

稻熱病菌抗丙烯酸酯類殺菌劑菌株之分子檢測與集群分析

段中漢^{1*}、陳冠穎¹、張豪方²

¹ 農業部農業藥物試驗所農藥應用組，臺灣臺中市。

² 源資國際生物科技股份有限公司，臺灣臺中市。

* 聯絡作者，E-mail: chduan1@hotmail.com

摘要

段中漢、陳冠穎、張豪方。2024。稻熱病菌抗丙烯酸酯類殺菌劑菌株之分子檢測與集群分析。植物醫學66(3_4): 50-59。

*Pyricularia oryzae*引起的稻熱病是臺灣水稻重要病害之一，為防治稻熱病須頻繁施用化學藥劑，易引發抗藥性風險。為探究稻熱病菌對丙烯酸酯類 (strobilurins) 殺菌劑抗藥性現況及其分子檢測的可行性，乃以2019年迄2023年採自臺灣各縣市水稻田的192株稻熱病菌單孢菌株，運用定序技術偵測其細胞色素*b*基因 (*cyt b*) 第129、137及143密碼子之變異。結果為第129密碼子有6株菌 (3.13%) 變異 (F129L)，137密碼子皆無變異，143密碼子有171株菌 (89.06%) 變異 (G143A)。測試兩種變異密碼子代表菌株之菌絲半抑制有效濃度 (EC₅₀) 得知，G143A突變株對百克敏呈低抗藥性或無抗藥性，對亞托敏及三氟敏均呈高抗藥性，但菌株RB225僅呈中等抗藥性；F129L突變株對百克敏及三氟敏皆無抗藥性，但對亞托敏呈低抗藥性。*cyt b*基因無變異之野生型菌株對上述三種藥劑都無抗藥性。應用t-隨機鄰近嵌入 (t-SNE) 演算法對供試菌株作集群分析顯示，G143A突變株遍布稻熱病菌各種遺傳背景之集群，而F129L突變株僅見於花蓮及臺東兩縣且屬同一集群。

關鍵詞：稻熱病菌、丙烯酸酯類抗藥性、*cyt b*基因、t-隨機鄰近嵌入

前言

稻米是臺灣民眾的主食，水稻 (*Oryza sativa* L.) 是臺灣栽培面積最大的作物，迄2023年，兩期作合計達22.2萬餘公頃⁽¹⁾。由*Pyricularia oryzae* Cavara引起的稻熱病是臺灣水稻最重要的病害⁽⁹⁾，此病害的防治雖以栽種抗病品種最為經濟且對環境友善，但因育成之抗病品種，特別是栽種面積最廣的粳稻，在推廣種植後1至5年即感病⁽⁷⁾，使得施用殺菌劑成為不得

不然的防治方法。惟長期且大量施用化學藥劑極易引發病原菌抗藥性，根據殺菌劑抗藥性行動委員會 (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC) 發布的資料，大部分作用機制 (mode of action, MOA) 的殺菌劑存有不同程度的抗藥性風險⁽¹⁵⁾。在國內外，稻熱病菌對殺菌劑呈現抗藥性或低感受性 (less sensitive) 的報告頗為常見^(8, 10, 18)。另據2023年發表之臺灣地區稻熱病菌對多種殺菌劑藥效試驗結果，供試19種殺菌劑於標稱劑量 (label rate)，已有17種對部分稻熱病菌菌株的孢子發芽抑制率低於50%，而對部分菌株菌絲生長抑制率低於50%者則有13種，反映稻熱病菌抗藥性問題在臺灣已然存在⁽¹²⁾。

經查農業部農業藥物試驗所建置之植物保護資訊系統，登記於防治稻熱病的化學藥劑共有28種有效成分 (active ingredient, a.i.)，分屬17種作用機制，用以防治稻種、秧苗、稻葉及稻穗等不同水稻生育期的稻熱病⁽³⁾。在稻熱病各種防治藥劑中，百克敏 (pyraclostrobin) 屬丙烯酸酯類殺菌劑 (strobilurin fungicide) 又稱對苯醌外部抑制劑 (quinone outside inhibitor, QoI)，是名列FRAC Code List[®] 2024具高風險抗藥性的藥劑類別，且對同屬code 11的其他藥劑具交互抗藥性 (cross resistance)⁽¹⁵⁾。此類藥劑於1996年陸續問市，並因其廣效性而迅速成為全球銷售金額最高的殺菌劑⁽⁴⁾。臺灣於1997年核准亞托敏 (azoxystrobin) 及克收欣 (kresoxim-methyl) 登記使用，爾後，三氟敏 (trifloxystrobin) 及百克敏等藥劑亦相繼進入國內市場，是臺灣廣為使用的真菌病害防治藥劑⁽²⁾。丙烯酸酯類殺菌劑的作用機制是藉其結合在病原菌粒線體呼吸鏈複合體 (mitochondrial respiratory chain complexes) 之複合物III---細胞色素bc₁ 酵素複合體 (cytochrome bc₁ enzyme complex) 的Qo位點，阻擋電子在cytochrome b與cytochrome c₁間傳遞，阻斷能量生成^(13, 16)。丙烯酸酯類殺菌劑的抗藥菌株常見其編碼膜蛋白cytochrome b的*cyt b*基因發生特定位點突變，導致這關鍵位點的胺基酸發生改變，使殺菌劑不能與之結合致藥劑不能發揮功能，因而呈現抗藥現象，是標靶點機制 (target-site based mechanisms) 抗藥性的典型案例。相關研究指出，病原真菌抗藥菌株的*cyt b*基因突變頻率

最高者為第143密碼子，原編碼之甘胺酸 (glycine, G) 被丙胺酸 (alanine, A) 取代 (G143A)；其次為第129 密碼子，原編碼之苯丙胺酸(phenylalanine, F) 被白胺酸 (leucine, L) 取代 (F129L)；較罕見者為第137 密碼子，原編碼之甘胺酸被精胺酸 (arginine, R) 取代 (G137R)^(4, 30, 36)。國外已有多篇研究報告證實，*Pyricularia* spp. 菌株可因上述密碼子的突變而成為對亞托敏或三氟敏的抗藥菌株^(5, 20, 27)。臺灣在10餘年前就有研究報告稱，部分稻熱病菌已對亞托敏及克收欣呈低感受性 (less sensitivity)，但未見上述密碼子突變⁽¹⁸⁾。經歷10餘年後，臺灣稻熱病菌對易生抗藥性的丙烯酸酯類殺菌劑感受性狀況如何，*cyt b* 基因的抗藥相關密碼子是否已有變異，均是值得追蹤探討的議題。

