

草莓灰黴病菌族群之分子特性

段中漢^{1*}、陳冠穎¹

¹ 農業藥物毒物試驗所農藥應用組，臺灣 臺中市。

* 聯絡作者，E-mail: chduan@tactri.gov.tw

摘要

段中漢、陳冠穎。2022。草莓灰黴病菌族群之分子特性。植物醫學64(2): 53-62。

灰黴病是臺灣地區草莓栽培最常見的病害之一，其病原菌*Botrytis cinerea*寄主範圍廣且遺傳變異大，對作物極具危害性。本研究自臺灣各草莓產區採取罹病果實以單孢分離法獲得菌株，選取其中36株供分子生物學及族群遺傳學分析之用。供試菌株以*B. cinerea*專一性引子對C729+/-進行聚合酶連鎖反應(PCR)，皆可產生700 bp擴增子；而以*Bc-hch*基因座擴增子輔以HhaI限制酶截切，亦均於膠片產生屬第二群之517 bp條帶，確證供試菌株全為*B. cinerea*。運用聚合酶連鎖反應分析供試菌株之配對型及轉位子基因型獲知，供試菌株均屬異絲型，其中MAT1-1型有23株，MAT1-2型有13株；轉位子基因型則分別有*transposa*型20株、*Boty*型14株、*Flipper*型0株及*vacuma*型2株。整合菌株配對型、轉位子基因型及三種菌種鑑定用基因(*RPB2*, *HSP60*及*G3PDH*)突變點構成之單核苷酸多態性(SNPs)進行灰黴病菌族群遺傳分析，結果顯示，苗栗縣大湖及獅潭鄉作為草莓主要產區，其灰黴病菌族群的遺傳多樣性指數均顯著高於其他地區者。族群基因流動與遺傳距離成對評估表並揭示，苗栗縣與其他縣市族群間的遺傳分化程度不高，而表示基因流動的數值，則指族群間有很強的基因交流。上述兩地區灰黴病菌族群分子變異階層式分析(AMOVA)亦表明，有90.11%的變異源自族群內部，族群間僅佔9.89%。

關鍵詞：草莓、灰黴病菌、族群遺傳學

前言

由*Botrytis cinerea* Persoon所引起的草莓及其他蔬果花卉灰黴病是臺灣地區常見的作物病害，本菌寄主範圍廣達200種以上作物，遍布全球溫帶及亞熱帶地區，在感染部位造成壞疽，是典型的壞死性真菌(necrotrophic fungus)，每年造成的經濟損

失難以估計^(5, 51)。*Botrytis* spp.約有30餘種(species)，傳統鑑定方法是以菌核(sclerotium)、菌絲、分生孢子(conidium)及分生孢子梗(conidiophore)形態及培養特性等為依據，但對部分菌種仍不易區別⁽⁵⁰⁾。草莓灰黴病菌已知有*B. cinerea*、*B. mali*、*B. fragariae*、*B. caroliniana*及*B. ricini*等多個菌種，惟以*B. cinerea*為優勢菌種^(1, 9, 27, 45)。為鑑定草莓灰黴病菌，有學者依據隨機擴增(amplification)多態性去氧核糖核酸(random amplified polymorphic DNA, RAPD)開發一組針對*B. cinerea*具專一性的引子對C729+/-，這有助於灰黴病菌快速且準確的鑑定⁽⁴¹⁾。

*B. cinerea*細胞具多核(multinucleate)、異核(heterokaryotic)，及多倍體(polyploidy)等特性⁽⁴⁸⁾，使本菌擁有多樣而複雜的遺傳變異，亦使其成為族群遺傳學研究的模式生物。用於族群變異(population-level variation)的多種分子遺傳技術亦常被用於*B. cinerea*的族群多樣性(population diversity)與遺傳結構(genetic structure)分析，例如，限制性斷片長度多形性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^(18, 35)、隨機擴增多態性去氧核糖核酸(RAPD)^(10, 34, 47)、擴增片段長度多型性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)⁽³³⁾、微衛星(microsatellite)等^(14, 22)。這些技術除用於族群變異分析外，亦可用於菌種鑑定。*B. cinerea*常與另一菌種*B. pseudocinerea*共生在相同寄主植物及地理區，屬同域物種(sympatry)，二物種在形態上又不易區別⁽⁴⁹⁾，為鑑別此二菌種，有學者自該類菌株選殖營養菌絲不親和性基因座(vegetative incompatibility locus, *Bc-hch*，約長1171 bp)，再以限制酶HhaI截切，可獲得長度分別為601-bp及517-bp的基因片段，並據以將菌株分別歸類為Group I及II⁽⁴⁶⁾。Group I並被命名為*B. pseudocinerea*，Group II則稱*B. cinerea sensu stricto*⁽⁴⁹⁾。Group I及II族群現已被描述為演化種(phylogenetic species)或稱隱蔽種(cryptic species)，二者在物候學(phenology)、寄主範圍、分生孢子型態及營養菌絲親和性等均有差異⁽¹⁵⁾。

已知*B. cinerea*的有性生殖具有兩種配對型(mating type) MAT1-1及MAT1-2，是由具二種等位基因的單一交配型基因

(single mating type gene with two alleles) 所控制⁽¹³⁾。 *B. cinerea* 兩種配對型的等位基因可藉聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 分別產生長度為1050 bp (*MAT1-1*) 及1100 bp (*MAT1-2*) 的擴增子⁽²¹⁾。本菌雖存有少量同絲型 (homothallic) 菌株，然多數菌株屬異絲型 (heterothallic)⁽¹³⁾。配對型基因座用於控制不同配對型菌株間的交配 (crossing)⁽¹³⁾，在自然界，兩種配對型菌株經由交配而發生有性重組 (sexual recombination) 將產生更大的遺傳變異，這有利於灰黴病菌的存活與致病性 (pathogenicity)。

*B. cinerea*已知有二種轉位子 (transposon)，分別為*Flipper* 及*Boty*^(7, 26)，依據此二種轉位子之有無可將*B. cinerea*族群分為4種分子基因型 (molecular genotype)，分別為*transposa* (containing both *Boty* and *Flipper*)、*Boty (Boty-only)*、*Flipper (Flipper-only)* 及 *vacuma* (lacking transposon)⁽¹⁸⁾。各種基因型的頻率在不同*B. cinerea*族群有別，且在其生理特性、寄主範圍及病原性方面也可能存有差異⁽⁴⁴⁾。轉位子可以作為*B. cinerea*族群遺傳分析 (population genetic analysis) 的標記 (marker)，藉以顯現族群的遺傳多樣性與遺傳結構特異性⁽⁵³⁾。

