

草莓灰黴病菌對殺菌劑與食品防腐劑之感受性

段中漢^{1*}、陳冠穎¹

摘要

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。

自 2018 至 2019 年，由臺灣各地以單孢分離法獲得草莓灰黴病菌，選取其中 36 株進行分子親緣性分析及對 19 種國內外推薦殺菌劑及 3 種食品防腐劑之感受性試驗。運用 *G3PDH*, *HSP60*, *RPB2* 等 3 種蛋白質基因序列進行草莓灰黴病菌族群親緣性分析，其多數菌株基因序列相同，僅少數菌株有 1 至 4 個鹼基變異。殺菌劑感受性試驗是以孢子發芽率及菌絲生長為指標，並以供試藥劑田間使用濃度作為測試劑量，而以微量滴定盤法 (microtiter plate method) 進行。試驗結果顯示，草莓灰黴病菌抗藥性極普遍且嚴重。供試之 19 種殺菌劑僅有得恩地能抑制全部供試菌株孢子發芽，但白克列、賽普護汰寧、三氟派瑞、氟克殺及亞派占等藥劑尚能抑制部分菌株之孢子發芽，且大多為暫時性之靜菌作用；惟全部供試藥劑均不能抑制供試菌株之菌絲生長。食品防腐劑苯甲酸鈉、丙酸鈣及己二烯酸鉀分別製備為濃度 2000 µg/ml 溶液，再以醋酸調降酸鹼值至 4，其對供試灰黴病菌之孢子發芽均可完全抑制且為殺菌作用；此外，苯甲酸鈉可抑制全部供試菌株之菌絲生長，己二烯酸鉀可抑制大多數菌株之菌絲生長，而丙酸鈣則幾全無抑制作用。

關鍵詞：草莓、灰黴病菌、殺菌劑、食品防腐劑

緒言

主範圍廣泛，在世界各地均是重要植物病原真菌⁽¹⁶⁾，在臺灣至少已有數十種寄主植物報告，包括果樹、蔬菜及花卉等作物

灰黴病菌 (*Botrytis cinerea* Persoon) 寄⁽¹⁾。草莓 (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne)

接受日期：2020 年 9 月 24 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

灰黴病 (gray mold) 是國內外草莓栽培常見的病害，罹病果實布滿灰黴病菌菌絲及分生孢子，如無有效防治，傳播極為迅速，罹病果實很快腐爛，喪失商品價值。由於灰黴病菌寄主範圍與地理分布甚廣，病原菌族群變異是值得探討的課題，因其可能涉及其病原性及抗藥性等問題。近年因分子生物學技術快速發展，且應用日廣，灰黴病菌的分子系統發生學 (molecular phylogeny) 也漸受重視 (31, 38)。利用特定基因序列比對可得知不同來源灰黴病菌的親緣關係，對追溯病原菌來源與分布以及探討其生物學特性提供可靠的科學證據。本菌引起的病害是以施用殺菌劑 (fungicide) 為主要防治方法，抗藥性問題是本病防治上的最大威脅。灰黴病菌在全球植物病理學界亦被視為抗藥性研究的重要題材 (11, 14, 17, 20, 36)，在美國、歐洲及中國大陸已發現抗各種作用機制殺菌劑的灰黴病菌 (12, 15, 18, 22, 27, 41)，且多重抗藥性 (multidrug resistance) 菌株亦已出現 (21, 25, 27, 35)。根據相關研究，經由遺傳變異及大量殺菌劑之選汰作用，許多針對單點作用機制 (site-specific) 殺菌劑之基因點突變菌株已成為病原菌族群的主要部分，抗藥性族群亦因而快速發展 (13, 21, 22, 23, 24, 41)。臺灣灰黴病防治藥劑多為單點作用機制藥劑 (2)，據此推斷，臺灣灰黴病菌之抗藥性問題亦不容忽視。事實上，臺灣早已有灰黴病菌抗藥性菌株報導，例如，草莓灰黴病菌對甲氧基丙烯酸酯類殺菌劑 (strobilurins) 之抗藥性已見 (9)，而甜柿灰

黴病菌則可能已對撲滅寧 (procymidone) 產生抗藥性 (10)。灰黴病菌雖頻見抗藥性現象，但國內外卻有多篇研究報告提及灰黴病菌對護汰寧 (fludioxonil) 抗藥性頻率較低 (3, 18, 19, 23, 29)，但亦有研究稱其已對護汰寧產生抗藥性 (25, 34)。由於該藥劑為國內常用之灰黴病防治藥劑，惟以賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) 混合劑販售，其抗藥性問題值得重視。臺灣灰黴病菌抗藥性現況尚乏有系統的研究，且因病原菌抗藥性是一隨時間而發展的動態過程，現況不斷演進，為確保病害防治之有效性，須作長期且深入的探討。灰黴病菌於人工培養基上能產生菌絲、分生孢子及菌核，分生孢子發芽及菌絲生長為殺菌劑藥效試驗常用的指標 (4, 6, 7, 8)，本研究將以微量滴定板法 (microtiter plate method) 就草莓灰黴病菌對防治藥劑進行室內藥效評估 (4)。復鑑於灰黴病菌對殺菌劑抗藥性日益嚴重，尋找替代性資材誠為當務之急。曾有研究者使用具殺菌作用之有機及無機鹽類化合物於植物病害之防治 (5, 26, 33)，特別是食品工業所用之防腐劑 (food antiseptics)，因其具廣效與安全之特性，是防治灰黴病可能的替代性資材。本研究擬先就草莓灰黴病菌之分子親緣性進行分析，主要工作則在調查本菌對國內外推薦藥劑之感受性現況，以為本病化學防治之用藥指引。此外，並嘗試探討數種食品防腐劑對灰黴病菌之抑制作用，冀開發其作為防治資材，以應實際所需。

