

## 利用聚合酶連鎖反應偵測百合鏟孢菌萎凋病菌

高衛婷<sup>1</sup> 施儼育<sup>1</sup> 謝文瑞<sup>1,2</sup>

1. 台中市 國立中興大學植物病理學系

2. 聯絡作者，電子郵件：[whhsieh@dragon.nchu.edu.tw](mailto:whhsieh@dragon.nchu.edu.tw)；傳真：04-22859009

接受日期：民國91年6月30日

### 摘要

高衛婷、施儼育、謝文瑞. 2002. 利用聚合酶連鎖反應偵測百合鏟孢菌萎凋病菌. 植病會刊11:112-122.

由病原菌 *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lilii* Imle 所引起之百合鏟孢菌萎凋病是目前台灣百合栽培的主要限制因子之一。一般分離鑑定百合鏟孢菌萎凋病病原菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lilii*) 之方法，是先將疑似罹患鏟孢菌萎凋病之百合植株其種球莖基部、鱗片及底根等部位做組織分離，或取罹病百合植株根圈土壤，利用五氯硝基苯 (pentachloronitrobenzene, PCNB) 選擇性培養基分離。將罹病組織或帶菌土壤中分離出之 *Fusarium* spp. 經由形態上之鑑定為 *F. oxysporum* 後再以接種百合的方式確定其病原性，以確認所分得為 *F. oxysporum* f. sp. *lilii*。上述之病原性測定需耗時長達四星期以上，耗日費時，故本試驗嘗試應用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術以開發一快速、方便且準確的病原菌偵測方法。首先由溪湖、埔里及豐原等地百合栽培田之罹病植株與土壤中取樣，以 PCNB 選擇性培養基分離，經形態上鑑定後共收集 *F. oxysporum* 之菌株 74 株，將此 74 個供試菌株以上述之接種方式做病原性的測定，結果有 30 株菌株對百合具病原性，另 44 株則否。選取 3 株病原性菌株 (F016、F025、G016) 與 6 株無病原性菌株 (F032、F036、F038、F040、F140、F141)，利用隨機增幅核酸多型性分析 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)，以 100 個長度為 10 個核苷酸 (nucleotides) 之核酸引子進行篩選。以此篩選出編號 OPAT-04 (5'-TTGCCTCGCC-3') 之引子，所增幅產生之一特殊去氧核糖核酸 (DNA) 片段能區別病原性與非病原性菌株，經回收此具鑑別性之 DNA 片段後加以解序，並設計出專一性核酸引子對 Fusal-5 (5'-GCTTCGGCCGCCCTCATAG-3') 與 Fusal-6 (5'-TTGCCTCGCCGATAGTGGAT-3')。以此專一性核酸引子對再利用 PCR 增幅病原性菌株之基因體核酸 (genomic DNA) 可得大小為 386 bp 的 DNA 片段。利用 Fusal-5 與 Fusal-6 專一性引子對及 PCR 增幅方式測試先前所分得之 74 個菌株，結果與以接種方法所測定之病原性結果相符合，相同的 30 株具病原性菌株可增幅出此 386 bp 專一性 DNA 片段，而另 44 株無病原性菌株則否，且以此 386 bp DNA 片段進行南方雜合反應也有相同結果。另外以此專一性引子對測試常見百合土壤病原菌 (*Rhizoctonia solani*、*Pythium aphanidermatum*、*Phytophthora parasitica*、及 *Sclerotium rolfsii* 等)、在百合上常分離到的 *Fusarium* 屬真菌如 *F. solani* 及 *F. moniliforme* 等、與在不同作物如絲瓜、薑、胡瓜、豇豆、洋香瓜、苦瓜、香蕉、唐菖蒲等上之 *F. oxysporum* 分化種，結果皆無此 386 bp 專一性 DNA 片段產生。推論此專一性 DNA 片段只可在對百合具有病原性的 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* 之基因體核酸中增幅產生，故所開發之核酸引子對 Fusal-5 與 Fusal-6 可成功應用在鑑別分離培養之真菌是否為 *F. oxysporum* f. sp. *lilii*。此外，利用此專一性引子對進行 PCR 增幅時，其敏感度可達 200 pg/μl 之基因體核酸的濃度。

關鍵詞：百合、百合鏟孢菌萎凋病、病原菌偵測、核酸探針、聚合酶連鎖反應、隨機增幅核酸多型性分析

### 緒言

將百合 (*Lilium* spp.) 由鱗片繁殖至可作為切花的開花球所需的時間因品種而異，短則一年，長則需長達三年之

久。百合長期種植於田間，加上儲藏肥厚養分的球莖，以及其構造上又缺少具保護性的外皮，使得百合種球受土壤病原菌危害的機會增加，最普遍之病原菌有 *Fusarium*

*oxysporum* Schlecht f. sp. *lili* Imle<sup>(1,5,7,8)</sup>、*Rhizoctonia solani* Kühn<sup>(1,5,8)</sup>、*Pythium spinosum* Sawada<sup>(1,7,8)</sup>、*Phytophthora parasitica* Dastur.<sup>(1,7,8)</sup> 及 *Sclerotium rolfsii* Sacc.<sup>(1,7,8)</sup> 等，其中又以 *F. oxysporum* f. sp. *lili* 引起之百合鐮孢菌萎凋病最為嚴重，使得百合鐮孢菌萎凋病成為百合種球以及切花生產的最大限制因子。*F. oxysporum* f. sp. *lili* 主要感染部位在鱗莖基部 (basal plate)，所以又稱之為基腐病 (basal rot disease of lily)<sup>(5,7)</sup>。百合鐮孢菌萎凋病早期被認為是由於栽種環境不良所導致，直到 1942 年 Imle 才正式對百合鐮孢菌萎凋病病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *lili* 加以描述及命名，並證明對百合具有專一病原性<sup>(5)</sup>。此病原菌感染通常發生在球莖的基部與鱗片交接處，可能經由老化的外層鱗片、搬運造成的傷口或根形成時的傷口進入。初期感染會在球莖邊緣呈現褐腐或黑腐的病徵，接著擴散至整個球莖基部，最後嚴重到可能整個種球腐爛<sup>(5)</sup>。*F. oxysporum* f. sp. *lili* 主要經由種球傳播，另外亦容易經由種球表面、工具、車輛及包裝用箱子等攜帶含有分生孢子及厚膜孢子的土壤來傳播<sup>(7)</sup>。病原菌分化種的鑑定與病原性測試首先需將罹病植株組織或從帶菌土壤中利用五氯硝基苯 (pentachloronitrobenzene, PCNB) 選擇性培養基<sup>(9)</sup> 分離，分離出為 *Fusarium* spp. 經由形態上之鑑定<sup>(3)</sup> 確定屬於 *F. oxysporum* 後，再將 *F. oxysporum* 菌株個別單孢培養於糖量減半之馬鈴薯瓊脂培養基 (含 1% dextrose 之 potato dextrose agar；減糖 PDA)，培養 14 天後分別以無菌水將孢子洗下，配製成每毫升含有  $10^6$  個分生孢子的懸浮液，將百合鱗片球浸於供試菌株孢子懸浮液 5 分鐘後種植於滅菌處理過之砂質壤土，置於溫室中每日澆水一次，5 週後觀察是否有植株萎凋及鱗莖基腐等病徵，以此接種方式測試各菌株對百合之病原性，以確認所分得之病原菌為 *F. oxysporum* f. sp. *lili*。由於形態鑑定需要經驗豐富之真菌分類人員，再加上接種確認病原性需耗時三至四星期以上，因此難以快速又準確地鑑定出是否為 *F. oxysporum* f. sp. *lili*。本文目的在先利用隨機增幅核酸多型性分析 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 方式，篩選出對百合具病原性之 *F. oxysporum* f. sp. *lili* 與非病原性之 *F. oxysporum* 兩者基因體核酸 (genomic DNA) 中不同的核酸片段，期運用此一特殊片段能鑑別二者，故將具有辨別性的核酸片段回收解序後設計專一性的核酸引子對，再利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 可增幅出大量核酸的特性，將設計之核酸引子應用於偵測 *F. oxysporum* f. sp. *lili*，期能解決病原菌鑑定困難與病原性測定耗時的困擾，應用於種球百合鐮孢菌萎凋病病原菌的鑑定，並能在檢疫上達到快速準確之實際應用價值。

