

臺灣草莓灰黴病菌對賽普護汰寧不同感受性菌株之分子特性

段中漢^{1*}、陳冠穎¹

摘要

段中漢、陳冠穎。2022。臺灣草莓灰黴病菌對賽普護汰寧不同感受性菌株之分子特性。臺灣農藥科學 12 : 43-59。

草莓灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*) 是易產生抗藥性的植物病原真菌，常以殺菌劑賽普護汰寧進行防治。本研究以 2018 及 2019 年分離自臺灣各地 12 株對賽普護汰寧不同感受性 ($EC_{50}=0.023\sim 2.986 \mu\text{g a.i./mL}$) 的草莓灰黴病菌為供試菌株，分析其與抗藥性相關之蛋白質序列及基因表現量，以探討這些變異同抗藥性的關係。Bos1 蛋白質序列分析結果指出，供試菌株的 Bos1 蛋白質序列共有 6 個點突變，分別為 F127S、I365N/S、N373S、Q369P、V1136I 及 D757N；其中 F127S 及 I365N 僅出現於低感藥菌株 (D1、D11 及 G5)。Mrr1 蛋白質序列分析結果則顯示，供試菌株的 mrr1 蛋白質序列總計有 42 個點突變，其中 V287S、M432T、L497 deletion、F568S、R634K 及 N666G 等均出現於較低感藥菌株 (D11 及 G5)，其他點突變則遍布不同感藥程度菌株。根據上述結果推測，此兩種蛋白質 (Bos1 及 mrr1) 所指的點突變可能與灰黴病菌對賽普護汰寧抗藥性有關。至於 *Bchog1* 基因表現量，則高感藥菌株表現量較高並隨菌株感藥程度降低而減少；當加以賽普護汰寧 $1 \mu\text{g a.i./mL}$ 處理後，其基因表現量僅能少量提升，甚或略減。

關鍵詞：草莓、灰黴病菌、分子生物學、賽普護汰寧、抗藥性

接受日期：2022 年 4 月 13 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

緒言

由 *Botrytis cinerea* Persoon 所引起的灰黴病是臺灣地區常見的作物病害，本菌寄主廣達 200 種以上作物，涵蓋果樹、蔬菜及觀賞植物，植栽遍布全球溫帶及亞熱帶地區^(5, 43)。灰黴病菌常在感染部位造成壞疽病徵，是典型的壞死性真菌 (necrotrophic fungus)，每年造成的經濟損失多到難以估計^(10, 43)。作物灰黴病的防治仍以施用化學藥劑為主要方法，其防治用藥 (botryticides) 的費用約占全球殺菌劑 (fungicides) 市場的 10%，顯見其重要性⁽⁴⁰⁾。大量且頻繁的使用殺菌劑可能引發抗藥性，況灰黴病菌具遺傳變異大、生活史短及繁殖力強等特性⁽³¹⁾，是易產生抗藥性的植物病原真菌^(18, 19, 35)。護汰寧 (fludioxonil) 屬苯吡咯類 (phenylpyrroles) 藥劑，為一種廣效型殺菌劑⁽³⁷⁾，在臺灣也常用於灰黴病防治⁽¹⁾，惟以賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) 混合劑販售。國外有報告稱灰黴病菌對賽普洛有較嚴重的抗藥性，但對護汰寧則否^(14, 15, 17)，亦有報告謂其已對護汰寧產生抗藥性^(2, 3, 22, 38)，其實臺灣草莓灰黴病菌對賽普護汰寧的抗藥性已然發生⁽³⁾。

灰黴病菌對殺菌劑的抗藥性常與該殺菌劑作用標的蛋白質在特定位點的序列變異有關⁽³²⁾，蛋白質 Bos1 及 mrr1 的序列突變即屬確定之例證^(25, 38)。*B. cinerea* 的組氨酸激酶 (group III histidine kinases, HK) 藉 *Bos1* 基因完成編碼 (encode)

⁽⁴¹⁾，此激酶可感受與傳導許多細胞內、外訊號 (signals)，這些訊號是用於調節真菌的一些生理程序⁽¹¹⁾。而該激酶亦是數種殺菌劑的作用標的，包括苯吡咯 (phenylpyrroles) 及二羧酰亞胺 (dicarboximides) 等類的藥劑^(7, 20, 23, 34, 38, 44)。有研究稱，組氨酸激酶的蛋白質序列如發生改變，將使 *B. cinerea* 對護汰寧 (苯吡咯類殺菌劑) 產生抗藥性^(21, 27)。而灰黴病菌 Bos1 蛋白質序列發生點突變 (I365S/N、V368F+Q369H) 已證其對殺菌劑依普同 (iprodione) 的抗藥性有關⁽²²⁾。為探討 *B. cinerea* 對護汰寧抗藥性的分子機制，可針對不同抗藥程度菌株的 *Bos1* 基因所轉譯的蛋白質序列進行比對分析，以獲知其關聯性。

