

台灣草莓灰黴病菌對 Strobilurin 類 (QoIs) 殺菌劑之感受性

陳麗淑¹ 鍾文全² 鍾文鑫^{1,3}

¹國立中興大學植物病理學系

²行政院農業委員會種苗改良繁殖場

³聯絡作者，電子郵件：wenchung@nchu.edu.tw；電話：+886-4-2284-0480 轉 356；
傳真：+886-4-2285-4292

接受日期：中華民國 98 年 6 月 26 日

摘要

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.

由 *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. 所引起的灰黴病為草莓重要病原真菌之一，除可造成田間作物危害外，亦可引起貯藏期果實的腐爛。Strobilurin (Quinone outside inhibitor, QoI) 類藥劑為一種廣效性殺菌劑，具有抑制粒線體電子傳遞鏈而降低 ATP 產生之作用機制，目前台灣尚未推薦用於防治灰黴病。本研究針對不同有效濃度克收欣、亞托敏及百克敏等三種 QoI 類殺菌劑對 152 株草莓 *B. cinerea* 菌株之感受性測試，結果顯示百克敏於 100 $\mu\text{g/ml}$ 之有效濃度下，對所有供試菌株菌絲生長抑制率達皆可達 50% 以上，然克收欣與亞托敏於 500 $\mu\text{g/ml}$ 之有效濃度下，則只分別對 9.9% 與 12.5% 之供試菌株菌絲生長抑制率達 50% 以上，顯示台灣草莓田間可能已出現抗 QoI 類殺菌劑的 *B. cinerea* 菌株。進一步分析對 QoI 類藥劑表現不同感受性之 5 株菌株的 *cytochrome b* (*cyt b*) 基因序列，得知此 5 株菌於 *cyt b* 基因中第 129 與 143 處密碼子並無發生核苷酸突變現象，推測 *cytb* 基因第 129 與 143 處密碼子可能並非影響草莓灰黴病菌對 QoI 類藥劑產生抗性反應之主要機制。

關鍵詞：灰黴病、Strobilurins (QoIs)、 EC_{50} 、*cyt b* 基因

緒言

Botrytis cinerea Pers.:Fr. 屬不完全菌，有性世代為 *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel，主要分布於亞熱帶的地區，於環境中可行腐生生活而廣泛存在於自然界中。它可引起作物灰黴病 (gray mold)，為害寄主範圍超過 235 種，包括葡萄、番茄、草莓、瓜類、豆類、花卉及觀賞植物等重要經濟作物⁽²⁴⁾；本病原菌除可在田間造成病害外，亦是重要的儲藏期病害病原菌之一⁽¹⁹⁾。在台灣，灰黴病菌可危害作物超過 48 種以上，包括蔬菜、糧食作物、花卉、果樹及木本植物等⁽¹⁶⁾。本病菌危害草莓時，主要以危害果實為主，最初由花開始，進而侵害果粒，嚴重影響草莓品質甚鉅。

灰黴病的防治策略多以施用化學藥劑為主，目前

台灣推薦用於防治灰黴病的殺菌劑有三類，第一類為 Anilinopyrimidine 類，如派美林 (Pyrimethanil) 及滅派林 (Mepanipyridin)；第二類為 Dicarboxidimide 類，如克氯得 (Chlozolinate)、依普同 (Iprodione)、免克寧 (Vinclozolin) 與撲滅寧 (Procymidone)；第三類為多重作用位置 (multiple site) 的殺菌劑如益發靈 (Dichlofluanid) 與免克得 (Metiram)⁽³⁾。前二類殺菌劑的可能作用機制分別是抑制 methionine 的合成，以及影響細胞中 MAP/Histidine-kinase pathway 的訊號傳遞⁽⁶⁾。然而根據 Fungicide resistance action committee (FRAC) 的統計，田間灰黴病菌對於 Anilinopyrimidine 類及 Dicarboxidimide 類藥劑已存在抗藥性的問題⁽⁶⁾。在台灣針對田間 *B. cinerea* 抗藥性動態的研究及了解並

不多，但仍有少數國外研究發現此兩類殺菌劑對灰黴病菌已有防治效果不彰的情形產生⁽¹⁷⁾。

Strobilurin (Quinone outside inhibitor, QoI) 類殺菌劑為 β -methoxyacrylic acid 之衍生物，1976 年首次在木材擔子菌 *Strobilurus tenacellus* Singer 上被發現⁽²³⁾，為近十年較為新型的廣效性殺菌劑，可施用於作物受到病原菌感染但病徵尚未發展的時期，而作為預防及治療的藥劑。此類藥劑之作用機制，主要在於抑制菌類細胞呼吸作用，對真菌孢子發芽與菌絲生長均有顯著抑制效果，於 1996 年正式商品化，應用於防治多種作物病害⁽¹⁾。目前國外市售的克收欣 (Kresoxim-methyl)、亞托敏 (Azoxystrobin)、百克敏 (Pyraclostrobin)、三氟敏 (Trifloxystrobin)、凡殺同 (Famoxadone)、Metominostrobin、Picoxystrobin、Fenamidon 及 Oryzastrobins 均屬於此類藥劑，然而在台灣上市登記販售之商品則僅有克收欣、亞托敏、百克敏、三氟敏與凡殺同等。雖然美國與日本均有推薦 QoI 類藥劑施用於灰黴病的防治，但在台灣卻未推薦使用⁽³⁾；加上，國內長期所推薦使用的 Anilinopyrimidine 及 Dicarboxidimide 等兩類殺菌劑防治灰黴病，對田間灰黴病菌有產生抗藥性之風險，因此，在其他防治策略尚不能取代化學防治的情況下，尋找新型作用機制的殺菌劑來管理灰黴病，是當前刻不容緩的工作。

近年來有關 QoI 類殺菌劑抗藥性產生的研究報告指出，病原菌對 QoI 類藥劑產生抗藥性之主要機制是由於基因體的 *cytochrome b* (*cyt b*) 基因產生突變所致⁽⁸⁾。此現象最初發現於擔子菌 *S. tenacellus* 與黏液球菌 *Myxococcus fulvus*，這兩種微生物為 QoI 類藥劑的天然生產者同時也具有抗藥性⁽⁴⁾。而 *cytochrome b* 胺基酸序列突變主要發生在第 129 處密碼子，基因由 TTC 突變成 TTA，使得胺基酸由苯丙胺酸 (phenylalanine) 轉變成亮氨酸 (leucine)，或是第 143 處密碼子由 GGT 突變為 GCT，而使得胺基酸由甘氨酸 (glycine) 轉變成丙胺酸 (alanine)，進而造成病原菌對 QoI 類殺菌劑產生抗藥性⁽⁴⁾。本研究目的在於檢測台灣草莓灰黴病菌對 QoI 類殺菌劑之抗感性，並進一步分析抗感性灰黴病菌菌株基因體中 *cyt b* 基因的第 129 或 143 處密碼子是否發生突變現象，進而評估灰黴病菌產生抗藥性之機制。