## 材料與方法

### 病原性測定

首先於臺灣溪湖萬興、埔里大坪頂及豐原后里等地百合栽培田中，採集罹有根腐 (root rot)、基腐 (basal rot)、黃化萎凋 (wilt) 病徵的百合罹病植株，以 1% (v/v) 次氯酸鈉溶液或 75% 酒精做表面消毒，並用無菌水漂洗 2 次後，將罹病組織〔底根 (root)、球莖基盤 (basal plate)、鱗片 (scale) 及莖 (stem) 等〕與健康組織交界處切下，放入 2% (w/v) 水瓊脂培養基及 PCNB 選擇性培養基，在室溫 (約 25 °C) 下以日光燈照光培養，俟組織邊緣長出菌絲後，切取菌絲尖端移入減糖 PDA 中培養，再經單孢分離培養於減糖 PDA 斜面試管中，放置於 22-25 °C 定溫箱中照光培養 (每日照光 12 小時)，將純化培養之菌株加以編號，以供接種及試驗用。供試菌株每個月必須以單孢分離方式更新培養，以維持供試菌株野生型 (wild type) 特性。鐮孢菌種之鑑定依據大孢子 (macroconidia)、小孢子 (microconidia) 形態及孢子著生情形與有無產生厚膜孢子 (chlamydospores) 等<sup>(3,11,12)</sup>，再經後續病原性測定後，對百合具有病原性者則為 *F. oxysporum* f. sp. *lili*。以孢子懸浮液為接種源接種百合鱗片球，首先將單孢培養在減糖 PDA 上 14 天的供試菌株以無菌水將孢子洗下，配製成每毫升含有  $10^6$  個分生孢子 ( $10^6$  cfu/ml) 的懸浮液。將以 1% (v/v) 次氯酸鈉溶液表面消毒 1 分鐘，再以無菌水漂洗過之百合 Casa Blanca 品種鱗片球，浸於供試菌株孢子懸浮液中，5 分鐘後將鱗片球取出，種植於口徑 5 吋高 3.5 吋盛有滅菌處理 (121 °C, 1.5 lb/in<sup>2</sup>, 20 分鐘) 過的砂質壤土的黑色軟質膠盆中；同樣方法將鱗片球浸於無菌水中做為對照處理。每盆種植 5 顆鱗片球，每重複 4 盆，置於溫室中，每日澆水一次。約 5 週後觀察記錄發病情形 (是否有植株萎凋及鱗莖基腐等病徵)。將接種發病後之罹病植株的根、球莖基部、鱗片及莖等部位做組織分離，並與原接種菌株單孢分離置於同一減糖 PDA 平板上，25 °C 照光培養，約 2 至 3 天後，依其菌落形態、生長速度、顏色以及利用顯微鏡觀察其大孢子的形態等加以比對。如與原接種菌株相同，則完成柯霍氏法則 (Koch's Postulates)，確定其病原性。將確定病原性之菌株供作各試驗之標準菌株。

### 利用隨機增幅核酸多型性分析 (RAPD) 篩選核酸引子

*Fusarium* spp. 的培養與基因體核酸之抽取，首先將供試菌株之孢子懸浮液加入 250 ml 經滅菌處理冷卻後之馬鈴薯葡萄糖培養液 (potato dextrose broth, PDB) 中，搖晃均勻，將此含有孢子的培養液倒入塑膠培養皿 (直徑 9 公分) 中，每皿約 12 ml，置於 24 °C 培養箱中照光培養 7 天後，將培養的菌絲以紗布將多餘的培養液濾除，放入冷凍乾燥機乾燥後置於 -20 °C 冰箱備用。取 1 g 冷凍乾燥後的菌絲

置於研鉢，加入適量的液態氮將其磨成細粉末狀，置入離心管中，加入 15 ml 的萃取緩衝液 [Extraction buffer：內含 100 mM Tris-HCl pH 8.0；50 mM EDTA；100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol；1% (w/v) SDS]，置於 60°C 水浴 20 分鐘，再加入 7.5 ml 的醋酸鉀(potassium acetate)，冰浴 20 分鐘後離心 30 分鐘(10000 xg, 4°C)，取上層液加入 8 ml 的異丙醇(isopropanol) 及 2.5 ml 10 M 的醋酸銨(ammonium acetate)，靜置於室溫下反應一小時後離心 30 分鐘(10000 xg, 4°C)。取沉澱物以 1.5 ml 緩衝液(Buffer：50 mM Tris-HCl pH 8.0；10 mM EDTA) 加以溶解，加入 RNase (50 mg/ml)，置於 37°C 下反應一小時後加入等體積的 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 混合液，離心 30 分鐘(10000 xg, 4°C) 後取上清液，重複一次後取上層液加入 2 ml isopropanol 以及 0.2 ml 的 3 M 醋酸鈉(sodium acetate) 靜置於 -20°C 中一小時，將其離心(10000 xg, 4°C) 30 分鐘後取其沉澱物，以 1.2 ml 的 TE 緩衝液(TE buffer：10 mM Tris-HCl pH 8.0；1 mM EDTA) 溶解後保存於 -20°C 以供後續去氧核糖核酸(DNA) 分析使用。接著進行核酸引子篩選，首先將前一步驟所純化之核酸利用分光光度計(spectrophotometer) 測量在波長 260 nm 及 280 nm 的吸收值，測得核酸之濃度，再將核酸的濃度稀釋至 40  $\mu$ g/ml 即為 PCR 所需之模板(template) DNA 濃度。接著使用 100 組不同隨機核酸引子(Operon Technologies 公司生產，編號 Kit AT、Kit AU、Kit AV、Kit AW、Kit AX 之隨機核酸引子組) 及 PCR 技術，以期能篩選出分辨對百合具病原性的 *F. oxysporum*。RAPD 反應所需材料與條件如下：10 X 緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 8.8；15 mM MgCl<sub>2</sub>；500 mM KCl；1% Triton X-100) 2.5  $\mu$ l；dNTP (2.5 mM) 2.5  $\mu$ l；模板 DNA 1.0  $\mu$ l；引子 (5  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ l；ProZymeII (PROtechnology Ent. Co., Ltd.) 0.3  $\mu$ l；ddH<sub>2</sub>O 17.7  $\mu$ l；總體積為 25  $\mu$ l。PCR 條件則為：(1) 94°C 5 分鐘，1 回合(cycle)；(2) 94°C 30 秒，40°C 30 秒，72°C 1 分鐘，共 40 回合；(3) 72°C 2 分鐘，1 回合。最後再將 RAPD 產物以 15 x 10 cm<sup>2</sup> 大小之 1.5% 琼脂(agarose) 置於 0.5 X 的 TAE 緩衝液(TAE Buffer：0.02 M Tris-base, 0.02 M acetate, 0.0005 M EDTA) 中以 100 V 電壓條件下進行 2 個小時電泳，結束後以溴化乙銨(ethidium bromide) 染色，在紫外燈下觀察並以拍立得(Polaroid MP4+) 拍照保存。

### 專一性DNA片段的選殖與解序

首先將專一性 DNA 片段回收，以前步驟所篩選出具鑑別性之核酸引子與 F016 菌株之基因體核酸進行 PCR，產物以電泳分析，將所見之專一性 DNA 片段以解剖刀切下，置於微量離心管中，加入 3 倍體積之 NaI 溶液，並以 55°C 水浴至回收瓊脂溶解後，加入 5  $\mu$ l EZ-GLASSMILK<sup>®</sup> 溶液(GENE CLEAN<sup>®</sup> III Kit, BIO 101 公司) 於室溫下混合

