

作物镰胞萎凋病菌之快速检测

藍清隆

私立輔仁大學生命科學系

電子郵件：bio1006@nchu.edu.tw；傳真：02-2905-2470

摘要

使用 700 支 RAPD 引子，挑選出 33 支能自 7 種 42 株镰胞菌基因組中放大出特异性片段的引子，總計篩選出 24 個特异性片段。選殖、定序上述特异性片段，並利用南方墨點法進一步確認片段之專一性。

使用 AFLP 指紋分析法，配合銀染 PAGE 膠體，以 *MseI*、*EcoRI* 限制酵素切割 10 株尖镰胞菌基因組 DNA，其後接合相對應之轉接子，二個延伸鹼基選擇性放大引子能有效簡化分子複雜度。選擇性引子組合放大出的條帶數大約在 65 條至 142 條間。15 組選擇性延伸引子組合共得到 204 個特异性 DNA 片段，平均一組選擇性延伸引子組合能得到 14 個特异性 DNA 片段。隨機選殖、定序 64 個特异性 DNA 片段，部份特异性片段並利用南方墨點法進一步確認其專一性。

關鍵詞：镰胞菌、分子檢測、*Fusarium spp.*、RAPD、AFLP

緒言

台灣地區镰胞菌(*Fusarium spp.*)引起的病害以下列四種病原菌最常見：尖镰胞菌(*F. oxysporum*)、念珠镰胞菌(*F. moniliforme*)、茄形镰胞菌(*F. solani*)、磚紅镰胞菌(*F. lateritium*)。根據文獻記載，尖镰胞菌不同分化型在臺灣地區可引起二十一種蔬菜、水果及花卉作物萎凋病(孫、黃，1996)。近年來臺灣地區農作環境惡化，更出現不少新的作物萎凋病。镰胞菌的形態特徵、生理特性與病原性都具有高度變異性，造成檢測及鑑定上極大的困難。

伴隨分子生物學的快速發展，分子標誌已經是不可缺少的防疫、檢疫輔助利器。DNA 層次的分子標誌研發自以雜合為基礎的(hybridization-based)、或是以 PCR 為基礎的(PCR-based)分子多型性分析法，前者操作過程較為複雜費時(Mueller and Wolfenbarger, 1999)，因此學界、業界普遍採用後者。以 PCR 放大為基礎的標記，通常發展自 AS-PCR、RAPD、DAF、AP-PCR 等四種技術。AS-

PCR(allele-specific PCR ; Wu *et al.*, 1989)是依據已知基因的序列設計引子，結果再現性高，但缺點是只適用於已知基因序列之物種。RAPD(Random amplified polymorphic DNA ; Williams *et al.*, 1990)、AP-PCR (Arbitrarily primer PCR ; Welsh and McClelland, 1990)、DAF(DNA amplification fingerprinting ; Caetane-Anolles *et al.*, 1992)則是使隨機引子在較低的溫度下和 DNA 模板煉合，經 PCR 放大產生不同長度的片段。三種分析法所用的引子長度及嚴謹度各有不同，反應中所需要的基因組 DNA 量少，其中 RAPD 由於操作容易而被廣泛使用(Luis *et al.*, 2001)，然而學界卻常質疑 RAPD 的結果再現性不佳。結合 RFLP 與 RAPD 兩者特性的 AFLP (Amplification fragment length polymorphism)技術所需的基因組 DNA 量少(Vos *et al.*, 1995)，同時可靠又快速，AFLP 分析法是分子標誌與診斷標誌開發的主要工具之一(Kakouli *et al.*, 2000 ; Reineke *et al.*, 1999)。本研究室以在台灣地區引起多種作物病害的尖鏽胞菌為重點，以發展成熟之 RAPD、AFLP 分子標誌比較由自不同作物寄主分離的菌株，期望從 DNA 層次尋找出鑑別尖鏽胞菌的方法，並進一步研製專一性分子探針。