材料與方法

供試菌株

自台灣南投縣國姓鄉、台中縣豐原市及新竹縣新

埔鎮等地區的草莓田，採集罹患灰黴病的草莓果實。在實驗室中以水瓊脂培養基 (Water agar, WA) 進行灰黴病菌單孢分離，然後移置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 斜面中，共計 152 株菌株，並保存於 4°C，作為本研究之供試菌株來源 (表一)。菌株的鑑定是以形態學觀察為主，包括產孢形態及產生菌核的能力，並輔以 rDNA 內轉錄間隔區 (Internal Transcribed Spacers; ITS) 序列作為種鑑定之依據 (數據未呈現)。

灰黴病菌總DNA萃取

將灰黴病菌株培養於 9 公分 PDA 培養基平板上，於 20°C 下培養 10 天後，以移植環刮取適量菌體放入微量離心管中，在 -20°C 下冷凍 1 至 2 小時後，利用已滅菌研磨棒於微量離心管中進行研磨，再加入菌絲體積比 3:7(v/v) 之萃取緩衝液 (150 mM EDTA, 50 mM Tris (pH8.0), 300 mg/l Protease K) 並置於乾熱器 (Digital Dry Bath. Incubator, Genepure Technology) 中，以 65°C 加熱 1 至 2 小時，每隔 15 分鐘均勻搖晃一次。將加熱完畢之菌體以高速低溫離心機 (Rotor: Nr.12154, Sigma 3K20) 離心 5 分鐘，轉速 14,000 ×g，溫度為 4°C，然後吸取上清液至已滅菌的微量離心管中，加入等體積之 phenol/chloroform/iso-amyl alcohol (25 : 24 : 1) 的混合溶液 (Applichem, Germany)，以手輕輕搖晃均勻至不分層後，離心 10 分鐘，轉速 14,000 ×g，再以微量吸收器吸取上清液至已滅菌微量離心管中，分別加入 900 μ l 之 99.5% 酒精與 50 μ l 之 5 M NaOAc 溶液，並於 -20°C 下沉澱過夜。取沉澱過夜之 DNA 溶液離心 5 分鐘，轉速 12,000 ×g 後，可於微量離心管底部觀察到 DNA 白色塊狀物 (pellet)。去除上清液後加入 1 ml 70% 酒精混合均勻後離心 2 分鐘，轉速 12,000 ×g，重複一次。將上清液去除後，取微量離心管倒扣於室溫下自然風乾 5 分鐘，加入 65°C 30 μ l 的 dH₂O 回溶 DNA，並保存於 -30°C 備用。

QoI 類藥劑對草莓灰黴病菌菌絲生長之抑制測試

將保存於 PDA 斜面中的 152 株灰黴病菌菌株，以移植針取出菌絲塊培養於 PDA 平板培養基 3 至 4 天，然後以直徑 0.3 公分的打孔器取出菌絲塊，分別放置於含 44.2% 克收欣水懸劑 (Kresoxim-methyl, Strony suspension concentrate (SC), BASF)、10% 亞托敏水懸劑 (Azoxystrobin, Strony suspension concentrate (SC), Syngenta) 及 23.5% 百克敏乳劑 (Pyraclostrobin, Cabrio emulsion, BASF) 之有效濃度為 1、10、100 及 500 μ g/ml 的 9 公分四分 PDA 平板培養基中，並以

表一、供試菌株分離自南投縣國姓鄉 (Guoshing, Nantou)、台中縣豐原市 (Fengyuan, Taichung) 及新竹縣新埔鎮 (Hsinpu, Hsinchu) 的草莓灰黴病罹病果實

Table 1. The list of *Botrytis cinerea* isolates obtained from infected fruits of strawberry in Guoshing, Nantou county, Fengyuan, Taichung county and Hsinpu, Hsinchu county

Host plant	Place	Number	Isolate	Time of collection
Strawberry	Guoshing, Nantou	110	GBS0-11~GBS0-16, GBS1-11~GBS1-14, GBS1-21~GBS1-24, GBS1-31~GBS1-34, GBS1-41~GBS1-44, GBS1-51~GBS1-54, GBS1-61~GBS1-64, GBS1-71~GBS1-74, GBS1-81~GBS1-84, GBS1-91~GBS1-94, GBS1-101~GBS1-104, GBS2-11~GBS2-14, GBS2-21~GBS2-24, GBS2-31~GBS2-34, GBS2-41~GBS2-44, GBS2-51~GBS2-54, GBS2-61~GBS2-64, GBS2-81~GBS2-84, GBS3-11~GBS3-14, GBS3-31~GBS3-34, GBS3-41~GBS3-44, GBS3-51~GBS3-54, GBS3-61~GBS3-64, GBS3-71~GBS3-74, GBS3-81~GBS3-84, GBS3-91, GBS3-92, GBS3-94, GBS3-101~GBS3-104, GBS3-22	2006/01/17 2006/04/06
	Fengyuan, Taichung	23	FBS0-1, FBS0-3, FBS0-4, FBS0-5, FBS0-C, FBS0-D, FBS1-1, FBS1-3, FBS1-4, FBS1-5, FBS1-6, FBS1-B, FBS2-4, FBS2-6, FBS2-A, FBS2-D, FBS2-E, FBS2-F, FBS3-3, FBS3-4, FBS3-6, FBS3-A, FBS5-2	2006/01/16
	Hsinpu, Hsinchu	19	SBS1-11~SBS1-14, SBS2-11~SBS2-14, SBS2-21~SBS2-24, SBS2-32~SBS2-34, SBS2-41~SBS2-44	2007/04/09
Total		152		

未添加農藥處理之 PDA 平板培養基作為對照組，於 20°C 定溫箱無光照培養，每處理四重複，經培養 3 天後記錄菌落直徑，並以半數有效抑制濃度 (Effective concentration for 50 % inhibition, EC_{50}) 作為菌株抗感性評估之依據。

