

利用 PCR-RFLP 調查臺南地區抗苯並咪唑類 (benzimidazoles) 殺菌劑芒果炭疽病菌的發生

羅佩昕¹ 黃盈潔¹ 鍾文全² 鄭安秀³ 鍾文鑫^{1,4}

¹ 臺中市 國立中興大學植物病理學系

² 臺中市 行政院農業委員會種苗改良繁殖場

³ 臺南市 行政院農業委員會臺南區農業改良場

⁴ 聯絡作者，電子郵件：wenchung@nchu.edu.tw

接受日期：中華民國 100 年 6 月 3 日

摘要

羅佩昕、黃盈潔、鍾文全、鄭安秀、鍾文鑫. 2010. 利用 PCR-RFLP 調查臺南地區抗苯並咪唑類 (benzimidazoles) 殺菌劑芒果炭疽病菌的發生. 植病會刊 19: 255-260.

利用顯微鏡和炭疽病菌專一性引子對 CgInt/ITS4 與 CaInt2/ITS4 進行 2006-2010 年間蒐集臺南地區芒果炭疽病菌菌株之鑑定，結果顯示 192 株菌株均屬於 *Colletotrichum gloeosporioides*。以專一性抗 benzimidazole 類殺菌劑之炭疽病菌的 PCR-RFLP 技術，評估炭疽病菌 192 菌株對 benzimidazole 類殺菌劑的抗感性反應，得知 192 菌株中有 158 菌株具有抗 benzimidazole 類殺菌劑。進一步以培養基法測試 158 株炭疽病菌株對 benzimidazole 類殺菌劑的免賴得、腐絕及貝芬替之感受性，得知所有菌株對三種殺菌劑的 EC₅₀ 值，分別為免賴得殺菌劑 128-467 mg a.i./l、貝芬替殺菌劑 111-415 mg a.i./l 及腐絕殺菌劑 146-433 mg a.i./l。綜合上述結果證實，臺南地區芒果炭疽病菌株屬抗 benzimidazole 類殺菌劑高風險族群。

關鍵詞：芒果炭疽病菌、芒果炭疽病、苯並咪唑抗藥性、聚合酶連鎖反應-限制性片段長度多態性法

芒果 (*Mangifera indica* L., Mango) 俗稱檬仔，為漆樹科芒果屬之多年生常綠喬木，適宜生長之月均溫為 25°C 以上，根據農委會 2010 年資料，目前臺灣芒果栽培總面積約 17,130 公頃，主要集中於臺南 (7,671 公頃)、屏東 (6,505 公頃)、高雄 (1,835 公頃) 等中南部產地，果實年產量約 140,290 噸 (Agriculture and Food Agency, COA)。常見的栽培品種有在來種 (土芒果)、愛文、金煌及凱特等，而以愛文與金煌為主要外銷品種，然由炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、蒂腐病菌 (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) 及黑斑病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) 等病原微生物所引起之病害，嚴重影響果實的產量與商品價值，其中以炭疽病 (Anthracnose) 影響最為嚴重⁽²⁾。

目前已知臺灣芒果炭疽病的病原有兩種，即 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. 與 *C. acutatum* Simmonds，而以 *C. gloeosporioides* 為優勢菌

種⁽¹⁷⁾。早年由於炭疽病的嚴重危害，臺灣芒果於生產季中噴藥次數常高達 10 至 12 次之多，使得生產成本難以降低，因而喪失外銷競爭力⁽¹⁸⁾。近年來進口國家亦相當重視藥劑殘留的問題，因此農政單位不斷積極推行各種防治方法，以降低用藥次數及藥劑量⁽⁴⁾。根據行政院農業委員會藥物毒物試驗所編輯之植保手冊，推薦用於防治芒果炭疽病的藥劑種類包含氨基甲酸鹽類 (carbamates)、麥角固醇合成抑制劑 (ergosterol biosynthesis inhibitors)、蛋白質抑制劑 (protein biosynthesis inhibitors)、放線菌素 (actinomycine)、苯並咪唑類 (benzimidazoles) 及史托比類 (strobilurins) 等殺菌劑，其中以鋅錳乃浦、苯並咪唑與史托比類的殺菌劑施用最為普遍，但大部分多為混合性藥劑⁽⁷⁾。