鏽胞萎凋病菌之分子檢測

供試鏽胞菌基因組 DNA 之製備

供試菌株包括來自中興大學黃振文教授、嘉義大學陳瑞祥教授、食品科學研究所菌種中心、與自行分離的各分化型尖鏽胞菌菌株。其餘六種鏽胞菌菌株則購自食品科學研究所菌種中心。將單胞培養的菌絲塊，切下移入 PDA 斜面培養基培養，用沾菌針沾取少量孢子，移入馬鈴薯葡萄糖懸浮培養液，並於 25°C 的培養箱中靜置培養 7 天。取出菌絲團置於棉紗網上，以無菌的二次蒸餾水反覆沖洗、擰乾後，置於研鉢中並加入液態氮研磨、並萃取 DNA(周，2000)。

RAPD 分析

RAPD 反應條件是修改周氏之實驗過程(周，2000)，PCR 最後總體積為 20 ul，反應液中包含 2ul 的 10X 反應緩衝液(10 mM Tris-HCl pH9.0，50 mM KCl，0.1 % Triton X-100，15 mM MgCl₂)，150 uM dNTPs，DNA 50 ng，0.2 uM primer，0.5U Taq DNA 聚合酵素(Protech 公司)。置於 PCR 機器(Biometra 公司)中進行反應。PCR 程式設定為 94°C 60sec，32°C 30sec，72°C 60sec 進行 5 次循環後；再以 94°C 5sec，37°C 30sec，72°C 60sec 進行 35 次循環，最後在 72°C 反應 8min。PCR 產物使用 1.4 %瓊脂膠體，以定電壓 170V，進行 80min 電泳。後以 0.5 ug/ml EtBr(ethidium bromide)染色 20min，在 UV 燈照射下觀察 DNA 片段形式，並使用 Bioprofil 系統(Vilber Lourmat 公司)將影像拍攝記錄(廖，2003)。

AFLP 分析

萃取各供試各分化型尖鏟胞菌株基因組 DNA (廖, 2003)。AFLP 分析方法比照 Gibco Life Technologies 公司使用手冊之步驟進行。微量離心管中取 250 ng DNA，加入反應緩衝液、2.5U *Eco* RI、2.5U *Mse* I(1.25U/ μ l)與去離子水，輕晃至均勻，短暫離心收集反應液後置於 37°C 恆溫槽中反應 2hr，於 70°C 反應 15min 不活化酵素後進行電泳觀察基因組 DNA 是否完全被切割。上述反應液加入轉接子接合緩衝液、1 μ l T4 DNA 接合酵素，於 20°C 反應 2hr 以上，反應液以 TE 稀釋後進行預放大反應。預放大反應的 PCR 反應條件設定為 94°C 30sec、56°C 60sec、72°C 60sec，進行 20 個循環。反應結束後，以 1%瓊脂膠體進行電泳，觀察片段大小和分佈情形。最終取放大產物稀釋 10X 後作為選擇性放大反應的模板。取稀釋 10X 的預放大 DNA 產物，再依序加入 *Mse* I primer、*Eco* RI primer、PCR buffer、*Taq* DNA polymerase、去離子等溶液，將上述試劑混和均勻，以 94°C 60sec、65°C 60sec、72°C 90sec 條件進行 PCR(1 循環)。再以 touchdown 方式，每個循環的鍊合溫度降溫 1°C(共 10 循環)，最後以 94°C 30sec、56°C 30sec、72°C 60sec 的條件進行 23 個循環。