在臺灣，草莓及許多作物的灰黴病均屬常見且危害性強的植物病害，但關於其病原菌的族群遺傳結構與變異分析卻付之闕如。本研究擬就臺灣地區常見的草莓灰黴病菌以分子生物學技術進行其族群鑑定與遺傳變異分析，目的在探討其族群結構與變異，以為日後擬定病害防治策略之參考。受分析的目標族群是以台灣草莓栽種面積最大的苗栗縣大湖鄉及其鄰接之獅潭鄉分離所獲之灰黴病菌作為主要族群，而以全臺其他草莓栽培地區分離之灰黴病菌作為對照族群。本文將應用分子標記及其相關技術，對個別族群內部與二族群間的變異進行比較分析。分析項目包括*B. cinerea*菌種分子鑑定，*Bc-hch*基因群鑑別，菌株配對型及轉位子基因型判定等。由於菌株配對型及轉位子基因型在本研究中顯現多型性 (polymorphism)，因而將其作為接續進行之族群遺傳分析標記。另為擴增族群遺傳分析標記，爰以作者前已發表於期刊論文中，與本研究相同菌株之增幅熱休克蛋白 (heat shock protein, *HSP60*)、核醣核酸聚合酶II (RNA polymerase II-binding, *RPB2*) 及甘油3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *G3PDH*) 等3種基因序列中具單核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 的6個突變點併同納入分析⁽⁸⁾。吾等希望此研究結果能為臺灣草莓灰黴病菌族群的遺傳變異與結構提供一些訊息，期能有助於日後對灰黴病之防治。

材料與方法

菌株來源與核酸萃取

為探討臺灣草莓灰黴病菌之各種分子生物學特性，於2018

年3月及2019年3月分別前往各草莓產地採集罹病果實上的灰黴病菌，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⁽⁸⁾。自採得的菌株中逢機選取代表各產區的菌株計36株，供後續各項試驗研究之用 (表一)。為獲得試驗所需之基因組去氧核醣核酸 (genomic deoxyribonucleic acid, 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℃黑暗定溫箱培養5日。先刮取菌絲，再以核醣核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit，百歐生技公司，臺灣) 抽取基因組去氧核醣核酸。

菌種分子鑑定

為以分子鑑定法鑑定表一所列36支菌株是否為*B. cinerea*，乃以本菌種專一性引子對 (*B. cinerea*-specific primer pair)：C729+ (AGCTCGAGAGAGATCTCTGA) 及C729-(CTGCAATGTTCTGCGTGGAA)⁽⁴¹⁾，就各菌株萃取之基因組核酸進行聚合酶連鎖反應 (PCR)，視其能否增幅長約700-bp 片段作為此菌種的判定依據^(41, 53)。另以購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心之*B. elliptica*標準菌株 (代號：BCRC33111, 原始代號：ATCC11787) 作為負對照 (negative control)。聚合酶連鎖反應物總體積為25 μL，內含主混和液 (master mix) 為12.5 μL PowerAmp 2X PCRmix-Green (慧眾生物科技公司，臺灣)，前後向引子各1 μL (10 μM)、基因組去氧核醣核酸1.0 μL (10 ng) 及水9.5 μL。本試驗使用聚合酶連鎖反應器(Biometra TAdvanced thermal cycler, Analytik Jena, Germany) 進行相關試驗，聚合酶連鎖反應增幅條件起始溫度為95℃，10 min，接著進入35次增幅循環 (95℃, 30 sec; 48.5℃, 30 sec; 72℃, 1 min)，最後以72℃作用7 min作結⁽⁵³⁾。聚合酶連鎖反應產物先以瓊脂糖凝膠 (1.2% agarose gel in 0.5X TBE buffer) 進行電泳分離，再以溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色，續以紫外光觀察及照相記錄。

***Bc-hch*基因群分析**

*B. cinerea*菌株基因群 (genetic group) 可依據增幅部分 *Bc-hch* 基因座所獲長約1171 bp擴增子 (amplicon)，以限制酶 (restriction enzyme) 截切，處理後之基因片段以凝膠分離。如凝膠出現601個鹼基對片段則屬基因群I (Group I)，出現517個鹼基對片段則屬基因群II (Group II)⁽¹⁶⁾。增幅*Bc-hch*基因座的引子對為262 (AAGCCCTTCGATGTCTTGGA) 及520L (ACGGATTCCGAACTAAGTAA)⁽¹⁶⁾。聚合酶連鎖反應的主混和液同上。增幅過程為先以94℃, 作用1 min，接著進入35次增幅循環 (94℃, 30 sec, 55℃, 1 min 30 sec, 72℃, 1 min)，最後以72℃, 10 min作結⁽⁵³⁾。增幅 *Bc-hch* 基因座所獲約1171 bp擴增子，再以限制酶Hha I (R0139S, New England BioLabs, Inc., USA) 於37℃處理30 min，相關處理條件悉參照該產品指南 (protocol)，而後以1.2%瓊脂糖凝膠進行電泳分離，以溴化乙錠染色，並用紫外

表一、草莓灰黴病菌菌株之配對型、轉位子基因型及單核苷酸多態性

 TABLE 1. Mating types, transposon genotypes and SNPs of *Botrytis cinerea* strawberry isolates

