

荔枝露疫病菌檢測用分子標記之建立

陳隆鐘^{1,4} 李崇正¹ 鍾依紋¹ 安寶貞² 葉瑩³

1. 臺中市 國立中興大學植物病理學系
 2. 臺中縣霧峰鄉 臺灣省農業試驗所
 3. 台北市 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局
 4. 聯絡作者：電子郵件 lcchen@dragon.nchu.edu.tw；傳真 04-2857990
- 接受日期：中華民國 87 年 11 月 30 日

摘 要

陳隆鐘、李崇正、鍾依紋、安寶貞、葉瑩。1998. 荔枝露疫病菌檢測用分子標記之建立。植病會刊 7:189-200.

利用隨機增幅核酸多型性分析，篩選荔枝露疫病菌 (*Peronophythora litchii*) 專一性核酸標識，由供試引子中選拔出引子 OPW-02 (5'-TCGCAGGTTTC-3')，可將供試之荔枝露疫病菌株基因體核酸增幅出 595 bp 之專一性核酸片段。利用載體 pCR II-TOPO 進行此 595 bp 專一性核酸片段之選殖，嵌入片段經非放射性標定後製備為核酸探針 pR4，經南方氏雜合反應結果顯示 pR4 與荔枝露疫病菌 29 株菌株皆可產生專一性核酸雜合訊號，而與對照組荔枝酸腐病菌 (*Geotrichum ludwigii*)、7 種疫病菌 (*Phytophthora spp.*)、4 種腐霉病菌 (*Pythium spp.*) 菌株，則皆無訊號產生。將此專一性核酸片段進行核甘酸定序，並由此序列衍生設計出正向引子 R4F7、R4MF245、R4MF258 及反向引子 R4R562、R4R592，其中以引子對 R4MF245 (5'-GCTCCAAGATGTTGGTTGGGATCGG-3') / R4R562 (5'-GATCTACAGCACAGCCCAAAGAAGG-3') 利用聚合酵素連鎖反應 (PCR) 偵測荔枝露疫病菌，可由供試之荔枝露疫病菌株之基因體核酸增幅得一 317 bp 專一性的核酸片段，而對照組疫病菌株，則皆無訊號產生。利用此專一性引子對 R4MF245 / R4R562 PCR 於荔枝露疫病菌基因體核酸之偵測時，其靈敏度可達 500 pg；若輔以 pR4 核酸探針進行南方氏雜合反應，其靈敏度可達 50 pg。

關鍵詞：荔枝露疫病菌、隨機增幅核酸多型性分析、聚合酵素連鎖反應

緒 言

台灣記載之荔枝樹病害迄今計有六種，包括炭疽病、葉枯病、煤病、病、露疫病 (2) 及酸腐病 (1)。其中以荔枝露疫病在荔枝產期對產量有決定性的影響，當此病害大發生時，產量必定銳減 (10)。目前荔枝露疫病除在臺灣有所記載外 (5, 10)，大陸地區亦有文獻報告 (9)。引起荔枝露疫病的病原真菌為露疫菌 (*Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al.)，該菌屬卵菌門 (*Oomycota*)，卵菌綱 (*Oomycetes*)，霜霉目 (*Peronosporales*) 露疫菌科 (*Peronophythoraceae*)，露疫菌屬 (*Peronophythora*)。目前荔枝露疫病菌之鑑定仍以其外觀形態、生理生化特性及病原性之測定為主 (5, 9, 11)，發展專一、靈敏及快速的偵測診斷技術將可能有助於病害生態和防治之研究。於 1990 年隨機增幅核酸多形性分析 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 發展以後 (18, 20)，為核酸分析技術開闢了新的領域。RAPD-PCR 分析可對不同物種

(species) 之間，甚或種內的不同生理小種 (race)、菌系 (strains) 及菌株之間加以區分 (19)，使得應用範圍大為增加，其對於遺傳演化的研究，亦有重要的參考價值 (17)。此外，對隨機增幅核酸多形性分析所得之專一性核酸片段，進行選殖與核甘酸序列定序，可由此序列衍生設計出專一性的引子對 (sequence-specific primers)，再利用 PCR 技術的靈敏性，增幅出此特定的核酸標識，如此可避免 RAPD 反應形成多形性條帶的特性，減少電泳膠體判讀的困難，以作為偵測特定病原菌的依據 (13, 21)，或對特定物種進行鑑定。利用專一性引子對，可由染病植株中抽取的少量核酸，將病原菌特有的核酸序列進行增量 (7, 18, 20)，不但可由電泳膠體上觀察增量的核酸片段，並可用核酸探針雜合的方法予以進一步確認，而達到快速偵測診斷病原菌之目的。本研究主要在應用 RAPD 反應分析隨機引子所產生核酸多形性增幅條帶，以篩選荔枝露疫病菌基因庫中專一性的 DNA 標記，並利用此專一性核酸標記片

段衍生設計更專一性引子對，再利用 PCR 增幅技術，進行露疫菌專一性偵測。

材料與方法

荔枝露疫病菌總量DNA之抽取

以直徑 10 mm 之打孔器在培養於 5 % V8 蔬菜汁瓊脂培養基 (5 % Campbell V-8 juice, 0.2 % CaCO₃, 2 % agar, 7000 rpm 離心 10 min; 簡稱V-8)的露疫病菌菌落邊緣取出瓊脂塊(agar disc), 移植至含有 5 % CV-8 蔬菜汁的馬鈴薯蔗糖培養液 (Potato Dextrose Broth, Difco, USA), 培養四、五天後, 將菌絲收集, 並以冷凍乾燥機 (Labconco, LYPH-LOCKR6, Kansas, USA) 進行冷凍乾燥備用。荔枝露疫菌全量核酸之萃取方法主要根據 Garber 和 Yoder 兩氏 (8) 及 Yoon 氏等人 (22) 之方法, 加以修改後進行 (3)。純化所得之 DNA 經濃度定量後, 供 RAPD 試驗的模版及各種分析之 DNA 來源。供試荔枝露疫病菌菌株列於表一, 對照之菌株包括疫病菌、腐霉病菌、荔枝酸腐病菌等, 及供試之荔枝樹來源分別列於表二。

表一、供 RAPD 及 PCR 試驗的荔枝露疫病菌之菌株來源
Table 1. Origins of isolates of *Peronophythora litchii* used for random amplified polymorphic DNA (RAPD) and polymerase chain reaction (PCR) analysis

Code NO.	Isolate NO.	Location
1	PL003	(Chunghsin Village, Nantow) 南投 中興新村
2	PL004	(Chunghsin Village, Nantow) 南投 中興新村
3	PL005	(Chunghsin Village, Nantow) 南投 中興新村
4	PL007	(Chunghsin Village, Nantow) 南投 中興新村
5	PL011	(Chunghsin Village, Nantow) 南投 中興新村
6	PL012	(Chunghsin Village, Nantow) 南投 中興新村
7	PL020	(Tsaotun, Nantow) 南投 草屯
8	PL026	(Tsaotun, Nantow) 南投 草屯
9	PL027	(Tsaotun, Nantow) 南投 草屯
10	PL018	(Shuangtung, Nantow) 南投 雙冬
11	PL002	(Taiping, Taichung) 台中 太平
12	PL013	(Taiping, Taichung) 台中 太平
13	PL024	(Chuchi, Chiayi) 台中 太平
14	PL010	(Minhsiung, Chiayi) 嘉義 民雄
15	PL016	(Minhsiung, Chiayi) 嘉義 民雄
16	PL023	(Minhsiung, Chiayi) 嘉義 民雄
17	PL025	(Shueili, Nantow) 南投 水里
18	PL028	(Shueili, Nantow) 南投 水里