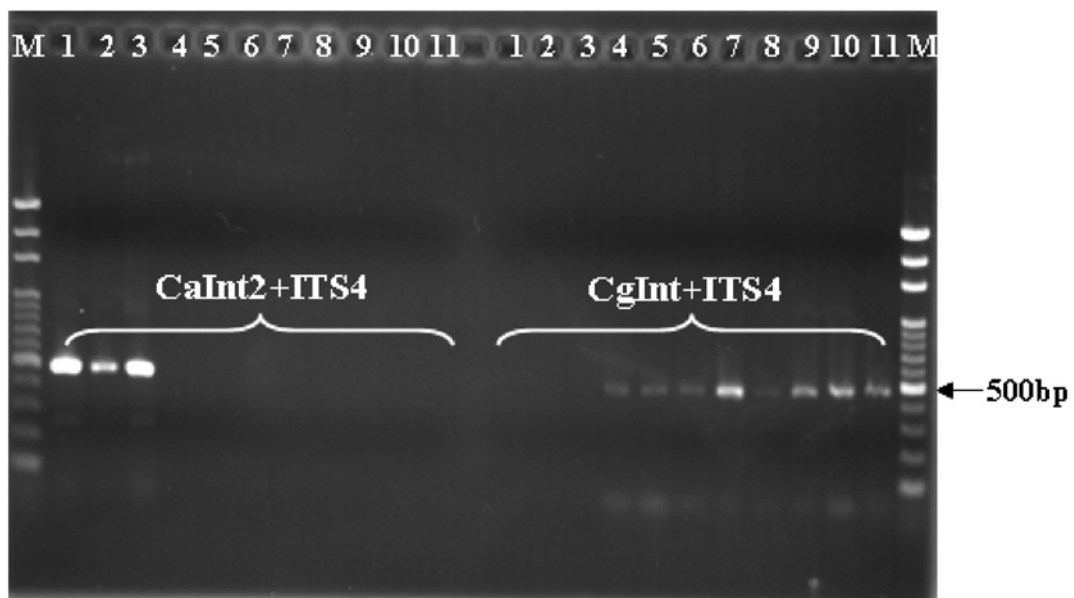
目前國內外田間常推薦施用 benzimidazole 類殺菌劑防治炭疽病，主要以免賴得 (benomyl)、腐絕 (thiabendazole)、貝芬替 (carbendazim) 及甲基多保淨

(thiophanate-methyl) 等為主，然在逐年大量的濫用下已出現防治效果不佳的情形^(6, 8, 9)。在臺灣，Pei 氏⁽¹⁴⁾曾報告果樹炭疽病菌對免賴得可濕性粉劑已產生抗藥性；而 Tsai 氏等人⁽¹⁶⁾亦報告 benzimidazole 類藥劑中的腐絕與貝芬替在抑制芒果與文旦炭疽病菌之孢子發芽與菌絲生長效果不彰。針對抗 benzimidazole 類藥劑產生機制，目前有許多報告指出是由於 β -tubulin 基因上單個核苷酸發生突變 (single point mutation) 所造成，最常發生的突變點為密碼子 50⁽¹²⁾、198、200^(1, 10, 19) 及 240⁽¹⁾。其中以 198 (GAG→GCG) 或 200 (TTC→TAC) 密碼子發生點突變時，可分別導致病原真菌產生高度抗藥性或中度抗藥性，因而被認為是產生抗藥性最主要的地方^(1, 10, 19)。本研究目的主要是利用 Chung 氏等人⁽⁵⁾所發展出 PCR-RFLP 技術評估臺南地區抗 benzimidazole 類藥劑芒果 *C. gloeosporioides* 菌株的發生情形。

本研究於 2006~2010 年間自臺南左鎮 (Zuojhen)、大內 (Danei)、山上 (Shanshang)、玉井 (Yujing)、官田 (Guantian)、南化 (Nanhua) 及楠西 (Nansi) 等 7 個地區的芒果罹病葉片組織分離到 192 株菌株，以光學顯微鏡觀察形態，並以專一性引子 CgInt (5'-GGGCTCCCGCCTCCGGCGG-3')⁽¹³⁾ 與 CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3')⁽¹⁵⁾ 配合 ITS4 引子 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 進行 PCR 方式增幅，得知 192 株菌株皆屬 *C. gloeosporioides*，部份測試

