

鐮胞菌的分子檢測技術—以香蕉黃葉病菌為例

張碧芳助理教授

國立中興大學植物病理學系

電子郵件：pfhang@nchu.edu.tw；傳真：04-2286-0442

摘 要

種子與種苗常攜帶植物病原菌，進行長距離的跨國傳播，因此種子與種苗的健康檢查，是維護我國作物安全的必要手段。我國已加入世界貿易組織（WTO），許多農產品的交易將更趨開放。為了扼止新病原的引進，農產品（如種子，種球及種苗）的快速檢疫工作，是當前刻不容緩的要務。根據「中華民國輸入植物或植物產品檢疫規定」，香蕉、稜指蕉（Bluggoe）、赫蕉（Heliconia）植株之全部及部分皆禁止輸入本國，以防杜香蕉巴拿馬病病原 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hans. 之 Race 2 及 Race 3 引入我國，危害香蕉產業，因此需針對香蕉黃葉病之病原菌--尖鐮胞菌香蕉分化型 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hans.，研發出快速檢測方法，以利檢疫工作的執行。本研究採用 RAPD 之方法，尋得 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 的專一性核酸片段，設計出專一性 PCR 檢測法，可用於香蕉種苗病原菌之快速檢疫工作及其健康種苗之篩選。

關鍵詞：香蕉、香蕉巴拿馬病、香蕉黃葉病、鐮胞菌萎凋病、尖鐮胞菌香蕉分化型、聚合酵素連鎖反應、隨機增幅核酸多形性分析

緒 言

香蕉黃葉病（又稱「巴拿馬病」及「鐮胞菌萎凋病」，Banana yellows, Panama disease, Fusarial wilt of banana）為危害香蕉產業之重要病害，其病原菌為尖鐮胞菌香蕉分化型 *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen（黃與孫，1997）。於1900-1960年間，中美洲各國香蕉約有十萬英畝被巴拿馬病所害，為香蕉之主要病害，直至1960年中美洲全面種植抗病之華蕉（Cavendish banana）品種，本病才得以抑制（孫與黃，1996）。台灣之香蕉栽培約有二百多年歷史，其栽培面積於1960年代曾高達四萬多公頃，香蕉產業達到

高峰，外銷量高居世界第四名，使台灣成為「香蕉王國」（黃，2000），但於1967年屏東縣佳冬地方出現黃葉病至今三十餘年來（蔡與陳，1971；蔡等，1972），此病發生面積高達四千多公頃，且已由高屏地區蔓延至臺灣中部，目前栽培面積只剩七千多公頃（黃，2002）。臺灣之栽培香蕉多為華蕉，是本菌第一生理小種（race 1）的抗病品種，但卻不具有抵抗本菌之第四號生理小種（race 4）的能力（莊，1973；1981；Su *et al.*, 1977；1986）。

香蕉黃葉病乃土傳性之鐮胞菌病害，此病害之傳播可由土壤之移動（藉人力，農具或車輛等），罹病株殘體被人攜帶，流水及風力傳播，河水氾濫也可將病株殘體帶至他處，而帶病之吸芽及蕉園中之雜草也是病害傳播者，公認為極難防治，須改種抗病品種才得復興香蕉產業（黃，1985；孫，1996）。自1967年臺灣之華蕉發生黃葉病後，「臺灣香蕉研究所」發展體細胞組織培養繁殖法，選出抗病品系「台蕉一號」、「台蕉三號」、及最新選育成功之「寶島蕉」等，有較強之抗病性，目前已陸續推廣種植，並繼續進行選拔的工作（孫等，1997；黃，2000；2002）。華蕉為三倍體不產種子，栽培需用無性繁殖之種苗，目前蕉農為防止本病蔓延，除使用前述之抗病組織培養苗（佔所有種苗四分之一左右）外，也常用根莖及抗病性較佳之吸芽苗種植，並自行於蕉園內取得，但帶菌之根莖及已被感染卻未表現病徵之吸芽苗，反而成為其主要傳染原而助長本病蔓延，因此，如何快速鑑定種苗是否健康不帶病菌，實為防治香蕉黃葉病蔓延之最佳方法。

尖鐮胞菌香蕉分化型（*F. oxysporum* f.sp. *cubense*）原有三個生理小種，但於1967年在臺灣出現第四個小種，可侵害華蕉（Cavendish banana）：

Race 1--侵害大米七（Gros Michel, AAA），絲蕉（Silk, AAB）及馬尼拉麻（abaca）

Race 2--侵害稜指蕉（Bluggoe, ABB）

Race 3--侵害赫蕉（Heliconia）

Race 4--侵害華蕉（Cavendish banana, AAA），在臺灣，澳洲，菲律賓及加那利群島（Canary Islands）均有存在（孫與黃，1996）。

由於此病原菌一旦進入無病之處女地即無法根除，而其抗病育種又極為困難，因此，如何防止目前台灣尚未發生之生理小種 Race 2 及 Race 3 入侵台灣，造成嚴重疫情，實為當前檢防疫工作之重要課題。尤其我國目前已加入世界貿易組織（WTO），許多農產品的交易將更趨開放，為防止此二生理小種隨觀賞作物之植物殘體、園中雜草或運輸工具引入我國，發展病原之快速且準確之偵測方法確有其必要性。