| Isolate | Origin | Genetic pattern ¹ | Mating type ² | Transposon genotype ³ | SNPs ⁴ |
|---------|------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------|
| D1 | Dahu, Miaoli | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| D3 | Dahu, Miaoli | B | MAT1-2 | <i>Boty</i> | TG, T, CCG |
| D5 | Dahu, Miaoli | C | MAT1-2 | <i>Boty</i> | CT, T, CCG |
| D7 | Dahu, Miaoli | D | MAT1-2 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| D9 | Dahu, Miaoli | C | MAT1-2 | <i>Boty</i> | CT, T, CCG |
| D10 | Dahu, Miaoli | E | MAT1-1 | <i>Boty</i> | CT, T, CCG |
| D11 | Dahu, Miaoli | E | MAT1-1 | <i>Boty</i> | CT, T, CCG |
| D13 | Dahu, Miaoli | F | MAT1-1 | <i>Boty</i> | TG, C, CTG |
| D15 | Dahu, Miaoli | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| D17 | Dahu, Miaoli | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| D19 | Dahu, Miaoli | G | MAT1-2 | <i>transposa</i> | TG, C, CCG |
| D20 | Dahu, Miaoli | H | MAT1-1 | <i>vacuma</i> | CG, T, CCA |
| D21 | Dahu, Miaoli | I | MAT1-1 | <i>Boty</i> | CG, T, ACA |
| D23 | Dahu, Miaoli | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| D24 | Dahu, Miaoli | D | MAT1-2 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| D25 | Dahu, Miaoli | J | MAT1-1 | <i>Boty</i> | TG, T, CCG |
| ST1 | Shihtan, Miaoli | K | MAT1-1 | <i>vacuma</i> | CG, T, ACA |
| ST4 | Shihtan, Miaoli | L | MAT1-1 | <i>Boty</i> | CG, T, CCG |
| ST6 | Shihtan, Miaoli | L | MAT1-1 | <i>Boty</i> | CG, T, CCG |
| ST7 | Shihtan, Miaoli | B | MAT1-2 | <i>Boty</i> | TG, T, CCG |
| G1 | Guoxing, Nantou | D | MAT1-2 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| G3 | Guoxing, Nantou | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| G5 | Guoxing, Nantou | E | MAT1-1 | <i>Boty</i> | CT, T, CCG |
| G8 | Guoxing, Nantou | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| G10 | Guoxing, Nantou | D | MAT1-2 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| GX1 | Guanxi, Hsinchu | D | MAT1-2 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| GX2 | Guanxi, Hsinchu | M | MAT1-1 | <i>transposa</i> | TG, T, CCG |
| GX3 | Guanxi, Hsinchu | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| GX5 | Guanxi, Hsinchu | N | MAT1-2 | <i>transposa</i> | TG, T, CCG |
| GX7 | Guanxi, Hsinchu | N | MAT1-2 | <i>transposa</i> | TG, T, CCG |
| N1 | Neihu, Taipei | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| N3 | Neihu, Taipei | A | MAT1-1 | <i>transposa</i> | CT, T, CCG |
| S2 | Shanhua, Tainan | E | MAT1-1 | <i>Boty</i> | CT, T, CCG |
| S3 | Shanhua, Tainan | M | MAT1-1 | <i>transposa</i> | TG, T, CCG |
| S4 | Shanhua, Tainan | C | MAT1-2 | <i>Boty</i> | CT, T, CCG |
| W1 | Wufeng, Taichung | M | MAT1-1 | <i>transposa</i> | TG, T, CCG |

^[1] The Genetic patterns were categorized by mating type, transposon genotype and SNPs.

^[2] The mating types distinguished by the MAT1-1 and MAT1-2 alleles were heterothallic.

^[3] Transposon: transposa (both Boty and Flipper), Boty (Boty only), Flipper (Flipper only) and vacuma (neither Boty nor Flipper).

^[4] SNPs: single nucleotide polymorphisms of RPB2 (2 base pairs), HSP60 (1 base pair) and G3PDH (3 base pairs) genes, respectively.

光觀察及照相紀錄。

配對型判別

灰黴病菌菌株之配對型 (mating type) 計有MAT1-1 (只有 *MAT1-1* 等位基因) 及MAT1-2 (只有*MAT1-2*等位基因) 等二種異絲型及兼有此二基因之同絲型⁽²¹⁾。MAT1-1基因 (長度1050 bp) 增幅引子對為MAT alpha5 (ATGACGGCTCCCTTCAAAACC) 及 MAT alpha3 (GGTGGTGAAGGGACATCTTC)；*MAT1-2*基因 (長度1100 bp) 增幅引子對為HMG5 (ATGTCTCTCTCTCTCTCCG) 及HMG3 (GGAAAAGAATGTGTAGAGATCCTG)⁽²¹⁾。將供試之36株菌株基因組核酸分別進行二種基因的聚合酶連鎖反應，主混和液同上。增幅MAT1-1先以94℃，作用 1 min，接著進入32次增幅循環 (94℃, 40 sec, 58℃, 1min 30 sec, 72℃, 1 min)，最後以72℃, 10 min作結。增幅MAT1-2 亦先以94℃, 作用1 min，接著進入32次增幅循環 (94℃, 40 sec, 57℃, 1min 30 sec, 72℃, 1 min)，最後以 72℃, 10 min作結⁽⁵³⁾。聚合酶連鎖反應產物先以1.2%瓊脂糖凝膠進行電泳分離，再以溴化乙錠染色，並以紫外光觀察及照相紀錄。上述結果依下列公式進行卡方檢定 (*χ*², chi-square test)，以視菌株配對型分布適合度 (goodness of fit) 是否符合預期之1:1比例^(40,41,53)。卡方檢定公式為

$$\chi ^2=\sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

O = MAT1-1或 MAT1-2之實際菌株數，*E* = MAT1-1或 MAT1-2之期望菌株數。臨界值 *χ*² =3.84 (*α* =0.05, df=1)，如卡方計算值<3.84，則*P*>0.05，表示病原菌族群的兩種配對型基因座 (mating locus) 具等比例分布。

轉位子基因型檢測

*B. cinerea*已知有二種轉位子分別為*Boty*及*Flipper*，菌株依其是否具此種轉位子，可區分為4種基因型，分別為*transposa*、*Boty*、*Flipper*及*vacuma*^(7, 17, 25)。取供試菌株之基因組核酸分別進行其二種轉位子的聚合酶連鎖反應，主混和液同上。*Boty* (620 bp)增幅引子對為*Boty*-F (TAACCTTGTCTTTGCTCATC)及*Boty*-R (CCCAATTTATTCAATGTCAG)，*Flipper* (1250 bp) 增幅引子對為F300 (GCACAAAACCTACAGAAG A) 及F1550 (ATTCGTTTCTTGACTGTA)⁽⁵³⁾。*Boty*聚合酶連鎖反應的增幅過程為先以94℃, 作用5 min，接著進入40次增幅循環 (95℃, 30 sec, 48℃, 30 sec, 72℃, 1 min)，最後以72℃, 15 min作結⁽³³⁾。*Flipper*聚合酶連鎖反應之增幅過程則先以95℃, 作用3 min，接著進入40次增幅循環 (94℃, 40 sec, 60℃, 40 sec, 72℃, 1 min)，最後以72℃, 10 min作結⁽²⁶⁾。聚合酶連鎖反應產物先以1.2%瓊脂糖凝膠進行電泳分離，再以溴化乙錠染色，並以紫外光觀察及照相紀錄。