材料與方法

一、供試菌株之分離及培養

於 2018 年 3 月及 2019 年 3 月，分別前往臺灣各地採集草莓罹灰黴病之果實供分離病原菌。罹病果實攜回實驗室後，將病果表面的灰黴病菌分生孢子塗於 2% 洋菜 (water agar) 平板，以玻璃針單孢分離法獲得單孢菌株，並培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA)，置於 24°C 之無光照定溫箱培養，以供後續試驗之用。另以培養 3 日所得之菌落以直徑 5 mm 打孔器切取菌落周邊菌絲塊，放入裝有 1 mL 無菌水之 2-mL 冷凍小管 (cryogenic vial, Nalge Co., Rochester, NY, USA)，置 16°C 定溫箱作長期保存。本研究共採得草莓灰黴病菌單孢菌株 65 株，逢機選取各地採集之菌株凡 36 株作為本研究之供試菌株 (表一)。

二、草莓灰黴病菌之分子親緣性分析

為探討臺灣各地草莓灰黴病菌之親緣關係，乃進行菌株特定基因之定序並分析之。將前述選取之 36 株菌株分別以其菌絲塊移植於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板，於 24°C 黑暗定溫箱培養 5 日。於刮取菌絲後，再以核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit；百歐生技公司，臺灣) 抽取基因組核酸 (genomic DNA)。抽

取之核酸以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分別增幅熱休克蛋白 (heat shock protein, *HSP60*, 引子對 *HSP60for+* / *HSP60rev+*)、核糖核酸聚合酶 II (RNA polymerase II-binding, *RPB2*, 引子對 *RPB2for+* / *RPB2rev+*) 及甘油 3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *G3PDH*, 引子對 *G3PDHfor+* / *G3PDHrev+*) 等 3 種基因序列⁽³⁸⁾。聚合酶連鎖反應之引子對黏合溫度 (annealing temperature) 分別為 60°C (*HSP60*)、55°C (*RPB2*) 及 64°C (*G3PDH*)，均作用 30 sec，其他關於聚合酶連鎖反應之材料與方法悉參照著者已發表報告進行⁽⁷⁾，而進入增幅循環前之 95°C 作用 15 min，且每一增幅循環之延伸溫度 (extension temperature) 為 72°C 作用 1.5 min，最後復以 72°C 作用 7 min 作結。接著以聚合酶連鎖反應產物進行基因雙向定序，定序結果整理成序列重疊群 (sequence contig)⁽³⁹⁾，供後續分析之用。菌株間分子親緣關係之探討是以菌株間多基因序列分析 (multilocus sequence analysis, MLSA) 為之^(7, 28)，先將各菌株之單一相同基因序列並列切齊，再將同一菌株之 3 種基因序列鏈結成多基因序列進行分析。分析方法是貝葉斯推斷法 (Bayesian inference method, TOPALi version 2.5)，分析時並以本菌種之模式菌株 (ex-type strain) MUCL87 作為參考菌株⁽³⁸⁾。

表一、草莓灰黴病菌供試菌株列表

Table 1. *Botrytis cinerea* isolates collected from strawberry for this study

Isolate	Colony type ¹⁾	Origin	Collecting date
S2	Conidial	Shanhua, Tainan	2018.03.26
S3	Conidial	Shanhua, Tainan	2018.03.26
S4	Conidial	Shanhua, Tainan	2018.03.26
N1	Intermedial	Neihu, Taipei	2018.03.17
N3	Conidial	Neihu, Taipei	2018.03.17
G1	Conidial	Guoxing, Nantou	2018.03.19
G3	Intermedial	Guoxing, Nantou	2018.03.19
G5	Conidial	Guoxing, Nantou	2018.03.19
G8	Intermedial	Guoxing, Nantou	2019.03.15
G10	Intermedial	Guoxing, Nantou	2019.03.15
D1	Conidial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D3	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D5	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D7	Sclerotial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D9	Sclerotial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D10	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D11	Conidial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D13	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D15	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D17	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D19	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D20	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D21	Intermedial	Dahu, Miaoli	2018.03.22
D23	Conidial	Dahu, Miaoli	2019.03.12
D24	Sclerotial	Dahu, Miaoli	2019.03.12
D25	Sclerotial	Dahu, Miaoli	2019.03.12
W1	Conidial	Wufeng, Taichung	2019.03.05
GX1	Conidial	Guanxi, Hsinchu	2019.03.12
GX2	Sclerotial	Guanxi, Hsinchu	2019.03.12
GX3	Conidial	Guanxi, Hsinchu	2019.03.12
GX5	Intermedial	Guanxi, Hsinchu	2019.03.12
GX7	Conidial	Guanxi, Hsinchu	2019.03.12
ST1	Conidial	Shihtan, Miaoli	2019.03.12
ST4	Intermedial	Shihtan, Miaoli	2019.03.12
ST6	Intermedial	Shihtan, Miaoli	2019.03.12
ST7	Conidial	Shihtan, Miaoli	2019.03.12

¹⁾ Colony type: 'Conidial', 'Sclerotial', and 'Intermedial' indicate that the main fungal structures of the colony on potato dextrose agar plate were conidia, sclerotia, and both conidia and sclerotia, respectively.

三、供試殺菌劑及食品防腐劑

依據農委會農業藥物毒物試驗所網站之「植物保護資訊系統」⁽²⁾，選取草莓灰黴病登記用藥 12 種，另加國內可購得之國外用於該病害之藥劑 7 種^(17, 18, 20, 30, 37)，合計 19 種殺菌劑作為本研究之供試藥劑，均為購自本地農藥零售店之成品農藥或藥毒所檢驗合格之成品農藥剩餘樣品。供試藥劑及其廠牌如下：亞托敏 (azoxystrobin) (興農)、免賴得 (benomyl) (興農)、白克列 (boscalid) (巴斯夫)、貝芬替 (carbendazim) (興農)、賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) (先正達)、三氟派瑞 (fluopyram + trifloxystrobin) (拜耳)、氟克殺 (fluxapyroxad) (巴斯夫)、依普同 (iprodione) (巴斯夫)、亞派占 (isopyrazam) (先正達)、滅派林 (mepanipyrim) (庵原)、免得爛 (metiram) (巴斯夫)、邁克尼 (myclobutanil) (道禮)、保粒黴素 (甲) (polyoxins) (興農)、撲滅寧 (procymidone) (住友)、百克敏 (pyraclostrobin) (巴斯夫)、派美尼 (pyrimethanil) (拜耳)、腐絕 (thiabendazole) (興農)、甲基多保淨 (thiophanate-methyl) (興農) 及得恩地 (thiram) (巴斯夫) 等 (表二)。又為篩選草莓灰黴病替代性防治資材，乃以我國衛生福利部食品藥物管理署所公告之食品添加用防腐劑經初步篩選後，選出苯甲酸鈉 (sodium benzoate) (天津東大化工)、丙酸鈣 (calcium propionate) (臺灣華祥理化) 及己二烯酸鉀 (potassium sorbate) (山東昆達生