集群分析 (cluster analysis) 是一種精簡資料的方法，依據樣本間的共同屬性將相似的樣本聚集在一起，形成集群。通常以距離作為分群的依據，相對距離愈近，相似程度愈高，分群之後可以使得群內差異小、群間差異大。利用多種分子標記進行菌株多基因座基因型 (multilocus genotype) 分型，雖可得知個別菌株基因分型概況，但眾多基因型菌株之間的關係與分布以及其與抗藥性的關聯性則難以知悉。因而希冀能以圖像化方式或稱數據可視化，將此多維度數據 (high-dimensional data) 降至人們可感知的二維度圖形 (two-dimensional map)，以呈現菌株 *cyt b* 基因型結合多基因座基因型的分布概況。t-隨機鄰近嵌入 (t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) 機器學習演算法是一種非線性降維 (non-linear dimensionality reduction) 方法，能將菌株複雜的多維數據組 (如分子標記) 進行低維度的轉換，但仍能保持數據點 (data point) 間的關係，以達樣本集群分析之目的^(32, 33)；此方法的特點是對處理高維度數據視覺化顯著優於其他方法⁽³³⁾。

本研究擬以近年採自臺灣全島各縣市的稻熱病菌192株定序其 *cyt b* 基因，用於比對抗丙烯酸酯類藥劑相關變異密碼子；再自不同變異密碼子所構成的 *cyt b* 基因型菌株中選出部分菌株，測其對此類藥劑的菌絲半抑制有效濃度 (EC₅₀)，以驗證其關聯性。此外，並運用t-隨機鄰近嵌入 (t-SNE) 演算法整合分析菌株多基因座基因型與 *cyt b* 基因型俾獲二維圖像，以呈現稻熱病菌不同 *cyt b* 基因型菌株的遺傳背景分布。是以本研究之目的，一為評估稻熱病菌抗丙烯酸酯類殺菌劑的分子檢測法，二在獲知稻熱病菌對此類殺菌劑的抗藥性現況，三則以t-隨機鄰近嵌入演算法呈現不同 *cyt b* 基因型菌株的集群分布圖，俾供後續相關研究之參考。

材料與方法

菌株來源與核酸萃取

自2019年9月至2023年5月分別前往臺灣本島各縣市水稻產區採集罹稻熱病之水稻葉片，以單孢分離法共獲得稻熱病菌

400餘株；菌株之分離、培養及保存等方法悉參照筆者已發表之報告⁽¹¹⁾。自採得的菌株中逢機選取分布於各水稻產區的菌株計192株，供本研究各項試驗之用⁽¹¹⁾。為獲得試驗所需之基因組去氧核糖核酸，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。刮取其菌絲，用核糖核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit, 百歐生技公司，臺灣) 抽取基因組去氧核糖核酸供後續基因增幅及定序之用。

細胞色素*b* (*cyt b*) 基因序列分析

為增幅稻熱病菌細胞色素基因 (*cyt b*)，乃依據已上傳基因銀行 (GenBank) 之該基因參考序列 (accession No. AY245425) 設計引子對進行基因增幅及定序，所用之正向及反向引子分別為RB_cytB-F (5'GGCTGTCTATTGGTTTAACT3') 及RB_cytB-R (5'GTACAATAGCAGCAGGAG3')。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 之反應總體積為25 μL，內含12.5 μL PowerAmp 2X PCRmix-Green (慧眾生技公司，臺灣)，其成分有1.25 units *Taq* DNA polymerase、0.4 mM 4種dNTP及3mM MgCl₂。反應前加入正反向引子各1 μL (10 μM) 及2 μL (10 ng) 之菌株基因體去氧核糖核酸，並補水至總體積25 μL。聚合酶連鎖反應以基因擴增儀 (Thermal Cycler) Biometra TAdvanced 96G (Analytik Jena GmbH, Germany) 進行基因增幅反應。增幅反應之起始溫度為95°C，5 min，接著進入35次增幅循環，每一循環之變性溫度 (denaturation temperature) 為95°C，30 sec，引子黏合溫度 (annealing temperature) 為55°C，30 sec，延伸溫度 (extension temperature) 為72°C，1 min，最後再以延伸溫度72°C，5 min結束反應。聚合酶連鎖反應產物接續進行基因單向定序。各菌株所獲的 *cyt b* 基因序列與前述參考基因序列 (AY245425) 以套裝軟體BioEdit version 7.0.5.3⁽¹⁷⁾ 作核酸序列比對，以獲知各菌株 *cyt b* 基因第129、137及143密碼子及其所編碼的胺基酸是否發生變異。

cyt b 基因型菌株之菌絲半抑制有效濃度

本試驗所用菌株依前項試驗結果，就第129及143密碼子編碼之不同胺基酸，將菌株區分為3種基因型：野生型 (Phe/Gly)、F129L突變型 (Leu/Gly) 及G143A突變型 (Phe/Ala)，並選取此3種基因型各地區代表菌株計24株供試 (表一)。殺菌劑以百克敏 (pyraclostrobin 23.6%EC，雅飛公司)、亞托敏 (azoxystrobin 50%WG，臺灣先正達公司) 及三氟敏 (trifloxystrobin 50%WG，臺灣拜耳公司) 等作為丙烯酸酯類殺菌劑供試藥劑。將供試殺菌劑以水稀釋系列濃度，分別混入滅菌後的基礎培養基 (表二)，基礎培養基配方為含量減半之馬鈴薯葡萄糖洋菜 (19.5 g PDA + 7.5 g agar/L, Difco™, USA)。各殺菌劑系列稀釋液尚須添加最終濃度為0.5 mM之水楊基羥污酸 (salicylhydroxamic acid, SHAM, Sigma-Aldrich, USA) 於培養基中以抑制替代氧化酵素 (alternative oxidase, AOX)^(22, 28)。配製完成

的培養基，倒入直徑9-cm之塑膠培養皿做成洋菜平板供試。而在全量馬鈴薯葡萄糖洋菜平板經24°C，無光照定溫箱培養5日的菌落為菌種。接種時，以直徑5-mm打孔器切取菌種菌落周緣的菌絲塊，移植至上述混有各種殺菌劑不同劑量的洋菜平板中央。接種後的平板置24°C、無光照之定溫箱培養5日。以通過菌落中心點之兩條垂直線為準，量取菌落直徑，再以二者平均值作為該菌落的直徑度量。供試菌株每藥劑濃度處理計3皿，每皿代表一重複。如重複間數據差異 ≥ 3 mm，該處理即須重做，直到重複間的數據 < 3 mm。殺菌劑的菌絲半抑制有效濃度 (EC_{50}) 是以殺菌劑系列濃度的對數值 (log value) 及菌株在各藥劑濃度下的菌落抑制百分率 [(不加藥劑處理之菌落直徑-藥劑處理之菌落直徑)/不加藥劑處理之菌落直徑] $\times 100\%$ 為變數，