QoI 類藥劑對草莓灰黴病菌孢子發芽之抑制測試

自 152 株灰黴病菌菌株中選取南投縣國姓鄉 6 菌株 (FBS0-5、FBS0-D、FBS1-6、FBS2-4、FBS2-6、FBS2-E) 與台中縣豐原市 5 菌株 (GBS0-15、GBS1-81、GBS3-11、GBS3-83、GBS3-91)，共計 11 株菌株，分別培養於 20°C 定溫箱 10 天後，照短波長藍光燈管 1 天以助菌株產孢，然後將孢子以無菌水洗下，以血球計數器調整孢子濃度至 10^4 conidia/ml，然後取 300 μ l 孢子懸浮液塗抹至含有上述三種 strobilurin 類殺菌劑有效濃度 1、10、100 及 500 μ g/ml 之 6 公分 2% WA 平板培養基中，於 20°C 中無光照靜置培養 20 小時後，以稀釋 2 倍之棉藍 (cotton blue)，飽和棉藍溶液添加 400 μ l/ml 甘油 進行染色並觀察孢子發芽情形，每

處理計數三個視野下之 100 顆孢子的發芽比率，並以不添加農藥之 WA 培養基作為對照組，並以 EC_{50} 作為 strobilurin 類殺菌劑對孢子發芽抗感性評估之依據。

單一罹病草莓果實所分離灰黴病菌的單孢菌株對 QoI 類藥劑之感受性差異

為了解單一罹病草莓果實內灰黴病菌的單孢菌株對 strobilurin 類藥劑之感受性的變化，分別挑選自南投縣國姓鄉單一罹病草莓果實所分離之 6 株灰黴菌單孢菌株 GBS0-11、GBS0-12、GBS0-13、GBS0-14、GBS0-15 及 GBS0-16；新竹縣新埔鎮單一罹病草莓果實所分離之 4 株灰黴菌單孢菌株 SBS2-41、SBS2-42、SBS2-43 及 SBS2-44；及台中縣豐原市兩個罹病草莓果實所分離之灰黴病菌各 6 株，分別為 FBS0-1、FBS0-3、FBS0-4、FBS0-5、FBS0-C、FBS0-D 和 FBS1-1、FBS1-3、FBS1-4、FBS1-5、FBS1-6、FBS1-B 等菌株，共計 22 株菌株，進行如上述三種 strobilurin 類殺菌劑四種有效濃度對灰黴病菌菌株生長的影響之試驗

方法，每處理四重複，並以 EC_{50} 作為菌株抗感性評估之依據。

灰黴病菌抗感性菌株 *Cytochrome b* 基因序列之分析

為了解粒線體中 *cytochrome b* (*cyt b*) 基因序列是否於第 129 及 143 處密碼子發生突變而導致供試菌株對 QoI 類藥劑產生不同程度之感受性，因此，挑選南投縣國姓鄉 3 株菌株 (GBS0-15, GBS1-24 及 GBS2-34)、台中縣豐原市 1 株菌株 (FBS3-3) 及新竹縣新埔鎮 1 株菌株 (SBS2-23) 等共計 5 株供試菌株進行基因體部份 *cyt b* 基因之增幅，各供試菌株對本實驗所使用 3 種 QoI 類藥劑之感受性如表六。將各菌株所萃取之總 DNA 溶液，利用可梯度聚合酵素連鎖反應器並以 10 μ M 引子對 Bccyt-F (5'-AGAGGTATGTACTATGGATC-3') 及 PWcyt-R (5'-AGGTATAGATCTTAATATAGC-3') 進行⁹⁾；反應溶液為 1 μ l 的總 DNA 溶液作為模板、2.5 μ l 10X PCR buffer minus $MgCl_2$ (Fermentas, USA; Invitrogen, Brazil)、2 μ l $MgCl_2$ (25 mM of Fermentas, USA; 50 mM of Invitrogen, Brazil)、2 μ l 2.5mM dNTP (Genemark, Taiwan)、引子 BccytF 及 PWcytR 各 0.3 μ l、0.25 μ l Tag DNA Polymerase (Fermentas, USA; Invitrogen, Brazil) 及 16.65 μ l 之 dH_2O ，總體積為 25 μ l。反應溫度條件為 95°C，2.5 min 一個循環；95°C，1 min、53°C，30 sec、72°C，1 min，共 35 個循環；72°C，8.5 min 一個循環完成反應。增幅出之片段以 1.5% (w/v) 之 TAE 瓊脂凝膠進行電泳分析，並送源資生物科技股份有限公司 (台中，台灣) 進行定序，然後將序列與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站中資料庫所登錄之序列進行比對，進一步

以 Biology WorkBench Version 3.2 Clustal W 進行基因與胺基酸序列相似度的比對。

結 果

QoI 類藥劑對草莓灰黴病菌菌絲生長之抑制測試將 152 株菌株之菌絲塊培養於含有克收欣、亞托敏及百克敏等 QoI 類殺菌劑之 1、10、100 和 500 μ g/ml 等有效濃度的四分 PDA 培養基平板 3 天後，計算抑制率並換算成 EC_{50} ，結果如表二顯示，克收欣對國姓、豐原及新埔之草莓灰黴菌菌絲生長的抑制效果皆不佳，於 500 μ g/ml 有效濃度下對菌絲生長抑制率有超過 50% 的菌株比例分別為 6.4、34.8 及 0%，而亞托敏抑制草莓灰黴病菌菌絲的生長效果亦不彰，於 500 μ g/ml 有效濃度下對菌絲生長抑制率有超過 50% 的菌株比例分別為國姓 3.6、豐原 47.8 及新埔 21.1%。至於百克敏對灰黴菌菌絲生長的抑制效果最佳，在有效濃度 100 μ g/ml 下，皆可有效抑制所有供試菌株菌絲生長。根據上述實驗結果，在所有供試菌株中，對克收欣及亞托敏屬低感受性，於 500 μ g/ml 有效濃度下菌株菌絲生長抑制率超過 50% 的菌株比例分別是 9.9 及 12.5%。

QoI 類藥劑對草莓灰黴病菌孢子發芽之抑制測試

測試 11 株灰黴菌孢子於添加 QoI 類三種藥劑 PDA 中的發芽例，結果得知孢子對藥劑的感受性隨著菌株而有所不同 (表三)。克收欣對 11 株供試菌株的孢子發芽抑制效果不佳，其 EC_{50} 濃度均大於 500 μ g/ml。亞托敏對孢子萌芽測試中，除 FBS0-D 與 GBS0-15 兩菌株孢子發芽對亞托敏較為敏感外， EC_{50} 濃度分別為

表二、比較不同地區所蒐集之草莓灰黴病菌菌株對 strobilurin 類殺菌劑克收欣 (kresoxim-methyl)、亞托敏 (azoxystrobin) 及百克敏 (pyraclostrobin) 的感受性