Mrr1 (multidrug resistance regulator 1) 是轉錄因子 (transcription factor) 基因，可編碼一種蛋白質 mrr1，用於結合在某基因上游特異核苷酸序列上，藉調控核糖核酸聚合酶 (RNA polymerase) 與去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 模板的結合，以控制其基因轉錄 (transcription)⁽²⁹⁾。*B. cinerea* 對護汰寧殺菌劑的抗藥性已證實與 *mrr1* 基因的突變有關⁽²⁵⁾，該基因突變將導致過度表達 (overexpression) *atrB* 基因，*atrB* 是一種用於編碼 ABC 運輸蛋白質 [ATP-binding cassette (ABC) transporter] 的基因⁽²⁸⁾。此編碼蛋白質具有將殺菌劑運出真菌細胞 (drug efflux) 的功能，為抗藥機制的一種⁽²⁸⁾。曾有研究指出灰黴病菌 *mrr1* 如發生

3 個鹼基對刪除 (3- bp deletion) ，因而造成白胺酸刪除 (L497 deletion) ，將導致菌株產生多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) ⁽³⁰⁾ 。而同屬灰黴病菌的另一菌種 *B. fragariae* 的 *mrr1* 蛋白質序列點突變 (C588Y、R632I) 亦與其對殺菌劑護汰寧的抗藥性有關 ⁽²⁵⁾ 。對不同感藥程度菌株進行 *mrr1* 蛋白質序列分析，除可得知菌株間的分子差異以推估其抗藥性，並可作為抗感藥菌株分子檢測的指標 ^(16, 25) 。

絲裂原所活化的蛋白質激酶基因 (mitogen activated protein kinase gene, MAPK) *hog1* 加上灰黴病菌學名被稱為 *Bchog1* ；在真核細胞中，此類激酶多出現在細胞內訊息傳遞路徑 (intracellular signaling pathways) 的前端，以便參與更多的訊息傳遞模組 (signaling modules) ，包括高滲透壓甘油絲裂原所活化之蛋白質激酶路徑 (high osmolality glycerol mitogen activated protein kinase (HOG-MAPK) pathway) ⁽¹²⁾ 。殺菌劑護汰寧會影響真菌滲透訊息傳導級聯反應 (osmotic signal transduction cascade) ⁽⁷⁾ ，造成感藥菌株 HOG1-type MAPK 的不當激活而大量表現 ^(12, 27) 。亦即 *Bchog1* 基因的表現程度 (expression level) 會因菌株對殺菌劑的抗性而有別，相關的研究指出，抗藥菌株除會增加對滲透壓的敏感度，也會抑制 *Bchog1* 基因的表現量；亦即抗藥菌株在護汰寧作用下，*Bchog1* 並不會顯著表現，但感藥菌株的 *Bchog1* 卻能大量表現 ⁽³⁸⁾ 。

儘管由 *B. cinerea* 所造成的灰黴病在臺灣果樹、蔬菜及花卉等作物為普遍發生的病害，且病原菌在持續受到各種殺菌劑選汰壓力下亦已產生不同程度的抗藥性 ⁽²⁾ ，但關於灰黴病菌族群抗藥性機制的研究卻極少。著者在先前試驗中曾以賽普護汰寧添加至洋菜培養基測定草莓灰黴病菌之半數有效抑制濃度 (median effective concentration, EC₅₀, unit: µg/mL) ，得知菌株間對該藥劑呈現不同感受性，惟程度尚非嚴重，但其最抗藥菌株與最感藥菌株相較，其抗性倍數比 (resistance factor, RF) ⁽⁸⁾ 接近 130，抗藥程度實不容忽視 ⁽³⁾ 。著者為比較臺灣地區草莓灰黴病菌對賽普護汰寧不同感受性菌株間是否具生理及生化特性差異，曾進行數種試驗以驗證之，惟部分結果與前人研究有別 ^(3, 13) 。本研究擬續就同批菌株之與抗藥性相關蛋白質 *Bos1* 及 *mrr1* 序列突變及 *Bchog1* 基因表現量進行比較分析，試圖從分子生物學的角度探討灰黴病菌對賽普護汰寧的抗藥機制，以作為日後田間抗藥性管理的依據。

材料與方法

一、菌株來源與核酸萃取

本研究為探討臺灣各地草莓灰黴病菌對賽普護汰寧不同感受性菌株之分子特性，於 2018 年 3 月及 2019 年 3 月分別前往各草莓產地採集灰黴病菌，共採得 70 株。菌株之分離、培養及保存等方法悉參

照著者已發表之報告⁽²⁾。自採得菌株中隨機選取代表各產區的菌株計 12 株，供後續各項分子生物學試驗之用 (表一)。供試 12 株灰黴病菌對賽普護汰寧的感受性試驗已完成並發表⁽³⁾，將於本研究中參考使用。為獲得試驗菌株所需基因組去氧核糖核酸 (genomic DNA)，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™, USA) 平板，於 24°C 黑暗定溫箱培養 5 日。先刮取菌絲，再以核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit，百歐生技公司，臺灣) 抽取基因組去氧核糖核酸。

二、Bos1 蛋白質序列分析

為探討灰黴病菌抗殺菌劑賽普護汰寧的分子基礎 (molecular basis)，乃選取經賽普護汰寧半數有效抑制濃度 (EC₅₀) 測定之 12 株草莓灰黴病菌 (表一)⁽³⁾，進行 Bos1 蛋白質序列分析。該基因增幅引子對為 *Bos1-F* (TACCGATCGAAAAACCCAAC) 及 *Bos1-R* (AAGTACTCGCAGTCGGTGGT)⁽³⁸⁾。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 之反應液總量為 25 μL，內含模板去氧核糖核酸 (template DNA) 1 μL (10 ng)，引子對各 1 μL (10 μM)，去氧核糖核苷三磷酸 (dNTP mix, 2.5 mM each) 2 μL，