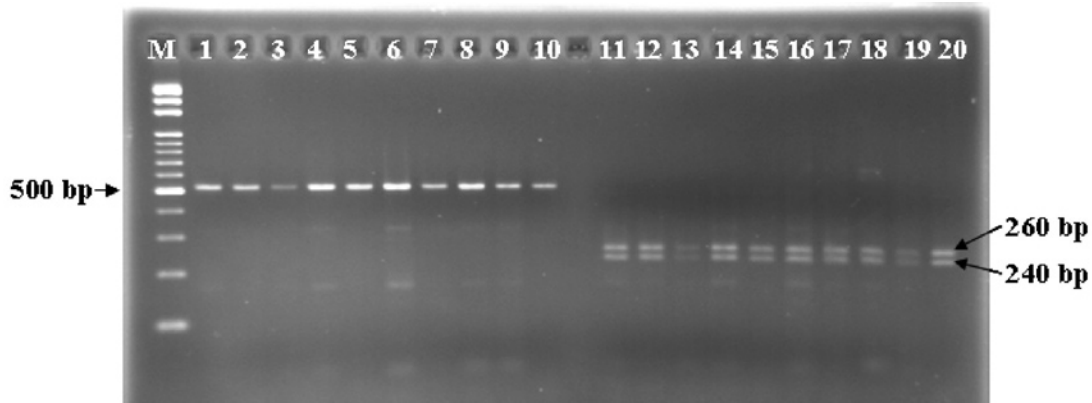
結果如圖一。此結果證實臺灣田間引起芒果炭疽病的主要病原為 *C. gloeosporioides*，與 Weng 和 Chuang⁽¹⁷⁾ 的研究相似。

為了解臺南地區芒果炭疽病菌是否已具有抗 benzimidazole 類殺菌劑的情形發生，本研究利用先前已發表可鑑定抗 benzimidazole 類殺菌劑之 PCR-RFLP 技術⁽⁵⁾ 進行評估，即將 192 株 *C. gloeosporioides* 菌株 DNA 萃取，然後先以 TubGF1 (5'-TCTCGATGTTATCCGCCG-3') 與 TubGR (5'-TGAGCTCAGGAACACTGACG-3') 引子進行 PCR 方式增幅 β -tubulin 基因片段。之後將所增幅得到 PCR 產物 (約 500 bp) 各取 10 μ l，分別添加 10x buffer R in BSA (Fermentas, Europe) 2 μ l，並加入可辨識 CGCG 切位的限制酵素 *Bsh* 1236I (*FunDII*) (Fermentas, Europe) 1 μ l，再溶於 20 μ l dH₂O，經 37°C 乾浴 8 小時後，以 3% agarose gels 於 0.5 X TAE buffer (Tris-acetate, EDTA) 分析。經 PCR-RFLP 分析結果顯示，所蒐集的 192 株炭疽病菌皆可被 TubGF1 與 TubGR 引子對增幅出約 500 bp 大小的 DNA 條帶，其中有 158 株的 500 bp 大小產物，經 *Bsh* 1236I 酵素作用後可分別產生 240 bp 與 260 bp 兩條帶，屬於抗 benzimidazole 類殺菌劑的菌株，分別為左鎮 7 株菌株、大內 17 株菌株、山上 6 株菌株、玉井 58 株菌株、官田 24 株菌株、南化 38 株菌株及楠西 8 株菌株 (表一)，部份電泳分析結果如圖二。



圖一、利用專一性引子 CaInt2/ITS4 與 CgInt/ITS4 鑑定自台南地區所分離到芒果炭疽病菌 *Colletotrichum* 屬之種類。M 為 100 bp DNA maker；CaInt2/ITS4 引子所增幅的結果，電泳圖 1~3 為 *C. acutatum* 菌株 (左邊)；CgInt/ITS4 引子所增幅的結果，電泳圖 4~11 為 *C. gloeosporioides* 菌株 (右邊)。

Fig. 1. PCR results using specific primers of CaInt2/ITS4 and CgInt/ITS4 to amplify the *Colletotrichum* isolates collected from mango diseased tissues in Tainan area. Lane M, 100 bp DNA marker; Species-specific primers CaInt2/ITS4 for *C. acutatum*, lanes 1~3 (left); Species-specific primers CgInt/ITS4 for *C. gloeosporioides*, lanes 4~11 (right).