病原性測試及培養基檢測法

一般判斷香蕉苗是否攜帶植物病原菌，經常採用植物組織分離法，亦即將香蕉苗之組織切片後，利用洋菜平板法（agar plate method）進行分離、培養與鑑定（Agarwal and Sinclair 1987; Neergaard, 1977），並以選擇性培養基來輔助菌

種之鑑定 (Komada, 1975; Tsao, 1970)。鑑別 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 之不同生理小種，最常用的方法就是利用不同品種的香蕉苗來作病原性測試 (Hwang and Ko, 1987; Stover, 1959; Sun and Su, 1984; Waite, 1977)，然而這些方法費力、耗時，且病原性測試甚至需要栽植不同指示品種 (indicator) 的蕉苗並於接種數日後觀察其病徵才能得知。因此，台灣大學植病物理學系孫岩章及蘇鴻基教授研究室曾開發出利用半乳糖 (galactose) 10 克、L-asparagine 2 克、磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 1 克、硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 克、氯化鉀 (KCl) 0.5 克、FeNaEDTA 0.01 克、洋菜粉 (agar) 16 克與蒸餾水 0.9 公升均勻混合及高壓滅菌後，再逐一加入內含 0.9 克五氯硝苯 (PCNB)，0.45 克牛膽汁 (oxgall)、0.5 克硼酸鈉 ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) 及 0.3 克鏈黴素 (Streptomycin sulfate) 等藥劑調製之溶液 100 毫升，最終以 10% 磷酸調配為 pH 3.8 ± 0.2 的 modified Komada's (K2) 選擇性培養基，可以鑑別 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 之不同生理小種 (孫, 1977; Sun *et al.*, 1978)，但其判定常因培養環境及其他主觀因素而影響鑑別結果，而且培養時間長，並不符合快速檢疫之需求。

偵測病原菌常用之快速分子檢測技術

近來，隨著分生技術的迅速發展，快速且可應用於大量材料的技術：「隨機增幅核酸多形性分析 (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)」及「聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)」已被廣泛用於菌種快速鑑別與類緣關係的研究 (Henson and French, 1993; Miller, 1996)。PCR 是應用在少量的 DNA 上，且必須有特定的寡核苷酸引子 (oligonucleotide primers) 才能增幅 (amplify) 少量的 DNA，其增幅原理及結果如圖一所示；而 RAPD 則是應用在隨意利用一個小且短、任意設計的引子 (arbitrarily designed primer) 達到增量少量的 DNA，所以 RAPD 又稱為 Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR)，經由篩選多種引子之增幅結果，我們可以選出特定之核酸引子，而由其增幅產物的差異來區分出原有核酸樣品的不同 (Williams *et al.*, 1990；如圖二)。此兩種方法皆具靈敏性，且可快速運用在大量材料上。如：Punja 及 Sun (2001) 利用幾個常用的隨機引子，使用在 *Sclerotium rolfsii* 的全 DNA 上，分析其 PCR 產物，再篩選出能夠有效區別不同寄主、地區及菌絲親合性群的有效引子，以進一步分析。Ouellet 及 Seifert 等人 (1993) 針對 *Fusarium graminearum* 菌株利用 RAPD 分析篩選出具有特異性且能應用於鑑別的片段，再利用解序 (sequencing) 此專一性的片段之後，以 PCR 增量，使能運用在田間快速鑑別此病原菌之存在。Manulis 等人 (1994) 及 Migheli 等人 (1998) 分別以 *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* 為材料篩選具致病性之 RAPD markers，以期能鑑定此病原菌的病原性族群 (pathogenicity group) 及分類。Plyler 等人 (1999) 由 *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* 的部分基因庫中篩選到一個 686 bp 的探針，利用點漬法測試 59 個 *F. oxysporum* f. sp.

canariensis 菌株和其他 7 株不同分化型之 *F. oxysporum* 真菌的核酸與此核酸探針反應，結果顯示探針會很專一的與 *F. oxysporum* 菌株產生明顯的反應，而不與其他菌株反應。此外，由此探針的序列中再設計出一專一性引子對，則可快速鑑別全部的 *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* 菌株而不和其他 56 株真菌的核酸反應。另外，尚有一些利用此技術成功的例子：如應用在不同分化型或特定 race 之 *F. oxysporum* 真菌的鑑定 (Assigbetse *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1998; Crowhurst *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 1998; Grajal-Martín *et al.*, 1993; Kalc *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1994; Migheli and Cavallarin, 1994; Nelson *et al.*, 1997;)；又如應用在 *Colletotrichum graminicola*、*Fusarium* spp. (Parry and Nicholson, 1996; Schilling *et al.*, 1996; Yoder and Christianson, 1998)、*Plasmodiophora brassicae* (Ito *et al.*, 1997)、*Sphaerotheca fuliginea* (Bardin *et al.*, 1997) 及 *Tilletia indica* (Smith *et al.*, 1996) 等菌系之分類或病原性之測定。甚至已有多位學者已利用此類方法研究香蕉黃葉病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) 之演化起源及其在不同地區分離株之間的遺傳差異和親緣關係 (Bentley *et al.*, 1994; 1995; 1998; Bentley and Bassam, 1996; Gerlach *et al.*, 2000; Kistler, 1997; Koenig *et al.*, 1997; Lodwig *et al.*, 1999; O'Donnell *et al.*, 1998)，並且將台灣的香蕉黃葉病菌 race 1 (屬於 VCG [vegetative compatibility group] 0123) 及 race 4 (屬於 VCG 0121) 菌株分別歸納為 DFG (DNA fingerprinting group) V 及 DFG III 二群 (Bentley *et al.*, 1998)，而針對此菌不同 race 的分子偵測技術也正在開發中。所以目前為止，針對植物病原真菌及細菌的分類與鑑定上，此種分子生物技術確實已成為一種新興且普遍的方法，而研究成果也在陸續增加中。為了達到對病原菌做快速的偵測 (detection) 及診斷 (diagnosis) 的目的，製備菌株專一性的核酸探針配合點漬試驗 (dot-blot assay) 應為較理想的方法。Sauer 等人由 *Ophiosphaerella herpotricha* 的基因庫篩選到一個 1.5 kb 的探針，利用點漬法測試 29 個 *O. herpotricha* 菌株和其他三十株真菌及細菌的核酸與此核酸探針的反應，結果顯示探針會很專一的與 *O. herpotricha* 菌株產生明顯的反應，此外將此核酸探針配合點漬法，可由 200 mg 的染病植株根部萃取的核酸中偵測病原菌的存在，以點漬法測出此核酸探針 (^{32}P 標識) 的靈敏度可達到 10 pg 核酸量，相當於 1 μg 冷凍乾燥菌絲所具有的核酸量。由於點漬試驗法一次可篩選許多樣本，將此法應用於病原菌的偵測實為經濟、快速、且簡便的方法。