均勻反應 5 分鐘。以 10000 xg 離心 5 秒鐘使 EZ-GLASSMILK<sup>®</sup> 和 DNA 的鉗合物沉澱，再利用 NEW Wash 溶液沖洗沉澱物 3 次，每次使用約 250  $\mu$ l，最後除去所殘留的液體留下乾燥的沉澱物。加入與沉澱物等體積之 Elution Solution (GENE CLEAN<sup>®</sup> III Kit, Bio 101 公司) 將其溶解，離心 30 秒，上層液即是欲回收之 DNA 片段。接著使用 Invitrogen 公司之 TOPO TA Cloning 套件進行選殖與轉形，方法如下：預先配置 TOPO<sup>®</sup> Cloning 反應液，將前步驟回收之專一性 DNA 片段取 2  $\mu$ l 加入 4  $\mu$ l 無菌去離子水與 1  $\mu$ l pCR<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> vector 混合均勻後，置於室溫 5 分鐘後加入 1  $\mu$ l 6X TOPO<sup>®</sup> 反應終止液 10 秒鐘後置於冰上。取出一管 competent cell (*E. coli* strain TOP10F) 於冰上解凍，並加入 2  $\mu$ l 之 0.5 M  $\beta$ -mercaptoethanol 混合均勻，加入 2  $\mu$ l 預先混合之 TOPO<sup>®</sup> Cloning 反應液混合均勻後置於冰上 30 分鐘，移置 42°C 水浴 30 秒(不可震盪)，隨即置於冰上 2 分鐘，加入 250  $\mu$ l SOC 培養基(2% Bacto tryptone；0.5% yeast extract；10 mM NaCl；2.5 mM KCl；20 mM glucose；10 mM MgCl<sub>2</sub>) 再置於 37°C 水浴水平震盪 1 小時，以微量吸管吸取此反應液 100  $\mu$ l 均勻塗抹於 LB 培養基平板(內含 50  $\mu$ g/ml kanamycin, X-Gal 及 IPTG)，置於 37°C 定溫箱中培養，12 小時後觀察挑取白色或是淺藍色之菌落至 LB 培養基，培養於 37°C 定溫箱中供後續分析。接下來專一性 DNA 片段的選殖，首先：(1) 質體(plasmid)的抽取，由 Birnboim and Doly<sup>2</sup> 及 Ish-Horowicz and Burke<sup>6</sup> 之方法改良，其純化方法如下：將前一步驟轉殖之 *E. coli* 以液態 LB 培養基(含 50  $\mu$ g/ml kanamycin) 於 37°C 培養 24 小時後取 1.5 ml 培養液以 12000 xg 4°C 下離心 30 秒，之後去除上層液使其乾燥，加入 100  $\mu$ l 預冷之 Solution I [50 mM glucose；25 mM Tris HCl (pH 8.0)；100 mM EDTA (pH 8.0)] 並震盪使菌體重新懸浮其中，再加入 200  $\mu$ l Solution II (0.2 N NaOH；1% SDS) 混合後置於冰上，再加入預冷之 Solution III (5 M potassium acetate 60 ml；glacial acetic acid 11.5 ml；H<sub>2</sub>O 28.5 ml) 150  $\mu$ l 並輕微震盪混合均勻後置於冰上 5 分鐘。以 12000 xg 4°C 條件離心 5 分鐘，取上層液加入等體積之 phenol : chloroform 混合液震盪混合後再以 12000 xg 4°C 離心 2 分鐘取上層液，再加入 2 倍體積之乙醇混合於室溫下靜置 2 分鐘使 DNA 沉降，以 12000 xg 4°C 離心 5 分鐘去除上層液後使其乾燥，加入 1 ml 70% 之乙醇漂洗後去除上層液並使沉澱物乾燥，最後加入 50  $\mu$ l TE 緩衝液將沉澱物溶解懸浮其中，置於 -20°C 保存供後續試驗用。(2) 以 Eco RI 限制酵素(restriction enzyme) 切取質體DNA 測試，取 200  $\mu$ l 微量離心管加入滅菌之去離子水 16.3  $\mu$ l、限制酵素反應緩衝液 2  $\mu$ l、Acetylated BSA (10  $\mu$ g /  $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l、及質體 1  $\mu$ l 混合均勻，最後加入 0.5  $\mu$ l Eco RI 限制酵素，總體積為 20  $\mu$ l。置於 37°C 水浴 4 小時後取出，以 1.5% 琼脂 100 V 電壓條件下進行 2 小時電泳，觀察所得到之 DNA 產物大小是否

與欲選殖之專一性 DNA 片段大小一致。(3)以篩選出之核酸引子分析選殖菌株之菌體 DNA，PCR 反應所需材料如下：10 X buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.8；15 mM MgCl<sub>2</sub>；500 mM KCl；1% Triton X-100) 2.5 μl；dNTP (2.5 mM) 2.5 μl；選殖菌株之質體DNA 1.0 μl；primer OPAT-04 (5 μM) 1.0 μl；ProZymeII (PROtechnology Ent. Co., Ltd.) 0.3 μl；ddH<sub>2</sub>O 17.7 μl；總體積為 25 μl。PCR 條件為：(1) 94°C 5 分鐘，1 回合；(2) 94°C 30 秒，40°C 30 秒，72°C 1 分鐘，共 40 回合；(3) 72°C 2 分鐘，1 回合。最後再將 RAPD 產物以 1.5% 瓊脂 100 V 電壓條件下進行 2 小時電泳，並以溴化乙銨染色於紫外燈下觀察結果比對是否與欲選殖之專一性 DNA 片段大小一致。(4) 專一性DNA 之解序，將所選殖成功之重組質體寄送至中研院生化所以自動核酸定序儀 (ABI 373 automatic sequencer, Perkingedma, USA) 解出此專一性片段之DNA 序列，經過不同時間 3 次解序及比對，得到此片段之完整核酸序列。

### 專一性核酸引子對的設計與測試

由所得到之專一性核酸序列以電腦軟體 Lasergene (DNAstar Inc., Madison, WI) 分析篩選專一性引子對，再將分析所得到之核酸引子序列交由快興科技股份有限公司合成。並將專一性核酸引子對與菌株基因體核酸的測試，此部份試驗主要為測試所合成之核酸引子對是否可以用於增幅前述試驗中所篩選出之專一性 DNA 片段，以便決定後續試驗之進行，因此所測試的菌株基因體核酸包含 F016、F025、FOL001、FOL002 等確定對百合有病原性之菌株，及 F032、F036、F038、F040 等確定對百合無病原性之 *F. oxysporum* 菌株的基因體核酸。材料與條件如下：10 X buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.8；15 mM MgCl<sub>2</sub>；500 mM KCl；1% Triton X-100) 2.5 μl；dNTP (2.5 mM) 0.4 μl；模板DNA (50 ng/ μl) 1.0 μl；primer Fusal-5 (5 μM) 1.0 μl；primer Fusal-6 (5 μM) 1.0 μl；DyNazyme II (Finnzymes Oy Inc., Finland) (2U/ μl) 0.3 μl；ddH<sub>2</sub>O 18.8 μl；總體積為 25 μl。PCR 條件為：(1) 94°C 5 分鐘，1 回合；(2) 94°C 30 秒，55°C 30 秒，72°C 1 分鐘，共 35 回合；(3) 72°C 5 分鐘，1 回合。最後再將 PCR 產物以 1.8% 瓊脂 120 V 電壓條件下進行 1 小時電泳，結束後以溴化乙銨染色，在紫外燈下觀察結果比對是否產生預期大小的DNA 片段，以及是否有非預期之DNA 片段產物產生。

### 南方雜合反應

為了確定各菌株DNA 利用專一性引子對及PCR 放大並經電泳分析所得之專一性片段與標準病原菌株 (F016 菌株) DNA 是否具同源性，所以利用南方雜合方法，先將標準病原菌株所放大出來的專一性片段使用免疫螢光標定套組 NEBlot® Phototope™ (NEW ENGLAND BioLabs® Inc.,