Table 2. Comparison of sensitivity among *Botrytis cinerea* isolates obtained from different strawberry fields to kresoxim-methyl, azoxystrobin, and pyraclostrobin

Fungicide	Collected place	Response to fungicide (%) ¹			
		1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml
Kresoxim-methyl	Guoshing	0.0	0.0	0.0	6.4
	Fengyuan	8.7	17.4	21.7	34.8
	Shinpu	0.0	0.0	0.0	0.0
Azoxystrobin	Guoshing	0.0	0.0	0.0	3.6
	Fengyuan	0.0	0.0	26.1	47.8
	Shinpu	0.0	0.0	5.3	21.1
Pyraclostrobin	Guoshing	0.9	23.9	100.0	100.0
	Fengyuan	47.4	82.6	100.0	100.0
	Shinpu	5.3	21.1	100.0	100.0

¹ The ratio of over 50% mycelial inhibition.

表三、草莓灰黴病菌菌絲生長與孢子發芽對 strobilurin 類殺菌劑克收欣 (kresoxim-methyl)、亞托敏 (azoxystrobin) 及百克敏 (pyraclostrobin) 之感受性

Table 3. Sensitivity of mycelial growth and spore germination of *Botrytis cinerea* isolates to three strobilurin fungicides

Location	Isolate	EC ₅₀ (μg/ml) ¹					
		Kresoxim-methyl		Azoxystrobin		Pyraclostrobin	
		mycelium	spore	mycelium	spore	mycelium	spore
Fengyuan	FBS0-D	56.11 ± 28.67	>500	71.12 ± 20.37	36.59 ± 22.16	1.55 ± 0.68	8.46 ± 1.68
	FBS0-5	2.06 ± 0.96	>500	465.91 ± 106.54	>500	4.82 ± 1.43	42.38 ± 3.94
	FBS1-6	>500	>500	>500	>500	23.56 ± 2.45	427.15 ± 101.42
	FBS2-4	28.20 ± 3.48	>500	131.44 ± 28.39	>500	< 1	30.84 ± 2.82
	FBS2-6	< 1	>500	67.28 ± 32.96	>500	< 1	27.68 ± 1.86
	FBS2-E	280.74 ± 74.42	-2	122.57 ± 45.67	>500	< 1	7.51 ± 2.11
Guoshing	GBS0-15	283.11 ± 165.0	-	477.07 ± 130.05	11.80 ± 1.55	4.39 ± 1.44	< 1
	GBS1-81	>500	>500	>500	>500	-	-
	GBS3-91	91.58 ± 41.25	>500	349.74 ± 115.02	>500	1.24 ± 0.19	31.52 ± 3.18
	GBS3-11	>500	>500	>500	>500	18.57 ± 2.21	392.34 ± 72.81
	GBS3-83	>500	>500	>500	>500	16.72 ± 1.96	364.23 ± 83.95

¹ EC₅₀: Effective concentration of the tested fungicide at which inhibition occurs at 50% mycelial growth of *B. cinerea*

² -: Non determination

36.59 ± 22.16 與 11.8 ± 1.55 μg/ml，其餘菌株之測試結果與克收欣相似。至於抑制菌絲生長效果最佳的百克敏，其對於孢子發芽的抑制效果仍較克收欣與亞托敏為佳。雖然比較菌絲生長的抑制情況，孢子對於百克敏的感受性有下降的趨勢，但在處理 500 μg/ml 的濃度下，藥劑對多數供試菌株孢子發芽的抑制率均達 100%。

單一罹病草莓組織所分離灰黴病菌的單孢菌株對 QoI 類藥劑之感受性差異

將自單一罹病草莓果實所分離到的不同灰黴菌單孢菌株對克收欣、亞托敏與百克敏等藥劑的感受性，結果如表四。南投縣國姓地區單一罹病草莓果實所分離到 6 株灰黴病菌菌株對克收欣感受性之 EC₅₀ 值分別介於 58.65 ± 15.57 與 283.11 ± 165.0 μg/ml，對百克敏感受性之 EC₅₀ 值則分別介於 4.39 ± 1.44 與 6.58 ± 1.82 μg/ml，而其中有 5 株菌株對亞托敏感受性之 EC₅₀ 值大於 500 μg/ml。在測試新竹縣新埔地區的 4 株灰黴病菌菌株中，顯示克收欣對 4 株供試菌株的 EC₅₀ 值均大於 500 μg/ml，亞托敏對 4 株菌株的 EC₅₀ 值則分別介於 151.58 ± 56.23 與 390.13 ± 199.58 μg/ml。反之，自台中縣豐原地區 2 個單一罹病草莓果實所分離的各 6 株菌株表現不同的抗感性，其中克收欣與亞托敏對 FBS1 系列菌株的 EC₅₀ 值均大於 500 μg/ml，而百克敏對此系列菌株的 EC₅₀ 值分別為介於 1.49 ± 1.28 與 75.12 ± 23.36 μg/ml 之間。在 FBS0 系菌間對 QoI 類藥反應中，得知克收欣對此系列菌株的 EC₅₀ 值中，除 FBS0-3 與 FBS0-C 大於 500 μg/ml 和 FBS0-1 小於 1 μg/ml 外，

其餘菌株分別為 2.06 ± 0.96、59.49 ± 23.28 與 97.75 ± 52.54 μg/ml。此外，亞托敏對 FBS1 系列菌株的 EC₅₀ 值均大於 500 μg/ml，而對 FBS0 系列菌的 EC₅₀ 值中，除 FBS0-C 大於 500 μg/ml 外，其餘菌株之 EC₅₀ 值則介於 72.41 ± 20.18 與 454.39 ± 103.13 μg/ml 之間¹，然百克敏對此系列菌株的 EC₅₀ 值介於 1.55 ± 0.68 與 6.25 ± 1.52 μg/ml。