開發香蕉黃葉病菌之分子檢測流程

本檢測技術即在針對香蕉之重要種苗病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*，應用 RAPD 之方法，尋得一專一性核酸片段，並設計出專一性 PCR 檢測法，建立種苗病原真菌之快速檢疫技術，以克服目前在種苗檢疫之障礙，並且能加速香蕉健康種苗之篩選。其基本流程如下：(1) 開發香蕉黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp.

cubense (race 4) 之 RAPD 快速偵測技術，尋找其增幅之專一性核酸片段。(2) 選殖 RAPD 增幅之專一性核酸片段，經定序分析以設計專一性引子對供 PCR 增幅之用。(3) 探討專一性 PCR 檢測法偵測香蕉黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (race 4) 的靈敏度。(4) 探討專一性 PCR 檢測法偵測香蕉種苗攜帶香蕉黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (race 4) 之可行性，並調查本省各地香蕉種苗之帶菌情形。(5) 若能取得國外香蕉黃葉病菌之 race 2 及 race 3 菌株 DNA，更將開發可供鑑別出 race 2 及 race 3 之 RAPD 專一性引子以供進口檢疫之用。(6) 利用鑑別 race 2、race 3 及 race 4 之專一性 PCR 檢測法，作香蕉黃葉病菌不同生理小種之鑑別，並以前述之 K2 選擇性培養基的結果做參考。

香蕉黃葉病菌之分子檢測

供試菌株及其總量 DNA 之萃取

根據王氏 (1996) 之方法自南投縣國姓鄉等地採回香蕉黃葉病的罹病株，經分離、培養及病原性測定後，取各地分離出之 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (race 4) 菌株作為萃取總量 DNA 之菌源。此外，並由「台灣香蕉研究所」取得 race 1 及 race 4 菌株，供萃取總量 DNA 之菌源。此外，分離自其他作物之 *F. oxysporum* 不同分化型之菌株、其他香蕉病原菌 (如：*Mycosphaerella fijiensis* [葉斑病]、*Phyllosticta musarum* [黑星病]、及 *Colletotrichum musae* [炭疽病] 等)、及常見之土壤病原菌或腐生菌 (如：*Rhizoctonia solani*、*Pythium aphanidermatum*、*Pythium splendens*、*Pythium ultimum*、*Phytophthora parasitica*、*F. moniliforme*、*F. solani* 及 *Sclerotium rolfsii* 等) 也予以培養並收集其菌絲供萃取總量 DNA 之用。總量 DNA 之萃取則參照 Chang 等人 (1996) 根據 Dellaporta 等人 (1983) 之方法作修正。此總量 DNA 可作為 RAPD 試驗之模版 (template) 及後續分析之 DNA 來源。(詳細方法請參考本專刊中「鐮胞菌的分子檢測實務—以香蕉黃葉病菌為例」一文)

RAPD 增幅反應之條件設計

參照李氏 (1998) 之方法，根據不同反應物 (模版 DNA、dNTPs、鎂離子、primer、*Taq* DNA 聚合酵素) 之濃度及 RAPD 增幅循環之溫度設定與循環次數作測試，於核酸增幅反應系統 (PTC-200 DNA Engine, MJ Research, Inc., MA, U.S.A.) 中進行 DNA 增幅，所得結果以瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳分析。將測試所得之最佳增幅條件用來篩選由 Operon Technologies 公司 (Alameda, CA, U.S.A.) 製造之不同 primer (引子)，選出增幅良好且再現性高之引子，以此引子測試各分離菌株、其他香蕉病原菌、分離自其他作物之 *F. oxysporum* 不同分化型之菌株、及常見之土壤病原菌或腐生菌等菌株之 DNA，以找出對 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 不同生理小種 (race 1 及 race 4) 的 DNA 能分別產生專

一性片段之引子。(詳細方法請參考本專刊中「鐮胞菌的分子檢測實務—以香蕉黃葉病菌為例」一文)

