

Botrytis cinerea 及 *B. elliptica* 偵測用分子標記之建立

陳隆鐘^{1,3} 陳天枝¹ 陳惠玲¹ 葉瑩²

1. 台中市 國立中興大學植物病理學系
 2. 台北市 行政院農業發展委員會動植物防疫檢疫局
 3. 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、陳天枝、陳惠玲、葉瑩. 1998. *Botrytis cinerea* 及 *B. elliptica* 偵測用分子標記之建立. 植病會刊 7:177-188.

將 *Botrytis cinerea* 菌株 WFFr103 與 *B. elliptica* 菌株 EPL803 之粒腺體核酸經限制酵素 *EcoRI* 處理後，分別與載體 pBluescript SK+ 接合，再轉型至 *E. coli* DH5 菌株，各構築一基因庫，並自轉殖株回收之 mtDNA 片段製備成的核酸探針與其餘菌株之全 DNA 進行點雜配反應，測試結果以核酸探針 pBE83-8 (0.9 kb) 可偵測至只含 10^{-2} ng 之灰黴病菌全量核酸之高敏感度，核酸探針 pBE83-4B (1.2 kb) 與所有供試 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 菌株之核酸同源性最高，皆有反應出現。另以隨機增幅核酸多型性分析，篩選出引子 OPB-17，其增幅灰黴病菌 DNA 時，皆有專一性 300 bp、600 bp 及 800 bp 左右之條帶產生，並進一步將此些片段進行轉殖及製備成探針 pBCE30、pBCE60 及 pBCE80。以南方氏核酸雜合反應分析，其與 *Botrytis cinerea* 和 *B. elliptica* 菌株皆有反應產生，並分別進行核酸序列解序設計引子對 PB30-1F / PB30-1R、PB60-1F / PB60-1R 和 PBCE80-1F / PB80-1R，其中引子對 PB80-1F / PB80-1R 能專一性自 *B. cinerea* 增幅出 890 bp 的條帶，和從 *B. elliptica* 增幅出 381 bp 的條帶，但對 *Sclerotium rolfsii* 與 *Mucor sp.* 則無任何產物產生。

關鍵詞：灰黴病菌、粒線體核酸探針、聚合 連鎖反應

緒 言

百合灰黴病菌 (*Botrytis elliptica*) 危害百合葉片、花器，初期產生白色褪色小斑點，以後轉為褐色或紅褐色病斑，病斑處凹陷，發病嚴重時則造成落葉，甚至全株枯萎。而其他作物常見之灰黴病多半由 *B. cinerea* 所引起，是一種多犯性病原真菌，其寄主範圍廣泛，普遍分布於世界各地，已知寄主超過 200 種 (2, 3, 4, 5)，且不斷有新寄主被報導 (5)，能感染蔬菜、漿果類、花卉等作物，甚至森林中的樹苗，造成重要的經濟作物及切花產量之損失並成為進出口產品品質的一個重要限制因子 (14, 15)。臺灣已有記載的 *B. cinerea* 寄主作物達近百種 (2)，主要栽培之花卉作物，如菊花、夜來香、玫瑰、洋桔梗、唐菖蒲、星辰花、非洲菊與蘭花等皆均受該灰黴病菌為害而降低品質。於高冷地栽培區或平地之冬末春初當氣候低溫高濕時，灰黴病發生猖獗，對觀賞植物類特別是花卉易造成嚴重為害，因此構成花農在冬春栽培時之障礙。灰黴病菌為害切花時，其分生孢子易藉空氣傳播，當傳播至花器上時，仍保持休眠狀態直至水分足夠時才發芽，發芽後數小