表一、草莓灰黴病菌對賽普護汰寧之半數有效抑制濃度及其 Bos1 蛋白質序列點突變

Table 1. Bos1 protein sequence mutations and sensitivity to cyprodinil+fludioxonil among *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fruit

Isolate	EC ₅₀ ¹⁾	Amino acid alteration in Bos1 position ²⁾
D9	0.023	I365S, D757N
D13	0.073	I365S, V1136I
GX7	0.074	Q369P, N373S
W1	0.104	No mutation
D24	0.192	I365S, V1136I
D20	0.239	No mutation
D1	0.353	F127S, I365N
G3	0.469	I365S, V1136I
D17	1.068	No mutation
D11	1.068	F127S, I365N
G5	1.101	F127S, I365N
GX2	2.986	I365S, D757N

¹⁾ EC₅₀: median effective concentration, unit: μg a.i./mL. Refer to the cited literature No. 3 for the information of this table

²⁾ One-letter symbol for amino acids. Sequence of XP_024546375 of *B. cinerea* B05.10 is used as a reference

聚合酶 (polymerase, 0.625 units) 0.5 μ L、緩衝液 (5X GXL Buffer solution) 5 μ L 及去離子水 14.5 μ L。本試驗擬增幅 4.5 Kb 之長片段擴增子 (amplicon)，需使用可增幅長片段之聚合酶 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa Bio, USA)；其聚合酶連鎖反應的增幅過程係直接進入 35 次增幅循環，每次循環之增幅溫度與時間分別為 98°C 10 sec、60°C 15 sec 及 68°C 5 min。聚合酶連鎖反應產物經以聚合酶連鎖反應產物純化試劑套組 (EasyPure PCR Cleanup Kit, 慧眾生物科技公司，臺灣) 進行純化及基因定序 (源資國際生物科技公司，臺灣)，基因序列復經轉譯 (translation) 為蛋白質序列以供後續比對。序列比對所用之套裝軟體為 BioEdit 3.3.19.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)，並以源自 *B. cinerea* B05.10 代號為 XP_024546375 的 Bos1 蛋白質序列 (1,315 amino acids) 為參考序列⁽³⁸⁾。

三、Mrr1 蛋白質序列分析

為得知 *mrr1* 蛋白質序列與灰黴病菌抗賽普護汰寧之關聯性，亦選取同上之 12 株草莓灰黴病菌 (表一)，進行增幅 *mrr1* 之聚合酶連鎖反應。試驗係依據 *B. cinerea* 參考菌株 N11_K_W08b 之 *mrr1* 基因序列 (代號 JX266761) 所設計之增幅引子對 *mrr1* 186 F (GGTGAGTGCAAGTTGTTT) 及 *mrr1* 2310 R (GGGATGCCATATTCGTGT) 供增幅反應之用⁽²⁵⁾。其聚合酶連鎖反應的主混和

液同上，但採用常規聚合酶 (0.1 unit/ μ L，慧眾生物科技公司，臺灣)。增幅過程係先以 95°C，作用 10 min，接著進入 35 次增幅循環 (95°C 30 sec、55°C 30 sec 及 72°C 2 min)，最後以 72°C 7 min 作結。由於 *mrr1* 核酸序列過長 (約 2,000 bp)，無法一次完成其增幅，須以引子移步 (primer walking) 之方法，加設一組引子對 *mrr1*_186F_Fwd1 (ACAAGYCAACAACGTACC 及 *mrr1*_2310R_Fwd1 (GYTGAAGTGGATA-TTGTGT)，經再一次增幅反應後 (反應條件同上)，始能獲得全部擴增子。聚合酶連鎖反應產物以同上之純化試劑套組進行純化及基因定序，基因序列亦經轉譯為蛋白質序列以供比對，並以源自 *B. cinerea* N11_K_W08b 之 *mrr1* 蛋白質序列 (代號 AFS33265) 作為參考序列⁽²⁵⁾。

四、*Bchog1* 基因表現量分析

為比較對賽普護汰寧不同感受性菌株之 *Bchog1* 基因表現量，爰選取本研究中最抗藥菌株 GX2，最感藥菌株 D9，及感藥程度居間的菌株 D11 及 G3，計 4 菌株供試。菌株先接種於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基，於 24°C 無光照定溫箱培養 3 日，作為後續試驗的接種源。以直徑 5 mm 圓形打孔器切取接種源菌落周緣之菌絲塊，移入裝有 50 mL 馬鈴薯葡萄糖液體培養基 (potato dextrose broth (PDB), Difco™, USA) 的 125 mL 三角瓶，先於轉速 175 rpm 之 24°C 黑暗定溫箱培養 3 日。再將每菌株取