族群遺傳分析

*B. cinerea*族群遺傳分析是以表一列36株草莓灰黴病菌為對象，依據菌株分離地點區分為大湖地區（苗栗縣大湖鄉及獅潭鄉）及其以外地區（台北、新竹、台中、南投及台南等縣市），將此36株菌劃分為二個族群。以菌株之2種配對型（MAT1-1、MAT1-2）、4種轉位子基因型（*transposa*、*Boty*、*Flipper*及*vacuma*）及分布於增幅熱休克蛋白（*HSP60*）、核糖核酸聚合酶II（*RPB2*）及甘油3-磷酸脫氫酶（*G3PDH*）等3種基因序列的6個突變點所構成之單核苷酸多態性（SNPs）⁽⁸⁾共同作為族群遺傳分析的指標（表一）。以套裝軟體POPGENE 32 version 1.31計算各族群之遺傳多樣性指數（genetic diversity index）⁽⁵²⁾，包括effective number of alleles⁽²³⁾、Nei's gene diversity (H)⁽³⁷⁾、Shannon's information index (I)⁽²⁰⁾、genetic differentiation coefficient (Gst)^(38, 43)、gene flow (Nm, $Nm = 0.5(1-Gst) / Gst$)⁽³⁰⁾、Nei's unbiased genetic identity及genetic distance⁽³⁶⁾。另以套裝軟體ARLEQUIN ver. 3.5.2.2進行階層式分子變異分析（hierarchical analysis of molecular variance, AMOVA）^(11, 12)。

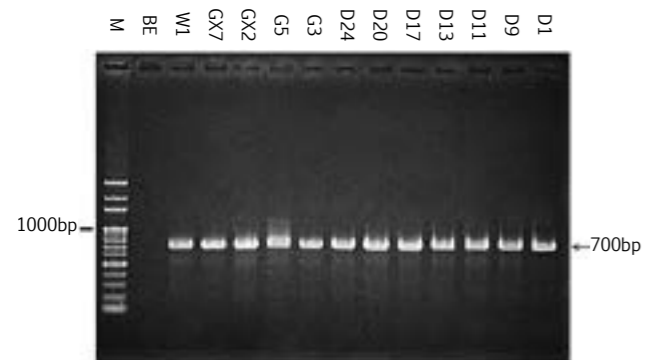
結果

菌種分子鑑定

供試36株灰黴病菌經聚合酶連鎖反應均增幅*B. cinerea*的專一性條帶（長約700 bp），作為負對照的菌株*B. elliptica*（代號：BCRC33111）則無任何擴增子產生，表供試引子對 C729+/- 具菌種專一性，並可推論供試菌株均為*B. cinerea*（圖一）。

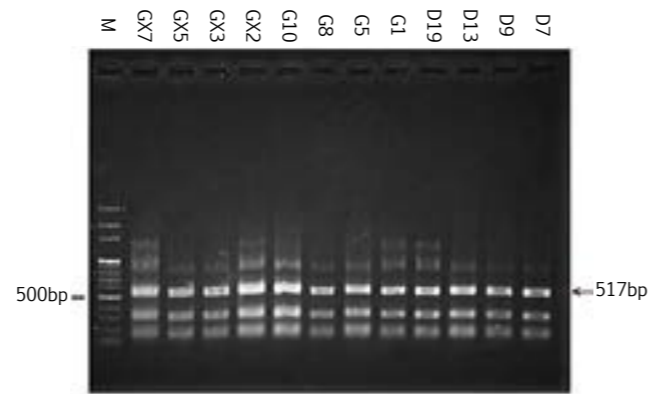
*Bc-hch*基因群分析

供試*B. cinerea*菌株均可依*Bc-hch*基因座專一性引子對增幅部分*Bc-hch*基因，並獲長約1171 bp擴增子，經以限制酶Hha I



圖一、草莓灰黴病菌經菌種專一性引子對C729+/-增幅之基因片段膠片圖。

Fig. 1. Gel electrophoretic profile of PCR amplification using *Botrytis cinerea* specific primer pairs for C729+/- that amplified a 700-bp fragment. Numerals on the top of the gel represent the isolate number. BE stands for *B. elliptica* isolate (ATCC11787) as negative control. M is DNA marker.



圖二、草莓灰黴病菌*Bc-hch*基因增幅產物經限制酶HhaI截切後之膠片圖。

Fig. 2. Gel electrophoretic profile of the *Bc-hch* gene product digested by HhaI. Numerals on the top of the gel represent the isolate number. M is DNA marker.

截切，處理後的基因片段以凝膠作分離。於凝膠上，各菌株均出現長約517 bp條帶（band），但未見601 bp條帶，證明其全屬基因群II（Group II）（圖二），此亦進一步確認供試菌株均為*B. cinerea sensu stricto*⁽⁴⁷⁾。

配對型判別

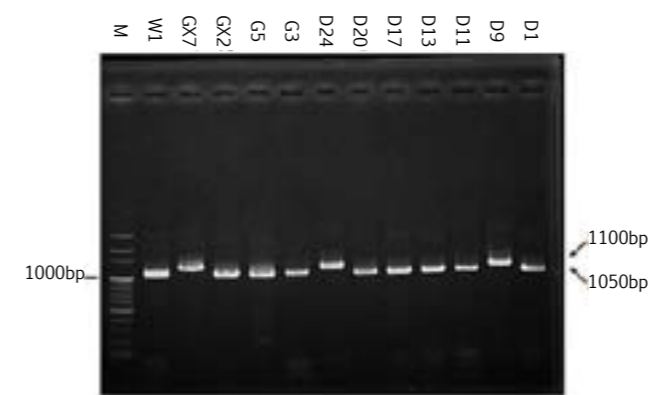
供試*B. cinerea*菌株經配對型MAT1-1基因增幅引子對MAT alpha5及MAT alpha3及配對型MAT1-2基因增幅引子對HMG5及HMG3之作用，可分別產生長約1050 bp或1100 bp之擴增子。試驗結果顯示，36株*B. cinerea*均為異絲型，其中MAT1-1有23株（63.9%），MAT1-2有13株（36.1%）（表一、圖三）。前述結果經以卡方檢定公式計算其數值，大湖獅潭族群為1.80，其他地區族群為1.00，全臺族群為2.78，均小於臨界值 $\chi^2_{(0.05, 1)} = 3.84$ ，亦即供試之各草莓灰黴病菌族群的二種配對型基因座具等比例分布。