隨機增幅核酸多型性分析反應條件之測定

以荔枝露疫病菌 *P. litchii* (PL020) 及滿天星疫病菌 *Phytophthora capsici* Leonian (9049) 兩菌株 DNA 為模板, 取 OPW-02 引子 (Operon Technologies Inc., lameda, CA,

U.S.A.) 進行 RAPD 初步試驗, 比較各種反應物在不同濃度及不同增幅條件下其 RAPD 增幅結果之差異。

引子的篩選

首先取 8 株荔枝露疫菌 (*P. litchii*) (PL011、PL012、PL017、PL020、PL018、PL002、PL013 及 PL023) 及 8 種不同種之疫病菌 (*Phytophthora* spp.) (92161、94001、9054、9049、8870、92199、95001 及 89153) 菌株的 DNA 為模版 DNA。利用 Operon Technologies 公司所製造的 60 個引子 (KitA、KitB 及 KitW) 測試, 而隨機篩選出 12 個增幅良好且具再現性 (reproducibility) 的引子 OPA-03、OPA-09、OPA-12、OPB-01、OPB-06、OPB-07、OPB-10、OPB-11、OPB-18、OPB-19、OPW-02、OPW-05, 並以此 12 個引子繼續測試供試荔枝露疫病菌、荔枝酸腐病菌及分離自其它作物的疫病菌、腐霉病菌菌株之隨機增幅多形性分析, 以篩選僅對露疫病菌產生專一性產物片段的引子。

隨機引子多形性增幅片段之選殖 (cloning)

將專一性增幅產物片段以 TOPO TA Cloning 套組 (Invitrogen, CA, USA) 之 pCR II-TOPO 作為選殖過程的載體 (vector), 取 RAPD 增幅產物 0.5 ~ 2 μ l, 加無菌水至 4 μ l, 與 1 μ l pCR II-TOPO 均勻混合, 置於室溫下反應 5 分鐘, 即完成黏接反應 (ligation)。

將完成黏合作用的質體和勝任細胞 (competent cell) 均勻混合後, 於冰上作用 30 分鐘, 加入 800 μ l LB 液體培養基 (Bacto-tryptone medium 1 %; Bacto-yeast extract 0.5 %; NaCl 1 %), 於 37 C 下振盪培養 1 小時。取此培養菌液塗抹於含有 ampicillin (50 μ g / ml)、4 μ l IPTG (20 mM)、40 μ l X-gal (80 μ g / ml) 的 LB 固態培養基上於 37 C 下培養 16 小時後, 即會出現菌落, 若為白色的菌落則可能為含有選殖片段的轉形株 (transformants), 而藍色的菌落則表示不含有選殖片段者。

核酸探針 (DNA probe) 之製備及南方漬染分析

依據 Southern 氏 (14) 實驗方法, RAPD 產物經瓊脂凝膠電泳分析後, 將膠體浸於 0.2 N HCl 溶液中緩慢搖盪 5 分鐘, 進行去嘌呤作用 (depurination), 以清水漂洗二次, 再於變性溶液 (denature solution: 0.5 N NaOH; 1.5 M NaCl) 中緩慢搖盪 20 分鐘, 並重覆一次後, 以清水漂洗二次。加入中和溶液 (neutralization solution: 1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl) 以中和其鹼性, 緩慢搖盪 20 分鐘, 再重覆一次, 即可將瓊脂凝膠置於已被 2X SSC 緩衝液 (0.3 M NaCl; 0.03 M sodium citrate) 潤溼的 Immobilon-S membrane 濾膜上, 使用 MilliBlot-VP vacuum transfer system (Millipore, American Bionetics, Inc. U.S.A.) 進行轉

表二、供 RAPD 及 PCR 試驗的荔枝露疫菌、酸腐病菌、疫病菌、腐霉病菌之菌株，及對照的荔枝樹來源

Table 5. Origins of isolates of *Peronophythora litchii*, *Geotrichum ludwigii*, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. And *Litchi chinensis* used for random amplified polymorphic DNA (RAPD) and polymerase chain reaction (PCR) analysis

No	Fungal Specie	Isolate No.	Host Plant	Location
1	<i>Peronophythora litchii</i>	PL003	<i>Litchi chinensis</i> (荔枝)	(Chunghsin Village, Nantow) 南投 中興新村
2	<i>P. litchii</i>	PL013	<i>Litchi chinensis</i> (荔枝)	(Taiping, Taichung) 台中 太平
3	<i>P. litchii</i>	PL020	<i>Litchi chinensis</i> (荔枝)	(Tsaotun, Nantow) 南投 草屯
4	<i>P. capsici</i>	92161 PCapb6-1A1	<i>Piper longum</i> (荖花)	(Tsaotun, Nantow) 南投 草屯
5	<i>P. capsici</i>	94001 PCa Pb11-1A1	<i>Piper longum</i> (荖花)	(Shuantung, Nantow) 南投 雙冬
6	<i>P. capsici</i>	9054 PCa D1-1A1	<i>Dahlia hybride</i> (大理花)	(Puli, Nantow) 南投埔里
7	<i>P. capsici</i>	9049 PCa Bb5-1A1	<i>Gypsophila paniarlate</i> (滿天星)	(Houli, taichung) 台中 后里
8	<i>P. capsici</i>	8870 PCa A1	<i>Capsicum annuum</i> (辣椒)	(Yuanchang, Chiai) 嘉義 元長
9	<i>P. capsici</i>	92199 PCa 27-1A1	<i>Solanum melorgena</i> (茄子)	(Chiai) 嘉義市
10	<i>P. capsici</i>	95001 PCa 33-1A1	<i>Cycopersicum esculentum</i> (蕃茄)	(Liuchiao, Chiai) 嘉義 六腳
11	<i>P. capsici</i>	89153 PCa pl-1A1	<i>Carica papaya</i> (木瓜)	(Hsinkang, Chiai) 嘉義新港
12	<i>P. capsici</i>	92228 PCa 28-2A1	<i>Capsicum annuum</i> (辣椒)	(shini, Nantou) 南投 信義
13	<i>P. cinnamomi</i>	PCiA8-1 A2	<i>Persea americana</i> (酪梨)	(Jungpu, chiai) 嘉義中埔
14	<i>P. cinnamomi</i>	94006 PCiA10-1A2	<i>Persea americana</i> (酪梨)	(Chiai) 嘉義市
15	<i>P. citrophthora</i>	95010 PCC15-2	<i>Citrus spp.</i> (柑桔)	(Jiaushi, Ilan) 宜蘭礁溪
16	<i>P. citrophthora</i>	95004 PCC14-1	<i>Citrus spp.</i> (柑桔)	(Jiaushi, Ilan) 宜蘭礁溪
17	<i>P. colocasiae</i>	Colocasia formosana (芋頭)	(Shueili, Nantow) 南投 水里	
18	<i>P. cryptogea</i>	94011 PCrG8-1	<i>Gerbera jamesonii</i> (非洲菊)	(Taichung) 臺中市
19	<i>P. drechsleri</i>		<i>Cucumis sativus</i> (胡瓜)	(Shikou, Chiai) 嘉義 溪口
20	<i>P. parasitica</i>	90146 PPPU1-1A1	<i>scindapsus aureus</i> (黃金葛)	(Tianewi, Changhua) 彰化 田尾
21	<i>P. parasitica</i>	9241 PPD2-1A2	<i>Diffenbachia amoena</i> (萬年青)	(Taitung) 臺東
22	<i>P. parasitica</i>	90174 PPA1-1A2	<i>Anthium sp.</i> (火鶴花)	(Jungpu, Chiaia) 嘉義 中埔
23	<i>P. parasitica</i>	90195 PPD1A2	<i>diffenbachia amoena</i> (萬年青)	(Tianewi, Changhua) 彰化 田尾
24	<i>P. parasitica</i>	PPT4-1	<i>Nicotiana tabacina</i> (煙草)	(Jungpu, Chiai) 嘉義 中埔
25	<i>Pythium splendens</i>	Piper longum (荖花)		
26	<i>Py. aphanidermatum</i>			
27	<i>Py. ultimum</i>			
28	<i>Py. ultimum</i>			
29	<i>Geotrichum ludwigii</i>	GL06	<i>Litchi chinensis</i> (荔枝)	(Shueili, Nantow) 南投水里
30	<i>G. ludwigii</i>	GL07	<i>Litchi chinensis</i> (荔枝)	(Shueili, Nantow) 南投水里
31	<i>Litchi chinensis</i>	LC01	none	(Taiping, Taichung) 台中 太平
32	<i>Litchi chinensis</i>	LC02	none	(Tsocheng, Nantou) 南投 草屯