其半數搖瓶，以殺菌劑賽普護汰寧 (37.5% cyprodinil+25% fludioxonil，臺灣先正達) 有效成分 (active ingredient, a.i.) 為 1 µg/mL 之最終劑量加入培養基，其餘半數搖瓶則不加藥劑作為對照，並繼續震盪培養 4 hr。將培養所得菌絲塊以布氏漏斗 (Büchner funnel) 搭配真空幫浦 (vacuum pump, LAB-300, Uni-Crown, Taiwan) 收集之。續以 Quick-RNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, USA) 抽取核糖核酸 (RNA)，再以聚合酶反應器 (thermal cycler, ABI 2720, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 合成互補 DNA (complementary DNA, cDNA)。最後以聚合酶反應器 (CFX384, Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) 進行定量即時聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)。引子對分別為用於增幅參考基因肌動蛋白基因 (actin) (gene accession number BC1G_08198.1) 之 actin-QF (TGTCACCAACTGGGATGATATG) 及 actin-QR (CTGTTGGACTTTGGTTGATTG) 與供試基因 *Bchog1* 之 hog1-QF (CGGCACCACCTTTGAGATTA) 及 hog1-QR (AACCGGTGAGGTTATCTTTGG)⁽³⁸⁾。聚合酶連鎖反應物總體積為 10 µL，內含主混和液 SYBR Master Mix 5 µL (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)，前後向引子各 1 µL (1 µM)、互補 DNA 1.5 µL (15 ng) 及去離子水 1.5 µL。反應條件先為 50°C 2 min 及 95°C 2 min，接著進入 40 次增幅循環 (95°C 15 sec 及 60°C 1 min)。供試菌株

Bchog1 基因表現量以肌動蛋白基因表現量 (actin gene expression) 進行標準化校正，菌株間的基因相對表現量則以 CFX Manager software (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 進行分析並自動設定基準線 (baseline)。本試驗即時定量聚合酶連鎖反應之 3 重複數據用於計算 *Bchog1* 基因表現量的平均值及標準差^(38, 42)。

結果

一、Bos1 蛋白質序列分析

供試菌株經核酸序列增幅後得到長約 4,500 bp 之序列，接著轉譯成蛋白質序列，得到長約 1,500 的胺基酸序列。經排列比對參考蛋白質序列 (XP_024546375)，12 支菌株的 *Bos1* 基因均無序列插入與刪除 (insertion/deletion)。蛋白質序列突變發生於第 127 至第 1136 位點。W1、D20 及 D17 等 3 菌株與參考菌株比較，蛋白質序列完全相同，3 菌株跨越不同程度藥劑感受性。其餘 9 菌株則均有 2 個胺基酸發生突變，且以蛋白質序列第 365 位點發生突變最多，計有 8 菌株。其中由異白胺酸突變為絲胺酸計 5 株 (isoleucine to serine, I365S)，涵蓋對賽普護汰寧最高感藥菌株 D9 及最低感藥菌株 GX2；而由異白胺酸突變為天門冬醯胺 (isoleucine to asparagine, I365N) 之 3 菌株 D1、D11 及 G5，則均屬感藥性較低菌株，此 3 菌株亦同步於蛋白質序列第 127

位點發生突變，由苯丙胺酸變為絲胺酸 (phenylalanine to serine, F127S)。較感藥菌株 GX7 同步於蛋白質序列第 369 及 373 位點發生單點突變，由麩醯胺酸變為脯氨酸 (glutamine to proline, Q369P) 及天門冬醯胺變為絲胺酸 (asparagine to serine, N373S)，且均為該菌株所獨有。在本研究中對殺菌劑感受性居於兩極的菌株 D9 及 GX2 卻均有相同的兩個點突變，由異白胺酸變為絲胺酸 (isoleucine to serine, I365S) 及天門冬胺酸變為天門冬醯胺 (aspartic acid to asparagine, D757N) (表一)。

二、Mrr1 蛋白質序列分析

Mrr1 基因序列長約 2,000 bp，轉譯為近 700 胺基酸之蛋白質序列。供試 12 株菌與野生型參考菌株比較，總計有 42 個胺基酸點突變。有些點突變僅見於一個菌株，有些則發生於多個菌株，或單一點突變因菌株不同而變為不同胺基酸。供試菌株中，D24、D1 及 G3 等 3 菌株的蛋白質序列與參考菌株最相似，均僅有一個且相同的點突變，即組織胺酸突變為天門冬胺酸 (histidine to aspartic acid, H353D)。但在胺基酸位點第 287 之纈氨酸突變為絲胺酸 (valine to serine, V287S)、位點第 432 之甲硫胺酸突變為息寧胺酸 (methionine to threonine, M432T)、位點第 497 之白胺酸缺失 (leucine deletion)、位點第 568 之苯丙胺酸突變為絲胺酸 (phenylalanine to

serine, F568S)、位點第 634 之魚精胺酸突變為離胺酸 (arginine to lysine, R634K) 及位點第 666 之天門冬醯胺突變為甘胺酸 (asparagine to glycine, N666G) 等，均發生於對藥劑感受性較低的菌株 D11 及 G5；其他點突變則遍布不同感藥程度菌株 (表二)。

三、*Bchog1* 基因表現量分析

供試之 4 菌株涵蓋對藥劑反應兩極及介於其間的菌株，試驗結果顯示，*Bchog1* 表現量隨菌株對殺菌劑賽普護汰寧之感受性，由較感向較抗逐漸遞減，且差距明顯。對藥劑感受性最高 (較感) 之 D9 的基因表現量亦最高，對藥劑感受性最低 (較抗) 之 GX2 的基因表現量則最低，另二菌株對藥劑感受性介於其間，其基因表現量亦介於其間。供試菌株之搖瓶於添加賽普護汰寧最終劑量為 1 µg a.i./mL，復經 4 小時之培養，其基因表現量多略有增加，但菌株 D11 則有小幅下降 (圖一)。

