原菌為存活而演化出抗藥變異株，進而形成抗藥族群。菌株抗藥性的產生 (一種新的優勢特性) 可能需要犧牲或改變菌株原有的一些優勢特性，此即適合度代價 (fitness cost)⁽²²⁾。因此，抗感藥菌株之間某些生理生化特性的差異，遂可能與菌株對藥劑的感受性有關聯，但不同的研究結果顯示，這些特性的改變亦有分歧^(6, 12, 27)。曾有報告指出，在中國蘇、魯兩省的胡瓜與番茄分離所得的灰黴病菌對護汰寧具高抗藥的菌株

($EC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$)，與感藥菌株相比，其在菌絲生長速率、產孢量及在草莓葉片或番茄果實上的致病力 (virulence) 均顯著下降。且同一研究亦表明，抗藥菌株對滲透壓的抗性遠低於感藥菌株，而抗藥菌株細胞的甘油含量也比感藥菌株少甚多，這些特性的改變或可視為適合度代價的案例⁽²⁷⁾。本研究所用菌株中，最低感藥菌株 GX2 的半數抑制濃度雖僅 2.986，但與最高感藥菌株 D9 相比，其抗性倍數比 (RF) 近 130。故在進行高低感藥菌株生理與生化特性差異比較時，可以 GX2 作為低感藥菌株的代表。GX2 在不同溫度下 (8°C 除外) 的生長速率明顯較其他菌株緩慢，這可視為反映適合度代價的結果 (表二)。但 GX2 與其他低感藥菌株如 D11、D17 及 G5 等在 8°C 的生長速率卻又優於大多數高感藥菌株，低溫生長的優勢可能有利於其存活，這也可說明生物演化的多元性。而菌株 GX2 的相對電導度最高 (圖四)，即細胞膜通透性最高，就與相關研究結果一致^(12, 27)。本研究亦顯示 GX2 對過氧化氫不敏感 (圖三)，表該菌株的生長較不受過氧化氫抑制。我們曾測到該菌在供試菌株中擁有相對最高的過氧化酵素活性 (peroxidase activity) (筆者，未發表)，推測可能是因其高活性過氧化酵素分解過氧化氫，使菌株生長得免受其抑制。此外，GX2 細胞中的草酸及胞外多醣含量均較低 (圖六、七)，但細胞甘油含量則無特異之處 (圖五)，此亦與相關研究有別^(12, 27)。

本研究之高感藥菌株 G3 的細胞甘油含量最高，但在菌株對滲透壓力及氧化壓力的試驗中，其菌絲生長抑制百分率卻也最高，甘油含量似無助於菌株對滲透壓力及氧化壓力的抗性，又與相關報告不符，可見其間的複雜性。此外，甘油含量試驗顯示，重複間變異大，表示它不是穩定的生理生化特徵，作為一種表型 (phenotype) 指標並不可靠。另有報告指出，美國東部數州分離之灰黴病菌對包括護汰寧在內的數種殺菌劑的抗感藥株在菌絲生長速率、產孢能力、菌核產量與活力，以及抗氧化壓力等特性上，並無顯著差異，僅抗藥菌株較感藥菌株對滲透壓呈過敏性 (hypersensitive)⁽⁶⁾。而菌核病菌 *S. sclerotiorum* 的抗護汰寧實驗室突變菌株 (lab mutant) 對高糖份滲透壓敏感，與高感藥的野生菌株相比，抗藥突變株在細胞膜通透性、甘油及草酸含量、過氧化酵素活性等均有明顯增加，但胞外多醣含量則無差異⁽¹²⁾。綜合以上所述，可知病原菌的許多生理及生化特性在高與低感藥菌株間難有一致性的定論。

灰黴病菌的生理與生化特性可能受多種內外因素的影響，例如菌株特性，抗藥程度，培養環境如溫度、培養基、光照及培養時間等，這些因素自可能對菌株的酵素活性及代謝物產量造成影響⁽¹⁰⁾。當我們比較高低感藥菌株間的生理及生化特性時，就必須慎選對藥劑抗性程度顯著且穩定的菌株，並以一致的培養條件進行相關試驗，方能獲致可靠的結果。而有些