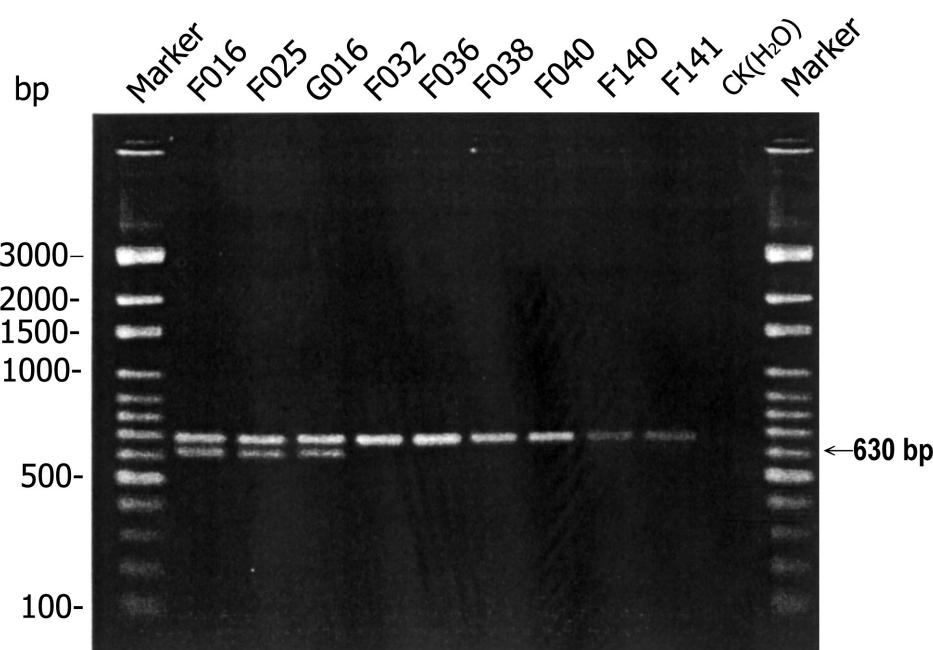
MA, USA) 進行標幟，製備成核酸探針(prob) pF016。先取 1.5 μl 的模板DNA 加入去離子水至最終體積為 34 μl，置於沸水中 5 分鐘後移至冰上冷卻 5 分鐘。加入 10 μl 之 5 X labeling solution (含 random biotinylated octamers) 及 5 μl 去氧核糖核苷三磷酸鹽 (dNTP mixture : 1 mM dCTP；1 mM dGTP；1 mM dTTP；1 mM dATP/Biotin-14-dATP) 與 1 μl (5 unit/ μl) 之 Klenow Fragment 酶素混合均勻後於 37°C 中作用 6 小時以上。再加入 5 μl 之 0.2 M EDTA (pH 8.0) 終止其反應後置於 -20°C 保存備用。接著進行核酸雜合反應 (hybridization)，將 PCR 增幅產物以 1.5% 瓊脂凝膠電泳分析後，將凝膠置於 0.2 N HCl 溶液中搖盪 5 分鐘，完成去噴冷 (depurine)，再以去離子水漂洗二次後加入變性溶液 (denature solution : 0.5 M NaOH；1.5 M NaCl) 緩慢搖晃 30 分鐘，以去離子水漂洗二次後加入中和溶液 (neutralization solution : 1 M Tris-HCl pH 7.5；1.5 M NaCl) 緩慢搖盪 20 分鐘中和其鹼性。之後將瓊脂凝膠改置於以 2 X SSC 緩衝液 (0.3 M NaCl；0.03 M sodium citrate) 潤濕的雜合膜 (Zeta-Probe® Blotting Membranes, BIO-RAD, CA) 上，使用 MilliBlot-V vaccum transfer system (American Bionetics, Inc., USA) 進行轉濱 1 小時，把凝膠中的DNA 轉濱到雜合膜上。將雜合膜取出置於 Whatman™ 3 mM 濾紙上風乾後，置於 UVC-515 Ultraviolet Crosslinker (ULTRA-LuM, Inc., USA) 內，以 254 nm 波長的紫外光 240 millijoules/cm<sup>2</sup> 進行聯結 (cross-linking)。將雜合膜置於反應袋中，每平方公分加入前雜合溶液 (prehybridization solution : 6 X SCC；5 X Denhardt's reagent；0.5% SDS；100 μg/ml salmon sprtm DNA) 於 68°C 進行前雜合反應 1 小時，取出標幟完成之探針 pF016，以沸水煮沸 5 分鐘後迅速置於冰上 5 分鐘，與前雜合反應溶液均勻混合後置於 68°C 進行核酸雜合 12 個小時。取出雜合膜以含有 0.1% SDS 的 0.1 X SSC 溶液漂洗 2 次每次 20 分鐘。接著使用 Phototope®—Star Detection Kit (NEW ENGLAND BioLabs® Inc., MA, USA) 進行偵測，首先將 blocking solution (5% SDS；phosphate pH 7.2；125 mM NaCl) 加入雜合反應袋中，每平方公分雜合膜使用 0.1 ml 的溶液，室溫下緩和搖動 5 分鐘，將溶液倒出後再加入 0.05 ml/cm<sup>2</sup> 量的 blocking solution，加入濃度 1 μg/ml 的 streptavidin 在室溫下搖動 5 分鐘，倒出溶液再加入 0.5 ml/cm<sup>2</sup> 量的 wash solution I (0.5% SDS；phosphate pH 7.2；12.5 mM NaCl) 漂洗二次，每次 5 分鐘，之後倒去此溶液加入 0.05 ml/cm<sup>2</sup> 量的 blocking solution，加入濃度為 0.5 μg/ml 的 biotinylated alkaline phosphatase，並如上述條件於室溫下反應 5 分鐘，再將此溶液倒出以 blocking solution 0.5 ml/cm<sup>2</sup> 漂洗一次。改加入 wash solution II (10 mM Tris-HCl；10 mM NaCl；1 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9.5) 漂洗二次，每次 5 分鐘。漂洗完後將其倒出並將 100 X CDP-Star™ 試液以 1 X CDP-Star assay buffer 進行稀釋 100-500 倍，並迅速加入雜合反應袋

表一、供試分離自百合植株之 *Fusarium oxysporum* 菌株之來源、病原性測定結果與以專一性引子對進行聚合酶連鎖反應結果  
Table 1. The origins, pathogenicity and the results of polymerase chain reaction of *Fusarium oxysporum* isolates isolated from the diseased lilies

Isolates	Isolated region	Origin	Pathogenicity test <sup>1</sup>	PCR product <sup>2</sup>
F013, F014, F015, F016, F024, F025, F028, F044, F046	basal plate, root, scale, stem	Hsi-hu	+	+
F031, F032, F033, F034, F035, F036, F038, F039, F040, F041, F057, F058	basal plate, root, scale, stem	Hsi-hu	-	-
F101, F109, F111, F133, F135, F139, F145, F149, F155, F156, F160, F165, F166, F169	basal plate, root, scale, stem	Feng-yuan	+	+
F137	root	Feng-yuan	-	-
P3SS, P3SSc, PFOL001~2	basal plate, root, scale, stem	Pu-li	+	+
PS2S, PS3S, PA2	basal plate, root, scale, stem	Pu-li	-	-
SPL7, SPL21	rhizosphere	Pu-li	+	+
SPL1~6, SPL8~9, SPL11~20, SPL22~26	rhizosphere	Pu-li	-	-
FOL67	basal plate	Tainan	+	+

<sup>1</sup>. The sandy loam soil collected from Hsi-hu were sterilized (121 °C, 1.5 lb/in<sup>2</sup> for 20 min), then put in the plastic pots (5 in. in height by 3.5 in. in diam.). Bulbs were dipped in the spore suspension (10<sup>6</sup> cfu/ml) for 5 min, and the check was dipped in the sterilized water. The inoculated bulbs were then planted in the plastic pots, and pots were put in greenhouse for 5 wks, and were watering once daily during the experiment periods. +: pathogenicity, wilt, basal rot, or root rot symptoms; -: non-pathogenicity, symptomless.