轉位子基因型檢測

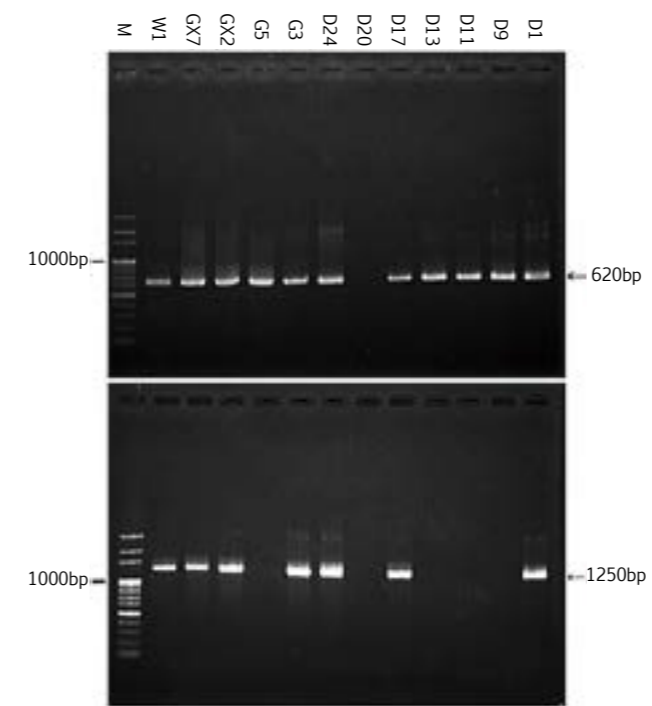
供試36株菌株經以轉位子*Boty*及*Flipper*專一性增幅引子對所進行之聚合酶連鎖反應，可分別產生長度為620 bp及1250 bp之擴增子，其中*transposa*型20株（55.5%）、*Boty*型14株（38.9%）、*Flipper*型0株（0%）、及*vacuma*型2株（5.6%）（表一、圖四）。大湖獅潭地區及其他地區之4種轉位子基因型則分別為7, 11, 0, 2株及13, 3, 0, 0株（表一）。

族群遺傳分析

草莓灰黴病菌族群遺傳分析所使用之各項分析標記均具多型性，但在各個族群的分布頻率不同。依據各菌株之配對型、轉位子基因型及分布於3種蛋白質基因序列之單核苷酸變異等3種標記可將全部供試菌株區分為14種基因型（genetic pattern）（表一）。菌株基因型地理分布顯示，14種基因型中，



圖三、草莓灰黴病菌配對型基因增幅片段膠片圖。
Fig. 3. Gel electrophoretic profile of the mating-type PCR amplification. Numerals on the top of the gel represent the isolate number. GX7, D24 and D9 are MAT1-2 (1100 bp), the others are MAT1-1 (1050 bp). M is DNA marker.



圖四、草莓灰黴病菌轉位子基因*Boty*（上圖）及*Flipper*（下圖）增幅片段膠片圖。

Fig. 4. Gel electrophoretic profile of the transposon *Boty* (top plate) and *Flipper* (bottom plate) amplicons (620 and 1250 bp, respectively) amplified by *Boty*- and *Flipper*-specific primer pairs. Numerals on the top of the gel represent the isolate number. M is DNA marker.

大湖獅潭地區即有12種，其他地區僅有6種，而此6種中又有4種（計11株）與大湖獅潭者重疊，僅2種（計5株）為其特有（表一）。綜合分析此3種標記顯示，大湖-獅潭族群的遺傳多樣性指數均高於來自其他地區者（表二）。成對評估（pairwise estimate）大湖-獅潭與其他地區之灰黴病菌族群亦發現，族群間遺傳分

化（genetic differentiation）程度不高（ $Gst=0.0833$ ），而表示基因流動（gene flow）的數值 $Nm=5.5035$ ，則表示族群間有較強的基因交流（表三）。由兩族群在遺傳身份（genetic identity）及遺傳距離（genetic distance）的成對評估得知，前者有較高的數值（0.9448），而後者較低（0.0568），這表示兩族群彼此間的遺傳分化現象較低（表三）。兩地區灰黴病菌族群的分子變異階層式分析（AMOVA）亦顯示，90.11%的遺傳變異來自族群內部，族群間僅佔9.89%（表四）。

表二、草莓灰黴病菌族群遺傳多樣性指數列表

TABLE 2. Genetic diversity indexes within each population of *Botrytis cinerea*¹

| Genetic diversity index | Population of | | |
|-------------------------|---------------|--------------|-------------|
| | Overall | Dahu-Shihtan | Other areas |
| Sample size | 36 | 20 | 16 |
| Polymorphic loci (%) | 100.00 | 100.00 | 50.00 |
| Na ² | 15.00 | 15.00 | 9.00 |
| Ne ³ | 9.61 | 10.30 | 8.07 |
| H ⁴ | 1.93 | 2.24 | 1.20 |
| I ⁵ | 3.18 | 3.69 | 1.77 |

¹ Genetic diversity indexes were based on combined analyses of mating type, transposon genotype and SNPs. Refer to Table 1 for isolate information.

² Na: observed number of alleles.

³ Ne: effective number of alleles (Hartl and Clark, 1989).

⁴ H: Nei's gene diversity (Nei, 1973).

⁵ I: Shannon's information index as a measure of gene diversity (Hennink and Zeven, 1991).

表三、草莓灰黴病菌族群基因流動與遺傳距離成對評估表

TABLE 3. Pairwise estimates of GST, Nm, Nei's unbiased genetic identity and genetic distance between two local *Botrytis cinerea* populations

| | Dahu-Shihtan | Other areas |
|--------------|--|--|
| Dahu-Shihtan | ... | 0.0833 ¹ /5.5035 ² |
| Other areas | 0.9448 ³ /0.0568 ⁴ | ... |

¹ Gst: mean of genetic differentiation coefficient (Ryman and Leimar, 2009).