技) 等 3 種供試⁽⁵⁾，另購用於調整溶液酸鹼度 (pH value) 之冰醋酸 (glacial acetic acid) (臺灣長春化工)。

四、殺菌劑及食品防腐劑對草莓灰黴病菌分生孢子發芽之影響

本試驗以微量滴定板法⁽⁴⁾ 測試 19 種草莓灰黴病防治用殺菌劑 (表二) 及前述 3 種食品防腐劑對逢機選取之 6 株草莓灰黴病菌分生孢子發芽的抑制作用。藥劑配製是以該藥劑在田間的使用濃度 (use rate) 作為供試菌株對該藥劑抗感性之區別濃度 (discriminatory concentration)。供試殺菌劑藥液配製是將藥劑溶於無菌蒸餾水並稀釋至其田間使用濃度⁽²⁾。3 種食品防腐劑則以每公升無菌蒸餾水加入 2 克食品防腐劑，待溶解後再以冰醋酸調降溶液酸鹼度至 4 作為供試藥液⁽⁵⁾。測試時，取 49 μL 供試藥液分別滴入微量滴定板之盤穴 (well)，再加入 1 μL 供試菌株之孢子懸浮液 (1×10^6 spores / mL)，均勻混合。另以供試菌株孢子加入無菌水之處理為對照。處理後之微量滴定板覆以封口膜 (parafilm, PM-996, PARAFILM, Neenah, WI, USA) 以防水分蒸散並置於實驗室 ($24 \sim 28^\circ\text{C}$)。2 小時後，將盤穴內之混合液分別塗布於直徑 9 公分之洋菜 (2% water agar) 平板上，靜置於 24°C 之黑暗定溫箱。24 小時後，於光學顯微鏡下計數孢子發芽率。每處理 4 重複，每重複計數 200 個孢子，以百分率表示孢子發芽率。

另為測試國內常用灰黴病防治藥劑賽普護汰寧與在前項試驗中最能有效抑制灰黴病菌孢子發芽之藥劑得恩地及對灰黴病菌菌絲最具抑制效果之食品防腐劑苯甲酸鈉等三種化學製劑對草莓灰黴菌孢子發芽

究為殺菌作用 (fungicidal) 或靜菌作用 (fungistatic)，乃將供試菌株涵蓋本研究所列全部 36 株，以上述方法進行孢子發芽抑制試驗。惟試驗觀察時間延長為 4 及 7 天，未發芽孢子並輔以臺盼藍水溶液

表二、本研究所用殺菌劑及食品防腐劑之種類、劑型、作用機制代碼及使用劑量

Table 2. Fungicides and food antiseptics used in this study¹⁾

Chemical	Formulation	FRAC code ²⁾	Use rate (µg a.i./ml) ³⁾	Labeled for strawberry ⁴⁾
Azoxystrobin	23% SC	11	115	Yes
Benomyl	50% WP	1	167	No
Boscalid	50% WP	7	333	Yes
Carbendazim	41.7% SC	1	209	No
Cyprodinil 37.5% + Fludioxonil 25%	62.5% WG	9, 12	313	Yes
Fluopyram 25% + Trifloxystrobin 25%	50% SC	7, 11	125	Yes
Fluxapyroxad	30% SC	7	60	Yes
Iprodione	23.7% SC	2	237	Yes
Isopyrazam	12.5% EC	7	62.5	No
Mepanipyrim	40% SC	9	133	Yes
Metiram	80% WG	M3	1600	Yes
Myclobutanil	40% WP	3	133	No
Polyoxins	50% SG	19	100	No
Procymidone	50% WP	2	250	Yes
Pyraclostrobin	23.6% EC	11	80	Yes
Pyrimethanil	37.4% SC	9	250	Yes
Thiabendazole	41.8% SC	1	418	No
Thiophanate-methyl	70% WP	1	700	No
Thiram	80% WP	M3	800	Yes
Calcium propionate	N/A	N/A	2000	N/A
Potassium Sorbate	N/A	N/A	2000	N/A
Sodium benzoate	N/A	N/A	2000	N/A

¹⁾ N/A: not applicable.

²⁾ FRAC: Fungicide Resistance Action Committee.

³⁾ Use rate represents the recommended active ingredient concentration on a product label for disease control, but the food antiseptics concentrations were set at 2000 µg/ml and adjusted their pH values to 4 with acetic acid.

⁴⁾ Registered for controlling strawberry diseases in Taiwan.