時便可侵入感染。故在冬、春之際此病原菌更可造成嚴重的經濟損失。其病徵能在溫室內栽培的花上見到，亦可能以分生孢子存在切花上，而在貯存、運輸、出貨時因溫度的改變及高濕亦可導致侵染發病 (14)。在為害果實上，本菌經常於開花期侵入花器，然後休眠潛伏或靜止直到果實成熟才產生病徵，因此病徵總在果實已在市場存放時才發生，而成為許多漿果類的重要貯運期病害 (6, 13)。當環境不適合時，病原菌雖侵入寄主組織但未立即表現病徵而出現潛伏感染現象，待環境適合時病徵才表現出來；進入潛伏感染之病原菌亦可以腐生狀態存在，而後以菌核及菌絲狀態休眠，休眠之菌核及菌絲遇環境適合時便開始生長，並於產生大量分生孢子後散佈，又因灰黴病菌可透過許多途徑傳播 (3, 6, 10)，因此本病一旦有病徵發生時，病害即已迅速擴展且易造成大發生，是以需要一套可快速偵測分析病原菌的技術，配合對其生理生態的了解，而達到病害防治的目的。

因此本研究進行專一性核酸片段之篩選及其核酸序列之解序，以發展灰黴病菌之核酸探針及設計具有專一性引

子，開發灰黴病菌之分子偵測技術。俾作為研究灰黴病菌在田間侵入感染及如何越夏、種球是否帶菌等問題時之應用。同時利用所收集之臺灣各地灰黴病菌菌株，建立其全量核酸基因庫，以隨機引子 DNA 聚合酵素連鎖增幅反應法 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)，分析菌株間之遺傳差異，俾瞭解灰黴病菌在地區間或寄主間是否有差異性存在，供將來進行國內外灰黴病菌菌株間遺傳差異之研究，並作為病害防治及檢疫偵測之應用。

材料與方法

供試菌株之來源

本研究供試菌株採自被灰黴病菌感染之花卉等作物 (表一)。供試菌株之菌絲培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板 (PDA plate, potato dextrose agar, Difco Laboratories, MI, USA)，*Botrytis elliptica* 菌株則培養於百合煎煮汁液瓊脂平板 (lily decoction agar plate, aqueous lily leaf extract obtained by autoclaving 800 g of fresh Alita lily leaves in deionized water, 10 g of glucose, and 15 g of Difco-Bacto agar per liter) (7)。

表一、供試菌株來源

Table 1. List of *B. cinerea* and *B. elliptica* isolates used in this study

Isolate No.	Host species	Location
<i>Botrytis cinerea</i>		
WFF101	<i>Eustoma grandiflorum</i> (洋桔梗)	Wufeng (霧峰)
CJF102	<i>Limouium sinuatum</i> Mill. (星辰花)	Chingjing (清境)
WFFr103	<i>Fragaria xananassa</i> Duch. (草莓)	Wufeng (霧峰)
PLF104	<i>Cymbidium</i> sp. (四季蘭)	Puli (埔里)
TJL105	<i>Eustoma grandiflorum</i> shim (洋桔梗)	Tianjung(田中)
TTF106	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 雙喜)	Tsaotuen (草屯)
TTF107	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 金葉BB)	Tsaotuen (草屯)
TTL108	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 熱情)	Tsaotuen (草屯)
TTF109	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 愛玲卡)	Tsaotuen (草屯)
WFFr110	<i>Fragaria xananassa</i> Duch. (草莓)	Wufeng (霧峰)
TTF111	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 絕代佳人)	Tsaotuen (草屯)
WFF112	<i>Eustoma grandiflorum</i> (洋桔梗)	Wufeng Nanshin (南勢)
TTF113	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 雙喜)	Wufeng peitoupu (北投埔)
TTF114	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 黛安娜)	Tsaotuen (草屯)
TTF115	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰, 草屯白)	Tsaotuen (草屯)
PLS116	<i>Gerbera jamesonii</i> (非洲菊)	Puli (埔里)
WFS117	<i>Eustoma grandiflorum</i> (洋桔梗)	Wufeng (霧峰)
JZFr118	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (四季豆)	Pingtung Jiouru (九如)
FSF119	<i>Rosa hybrida</i> (玫瑰)	Tsaotuen (草屯)
SPL120	<i>Eustoma grandiflorum</i> (洋桔梗)	Chiai shipei (嘉義溪北)
<i>Botrytis elliptica</i>		
CJF801	<i>Lilium hybridum</i> Oriental (acapulco)	Chingjing (清境)
CYF802	<i>Lilium hybridum</i> Oriental (stargazer)	Chiai (嘉義)
EPL803	<i>Lilium hybridum longiflorum</i> (新雪山一號)	Yanpu (鹽埔)
CSL804	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic (polyanna)	Chiai Shipei (嘉義溪北)