討論

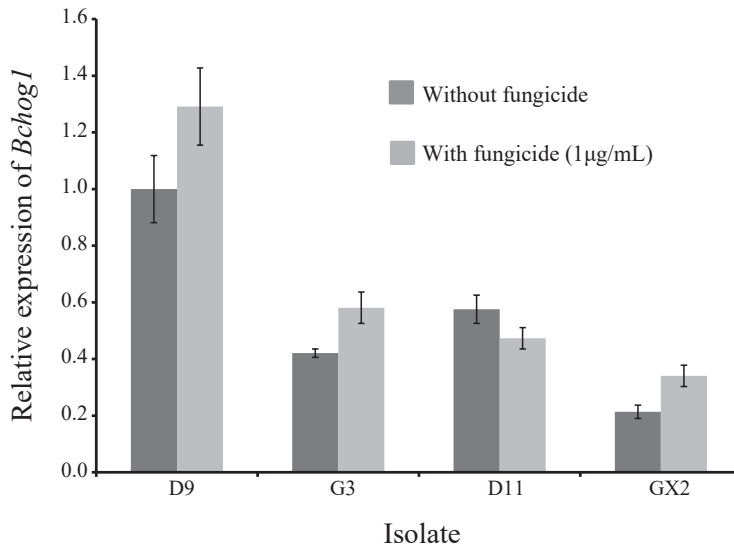
賽普護汰寧是臺灣地區草莓以及其他作物灰黴病常用的防治藥劑之一⁽¹⁾，由於廣泛且大量使用，抗藥性問題已漸浮現⁽²⁾。為探討抗藥性機制，著者曾以對該藥劑不同感受性之草莓灰黴病菌菌株進行其生理及生化特性的比較，惟部分結果未如預期⁽³⁾。由於核酸是穩定的生物分子，常

表二、草莓灰黴病菌對賽普護汰寧不同感受性菌株之 mrr1 蛋白質序列點突變

Table 2. Mutations in the mrr1 protein sequence among *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fruit with various sensitivities to cyprodinil+fludioxonil

Codon position	Amino acid alteration in the mrr1 sequence ¹⁾												
	WT ²⁾	D9	D13	GX7	W1	D24	D20	D1	G3	D17	D11	G5	GX2
69	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
119	Y	D	D	D	D	Y	D	Y	Y	D	D	D	D
164	N	T	T	T	T	N	T	N	N	T	T	T	T
165	D	D	D	D	D	D	N	D	D	D	D	D	D
228	I	T	T	T	T	I	T	I	I	T	T	T	T
237	T	T	T	T	T	T	M	T	T	T	T	T	T
258	P	S	S	S	S	P	S	P	P	S	S	S	S
287	V	A	A	A	A	V	S	V	V	A	S	S	A
289	A	S	S	S	S	A	S	A	A	S	S	S	S
290	M	M	M	M	M	M	V	M	M	M	M	M	M
312	N	Q	Q	Q	Q	N	Q	N	N	Q	Q	Q	Q
352	T	A	A	A	A	T	A	T	T	A	A	A	A
353	H	H	H	H	H	D	H	D	D	H	H	H	H
381	Q	K	K	K	K	Q	K	Q	Q	K	K	K	K
382	Q	E	E	E	E	Q	E	Q	Q	E	E	E	E
392	V	I	I	I	I	V	I	V	V	I	I	I	I
431	M	I	I	I	I	M	I	M	M	I	I	I	I
432	M	S	S	S	S	M	S	M	M	S	T	T	S
437	S	T	T	T	T	S	T	S	S	T	T	T	T
443	I	L	L	L	L	I	L	I	I	L	L	L	L
445	I	F	F	F	F	I	F	I	I	F	F	F	F
449	T	S	S	S	S	T	T	T	T	S	T	T	S
492	I	V	V	V	V	I	V	I	I	V	V	V	V
497	L	V	V	L	V	L	V	L	L	V	—	—	V
498	A	T	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	T
499	G	C	C	C	C	G	C	G	G	C	C	C	C
510	Y	F	F	F	F	Y	F	Y	Y	F	F	F	F
511	C	S	S	S	S	C	S	C	C	S	S	S	S
513	V	S	S	S	S	V	S	V	V	S	S	S	S
568	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	S	S	F
579	V	A	A	A	A	V	A	V	V	A	A	A	A
601	E	G	G	G	G	E	G	E	E	G	G	G	G
602	G	S	S	S	S	G	S	G	G	S	S	S	S
627	R	K	K	K	K	R	K	R	R	K	K	K	K
634	R	R	R	R	R	R	K	R	R	R	K	K	R
656	R	L	L	L	L	R	L	R	R	L	L	L	L
666	N	N	D	D	D	N	D	N	N	D	G	G	D
668	A	G	G	G	G	A	G	A	A	G	G	G	G
670	G	E	E	E	E	G	E	G	G	E	E	E	E
671	C	F	F	F	F	C	F	C	C	F	F	F	F
682	C	R	R	R	R	C	R	C	C	R	R	R	R
684	S	P	P	P	P	S	P	S	S	P	P	P	P

¹⁾ One-letter symbol for amino acids, —: amino acid deletion at codon position 497²⁾ WT: the sequence of AFS33265 of *B. cinerea* wild type isolate (N11_K_W08b) is used as a reference



圖一、草莓灰黴病菌對賽普護汰寧不同感受性菌株之 *Bchog1* 基因表現量。

Fig. 1. Expression levels of *Bchog1* in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fruit with various sensitivities to cyprodinil+fludioxonil. The mycelia of each isolate were treated with the fungicide at 1 µg a.i./mL after growth in potato dextrose broth for 3 days. Cultures without fungicide treatment were used as controls. The bars denote standard deviations of three replications.