(0.2% trypan blue) 染色，以確定孢子是否死亡⁽⁴⁰⁾。以上各試驗供試菌株在各處理之孢子發芽百分率均先進行顯著性分析 (One-way analysis of variance, ANOVA)，差異達 5% 顯著水準，則對處理間之差異進行費雪最小顯著差異測驗 (Fisher's protected least significant difference test, LSD, 5%)。

五、殺菌劑及食品防腐劑對草莓灰黴病菌菌絲生長之影響

為測試前述 19 種殺菌劑及 3 種食品防腐劑分別對逢機選取之 6 株 (測試殺菌劑) 及 28 株 (測試食品防腐劑) 草莓灰黴病菌菌絲生長之影響，乃以供試菌株生長於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 3 日之菌落為接種源，先以直徑 5 mm 打孔器切取菌落周緣之菌絲塊，將之分別放入注有 200 μ L 供試藥液之微量滴定板盤穴內。另將菌絲塊加入無菌水之處理為對照。供試藥劑之稀釋方法及濃度同於前項試驗。於室溫下 (24~28°C) 處理 2 小時，再以移植針將菌絲塊挑出，置於滅菌過之擦手紙將藥液吸乾，並移置於直徑 9 cm 之馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板中央，於 24°C 黑暗之定溫箱培養 3 日。以通過菌落中心點之兩條垂直線為準，量取菌落直徑，並以二者之平均值為該菌落之直徑度量，以比較各化學藥劑抑制菌絲生長之效果。每菌株每藥劑處理 4 重複。

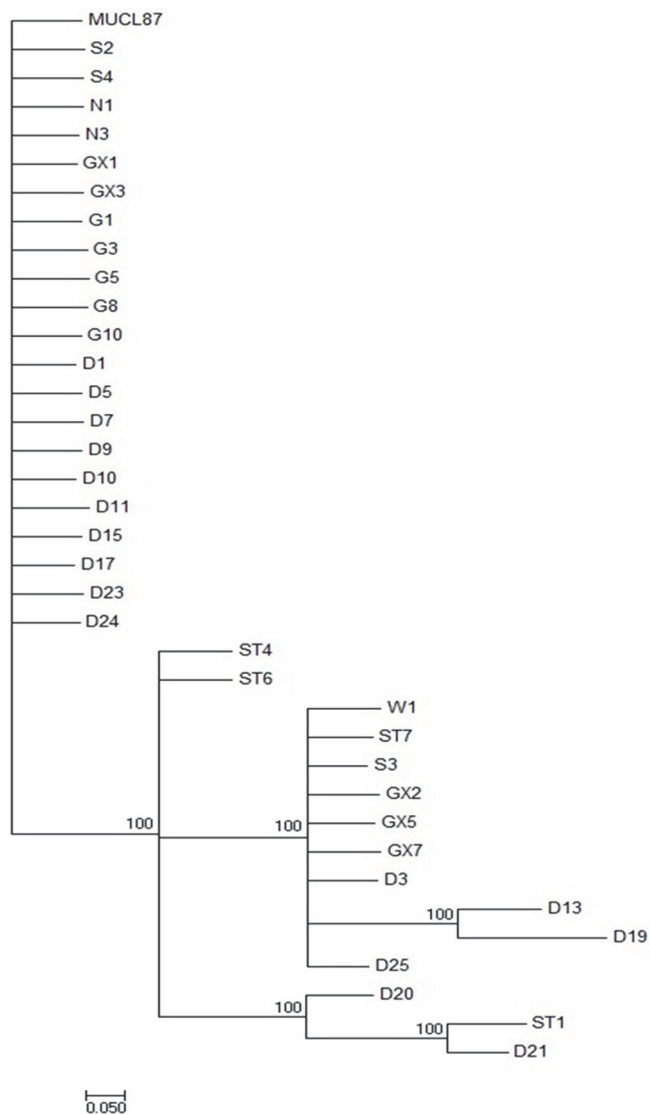
結果

一、草莓灰黴病菌之菌落型及分子親緣性分析

草莓灰黴病菌在馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基經 14 日之培養，呈現三種菌落型態：分生孢子型 (conidial)、菌核型 (sclerotial) 及兼有孢子及菌核之中間型 (intermedial)，其分別以分生孢子或菌核為主要真菌構造 (fungal structure) 與兩者兼有之三種菌落型態。其中菌核型最少，分生孢子型及兩者兼具型較多，且數量略等 (表一)。供試之 36 株草莓灰黴病菌的 3 種基因 (*HSP60*, *RPB2*, *G3PDH*) 經定序、整理並鏈結後進行親緣性分析，在全部序列中有差異的鹼基總計僅有 6 個，於總長 2975 個鹼基中僅占 0.3%。其中 21 株菌之基因序列的全部鹼基均相同，且與模式菌株 MUCL87 無異，其餘 15 株菌則分別有 1 至 4 個鹼基變異，且變異之鹼基平均分布在 3 條基因上。各地分離所得菌株在親緣樹位置呈逢機分布，並無因地緣而聚集的現象 (圖一)。

二、殺菌劑及食品防腐劑對草莓灰黴病菌分生孢子發芽之影響

本試驗各處理經 24 h 後，計數孢子發芽率得知，供試 19 種殺菌劑僅得恩地對 6 株草莓灰黴病菌之孢子發芽可完全抑制，



圖一、草莓灰黴病菌菌株分子親緣關係圖。

Fig. 1. Phylogenetic analysis of strawberry isolates of *Botrytis cinerea* based on concatenated gene sequences of the *RPB2*, *HSP60* and *G3PDH*. This analysis was performed by Bayesian inference method using TOPALi version 2.5. The numbers above nodes indicate Bayesian posterior probability. MUCL 87 is the ex-type strain. Scale bar=0.05 substitutions per site.

其餘殺菌劑如白克列、賽普護汰寧、三氟派瑞、氟克殺及亞派占等分別能抑制 1 至 3 株供試菌的孢子發芽，其餘 13 種殺菌劑則均無抑菌作用 (表三)。但 3 種食品防腐劑均能完全抑制 6 株供試菌株之孢子發芽 (表三)。另測試賽普護汰寧、得恩地及苯甲酸鈉對 36 株草莓灰黴病菌孢子之抑菌作用，其結果顯示，經賽普護汰寧之處理，多數菌株之孢子於 1 天內即發芽，其

餘未發芽之孢子或無發芽孢子之菌株經 4 至 7 天亦陸續發芽。得恩地之處理，第一天有 1 菌株發芽，第 4 日則增至 18 株，第 7 日更達 28 株。食品防腐劑苯甲酸鈉之處理則對全部供試菌株歷經 1 至 7 日均未見其孢子發芽。各處理未發芽孢子經臺盼藍水溶液染色，確定其已死亡 (表四)。