<sup>2</sup>. The 386 bp DNA product of PCR with specific primers Fusal-5/ Fusal-6 and genomic DNA of the different *F. oxysporum* isolates. +: the 386 bp DNA product display; -: no 386 bp DNA product.



圖一、隨機引子 OPAT-04 與病原性菌株 F016、F025、G016 及非病原性菌株 F032、F036、F038、F040、F140、F141 基因體核酸進行隨機增幅核酸多型性分析增幅產物之電泳圖，圖中顯示病原菌比非病原菌在 630 bp 位置多出一個條帶。

**Fig. 1.** Amplified DNA polymorphisms of genomic DNA from different *Fusarium* isolates. The pathogenic isolates are F016, F025 and G016, and the non-pathogenic isolates are F032, F036, F038, F039, F040, F140 and F141. The results show a specific DNA fragment at 630 bp was present in the PCR product when genomic DNA of pathogenic isolates were used.

中每平方公分使用 0.025 ml 的反應緩衝液，並於室溫下緩和搖動 5 分鐘使其反應，最後將溶液倒出並將雜合膜取出置於 X-ray 底片 (HyperfilmTM-MP, Amersham, Sweden) 進行壓片約 1 分鐘。取出 X-ray 底片進行沖洗並與電泳相片比對即可知與核酸探針 DNA 具同源性 (homology) 的 DNA 片段。

### 靈敏度測試

取病原菌株 F016 之基因體核酸分別將其濃度調整為 100 ng /  $\mu$ l、50 ng /  $\mu$ l、10 ng /  $\mu$ l、5 ng /  $\mu$ l、1 ng /  $\mu$ l、500 pg /  $\mu$ l、100 pg /  $\mu$ l、50 pg /  $\mu$ l、10 pg /  $\mu$ l、0 pg /  $\mu$ l 後，各取 1  $\mu$ l 基因體核酸作為模板 DNA，與前述專一性核酸引子對測試使用相同之材料與條件進行 PCR，再以電泳方式觀察是否有專一性條帶表現，有專一性條帶表現的最小濃度即為其靈敏度，以基因體核酸的量除以反應總體積 (25  $\mu$ l) 所得的反應濃度表示之。

### 收集所得菌株之測試

將我們所有分離、鑑定及病原性測定確定之 *F. oxysporum* 菌株分別以 VIOGENE 公司之植物 DNA 純化組 (Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System Kit) 純化其基因體核酸並調整其濃度為 50 ng /  $\mu$ l 後，同樣以專一性引子對 Fusal-5 與 Fusal-6 及前述專一性核酸引子對測試使用相同之材料與條件進行 PCR，再以電泳方式觀察各菌株是否有大小 386 bp 之專一性 DNA 條帶增幅出來。將所得結果與先前之病原性測定結果比對是否互相符合，若符合則表示以此專一性引子對及 PCR 方式能區別 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* 與對百合無病原性之 *F. oxysporum*。

### 百合土壤病原菌與不同作物上之 *F. oxysporum* 分化種之測試

以專一性引子對 Fusal-5 與 Fusal-6 及前述專一性核酸引子對測試使用相同之材料與條件進行 PCR，測試常見百合土壤病原菌 *Pythium aphanidermatum*、*Pythium splendens*、*Pythium myriotylum*、*Pythium ultimum*、*Sclerotium rolfsii*、*Rhizoctonia solani*、*Phytophthora parasitica* 等，及在百合上常可分離到的 *Fusarium* 屬真菌 (*F. solani* 及 *F. moniliforme* 等) 與在不同作物上之 *F. oxysporum* 分化種 (絲瓜 *F. oxysporum* f. sp. *luffae*、胡瓜 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、豇豆 *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*、洋香瓜 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*、苦瓜 *F. oxysporum* f. sp. *monodricae*、香蕉 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*、唐菖蒲 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* 等)，瞭解在其他百合土壤病原菌與其他 *F. oxysporum* 分化種之基因體核酸 (50 ng /  $\mu$ l) 中是否可增幅出此 386 bp 大小之專一性 DNA 片段，期以此專一性引子對及 PCR 方式能區別 *F.*

*oxysporum* f. sp. *lilii* 與其他百合土壤病原菌或不同之 *F. oxysporum* 分化種。

## 結 果

### 病原性測定

由溪湖萬興農場，埔里大坪頂及豐原后里百合栽培田中採集罹病百合植株，自底根、鱗片、球莖基盤及莖等部位進行組織分離，並經單孢分離純化培養，經形態鑑定後共得 74 株鏟孢菌 (*F. oxysporum*) 菌株(表一)。

鏟孢菌 *F. oxysporum* 之形態<sup>(3)</sup> 小孢子者為橢圓形 (elliptical) 至卵圓形 (ovate)，由單瓶狀枝 (monophialide) 產生，分生孢子梗 (conidiophore) 較短且少分支，產量多，呈假頭狀 (false heads) 排列，大小約在 5-12  $\times$  2.2-3.5  $\mu$ m；大孢子為鏟刀形不對稱彎曲，壁薄，有明顯的足細胞，多為 3 至 5 個隔膜，大小多在 27-46  $\times$  3-4.5  $\mu$ m，由單瓶狀枝產生，分生孢子梗有較複雜的分支；具有厚膜孢子，近球形，頂生 (terminal) 或間生 (intercalary)。將所得菌株以分離、接種與再分離的方式測試此分離之 74 菌株對百合是否具有病原性，結果其中共有 30 個菌株接種產生植株萎凋及鱗莖基腐等病徵，具病原性 (為 *F. oxysporum* f. sp. *lilii*)；44 菌株接種百合未產生植株萎凋及鱗莖基腐等病徵，不具病原性 (為 *F. oxysporum*) (表一)，將此接種確定之 74 菌株供作為進一步試驗之標準菌株。

### 利用隨機增幅核酸多型性分析(RAPD)篩選核酸引子

本試驗以 F016、F025、G016 為標準病原性菌株以及 F032、F036、F038、F040、F140、F141 為非病原性菌株，進行 100 組核酸引子的篩選，將 RAPD 增幅產物以電泳分析並加以比對，比對方式為病原性菌株之 DNA 產物電泳條帶一致，且能區別病原性及非病原性菌株者。經過初步篩選所得之結果為核酸引子編號 OPAT-04 (5'-TTGCCTCGCC-3') 在 RAPD 反應後可於 630 bp 位置得到一特殊 DNA 產物 (圖一)。此 DNA 產物只於具病原性菌株產生，非病原性菌株則無此 DNA 產物，由於此 DNA 產物具備區別病原與非病原菌株之能力，故將此特殊 DNA 片段回收以進行後續試驗。

### 專一性DNA片段的選殖與解序

以篩選出之 OPAT-04 核酸引子與 F016 菌株之基因體核酸進行 RAPD 反應，所產生約 630 bp 大小之專一性 DNA 片段成功選殖到 TA 輽體上，再將此專一性 DNA 片段經由中研院生化研究所進行自動解序，所解出之 DNA 序列為求正確經三次解序，結果經過比對、修正後得到此專一性 DNA 片段之核酸序列 (表二)。

表二、存在於對百合具病原性之百合鏟孢菌萎凋病病原菌之專一性核酸片段序列，末端劃底線部份為OPAT-04 核酸引子之對應序列，粗體字部份為設計之專一性核酸引子序列。

Table 2. Nucleotide sequence of DNA fragment specific to the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lili*. The codes underlined are complementary sequence of primer OPAT-04. The bold codes are selected specific primers.