RAPD 增幅片段之選殖及定序

參照 Chang 等人(1993)之方法,將 RAPD 增幅產生之專一性片段自 agarose gel 回收,選殖於 pGEM-T Easy 載體 (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.), 殖入之片段再用來製備核酸探針,待確定可辨認 RAPD 增幅產生之專一性片段後,即為專一性核酸探針,並依 Sanger 氏等人 (1977) 之方法定序。(詳細方法請參考本專刊中「鐮胞菌的分子檢測實務—以香蕉黃葉病菌為例」一文)

利用專一性核酸片段之序列設計專一性引子對並以 PCR 測試分析其靈敏度

由專一性核酸片段之序列中設計適當之正反向引子,依不同之黏合 (annealing) 溫度測試 PCR 增幅條件,並以不同之引子組合測試其最適合之反應結果,以篩選出具專一性的引子對。利用此專一性的引子對根據不同 DNA 模版含量進行 PCR 測試,以「南方轉漬分析 (Southern blotting)」(Southern, 1975) 及前項之專一性核酸探針,經核酸雜合作用及偵測反應 (Sambrook *et al.*, 1989), 分析專一性 PCR 法及專一性核酸探針法對 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (race 4) 基因組核酸偵測之靈敏度。

利用專一性 PCR 檢測法鑑定 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 之生理小種,並調查本省香蕉種苗之帶菌情形

利用前述開發專一性 PCR 檢測法之流程,可繼續針對 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, race 2、race 3 及 race 4 發展出專一性 PCR 檢測法,即能區分香蕉黃葉病菌 race 2、race 3 及 race 4 之差別,則可用來鑑定 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 之不同生理小種,尤其是 race 2、race 3 及 race 4 之區分,並以前述之 K2 選擇性培養基搭配進行比較試驗。若所得結果無誤,則可用於偵測香蕉種苗是否健康不帶黃葉病菌,另外更可於海關檢疫時,防杜國外之 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, race 2 及 race 3 引入台灣造成重大疫情。

引用文獻

- 王麗媚。1996。西瓜蔓割病菌之野生型與變異型菌株間致病毒力的比較與其去氧核糖核酸的分析。國立中興大學植物病理研究所碩士論文, 67 頁。
- 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。2000。中華民國輸入植物或植物產品檢疫規定, 66 頁。
- 李崇正。1998。利用隨機增幅核酸多型性分析及聚合酵素連鎖反應技術專一性檢測荔枝露疫病菌。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文, 101 頁。

- 孫守恭、黃振文。1996。台灣植物鐮胞菌病害。世維出版社。台中市，170 頁。
- 孫守恭。1996。台灣果樹病害。世維出版社。台中市，427 頁。
- 孫岩章。1977。台灣香蕉黃葉病菌在土中的存活。台灣大學植物病蟲害學系碩士論文，80 頁。
- 孫明賢、黃新川、柯文雄。1996。具推廣潛力之抗黃葉病品系—華蕉 GCTCV-105 品系。植保會刊 38:27-37。
- 莊再揚。1973。台灣香蕉黃葉病菌之生理與生態之研究。台灣大學植物病蟲害學系碩士論文，64 頁。
- 莊再揚。1983。台灣中部香蕉黃葉病菌生理小種之鑑定。植保會刊 25:57-58。
- 黃振文、孫守恭。1997。台灣產鐮胞菌。世維出版社。台中市，116 頁。
- 黃新川、陳其麗、巫富良。1984。台灣現有香蕉品種對黃葉病、黑星病及緣枯病之罹病性調查。植保會刊 26:155-161。
- 黃新川。1985。香蕉黃葉病之生態與防治。植保會刊 27:233-245。
- 黃新川。2000。香蕉黃葉病。植物疫情與策略。中華植物保護學會出版。台中縣，第 45-58 頁。
- 黃新川。2002。組培技術在香蕉黃葉病防治上之應用。植病會刊 11:57-61。
- 蔡雲鵬、陳復漢。1971。台灣之香蕉萎凋病：(1)生態及藥劑防治初期研究。植保會刊 14:65-73。
- 蔡雲鵬、蘇鴻基、黃平和。1972。台灣香蕉萎凋病之發病概況，緊急措施及田間防治試驗。果農合作 301:5-10。
- Agarwal, V. K., and Sinclair, J. B. 1987. Principles of seed pathology. Vol. I, II. CRC Press, Boca Raton, Florida, 344pp.
- Assigbetse, K. B., Fernandez, D., Dubois, M. P., and Geiger J.-P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Phytopathology 84:622-626.
- Bardin, M., Nicot, P. C., Normand, P., and Lemaire, J. M. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. Eur. J. Plant Pathol. 103: 545-554.
- Bentley, S., and Bassam, B. J. 1996. A robust DNA amplification fingerprinting system applied to analysis of genetic variation within *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Journal of Phytopathology 144:207-213.
- Bentley, S., Pegg, K. G. and Dale, J. L. 1994. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Journal of Phytopathology 142:64-78.
- Bentley, S., Pegg, K. G., and Dale, J. L. 1995. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. Mycol. Res. 99: 1378-1384.