經簡單線性迴歸分析 (simple linear regression analysis) 計算獲得。本計算係於Microsoft Excel 2016 (KB3178673) 64-Bit Edition 活頁簿中完成。

cyt b 基因型菌株集群分析

為探討供試稻熱病菌不同*cyt b* 基因型菌株之遺傳背景與分布概況，乃運用供試菌株先前完成之8種分子標記 (molecular markers)⁽¹¹⁾ 作為集群分析之數據組 (dataset)，以產出不同*cyt b* 基因型菌株之二維分布圖。圖中不同*cyt b* 基因型菌株將標以不同顏色之點，紅點為野生型菌株，藍點為F129L突變株，黑點為G143A突變株。演算法使用t-隨機鄰近嵌入 (t-SNE)，資料分析程式語言為R (t-SNE in R, v.4.4.1)^(21, 25, 33)。將上述3種*cyt b* 基因

表一、稻熱病菌細胞色素b基因突變株對丙烯酸酯類殺菌劑之感受性

TABLE 1. Sensitivity of *Pyricularia oryzae* isolates against the strobilurin fungicides and deduced amino acid substitutions in the *cyt b* gene sequence at two codons

Isolate	Amino acid of codon ¹		EC_{50} ² (a.i. $\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	129	143	pyraclostrobin	azoxystrobin	trifloxystrobin
Wild-type					
RB105	Phe	Gly	<0.001	<0.001	<0.001
RB156	Phe	Gly	<0.001	0.002	<0.001
RB160	Phe	Gly	<0.001	0.002	<0.001
RB257	Phe	Gly	<0.001	0.026	<0.001
RB316	Phe	Gly	<0.001	<0.001	<0.001
RB350	Phe	Gly	<0.001	0.007	<0.001
RB376	Phe	Gly	<0.001	0.002	<0.001
RB386	Phe	Gly	<0.001	0.006	<0.001
RB388	Phe	Gly	<0.001	0.006	<0.001
RB400	Phe	Gly	<0.001	<0.001	<0.001
G143A mutant					
RB6	Phe	Ala	0.015	>1000	>1000
RB20	Phe	Ala	0.001	444.062	>1000
RB44	Phe	Ala	<0.001	462.628	>1000
RB111	Phe	Ala	0.054	>1000	>1000
RB129	Phe	Ala	0.014	565.876	>1000
RB140	Phe	Ala	0.005	504.309	>1000
RB152	Phe	Ala	1.685	>1000	>1000
RB170	Phe	Ala	<0.001	799.256	>1000
RB225	Phe	Ala	<0.001	18.225	27.409
RB301	Phe	Ala	0.301	>1000	>1000
RB327	Phe	Ala	<0.001	>1000	>1000
RB395	Phe	Ala	0.060	>1000	>1000
F129L mutant					
RB148	Leu	Gly	<0.001	3.372	<0.001
RB253	Leu	Gly	<0.001	1.104	<0.001

¹ Ala: alanine, Gly: glycine, Leu: leucine, Phe: phenylalanine.

² EC_{50} was obtained by the mycelial growth inhibition method.

表二、稻熱病菌之殺菌劑半抑制有效濃度試驗用劑量

TABLE 2. Fungicide concentrations used to determine the EC₅₀ of *Pyricularia oryzae* isolates

Common name	Chemical group	Concentration (a.i. µg/mL) in medium ¹
Azoxystrobin	methoxy-acrylates	0, 0.1, 10, 100, 250, 500, 1000
Pyraclostrobin	methoxy-carbamates	0, 1, 10, 100, 250
Trifloxystrobin	oximino-acetates	0, 0.1, 1, 10, 100, 250, 500

¹ Half-strength potato dextrose agar (PDA): 19.5 g of PDA and 7.5 g of agar (Difco™) were added to 1000 mL of distilled water.

型菌株依據其8種分子標記匯入執行嵌入演算，使各菌株之高維度數據投影到二維平面圖，讓每一菌株的數據點在此二維圖上均有其位置以呈現菌株間相似度。t-隨機鄰近嵌入演算法需在降維前設置困惑度 (perplexity) 作為超參數 (hyperparameter)，乃以常用困惑度 (5~50) 分別進行演算以確定最適數值⁽²⁵⁾。

結 果

細胞色素*b* (*cyt b*) 基因序列分析

以RB_cytB-F及RB_cytB-R引子對增幅供試192株稻熱病菌的細胞色素*b*基因 (*cyt b*) 均可獲長度約850 bp之核酸增幅產物。再以RB_cytB-F進行*cyt b*基因單向定序即可於其基因序列約第400 bp處檢視其第129、137及143等三種密碼子。經與*cyt b*參考基因序列 (AY245425) 比對，第129密碼子有6株稻熱病菌 (占比3.13%) 由TTC突變為TTA，其編碼之胺基酸由苯丙胺酸轉變為白胺酸 (F129L)，但這些菌株僅分布於花蓮及臺東地區。第137密碼子均無突變，皆為GGA，其編碼之胺基酸為甘胺酸。第143密碼子有171株稻熱病菌 (占比89.06%) 由GGT突變為GCT，其編碼之胺基酸由甘胺酸轉變為丙胺酸 (G143A)，G143A突變菌株遍布於臺灣各地。此外，未見兼具第129及143兩種突變密碼子之菌株。無突變之野生型菌株則有15株 (占比7.81%)，分布於以下各縣市：宜蘭5株，桃園3株，新竹、苗栗及花蓮各2株及南投1株 (表三、補充表一)。

cyt b 基因型菌株之菌絲半抑制有效濃度

供試之G143A突變株對百克敏呈低抗藥性或感藥性，其EC₅₀介於1.685至小於0.001 µg/mL；對亞托敏多呈強抗藥性，除RB225 (EC₅₀=18.225 µg/mL)，其他菌株之EC₅₀介於444.062至大於1000 µg/mL；對三氟敏亦多呈強抗藥性，亦除RB225 (EC₅₀=27.409 µg/mL)，其他菌株之EC₅₀均大於1000 µg/mL。F129L突變株對百克敏及三氟敏均呈感藥性，其EC₅₀皆小於0.001 µg/mL；對亞托敏則呈低抗藥性，其EC₅₀介於3.372至1.104 µg/mL。野生型菌株對上述三種藥劑均為感藥性，對百克敏及三氟敏之EC₅₀皆小於0.001 µg/mL；對亞托敏之EC₅₀則介於0.026

表三、稻熱病菌細胞色素*b*基因型菌株在各地區族群之分布**TABLE 3.** Number of isolates of the *cyt b* genotypes in each population of the regions

Population ¹	No. of isolates ²		
	Wild-type	F129L mutant	G143A mutant
A	5	0	27
B	3	0	29
C	0	0	32
D	0	0	32
E	5	0	27
F	2	6	24
Total	15	6	171

¹ Geographical origin (City or County) of each population: A = Taipei, Taoyuan and Hsinchu; B = Miaoli, Taichung and Nantou; C = Changhua and Yunlin; D = Chiayi, Tainan, Kaohsiung and Pingtung; E = Yilan; F = Hualien and Taitung. Refer to Duan and Chen⁽¹¹⁾ for details.