製備核酸之菌絲培養方法係將供試菌株菌絲接種源各別接種於直徑九公分的玻璃培養皿，其內含有 20 ml PD broth (potato dextrose broth; Difco laboratories, MI, U.S.A.)，於 20 C 之定溫培養箱內培養約 5 天後，將其菌絲收集並以蒸餾水洗淨，去除多餘水份，將其撕成碎片裝於 100 ml 的血清瓶中，以冷凍乾燥機 (Labconco LYPH-LOCK 6 Kansas, U.S.A.) 進行菌絲冷凍乾燥。最後將冷凍乾燥後之菌絲磨成粉末狀，並保存在 -20 C 之冷凍櫃內備用。

灰黴病菌之核酸探針之製備與分析

灰黴病菌全量核糖核酸 (total DNA) 及粒腺體去氧核糖核酸 (mitochondrial DNA, mtDNA) 之抽取

灰黴病菌全量 DNA 之抽取，係取經上述保存在 -20C 之冷凍櫃內備用的菌絲粉末 8 g，加入 120 ml 之核酸萃取緩衝液 (extraction buffer, 0.5 M sucrose, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA)，使其混和均勻，加入等倍體積之 phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1 (v/v)) 混合液，均勻混合後以 10000 g 離心 15 分鐘，然後吸取含有核酸之上層液至新的離心管，再加入 1 / 10 倍體積 3 M 醋

CSL805	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic (elita)	Chiai Shipei (嘉義溪北)
CSL806	<i>Lilium hybridum longiflorum</i> (雪山鐵砲)	Chiai Shipei(嘉義溪北)
HLL807	<i>Lilium hybridum</i> Oriental (casa blanca)	Houli (后里)
YCL808	<i>Lilium hybridum</i> Oriental (stargazer)	Yuchr (魚池)
WTF809	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	Wandan (萬丹)
SGL810	<i>Lilium hybridum</i> Oriental (stargazer)	Shengang (神岡)
SGL811	<i>Lilium hybridum</i> Oriental (stargazer)	Shengang (神岡)
SGL812	<i>Lilium hybridum</i> Oriental (stargazer)	Shengang (神岡)
SGF813	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic. (polyanna)	Shengang (神岡)
SGF814	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic. (polyanna)	Shengang (神岡)
SGF815	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic. (polyanna)	Shengang (神岡)
SGL816	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic. (elita)	Shengang (神岡)
SGL818	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic. (elita)	Shengang (神岡)
SGL819	<i>Lilium hybridum</i> Asiatic (acapulco)	Shengang (神岡)
Be-li-10	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA1
Be-li-1-16	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be-2-2	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be-3-3	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be-12-1	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be12-9	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be83-2-10	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be85-1-4	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be85-1-8	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be-85-3-9	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be-69-5-2	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
Be-69-2-5	<i>Lilium hybridum longiflorum</i>	NCYIIA
<i>Botrytis gladiolorum</i>		
CYF501	<i>Gladiolus hybrida</i> (唐菖浦)	Chiayi (嘉義)
TWL502	<i>Gladiolus hybrida</i> (唐菖浦)	Tienwei (田尾)
<i>Mucor sp.</i>		
MCOO1	<i>Fragaria xananassa</i> Duch. (草莓)	Kuohsing (國姓)
<i>Aspergillus nidulans</i>		
ASPOO2		
<i>Sclerotium rolfsii</i>		
804026	<i>Fragaria xananassa</i> Duch. (草莓)	Mauli Tahu (大湖)
804002	<i>Iris tectorum</i> (鳶尾)	Houli (后里)
804023	<i>Limonium sinuatum</i> Mill. (星辰花)	Puli (埔里)
804031	<i>Alstroemeria hybrida</i> (水仙百合)	Chingjing (清境)
Other fungus		
CKS001	<i>Botrytis cinerea</i> (non-pathogenic)	
SFF002	<i>Fursarium sp.</i>	Houli (后里)

¹NCYIIA: National Chia-Yi Institute of Agriculture, Chia-Yi.