圖二、利用 PCR-RFLP 檢測自田間所分離芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 菌株對 benzimidazole 類殺菌劑抗感性反應。

Fig. 2. PCR results using PCR-RFLP to detect sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates collected from mango field to benzimidazole. Lanes 1-10 present benzimidazole-sensitive isolates. Lanes 11-20 present benzimidazole-resistant isolates.

表一、以 PCR-RFLP 評估 2006 至 2010 年間臺南地區芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 菌株對 benzimidazole 類殺菌劑的抗感性反應

Table 1. Response of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from Tainan area to benzimidazole as assessed by PCR-RFLP during 2006 to 2010

Collected place	Year isolated	Total of isolates	No. of isolates tested by PCR-RFLP ¹	
			Ben ^R	Ben ^S
Yujing	2006-2010	71	58	13
Guantian	2006-2009	32	24	8
Tzuojen	2008-2010	7	7	0
Danei	2008-2010	21	17	4
Shanshang	2008-2010	6	6	0
Nanhua	2008-2010	46	38	8
Nanshi	2010	9	8	1
Total		192	158	34

¹ Ben^R and Ben^S present benzimidazole-resistant and benzimidazole-sensitive, respectively.

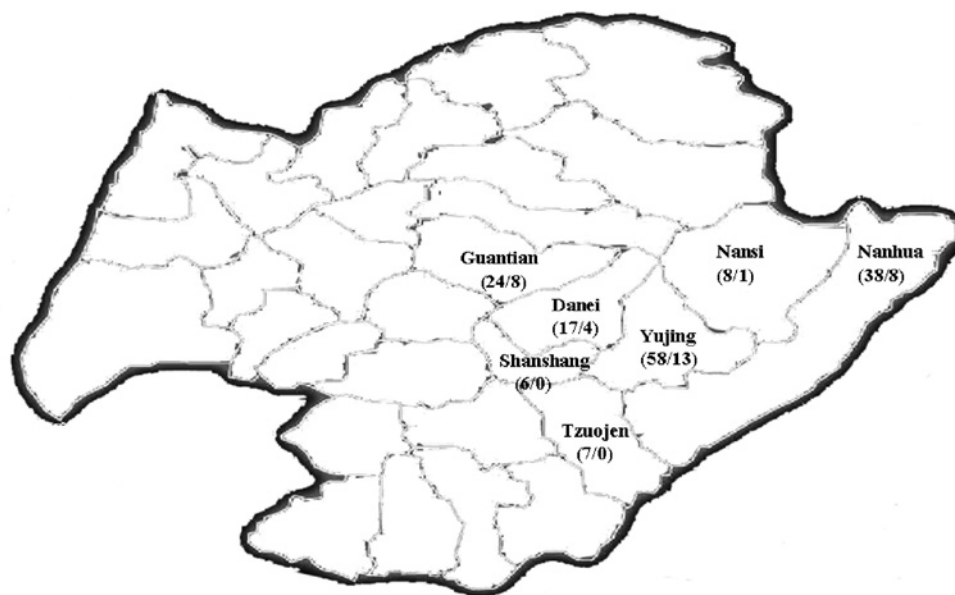
表二、158 株芒果炭疽病菌菌株對 benzimidazole 類殺菌藥的免賴得 (benomyl)、貝芬替 (carbendazim) 及腐絕 (thiabendazole) 之 EC₅₀ 值 (mg a.i./l)

Table 2. EC₅₀ value of 158 benzimidazole-resistant isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from mango for benomyl, carbendazim and thiabendazole fungicides

Collected place	Ben ^R isolate ¹	EC ₅₀ range (mg a.i./l) ²		
		Benomyl	Carbendazim	Thiabendazole
Yujing	58	201-467	128-415	200-433
Guantian	24	224-433	155-387	209-404
Tzuojen	7	186-340	114-255	201-305
Danei	17	223-360	136-301	188-333
Shanshang	6	203-386	199-299	196-379
Nanhua	38	249-403	186-383	209-419
Nanshi	8	128-251	111-266	146-272

¹ Ben^R presents benzimidazole-resistant.