表三、殺菌劑及食品防腐劑對草莓灰黴病菌孢子發芽之影響

Table 3. Effect of fungicides and food antiseptics on conidial germination of *Botrytis cinerea* isolates collected from strawberry

Chemical	Germination rate (%) ^{1, 2)}					
	S2	G1	D23	W1	GX1	ST1
Azoxystrobin	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	96.5±0.6 bcd	100.0±0.0 a
Benomyl	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	97.5±0.5 bcd	100.0±0.0 a	95.3±2.2 cd	92.3±0.9 d
Boscalid	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	0.0±0.0 g	0.0±0.0 h	97.3±0.8 abcd	0.0±0.0 g
Carbendazim	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	97.5±0.5 bcd	100.0±0.0 a	99.0±0.4 ab	91.8±0.9 d
Cyprodinil + Fludioxonil	100.0±0.0 a	0.0±0.0 e	0.0±0.0 g	96.0±0.8 e	95.5±1.0 cd	100.0±0.0 a
Fluopyram + Trifloxystrobin	100.0±0.0 a	0.0±0.0 e	96.0±0.7 cd	100.0±0.0 a	89.3±1.7 f	0.0±0.0 g
Fluxapyroxad	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	90.5±0.6 e	0.0±0.0 h	91.8±0.9 ef	83.8±0.5 e
Iprodione	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	91.8±0.9 e	96.3±0.6 de	98.8±0.5 ab	100.0±0.0 a
Isopyrazam	88.3±0.9 b	97.8±0.5 b	97.0±0.9 bcd	0.0±0.0 h	90.8±0.8 f	93.3±0.8 d
Mepanipyrim	100.0±0.0 a	97.2±0.5 b	100.0±0.0 a	99.3±0.5 ab	98.3±0.3 abc	98.5±0.3 ab
Metriam	53.0±2.6 c	27.3±2.2 d	38.0±1.2 f	72.3±1.7 g	22.8±2.2 h	19.3±2.5 f
Myclobutanil	100.0±0.0 a	90.5±0.5 c	100.0±0.0 a	97.8±0.8 bcd	53.8±1.7 g	98.3±0.9 abc
Polyoxins	98.8±0.9 a	97.8±0.9 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Procymidone	100.0±0.0 a	98.0±0.7 b	95.5±1.0 d	82.0±0.8 f	100.0±0.0 a	97.5±1.2 bc
Pyraclostrobin	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	99.0±0.4 ab	98.0±0.4 bc	100.0±0.0 a	92.5±1.6 d
Pyrimethanil	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	96.3±0.9 cd	96.8±0.8 cde	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Thiabendazole	100.0±0.0 a	98.8±0.5 ab	97.8±0.6 bc	98.0±0.7 bc	94.3±0.9 de	100.0±0.0 a
Thiophanate-methyl	100.0±0.0 a	98.8±0.3 ab	97.8±0.6 bc	99.3±0.3 ab	96.5±0.5 bcd	96.0±0.9 c
Thiram	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e	0.0±0.0 g	0.0±0.0 h	0.0±0.0 i	0.0±0.0 g
Calcium propionate	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e	0.0±0.0 g	0.0±0.0 h	0.0±0.0 i	0.0±0.0 g
Potassium sorbate	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e	0.0±0.0 g	0.0±0.0 h	0.0±0.0 i	0.0±0.0 g
Sodium benzoate	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e	0.0±0.0 g	0.0±0.0 h	0.0±0.0 i	0.0±0.0 g
Control (water)	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	97.0±0.4 bcd	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a

¹⁾ Mean±standard error (n=4). Mean values within a column followed by the same letters were not significantly different at the 5% level according to Fisher's protected least significant difference test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis. Data were taken 24 h after treatment.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.

表四、賽普護汰寧、得恩地及苯甲酸鈉對草莓灰黴病菌孢子發芽之影響

Table 4. Effect of cyprodinil+fludioxonil, thiram, and sodium benzoate on conidial germination of *Botrytis cinerea* isolates collected from strawberry

Isolate ²⁾	Conidial germination rate (%) ¹⁾									
	Cyprodinil+Fludioxonil			Thiram			Sodium benzoate			Control
	D1	D4	D7	D1	D4	D7	D1	D4	D7	D1
S2	100.0±0.0	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	98.8±0.8
N1	90.0±0.7	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	86.5±0.8	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.3±0.5
G1	0.0±0.0	82.3±1.1	92.3±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	97.8±0.7
G10	92.0±1.6	N/A	N/A	0.0±0.0	95.8±0.7	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
D1	96.0±0.7	N/A	N/A	73.0±1.1	94.5±1.5	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
D10	95.0±1.1	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
D15	97.8±0.5	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
D23	0.0±0.0	95.0±1.1	N/A	0.0±0.0	96.3±0.7	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
W1	96.0±0.7	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	97.3±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
GX1	95.5±0.8	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
ST1	100.0±0.0	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
ST6	93.5±1.1	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	93.5±1.1
S3	92.0±0.8	N/A	N/A	0.0±0.0	94.3±0.7	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	94.5±0.6
S4	0.0±0.0	95.8±0.7	N/A	0.0±0.0	13.5±0.9	64.8±1.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	95.8±0.7
N3	66.3±0.7	N/A	N/A	0.0±0.0	94.8±1.1	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.3±0.7
G3	0.0±0.0	0.0±0.0	28.3±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	82.8±1.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.0±0.6
G5	100.0±0.0	N/A	N/A	0.0±0.0	85.8±0.7	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.3±0.7
G8	97.8±0.2	N/A	N/A	0.0±0.0	98.0±0.6	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	98.3±0.4
D3	100.0±0.0	N/A	N/A	0.0±0.0	4.3±0.4	91.8±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
D5	94.5±1.5	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	52.8±1.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.0±0.7
D7	92.3±0.7	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.0±0.7
D9	99.3±0.4	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	23.5±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	97.0±0.8
D11	97.5±0.6	N/A	N/A	0.0±0.0	82.0±1.7	98.0±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	97.3±0.6
D13	100.0±0.0	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
D17	0.0±0.0	0.0±0.0	93.8±1.3	0.0±0.0	0.0±0.0	62.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	98.0±0.6
D19	97.3±0.6	N/A	N/A	0.0±0.0	95.8±0.7	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	98.0±0.4
D20	93.0±1.1	N/A	N/A	0.0±0.0	63.8±1.3	65.8±1.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.8±1.0
D21	73.0±1.1	N/A	N/A	0.0±0.0	43.8±1.7	48.8±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	95.8±0.7
D24	0.0±0.0	91.8±0.7	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	24.5±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.5±0.8
D25	86.8±0.6	N/A	N/A	0.0±0.0	87.0±1.1	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	95.8±0.7
GX2	95.5±1.6	N/A	N/A	0.0±0.0	31.3±0.8	91.8±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	97.0±0.5
GX3	96.3±0.7	N/A	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	50.5±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
GX5	0.0±0.0	93.3±1.2	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	92.8±1.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	96.0±0.8
GX7	97.3±0.6	N/A	N/A	0.0±0.0	48.8±1.0	42.8±1.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	97.3±0.6
ST4	49.5±1.3	55.0±1.1	97.8±0.5	0.0±0.0	89.0±0.8	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
ST7	95.8±0.7	N/A	N/A	0.0±0.0	95.8±0.7	N/A	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	97.5±0.6