酸鈉 (sodium acetate) 及 2 倍體積之預冷 99.5 % 酒精 (Merck, Darmstadt, Germany), 於 -20 C 下靜置 2 小時, 然後在 4 C 下以 10000 g 離心 20 分鐘以沉降核酸, 再用 70 % 預冷酒精洗滌核酸沉澱物 (pellet), 以真空抽氣乾燥後, 加入 4 ml 之 TE 緩衝液 (pH 8.0), 置於 4 C 溶解。純化所得之核酸保存於 -20 C 超低溫冷凍櫃中備用。而粒腺體核酸之純化, 係將上述純化之全量核酸, 利用 CsCl / Bisbenzimidazole (0.2 mg / ml, Sigma, MO, USA) 超高速離心法, 置於超高速離心機 (Hitachi 85-72, Roter RPS 50-2, Takeda Katsuta, Japan) 中, 以 45000 g 離心 24 小時。離心

後隨即抽出位於最上層之粒腺體核酸亮帶, 以等體積之 1-butanol 反覆抽取以去除 bisbenzimidazole; 再將上層液移到新的離心管, 加入 1 / 10 倍體積之 3 M 醋酸鈉及 2 倍體積之預冷無水酒精, 於 -80 C 下靜置 2 小時; 然後以 10,000 g 離心 15 分鐘沈澱 DNA, 再用 70 % 預冷酒精洗滌 DNA 沈澱物, 以真空抽氣乾燥後, 即可保存於 -20 C 超低溫冷凍櫃中備用。

粒腺體核酸片段之選殖 (cloning)

首先進行載體 pBluescript SK (+) 製備, 然後取 2 µg 之 mtDNA (*B. cinerea* 菌株 WFFr103 及 *B. elliptica* 菌株

EPL803), 以內限制酵素 *EcoRI* 剪切後, 進行剪切片段回收, 並以酒精沈降核酸, 再將其溶於 TE 緩衝液 (pH 8.0) 中, 調整濃度為 $0.1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 。將剪切完成之 mtDNA 片段及載體混合放入微量離心管中, 加入 $10 \times$ 黏結酵素緩衝液及 2 單位 (unit) 之 T_4 黏結酵素 (T_4 DNA ligase, New England Biolabs Inc, MA, USA), 最終反應總體積為 $20 \mu\text{l}$ 。於 16°C 中作用 8 小時, 以進行黏結反應 (ligation)。勝任細胞 (competent cell) 的製備係參照 Mandel 和 Higa 的方法進行 (11), 將經黏結酵素作用完畢之 DNA 溶液置於 65°C 之水浴中作用 5 分鐘, 以去除黏結酵素之活性, 並將其加入製備好之勝任細胞中, 混合均勻後放置於冰浴中 1 小時, 繼而於 42°C 水浴後, 立即取出置於冰上; 加入 1 ml LB (Luria-Bertani) 培養液, 於 37°C 中震盪培養一小時, 再分別加入 $4 \mu\text{l}$ IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside, Promega, WI, USA) 及 $40 \mu\text{l}$ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase, Promega, WI, USA), 然後取此培養菌液塗抹於含有 $60 \mu\text{g} / \text{ml}$ 之 ampicillin 的 LB 固體培養基上, 於 37°C 培養 12 小時後, 挑出白色菌落移植於 LB / ampicillin 之固體培養基中培養, 以進一步分析, 俾確定所挑之白色菌落為攜帶質體之準轉殖株 (putative transformants)。