² Concentration of fungicide caused 50% inhibition of growth of isolates.



圖三、以 PCR-RFLP 技術檢測自 2006-2010 年台南地區抗 benzimidazole 類殺菌劑芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 菌株之分佈。括號內左邊數據為抗藥性菌株，右邊數據為感受性菌株。

Fig. 3. Tainan area where samples of mango leaves infected with *Colletotrichum gloeosporioides* were collected for sensitivity assays to benzimidazole fungicide by PCR-RFLP during 2006-2010. Numbers in bracket indicate resistant isolates (left) and sensitive isolates (right), respectively.

進一步將上述 158 株菌株菌絲塊 (直徑 0.3 cm) 分別培養在含有 0、1、10、100 及 500 mg a.i./l 之 50% 免賴得可濕性粉劑、41.8% 腐絕水懸劑及 50% 貝芬替可濕性粉劑的 PDA 培養基平板上，於 25°C 不照光培養 5 天後，計算 158 株菌株對 3 種 benzimidazole 類殺菌劑之 EC₅₀ 值，每處理三重覆。結果證實 158 株炭疽病菌菌株對 3 種藥劑的 EC₅₀ 值，分別為免賴得殺菌劑 128-467 mg a.i./l、貝芬替殺菌劑 111-415 mg a.i./l 及腐絕殺菌劑 146-433 mg a.i./l (表二)。此結果亦證實臺南地區的芒果炭疽病菌菌株，已成為高風險抗藥性族群，抗性菌株分佈如圖三。另為確定其餘 34 株炭疽病菌株是否對 benzimidazole 類藥劑具感受性，依上述方法將 34 株菌株之菌絲塊置於含有不同有效濃度的貝芬替之 PDA 培養基，並於 25°C 不照光培養 5 天後觀察。結果顯示，該 34 株炭疽病菌株對貝芬替之 EC₅₀ 值皆小於 10 mg a. i./l。

傳統藥劑檢測需經過菌株純化分離、培養到量測等過程，約需一至兩週的時間才能判斷是否具有抗藥性，相當費時。目前已有研究指出利用分子生物學的方法可能有效追蹤抗藥性病菌於田間分佈情形，如引起無花果病害的 *Alternaria*⁽¹¹⁾，以及引起香蕉葉斑病的 *Mycosphaerella fijiensis*⁽³⁾。本研究利用 PCR-RFLP 方法，從炭疽病菌株培養、抽取 DNA、進行 PCR 試

驗到電泳分析結果，僅需 3~5 天，若有現成病原菌體，則更可在一天之內完成測試並得到診斷結果。此外，比較 PCR-RFLP 分析與藥劑測試結果，證實各分析結果亦互相吻合，確定本研究所使用的 PCR-RFLP 技術具有對田間炭疽病菌抗藥性檢測的效率與準確度。目前 benzimidazole 類殺菌劑仍為防治果樹炭疽病常使用的藥劑，未來期望能將此技術應用於其他果樹抗 benzimidazole 類藥劑炭疽病菌之監測。

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，並承行政院農業委會動植物防疫檢疫局 99 農科 -9.2.4- 檢 B1 (Z) 暨教育部邁向頂尖大學計畫補助，特以致謝。

引用文獻(LITERATURE CITED)

1. Albertini, C., Gredt, M., and Lerous, P. 1999. Mutations of the β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. Pestic. Biochem. Physiol. 64: 17-31.