² Nm: gene flow from the estimate mean of Gst (McDermott and McDonald, 1993).

³ Nei's unbiased genetic identity (Nei, 1978).

⁴ Nei's unbiased genetic distance (Nei, 1978).

表四、大湖獅潭與其他地區草莓灰黴病菌族群之分子變異階層式分析
TABLE 4. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) with two *Botrytis cinerea* populations from Dahu-Shihtan and other areas

| Source of variation | d.f. | Sum of squares | Variance components | Percentage of variation |
|---------------------|------|----------------|---------------------|-------------------------|
| Between populations | 1 | 2.781 | 0.103 | 9.89 |
| Within populations | 34 | 32.025 | 0.942 | 90.11 |
| Total | 35 | 34.806 | 1.045 | ... |

討 論

傳統植物病理學的研究常關注個別菌株的病原性或抗藥性等問題，但在田間實際狀況是，病原菌以一個龐大族群的形式存在，病害防治的對象是病原菌族群而非個體。病原菌族群為因應環境變動以求存活，勢須不斷演化。族群遺傳學是研究在演化動力 (evolutionary forces) 影響下，等位基因 (alleles) 的分布與改變。演化動力包括天擇 (natural selection)、交配 (mating)、遺傳漂變 (genetic drift)、基因流動 (gene flow)、族群大小 (population size)、及突變 (mutation) 等^(19, 39)。演化將造成病原菌基因組成的改變，且在某一時空下成為該族群特徵的一部分。我們可以人為劃分病原菌族群，並探討個別族群內部及不同族群間在各種生物學特徵上的差異，特別是穩定的遺傳特徵，例如前述之病原性、抗藥性及近年興起的各種分子生物學標記等。分析病原菌族群的遺傳特徵，將有助於我們掌握其演化趨勢，瞭解各種遺傳標記在族群內的分布與族群間的差異，並據以釐定病害防治策略及執行實際防治作為。在農業生態環境中，由耕作者依需要加入各種因子於作物生長環境，例如，抗病品種、殺菌劑、灌溉系統及輪作制度等，將會定向選汰 (directional selection) 病原菌族群，導致其某些特徵朝特定的方向發展，例如，抗藥性族群的產生⁽³¹⁾。植病工作者必須認識病原菌族群的遺傳特徵並預測其可能的演化方向，方能採行有效的防治措施。

病原菌族群遺傳學研究的首要工作在探討族群的遺傳結構，這是指族群內與族群間遺傳變異的分布與數量，因其反映了病原菌族群的演化歷史與演化潛力，對明瞭其在某一階段的演化過程乃至其最終結果至關重要。族群遺傳結構與基因流動是最常被用於推斷病原菌族群的統計史 (demographic history) 及可能產生的遺傳變異^(30, 31)。病原菌族群遺傳結構與變異分布可以讓我們觀察到驅使病原菌快速演化的動力與進程，這有利於我們規劃一個有效且能永續的病害管理策略⁽³²⁾。分子標記因與植物病原菌對環境適應較無關聯，可作為族群遺傳分析之用。在國外，有關灰黴病菌族群的分子遺傳研究已有多篇報導^(1, 3, 6, 14, 29, 44, 46, 49, 53)，惟國內尚乏相關研究。本文嘗試以族群遺傳結構與基因流動的分析結果來呈現臺灣地區草莓灰黴病菌族群的現況，以期開啟後續的相關研究。

在草莓、藍莓及葡萄等作物的灰黴病菌中已知有 *B. cinerea*、*B. caroliniana*、*B. fragariae*、*B. pseudocinerea* 及 *Botrytis group S* 等數個菌種^(16, 28, 42)。*Botrytis* 所屬個別菌種的傳統鑑定方法是依據菌落形態、分生孢子及分生孢子梗形態等，但以形態作鑑定並不易區別菌種間的差異⁽⁴⁹⁾。針對 *B. cinerea* 的鑑定，以隨機擴增多態性去氧核醣核酸 (RAPD) 的技術已開發出具種別專一性的引子對C729+/-⁽⁴¹⁾，其在本研究中顯示出極佳的鑑別結果(圖一)。供試菌株並以擴增營養菌絲不親和性基因座 (*Bc-hch*)，再以限制酶*Hha*I截切，均獲得長度為517 bp

的基因片段，因而肯定其為*B. cinerea* (Group II) (圖二)，並以之區別自其分化的另一同域菌種*B. pseudocinerea* (Group I)⁽¹⁶⁾。國外的相關研究亦顯示，Group II菌株均占族群之全部或絕大多數，Group I菌株在全球的分布中均僅佔極少數^(53, 54)。綜合上述，我們可以判定本研究所用草莓灰黴病菌均屬*B. cinerea*。

B. cinerea 的有性世代在自然界非常罕見，因而有學者推斷肇致本菌遺傳多樣性的主因並非源自其有性生殖⁽⁴⁾。然探討灰黴病菌族群中有性生殖是否可能發生的簡易方法就是偵測其配對型的分布。由於本菌大部分菌株屬異絲型，當其族群中兩種配對型 (MAT1-1及MAT1-2) 的分佈比例接近1:1時，即屬逢機交配，亦即可能發生基因有性重組 (sexual recombination)，而這種現象在自然界可能很普遍⁽¹³⁾。本研究之配對型基因偵測結果經卡方檢定，顯示配對型分布不論是個別族群或二族群加總均符合等比例之假說檢定，此與相關的研究結果一致^(24, 53)。儘管我們尚未於田間發現其有性世代的構造，但依本研究結果推測，草莓灰黴病菌在臺灣經由有性生殖產生子代及基因重組的可能性是存在的。