被用於灰黴病菌抗藥性的相關研究 (8, 16, 17, 22, 28)。草莓灰黴病菌已知有數種蛋白質的基因序列在特定位點發生突變，導致其轉譯的胺基酸被取代，而這些點突變與某些殺菌劑抗藥性有關 (22)。然有研究者以這些蛋白質在特定位點的胺基酸變異作為菌株是否抗藥的依據，卻無一致性的結果 (4, 6, 26)。此種現象亦見於其他病原真菌，例如常見殺菌劑抗藥性的多種果樹炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) (9)。

本研究以供試菌株編碼組氨酸激酶 (group III HK) 的 *Bos1* 基因及轉錄因子基因 *mrr1* 的蛋白質序列分別進行比較分

析，並對高滲透壓甘油絲裂原所活化之蛋白質激酶基因 (*Bchog1*) 的表現量在對賽普護汰寧不同感受性菌株間作比較，以期能理解灰黴病菌對賽普護汰寧的抗藥性分子機制。*B. cinerea* 的組氨酸激酶藉 *Bos1* 基因完成編碼，該酵素不但在灰黴病菌的致病性與生長發育扮演重要角色，同時也參與菌株在高滲透壓環境之生長及對苯吡咯與二羧酰亞胺等類殺菌劑的感受性 (36, 38)。護汰寧即屬苯吡咯類藥劑，組氨酸激酶則是該類藥劑的作用標的 (7, 23, 34, 44)，因而在探討灰黴病菌對護汰寧的抗藥機制上具有重要地位。此外，組氨酸激酶也是高滲

透壓甘油絲裂原所活化之蛋白質激酶路徑 (HOG-MAPK pathway) 的正向調控因子 (7, 24, 33)。*Bos1* 基因突變將導致組氨酸激酶蛋白質序列改變，這可能造成灰黴病菌對護汰寧的抗藥性 (21, 27)。因此，在探討灰黴病菌抗護汰寧機制時，*Bos1* 基因的選殖 (cloned) 與分析有其重要性。曾有研究指出，來自中國江蘇與山東省的灰黴病菌抗護汰寧菌株，在其 *Bos1* 蛋白質序列中，發現有 G262S、G265D、G311R、R319K、V336M、D337N、V346I、A350S、Q369P、N373S、G545E 及 N609T 等 12 個點突變，且某些高抗藥菌株同時擁有多達 7 個蛋白質序列點突變，但多數抗藥菌株僅有 1 個點突變，而這些突變菌株對護汰寧的 EC_{50} 數值普遍達 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上，顯見其田間存有變異很大的高抗藥突變株 (38)。但上述基因點突變中見於本研究，僅有 Q369P 及 N373S (表一)，可見臺灣地區 *Bos1* 蛋白質序列變異幅度不大，抗藥程度亦然 (表一)。

本研究供試菌株之 *Bos1* 蛋白質序列大多有點突變，其中 I365S 點突變遍布於對賽普護汰寧不同感受性之菌株，V1136I (valine to isoleucine) 點突變均發生於較感藥菌株，D757N 點突變則分列於對藥劑感受性程度屬兩極之菌株 (D9 及 GX2)，推測這幾種突變可能與灰黴病菌對該殺菌劑之感受性無關 (表一)。F127S 及 I365N 點突變同步出現於 D1、D11 及 G5 等 3 菌株，皆為對賽普護汰寧感受性較低的菌株，此二突變可能與菌株對該藥劑的感受

性有關 (表一)。儘管此 3 菌株擁有相同的點突變，但對藥劑感受性仍有程度上的差別，推測可能尚有其他未知因子參與其中。進一步分析此三菌株之 *Bos1* 及 *mrr1* 蛋白質序列發現，如單就 *Bos1* 蛋白質序列點突變而言，此三菌株是相同的，但如檢視 *mrr1* 蛋白質序列點突變，則僅 D11 及 G5 兩菌株相同，而此兩菌株對藥劑反應也較接近。D1 的 *mrr1* 蛋白質序列點突變與 D11 及 G5 兩菌株存有較大差異，這是否因而造成該菌株的 EC_{50} 數值較低，則有待探討。但由此二基因的整合分析或可推論，單看某一個基因的差異尚難決定其抗藥性表現，很可能尚有其他基因參與菌株對藥劑的反應。此外，*Bos1* 蛋白質序列中僅出現於較感藥菌株 GX7 的 Q369P 及 N373S 等二個獨特點突變，是否與其對本藥劑或其他藥劑之感受性有關，亦待後續研究。由於 *B. cinerea* 組氨酸激酶具多種功能，因此一旦發生突變，將可能降低該類菌株的存活能力，儘管突變株具有抗藥性的優勢，亦恐難與野生菌株競爭，這也可能是高抗藥菌株不易在田間出現的原因 (38)。