¹⁾ Mean±standard error (n=4). N/A: not applicable. Data were taken 1 day (D1), 4 days (D4), and 7 days (D7) after treatment, respectively.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.

三、殺菌劑及食品防腐劑對草莓灰黴病菌菌絲生長之影響

供試 19 種殺菌劑對草莓灰黴病菌之絕大部分供試菌株的菌絲生長均無抑制作用，僅有一菌株 ST1 受到屬相同作用機制 (抑制有絲分裂微管蛋白聚合 (β -tubulin assembly in mitosis, FRAC code: 1)) 之 4 種殺菌劑抑制，此 4 種藥劑分屬苯併咪唑類

(benzimidazoles) 之免賴得、貝芬替、腐絕及硫脲甲酸類 (thiophanates) 之甲基多保淨 (表五)。供試之 3 種食品防腐劑處理 28 株草莓灰黴病菌經 3 天之觀察，結果互異。苯甲酸鈉對供試菌株之菌絲均具抑制作用，而丙酸鈣對供試菌株卻均無抑制作用，己二烯酸鉀則對多數菌株具抑制作用 (表六)。

表五、殺菌劑對草莓灰黴病菌菌絲生長之影響

Table 5. Effect of fungicides on mycelial growth of *Botrytis cinerea* isolates collected from strawberry

Fungicide	Mycelial growth ^{1, 2)}					
	S2	G1	D23	W1	GX1	ST1
Azoxystrobin	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benomyl	+++	+++	+++	+++	+++	-
Boscalid	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Carbendazim	++	+++	+++	+++	+++	-
Cyprodinil + Fludioxonil	++	+	+++	+++	+	+
Fluopyram + Trifloxystrobin	++	++	++	++	++	+
Fluxapyroxad	++	+++	+++	++	+++	+++
Iprodione	++	++	+++	+	++	+
Isopyrazam	++	+++	++	++	++	+
Mepanipyrim	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Metiram	+++	+++	+++	+++	++	+++
Myclobutanil	++	++	++	++	+	++
Polyoxins	+++	+++	+++	++	+++	+++
Procymidone	+++	+++	+++	+	+++	+
Pyraclostrobin	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pyrimethanil	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Thiabendazole	+++	+++	+++	+++	+++	-
Thiophanate-methyl	+++	+++	+++	+++	+++	-
Thiram	++	+	+++	+++	+	+++
Control (water)	+++	+++	+++	+++	+++	+++

¹⁾ Diameter range of colony after 3-day-growth on potato dextrose agar: +++, > 4.0 cm; ++, 2.1 to 4.0 cm; +, 0.1 to 2.0 cm; -, no growth.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.

表六、食品防腐劑對草莓灰黴病菌菌絲生長之影響

Table 6. Effect of food antiseptics on mycelial growth of *Botrytis cinerea* isolates collected from strawberry

Isolate ²⁾	Mycelial growth ¹⁾			
	Calcium propionate	Potassium sorbate	Sodium benzoate	Control (water)
S2	+++	-	-	+++
N1	+	-	-	+++
G1	++	-	-	+++
G10	+++	++	-	+++
D1	+	-	-	+++
D10	++	-	-	+++
D15	++	-	-	+++
D23	+++	+++	-	+++
W1	+	-	-	+++
GX1	+++	-	-	+++
ST1	++	-	-	+++
ST6	++	-	-	+++
S3	+	-	-	+++
S4	+	-	-	+++
N3	+++	-	-	+++
G3	++	-	-	+++
G5	+	-	-	+++
G8	++	-	-	+++
D3	++	-	-	+++
D21	+	+	-	+++
D24	+++	+	-	+++
D25	++	-	-	+++
GX2	+	-	-	+++
GX3	++	-	-	+++
GX5	+++	-	-	+++
GX7	+	-	-	+++
ST4	+	++	-	+++
ST7	+	-	-	+++

¹⁾ Diameter range of colony after 3-day-growth on potato dextrose agar: +++, > 4.0 cm; ++, 2.1 to 4.0 cm; +, 0.1 to 2.0 cm; -, no growth.

²⁾ Refer to Table 1 for isolate information.