- Bentley, S., Pegg, K. G., Moore, N. Y., Davis, R. D., and Buddenhagen, I. W. 1998. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology* 88:1283-1293.
- Chang, P. F. L., Narasimhan, M. L., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. 1993. Quantitative mRNA-PCR for expression analysis of low-abundance transcripts. *Plant Molecular Biology Reporter* 11, 237-248.
- Chang, P. F. L., Damsz, B., Kononowicz, A. K., Reuveni, M., Chen, Z., Xu, Y., Hedges, K., Tseng, C. C., Singh, N. K., Binzel, M. L., Narasimhan, M. L., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. 1996. Alterations in cell membrane structure and expression of a membrane-associated protein after adaptation to osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 98:505-516.
- Clark, C. A., Hyun, J-W., and Hoy, M. W. 1998. Relationships among wilt-inducing isolates of *Fusarium oxysporum* from sweetpotato and tobacco. *Plant Dis.* 82:530-536.
- Crowhurst, R. N., King, F. Y., Hawthorne, B. T., Sanderson, F. R., and Choi-Pheng, Y. 1995. RAPD characterization of *Fusarium oxysporum* associated with wilt of angkana (*Pterocarpus indicus*) in Singapore. *Mycol. Res.* 99: 14-18.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1:19-21.
- Dieffenbach, C. W., and Dveksler, G. S. 1995. PCR primer. Pages 143-155. *In: Design and Use of Mismatched and Degenerate Primers*, Kwok, S. et al. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Fernandez, D., Ouinten, M., Tantaoui, A., Geiger, J.-P., Daboussi, M.-J., and Langin, T. 1998. *Fot1* insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:633-636.
- Garber, R. C. and Yoder, O. C. 1983. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. *Anal. Biochem.* 135: 416-422.
- Gerlach, K. S., Bentley, S., Moore, N.Y., Pegg, K.G., and Aitken, E. A. B. 2000. Characterisation of Australian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* by DNA fingerprinting analysis. *Aust. J. Agric. Res.* 51:945-53.
- Glick, B.R., and Pasternak, J. J. 1998. *Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 2nd ed. American Society of Microbiology Press, Washington, D.C., 683pp.
- Grajal-Martín, M. J., Simon, C. J., and Muehlbauer, F. J. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 83:612-614.

- Henson, J. M., and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.
- Hwang, S. C., and Ko, W. H. 1987. Using plantlets for screening resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 affecting Cavendish bananas. *Plant Prot. Bull.* 29:425-426. (Abst.)
- Ito, S., Maehara, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Tano, S., and Kishi, F. 1997. Cloning of a single-copy DNA sequence unique to *Plasmodiophora brassicae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 289-300.
- Kalc Wright, G. F., Guest, D. I., Wimalajeewa, D. L. S., and van Heeswijck, R. 1996. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Eur. J. Plant Pathol.* 102:451-457.
- Kelly, A., Alcalá-Jiménez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E., and Jiménez-Díaz, R. M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84:1293-1298.
- Kistler, H. C. 1997. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87:474-479.
- Koenig, R. L., Ploetz, R. C., and Kistler, H. C. 1997. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. *Phytopathology* 87:915-923.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8:114-125.
- Lodwig, E. M., Bridge, P. D., Rutherford, M. A., Kung'u, J., and Jeffries, P. 1999. Molecular differences distinguish clonal lineages within East African populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Applied Microbiology* 86:71-77.
- Manulis, S., Kogan, N., Reuven, M., and Ben-Yephet, Y. 1994. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Phytopathology* 84:98-101.
- Migheli, Q., and Cavallarin, L. 1994. Characterization of antagonistic and pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Mol. Biotechnol.* 2:197-200.
- Migheli, Q., Briatore, E., and Garibaldi, A. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify race 1, 2, 4 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:49-57.
- Miller, S. 1996. Detecting propagules of plant pathogenic fungi. Pages 73-102. *In: Advances in Botanical Research. Vol. 23. Academic Press Limited, London.*

- Neergaard, P. 1977. Seed Pathology. Vol I , II . The Macmillan Press LTD, London, 1191pp.
- Nelson, A. J., Elias, K. S., Arévalo G., E., Darlington, L. C., and Bailey B. A. 1997. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* associated with an emerging epidemic in Peru. *Phytopathology* 87:1220-1225.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:2044-2049.
- Ogram, A., Sayler, G. S., and Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7:57-66.
- Ouellet, T., and Seifert, K. A. 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology* 83(9):1003-1007.
- Parry, D. W., and Nicholson, P. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathol.* 45:383-391.
- Ploetz, R. C., ed. 1990. *Fusarium Wilt of Banana*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 140pp.
- Plyler, T. R., Simone, G. W., Fernandez, D., and Kistler, H. C. 1999. Rapid detection of the *Fusarium oxysporum* lineage containing the Canary Island date palm wilt pathogen. *Phytopathology* 89:407-413.
- Punja, Z. K., and Sun, L. J. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S. delphinii*. *Mycological Research* 105:537-546.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sauer, K. M., Hulbert, S. H., and Tisserat, N. A. 1993. Identification of *Ophiosphaerella herpotricha* by cloned DNA probes. *Phytopathology* 83: 97-102.
- Schilling, A. G., Moller, E. M., and Geiger, H. H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86:515-522. .
- Smith, O. P., Peterson, G. L., Beck, R. J., Schaad, N. W., and Bonde, M. R. 1996. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of karnal bunt of wheat. *Phytopathology* 86: 115-122.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments

- separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
- Stover, R. H. 1959. A rapid and simple pathogenicity test for detecting virulent clones of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* using seedlings of *Musa balbisiana*. *Nature* 184:1591-1592.
- Stover, R. H., and Malo, S. E. 1972. The occurrence of fusarial wilt in normally resistant 'Dwarf Cavendish' banana. *Plant Dis. Rep.* 56:1000-1003.
- Su, H. J., Chung, T. Y., and Kong, W. S. 1977. Physiological race of fusarial wilt fungus attacking Cavendish banana of Taiwan. *Taiwan Banana Res. Inst. Spec. Publ.* 2. 21 pp.
- Su, H.-J., Hwang, S.-C., and Ko, W.-H. 1986. Fusarial wilt of Cavendish bananas in Taiwan. *Plant Dis.* 70:814-818.
- Sun, E. J., and Su, H. J. 1984. Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using banana plantlets. *Trop. Agric. (Trinidad)* 61:7-8.
- Sun, E. J., Su, H. J., and Ko, W. H. 1978. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 from soil or host tissue by cultural characters. *Phytopathology* 68:1672-1673.
- Tsao, P. H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8:157-186.
- Waite, B. H. 1977. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with race 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. *Plant Dis. Rep.* 61:15-19.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., and Zoller, M. 1992. *Recombinant DNA*, 2nd ed. Scientific American Books, New York., 618 pp.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R. K., Livak, J. L., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic makers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- Yoder, W. T., and Christianson, L. M. 1998. Species-Specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. *Fungal. Gen. Biol.* 23: 68-80.

**Molecular Technique for Identification of *Fusarium*
oxysporum f. sp. *cubense***

Pi-Fang Linda Chang

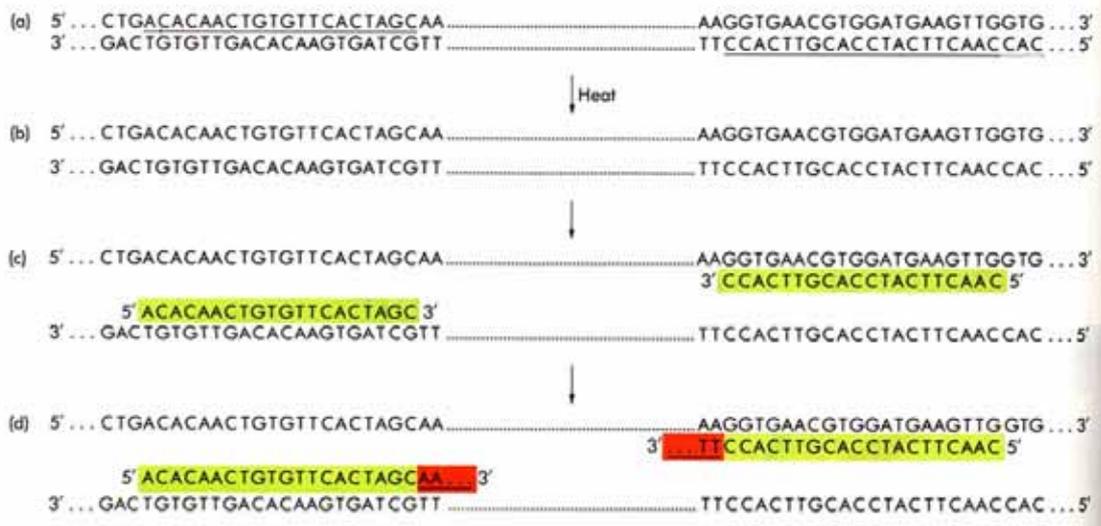
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University,
Taichung, Taiwan

E-mail: pfchang@nchu.edu.tw; Fax no: 04-2286-0442

ABSTRACT

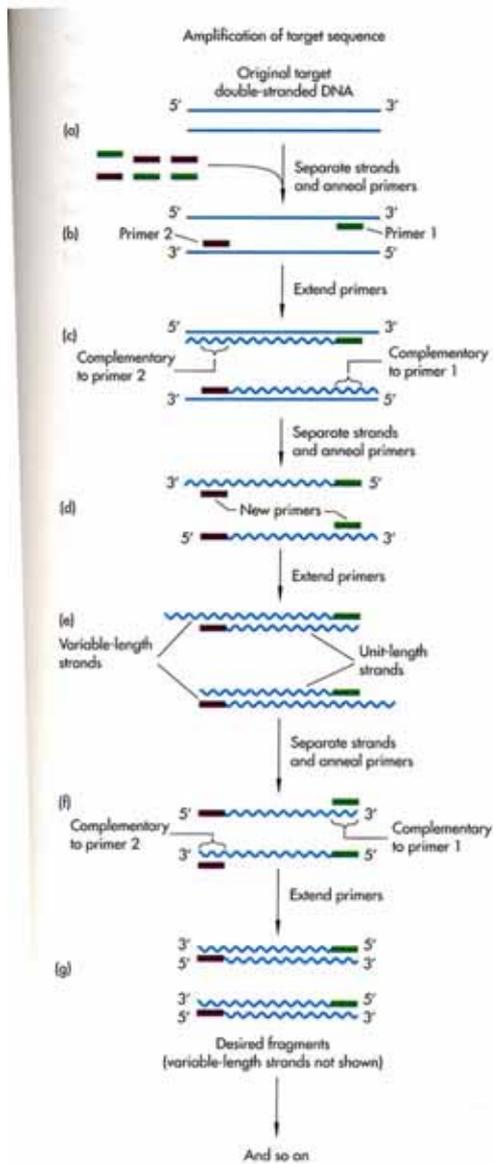
In order to develop a rapid detection technique of fungal pathogen- *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, which cause the Banana Yellows or Panama Disease, a rapid detection technique based on the results of RAPD was used to design a specific PCR detection method. In addition to the improved detection sensitivity, specific primer sets for individual race (especially race 2, 3 and 4) will be designed. These improved detection techniques for rapid and race-specific identification will be used for quarantine to prevent the introduction of new pathogens through the imported seeds and seedlings, and are also served for rapid screening of healthy banana seedlings.