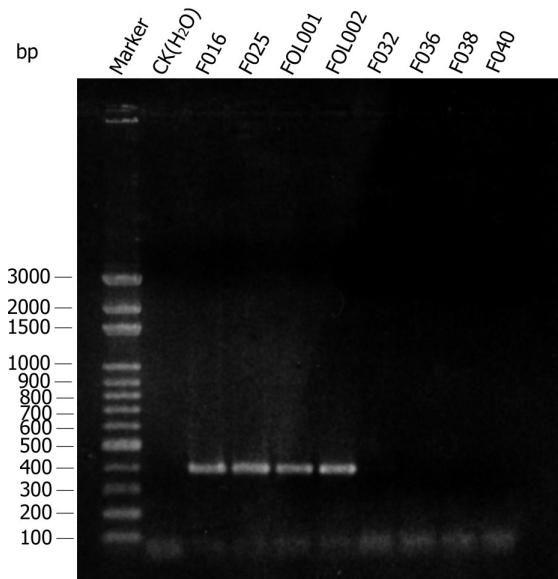
5'-**TTGCCTCGCCATATCCCATAACATGCGATACCTAACGACATCATGCAATATTACTATCCA**  
**GCAATGAATCATGCTTACCATCATTCTAACAAACAGCCCATCCCAGAATCCACCGCAATTG**  
**CTGGTAGGTCCCTCCTTATCACCTGTCTGCAGCCTAGAGTTAACCTTG GCCAGCAAGT**  
**ACTGACGTCCCTGGTGGGTCGGCGATGTGTCATTCTCCGACAACCCG**CTTCGGCCGC**  
**CTCTCATAGTGGCCGAGATAGCCACTTCGGTACAGCAATTGTTACATACCAACGAAAGACTTC**  
**ACTCTGTGACGCACCTCGGACCCAGTCAGCATTGATTATCAAGACGCTCTGGAGCCTGGT**  
**GACCTCTTCACTTGGCCCTCCGGCTAACCTGGCTATGCTTATTATCTCTGCCAACTTCC**  
**GTAGAATAAAGTTTCCCCATAAGCAAATCAGTGATTCCCTTCCCCCTGGCGTCAATAGAT**  
**CCTTGTCTAACGGTAAATCATATGCTCCTACTAATAAAATCCTCTTGCTGAACCTTGGCTT**  
**CAGTCCCGAGGGAGCAGCTGATTCCCTCAGTTAACAT**CCACTATCGCGAGGCAA**-3'****

### 專一性核酸引子對的設計與測試

專一性核酸引子對的設計是為了能夠挑選出適合增幅專一性DNA片段的引子，透過Lasergene電腦軟體分析所選取之核酸引子對分別為 Fusal-5 (序列為 5'-GCTTCGGCCGCCTCTCATAG-3') 與 Fusal-6 (序列為 5'-TTGCCTCGCCGATAGTGGAT-3')，Fusa1-5 之 Tm 值為 59.8 °C，Fusa1-6 之 Tm 值為 56.8 °C，預定增幅後之 DNA 產物大小為 386 bp，應為理想之核酸引子對，故以 Fusa1-5 及 Fusa1-6 進行後續之測試，期能應用於實際偵測。接著以專一性核酸引子對與菌株基因體核酸測試的目的在於測試所合成之專一性核酸引子對是否能有效增幅專一性 DNA 片段，故此試驗使用純化之菌株基因體核酸，所測試菌株分別為 F016、F025、FOL001、FOL002 等具病原性之菌株，以及 F032、F036、F038、F040 等非病原性菌株，經 PCR 增幅及電泳分析結果顯示 F016、F025、FOL001、FOL002 皆會在 386 bp 位置產生專一性之 DNA 片段(圖二)，非病原性菌株則無增幅產物出現，故可以確認所設計之核酸引子對的專一性。

### 南方雜合反應

取病原性菌株 F028、F046、F109、F111、F156、FOL001、FOL002、P3SS2 等八菌株進行雜合，結果八株病原性菌株之 DNA，利用專一性引子對 (Fusal-5 & Fusal-6) 及 PCR 放大，經電泳分析觀察之專一性片段與標準病原菌株之探針 pF016 有雜合反應(圖三)，故所放大出來的專一性片段皆具同源性，故推論凡可利用此專一性引子對放大出 386 bp DNA 片段之 *F. oxysporum* 菌株則為 *F. oxysporum* f. sp. *lili*。



圖二、專一性核酸引子對 Fusa1-5/Fusa1-6 與 F016、F025、FOL001、FOL002、F032、F036、F038、F040 菌株之基因體核酸進行聚合酶連鎖反應，結果顯示 F016、F025、FOL001、FOL002 皆會在 386 bp 處有增幅產物出現。

**Fig. 2.** DNA products of PCR with specific primers Fusa1-5/Fusa1-6 and genomic DNA of different *Fusarium* isolates F016, F025, FOL001, FOL002, F032, F036, F038, F040. The expected 386 bp specific DNA fragments are produced when genomic DNA of pathogenic *Fusarium* isolates was used for PCR.

## 靈敏度測試

取濃度調整為  $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $500 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 $100 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 $50 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 $0 \text{ pg}/\mu\text{l}$  之病原菌株 F016 之基因體核酸  $1 \mu\text{l}$  作為模板 DNA 進行 PCR，結果在基因體核酸濃度為  $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  及  $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  時有專一性條帶增幅，所以有專一性條帶增幅的最小濃度為  $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，因此以基因體核酸的量 ( $5 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 1 \mu\text{l} = 5 \text{ ng}$ ) 除以反應總體積 ( $25 \mu\text{l}$ ) 得基因體核酸最小反應濃度即為其靈敏度為  $200 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 。

## 收集所得菌株之測試

將前所收集分離之 74 株 *F. oxysporum* 菌株以專一性引子對 Fusal-5 及 Fusal-6 進行 PCR 結果列於表一， "+" 表示電泳結果有出現 386 bp 的專一性條帶， "-" 表示電泳結果未出現專一性條帶，菌株電泳結果情形見圖四。所得各菌株結果與先前以接種所測試病原性結果相符合，相同的 30 株具病原性菌株可增幅出此 386 bp 專一性 DNA 片段，而另 44 株無病原性菌株則否，由上述結果推論以此專一性引子對及 PCR 方式確能區別 *F. oxysporum* f. sp. *lili* 與對百合無病原性之 *F. oxysporum*。

## 百合土壤病原菌與不同作物上之 *F. oxysporum* 分化種之測試

常見百合土壤病原菌 *Pythium aphanidermatum*、*P. splendens*、*P. myriotylum*、*P. ultimum*、*Sclerotium rolfsii*、*Rhizoctonia solani*、*Phytophthora parasitica* 等，及在百合上常可分離到的 *Fusarium* 屬真菌 (*F. solani* 及 *F. moniliforme* 等) 與在不同作物上之 *F. oxysporum* 分化種 (絲瓜 *F. oxysporum* f. sp. *luffae*、胡瓜 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、豇豆 *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*、洋香瓜 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*、苦瓜 *F. oxysporum* f. sp. *monodricae*、香蕉 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*、唐菖蒲 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* 等)，以專一性引子對 Fusal-5 及 Fusal-6 進行 PCR 測試結果列於表三，結果顯示所測試之常見百合土壤病原菌及在百合植株上常可分離到的 *Fusarium* 屬真菌與在不同作物上之 *F. oxysporum* 分化種等皆無產生 386 bp 之專一性 DNA 片段，故能區別 *F. oxysporum* f. sp. *lili* 與其它百合土壤病原菌或不同之 *F. oxysporum* 分化種。