Mrr1 屬轉錄因子，它是一種能夠結合在一種 ABC 運輸蛋白質基因 (*atrB*) 上游特定核苷酸序列上的蛋白質，藉此調控該等基因的轉錄 (29)。灰黴病菌對護汰寧的抗藥性已證實與 *mrr1* 的突變有關，該基因如果突變會導致 ABC 運輸蛋白質 (ABC transporter) 的過度表達 (28)。而這種運輸蛋白質能將滲入真菌細胞的殺菌劑

快速運出細胞外，達到抗藥目的，但此種抗藥分子機制僅與護汰寧低劑量 ($EC_{50} < 1$ a.i. $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的抗藥性有關⁽³⁹⁾。另一涉及護汰寧高劑量 ($EC_{50} > 100$ a.i. $\mu\text{g}/\text{mL}$) 抗藥性之分子機制則是與 *Bos1* 基因突變有關⁽³⁸⁾。本研究所列 12 支菌株，其 *mrr1* 基因經定序並轉譯為蛋白質序列後與參考序列 (蛋白質序列代號 AFS33265) 相較，有多達 42 個胺基酸點突變，顯示該基因具有易於突變的特性。大多數點突變 (38/42) 雖僅有一種取代之胺基酸，但有 4 個點突變有 2 種取代之胺基酸或缺失 (deletion) (表二)。又，大多數點突變的取代胺基酸廣布於對殺菌劑不同感受性菌株或僅單一菌株發生突變，而該菌株對藥劑感受性卻居中，因而這類的點突變難以和藥劑感受性產生聯結。但菌株 D11 及 G5 在 287、432、497、568、634 及 666 等 6 個點突變分別有相同的取代胺基酸或缺失，而這二菌株均屬對賽普護汰寧感受性較低的菌株，則這些點突變就可能與菌株對藥劑的反應具有關聯性 (表二)。特別是，點突變 497 的胺基酸缺失與灰黴病菌對多種藥劑之抗藥性有關，已有報告證實⁽³⁰⁾。

由於殺菌劑護汰寧會影響真菌滲透訊息傳導級聯反應⁽⁷⁾，所以可用於防治植物病原真菌。有報告稱，灰黴病菌抗藥菌株在護汰寧作用下會增加對滲透壓的敏感性，且 *Bos1* 基因發生突變及 *Bchog1* 表現量下降，推測其原因可能是護汰寧抑制高滲透壓甘油絲裂原所活化之蛋白質激酶路徑 (HOG-MAPK pathway)⁽³⁸⁾，因而抗藥

菌株絲裂原所活化之蛋白質激酶基因 (MAPK gene) *Bchog1* 的表現量會受到抑制。但本研究之結果卻顯示，無論抗或感藥菌株在未受殺菌劑刺激下，其 *Bchog1* 基因的表達量即有上述之差異，雖在添加殺菌劑後亦略有增加，但趨勢並未改變 (圖一)。此現象顯示，*Bchog1* 基因的表達性質屬構成的 (constitutive)，與類似的試驗結果並不一致，該試驗結果顯示，未受藥劑處理前，抗感藥菌株之 *Bchog1* 基因表現量差異不大，但經藥劑處理後，感藥菌株的基因表現量大幅提升，而抗藥菌株則僅有小量提升，表達性質屬誘導的 (inductive)⁽³⁸⁾。由於 *Bchog1* 基因的表現量是一動態現象，除與菌株特性有關，亦可能受培養環境之影響，例如滲透壓⁽³⁾。推測在本研究中，該等基因在受到某種培養環境影響下，未經殺菌劑處理即已啟動其表現，但高感藥菌株基因表現量明顯高於低感藥菌株的規律則與前人研究是一致的。惟此項結果可確定低感藥菌株 (較抗藥) 與高感藥菌株相比，其活化高滲透壓甘油絲裂原所活化之蛋白質激酶路徑 (HOG-MAPK pathway) 的能力是較低的。為能更深入且全面的了解植物病原真菌抗藥機制，今後，對其抗藥性研究應擴及更多的基因及蛋白質，且不僅止於靜態的序列分析，更要探討其動態的基因表現量。相信透過這些分析與研究，將可增益我們對病原真菌抗藥機制的了解並有助於田間的抗藥性管理。

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/> (Nov. 12, 2021)
2. 段中漢、陳冠穎。2020。草莓灰黴病菌對殺菌劑與食品防腐劑之感受性。臺灣農藥科學 9：99-116。
3. 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。
4. 陳麗淑、鍾文全、鍾文鑫。2009。台灣草莓灰黴病菌對 Strobilurin 類 (QoIs) 殺菌劑之感受性。植病會刊 18：89-99。
5. 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。
6. 黃盈潔、羅佩昕、彭孟慈、鍾文鑫。2011。果樹炭疽病菌之抗藥性研究與分子診斷。有害生物抗藥性研討會專刊，第 167-189 頁。王順成、何琦琛、徐玲明主編。朝陽科技大學編印。臺中。
7. Bahn, Y. S. 2008. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. Eukaryot. Cell 7: 2017-2036.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Duan, Y., Ge, C., Liu, S., Wang, J., and Zhou, M. 2013. A two-component histidine kinase *shkl* controls stress response, sclerotial formation and fungicide resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. Mol.