漬1小時，然後將濾膜取出，於 2X SSC 漂洗後，將吸附有 DNA 的面朝上，置於乾淨的濾紙 (Whatman™ 3MM) 上，以 80 C 烘箱烘乾 20 分鐘。完全乾燥後，置於 UVC-515 Ultraviolet Crosslinker (ULTRA-LUM, Inc. U.S.A.) 內進行聯結 (cross-linking)。最後將此濾膜置於反應袋中，保存於 4 C 備用。

選殖成功之質體，經限制酵素 *EcoRI* 剪切嵌入片段，並將嵌入片段回收以非放射性之 NEBlot™ Phototope™ 套組 (NEW ENGLAND BIOLABS. Inc., MA, USA) 方法進行標幟。將標幟好之核酸片段，保存於冷凍櫃中備用，以備進行核酸雜合反應。將前述經聯結反應後的濾與標示之核酸片段放入 68 C 之旋轉定溫烘箱 (Maxi Oven, Hybaid) 進行核酸雜合 (hybridization) 反應，之後將濾膜取出，進行偵測反應。

偵測反應分析乃使用 Phototope™-Star Detection Kit (NEW ENGLAND BIOLABS. Inc., MA, USA) 進行。俟偵測反應完成後，取出濾膜，以 X-ray 底片 (Hyperfilm™-MP, Amersham, Sweden) 進行曝光及偵測訊號反應估算。

專一性探針之核甘酸定序 (sequencing) 與分析

將嵌入增幅產物片段之重組質體，進行核甘酸定序，以了解其嵌入 DNA 所可能攜帶之基因訊息。核酸序列解讀分析，依據 Sanger 氏等人 (12) 的鏈終止原理 (chain-termination method)，以 T7 Sequenase version 2.0 DNA sequence kit (United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio USA) 進行定序。利用 PC/GENE (IntelliGenetics Inc. USA) 與 LASERGENE (DNASTAR

Inc. USA) 電腦軟體進行核苷酸序列之分析, 包括內限制酵素切位、轉譯架構、引子等初級結構的分析。

專一性引子設計及專一性測試分析

P. litchii 之專一性核酸探針 pR4, 經核苷酸定序後, 並由此序列衍生設計正向引子 (forward primer) 及反向引子 (reverse primer), 以利用聚合酵素連鎖反應, 對荔枝露疫病菌菌株進行專一性增幅反應。將設計完成之引子均委由湃瑪仕有限公司合成, 引子序列之設計乃根據專一性核酸探針 pR4 定序之結果, 實驗中所使用之引子及其序列如表三所示, 引子名內的數字為其在探針 pR4 核酸序列上之相對應位置。

將內含有不同引子與 PCR 反應物的微量離心管置入 OmniGene 迴溫循環器中進行不同黏合 (annealing) 溫度的聚合酵素連鎖反應, 其增幅測試條件為 (I) 94 C 2 分鐘, 1 個循環 (cycle); 94 C 60 秒, 55 C 90 秒, 72 C 60 秒, 35 個循環; 72 C 7 分鐘, 1 個循環。(II) 94 C 2 分鐘, 1 個循環; 94 C 60 秒, 60 C 90 秒, 72 C 60 秒, 35 個循環; 72 C 7 分鐘, 1 個循環。(III) 94 C 2 分鐘, 1 個循環; 94 C 60 秒, 65 C 90 秒, 72 C 60 秒, 35 個循環; 72 C 7 分鐘, 1 個循環。上述條件分別進行試驗。

取 10 μ l 增幅後的 DNA 產物, 觀察聚合酵素連鎖反應的結果。各引子以 R4F7 / R4R592、R4F7 / R4R562、R4MF258 / R4R562、R4MF245 / R4R592 及 R4MF245 / R4R562 等組合於不同增幅條件下測試其最適反應條件, 以篩選出專一性的引子對。

另將瓊脂凝膠上的 DNA 轉漬於尼龍濾膜上。利用 RAPD 試驗中所篩選出的專一性核酸探針 pR4, 經核酸雜合作用及偵測反應, 以 X-ray 底片進行曝光。同時觀察應用聚合酵素連鎖反應及南方氏漬染分析, 對 *P. litchii* 基因體核酸偵測的敏感度。

結 果

不同濃度反應物及增幅反應的循環次數對 RAPD 的影響荔枝露疫菌及滿天星疫病菌二菌株模版 DNA 增幅最適量為 50 ~ 200 ng, 而 dNTPs 最佳反應濃度是 200 ~ 400

表三、荔枝露疫菌之專一性供試引子篩選

Table 5. Sequence-specific primer pairs derived from clone R4

Primer1	direction	Sequence	GC(%)
R4F7	Forward	5' <u>GTT CCG</u> GAC ATG GTT CTA CC-3'	70.3
R4MF245	Forward	5' GCT CCA AGA TGT TGG TTG GA TCG G-3'	77.5
R4MF258	Forward	5' GGT TGG GAT CGG CGC-3'	66.6
R4R562	Reverse	5' GAT CTA CAG CAC AGC CCA AAG AAG G-3'	
R4R592	Reverse	5' <u>CAG GTT</u> CAA CAT CTG TAT GAT C-3'	67.6

¹. underlined sequences were derived from the OPW-02 primer.

μ M; 緩衝液中 Mg^{2+} 濃度為 2 ~ 2.5 mM 時, 荔枝露疫病菌的 DNA 增幅效果最佳。以此菌增幅的結果而言, 引子濃度設計於 0.3 ~ 0.4 μ M 時, 應是較佳的選擇。