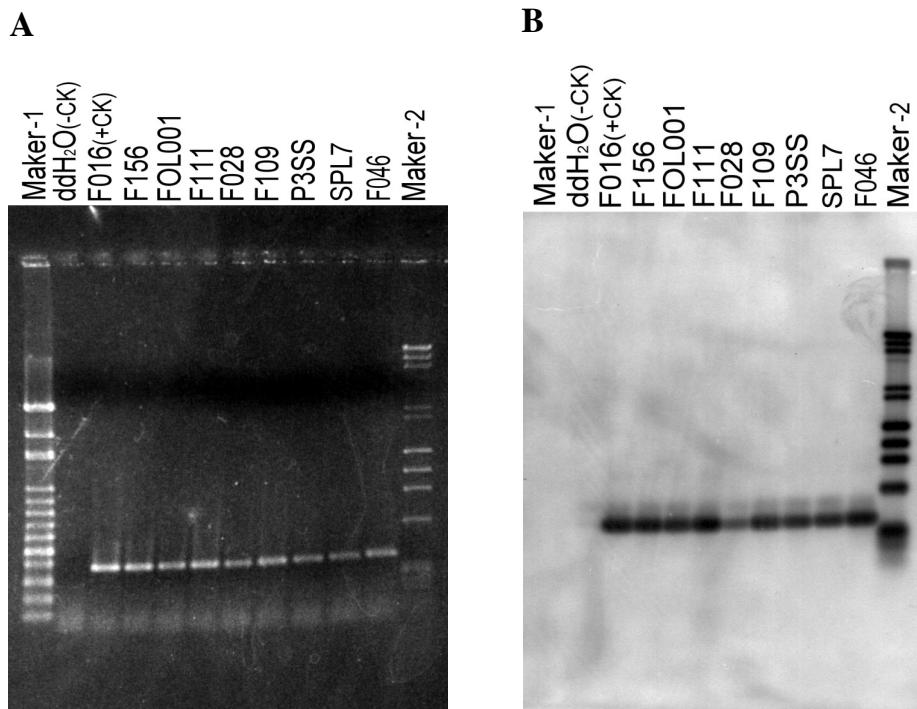
## 討 論

本試驗選擇利用 PCR 的原因在於此方式可以增量出基因體核酸中的片段，可以很容易利用電泳觀察出來。因為我們不瞭解百合鐮孢菌萎凋病病原性菌株與非病原性菌株間 DNA 上的差異，所以開始時以不同的引子 (序列較

短，專一性較低) 利用 PCR 的特性，隨機增幅菌株 DNA 上不同的片段，即為 RAPD，希望以此方式能增幅出病原性與非病原性菌株 DNA 上有差異的部分。結果發現以編號 OPAT-04 隨機引子經 PCR 後產生了區別病原性與非病原性菌株的 DNA 條帶，將其序列解出後我們以 OLIGO 分析軟體設計了一對引子為 Fusal-1 (5'-CCTAACAAACAGCCCCATCCCA-3') 及 Fusal-4 (5'-GCCAAGGTTCAAGCAAGAGA-3')，此引子對一開始能放大出預期 474 bp 大小的 DNA 片段，但接下來進行各項測試時出現了不穩定的情形，即標準病原性菌株 F016 之 DNA 有時能增量出預期的專一性 DNA 片段但有時卻無法增量出來，在屢次測試下依然呈現不穩定的情形，所以我們就試著以另一設計軟體 (Lasergene) 來設計，結果此軟體設計一對引子為 Fusal-5 與 Fusal-6，其特性、條件較適合做為增幅此專一性 DNA 片段的引子，不會有本身自身黏合產生環狀構造 (loop) 及兩引子不會有序列互補形成的二聚合體 (dimer) 等現象，以此引子對進行後續試驗，結果標準病原性菌株 F016 進行 PCR 皆能穩定增幅出預期大小 386 bp 的專一性 DNA 片段。

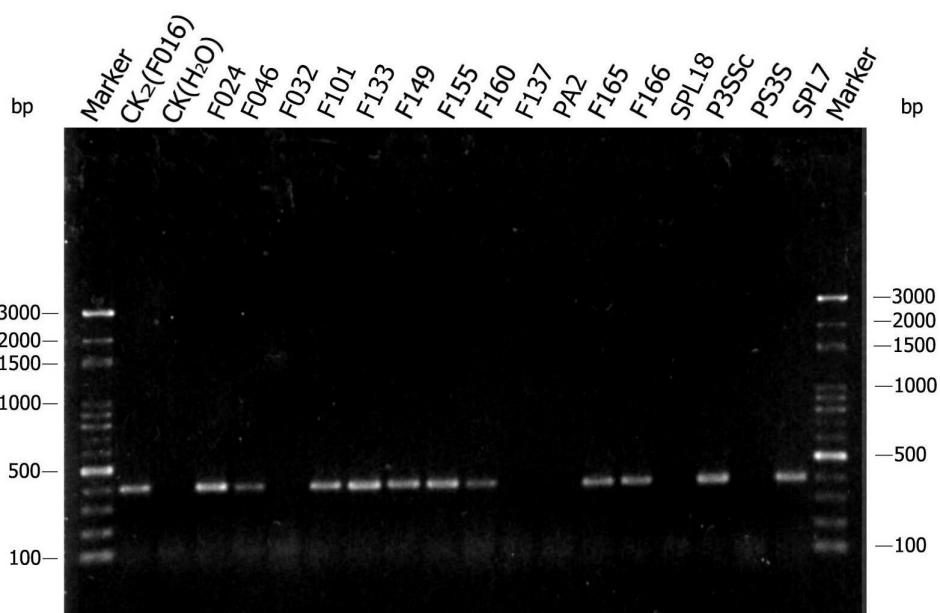
由本試驗測試 *F. oxysporum* 病原性與非病原性菌株的結果，可推論利用此專一性引子對 Fusal-5 與 Fusal-6 進行 PCR 能成功區別出對百合具有病原性的 *F. oxysporum* f. sp. *lili*。另外以此專一性引子對測試在百合上常見 *Fusarium* 屬之真菌 (*F. moniliforme* 及 *F. solani*) 與百合主要土壤傳播性病害之病原菌 (*Pythium aphanidermatum*、*P. splendens*、*P. myriotylum*、*P. ultimum*、*Sclerotium rolfsii*、*Rhizoctonia solani*、*Phytophthora parasitica* 等) 的 PCR 測試結果並無專一性 DNA 片段增幅，所以經本試驗結果推論此專一性引子對 Fusal-5 與 Fusal-6 可用於區別出 *F. oxysporum* f. sp. *lili* 與其他病原菌，使沒有分類經驗的研究人員不需透過分類鑑定及病原性接種試驗即能輕易的辨別出 *F. oxysporum* f. sp. *lili*。使用此專一性引子對以 PCR 增幅放大的方式偵測 *F. oxysporum* f. sp. *lili* 的優點包括有步驟簡單任何人都可以使用、能很快知道結果不需再透過繁複的百合病原性接種試驗、以及 PCR 具有敏銳度與專一性高的特性。

本試驗中以專一性核酸引子對所測試之各菌株 DNA 皆為以減糖 PDA 或 PDB 純培養後，取其菌絲 (乾重 100 mg 以上) 按照純化步驟抽取而得，結果皆能成功偵測出 *F. oxysporum* f. sp. *lili*，故利用此專一性引子對偵測純化培養的菌株能成功偵測出 *F. oxysporum* f. sp. *lili*。但經我們初步測試如果直接由罹病組織 (百合莖基部) 抽取基因體核酸再用引子對 Fusal-5 與 Fusal-6 實際去偵測則無法放大出專一性 DNA 片段 (作者未發表之試驗結果)，推測應是菌量太低抽出病原菌之 DNA 量也過少，低於 PCR 反應所需濃度，以致於無法成功增幅出鑑別性 DNA 片段，無法直接由百合罹病之莖基部偵測出是否已遭 *F. oxysporum* f.



圖三、百合鏟孢菌萎凋病病原菌應用引子對 Fusal-5 與 Fusal-6，經聚合酶連鎖反應增幅後之電泳圖 (A)；(A) 之電泳凝膠經 DNA 轉漬後與探針 pF016 之南方雜漬 (B)。Marker-1 為 Gen-100 DNA Ladder；Marker-2 為 *Hind* III digested Lambda DNA 與 *Hae* III digested  $\phi$ x 174 DNA 之混合物。

**Fig. 3.** Electrophoresis result of PCR products of genomic DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lili* with primers Fusal-5 and Fusal-6 (A); Southern hybridization result using biotin labeled 386-bp PCR product as probe (B). Marker-1 is Gen-100 DNA Ladder, and Marker-2 is a mixture of *Hind* III digested Lambda DNA and *Hae* III digested  $\phi$ x 174 DNA.