2. Ann, P. J. 1999. Occurrence and management of disease, Pages 97-107 *in*: Integrated Pest Management of Mango. H. C. Yang, Y. L. Wu, Y. M. Huang, and C. S. Cheng eds. Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan.
3. Cañas-Gutiérrez, G. P., Patiño, L. F., Rodríguez-Arango, E., and Arango, R. 2006. Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *J. Phytopathol.* 154: 403-405.
4. Chuang, T. Y., Leu, L. S., Ann, P. J., Yang, H. R., Yang, H. R., and Kao, C. W. 1999. The control process of anthracnose in export mango, Pages 109-116 *in*: Integrated Pest Management of Mango. H. C. Yang, Y. L. Wu, Y. M. Huang, and C. S. Cheng eds. Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan.
5. Chung, W. H., Chung, W. C., Peng, M. T., Yang, H. R., and Huang, J. W. 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. *New Biotechnol.* 27: 17-24.
6. Davidse, L. C. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 43-65.
7. Fei, W. C., Wang, Y. M., Chen, F. C., Lin, C. M., and Lee, Y. H. 2010. Plant Protection Manual. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan. 963 pp.
8. Fitzell, R. D. 1981. Effect of regular applications of benomyl on the population of *Colletotrichum* in mango leaves. *T. Brit. Mycol. Soc.* 77: 529-533.
9. Fungicide Resistance Action Committee. 2008. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. Published by the Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium. 60 pp.
10. Koenraadt, H., Somerville, S. C., and Jones, A. L. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.
11. Luo, Y., Ma, Z., Reyes, H. C., Morgan, D. P., and Michailides, T. J. 2007. Using real-time PCR to survey frequency of azoxystrobin-resistant allele G143A in *Alternaria* populations from almond and pistachio orchard in California. *Pestic. Biochem. Phys.* 88: 328-336.
12. McKay, G. J., Egan, D., Morris, E., and Brown, A. E. 1998. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR based method. *Mycol. Res.* 102: 671-676.
13. Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S., and Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Letters* 98: 137-144.
14. Pei, C. L. 1981. Investigation on resistance of phytopathogenic fungi to fungicides in Taiwan. Master Thesis, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 125 pp. (in Chinese with English abstract)
15. Sreenivasaprasad, S., Sharda, S. K., Brown, A. E., and Mills, P. R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol.* 45: 650-655.
16. Tsai, J. N., Ann, P. J., Hu, C. Y., and Cheng, S. F. 2006. Evaluation of fungicides for suppression of mycelial growth and conidial germination of *Colletotrichum* species isolated from mango, pomelo and banana fruit. *Plant Pathol. Bull.* 15: 39-54.
17. Weng, F. Y. and Chuang, T. Y. 1995. Grouping of mango anthracnose fungus in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 37: 295-309.
18. Yang, H. R. 1999. Determination of resistance and non-pesticide control in anthracnose, Pages 117-121 *in*: Integrated Pest Management of Mango. H. C. Yang, Y. L. Wu, Y. M. Huang, and C. S. Cheng eds. Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Press, Taiwan.
19. Yarden, O. and Katan, T. 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478-1483.

ABSTRACT

Lou, P. S.¹, Huang, Y. J.¹, Chung, W. C.², Cheng, A. S.³, and Chung, W. H.^{1,4} 2010. Application of PCR-RFLP in detecting benzimidazoles-resistant isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from mango in Tainan area. Plant Pathol. Bull. 19: 255-260. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ² Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan; ³ Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Tainan, Taiwan; ⁴ Corresponding author, E-mail: wenchung@nchu.edu.tw)

For examining the sensitivity of PCR-RFLP developed for testing benzimidazole-resistant *Colletotrichum gloeosporioides*, a total 192 isolates of *C. gloeosporioides* obtained from mango producing area, Zuojhen (7 isolates), Danei (21 isolates), Shanshang (6 isolates), Yujing (71 isolates), Guantian (32 isolates), Nanhua (46 isolates) and Nansi (9 isolates), in Tainan. The results showed that the partial β -tubulin gene of all *C. gloeosporioides* isolates could be amplified by primers TubGF1 and TubGR. Consequently, 158 PCR products could digest into two bands by restriction enzyme of *Bsh* 1236I. Furthermore, the EC₅₀ (mg a.i./l) of three benzimidazoles of benomyl, carbendazim and thiabendazole to the isolates of PCR product digested are 128-467, 111-415 and 146-433 mg a.i./l. According to the results, the isolates of *C. gloeosporioides* from mango in Tainan are high risk population to benzimidazoles.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose, benzimidazoles resistance, PCR-RFLP