灰黴病菌抗感性菌株 *Cytochrome b* 基因序列分析

利用引子對 Bccyt F 及 PWcytR 進行對 QoI 類藥劑不同抗感受性之 5 株灰黴菌菌株的部份 *cyt b* 基因增幅，結果顯示所增幅出的片段大小約為 540 bp，經解序後於 NCBI 資料庫進行比對，得知 5 株供試菌株的序列與 NCBI 資料庫中的 *Botryotinia fuckeliana* (AB262970、AB428335、AB 427166 與 AB262969) 之 *cyt b* 基因的相似性介於 79%~83%。進一步以 Biology WorkBench Version 3.2 之 Clustal W 進行菌株基因片段相似度的比較，得知供試菌株之部分 *cyt b* 基因序列相似度介於 81%~100%，而根據 *cyt b* 基因序列相似度大致可分成三群。第一群包含 GBS1-24 與 FBS3-3 兩菌株，序列完全相同，第二群為 SBS2-23 與 GBS2-34 兩菌株，序列相似度達 99%，而 GBS0-15 菌株的序列與其他菌株相似性只有 81%~84% (表五)。另將此三群菌株序列經進行比對後，得知三群間的相似度僅介於 81%~85%，顯示此片段 *cyt b* 基因於菌株間具有差異性，但與菌株的抗感性不具相關性。

利用 Biology WorkBench Version 3.2 之 Clustal W

表四、分離自國姓 (Guoshing)、豐原 (Fengyuan) 及新埔 (Hsinpu) 田間單一罹病草莓果實上菌株之單孢菌株對克收欣 (kresoxim-methyl)、亞托敏 (azoxystrobin) 及百克敏 (pyraclostrobin) EC₅₀ 的感受性

Table 4. EC₅₀ values for 22 single-conidium isolates of *Botrytis cinerea* from single infected strawberry fruit in Guoshing, Fengyuan and Hsinpu assayed for sensitivity to kresoxim-methyl, azoxystrobin and pyraclostrobin

Location	Isolate	EC ₅₀ (μg/ml) ¹		
		Kresoxim-methyl	Azoxystrobin	Pyraclostrobin
Guoshing	GBS0-11	126.95 ± 82.43	>500	6.58 ± 1.82
	GBS0-12	223.78 ± 125.29	>500	4.70 ± 1.39
	GBS0-13	204.38 ± 90.29	>500	4.49 ± 1.20
	GBS0-14	58.65 ± 15.57	>500	5.03 ± 0.90
	GBS0-15	283.11 ± 165.00	477.07 ± 130.05	4.39 ± 1.44
	GBS0-16	237.13 ± 153.16	>500	6.13 ± 1.51
Fengyuan	FBS0-1	< 1	435.44 ± 238.18	5.13 ± 1.23
	FBS0-3	> 500	163.12 ± 33.30	3.89 ± 1.76
	FBS0-4	59.49 ± 23.28	454.39 ± 103.13	4.98 ± 1.38
	FBS0-5	2.06 ± 0.96	465.91 ± 106.54	4.82 ± 1.43
	FBS0-C	> 500	>500	6.25 ± 1.52
	FBS0-D	56.11 ± 28.67	71.12 ± 20.37	1.55 ± 0.68
	FBS1-1	> 500	>500	55.62 ± 19.56
	FBS1-3	> 500	>500	68.25 ± 21.82
	FBS1-4	> 500	>500	7.15 ± 2.11
	FBS1-5	> 500	>500	75.12 ± 23.36
	FBS1-6	> 500	>500	23.56 ± 2.45
FBS1-B	> 500	>500	1.49 ± 1.28	
Hsinpu	SBS2-41	> 500	151.58 ± 56.23	< 1
	SBS2-42	> 500	390.13 ± 199.58	2.58 ± 1.12
	SBS2-43	> 500	361.04 ± 132.68	2.23 ± 1.05
	SBS2-44	> 500	235.23 ± 154.30	1.79 ± 0.59

¹ EC₅₀: Effective concentration of the tested fungicide at which inhibition occurs at 50% mycelial growth of *B. cinerea*

表五、不同供試灰黴病抗感性菌株之部分 *cyt b* 基因相似性(%)

Table 5. Similarity (%) of partial *cyt b* gene of five *Botrytis cinerea* isolates compared by Clustal W program in Workbench 3.2

Isolate	GBS0-15	GBS1-24	GBS2-34	FBS1-3	SBS2-23
GBS0-15	-	-	-	-	-
GBS1-24	81	-	-	-	-
GBS2-34	85	82	-	-	-
FBS3-3	81	100	82	-	-
SBS2-23	84	81	99	81	-

分析，結果顯示供試菌株於 *cyt b* 基因第 129 及 143 處密碼子均未發生點突變。此 5 株供試菌株的 *cyt b* 基因於第 129 處密碼子均為 TTC，而第 143 處密碼子序列 GGA 與 GGT 對應相同的胺基酸 glycine (表六)。此外，將序列於 Biology WorkBench Version 3.2 轉譯成胺基酸後以 Clustal W 進行比對，結果得知 5 株供試菌株於其他可能造成抗藥性的突變區域並未發現如 G137R/E/V/S、I147F、A153S、S255Q 與 L275S/T⁽⁷⁾ 等密碼子點突變的現象 (圖一)。此外，根據排序結果亦

得知供試菌株 GBS1-24 與 FBS3-3 則於 *cyt b* 基因 127 密碼子處發生 T127I 突變，然而此點突變對 QoI 類藥劑產生抗藥性之反應並無直接相關性。