代謝產物需在有殺菌劑即時刺激或誘導下方能迅速且大量產生⁽²⁷⁾，故在實驗方法上亦須斟酌。在後續的研究中，我們將聚焦於與抗藥性相關的分子生物學研究，例如 *Bos1* 與 *mrr1* 的基因序列與胺基酸序列及 *Bchog1* 基因表現量的比較分析等，以探討高低感藥菌株間在分子生物學上的差異，用補本研究之不足。

謝辭

本研究承行政院農業委員會 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

1. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。2021。植物保護資訊系統。檢自 <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/> (Apr. 18, 2021)
2. 段中漢、陳冠穎。2020。草莓灰黴病菌對殺菌劑及與食品防腐劑之感受性。臺灣農藥科學。9：99-116。
3. 曾德賜。2015。農藥藥理與應用：殺菌劑。藝軒圖書出版社。臺中。166 頁。
4. 曾顯雄、曾國欽、張清安、蔡東纂、嚴新富。2019。臺灣植物病害名彙 (第五版)。中華民國植物病理學會。臺中。329 頁。
5. Amiri, A., Heath, M. S., and Peres, N. A. 2013. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. Plant Dis. 97: 393-401.
6. Chen, S. N., Luo, C. X., Hu, M. J., and Schnabel, G. 2016. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* isolates with resistance to multiple chemical classes of fungicides. Phytopathology 106: 997-1005.
7. Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., Weeds, P. L., and Templeton, M. D. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Fungal Genet. Biol. 36: 187-198.
8. 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.
9. Defosse, T. A., Sharma, A., Mondal, A. K., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J. P., Calderone, R., Giglioli-Guivarc'h, N., Courdavault, V., Clastre, M., and Papon, N. 2015. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. Mol. Microbiol. 95: 914-924.
10. Duan, C. H., Riley, M. B., and Jeffers, S. N. 2011. Effects of growth medium, incubation temperature, and mycelium age on production of five major fatty acids by six species of *Phytophthora*. Arch. Phytopathol.

- Plant Prot. 44: 142-157.
11. Duan, Y., Ge, C., Liu, S., Wang, J., and Zhou, M. 2013. A two-component histidine kinase *shk1* controls stress response, sclerotial formation and fungicide resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. Mol. Plant Pathol. 14: 708-718.
 12. Duan, Y. B., Ge, C. Y., and Zhou, M. G. 2014. Molecular and biochemical characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* laboratory mutants resistant to dicarboximide and phenylpyrrole fungicides. J. Pest Sci. 87: 221-230.
 13. Fan, F., Hamada, M. S., Li, N., Li, G. Q., and Luo, C. X. 2017. Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei province, China. Plant Dis. 101: 601-606.
 14. Fernández-Ortuño, D., Chen, F., and Schnabel, G. 2013. Resistance to cyprodinil and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in North and South Carolina. Plant Dis. 97: 81-85.
 15. Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., and Schnabel, G. 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U. S. states. Plant Dis. 98: 825-833.
 16. 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.
 17. 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> (May 24, 2021)
 18. 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 (May 24, 2021)
 19. Furukawa, K., Randhawa, A., Kaur, H., Mondal, A. K., and Hohmann, S. 2012. Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. FEBS Lett. 586: 2417-2422.
 20. 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.
 21. Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini,