討論

由臺灣各地分離所得之草莓灰黴病菌的三種基因序列 (*RPB2*, *HSP60*, *G3PDH*) 差異甚小，且多數菌株 (約 60%) 之三種基因序列並無差異且同於模式菌種 MUCL87，其他菌株亦僅 1~4 個鹼基之差。這可能與臺灣地區草莓苗來源有關，它們多來自相同地區，例如，苗栗大湖，這使得依附草莓苗的灰黴病菌因屬相同族群以致變異較少。但亦可能係這三種基因主要用於種間鑑別 (interspecies identification)，因而其種內 (intraspecies) 的變異較小，此亦見於前人之報告⁽³¹⁾。是項結果亦顯示，這三條基因以其在種內變異小而具良好的種間鑑別能力。

本研究使用之 19 種殺菌劑涵蓋 8 種化學類別 (chemical classes)，多數藥劑已對草莓灰黴病菌不具藥效，僅有得恩地於 24 小時內尚能完全抑制全部供試菌株之孢子發芽，但經 4 至 7 天觀察，則大多數菌株孢子會陸續發芽 (表三、四)。賽普護汰寧在表三之結果顯示僅有菌株 G1 及 D23 受其抑制，但在表四則顯示當更多菌株供試，受抑制的菌株也隨之增加，但這些菌株經 4 至 7 天後均會有不同程度的發芽率，亦即賽普護汰寧只能於藥劑處理初期抑制部分菌株孢子發芽，且多屬靜菌作用。賽普護汰寧現仍是臺灣地區灰黴病常用的防治藥劑，該殺菌劑為混合劑含賽普洛及護汰寧兩種成分，單劑護汰寧在臺灣並無販售。著者曾測試購得之賽普洛 (先

正達) 的藥效，發現該單劑於推薦濃度並無抑制灰黴病菌孢子發芽的效果 (著者，未發表)。因此，推測此混合劑的有效成分應僅為護汰寧，且藥效已不佳。但國內外報告多認為灰黴病菌尚未對護汰寧產生普遍之抗藥性，賽普洛則否^(11, 18, 19, 20, 23, 29, 35, 41)。然而，護汰寧之抗藥性問題確已漸浮現^(25, 32, 34)。而我們的試驗結果亦顯示，賽普護汰寧對灰黴病菌的藥效不佳，此應與灰黴病菌對賽普護汰寧正在增加的抗藥性有關。本研究復顯示，大部分孢子未發芽之菌株係受琥珀酸脫氫酶抑制劑類藥劑 (succinate dehydrogenase inhibitors, SDHIs) 抑制 (表三)，且僅限於部分該類藥劑。可見相同作用機制之不同藥劑對灰黴病菌抗藥族群的影響不同，至少部分菌株並不具交互抗藥性現象，此與之前果樹炭疽病菌研究結果類同⁽⁸⁾。

本研究又顯示，雖有少數供試殺菌劑對灰黴病菌孢子發芽有不同程度的抑制作用，但對灰黴病菌的菌絲則幾無抑制，此亦表示殺菌劑對孢子的藥效優於菌絲，這在果樹炭疽病菌及其他草莓灰黴病菌之研究亦有類似現象^(8, 37)。在供試菌株中 ST1 的菌絲生長受少數殺菌劑之抑制且未再生長，其在孢子發芽之試驗亦然，此可能與該菌株特性有關，ST1 應是一株對某些殺菌劑感受性較高的菌株。但抑制其孢子發芽與抑制其菌株生長的藥劑種類卻完全不同 (表三、五)，此亦可證殺菌劑作用機制與病原菌生理特性之間的複雜關係。

在我們過往的研究中常見多點作用機

制藥劑較不易產生抗藥性 (6, 7, 8)。但在本研究中同屬二硫代胺基甲酸鹽類藥劑之免得爛及得恩地，卻見草莓灰黴病菌孢子對其有不同反應。在免得爛之處理，灰黴病菌孢子雖會發芽但發芽率相對較低，顯示其尚有局部抑制作用。但得恩地則完全抑制其發芽 (表三)，如持續觀察，則多數菌株經 4 至 7 日會陸續發芽 (表四)。顯見得恩地雖初始藥效較佳，但對多數菌株僅具暫時性的靜菌作用，如於田間應用該藥劑，勢需縮短施藥間隔期才能達到防治效果。此項結果也在預警二硫代胺基甲酸鹽類藥劑的抗藥性現象在灰黴病菌已然浮現，可能將使這一類的藥劑失去其防治灰黴病的功效。依此判斷，多點作用機制藥劑的抗藥性問題終將出現，這是殺菌劑抗藥性管理上的警訊，值得密切注意。但在本研究中，亦見如白克列、賽普護汰寧、三氟派瑞、氟克殺及亞派占等單點作用機制藥劑尚可抑制部分菌株之孢子發芽 (表三)，可見多點與單點作用機制藥劑各擅勝場。

由於殺菌劑抗藥性問題已由單點作用機制藥劑擴大到多點作用機制藥劑，就灰黴病而言，國內外現有的推薦藥劑恐難長期維持其有效性。面對嚴峻的灰黴病菌抗藥性問題，勢須另覓具永續性之替代防治資材。此類資材除須具有藥效外，尚須對人畜及環境以至非目標生物等都須是安全的，且農用資材價格必須低廉，因而開發這類植保資材是極大挑戰。本研究嘗試應用部分食品防腐劑作為草莓灰黴病之防治

藥劑，在兼顧有藥效、無藥害，且須價廉又安全的條件下，我們選出苯甲酸鈉、丙酸鈣及己二烯酸鉀作為本病田間防治的候用資材，其中又以苯甲酸鈉最具潛力，因其可同時抑制灰黴病菌的孢子發芽與菌絲生長。目前該項資材已進行初步的田間試驗，結果尚佳 (著者，未發表)。我們期待今後有更多田間試驗來支持其作為灰黴病的替代性防治資材。

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. 未具名。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。
2. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。2019。植物保護資訊系統。檢自 <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/> (April 18, 2020)
3. 李敏郎、陳隆鐘、陳天枝。2004。百合灰黴病菌之室內藥劑篩選與其田間防治效果。植保會刊 46 : 1-13。
4. 段中漢。2015。微量滴定板篩選植物萃取液與植物 (精) 油抑制菜豆銹病菌及草莓灰黴病菌。植病會刊 24 : 67-75。
5. 段中漢、王群中。2019。食品防腐劑防