² Amino acid of codon 129 and 143 of the *cyt b* gene, A: alanine, F: phenylalanine, G: glycine, L: leucine, wild-type: codon 129=F, codon 143=G.

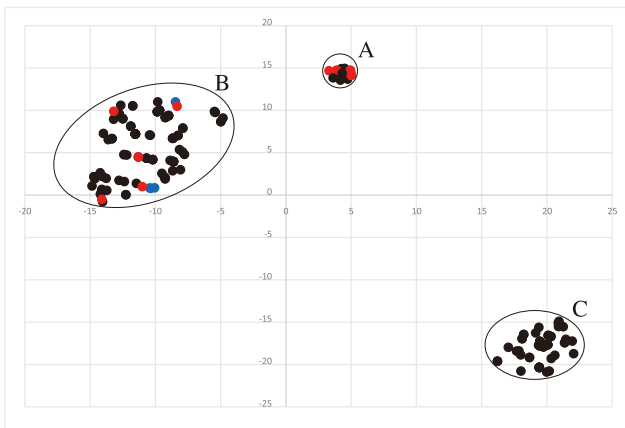
至小於0.001 µg/mL (表一)。

cyt b 基因型菌株集群分析

本項試驗經不同困惑度 (5~50) 演算結果，以困惑度30所獲分群效果最佳。供試菌株在圖中明確分為A、B及C等3個集群，A集群位於第一象限 (quadrant)，有25株，包含*cyt b*兩種基因型 (野生型、G143A)，B集群位於第二及第三象限，有111株包含*cyt b*三種基因型 (野生型、F129L、G143A)，C集群位於第四象限，有56株且僅有一種基因型 (G143A) (圖一)。就*cyt b*基因型之集群分布而言，G143A突變型數量最多有171株，遍布於A、B及C等三集群，次為野生型計15株，分布於A及B二集群，F129L突變型最少，僅有6株均源自花蓮及臺東兩縣且僅分布於B集群 (圖一、補充表一)。

討 論

本研究以採自全臺各縣市之192株稻熱病菌作其*cyt b*基因定序，並測定各*cyt b*基因型代表菌株對丙烯酸酯類殺菌劑的菌絲半抑制有效濃度 (EC₅₀)。結果顯示，佔比近九成的G143A突變是造成稻熱病菌抗此類藥劑的主因，F129L突變佔比少且抗藥程度輕微 (表一、三)，這個結果與相關報告大致相同^(5, 10, 20, 27, 35)。此項結果除為抗藥性屬遺傳現象提供具體證據，也證實應用分子技術檢測稻熱病菌抗丙烯酸酯類殺菌劑具可行性。但因稻熱病菌對不同丙烯酸酯類藥劑的抗性存有顯著差異，故仍需以實體菌株測其對個別藥劑的半抑制有效濃度 (EC₅₀) 方能



圖一、稻熱病菌細胞色素**b**基因型菌株的t-SNE集群分布圖。

Fig. 1. Cluster distribution of the *cyt b* genotypes of *Pyricularia oryzae* isolates using t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) algorithm (perplexity=30). Black dot: G143A mutant, red dot: wild-type, blue dot: F129L mutant. A=alanine, F=phenylalanine, G=glycine, L=leucine. Refer to Duan and Chen⁽¹¹⁾ for the dataset used in t-SNE algorithm.

確定。植物病原真菌抗藥性分子檢測在臺灣已有數篇報告^(6, 24, 26)，本篇將為此應用再添一例。在本次調查中，採自彰化縣迄屏東縣的稻熱病菌全是G143A突變株（補充表一），而這個區域又是臺灣水稻主要產區，抗藥族群的快速發展與驚人覆蓋率將成為此類藥劑防治的重大隱憂。近年在巴西北部的稻熱病菌被發現有90%菌株為G143A突變株，且主要表現在對亞托敏的抗藥性⁽¹⁰⁾；而小麥的類似病害wheat blast的病原菌 (*Magnaporthe oryzae*) 亦然，其G143A突變株在7年內由36%上升至90%⁽⁵⁾，這都表示抗藥突變株演化速度極快，可與本研究的調查結果相互參照。雖本研究之G143A突變株對亞托敏及三氟敏多呈強抗藥性，但菌株RB225的抗藥程度卻明顯偏低（表一）。經比對其*cyt b*基因，序列同於其他突變株（數據未揭露）。在真菌抗藥性機制中，除本研究所述標靶點機制，尚有非標靶點機制（non-target site mechanisms）⁽¹⁹⁾。非標靶點機制中，已知ABC轉運蛋白（ATP-binding cassette transporter）可將殺菌劑及抗生素自稻熱病菌細胞排出^(19, 23)；另有粒線體異質性（mitochondrial heteroplasmy）則為病原真菌單一細胞內並存*cyt b*基因的野生型G143（感藥）與突變型A143（抗藥）兩種等位基因（alleles），並因兩種等位基因的不同比例影響病原真菌對QoI類藥劑的抗藥性，但此種機制因不同菌種而有很大差異^(19, 34)，且其是否存於稻熱病菌尚無報告。然究係何種原因導致RB225抗藥性異於其他G143A突變株，有待深究。此外，本研究中與RB225基因型（A092）相同的菌株另有RB228、RB273及RB286等3株，且皆源自花東地區（補充表一），此3菌株是否對亞托敏及三氟敏亦具相同抗藥反應，也值得測試。

依據殺菌劑抗藥性行動委員會（FRAC）發布的訊息，植物

病原真菌對高風險抗藥性的丙烯酸酯類殺菌劑具交互抗藥性⁽¹⁵⁾。但本研究發現稻熱病菌G143A突變株對亞托敏及三氟敏雖同具抗藥性，但對百克敏卻不然；儘管部分G143A突變株對百克敏略顯抗性，但程度輕微（表一）。然部分突變株如RB152，其EC₅₀與野生型菌株相比仍有相當差異，而與該菌同屬A016多基因座基因型的RB301⁽¹¹⁾也有較高的EC₅₀（表一）。這除表示稻熱病菌抗百克敏族群的演化可能正在進行，也隱含多基因座基因型與抗藥程度的關聯性。另就本研究所用三種丙烯酸酯類殺菌劑的化學結構而言，三氟敏、亞托敏及百克敏所屬的化學群（chemical group）分別為oximino-acetates、methoxy-acrylates及methoxy-carbamates⁽¹⁵⁾，互異的化學結構與組成亦有可能影響其與病原真菌間的交互作用（interaction）。此外，也不能排除非標靶點機制參與其中，而各藥劑在田間的使用狀況都可能造成稻熱病菌突變株對不同丙烯酸酯類殺菌劑抗藥程度的差異。曾有報告稱，草莓炭疽病菌*cyt b*突變株及野生株對百克敏的EC₅₀與亞托敏相比，均明顯較低，似表示病原菌較不易對百克敏產生抗藥性⁽¹⁴⁾；惟國外確有稻熱病菌突變株（G143A/S）對百克敏及亞托敏同具抗藥性的報告⁽²⁹⁾。