- C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58: 876-888.
22. Melnyk, A. H., Wong, A., and Kassen, R. 2015. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol. Appl.* 8: 273-283.
23. Mercier, J., Kong, M., and Cook, F. 2010. Fungicide resistance among *Botrytis cinerea* isolates from California strawberry fields. *Plant Health Prog.* doi: 10.1094/PHP-2010-0806-01-RS.
24. Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., and Tzavella-Klonari, K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 91: 407-413.
25. Oliveira, M. S., Amiri, A., Zuniga, A. I., and Peres, N. A. 2017. Sources of primary inoculum of *Botrytis cinerea* and their impact on fungicide resistance development in commercial strawberry fields. *Plant Dis.* 101: 1761-1768.
26. Raaijmakers, J. M., Vlami, M., and de Souza, J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
27. Ren, W., Shao, W., Han, X., Zhou, M., and Chen, C. 2016. Molecular and biochemical characterization of laboratory and field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. *Plant Dis.* 100: 1414-1423.
28. Saito, S., Michailides, T. J., and Xiao, C. L. 2016. Fungicide resistance profiling in *Botrytis cinerea* populations from blueberry in California and Washington and their impact on control of gray mold. *Plant Dis.* 100: 2087-2093.
29. Saito, S., and Xiao, C. L. 2018. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* populations in California and its influence on control of gray mold on stored mandarin fruit. *Plant Dis.* 102: 2545-2549.
30. Schnabel, G. 2016. Evolution, mechanisms and management of fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Acta Hort.* 1117: 83-86.
31. Weber, R. W. S. 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. *Plant Dis.* 95: 1263-1269.
32. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and van Kan, J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of gray mold disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561-580.
33. Wolanin, P. M., Thomason, P. A., and Stock, J. B. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 3: reviews3013.1.
34. Yang, Y., Zeng, G. D., Zhang, Y., Xue, R., and Hu, Y. J. 2019. Molecular and biochemical characterization of carbendazim-resistant

- Botryodiplodia theobromae* field isolates. Plant Dis. 103: 2076-2082.
35. Yin, W. X., Adnan, M., Shang, Y., Lin, Y., and Luo, C. X. 2018. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from nectarine/cherry in China to six fungicides and characterization of resistant isolates. Plant Dis. 102: 2578-2585.
36. Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., and Tanaka, C. 2005. Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. Eukaryot. Cell 4: 1820-1828.
37. Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., and Xu, J. R. 2002. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. Appl. Environ. Microbiol. 68: 532-538.
38. Zhao, H., Kim, Y. K., Huang, L., and Xiao, C. L. 2010. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. Postharvest Biol. Technol. 56: 12-18.

Physio-biochemical Characterization of *Botrytis cinerea* Strawberry Isolates with Different Sensitivities to Cyprodinil+Fludioxonil in Taiwan

Chung-hang Duan^{1*}, Guan-ying Chen¹

Abstract

Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2021. Physio-biochemical characterization of *Botrytis cinerea* strawberry isolates with different sensitivities to cyprodinil+fludioxonil in Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 10: 91-107.

Botrytis cinerea is a necrotrophic, filamentous phytopathogen with a high risk of developing resistance to fungicides. The phenylpyrrole fungicide fludioxonil premixed with cyprodinil has been reported to be the most frequently used fungicide against *B. cinerea* in Taiwan. For this study, the physio-biochemical characteristics of *B. cinerea* isolates with different sensitivity to cyprodinil + fludioxonil were determined. The range of EC₅₀ values of cyprodinil + fludioxonil of 12 selected *B. cinerea* isolates were from 0.023 to 2.986 µg a.i./mL. In addition, the highest resistance factor (RF) was close to 130, while all other RFs were less than 50. Among the 12 tested isolates, the least sensitive isolate GX2 had multiple physio-biochemical characteristics of the most slowly mycelial growth within 12~28°C, the highest cell membrane permeability and the least sensitive to hydrogen peroxide. The more sensitive isolates were sensitive to oxidative stress of 0.05 M hydrogen peroxide and osmotic stress of 0.8 M D-sorbitol but not by 0.5 M KCl. Compared to the more sensitive isolates with more oxalate content, the less sensitive ones had an increase in cell membrane permeability, but they did not differ in terms of cellular glycerol and exopolysaccharide content.

Key words: *Botrytis cinerea*, fludioxonil, fungicide sensitivity, physio-biochemical, strawberry

Accepted: August 17, 2021.

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

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