利用 Gibco model S2 Sequencing gel electrophoresis system 製備 4% DNA 聚丙烯醯胺膠體。在短玻璃、長玻璃內面均勻塗抹 silane solution。水平放置，將 spacer 沾上少許去離子水後置於長玻璃兩側，放上短玻璃，以透明膠帶黏合長短兩片玻璃。注入 4%聚丙烯醯胺膠體溶液。隔夜待膠凝固後，撕下膠帶，取出梳片，將膠體與玻璃組上電泳槽，於上下槽各倒入約 TBE 緩衝液，以 1600V，pre-run 30min。此時將 AFLP 產物與 loading dye 混合，放入 95°C 水浴鍋作用 3min，快速置於冰上，待膠體 pre-run 完畢，再次以 TBE 緩衝液沖洗樣本槽清洗；將處理過的樣本加入樣本槽中，以 2000V 60W 進行電泳至指示劑到達膠體底部後終止電泳(約 190min)。以水果刀將兩片玻璃拆開，將此含膠體之短玻璃放入置有 1L 10% glacial acetate 溶液中輕搖 20min。膠體以二次水清洗三次。之後把膠體放入裝有 silver nitrate、formaldehyde 溶液，輕搖 30min。以二次水清洗 10sec 後，移入預冷的顯影液，輕搖至譜帶清楚出現為止。放入固定液搖 2min 以終止反應，再用二次水清洗兩次，最後放在室溫下風乾。將風乾後的膠體以掃描機將結果掃描並儲存數位影像(王, 2004)。

結 果

周(2000)以 7 種 36 株鏟胞菌，使用 500 條 RAPD 引子(Operon 公司)，以 94°C 變性 DNA 後、以 32°C-50°C 的引子黏合溫度、72°C 的引子延長溫度(R-1 程式)，35 個循環溫度次數，進行 RAPD 分析。PCR 產物利用 1%瓊脂膠分離後，發現利用 510 條隨機引子自供試鏟胞菌菌株基因組放大出之 DNA 片段間的分歧異

性甚小。發現 12 條引子可在大多數的供試尖鏽孢菌菌株基因組中放大產生特異性的片段。9 個特異性片段再選殖入 puc-T 載體，定序後進行 DNA 序列分析。

廖(2003)根據前述結果，挑選 Operon 公司合成 200 支 RAPD 引子、18 株尖鏽孢菌菌株，以 R-1 程式進行 PCR，發現利用 1.5 mM Mg²⁺ 進行 PCR 後，再搭配 1.4% 瓊脂膠體分離 PCR 產物之解析度效果最佳(圖一)。挑選出 21 支能在 18 菌株基因組中放大出特異性片段的引子，DNA 多形性分析研究發現在致病性尖鏽孢菌各分化型之基因組較為一致，甚至只要使用單一引子就可明顯的區分不同致病性分化型尖鏽孢菌。選殖、定序 15 個特異性片段，利用南方墨點法進一步確認其專一性。

王(2004)使用 AFLP 技術配合銀染 PAGE 膠體，找尋分化型間特異性 DNA 片段。以 *Mse*I 限制酵素切割 7 種尖鏽孢菌基因組 DNA，其後接合相對應之轉接子，限制酵素切割與轉接子接合分別為 37°C 作用 2hr，20°C 作用過夜為最佳。研究中選用的二個延伸鹼基選擇性放大引子 M-AC、M-AG、M-CA、M-CG、M-CT、M-GA、M-GG、M-TC、M-TG 能有效簡化分子複雜度。9 組選擇性引子組合放大出的條帶數大約在 21 條至 53 條間(圖二)，對於 7 個參試樣本總共得到 2075 個 AFLP 譜帶。9 組選擇性延伸引子組合共得到 108 個特異性 DNA 片段。46 個 DNA 片段選殖入 yT&A 載體，定序上述特異性片段，並利用南方墨點法進一步確認片段之專一性。

討 論

本研究已利用 RAPD、AFLP 分析法篩選出台灣地區重要作物鏽孢萎凋病菌之 300 餘個特異性片段，選殖、定序上述 88 個特異性片段，並利用南方墨點法進一步確認片段之專一性；期望將來能進一步發展成為作物鏽孢萎凋病之檢測、診斷利器。