儘管許多研究報告均指出，稻熱病菌的*cyt b*基因突變與抗丙烯酸酯類殺菌劑的關聯性^(5, 10, 20, 27, 35)，然謝氏等以10餘年前分離自臺灣中南部的稻熱病菌進行研究，雖發現多數菌株對克收欣及亞托敏均呈現明顯的低感受性（less sensitivity），但其*cyt b*基因的第129及143密碼子並無變異，該文推測可能是交替氧化酶（alternative oxidase, AOX）及ABC轉運蛋白所造成⁽¹⁸⁾。惟突變株的抗藥性應較穩定，如遭藥劑選汰壓力（selective pressure）較易發展成優勢族群，此由本研究之稻熱病菌G143A突變株對亞托敏的EC₅₀普遍高於謝文者可為佐證（表一）。又據農業部動植物防疫檢疫署農藥資訊服務網訊息，亞托敏、克收欣以及三氟敏均非稻熱病登記用藥，且除三氟敏用於稻種消毒以防治紋枯病，其他兩種藥劑甚且非水稻用藥⁽²⁾。謝文發表時，田間稻熱病菌應尚未接觸任何丙烯酸酯類藥劑，其半抑制有效濃度（EC₅₀）分布圖就是病原菌對此類藥劑的感受性基準線（baseline sensitivity）⁽²²⁾。時至今日，稻熱病菌對部分丙烯酸酯類殺菌劑的抗藥突變株已堂堂出現，且抗藥程度非常顯著，此亦證明感受性基準線的重要性，因其預告稻熱病菌與丙烯酸酯類藥劑是易生抗藥性的組合。由於國內農藥登記審查並未要求提供新藥劑的感受性基準線資料，本文與謝文之內容可作為農藥主管機關思考將此項資料納為備審文件的依據，以建構農藥抗藥性預警機制。而田間稻熱病菌在10餘年前就對尚未登記使用的亞托敏及克收欣呈低感受性⁽¹⁸⁾，雖此現象並非特例⁽⁸⁾，其肇因仍值得探討。

百克敏作為臺灣唯一登記用於防治稻熱病的丙烯酸酯類殺菌劑，應是驅使稻熱病菌演化為抗藥族群的重要動力。然其在本研究的三種殺菌劑中間市最晚⁽⁴⁾，臺灣至2020年始登記為稻熱病用藥⁽²⁾。對比本研究自2019年9月迄2023年5月的稻熱病菌

採樣時間及已然遍布全臺佔比近九成的G143A突變株(表三),實難僅歸因於百克敏的影響,況供試稻熱病菌突變株對百克敏未具顯著抗藥性(表一)。隨著時間推移,日後稻熱病菌是否會對百克敏產生顯著抗藥性,有待時間驗證。是故,稻熱病菌對百克敏的抗藥性發展應持續監控,這是必須進行的工作。三氟敏係2011年核准用於稻種消毒以防治紋枯病⁽²⁾,較有可能於水稻秧苗期接觸稻熱病菌,而對該菌在抗藥性族群發展上產生作用,由於G143A突變株對三氟敏的抗藥程度普遍高於應未曾使用過的亞托敏,或係導因於此(表一)。

至於抗藥族群的可能來源,主因還是由感藥的野生型菌株「突變」而來,此因t-SNE分析之集群A與B均有感藥及抗藥菌株。由於集群內菌株的遺傳背景相近,顯示彼此具同源關係,最具體的證據是A039基因型兼有野生型菌株RB400與G143A突變株RB380(圖一、補充表一)。但同一分析之集群C全為G143A突變株(圖一、補充表一),此集群的突變株又可能是「既存」於原有的族群。由於本研究之突變菌株遠多於野生型菌株,且高抗藥性的G143A突變株也大幅多於低抗藥性的F129L突變株(表三),可證藥劑應發揮很強的選汰作用。抗藥菌株會隨稻種或秧苗散布,並因相關藥劑施用而發展為優勢族群,此有日本稻熱病菌抗加普胺(carpropamid)族群的發展為證⁽³¹⁾。

本研究應用t-隨機鄰近嵌入(t-SNE)演算法分析全臺各縣市192株稻熱病菌,並明確將其區分成A、B及C三個集群(圖一)。G143A突變型在3個集群皆存在,顯示此抗藥族群遺傳背景(genetic background)廣泛,而F129L突變株僅見於B集群,地理分布更囿於花蓮及臺東兩縣,數量也僅6株,但與這6株菌擁有相同多基因座基因型的其他菌株卻遍及臺北、臺中、彰化及臺東等縣市且均為G143A突變株(補充表一)。我們推斷西部平原與花東地區的稻熱病菌族群應有基因流動(gene flow),只是在花東地區的部分菌株演化成F129L突變株,也可能因該突變株的抗藥程度遠遜於G143A突變株,致難以形成優勢族群,致數量較少而不易被偵獲。

由於稻熱病菌G143A突變株大量出現且對數種丙烯酸酯類殺菌劑表現普遍且嚴重的抗藥性,田間抗藥菌株的監測工作勢須持續進行,以掌握抗藥性的發展動態。面對危害嚴重且傳播快速的稻熱病菌及其既存或潛存的抗藥性風險,輪用不同作用機制藥劑、使用混合藥劑、微生物藥劑或多點作用機制藥劑及限制單一藥劑使用次數,特別是已產生抗藥性的高風險藥劑等均為延緩稻熱病菌抗藥性族群發展的必要作為。