轉位子又稱跳躍基因 (jumping gene) 是一段去氧核醣核酸 (DNA) 序列，可在基因組 (genome)中移動，對基因組功能與演化構成實質影響⁽²⁵⁾。*B. cinerea* 菌株依據兩種轉位子 (*Boty*, *Flipper*) 的有無可區分為4種轉位子基因型⁽¹⁸⁾。本研究之菌株以 *transposa* 型最多，其次為*Boty*型，再次為*vacuma*型，*Flipper* 型則未測得 (表一)。4種轉位子基因型佔比與相關研究結果大致相同，亦即*transposa*型最多，*Boty*型次之，另二型均屬稀少^(1, 6, 29, 53)。另有研究指出，轉位子基因型分布與地理及氣候區有關，並歸納出不同基因型的地理分布概況。其中以*transposa*型分布最廣，且遺傳變異也最大，在各地理區均為主要基因型，*Boty*型主要在溫暖 (warm) 地區，*vacuma*型主要在溫帶地區，*Flipper*型則主要在溫暖及炎熱潮濕 (warm and tropical humid) 地區^(24, 53)。由於*Flipper*型菌株較少見於溫帶地區，而該地區卻是易罹灰黴病的草莓及許多蔬果及花卉的栽培地，故在灰黴病菌族群中，*Flipper*型菌株偏少，但這也是臺灣草莓灰黴病菌族群轉位子的分布狀況。臺灣地處亞熱帶，屬炎熱潮濕氣候區，理應是*Flipper*型菌株的分布地，卻未見該型菌株，則臺灣地區的草莓灰黴病菌從何而來，是一有趣且值得探討的課題。而不同轉位子基因型菌株對氣候的適應性是否存在有差異，因而導致其在不同地理區分布頻率不同，實值得深入研究。

有研究指出，可以用轉位子基因型作為標記，分析灰黴病菌族群的基因型分布以探討不同基因型族群間是否具有性生殖現象⁽⁵³⁾，因有性生殖與基因交流及遺傳分化密切相關。分析有性生殖後代的基因型分布狀況，可據以推估何種基因型族群間發生交配。惟本研究因菌株數量及地理分布有限，未進行相關分析，日後應擴大菌株數量及來源以獲得更完整的分析結果。曾有學者提出*transposa*及*vacuma*基因型族群因生殖隔離 (reproductive isolation) 而發展為同域物種^(17, 18)，惟本研究

只能依據兩基因型數量差異懸殊，推斷彼此可能有生殖隔離現象。由於不同轉位子基因型除*vacuma*型因稀少及未偵測出之*Flipper*型外，因在相同地區均存有約等比例的兩種配對型菌株，據此可推測，經由有性生殖導致菌株間遺傳物質交換是可能的。臺灣草莓主要種植於大湖與獅潭地區，約佔85%以上⁽²⁾，但亦有零星種植於全臺之北中南各地。本研究為比較大湖獅潭地區與其他零星栽培地區灰黴病菌族群之差異，乃運用數種多型性分子標記，包括配對型、轉位子基因型及3種用於*Botrytis*種間鑑定用基因序列的6個突變點於其族群遺傳學研究^(8, 46)。綜合各項分析數據顯示，大湖獅潭地區灰黴病菌的各種族群遺傳多樣性指數均明顯高於其他地區者，此表示大湖獅潭地區灰黴病菌因栽培歷史悠久且面積最大，因而有較長遠的演化歷史，進而造就其遺傳多樣性的結果 (表二)。草莓灰黴病菌族群基因流動與遺傳距離成對評估表亦表明，族群間遺傳分化 (differentiation) 程度低 (Gst=0.0833)，則遺傳距離也低 (Nei's genetic distance=0.0568)。而族群間基因流動高 (Nm=5.5035)，則遺傳相似度也高 (Nei's unbiased genetic identity=0.9448) (表三)。另，依據兩族群的分子變異階層式分析表，族群間的變異百分率遠低於族群內的變異 (表四)，此表示族群間交流頻繁，這項結果也類同於相關研究^(3, 29, 53)。以上數據皆表示，不同灰黴病菌族群間的基因交流頻繁，導致族群間遺傳分化程度較低，此亦與相關研究結果一致^(3, 53)。綜合上述訊息，我們可以推斷苗栗縣大湖與獅潭鄉應是臺灣草莓灰黴病菌族群遺傳變異的主要源頭，而其他地區族群的遺傳變異可能大多源自此地區。因根據本文族群遺傳分析結果，其他地區大部分菌株的變異型態確與大湖、獅潭者重疊，但亦有少部分菌株，例如，GX2、GX5、GX7、S3及W1等的基因型並未見於大湖、獅潭地區 (表一)。我們推測，如能分析更多大湖、獅潭菌株，則其亦可能與之重疊。綜合本研究結果或可推斷，草莓灰黴病菌很可能是隨大湖、獅潭的草莓苗傳播至其他地區，這也為使用清潔種苗可以減輕草莓多種病害提供可信的科學證據。

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. Amiri, A., Zuniga, A. I., and Peres, N. A. 2018. Prevalence of *Botrytis* cryptic species in strawberry nursery transplants and strawberry and blueberry commercial fields in the Eastern United States. Plant Dis. 102:398-404.

- Anonymous, 2020. Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan (R.O.C.), Taipei, 351 pp. (in Chinese).
- Bardin, M., Decognet, V., and Nicot, P. C. 2014. Remarkable predominance of a small number of genotypes in greenhouse populations of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 104:859-864.
- Beever, R. E., and Weeds, P. L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Pages 29-52 in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. 447 pp.
- 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.
- DeLong, J. A., Saito, S., Xiao, C.-L., and Naegele, R. P. 2020. Population genetics and fungicide resistance of *Botrytis cinerea* on *Vitis* and *Prunus* spp. in California. Phytopathology 110:694-702.
- Dioloz, A., Marches, F., Fortini, D., and Brygoo, Y. 1995. Boty, a long-terminal repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Appl. Environ. Microbiol. 61:103-108.
- 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. (in Chinese)
- Dowling, M. E., and Schnabel, G. 2017. First report of *Botrytis mali* causing gray mold on strawberry in the United States. Plant Dis. 101:1034.
- Esterio, M., Muñoz, G., Ramos, C., Cofré, G., Estévez, R., Salinas, A., and Auger, J. 2011. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson seedless table grapes in the Central Valley of Chile. Plant Dis. 95:683-690.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online 1:47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., and Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131(2):479 – 491.
- Faretra, F., Antonacci, E., and Pollastro, S. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol. 134:2543-2550.
- Fournier, E., Giraud, T., Loiseau, A., Vautrin, D., Estoup,