討 論

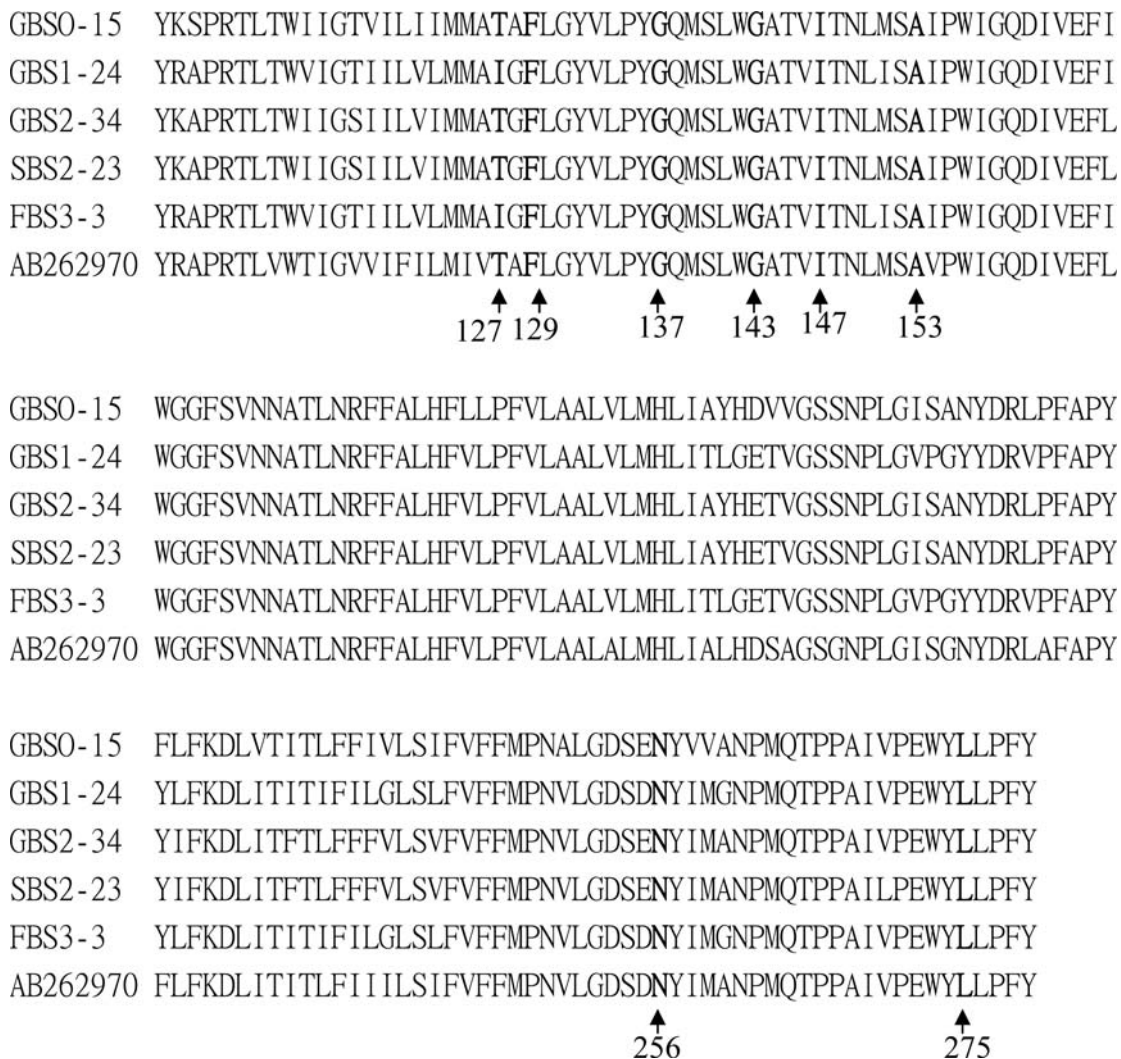
本研究檢測草莓灰黴病菌菌株對 QoI 類殺菌劑的感受性，雖然此類藥劑在台灣並未推薦用於防治草莓灰黴病，但測試結果指出台灣草莓灰黴病菌菌株對於

表六、對克收欣 (kresoxim-methyl, Km)、亞托敏 (azoxystrobin, Az) 及百克敏 (pyraclostrobin, Py) 表現不同抗感性之 *Botrytis cinerea* 菌株於 *cyt b* 基因上第 129 與 143 密碼子處之突變情形。

Table 6. Mutation and deduced amino acid substitutions in the partial sequence of the *cyt b* gene in isolates of *Botrytis cinerea* with different responses to kresoxim-methyl (Km), azoxystrobin (Az) and pyraclostrobin (Py)

Isolate	Host	Place	EC ₅₀ (μg/ml) ¹			Sequence in codon (amino acid)	
			Km	Az	Py	129	143
GBS0-15	strawberry	Guoshing	283.11 ± 165.00	477.07 ± 130.05	4.39 ± 1.44	TTC (Phe)	GGA (Gly)
GBS1-24	strawberry	Guoshing	> 500	> 500	38.53 ± 7.31	TTC (Phe)	GGT (Gly)
GBS2-34	strawberry	Guoshing	> 500	> 500	40.84 ± 8.80	TTC (Phe)	GGT (Gly)
FBS3-3	strawberry	Fengyuan	2.01 ± 1.17	83.17 ± 51.96	< 1	TTC (Phe)	GGT (Gly)
SBS2-23	strawberry	Hsinpu	> 500	> 500	15.03 ± 1.90	TTC (Phe)	GGT (Gly)

¹ EC₅₀: Effective concentration of the tested fungicide at which inhibition occurs at 50% mycelial growth of *B. cinerea*



圖一、5 株灰黴病菌株之部份 cytochrome *b* 基因的胺基酸序列與 NCBI 資料庫之 *Botrytis fuckeliana* 序列 (AB 262970) 比對結果。SBS2-23、SBS2-34、GBS1-24 及 GBS0-15 為抗性菌株，FBS3-3 為感性菌株。箭頭所指為前人研究中報告與抗 QoI 類藥劑相關之密碼子。

Fig. 1. The amino acids sequences variation in partial cytochrome *b* gene among seven *Botrytis cinerea* isolates. GenBank accession number AB 262970 is *B. fuckeliana* sequences in NCBI. Isolates of SBS2-23, SBS2-34, GBS1-24 and GBS0-15 were resistant to strobilurins, and FBS3-3 was sensitive to strobilurins. The arrows of 129 and 143 were reported that mainly corresponded with resistance to strobilurins, and others showed minor relationship with resistance of QoIs.

克收欣及亞托敏的感受性偏低，在藥劑有效濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ 的處理下，則只分別對 9.9% 與 12.5% 之供試菌株菌絲生長抑制率達 50% 以上，顯示部份 QoI 類殺菌劑對抑制台灣草莓灰黴病菌株菌絲生長效果不佳。在日本，亦有報告指出自罹病柑橘與草莓組織所分離之 *B. cinerea* 對克收欣與亞托敏有抗藥性產生^(5, 18)，顯示 *B. cinerea* 菌株對克收欣與亞托敏屬於抗藥性產生高風險的真菌，而本研究結果(表二)與 Ishii 氏等人⁽⁵⁾的結果相似。調查中亦發現，不同地區所蒐集分離之草莓灰黴病菌對克收欣、亞托敏及百克敏等 3 種 QoI 類藥劑的反應表現不同的感受性，尤其特別自豐原地區所蒐集的菌株，對克收欣的反應差異明顯表現於各菌株之間，由於台灣已登記使用克收欣防治草莓白粉病，推測草莓栽培業者在防治白粉病的同時亦可能針對灰黴病進行防治，進而導致草莓灰黴病菌對克收欣產生抗性。此外，*B. cinerea* 為害作物種類範圍廣泛，對克收欣或亞托敏具抗性之菌株亦可能來自鄰近果園或不同作物。本研究中所測試之另一種 QoI 類藥劑百克敏，於有效濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ 下對草莓灰黴病菌菌絲生長與孢子發芽具有良好的抑菌效果，推測可能原因為百克敏於台灣仍不十分普遍，一般作物栽培者並未經常使用，因而導致台灣草莓灰黴病菌株對百克敏仍較為敏感。