- Plant Pathol. 14: 708-718.
13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Li, X., and Schnabel, G. 2015. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 105: 424-432.
 17. 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.
 18. 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> (Nov. 12, 2021)
 19. 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 (Nov. 12, 2021)
 20. 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.
 21. Furukawa, K., Yoshimi, A., Furukawa, T., Hoshi, Y., Hagiwara, D., Sato, N., Fujioka, T., Mizutani, O., Mizuno, T., Kobayashi, T., and Abe, K. 2007. Novel reporter gene expression systems for monitoring activation of the *Aspergillus nidulans* HOG pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1724-1730.
 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. Hagiwara, D., Matsubayashi, Y., Marui, J., Furukawa, K., Yamashino, T., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., and Mizuno, T. 2007. Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 844-847.
24. Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 300-372.
25. Hu, M. J., Cosseboom, S., and Schnabel, G. 2019. *atrB*-associated fludioxonil resistance in *Botrytis fragariae* not linked to mutations in transcription factor *mrr1*. *Phytopathology* 109: 839-846.
26. Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W. H., Kansako, M., Nishimura, K., Takahashi, K., and Oshima, M. 2009. Characterization of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Manag. Sci.* 65: 916-922.
27. Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., and Okuno, T. 2004. Fungicide activity through activation of a fungal signaling pathway. *Mol. Microbiol.* 53: 1785-1796.
28. Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., De Waard, M. A., and Hahn, M. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mold fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.* 5: e1000696.
29. Latchman, D. S. 1993. Transcription factors: An overview. *Int. J. Exp. Pathol.* 74: 417-422.
30. Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., and Hahn, M. 2013. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 159-167.
31. 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.
32. Leroux, P. 2004. Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. pp. 195-222. *In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, [eds.], Botrytis: Biology, Pathology and Control.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 403 pp.
33. Meena, N., Kaur, H., and Mondal, A. K. 2010. Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases

- from fungi. *J. Biol. Chem.* 285: 12121-12132.
34. Motoyama, T., Ohira, T., Kadokura, K., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., and Kudo, T. 2005. An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Curr. Genet.* 47: 298-306.
 35. Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., and Tzavella-Klonari, K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 91: 407-413.
 36. Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag. Sci.* 57: 437-442.
 37. Raaijmakers, J. M., Vlami, M., and de Souza, J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *A. Van Leeuw. J. Microb.* 81: 537-547.
 38. 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.
 39. Rupp, S., Plesken, C., Rumsey, S., Dowling, M., Schnabel, G., Weber, R. W. S., and Hahn, M. 2017. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e00269-17.
 40. UIPP. 2002. Annual report.: Union des Industries de la Protection des Plantes. Paris, France. 201 pp.
 41. Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J. S., Le Pêcheur, P., Kunduru, A. R., Leroux, P., and Legendre, L. 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1042-1050.
 42. Wang, Y., Duan, Y. B., and Zhou, M. G. 2015. Molecular and biochemical characterization of boscalid resistance in laboratory mutants of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol.* 64: 101-108.
 43. 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.
 44. 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.

Molecular Characterization of *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry with Different Sensitivities to Cyprodinil+fludioxonil in Taiwan

Chung-Hang Duan^{1*}, Guan-Ying Chen¹

Abstract

Duan, C. H., and Chen, G. Y. 2022. Molecular characterization of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry with different sensitivities to cyprodinil+fludioxonil in Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 12: 43-59.

Botrytis cinerea is a filamentous phytopathogen with a high risk of developing resistance to fungicides. Cyprodinil+fludioxonil (a premixture) is the most frequently used fungicide against *B. cinerea* in Taiwan. In this study, molecular characteristics of 12 isolates of *B. cinerea* obtained from strawberry fruit with different sensitivities to this fungicide were investigated. Their fungicide sensitivities were specifically determined according to median effective concentration values (EC_{50}), which ranged from 0.023 to 2.986 $\mu\text{g a.i./mL}$. In comparing the Bos1 protein sequence of tested isolates with that of wild type isolate B05.10 (XP_024546375), 6 amino acid alterations were observed, including in F127S, I365N/S, N373S, Q369P, V1136I and D757N. Among these, alterations in F127S and I365N only occurred in less sensitive isolates (D1, D11 and G5). In comparing the mrr1 protein sequence of tested isolates with that of wild type isolate N11_K_W08b (AFS33265), we identified a total of 42 amino acid alterations. Among these, alterations in V287S, M432T, L497 deletion, F568S, R634K and N666G only occurred in less sensitive isolates (D11 and G5). We posit that some of the point mutations in Bos1 and mrr1 among D11 and G5 isolates may be correlated with the reduced sensitivity to the fungicide that these isolates possess. In

Accepted: April 13, 2022.

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

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

addition, more sensitive isolates consistently exhibited greater *Bchog1* expression than did isolates with lower sensitivities. Finally, when further treated with the fungicide at 1 µg a.i./mL, most isolates showed slightly higher *Bchog1* expression levels. Findings from this study should enhance our understanding of the resistance mechanism of *B. cinerea* to cyprodinil+fludioxonil.

Key words: *Botrytis cinerea*, cyprodinil+fludioxonil, fungicide resistance, molecular biology, strawberry