本研究室和輔仁大學化學系合作利用微電泳晶片，以間接電化學偵測方式建立 DNA 的偵測系統，並探討電化學直接與間接偵測法的比較並針對靈敏度的提升與可行性。在 DNA 分析方面，目前仍以毛細管電泳配合光學偵測為研發的主要趨勢，其優勢為樣品以螢光形式釋放出的能量來進行分析，光電倍增管作為偵測，便不易受背景電流影響，造成偵測上的困難；而缺點是儀器昂貴且龐大。在研究中分別以電化學直接與間接偵測法來尋求最適化條件做為參數。因此以微電泳晶片銜接電化學偵測器來分析已達樣品消耗量少(樣品進樣量由 μ L 等級下降至 pL 等級)、分離時間短(整體滯留時間由數十分鐘縮短至 1 分鐘)、溶劑消耗量少、操作簡易、總體操作時間符合微小化之未來性的優點。期望將來能以電泳式晶片配合電化學偵測來取代現有以 EtBr 染色之平板電泳分析法。但現階段仍有待解決的問題，例如 DNA 樣品容易吸附於流道管壁造成滯留時間的飄移與雜訊

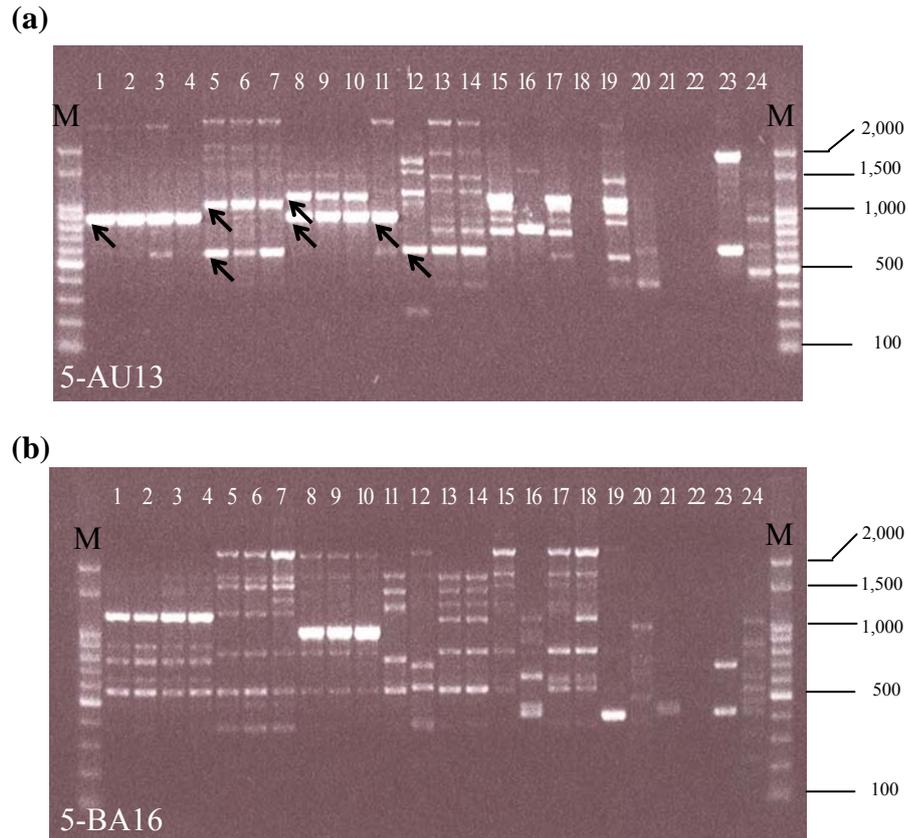
的產生、和樣品在系統中解析度的提升。

引用文獻

- 王正如。2004。利用 AFLP 指紋分析尋找尖镰胞菌分化型特異性 DNA 片段。輔仁大學生命科學研究所碩士論文。
- 周佳宏。2000。植物萎凋病原菌-尖镰胞菌 (*Fusarium oxysporum*) 偵測分子標記之研發。輔仁大學生物學研究所碩士論文。
- 廖竟好。2003。以 RAPD 分析尖镰胞菌 (*Fusarium oxysporum*) 各分化型之特殊 DNA 片段。輔仁大學生物學研究所碩士論文。
- 孫守恭、黃振文。1996。台灣植物镰胞菌病害。世維出版社。台中市，170 頁。
- Caetane-Anolles, G., Bassam, B. J., Gresshoff, P. M., 1992. *Bio/Technology* 9:553-557.
- Clerc, A., Manceau, C., Nesme, X., 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1180-1187.
- Kakouli, D.T., Casey, D. G., Burnell, A. M., 2001. *J. Econ. Entomol.* 94:989-997.
- Luis, F.C., Uygun, A., Serra, H., Jose, M., Leitao, 2001. *Sci. Hort.* 87:261-273.
- Mueller, G.U., Wolfenbarger, L. L., 1999. *Trends Ecol. Evol.* 14:389-394.
- Reineke, A., Karlovsky, P., Zebitz, C.P.W., 1999. *Bull. Entomol. Res.* 89:79-88.
- Vos, P., Rene, H., Marjo, B., Martin, R., Theo, van de Lee, Miranda, H., Adrie, F., Jerina, P., Johan, P., Martin, K., Marc, Z., 1995. *Nucl. Acid. Res.* 23:4407-4414.
- Welsh, J., McClellan, M., 1990. *Nucl. Acid. Res.* 18:7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. Tingey, S. V., 1990. *Nucl. Acid. Res.* 18:6531-6535.