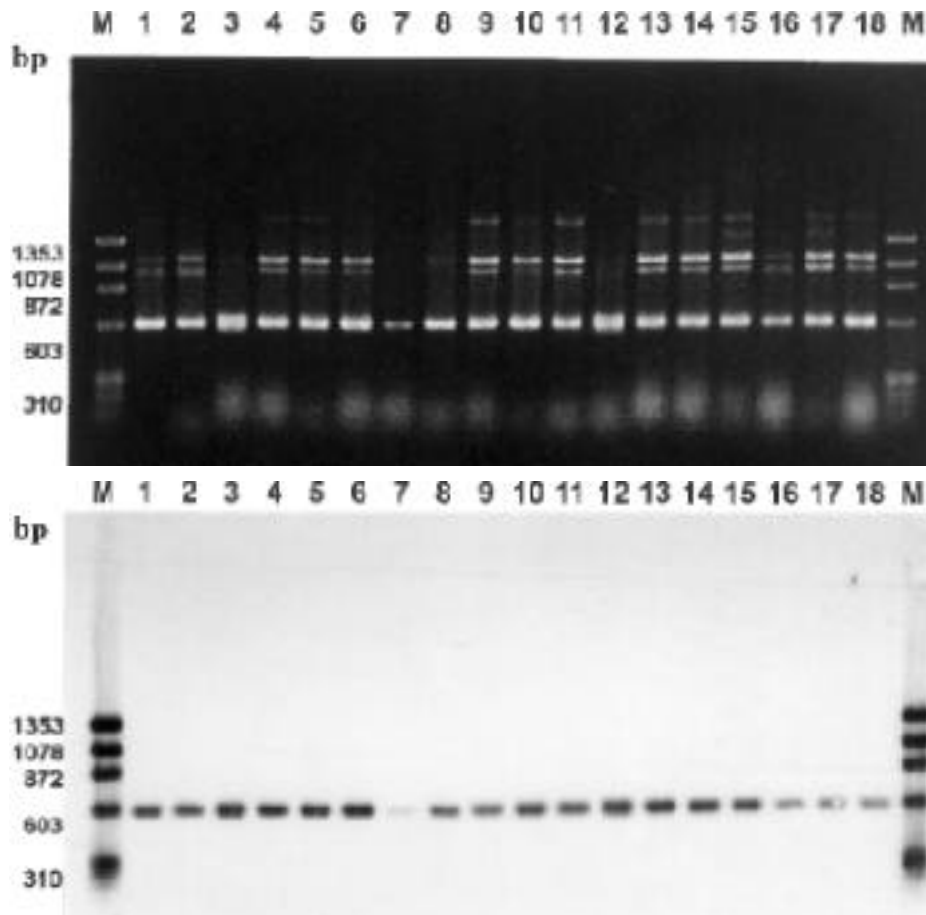
當使用 1 單位 DynaZyme II DNA 聚合酵素時, 則可產生相當清楚的 DNA 增幅條帶, 若再依序提高至 5 單位時, 增幅產物 DNA 僅在量上有所差異, 而產生的條帶大致相同, 所以 1 單位的 DynaZyme II DNA 聚合酵素是最佳的選擇。本實驗共測試八種不同的循環次數 (15、20、25、30、35、40、50 及 60 cycles) 之影響, 當循環次數為 15 循環時, 荔枝露疫病菌菌株皆無產物產生; 而循環次數為 20 循環時, 並不足以產生循環足夠偵測的產物; 當循環次數增加為 25 循環時, 次要條帶 (1 ~ 1.6 kb) 的 DNA 尚較為不足, 辨識較困難; 當循環次數為 30、35 及 40 循環時, 荔枝露疫病菌菌株即可得到完整的產物; 而當循環次數依次由 40 循環增加至 60 循環時, 荔枝露疫病菌菌株所產生之主要及次要條帶的 DNA 量上, 並無明顯的變化, 故以 30 或 35 循環反應次數為最佳的選擇。

引子的篩選

應用 12 個引子進行供試菌株的 RAPD 篩選試驗中, 引子 OPW-02 (TCGCAGGTTC) 可對所有供試之荔枝露疫病菌菌株, 增幅出一條近似 603 bp 專一性 DNA 片段 (圖一 A), 而與供試的荔枝酸腐病菌 (*Geotrichum ludwigii* (Hansen) Sin-Fang, Tzu & Cheng Jing-Chu)、8 種疫病菌 (*Phytophthora* spp.)、4 種腐霉病菌 (*Pythium* spp.) 等對照菌株及荔枝植物體 DNA, 並無此專一性 DNA 片段的生成 (圖二 A、三 A)。藉由此片段設計專一性引子對 (sequence-specific primers) 時, 因其片段大小為 595 bp, 利於聚合酵素連鎖反應的產物生成。故以引子 OPW-02 對荔枝露疫菌增幅所得的 DNA 產物, 進行 *E. coli* 的核酸片段選殖與專一性探針的篩選。

P. litchii 專一性核酸探針 (DNA probe) 之篩選

由 *P. litchii* 部分基因庫 (partial genomic library) 中選殖專一性片段成功之菌株中, 逢機挑選出標號為 R4 的菌株, 以 *Eco*RI 內限制酵素剪切嵌入片段, 經非放射性標定後製備為核酸探針, 並命名為 pR4, 再進行南方漬染分析, 與各供試菌株進行專一性測定。供測試菌株及荔枝植物體之基因體核酸, 以 OPW-2 引子 RAPD 增幅後經瓊脂凝膠電泳後, 將凝膠上的 DNA 轉漬於尼龍濾膜上, 以 pR4 核酸探針進行南方漬染分析。發現所有逢機選取的 *P. litchii* (表一) 與 pR4 探針皆可產生一專一性雜合訊號 (圖一 B), 與相對照的 2 株荔枝酸腐病菌, 8 種疫病菌, 4 種



圖一、(A) 荔枝露疫菌菌株之基因體核酸利用引子 OPW-02 之 RAPD 電泳分析圖譜；(B) 利用選殖自 *P. litchii* PLO20 菌株的 pR4 探針之南方氏雜合反應。

Fig. 1. (A) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of genomic DNA from *Peronophythora litchii* with OPW-02 primer (B) Southern blot hybridization to the RAPD products probed with biotinylated pR4 probe from PL020 of *P. litchii*. Lanes 1 to 18, isolates of *P. litchii* listed in Table 1; lanes M, biotinylated X174 *Hae* digest marker (NEW ENGLAND BIOLABS. INC., MA, U.S.A.).

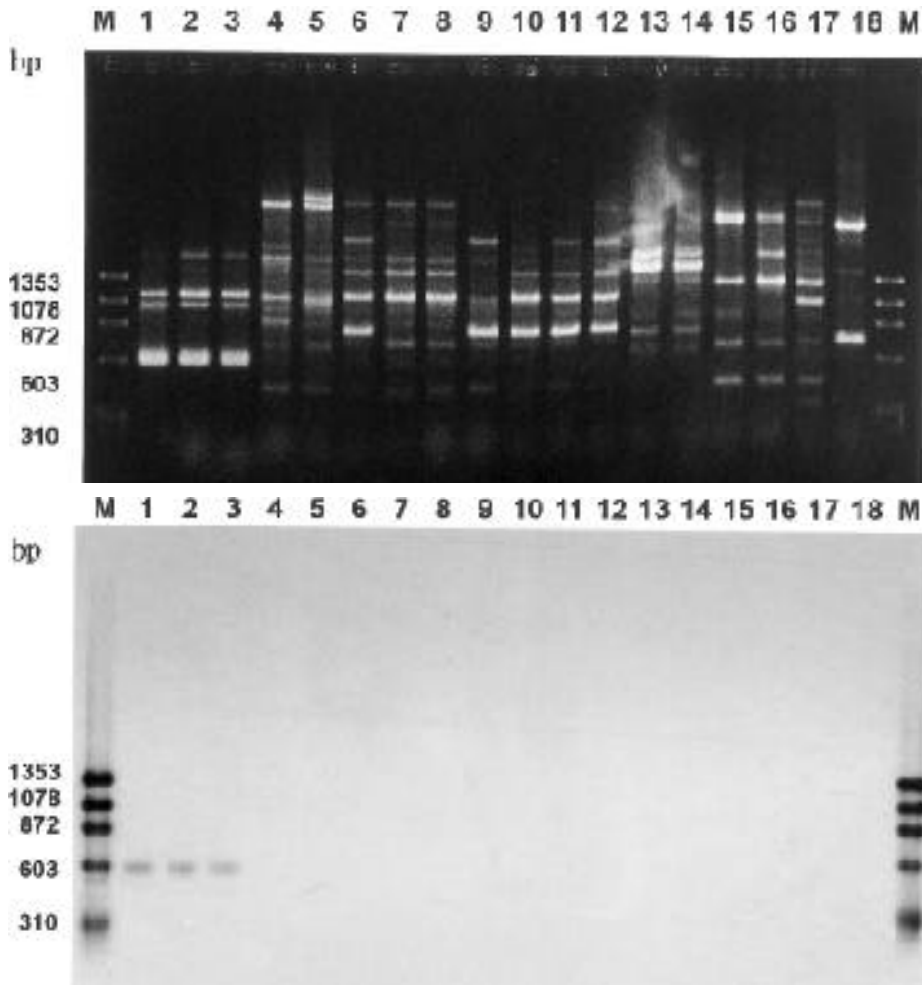
腐霉病菌菌株及荔枝植物體核酸 (表二)，皆無訊號產生 (圖二B、三B)，因此確定選殖株 R4 的質體上帶有荔枝露疫菌所專有的核酸片段。以此 R4 選殖株的嵌入 DNA 片段進行核苷酸定序，設計針對荔枝露疫病菌可產生專一性 DNA 標識的引子對。本實驗針對所篩選出，攜帶專一性增幅產物嵌入片段之選殖株 R4，進行核苷酸定序，結果如圖四所示。