利用 DNA 雜合反應 (hybridization) 進行專一性核酸片段之篩選

擇 mtDNA 嵌入片段小於 2 kb 的轉殖株, 利用質體微量抽取法得到重組質體 DNA 後, 以內限制酵素 *EcoRI* 作用後回收 mtDNA 片段。將回收之 mtDNA 片段, 採用非放射性之 NEBlot-Phototope™ 套組 (New England Biolabs, Inc., MA, USA) 方法進行標識, 標識完成之核酸片段, 保存於 -20°C 超低溫冷凍櫃中備用。取供試菌株之全量核酸 ($0.1 \mu\text{g}$), 各別加入 $300 \mu\text{l}$ 變性緩衝液 (denatured buffer: 0.4 N NaOH ; 10 mM EDTA , pH 8.0), 置於 90°C 作用 10 分鐘, 冰浴 5 分鐘後, 瞬間離心, 再置於冰上待用。另剪一大小與濾紙 (Milliblot filter paper, $8.5 \text{ cm} \times 11 \text{ cm}$, MA, USA) 相似的濾膜 (Immobilon-S membrane, MA, USA), 於 $2 \times \text{SSC}$ 溶液 (0.3 M NaCl ; $0.03 \text{ M sodium citrate}$) 中潤溼後, 使用 96 孔點漬轉漬器 (Milliblot™-S, MA, USA) 進行轉漬。其後將薄膜小心取出, 於 $2 \times \text{SSC}$ 溶液中漂洗, 再置於無菌箱中風乾。完全乾燥後, 置於 UV Model TL-312A (Spectroline, NY, USA) 內, 進行聯結 (cross linking)。最後將此濾膜置於反應袋中, 加入前雜合溶液 (prehybridization solution: $5 \times \text{SSC}$, 0.1% (W/V) SDS, 5% (W/V) dextran sulfate, $1/20 \times$ liquid block (Amersham, Buckinghamshire, England)), 於 68°C 進行前雜合。然後將已標識好之探針置於沸水中煮 5 分鐘使其變性後, 立即置於冰上冰浴 5 分鐘, 瞬間離心後, 加入反應袋之溶液中, 使其最終濃度為 $20 \text{ ng} / \text{ml}$, 同樣於 68°C 中進行核酸雜合

反應。偵測反應分析乃使用 Phototope™-Star Detection 套組建議流程進行。薄膜以 X-ray 底片 (Hyperfilm™-MP, Amersham, Sweden) 進行曝光 5 分鐘後並比較核酸片段的訊號強度。

核酸探針靈敏度測定

將灰黴病菌之全量 DNA 100 ng ml^{-1} 進行十倍系列稀釋, 然後利用已標識好之核酸探針進行 DNA 點雜合反應, 以分析探針之靈敏度, 雜合之步驟如上述。

以隨機增幅多型性分析 (RAPD) 進行灰黴病菌專一性片段之篩選

反應物的增幅條件

以 $200 \mu\text{l}$ 微量離心管盛裝 RAPD 的反應物, 每一樣本參與反應的總體積為 $25 \mu\text{l}$, 包含 0.4 mM 的去氧核糖核苷三磷酸鹽 (dNTPs) (Protech, Taipei, R.O.C.)、 1 mM MgCl_2 、含 1.5 mM 鎂離子的反應緩衝液 ($1 \times$ reaction buffer) (Finnzymes Oy Inc., Finland)、 $0.4 \mu\text{M}$ 的引子 (primer)、 2 U 的 DynaZyme I DNA 聚合酵素 (Finnzymes Oy Inc., Finland) $0.5 \mu\text{l}$ 、 20 ng 的模版 DNA, 將微量離心管置入迴溫循環器 (Hybaid, OmniGene, U. K., England) 中進行 DNA 增幅, 其增幅條件為 (a) 95°C , 50 秒; 37°C , 60 秒; 72°C , 70 秒; 35 個循環; (b) 95°C , 50 秒; 37°C , 70 秒; 72°C , 7 分鐘; 1 個循環。增幅完畢後取出反應產物進行瓊脂電泳分析。