在 QoI 類殺菌劑對灰黴病菌菌絲生長和孢子發芽的試驗中，顯示此類藥劑抑制菌株菌絲生長較孢子發芽明顯。根據 Bartlett 氏(2002)指出 QoI 類殺菌劑的殺菌作用為抑制粒腺體電子傳遞的進行，因而降低了 ATP 之生合成，故對孢子發芽及菌絲生長應具有抑制效用⁽¹⁾。雖然前人研究指出，QoI 類殺菌劑對 *Cercospora beticola* Sacc. 與 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 等植物病原真菌的孢子發芽抑制情形較菌絲生長明顯^(12, 22)，但亦有研究指出利用菌絲生長方式亦可作為菌株對 QoI 類殺菌劑感受性的檢測方法⁽²⁰⁾。針對本研究中比較菌絲和孢子對藥劑感受性的差異，得知 QoI 類藥劑對 11 株供試菌株的菌絲生長抑制情形較抑制孢子發芽明顯。但由於本研究中用於孢子萌芽測試的菌株數較少，因此為確定 QoI 對菌絲生長影響是否較孢子為大，未來需要以更多的菌株進行測試。

為了解田間抗感性草莓灰黴病菌株於罹病組織上之族群分佈，測試自單一罹病草莓果實上所分離之灰黴菌單孢菌株，結果得知自國姓與新埔地區單一罹病草莓果實所分離之灰黴菌單孢菌株間對 QoI 類藥劑反應較均一，然豐原地區單一罹病草莓果實上之灰黴菌菌株對 QoI 類藥劑抗感反應則較為複雜(表四)。Brentc 和 Hollomon (2007) 兩氏⁽²⁾指出田間抗藥性菌株

產生可能原因之一，即田間可能同時存在抗性與感性菌株，當長期施用同一類型藥劑時能影響此兩種菌系族群的消長。本研究結果證實了同一罹病草莓果實上能同時存在抗性與感性菌株，雖然三個地區所呈現的結果不同，推測可能與三個地區草莓栽培業者施用克收欣或亞托敏之頻繁程度有關，即國姓與新埔地區草莓栽培業者施用克收欣或亞托敏等藥劑的次數或頻率可能較豐原地區草莓栽培業者高。此外，QoI 類殺菌劑對植物病原真菌具有廣泛性的殺菌作用，目前台灣推薦施用在多種植物真菌病害的防治管理上，如十字花科露菌病 (*Peronospora brassicae* Gäum.)、瓜類露菌病 (*Pseudoperonospora cubensis*)、瓜類白粉病 (*Sphaerotheca fuliginea* (Schltld.) Pollacci)、瓜類蔓枯病 (*Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm)、晚疫病 (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) 及炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 等⁽³⁾，因此在開放的自然環境中，草莓受到藥物污染也可能是造成抗藥性的因素之一。未來仍須持續追蹤此三地區草莓灰黴病菌對 QoI 類藥劑之抗感性變化，並了解當地作物施藥的情形。

本研究分析粒線體中 *cytochrome b* (*cyt b*) 基因，結果顯示不同抗感性菌株於 *cyt b* 基因中第 129 與 143 處密碼子並未發生點突變現象(圖一)，與前人研究所報告抗 QoI 類藥劑菌株常於第 129 與 143 密碼子處發生點突變的現象^(4, 8, 10, 12, 14, 25)並不相符，證實台灣抗 QoI 類藥劑之草莓灰黴病菌株產生抗藥性機制，並非由 *cyt b* 基因所主導。本研究分析對 QoI 類藥表現不同感受性灰黴病菌株之 *cyt b* 基因時，卻未觀察到與抗 QoI 類殺菌劑產生相關密碼子的突變，雖然抗性菌株 GBS1-24 與 FBS3-3 於第 127 密碼子處出現 T127I 之突變現象，但在其他抗性菌株如 GBS2-34 與 SBS2-23 則均無突變產生，顯示第 127 處密碼子與抗藥性產生並不相關。Zheng 與 Köller 兩氏(1997)指出 QoI 類殺菌劑的天然生產者 *S. tenacellus* 與 *M. Galopoda* 和天生具有抗藥性之 *M. viridimarginata* 均於 *cyt b* 基因之第 127 密碼子處有變異現象，但卻發現 *M. viridimarginata* 對 QoI 類殺菌劑之感受性較前兩者高，經進一步研究得知 *S. tenacellus* 與 *M. galopoda* 除了在第 127 密碼子處發生突變外，亦於第 143 與 255 密碼子處發生變異，故 Zheng 與 Köller 兩氏認為由於第 127 密碼子鄰近第 129 密碼子，因此可能導致 *M. viridimarginata* 具有中等程度的抗性⁽²⁷⁾。實驗中雖得知個別菌株間 *cyt b* 基因序列差異性很高，可分成三群，但此三群菌株間的分子特徵對藥劑感受性並無直接關係，此結果與 Ishii 氏等人所發表結果相似⁽¹⁰⁾。此外目前所分析的草莓灰黴菌

株數過少，無法完全說明其分子多樣性是否與地域性有關，未來須分析更多菌株以釐清草莓灰黴菌 *cyt b* 基因在分子演化中的重要性。

根據 2005 年 Ma 氏等人的報告中指出，抗藥性的產生可能由多重因素所造成，包括藥劑作用點的改變或大量產生作用目標、利用新陳代謝反應使藥劑降解、以替代路徑避開藥劑作用及減少細胞內藥劑的累積等⁽¹⁷⁾。其中以藥劑作用目標的改變最為單純，而其他的機制則牽涉多種生理生化反應。然根據實驗結果指出，台灣草莓灰黴病菌株對於 QoI 類藥劑的抗藥性反應，並非由 *cyt b* 基因的突變所造成，而此結果與前人研究^(4, 9, 11, 13, 15, 25) 認為 *cyt b* 基因發生突變可導致抗藥性產生不合。利用替代路徑 alternative oxidase pathway 避開 QoI 類藥劑的作用點，已被多位研究學者證實可增加真菌抗 QoI 類藥劑之能力^(21, 26, 28)。此外，以 ABC (ATP-binding cassette) transporter 行主動運輸減少藥劑於細胞內的累積，亦被證實可對多種藥劑產生抗性⁽²⁴⁾。根據上述前人研究推測 alternative oxidase pathway 與 ABC transporter，可能為引起台灣草莓灰黴病菌對 QoI 類藥劑產生抗性的主要因子，未來有必要釐清影響台灣草莓灰黴病菌抗藥性產生的機制，並探討 alternative oxidase pathway 與 ABC transporter 於抗 QoI 類藥劑機制所扮演的角色。本研究已針對抗 QoI 類藥劑草莓灰黴病菌產生抗藥性的現象進行了初步探討，祈未來能對抗藥性產生的機制作更深入的了解，進而擬定減少田間抗藥性發生的策略，並達到降低田間藥劑使用量的目的。