專一性引子設計及其專一性測試分析

本試驗共測試六種不同引子對組合，包括 R4F7 / R4R592、R4F7 / R4R562、R4MF258 / R4R562、R4MF245 / R4R592 及 R4MF245 / R4R562，將其在不同的黏合溫度下進行聚合酵素連鎖反應。

R4F7 / R4R592 引子對於條件 (I) 和 (II) 進行聚合酵素連鎖反應，對荔枝露疫菌菌株會在 530 ~ 630 bp 之間產生

三條專一性的條帶 (圖五 lane 1、7)，而其它供試之疫病菌、腐霉病菌菌株除了產生相近似的大小片段外，亦有其它多形性條帶的生成，或沒有任何 DNA 產物。當黏合溫度提升至 65 C，條件 (III) 時，引子對不能使露疫菌產生任何的條帶 (圖五 lane 13)。引子對 R4MF258 / R4R592 於條件 (I) 進行聚合酵素連鎖反應，對荔枝露疫菌菌株除可產生專一性的 335 bp 的條帶外，對不同採集地的菌株，在 250 ~ 1500 bp 之間還會增幅出 2 ~ 10 條的多形性條帶 (圖五 lane 3)；相較於疫病菌、腐霉病菌供試之菌株，大部份會在 500 ~ 1500 bp 之間產生多形性條帶，少部份則是沒有任何 DNA 增幅產物的生成。以條件 (II) 進行反應時，所增幅的專一性條帶 DNA 量不甚明顯，反而多形性條帶的量明顯增加 (圖五 lane 9)。當使用條件 (III) 進行增幅反應，荔枝露疫菌並不能增幅出 335 bp 的專一性條帶，但會形成極少量的多形性條帶 (圖五 lane 15)，供試之



圖二、(A) 荔枝露疫菌菌株與其它病原菌株之基因體核酸利用引子 OPW-02 之 RAPD 電泳分析圖譜；(B) 利用選殖自 *P. litchii* PLO20 菌株的 pR4 探針之南方氏雜合反應。

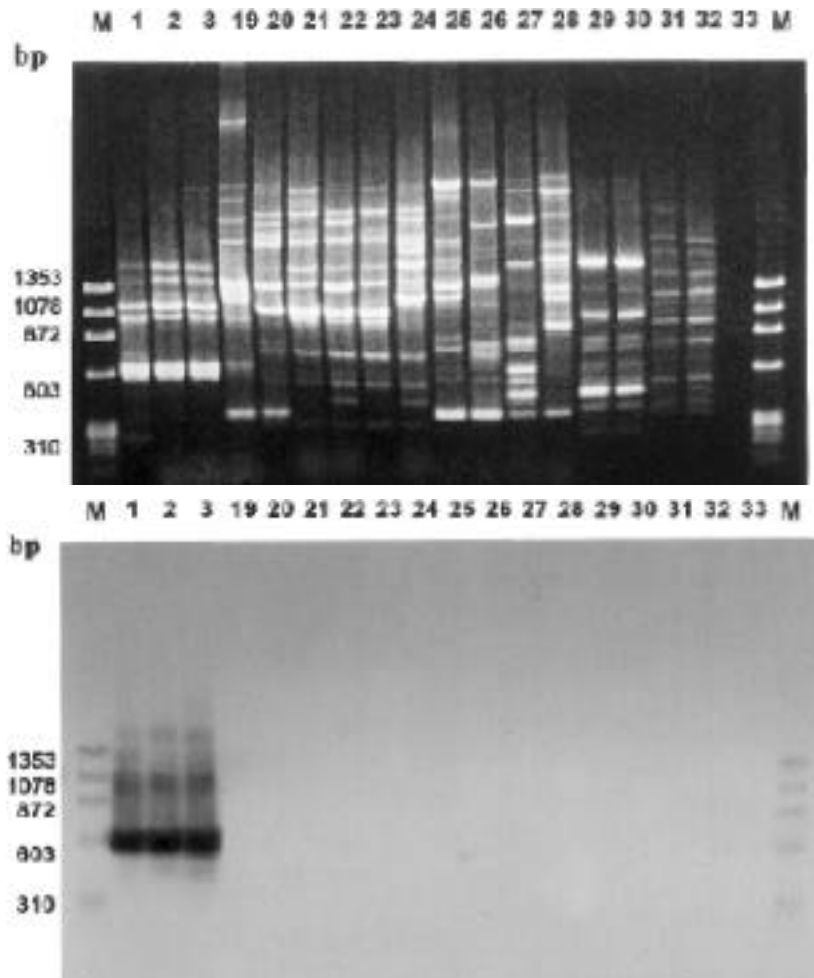
Fig. 2. (A) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of genomic DNA from *Peronophythora litchii* with OPW-02 primer (B) Southern blot hybridization to the RAPD products probed with biotinylated pR4 probe from PL020 of *P. litchii*. Lanes 1 to 3, isolates of *P. litchii*; lanes 4 to 18, isolates of other tested fungi listed in Table 2. lane M, biotinylated X174 *Hae* III digest marker.

疫病菌、腐霉病菌，則無任何增幅產物的生成。以二段式黏合溫度進行 PCR 反應 (degenerate PCR) (22)：(a) 94 C 2 分鐘，1 個循環；(b) 94 C 60 秒，55 C 90 秒，72 C 60 秒，5 個循環；(c) 94 C 60 秒，65 C 90 秒，72 C 60 秒，30 個循環；(d) 72 C 7 分鐘，1 個循環。其增幅結果與條件 (II) 進行反應的結果相似，但在多形性條帶的數量上有所增加 (圖五 lane 19)。

重新設計引子 R4MF258 及 R4R592，增加核苷酸數與調整引子 GC 值百分比，得到引子 R4MF245 及 R4R562 (表三)，重新進行 PCR 篩選試驗。R4F7 / R4R562 引子對於條件 (I)、(II) 及 (III) 進行聚合酶連鎖反應，對荔枝露疫菌菌株皆能在 500 ~ 600 bp 之間產生三條專一性的條

帶 (圖五 lane 2、8、14)，且 DNA 增幅量會隨黏合溫度升高而減少；而其它疫病菌供試菌株則是除了相近似的大小片段，有增幅片段產生外，亦有其餘多形性條帶的生成，或沒有任何 DNA 增幅產物。

R4MF258 / R4R562 引子對於條件 (I)、(II) 進行聚合酶連鎖反應 (圖五 lane 4、10)，與 R4MF258 / R4R592 引子對在條件 (I)、(II) 時的結果 (圖五 lane 3、9)，除在專一性片段位置相差 30 bp 外，其它多形性片段的位置皆相近。R4MF245 / R4R592 引子對於條件 (I)、(II)，對荔枝露疫菌在 350 bp、390 bp 各增幅出一條產物 (圖五 lane 5、11)，但在 DNA 增幅量上，350 bp 者明顯較 390 bp 者為多；所有對照供試菌株，只有少數幾株有 1 ~ 3 條多形性



圖三、(A) 荔枝露疫菌菌株與其它病原菌菌株及荔枝果樹之基因體核酸利用引子 OPW-02 之 RAPD 電泳分析圖譜；(B) 利用選殖自 *P. litchii* PLO20 菌株的 pR4 探針之南方氏雜合反應。

Fig. 3. (A) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of genomic DNA from *Peronophythora litchii*, other tested fungi and litchi with OPW-02 primer (B) Southern blot hybridization to the RAPD products probed with biotinylated pR4 probe from PL020 of *P. litchii*. Lanes 1 to 3, isolates of *P. litchii*; lanes 19 to 30, isolates of other tested fungi listed in Table 2. lane 31 and 32, *Litchi chinensis*, and lane 33, control by water; lane M, biotinylated X174 *Hae* III digest marker.