RAPD 增幅片段之選殖

隨機選取 32 株灰黴病菌菌株 (20 株 *B. cinerea* 和 12 株 *B. elliptica*)、8 株對照菌株 (*B. gladiolorum*、*Alternaria* sp.、*Aspergillus nidulans*、*Mucor* sp. 及 *Sclerotium rolfsii*) 與 2 種百合葉片 (*Lilium hybridum* Oriental (Casablanca) and *Lilium hybridum* Asiatic (Elita)), 作為模版 DNA 進行測試 Operon Technologies 公司 (Alameda, CA, USA) 所製造的 60 個引子 (KitA、KitB 及 KitW), 篩選具專一性且再現性 (reproducibility) 穩定的增幅核酸片段。其選殖係採用 TOPO TA Cloning 套組 (Invitrogen, CA, USA), 並依廠商建議之使用說明進行。取新鮮的 RAPD 增幅產物 $0.5 \sim 2 \mu\text{l}$, 加無菌水至 $4 \mu\text{l}$, $1 \mu\text{l}$ pCR II-TOPO 質體 ($10 \text{ ng} / \mu\text{l}$ plasmid DNA in 50% glycerol; 50 mM Tris-HCl , pH 7.4; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 0.1% Triton X-100; $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ BSA; phenol red) 均勻混合, 置於室溫下反應 5 分鐘, 即完成黏接反應。其勝任細胞的製備與質體轉殖方法, 同粒腺體核酸片段之選殖。

南方氏轉漬 (Southern blotting) 分析

參考 Southern 氏之方法 (17), 將上述經電泳後之膠體上之增幅核酸產物轉漬於 nylon 濾膜上。首先將膠體浸於 0.2 N HCl 溶液中, 緩慢搖盪 5 分鐘後, 倒掉 HCl 溶液, 以清水漂洗兩次, 再以變性溶液 (denaturation solution:

1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) 緩慢搖盪 30 分鐘, 再重複一次後, 以清水漂洗兩次。加入中和溶液 (neutralization solution: 1 M Tris, pH 7.5, 1.5 M NaCl) 緩慢搖盪 20 分鐘, 再重複一次。如此, 即可將膠體置於經轉漬液 (2 × SSC) 溼潤之濾膜上, 使用轉漬器 (MilliBlot-V Vacuum Transfer System) 進行轉漬 1 小時, 然後將濾膜小心取出, 於 2 × SSC 溶液中漂洗後, 置於乾淨的濾紙 (Whatman™ 3MM paper) 上, 於無菌箱中風乾。完全乾燥後, 置於聯結器 (UV Stratalinker 1000, Stratagene™, USA) 內進行聯結, 最後將此濾膜置於雜合反應袋中, 依前述步驟進行 DNA 雜合反應。

核酸定序 (sequencing) 解讀分析

核酸序列解讀分析係依據 Sanger 氏等人 (16) 的鏈終止方法 (chain-termination method), 以 T7 Sequenase version 2.0 DNA sequence kit (United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, USA) 進行定序, 其則依據廠商所提供者進行。序列資料以 Lasergene (DNASTAR Inc., Wisconsin, USA) 程式進行分析, 從中設計及製備具專一性的引子對。

以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行灰黴病菌之偵測

反應物的增幅條件

以 200 μl 微量離心管盛裝預進行 PCR 的反應物, 每一聚合酵素連鎖反應樣本參與的總體積為 25 μl, 包含 50 ng 模版 DNA、200 μM 的去氧核糖核苷三磷酸鹽、含 1.5 mM 鎂離子的反應緩衝液 (1 × reaction buffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8.8; 50 mM KCl; 0.1 % Triton X-100; 0.2 mg/ml activated DNA)、0.25 μM 的引子、1 U 的 DynaZyme II DNA 聚合酵素, 將各成分充分混合後, 加入 20 μl 礦物油懸浮於樣本上層, 以防止反應過程中反應物之蒸散。將微量離心管置入 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 (a) 94 C, 4 分鐘; 1 個循環; (b) 94 C, 60 秒; 60 C, 60 秒; 72 C, 60 秒; 35 個循環; (c) 72 C, 7 分鐘; 1 個循環。

專一性引子對灰黴病菌偵測的敏感度

取 *B. cinerea* 及 *B. elliptica* 基因體核酸 100 ng 做十倍系列稀釋進行 PCR 的反應, 反應的體積為 25 μl, 反應物濃度與條件如上述。