Key words: Banana, *Musa* spp., Panama disease, Banana yellows, Fusarial wilt of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Polymerase chain reaction (PCR), Random amplified polymorphic DNA (RAPD).



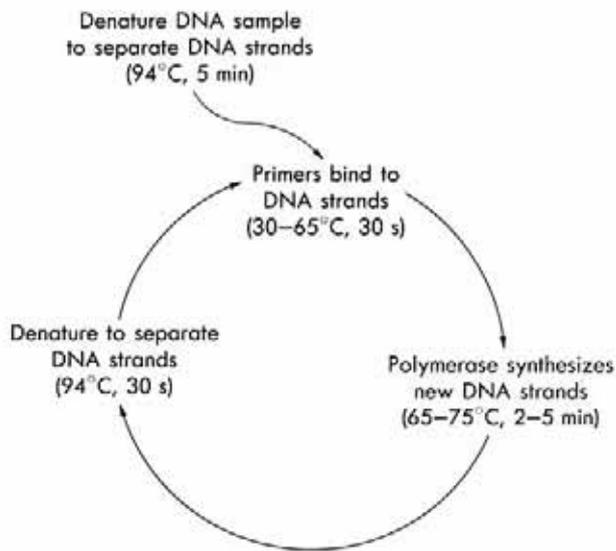
圖一(A)、「聚合酵素連鎖反應」之示意圖--DNA 聚合酵素所用之引子(primers)。(資料來源：Watson *et al.*, 1992)

Fig. 1 (A). The polymerase chain reaction (PCR) -- Primers for DNA polymerase. (a) The target for amplification, a small section covering 110 bp of the β -globin gene, is shown. Two sequences separated by 60 nucleotides are detailed, and the 20 nucleotides underlined are used as oligonucleotide primers for the PCR. (b) When the DNA is heated, the strands separate. (c) The oligonucleotide primers (shown in green) hybridize specifically to their complementary sequences at the 3' ends of each strand of the target sequence. (d) DNA polymerase uses these primers to begin synthesis of new strands (shown in orange and underlined) complementary to the target DNA sequences in the 5'-to-3' directions. (From: Watson *et al.*, 1992)



圖一 (B)、「聚合酵素連鎖反應」之示意圖--「聚合酵素連鎖反應」之反應圖示。(資料來源: Watson *et al.*, 1992)

Fig. 1 (B). The polymerase chain reaction (PCR). (a) The starting material is a double-stranded DNA molecule. (b) The strands are separated by heating the reaction mixture and then cooled so that the primers anneal to the two primer binding sites that flank the target region, one on each strand. (c) *Taq* polymerase synthesizes new strands of DNA, complementary to the template, that extend a variable distance beyond the position of the primer binding site on the other template. (d) The reaction mixture is heated again; the original and newly synthesized DNA strands separate. Four binding sites are now available to the primers, one on each of the two original strands and the two new DNA strands. (To simplify the diagram, subsequent events involving the original strands are omitted). (e) *Taq* polymerase synthesizes new complementary strands, but the extension of these chains is limited precisely to the target sequence. The two newly synthesized chains thus span exactly the region specified by the primers. (f) The process is repeated, and primers anneal to the newly synthesized strands (and also to the variable length strands, but these are omitted from the figure). (g) *Taq* polymerase synthesizes complementary strands, producing two double-stranded DNA fragments that are identical to the target sequence. The process is repeated. (From: Watson *et al.*, 1992)



圖一 (C)、「聚合酵素連鎖反應」之示意圖--「聚合酵素連鎖反應」之循環。
(資料來源：Watson *et al.*, 1992)

Fig. 1 (C). The polymerase chain reaction (PCR) -- The PCR cycle. The DNA sample is heated to separate the DNA strands (initial denaturation), and then the reaction mixture goes through repeated cycles of primer annealing, DNA synthesis, and denaturation. The target sequence doubles in concentration for each cycle. (From: Watson *et al.*, 1992)