- 治植物真菌性病害之初步評估 植物醫學 61(2/3) : 38。
6. 段中漢、張智凱、王群中。2017。芒果炭疽病之藥劑防治與熱處理。臺灣農藥科學 3 : 65-78。
 7. 段中漢、潘蕙如、王群中。2018。臺灣五種果樹炭疽病菌之鑑定、病原性及對殺菌劑之感受性。臺灣農藥科學 5 : 91-111。
 8. 段中漢、潘蕙如、王群中。2019。果樹炭疽病菌之分子鑑定及對殺菌劑之感受性。臺灣農藥科學 6 : 71-104。
 9. 陳麗淑、鐘文全、鐘文鑫。2009。臺灣草莓灰黴病菌對 Strobilurin 類 (QoIs) 殺菌劑之感受性。植病會刊 18 : 89-99。
 10. 童伯開、黃啟鐘、曾素玲、蔡竹固。1994。臺灣柿灰黴病的發生及化學防治。植保會刊 36 : 53-63。
 11. Adnan, M., Hamada, M. S., Li, G. Q., and Luo, C. X. 2018. Detection and molecular characterization of resistance to the dicarboximide and benzamide fungicides in *Botrytis cinerea* from tomato in Hubei province, China. Plant Dis. 102: 1299-1306.
 12. 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.
 13. Amiri, A., Heath, S. M., and Peres, N. A. 2014. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. Plant Dis. 98: 532-539.
 14. Angelini, R. M. De M., Masiello, M., Rotolo, C., Pollastro, S., and Faretra, F. 2014. Molecular characterization and detection of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Pest Manag. Sci. 70: 1884-1893.
 15. Asadollahi, M., Szojka, A., Fekete, E., Karaffa, L., Takács, F., Flippini, M., and Sándor, E. 2013. Resistance to QoI fungicide and cytochrome b diversity in the Hungarian *Botrytis cinerea* population. J. Agr. Sci. Tech. 15: 397-407.
 16. 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.
 17. Dowling, M. E., Hu, M. J., Schmitz, L. T., Wilson, J. R., and Schnabel, G. 2016. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry with reduced sensitivity to polyoxin D zinc salt. Plant Dis. 100: 2057-2061.
 18. 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.

19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Fernández-Ortuño, D., Pérez-García, A., Chamorro, M., de la Peña, E., de Vicente, A. and 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.
23. 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.
24. Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., and Schnabel, G. 2013. Fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry fields in the Carolinas is associated with four target gene mutations. *Plant Dis.* 97: 271-276.
25. Grabke, A., and Stammer, G. 2015. A *Botrytis cinerea* population from a single strawberry field in Germany has a complex fungicide resistance pattern. *Plant Dis.* 99: 1078-1086.
26. Hervieux, V., Yaganza, E. S., Arul, J., and Tweddell, R. J. 2002. Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Plant Dis.* 86: 1014-1018.
27. 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.
28. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
29. Lee, M. L. 2005. Baseline sensitivity of *Botrytis elliptica* to fludioxonil in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 48: 163-171.
30. Lennox, C. L., and Spotts, R. A. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 87: 645-649.
31. Mansouripour, S., and Holmes, G. J. 2020.

- First report of *Botrytis cinerea* causing leaf spot on strawberry in California. *Plant Dis.* 104: 1866.
32. 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.
 33. Olivier, C., MacNeil, C. R., and Loria, R. 1999. Application of organic and inorganic salts to field-grown potato tubers can suppress silver scurf during potato storage. *Plant Dis.* 83: 814-818.
 34. 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.
 35. 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.
 36. Schnabel, G. 2016. Evolution, mechanisms and management of fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Acta Hort.* 1117: 83-86.
 37. Song, Y., Zhang, Z., Chen, L., He, L., Lu, H., Ren, Y., Mu, W., and Liu, F. 2016. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to the succinate dehydrogenase inhibitor isopyrazam and efficacy of this fungicide. *Plant Dis.* 100: 1314-1320.
 38. Staats, M., van Baarlen, P., and van Kan, J. A. L. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* 22: 333-346.
 39. Staden, R. 1980. A new computer method for the storage and manipulation of DNA gel reading data. *Nucleic Acids Res.* 8: 3673-3694.
 40. Strober, W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111: A3-B.
 41. Yin, W. X., Adnan, M., Shang, Y., Lin, Y., 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.

Sensitivity to Fungicides and Food Antiseptics in *Botrytis cinerea* from Strawberry in Taiwan

Chung-Hang Duan^{1*}, Guan-Ying Chen¹

Abstract

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.

Botrytis cinerea isolates with resistance to multiple chemical classes of fungicides have been detected frequently in many parts of the world. In the present study, 36 representative isolates of *B. cinerea* collected from strawberry fields in Taiwan were used to investigate their phylogeny and determine their sensitivities to the 19 botryticides and 3 food antiseptics. The phylogenetic analysis of *B. cinerea* isolates revealed that 21 of the 36 tested isolates were identical in concatenated sequences of the *RPB2*, *HSP60* and *G3PDH* genes (DNA-dependent RNA polymerase subunit II, heat-shock protein 60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, respectively), while the others had 1 to 4 base pairs differences. Fungicides with their use rates or acidifying solutions (pH 4) of food antiseptics (2 g/L) loading in microtiter plate were employed to estimate their inhibition on *B. cinerea* isolates based on conidial germination and mycelial growth. In conidial germination tests, only thiram could inhibit all the tested isolates, while boscalid, cyprodinil + fludioxonil, fluopyram + trifloxystrobin, fluxapyroxad and isopyrazam could also inhibit few isolates, and most of them were fungistatic. Acidifying solutions of food antiseptics including calcium propionate, potassium sorbate, and sodium benzoate were fungicidal to the conidia of all the tested isolates. In mycelial growth tests, all the tested fungicides and calcium propionate had almost no inhibitory effect; conversely, sodium benzoate followed by potassium sorbate was very effective in inhibiting the mycelial growth.

Key words: strawberry, *Botrytis cinerea*, fungicide, food antiseptic

Accepted: September 24, 2020.

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

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