條帶的生成。R4MF245 / R4R562 引子對於條件 (I)、(II) 及 (III)，針對荔枝露疫菌能增幅出專一性的 317 bp 的條帶 (圖五 lane 6、12、18)，及二條極少量的多形性條帶，分別位於 480 bp 及 690 bp；所有對照供試的荔枝酸腐病菌、疫病菌、腐霉病菌之菌株，在條件 (I)、(II) 下，只有少數幾株能形成一條的增幅條帶 (圖六 lane 15、16)。

綜合本項引子試驗結果，可利用正向引子 R4MF245 及反向引子 R4R562，並設定聚合酵素連鎖反應增幅條件為 (a) 94 C 2 分鐘，1 個循環；(b) 94 C 60 秒，60 C 90 秒，72 C 60 秒，35 個循環；(c) 72 C 7 分鐘，1 個循環。由荔枝露疫菌基因體核酸僅能增幅出一條 317 bp 的主要

條帶，其可作為專一性檢測的依據 (圖六、圖七)。

P. litchii 基因體核酸經序列稀釋成 100 ng、50 ng、10 ng、5 ng、1 ng、500 pg、100 pg、50 pg 及 10 pg，應用專一性引子對 R4MF245 / R4R562 進行聚合酵素連鎖反應，其偵測的敏感度可達 500 pg (圖八 A)；輔以專一性核酸探針 pR4 進行南方氏漬染分析，其在 X-ray 底片上所呈現的訊號可偵測到，50 pg 基因體核酸經聚合酵素連鎖反應所增幅的產物 (圖八 B)，較單以聚合酵素連鎖反應的結果提高十倍。

```

TCGGAGCTTCGGGACATCGTTTCTACCTCANTCGNGAGGTACCCCTTGRATAATGGGATT 50
OPN02→
TCTTGCCGAGGCTTCGGTGGCTTGGTCCATGGTAGCCGCGCATTTTTGGAAATGAACATC 120
ACATGCCACGACGGTACGGGCTGCTGGAGCTAATGTACAGGGGGTCAACATCTGAAAGCG 180
CCCGCAACCGAAGAGCTTCAAGTCAAAGAGAAAACACCCCTCCTCMAATTTGISTGCC 240
GTGAGCTCCANGATGTTGGTTGGGACCGGGGCTAAACAATTGCTATCATAAGITGCTCGC 300
TCACACTTCTCTCCCCCGCTCAGTTCGGAGGGGTTATAAGGTTGGCCCACTTCATGCTA 360
GCTCACTGTACATATTCTACGGGTTTCACAGCGGACCCATTGACCCADCTACITAGCCAC 420
TTTGTGCTCAGAGGCTTCTCCCTCCTGATCAATCTTTGCCAATACAITTGGTAAATAACA 480
CTTAGTATTGGGCTGTCTCTGAATCAAAATCAAGTCCGTCGCGTATGATACCAATCTGCT 540
CTTTTGGGCTGGTCTGTAGTGGCCCTTGGAGTTCATACAGATGTTTTAAGCGTGGGA
←OPN02

```

圖四、轉殖株 R4 之 595 bp 嵌入 DNA 片段的核苷酸序列。

Fig. 4. Nucleotide sequence of the 595 bp RAPD fragment from *P. litchii* isolate PL020 inserted in clone R4.

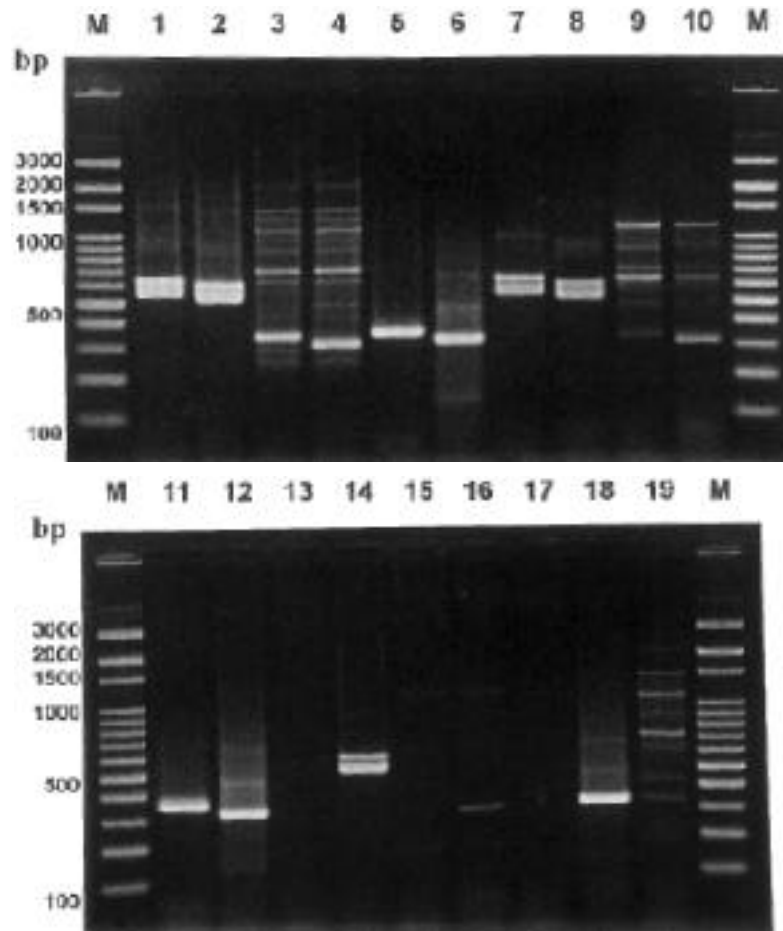
討 論

荔枝露疫病菌是荔枝果樹重要病害，此病原真菌危害近成熟之果實，有時亦可危害花穗 (7) 等部位，但真正之殘存樣式，至目前為止，尚未完全證實。近年來，值久雨不晴之梅雨季節，此病害的發生情形會非常嚴重，因此要防治此病害必須對此病原菌之生態殘存機制瞭解。本研究擬從分子偵測自然界的土壤、水、植物中含菌量之微量核酸，但如將病原菌特有的核酸片段解序並設計引子，再利用聚合酵素連鎖反應進行增量，並輔以核酸探針雜合反應，應可提升偵測靈敏度。

本研究以 RAPD 分析荔枝露疫病菌共同的多形性條帶時，發現有 9 個引子能對所有供試的荔枝露疫病菌，增幅出 1 ~ 4 條的共同條帶 (common band patterns)，其 DNA 增幅產物大小為 350 ~ 3140 bp；而另有 5 個隨機引子可對露疫菌與疫病菌增幅出三個共同條帶，其增幅產物大小分別 600 ~ 1400 bp。而不同採集地的荔枝露疫病菌菌株，除了引子 OPA-03、OPA-09 及 OPB19 可產生差異性較大的 DNA 多形性增幅條帶外，其餘引子對皆可產生相近似的 DNA 多形性增幅條帶。而不同隨機引子對各地採集的露疫菌菌株增幅結果，其所產生的多形性條帶大小和數量都極為相近，如採集自南投中興新村的菌株，並無明顯的歧異性存在 (圖一 lane 1 ~ 7)，因此推測此菌可能由於寄主分別進行共同演化，使得同屬同種的病原菌之間，有較高的遺傳差異。本研究由 RAPD 分析篩選 *P. litchii* 具有的專一性核酸片段，並進行此片段序列解序與分析，由其中