謝 辭

本研究承農業部112年及113年農科-5.3.1-藥-P2計畫經費補助,謹此致謝。

引用文獻

1. Anonymous, 2024. Agricultural Statistics Yearbook. Department of Statistics, Ministry of Agriculture, Taipei, 372 pp. (in Chinese)
2. Anonymous, 2024. Pesticide information service. Retrieved from <https://pesticide.aphia.gov.tw/> (Oct. 20, 2024) (in Chinese)
3. Anonymous, 2024. Plant Protection Information System. Retrieved from <https://otserv2.acri.gov.tw/> (Oct. 20, 2024) (in Chinese)
4. Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58:649-662.
5. Castroagudín, V. L., Ceresini, P. C., de Oliveira, S. C., Reges, J. T. A., Maciel, J. L. N., Bonato, A. L. V., Dorigan, A. F., and McDonald, B. A. 2015. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* 105:284-294.
6. Chen, G.-Y., and Duan, C.-H. 2023. Molecular detection of insensitivities to the fungicides pyraclostrobin, carbendazim, boscalid and myclobutanil in *Botrytis cinerea* in Taiwan. *J. Plant Med.* 65(4):139-148. (in Chinese)
7. Chen, L. C., Chen, Y. S., and Cheng, Y. H. 2004. Test of rice varieties and strains resistant to rice blast in blast nurseries during 1990-2002. *J. Agric. Res. China* 53:269-283. (in Chinese)
8. Chen, Y., Yang, X., Yuan, S.-K., Li, Y.-F., Zhang, A.-F., Yao, J., and Gao, T.-C. 2015. Effect of azoxystrobin and kresoxim-methyl on rice blast and rice grain yield in China. *Ann. Appl. Biol.* 166:434-443.
9. Chien, C.-C. 1991. Review and future prospects of research on rice diseases. Pages 1-14 in: Symposium on Rice Diseases. C.-C. Tu, C.-W. Tsai, C.-C. Chien, W.-H. Tsai, and Y.-C. Chang eds. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, 152 pp. (in Chinese)
10. D'Ávila, L. S., Corsi De Filippi, M. C., and Café-Filho, A. C. 2021. Sensitivity of *Pyricularia oryzae* populations to fungicides over a 26-year time frame in Brazil. *Plant Dis.* 105:1771-1780.
11. Duan, C.-H., and Chen, G.-Y. 2024. Population structure of *Pyricularia oryzae* from rice in Taiwan. *J. Plant Med.* 66(1/2):15-30. (in Chinese)
12. Duan, C.-H., and Chen, G.-Y. 2023. Molecular identification, mating type, and fungicide sensitivity of *Pyricularia oryzae* isolates from Taiwan. *J. Plant Med.* 65(1):33-42. (in Chinese)
13. Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., Vicente, A., and Pérez-García, A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int. Microbiol.* 11:1-9.

14. Forcelini, B. B., Seijo, T. E., Amiri, A., and Peres, N. A. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. *Plant Dis.* 100:2050-2056.
15. Fungicide Resistance Action Committee. 2024. FRAC Code List ©*2024: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC groups on product labels). Retrieved from <http://www.frac.info>. (Sep. 20, 2024)
16. Fungicide Resistance Action Committee. 2006. Mutations associated with QoI resistance. Retrieved from <http://www.frac.info>. (Sep. 20, 2024)
17. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
18. Hsieh, C.-H., Chung, W.-C., Chen, Y.-N., and Chung, W.-H. 2013. Phylogenetic diversity and sensitivity to MBI and QoI fungicides of *Magnaporthe oryzae* in Taiwan. *J. Pestic. Sci.* 38(4):194-199.
19. Hu, M., and Chen, S. 2021. Non-target site mechanisms of fungicide resistance in crop pathogens: A review. *Microorganisms.* 9(3):502.
20. Kim, Y. S., Dixon, E. W., Vincelli, P., and Farman, M. L. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93:891-900.
21. Krijthe, J. H. 2015. Rtsne: T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding using Barnes-Hut Implementation. R package version 0.17. Retrieved from <https://github.com/jkrijthe/Rtsne> (Oct. 20, 2024).
22. Kunova, A., Pizzatti, C., Bonaldi, M., and Cortesi, P. 2014. Sensitivity of nonexposed and exposed populations of *Magnaporthe oryzae* from rice to tricyclazole and azoxystrobin. *Plant Dis.* 98:512-518.
23. Lee, Y.-J., Yamamoto, K., Hamamoto, H., Nakaune, R., and Hibi, T. 2005. A novel ABC transporter gene *ABC2* involved in multidrug susceptibility but not pathogenicity in rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 81:13 – 23.
24. Lin, S.-R., Chang, Y.-C., Lin, Y.-H., Chung, C.-L., and Hung, T.-H. 2022. Analysis of the sensitivity to benomyl and thiophanate-methyl for *Colletotrichum* spp. associated with brown blight of tea in Taiwan. *J. Plant Med.* 64:139-148. (in Chinese)
25. Liu, H., Yang, J., Ye, M., James, S. C., Tang, Z., Dong, J., and Xing, T. 2021. Using t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) for cluster analysis and spatial zone delineation of groundwater geochemistry data. *J. Hydrol.* 597:126-146.
26. Lou, P. S., Huang, Y. J., Chung, W. C., Cheng, A. S., and Chung, W. H. 2010. Application of PCR-RFLP in detecting benzimidazoles-resistant isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from mango in Tainan area. *Plant Patholo. Bull.* 19:255-260. (in Chinese)
27. Ma, B., and Uddin, W. 2009. Fitness and competitive ability of an azoxystrobin-resistant G143A mutant of *Magnaporthe oryzae* from perennial ryegrass. *Plant Dis.* 93:1044-1049.
28. Olaya, G., and Köller, W. 1999. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pestic. Sci.* 55:1083-1088.
29. Ruan, H., Tian, P., Shi, N., Du, Y., Chen, F., and Chen, F. 2022. Characterization of pyraclostrobin-resistant *Magnaporthe oryzae*. *J. Phytopathol.* 170:233 – 241.
30. Sierotzki, H., Frey, R., Wullschleger, J., Palermo, S., Karlin, S., Godwin, J., and Gisi, U. 2007. *Cytochrome b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest. Manag. Sci.* 63:225-233.
31. Suzuki, F., Arai, M., and Yamaguchi, J. 2007. Genetic analysis of *Pyricularia grisea* population by rep-PCR during development of resistance to scytalone dehydratase inhibitors of melanin biosynthesis. *Plant Dis.* 91:176-184.
32. van der Maaten, L. J. P. 2014. Accelerating t-SNE using tree-based algorithms. *J. Mach. Learn. Res.* 15:3221-3245.
33. van der Maaten, L. J. P., and Hinton, G. E. 2008. Visualizing high-dimensional data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* 9:2579-2605.
34. Villani, S. M., and Cox, K. D. 2014. Heteroplasmy of the *cytochrome b* gene in *Venturia inaequalis* and its involvement in quantitative and practical resistance to trifloxystrobin. *Phytopathology* 104:945-953.
35. Wei, C.-Z., Katoh, H., Nishimura, K., and Ishii, H. 2009. Site-directed mutagenesis of the cytochrome *b* gene and development of diagnostic methods for identifying QoI resistance of rice blast fungus. *Pest Manag. Sci.* 65:1344 – 1351.
36. Yin, Y., Miao, J., Shao, W., Liu, X., Zhao, Y., and Ma, Z. 2023. Fungicide resistance: Progress in understanding mechanism, monitoring, and management. *Phytopathology* 113:707-718.