結 果

灰黴病菌之核酸探針之製備與分析

粒腺體核酸限制酵素剪切片段之選殖與核酸探針之製備

由全量 DNA (total DNA) 中萃取之粒腺體核酸, 藉由內限制酵素 *EcoRI* 將其切成大小不同片段, 自 *B. cinerea*

菌株 WFFr103 經轉殖作用後, 得到 736 個白色大腸桿菌轉殖菌株; 而自 *B. elliptica* 菌株 EPL803 經轉殖作用後, 得到 475 個白色大腸桿菌轉殖菌株。這些轉殖株經過微量質體抽取, 並經由內限制酵素 *EcoRI* 酵解及電泳分析後, 確定其所攜帶之質體為帶有外來 DNA 片段之重組質體 (recombinant plasmid), 並以南方轉漬 (Southern blotting) 分析, 確定其重組質體帶有之外來 DNA 片段來自於轉殖之粒腺體核酸, 並隨機選取 0.7 至 1.2 kb 之 6 個核酸片段製成核酸探針, 並命名為 pBE83-8 (0.9 kb)、pBE83-4B (1.2 kb)、pBE83-7 (1.1 kb)、pBC26-9 (1.2 kb)、pBC29-9 (0.7 kb) 及 pBC29-2 (1.2 kb)。

以點雜配分析法與南方轉漬分析法進行核酸探針專一性篩選 mtDNA 片段製備成的核酸探針與其餘菌株之全量 DNA 進行點雜配 (dot hybridization) 反應, 以 pBE83-8 之敏感度最高可達 10^{-2} ng; 核酸探針 pBE83-4B 則與所收集之 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 菌株皆有反應; 核酸探針 pBE83-7 則與所收集之 *B. cinerea* 菌株大多有反應; 核酸探針 pBC26-9、核酸探針 pBC29-9 則與所收集之 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 菌株僅部分有反應; 核酸探針 pBC29-2 則與所收集之 *B. elliptica* 菌株皆有反應。六個核酸探針皆與 *Sclerotium rolfsii* 與 *Mucor* sp. 有雜合反應產生 (表二)。

以隨機增幅多型性分析 (RAPD) 技術進行灰黴病菌專一性片段之篩選

由 Operon Technologies 公司 (Alameda, CA, USA) 所製造的 60 個引子 (KitA、KitB 及 KitW) 中, 篩選出 3 個對 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 具專一性且再現性 (reproducibility) 穩定的增幅機引子 OPW-05 (5'CTGCTTCGAG3')、OPB-17 (5'AGGGAACGAG3') 及 OPW-02 (5'TCGCAGGTTTC3')。

以引子 OPW-05, 利用隨機增幅多型性分析進行灰黴病菌 DNA 的增幅, 在 *B. cinerea* 菌株中除 CJFr118 外皆有 450 bp 左右之條帶產生, 除 TTF107 外皆有 700 bp 左右之條帶產生, 其它條帶則菌株間有明顯的差異。在 *B. gladiolorum*、*B. elliptica* 皆有 450 bp 及 700 bp 左右之條帶產生, 其它條帶則菌株間有明顯的差異, 7 株對照組真菌菌株與 2 種百合葉片則皆無 450 bp 左右之條帶產生。因此可用 450 bp 左右之條帶來進行偵測。以引子 OPB-17, 利用 RAPD 進行灰黴病菌 DNA 的增幅時, *B. cinerea*、*B. gladiolorum* 除 WFS117 菌株外皆有 300 bp 左右之條帶產生, 除 JZF118、TSF119 外皆有 600 bp 左右之條帶產生, 其它條帶則菌株間有明顯的差異。而 *B. elliptica* 菌株皆有 600 bp、800 bp 左右之條帶產生, 其它條帶則菌株間有明顯的差異, 在所有供試灰黴病菌菌株均有 800 bp 左右之條帶產生, 7 株對照組真菌菌株與 2 種百合葉片則皆無 800 bp 左右之條帶產生, 電泳照片 A3 則因無加入灰黴病菌 DNA 故無增幅產物產生 (圖一)。因此可

表二、由灰黴病菌菌株 (WFFr103 及 EPL803) 製備之六個核酸探針與供試菌株全量核酸點雜配結果

Table 2. Results of dot blotting hybridization of tested fungal isolates with six mtDNA probes prepared from *Botrytis cinerea* isolate WFFr103 and *B. elliptica* isolate EPL8031