設計適當的核酸片段，合成專一性的引子對 R4MF245 / R4R562，應用聚合酵素連鎖反應，可由 *P. litchii* 菌絲所抽取的少量核酸，將此病原菌特有的序列予以增量，其偵測的敏感度可達 500 pg 基因體核酸，而達到偵測病原菌的目的。本研究的最終目標，是設計一引子作為檢測鑑定的依據，此引子只能夠針對引起荔枝露疫病的病原菌產生增幅反應。因為專一的特性對於病原菌的偵測是相當重要的，為了尋找對荔枝露疫菌具有專一性的引子，故以各組不同之正向和反向引子的組合方式，進行 PCR 的測試，結果顯示 (圖七、八及九) R4MF245 和 R4R562 引子對荔枝露疫菌具有專一性，可藉由 317 bp 增幅產物的有無加以判別。目前這些測試分析的結果，為在實驗室中以露疫菌的基因體核酸偵測所得，將來可針對採集自田間的土壤及果實，設計出最適的偵測方法與步驟，開發出完整的檢測流程。

本研究對臺灣本土發生之荔枝露疫菌之基因體核酸進行 RAPD 選殖與專一性探針分析以確立荔枝露疫菌之本土型 RAPD 模式之建立。如藉由與大陸地區荔枝露疫菌菌株進行 RAPD 分析比較，可就本土型與外來型之菌株同源性或差異性應用於菌株間鑑定與區分之用。此外於 RAPD 反應中所需核酸量甚低，因此許多卵菌門的絕對寄生菌，亦可由侵入寄主組織的少量菌絲，進行分析試驗與露疫菌進行多形性比較，有助於了解荔枝露疫菌在卵菌演化上所站的地位。



圖五、利用不同引子對 R4F7 / R4R592 (1, 7, 13) , R4F7 / R4R562 (2, 8, 14) , R4MF258 / R4R592 (3, 9, 15, 19) , R4MF258 / R4R562 (4, 10, 16) , R4MF245 / R4R592 (5, 11, 17) 與 R4MF245 / R4R562 (6, 12, 18) 及不同黏合 (annealing) 溫度 55C (1-6) , 60 (7-12) , 65 (13-18) 的進行荔枝露疫菌聚合酵素連鎖反應之電泳圖譜。

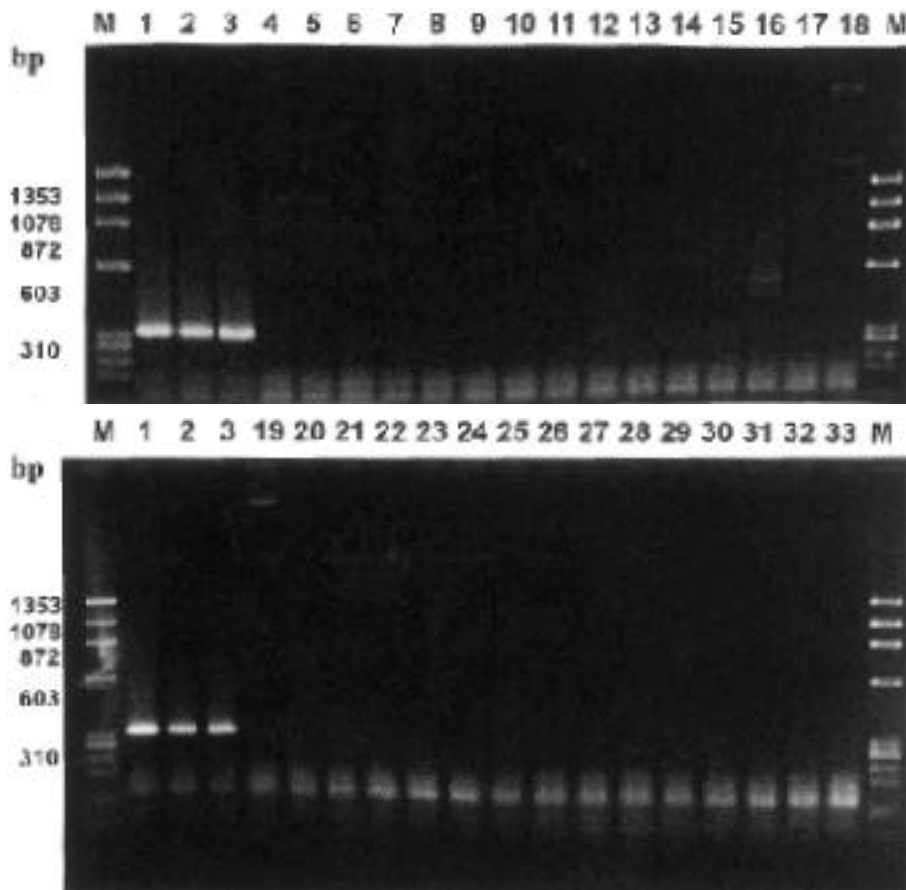
Fig. 5. Polymerase chain reaction products of isolate PL020 of *Peronophythora litchi* using differnt primer pairs and annealing temperatures. Lanes 1, 7 and 13, R4F7/R4R592; lanes 2, 8 and 14, R4F7/R4R562; lanes 3, 9, 15 and 19, R4MF258/R4R592; lanes 4, 10 and 16, R4MF258/r4R562; lanes 5, 11 and 17, r4MF245/R4R592; lanes 6, 12 and 18, R4MF245/R4R562. Lane M, Bio 100 DNa Ladder™ (PROtech Technology Ent. Co., Ltd. R.O.C.). The amplified reaction were (1) one cycle at 94C for 50 s, then 35 cycle at 94C for 60 s, 55C for 90 s, and 72C 60 s, and one cycle at 72C for 7 min (lanes 1-6). (2) one cycle at 94C for 50 s, then 35 cycle at 94C for 60 s, 60C for 90 s, and 72C 60 s, and one cycle at 72C for 7 min (lanes 7-12). (3) one cycle at 94C for 50 s, then 35 cycle at 94C for 60 s, 65c for 90 s, and 72C 60 s, and one cycle at 72C for 7 min (lanes 13-18). (4) one cycle at 94C for 50 s, five cycle at 94c for 60 s, 55C for 90 s, and 72C 60 s, then 30 cycle at 94C for 60 s, 65C for 90 s, and 72C 60 s, and one cycle at 72C for 7 min (lane 19).

謝 辭

本實驗承蒙行政院農委會 87 科技-1.3-糧-26 (2-6B) 計劃經費補助，謹此致最大之謝意。

引用文獻

1. 蔡志濃、謝文瑞. 1998. 荔枝酸腐病之發生及病原菌特性. 植病會刊 7:10-18.
2. 蔡雲鵬. 1990. 臺灣植物病害名彙 (三版) 中華植物保護學會暨植物病理學會出版. 台中, 243-244 頁.
3. 賴學珍. 1995. 露疫菌粒線體核酸探針的選殖與分析. 國立中興大學植物病理學研究所第二十五屆碩士論文.
4. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-10.
5. Chen, C. C. 1961. A species of *Peronophythora* gen. Nov. parasitic on litchi fruit in Taiwan. Special Publ. Coll. Agric., Natl. Taiwan Univ. 10: 1-37.
6. Duncan, J. M., and Torrance, L. 1992. Techniques for the rapid detection of plant pathogens. in: Immunological techniques. Blackwell scientific publications, London,