ABSTRACT

Duan, C.-h.^{1*}, Chen, G.-y.¹, and Chang, A.². 2024. Molecular detection and cluster analysis of *Pyricularia oryzae* isolates resistant to strobilurin fungicides. J. Plant Med. 66(3_4): 50-59.

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

Rice blast, caused by *Pyricularia oryzae*, is an important rice disease in Taiwan. Control has relied mainly on fungicides, including the strobilurins (quinone-outside inhibitors [QoIs]). In this study, we investigated the QoIs resistance in 192 *P. oryzae* single-spore isolates sampled from different paddy fields islandwide. Sequence analysis of the cytochrome *b* gene (*cyt b*) revealed that the frequency of the G143A mutation (glycine→alanine) in *P. oryzae* isolates was 89.06%, and the F129L mutation (phenylalanine→leucine) was 3.13%. However, the G137R (glycine→arginine) mutation was not found. Mycelial EC₅₀ (effect concentration for 50% inhibition) of representative isolates of the mutants indicated that the *cyt b* gene carrying the G143A mutation was associated with high resistance to azoxystrobin and trifloxystrobin but not to pyraclostrobin. The F129L mutation was associated with low resistance to azoxystrobin but not to pyraclostrobin and trifloxystrobin. The wild-type isolates exhibited no fungicide resistance. Cluster analysis with t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) algorithm demonstrated that the G143A mutation appeared in all three genetic backgrounds (clusters), suggesting that field resistance to the strobilurin fungicides in *P. oryzae* is widespread in Taiwan, while the F129L mutation was restricted to Hualien and Taitung Counties and appeared in one cluster only.

Keywords: cytochrome *b*, fungicide resistance, *Pyricularia oryzae*, strobilurins, t-SNE

補充表一、供試稻熱病菌之多基因座基因型與細胞色素b基因型及t-SNE集群

TABLE S1. Genotypes and t-SNE cluster of *Pyricularia oryzae* isolates in this study

Isolate	Geographical origin ¹	Multilocus genotype ²	<i>cyt b</i> genotype ³	t-SNE cluster ⁴
RB105	A-Xinwu	A001	Wild-type	A
RB107	A-Xinwu	A002	Wild-type	B
RB109	A-Hukou	A003	G143A	C
RB111	A-Xinpu	A004	G143A	C
RB113	A-Xinpu	A005	G143A	B
RB114	A-Xinfeng	A006	G143A	C
RB116	A-Xinfeng	A007	G143A	B
RB124	A-Beitou	A008	G143A	B
RB160	A-Emei	A001	Wild-type	A
RB161	A-Xinpu	A007	G143A	B
RB162	A-Daxi	A009	G143A	B
RB164	A-Daxi	A010	G143A	B
RB165	A-Qionglin	A003	G143A	C
RB280	A-Beitou	A004	G143A	C
RB325	A-Zhongli	A007	G143A	B
RB327	A-Zhongli	A007	G143A	B
RB332	A-Yangmei	A003	G143A	C
RB336	A-Yangmei	A005	G143A	B
RB338	A-Guanyin	A003	G143A	C
RB341	A-Guanyin	A011	G143A	B
RB342	A-Xinwu	A012	G143A	B
RB344	A-Xinwu	A007	G143A	B
RB346	A-Zhubei,	A007	G143A	B
RB348	A-Zhubei,	A003	G143A	C
RB350	A-Guanxi	A001	Wild-type	A
RB352	A-Hengshan	A007	G143A	B
RB354	A-Daxi	A013	G143A	B
RB356	A-Qionglin	A014	G143A	B
RB357	A-Qionglin	A015	G143A	B
RB361	A-Zhongli	A016	G143A	A
RB362	A-Bade	A017	Wild-type	B
RB363	A-Hengshan	A005	G143A	B
RB1	B-Xitun	A018	G143A	C
RB4	B-Xitun	A019	G143A	B
RB6	B-Wufeng	A020	G143A	C
RB9	B-Zhushan	A003	G143A	C
RB24	B-Qingshui	A021	G143A	C
RB26	B-Qingshui	A022	G143A	B
RB29	B-Qingshui	A003	G143A	C
RB39	B-Wuqi	A023	G143A	C
RB48	B-Mingjian	A024	G143A	C
RB51	B-Zhushan	A025	G143A	C

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Geographical origin ¹	Multilocus genotype ²	<i>cyt b</i> genotype ³	t-SNE cluster ⁴
RB57	B-Dadu	A004	G143A	C
RB58	B-Dadu	A003	G143A	C
RB60	B-Houli	A026	G143A	C
RB67	B-Waipu	A027	G143A	C
RB69	B-Waipu	A028	G143A	B
RB72	B-Dajia	A029	G143A	B
RB74	B-Dajia	A030	G143A	B
RB117	B-Caotun	A031	G143A	B
RB128	B-Yuanli	A032	G143A	C
RB129	B-Zaoqiao	A031	G143A	B
RB130	B-Tongxiao	A033	G143A	B
RB166	B-Toufen	A034	G143A	C
RB316	B-Nantou	A035	Wild-type	B
RB318	B-Nantou	A036	G143A	C
RB320	B-Caotun	A037	G143A	B
RB322	B-Zhushan	A037	G143A	B
RB398	B-Miaoli	A038	G143A	B
RB400	B-Sanyi	A039	Wild-type	B
RB401	B-Touwu	A040	G143A	B
RB402	B-Tongluo	A037	G143A	B
RB406	B-Tongluo	A041	Wild-type	B
RB408	B-Houlong	A042	G143A	B
RB10	C-Beigang	A043	G143A	B
RB13	C-Sihu	A044	G143A	C
RB15	C-Lugang	A045	G143A	B
RB17	C-Yuanzhang	A046	G143A	B
RB20	C-Erlun	A047	G143A	B
RB22	C-Baozhong	A048	G143A	C
RB28	C-Lunbei	A049	G143A	B
RB31	C-Zhutang	A048	G143A	C
RB32	C-Zhutang	A025	G143A	C
RB35	C-Pitou	A050	G143A	B
RB38	C-Erlin	A030	G143A	B
RB41	C-Erlin	A051	G143A	C
RB44	C-Xihu	A048	G143A	C
RB49	C-Xizhou	A030	G143A	B
RB52	C-Hemei	A049	G143A	B
RB54	C-Dacun	A003	G143A	C
RB62	C-Shetou	A048	G143A	C
RB75	C-Xianxi	A052	G143A	B
RB77	C-Dounan	A053	G143A	B
RB79	C-Xiluo	A048	G143A	C
RB81	C-Huwei	A045	G143A	B
RB83	C-Citong	A048	G143A	C
RB84	C-Puyan	A054	G143A	B