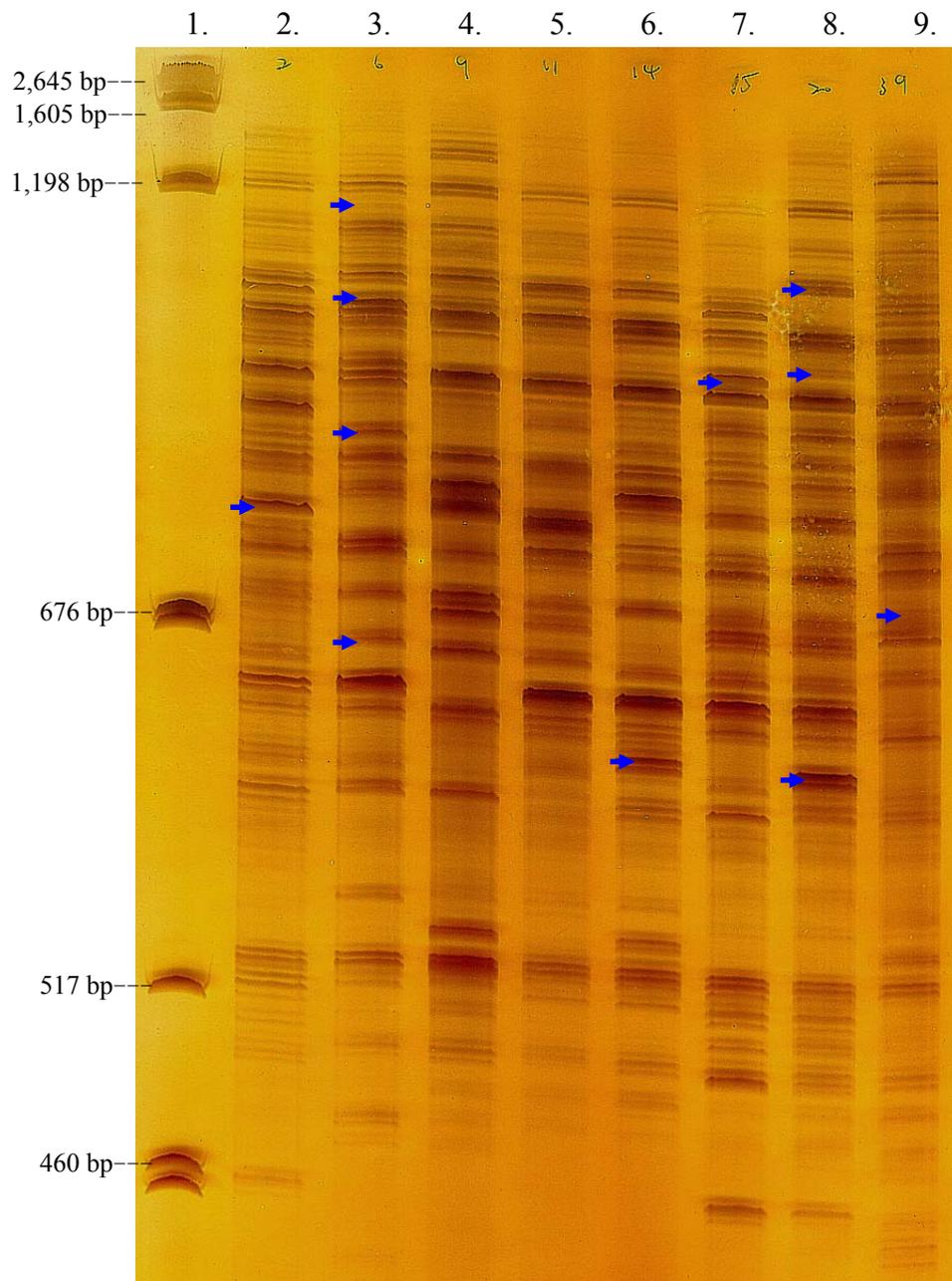
誌 謝

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局補助研究經費(91 農科-7.2.2-檢-B13、92 農科-1.8.2-檢-B4、93 農科-1.9.2-檢-B1、94 農科-13.3.2-檢-B1)，又蒙中興大學黃振文教授、嘉義大學陳瑞祥教授讓贈菌株，謹此誌謝。



圖一. 尖鏟胞菌基因組經 RAPD 電泳分析結果

使用 RAPD 引子(a)5-AU13；(b)5-BA16 對 18 株尖鏟胞菌進行 PCR (R-1 程式，1.5 mM MgCl₂) 反應後利用 1.4% 膠體分離結果。圖中 1~18 分別代表分離自：*F. oxysporum* f. sp. *lilii*(G16；G16-2；FF2；F16)、*F. oxysporum* f. sp. *lactucum* (LFO-11-13；FO31-14；LFO-32-14)、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (CCRC32107；CCRC32108；FOL-4)、*F. oxysporum* f. sp. *niveum* (FNH0103-2)、*F. oxysporum* f. sp. *raphani* (FOR04-0；FOR4566-1；FOR4566)、*F. oxysporum* f. sp. *gladioli*(FF-5；FF-6；FF-8；FF-32)之不同分化型病原性尖鏟胞菌；19~24 為 *F. oxysporum* (Soil4507)和植物基因組 DNA(分別為百合；萵苣；蕃茄；蘿蔔；唐菖蒲)。左下角數字表示引子編號，M 為標準分子量(100 bp ET marker)。



圖二. 以 M-AC 為選擇性放大引子之圖譜，箭頭處為具特異性之 DNA 片段。使用 AFLP 技術配合銀染 PAGE 膠體，找尋分化型間特異性 DNA 片段。圖中 1~9 分別代表分離自：1 為 pGEM marker；2 為 *F. oxysporum* f. sp. *lili* (G16-2)；3 為 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOCub1010)；4 為 *F. oxysporum* f. sp. (Soil4507)；5 為 *F. oxysporum* f. sp. *lactucum* (FO31-14)；6 為 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (CCRC32108)；7 為 *F. oxysporum* f. sp. *mormodicae* (FOM4717)；8 為 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (FNH0103-2)；9 為 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (FF-5)。