- A., Solignac, M., Cornuet, J. M., and Brygoo, Y. 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Mol. Ecol. Notes* 2:253-255.
15. Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., and Brygoo, Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97:1251-1267.
16. Fournier, E., Levis, C., Fortini, D., Leroux, P., Giraud, T., and Brygoo, Y. 2003. Characterization of *Bc-hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa het-c* vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia* 95:251-261.
17. Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K., and Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89:967-973.
18. Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., and Brygoo, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol. Biol. Evol.* 14:1177-1185.
19. Hartl, D. L., and Clark, A. G. 1989. Principles of Population Genetics. 2nd edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA. 682 pp.
20. Hennink, S., and Zeven, A. C. 1991. The interpretation of Nei and Shannon-Weaver within population variation indices. *Euphytica* 51:235-240.
21. van Kan, J. A. L., Duarte, J., Dekkers, E., Dyer, P. S., and Kohn, L. M. 2010. The *Botrytis cinerea* mating type loci. XV International *Botrytis* symposium. Cádiz, Spain.
22. Kecskeméti, E., Brathuhn, A., Kogel, K. H., Berkelmann-Löhnertz, B., and Reineke, A. 2014. Presence of transposons and mycoviruses in *Botrytis cinerea* isolates collected from a German grapevine growing region. *J. Phytopathol.* 162:582-595.
23. Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E., Kimura, M., and Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
24. Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E., and Kapoor, R. 2014. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. *Microbiol. Res.* 169:862-872.
25. Latchman, D. S. 1993. Transcription factors: An overview. *Int. J. Exp. Pathol.* 74:417 - 422.
26. Levis, C., Fortini, D., and Brygoo, Y. 1997. Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol. Gen. Genet.* 254:674-680.
27. Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., and Schnabel, G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104:650-658.
28. Li, X., Fernández-Ortuño, D., Chai, W., Wang, F., and Schnabel, G. 2012. Identification and prevalence of *Botrytis* spp. from blackberry and strawberry fields of the Carolinas. *Plant Dis.* 96:1634-1637.
29. Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Dis.* 89:1083-1089.
30. McDermott, J. M., and McDonald, B. A. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:353-373.
31. McDonald, B. A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453.
32. McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:349-379.
33. Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R., and Melgarejo, P. 2003. Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:515-522.
34. Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., and Giraud, T. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Micol. Res.* 106:594-601.
35. Muñoz, C., Talquenca, S. G., Oriolani, E., and Combina, M. 2010. Genetic characterization of grapevine-infecting *Botrytis cinerea* isolates from Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 27:66-70.
36. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292.
37. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:3321-3323.
38. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
39. Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA. 512 pp.
40. Ott, R. L., and Longnecker, M. 2001. *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*. 5th ed. Duxbury, Pacific Grove, CA, USA. 1152 pp.
41. Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., and Viret, O. 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria xananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 209 (2):169 - 174.
42. 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.
43. Ryman, N., and Leimar, O. 2009. GST is still a useful measure of genetic differentiation - a comment on Jost's *D*. *Mol. Ecol.* 18:2084-2087.
44. Samuel, S., Veloukas, T., Papavasileiou, A., and Karaoglanidis, G. S. 2012. Differences in frequency of transposable elements presence in *Botrytis cinerea* populations from several hosts in Greece. *Plant Dis.* 96:1286-1290.
45. Shaw, M. W., Emmanuel, C. J., Emilda, D., Terhem, R. B., Shafia, A., Tsamaidi, D., Emblow, M., and van Kan, J. A. L. 2016. Analysis of cryptic, systemic *Botrytis* infections in symptomless hosts. *Front. Plant Sci.* 7:1 - 14.
46. 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(2):333-346.
47. Thompson, J. R., and Latorre, B. A. 1999. Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. *Plant Dis.* 83:1090-1094.
48. van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., and van Kan, J. A. L. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Micol. Res.* 97:1193 - 1200.
49. Walker, A.-S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Pecheur, P. L., Dupont, J., and Fournier, E. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101:1433-1445.
50. Walker, A.-S. 2016. Diversity within and between species of *Botrytis*. in: *Botrytis - the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. S. Fillinger and Y. Elad eds. Springer, Berlin, 486 pp.
51. 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.
52. Yeh, F., Yang, R. C., Boyle, T. B. J., Ye, Z. H., and Mao, J. X. 1999. POPGENE, The User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
53. Zhang, Y., Li, X., Shen, F., Xu, H., Li, Y., and Liu, D. 2018. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from grape vineyards in China. *Plant Dis.* 102:40-48.
54. Zhang, Y. J., Shen, F. Y., Xu, H. P., Li, Y. N., and Liu, D. Q. 2017. Research advances in the diversity of *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Biotechnol.* 25:954-968.

ABSTRACT

Duan, C.-H.* and Chen, G.-Y. 2022. Molecular characterization of *Botrytis cinerea* populations on strawberry in Taiwan. *J. Plant Med.* 64(2): 53-62.

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

Botrytis cinerea is a prevalent and devastating fungal pathogen on strawberry in Taiwan. Thirty-six selected single-conidium isolates collected from strawberry fields islandwide were identified as *B. cinerea sensu stricto* based on *B. cinerea*-specific primer pair C729+/- and belonged to Genetic Group II based on PCR-RFLP of the *Bc-hch* locus. The 36 isolates were all heterothallic isolates. Twenty-three isolates belonged to MAT1-1 type and 13 were characterized as MAT1-2 type. The four transposon genotypes, *transposa*, *Boty*-only, *Flipper*-only, and *vacuma*, comprised 55.5%, 38.9%, 0.0%, and 5.6%, respectively, of all the isolates studied. Combined analyses of mating types, transposon genotypes and single nucleotide polymorphisms of *RPB2*, *HSP60* and *G3PDH* genes of *B. cinerea* isolates were performed to assess their genetic population structure and diversity. Genetic diversity indexes within Dahu-Shihtan population were all higher than those of the other areas population. Pairwise estimates of G_{st}, N_m and Nei's unbiased genetic identity and genetic distance between these two geographical populations revealed that low genetic differentiation and high gene flow existed between them. Hierarchical analysis of molecular variance of these two populations further indicated that 90.11% of the variation occurred within populations, while the variation between populations was only 9.89%. This is the first report of the genotypic diversity of *B. cinerea* populations on strawberry in Taiwan.

Keywords: *Botrytis cinerea*, population genetics, strawberry