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Geographical origin ¹	Multilocus genotype ²	<i>cyt b</i> genotype ³	t-SNE cluster ⁴
RB85	C-Beidou	A055	G143A	C
RB88	C-Fuxing	A003	G143A	C
RB90	C-Tianzhong	A028	G143A	B
RB93	C-Tuku	A056	G143A	C
RB94	C-Ershui	A045	G143A	B
RB96	C-Fenyuan	A057	G143A	C
RB99	C-Xiushui	A047	G143A	B
RB102	C-Zhutang	A031	G143A	B
RB103	C-Erlun	A058	G143A	B
RB139	D-Liuying	A003	G143A	C
RB140	D-Guantian	A059	G143A	B
RB142	D-Houbi	A004	G143A	C
RB146	D-Changzhi	A031	G143A	B
RB158	D-Chaozhou	A003	G143A	C
RB170	D-Meinong	A004	G143A	C
RB172	D-Meinong	A057	G143A	C
RB173	D-Shanlin,	A031	G143A	B
RB175	D-Shinyuan	A031	G143A	B
RB177	D-Wandan,	A060	G143A	B
RB180	D-Kanding	A061	G143A	B
RB182	D-Pingtung	A062	G143A	B
RB184	D-Donggang	A003	G143A	C
RB186	D-Daliao	A004	G143A	C
RB187	D-Lioujia	A063	G143A	B
RB188	D-Baihe	A064	G143A	C
RB189	D-Baihe	A065	G143A	B
RB191	D-Liuying	A007	G143A	B
RB194	D-Liuying	A066	G143A	B
RB195	D-Guantian	A067	G143A	B
RB198	D-Lucao	A003	G143A	C
RB201	D-Lucao	A059	G143A	B
RB202	D-Lioujiao	A005	G143A	B
RB205	D-Puzi	A068	G143A	B
RB208	D-Singgang	A069	G143A	B
RB211	D-Singgang	A024	G143A	C
RB213	D-Xiaying	A003	G143A	C
RB214	D-Yijhu	A031	G143A	B
RB215	D-Sikou	A031	G143A	B
RB218	D-Xingying	A070	G143A	C
RB219	D-Dalin	A059	G143A	B
RB223	D-Minsyong	A033	G143A	B
RB328	E-Toucheng	A071	G143A	A
RB330	E-Toucheng	A072	G143A	B
RB359	E-Suao	A033	G143A	B
RB364	E-Suao	A016	G143A	A

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Geographical origin ¹	Multilocus genotype ²	<i>cyt b</i> genotype ³	t-SNE cluster ⁴
RB366	E-Dongshan	A068	G143A	B
RB368	E-Dongshan	A073	G143A	B
RB369	E-Dongshan	A031	G143A	B
RB371	E-Wujie	A049	G143A	B
RB373	E-Wujie	A074	G143A	B
RB375	E-Wujie	A028	G143A	B
RB376	E-Yilan	A075	Wild-type	A
RB377	E-Yilan	A076	G143A	B
RB380	E-Yilan	A039	G143A	B
RB381	E-Yilan	A001	Wild-type	A
RB383	E-Luodong	A077	G143A	B
RB385	E-Luodong	A078	G143A	B
RB386	E-Luodong	A079	Wild-type	A
RB387	E-Jiaoxi	A073	G143A	B
RB388	E-Jiaoxi	A001	Wild-type	A
RB390	E-Sanshing	A080	G143A	B
RB392	E-Sanshing	A081	G143A	B
RB393	E-Sanshing	A082	G143A	C
RB395	E-Sanshing	A083	G143A	C
RB397	E-Sanshing	A084	G143A	C
RB421	E-Toucheng	A001	Wild-type	A
RB423	E-Toucheng	A085	G143A	B
RB424	E-Toucheng	A086	G143A	C
RB426	E-Toucheng	A087	G143A	A
RB428	E-Jhuangwei	A088	G143A	B
RB429	E-Jhuangwei	A083	G143A	C
RB433	E-Jhuangwei	A088	G143A	B
RB435	E-Jhuangwei	A089	G143A	B
RB148	F-Chihshang	A090	F129L	B
RB150	F-Luye	A016	G143A	A
RB152	F-Jian	A016	G143A	A
RB154	F-Fenglin	A091	G143A	A
RB156	F-Yuli	A075	Wild-type	A
RB225	F-Luye	A092	G143A	B
RB228	F-Guanshan	A092	G143A	B
RB233	F-Chihshang	A093	G143A	B
RB236	F-Chihshang	A016	G143A	A
RB237	F-Beinan	A030	G143A	B
RB238	F-Chenggong	A016	G143A	A
RB239	F-Taitung	A094	G143A	B
RB242	F-Fuli	A005	G143A	A
RB245	F-Fuli	A095	G143A	B
RB248	F-Yuli	A008	F129L	B
RB252	F-Yuli	A096	G143A	A
RB253	F-Guangfu	A097	F129L	B

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Geographical origin ¹	Multilocus genotype ²	<i>cyt b</i> genotype ³	t-SNE cluster ⁴
RB257	F-Ruisui	A075	Wild-type	A
RB261	F-Fonglin	A016	G143A	A
RB269	F-Fengbin	A098	G143A	B
RB271	F-Jian	A099	G143A	A
RB273	F-Shoufeng	A092	G143A	B
RB277	F-Shoufeng	A016	G143A	A
RB283	F-Guanshan	A073	G143A	B
RB286	F-Guanshan	A092	G143A	B
RB290	F-Guanshan	A100	F129L	B
RB293	F-Chihshang	A004	G143A	C
RB296	F-Chihshang	A101	F129L	B
RB301	F-Haiduan	A016	G143A	A
RB306	F-Taitung	A030	G143A	B
RB312	F-Luye	A102	G143A	C
RB419	F-Guanshan	A030	F129L	B

¹ Geographical origin (City or County) of each population: A = Taipei, Taoyuan and Hsinchu; B = Miaoli, Taichung and Nantou; C = Changhua and Yunlin; D = Chiayi, Tainan, Kaohsiung and Pingtung; E = Yilan; F = Hualien and Taitung.

² Refer to Duan and Chen ⁽¹¹⁾ for multilocus genotype information.

³ Amino acid of codon 129 and 143 of the *cyt b* gene: A= alanine, F= phenylalanine, G= glycine, L= leucine.

⁴ t-SNE= t-distributed stochastic neighbor embedding. Refer to Fig. 1 for cluster information.