圖四、專一性核酸引子對 Fusa1-5/Fusa1-6 與 F024、F046、F32、F101、F133、F149、F155、F160、F137、PA2、F165、F166、SPL18、P3SSc、PS3S、SPL7 菌株之基因體核酸進行聚合酶連鎖反應，結果顯示其中 F024、F046、F101、F133、F149、F155、F160、F165、F166、P3SSc、及 SPL7 菌株有 386 bp 增幅產物出現。

**Fig. 4.** DNA products of PCR with specific primers Fusa1-5/Fusa1-6 and genomic DNA of different *Fusarium* isolates, F024, F046, F32, F101, F133, F149, F155, F160, F137, PA2, F165, F166, SPL18, P3SSc, PS3S, and SPL7. The expected 386 bp specific DNA fragment is produced when genomic DNA of the pathogenic *Fusarium* isolates was present.

表三、供試之百合土壤病原菌與不同作物上之 *F. oxysporum* 分化種菌株表以及將此菌株以專一性引子對進行聚合酶連鎖反應結果

Table 3. List of the isolates which are the pathogens common in lily, and some different formae speciales isolates of *F. oxysporum*, and the result of polymerase chain reaction

Isolates	Species	Host	PCR product <sup>1</sup>
F016	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i>	Lily	+
P448, P483	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Lily	-
P453, P459	<i>Pythium splendens</i>	Lily	-
P482	<i>Pythium myriotylum</i>	Lily	-
Sr032, Sr105, Sr136, Sr175, Sr176	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Lily	-
F001, F008	<i>Fusarium solani</i>	Lily	-
F066	<i>Fusarium moniliforme</i>	Lily	-
Rs-11	<i>Rhizoctonia solani</i>	Lily	-
P451, P485	<i>Phytopathora parasitica</i>	Lily	-
P452	<i>Pythium ultimum</i>	Lily	-
Folu-118	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>luffae</i>	Loofah	-
GF04	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ginger	-
Foc-100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Cucumber	-
Fot-81	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	Cowpea	-
Fom-111	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Melon	-
Fomo-102	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>monodriciae</i>	Balsam pear	-
BF026	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Banana	-
Fog001	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	Gladiolus	-

<sup>1</sup>. The 386 bp DNA product of PCR with specific primers Fusal-5/ Fusal-6 and genomic DNA of the different isolates. +: the 386 bp DNA product display; -: no 386 bp DNA product.

sp. *lilii* 感染。如果先將百合組織分離而得的菌株移至營養培養基 PDA 或 PDB 上增量培養，增加菌量後再將其 DNA 純化出來，可達到 PCR 所需反應濃度，則可成功利用專一性引子對偵測是否為 *F. oxysporum* f. sp. *lilii*，增量培養的另一項好處是能避免偵測到已死亡無法再感染百合之病原菌 DNA，但增量培養的缺點是增量培養必須多花費數天時間待其生長至菌絲量足夠後其純化之DNA 濃度才足夠使專一性引子對能成功偵測出來，不過比起一般需完成分離、鑑定、接種、再分離才能確定百合鏟孢菌萎凋病病原的時間上來說已經是一種簡單且快速的方式。

目前初步測試無法由罹病植株組織直接抽取的 DNA 增量出專一性 DNA 片段的原因可能是因為種球未種植前以低溫保存，在種球內之病原菌於低溫下生長非常緩慢所以菌量少，加上我們在純化抽取 DNA 的過程會有 DNA 遺漏，使得我們所純化出病原菌之 DNA 濃度太低，無法用專一性引子對及 PCR 放大出鑑別的 DNA 片段。除了增量培養的方式外，若能著手在純化抽取 DNA 的步驟上改善，減少 DNA 的遺漏，提升 DNA 的濃度至可利用專一性引子對增幅放大出鑑別的 DNA 片段，則能縮短偵測 *F.*

*oxysporum* f. sp. *lilii* 的時間至 1 天內，能更有效運用在防疫檢疫上。

## 謝 辭

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 90 農科 6.3.2-檢-B2 (2) 及 91 農科-7.3.2-檢-B2 經費補助，特致謝忱。

## 引用文獻

1. 謝廷芳、杜金池. 1996. 百合、彩色海芋之病害及防治. 球根花卉產業研討會專輯第 200-211 頁. 農林廳種苗改良繁殖場編印.
2. Birnboim, H. C., and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7 : 1513-1518.
3. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. C. M. I. Kew, Surrey, England. 237 pp.
4. de Haan, L. A. M., Numansen, A., Roebroeck, E. J. A.,

- and van Doorn, J. 2000. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* race 1, causal agent of Gladiolus yellows disease, from infected corms. Plant Pathology 49, 89-100.
5. Imle E. P. 1942. Bulb Rot Disease of Lilies. The American Lily Society Yearbook.30-41.
  6. Ish-Horowicz D., and Burke J. F. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res. 9, 2989-2998.
  7. Linderman R.G. 1981. Fusarium disease of flowering bulb crops. Pages 129-141 in : Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy. Nelson, P. E., Tousson, T. A., and Cook, R. J., eds. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
  8. McRae, E. A. 1988. Fungus diseases, pp13-18 in Lily disease handbook, North American Lily Society.
9. Nash,S. M., and Snyder, W. C.1962. Quantitative estimation by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52:567-572.
10. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Press.
11. Snyder, W. C., and Toussoun, T. A. 1965. Current status of taxonomy in Fusarium species and their perfect stages. Phytopathology 55:833-837.
12. Wollenweber, H. W., and Reinking, O. A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin. 355pp.

## ABSTRACT

Kao, W. T.<sup>1</sup>, Shih, Y. Y.<sup>1</sup>, and Hsieh, W. H.<sup>1,2</sup>. 2002. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lili* by PCR. Plant Pathol. Bull. 11:112-122. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan, R.O.C. ; <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: whhsieh@dragon.nchu.edu.tw, Fax No: +886-4-22859009.)

The basal rot, root rot and wilt of lilies caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lili* are the most destructive disease during its growing period in Taiwan. *F. oxysporum* f.sp. *lili* is difficult to identify because of the various morphological characteristics and virulence. For the reason using the molecular techniques to provide a fast and precise method in identification of *F. oxysporum* f. sp. *lili* is needed. Total 74 *F. oxysporum* isolates isolated from the diseased bulbs, plants, and the soil in the field of Hsi-hu, Feng-yuan, and Pu-li were used in the experiment. For the pathogenicity tests, bulbs were dipped in the spore suspension ( $10^6$  cfu/ml) of each isolate then planted in the sterilized sandy loam soil. The pathogenicity tests revealed that 30 isolates of *F. oxysporum* were pathogenic on lily and the other 44 isolates were non-pathogenic. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to screen 100 random primers with genomic DNA of 3 pathogenic *F. oxysporum* isolates (F016, F025, and G016) and 6 non-pathogenic *F. oxysporum* isolates (F032, F036, F038, F040, F140, and F141). The primer OPAT-4 (5'-TTGCCTCGCC-3') was found to amplify a specific DNA fragment only in the genomic DNA of the pathogenic isolates. The amplified specific DNA fragment was recovered, cloned, and sequenced. And the specific primers set Fusal-5 (5'-GCTTCGGCCGCCTCATAG-3') and Fusal-6 (5'-TTGCCTCGCCGATAGTGGAT-3') were designed from the nucleotide sequence of the above specific DNA fragment for polymerase chain reaction (PCR). As expected, a 386-bp specific DNA fragment was produced in PCR. Using the specific primers to detect the 74 *F. oxysporum* isolates, the same results were obtained as the pathogenicity test forementioned. The specific DNA fragment was not amplified in the genomic DNA of the common pathogens *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Sclerotium rolfsii*, and *F. moniliforme* found on lily, and some different formae speciales isolates of *F. oxysporum*, tested i.e. *F. oxysporum* f. sp. *luffae*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *monodricae*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, and *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. The results showed that the specific primer set developed can successfully detect *F. oxysporum* f. sp. *lili* from other fungal pathogens when the genomic DNA of the cultured mycelia was used for PCR. And the minimal DNA concentration could be detected is about 200 pg /  $\mu$ l.

**Key words:** Lily, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lili*, detection, polymerase chain reaction, probe, random amplified polymorphic DNA