謝 辭

本研究感謝國立中興大學昆蟲學系齊心教授提供 Probit-MSChart 軟體分析 EC₅₀ 值，並承行政院國家科學委員會 NSC 95-2313-B-005-020 暨教育部邁向頂尖大學計畫補助，特以致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B. 2002. Review: The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58: 649-662.
- Brent, J. K., and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Published by Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium. 56pp.
- Fei, W. C., and Wang, Y. M. 2004. Plant protection manual. Taiwan Agriculture Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Press. 835pp.
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., de Vicente, A., and Pérez-García, A. 2008. Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Pest Manag. Sci.* 64: 694-702.
- Fontaine, J. M., Ishii, H., Uchida, K., Inada, M., Tanahashi, M., Takeda, T., Ozeki, F., and Nakayama, K. 2006. Development of QoI resistant alleles in populations of strawberry powdery mildew. *Abstr 11th 9 IUPAC Intr. Cong. Pestic. Chem.*: 131.
- Fungicide Resistance Action Committee. 2008. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. Published by the Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium. 60pp.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58: 859-867.
- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., and Gisi, U. 2006. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 62: 465-472.
- Inada, M., Ishii, H., Chung, W. H., Yamada, T., Yamaguchi, J., and Furuta, A. 2008. Occurrence of strobilurin-resistant strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), the causal fungus of strawberry anthracnose. *Jpn. J. Phytopathol.* 74: 114-117.
- Ishii, H., Fontaine, 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.* 66: (in press)
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., and Hollomon, D. W. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166-1171.
- Karadimos, D. A., Karaoglanidis, G. S., and Tzavella-Klonari, K. 2005. Biological activity and physical modes of action of the Qo inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*. *Crop Protect.* 24: 23-29.
- 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.
- Kraiczky, P., Haase, U., Gencic, S., Flindt, S., Anke, T.,

- Brandt, U., and Jagow, G. V. 1996. The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome *bcl* complex from strobilurin-producing Basidiomycetes to center Q_p inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 235: 54-63.
15. Kuch, K. H. 2007. QoI fungicides: resistance mechanisms and its practical importance. Pages 275-283 in: *Pesticide Chemistry-Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*. H. Ohkawa, H. Miyagawa, and P. W. Lee eds. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
16. List of Plant Diseases in Taiwan. 2002. 4th ed, Published by Taiwan Phytopathological Society, 286pp.
17. Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protect.* 24: 853-863.
18. Markoglou, A. N, Malandrakis, A. A, Vitoratos, A. G., and Ziogas, B. N. 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 149-162.
19. Mertely, J. C., MacKenzie, S. J., and Legard, D. E. 2002. Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. *Plant Dis.* 86: 1019-1024.
20. Meyer, M. C., Buenob, C. J., Souza, N. L., and Yorinori, J. T. 2006. Effect of doses of fungicides and plant resistance activators on the control of *Rhizoctonia foliar* blight of soybean, and on *Rhizoctonia solani* AG1-IA in vitro development. *Crop Protect.* 25: 848-854.
21. Olaya, G., and Köller, W. 1999. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baselin populations of *Venturia inaequalis*. *Pestic. Sci.* 55: 1083-1088.
22. Reuveni, M., and Sheglov, D. 2002. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Protect.* 21: 951-955.
23. Sauter, H., Steglich, W., and Anke, T. 1999. Strobilurine: Evolution einer neuen wirkstoffklasse. *Angewandte Chemie.* 111: 1416-1438.
24. Schoonbeek, H. 2004. ABC transporters from *Botrytis cinerea* in biotic and abiotic interactions. Wageningen University (Netherlands). pp.
25. Sierotzki, H., Wullschleger, J., and Gisi, U. 2000. Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68: 107-108.
26. Tamura, H., Mizutani, A., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, K., and Masuko, M. 1999. Effect of the methoxyiminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity of *Botrytis cinerea*. *Pestic. Sci.* 55: 681-686.
27. Zheng, D., and Köller, K. 1997. Characterization of the mitochondrial cytochrome *b* gene from *Venturia inaequalis*. *Cur. Genet.* 32: 361-366.
28. Ziogas, B. N., Baldwin, B. C., and Young, J. E. 1997. Alternative Respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pestic. Sci.* 50: 28-34.

ABSTRACT

Chen, L. S.¹, Chung, W. C.², and Chung, W. H.^{1,3} 2009. Sensitivity of *Botrytis cinerea* of strawberry to Strobilurins (QoIs) in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 18: 89-99. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, 250, Kuo Kuang Rd., Taichung 402, Taiwan; ² Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, Hsinhsueh, Taichung 426, Taiwan; ³ Corresponding author, E-mail: wenchung@nchu.edu.tw ; Tel: +886-2284-0480 ext 356 ; Fax: +886-2285-4292)

Gray mold of strawberry, caused by *Botrytis cinerea*, is one of most important diseases in field and postharvest. Quinone outside inhibitors (QoIs), broad-spectrum fungicide, is an inhibitor of mitochondrial respiration to decrease ATP production. However, QoIs do not register for controlling gray mold in strawberry in Taiwan. Three QoIs fungicides including kresoxim-methyl, azoxystrobin and pyraclostrobin were tested for their efficacy on inhibition of mycelial growth of 152 *Botrytis cinerea* isolates. Among fungicides tested, 100 pyraclostrobin $\mu\text{g/ml}$ inhibited the mycelial growth of all tested isolates; whereas kresoxim-methyl and azoxystrobin only inhibited 9.9% and 12.5% isolates which 50% of mycelial growth was inhibited even the concentration are more than 500 $\mu\text{g/ml}$. Thus, the QoI resistant isolates might exist in field. Analysis of cytochrome *b* (*cyt b*) gene revealed that 5 QoI less sensitive and sensitive isolates did not show mutation at codon 129 or 142 in *cyt b* gene. Consequently, the codon 129 or 143 in *cyt b* gene might not the major resistant mechanism to QoIs in *B. cinerea* of strawberry in Taiwan.

Key words : gray mold, Strobilurins (QoIs) 、 EC_{50} 、*cyt b* gene