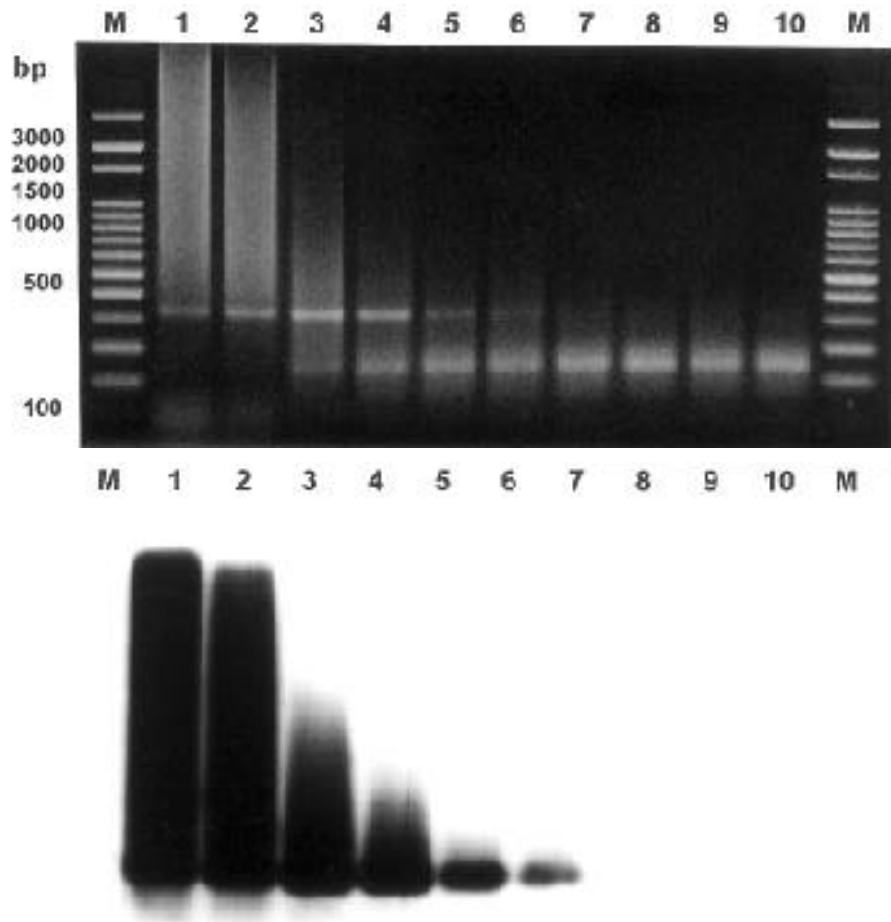


圖六、荔枝露疫菌與其它供試菌株及荔枝果樹基因體核酸利用 R4MF245 / R4R562 引子對，經 PCR 分析後所得到的電泳圖譜。

Fig. 6. Polymerase chain reaction products of isolates of *Peronophythora litchii* and other tested fungi using R4MF245/R4R562 primers. Lanes 1 to 3, isolates of *P. litchii*, lanes 4 to 33, isolates of other tested fungi listed in Table 2; lane M, X174 *Hae* digest marker.

235 pp.

7. Ersek, T., Schoelz, J. E., and English, J. T. 1994. PCR amplification of species- specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (7): 2616-2621.
8. 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.
9. Ho, H. H., Jiayun, L., and Longyin, G. 1984. Observation on asexual reproduction by *Peronophythora litchii*. *Mycologia* 76: 745-747.
10. Kao, C. W., and Leu, L. S. 1980. Sporangium germination of *Peronophythora litchii*, the causal organism of litchi downy blight. *Mycologia* 72: 737-748.
11. Lin, F. C., and Leu, L. S. 1984. Fine structural changes during sporogenesis in *Peronophythora litchii*. *Plant Prot. Bull. (Taiwan, R.O.C.)* 26: 201-217.
12. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
13. 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.
14. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
15. Tooley, P. W., Bunyard, B. A., Carras, M. M., and Hatziloukas, E. 1997. Development of PCR primes from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4): 1467-1475.



圖七、(A) 荔枝露疫菌 PL020 菌株之基因體核酸經系列稀釋為 100 ng、50 ng、10 ng、5 ng、1 ng、500 pg、100 pg、50 pg、10 pg (1-9)，利用 R4MF245 / R4R562 引子對，以聚合酵素連鎖反應增幅後之電泳分析圖譜；(B) 以選殖自 *P. litchii* PL020 菌株的 pR4 為探針之南方氏雜合反應，以偵測其反應的靈敏度。

Fig. 7. (A) Ethidium bromide-stained gel of polymerase chain reaction products amplified from serial dilutions of DNA from *Peronophythora litchii* isolate PL020. (B) Southern blot hybridization to the PCR products probed with biotinylated pr4 probe from PL020 of *P. litchii*. Lane 1, 100 ng; lane 2, 50 ng; lane 3, 10 ng; lane 4, 5 ng; lane 5, 1 ng; lane 6, 500 pg; lane 7, 100 pg; lane 8, 50 pg; lane 9, 10 pg. lane 10, control water; lane M, Bio 100 DNA LadderTM (PROtech Technology Ent. Co., Ltd. R.O.C.) indicated in base pairs to the left.

16. Trout, C. L., Ristaino, J. B., Madritch, M., and Wangsomboondee, T. 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant Dis.* 81: 1042-1048.
17. Tyler, B. M., Forster, H., and Coffey, M. D. 1995. Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Mol. Plant. Microb Interact.* 8 (4): 515-523.
18. Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18: 7213-7218.
19. Whisson, S. C., Drenth, A., Maclean, D. J., and Irwin, J. A. G. 1995. *Phytophthora sojae* avirulence genes, RAPD, and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map. *Mol. Plant. Microb Interact.* 8 (6): 988-995.
20. 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 markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
21. Yoder, W. T., and Christianson, L. M. 1998. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section

Fusarium. Fungal. Gen. Bio. 23: 68-80.

method for rapid small scale preparation of fungal DNA.

22. Yoon, C. S., Glawe, D. A., and Shaw, P. D. 1991. A

Mycologia 83 (6): 835-838.

ABSTRACT

Chen, L. C.^{1,4}, Lee, C. C.¹, Chung, Y. W.¹, Ann, P. J.² and Yeh, Y.³ 1998. Establishment of molecular markers for detection and diagnosis of *Peronophthora litchii*. Plant Pathol. Bull. 7:189-200. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ² Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ³ Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine; ⁴ Corresponding author: E-mail:lcchen@dragon.nchu.edu.tw ; Fax:04-2857990)

Twelve primers were used for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis to find specific DNA markers of *Peronophthora litchii*. There were nine primers which could amplify the specific bands patterns by RAPD. The primer OPW-02 (5'- TCGCAGGTTC-3') amplified a distinct fragment, subsequently cloned in pCR II-TOPO vector, that was specific to *P. litchii*. The cloned DNA fragment labeled with non-isotope biotin, named pR4, was used as a probe in Southern blotting analysis. There was specific signal to *P. litchii* and the same signal was not shown in 7 species of *Phytophthora*, 4 species of *Pythium*, and *Geotrichum candidum* in Southern blotting analysis. Five primers were designed and synthesized according to the sequence of 595-bp DNA fragment: R4F7, R4MF245, R4MF258 are forward primers, and R4R562, R4R592 are reverse primers. The primer pairs R4MF245 (5'- GCTCCAAGATGTTGGTTGGGATCGG-3') and R4R562 (5'-GATCTACAGCAC GCCCAAAGAAGG-3') could amplify a specific 317-bp fragment from genomic DNA of *P. litchii* by polymerase chain reaction (PCR). As little as 500 pg of genomic DNA of *P. litchii* could be detected by the developed PCR conditions. The sensitivity can be even increased up to 50 pg of DNA from *P. litchii* by incorporation of Southern blotting analysis with probe pR4. We hope to use these techniques for detecting *P. litchii* on the fruit and in the soil directly from the field to understand the ecological role, disease development and the genetic diversity from oomyces in advance.