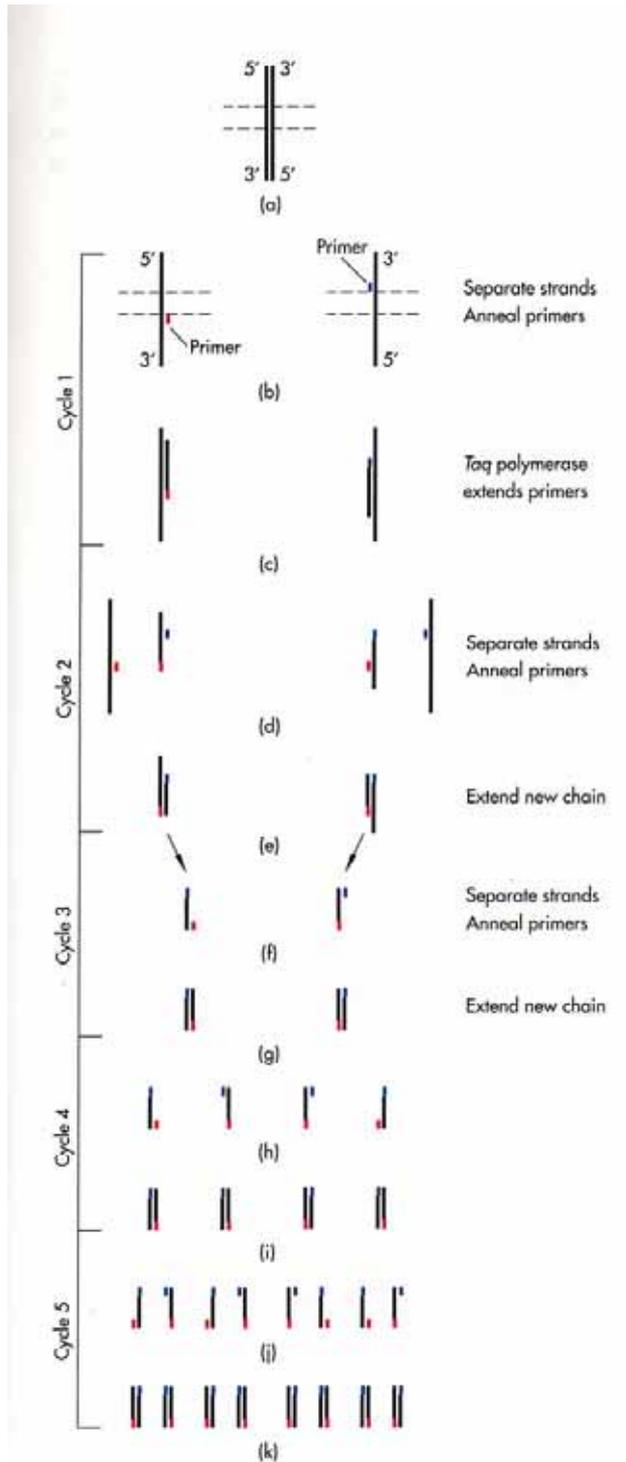
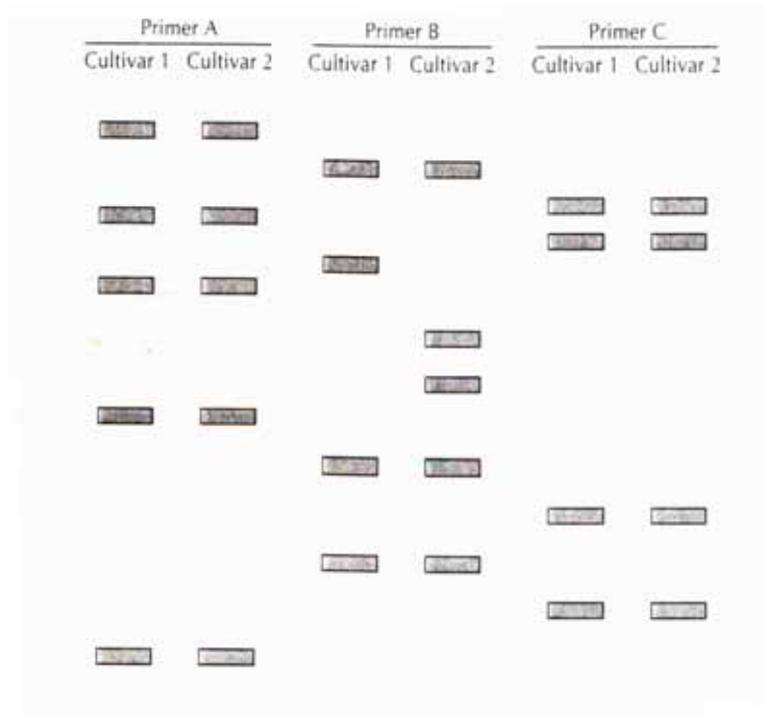


Fig. 1 (D). The polymerase chain reaction (PCR) -- The polymerase chain reaction leads to amplification of the target sequences (marked with dashed lines).

The polymerase chain reaction leads to amplification of the target sequences (marked with dashed lines in [a] and [b]). The first of the PCR-synthesized target fragments is shown in (g) (corresponding to [g] in Fig. 1 [B]). This figure shows how the number of these fragments subsequently doubles for each cycle of the reaction. (From: Watson *et al.*, 1992)

圖一 (D)、「聚合酵素連鎖反應」之示意圖--由「聚合酵素連鎖反應」所複製之核酸產物(如虛線所示)。(資料來源:Watson *et al.*, 1992)



圖二、利用「隨機增幅核酸多形性分析」來區分物種。(資料來源：Glick and Pasternak, 1998)

Fig. 2. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) can be used to differentiate species. Ethidium bromide-stained bands following polyacrylamide gel electrophoresis of PCR-amplified plant DNA. Three separate random primers were used to amplify fragments from each of the two cultivars. Cultivars 1 and 2 show identical patterns of bands with primers A and C. However, they have different patterns when primer B is used; hence, primer B can be used to distinguish between cultivars 1 and 2. (From: Glick and Pasternak, 1998)