Isolate	BC26-9 ²	BC29-2 ²	BC29-9 ²	BE83-4B ³	BE83-7 ³	BE83-8 ³
<i>Botrytis cinerea</i>						
WFF101	- ⁴	-	-	+	+/-	-
CJF102	-	-	+/-	+	+/-	-
WFFr103	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-
PLF104	+/-	-	-	+	+/-	-
TCL105	+/-	-	-	+	+/-	+/-
TTF106	-	-	-	+/-	-	-
TTF107	+/-	+	-	+	+/-	+/-
TTL108	+/-	+	-	+/-	+	+/-
TTF109	+/-	nd	nd	+	+/-	+/-
WFFr110	+	-	+/-	+	+/-	+/-
TTF111	+	+/-	+	+	+/-	+/-
WFF112	-	-	+/-	+	+/-	+
TTF113	+	+	+	+	+/-	+/-
TTF114	+	+	+	+	+	+
TTF115	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-
PLS116	+	+	+	+/-	+/-	+/-
WFS117	-	+	+	+	+/-	+/-
JZFr118	+/-	+/-	+	+	+	+/-
FSF119	+	nd	nd	+	+/-	+/-
CPL120	+	nd	nd	+	+	+/-
<i>Botrytis gladiolorum</i>						
CYF501	-	-	-	-	-	-
<i>Botrytis elliptica</i>						
CJF801	+/-	+	+	+	+/-	+
CYF802	-	+	+/-	+/-	-	+/-
EPL803	-	+	-	+/-	+/-	+/-
CCL804	+/-	+	+	+	-	+/-
CCL805	+	+	+	+	+	+/-
CCL806	-	+	+	+	-	+/-
<i>Mucor sp.</i>						
MCOO1	+	+	+	++	+	+
<i>Aspergillus nidulans</i>						
ASPOO2	-	+/-	-	-	-	-
<i>Sclerotium rolfsii</i>						
804002	+	+/-	+	+	+/-	+
804023	-	-	+/-	-	-	-
804026	+	+	+	+	+	++
804031	+	-	-	+	+/-	+/-
Sensitivity (ng)	1	10 ⁻¹	1	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²

1. One μg of total DNA of each test isolate was applied in each dot.

2. Cloned mtDNA probes prepared from *B. cinerea* isolate WFFr103.

3. Cloned mtDNA probes prepared from *B. elliptica* isolate EPL803.

4. Hybridization signals in dot blotting: -, negative signal; +, positive signals; +/-, very weak signal; nd=hybridization no done.

用 800 bp 左右之條帶進行 *B. cinerea* 及 *B. elliptica* 之偵測。以引子 OPW-02, 利用 RAPD 進行灰黴病菌 DNA 的增幅時, 在 *B. cinerea*、*B. gladiolorum*、*B. elliptica* 皆有 700 bp 左右之條帶產生, 其它條帶則菌株間有明顯的差異, 7 株對照組真菌菌株與 2 種百合葉片皆無 700 bp 左右之條帶產生。因此可用 700 bp 左右之條帶進行灰黴病菌之偵測。

RAPD 增幅片段之選殖及核酸定序 (sequencing) 解讀分析

分別將引子 OPW-05 (450 bp 和 700 bp 左右)、OPB-17 (300 bp、600 bp 和 800 bp 左右) 及 OPW-02 (450 bp 和 700 bp 左右), 利用隨機增幅多型性分析技術進行灰黴病菌 DNA 所增幅之核酸片段進行選殖, 並分別命名為 pBCEW-05-21、pBCEW-05-13、pBCEB-17-18、pBCEB-17-05、pBCEB-17-17、pBCEW-02-05 及 pBCEW-02-08 並進一步進行轉殖及製備成探針, 其中由 pBCEB-17-18、pBCEB-17-05、pBCEB-17-17 轉殖菌株所製備成的核酸 pBCE30、pBCE60 及 pBCE80。以南方氏核酸雜合反應分析, 與 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 菌株皆有雜合反應, 而与其它對照菌株皆無雜合反應產生 (圖二), 將其核酸序列分別解序設計引子對 PB30-1F / PB30-1R、PB60-1F / PB60-1R 和 PB80-1F / PB80-1R (圖三)。

聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

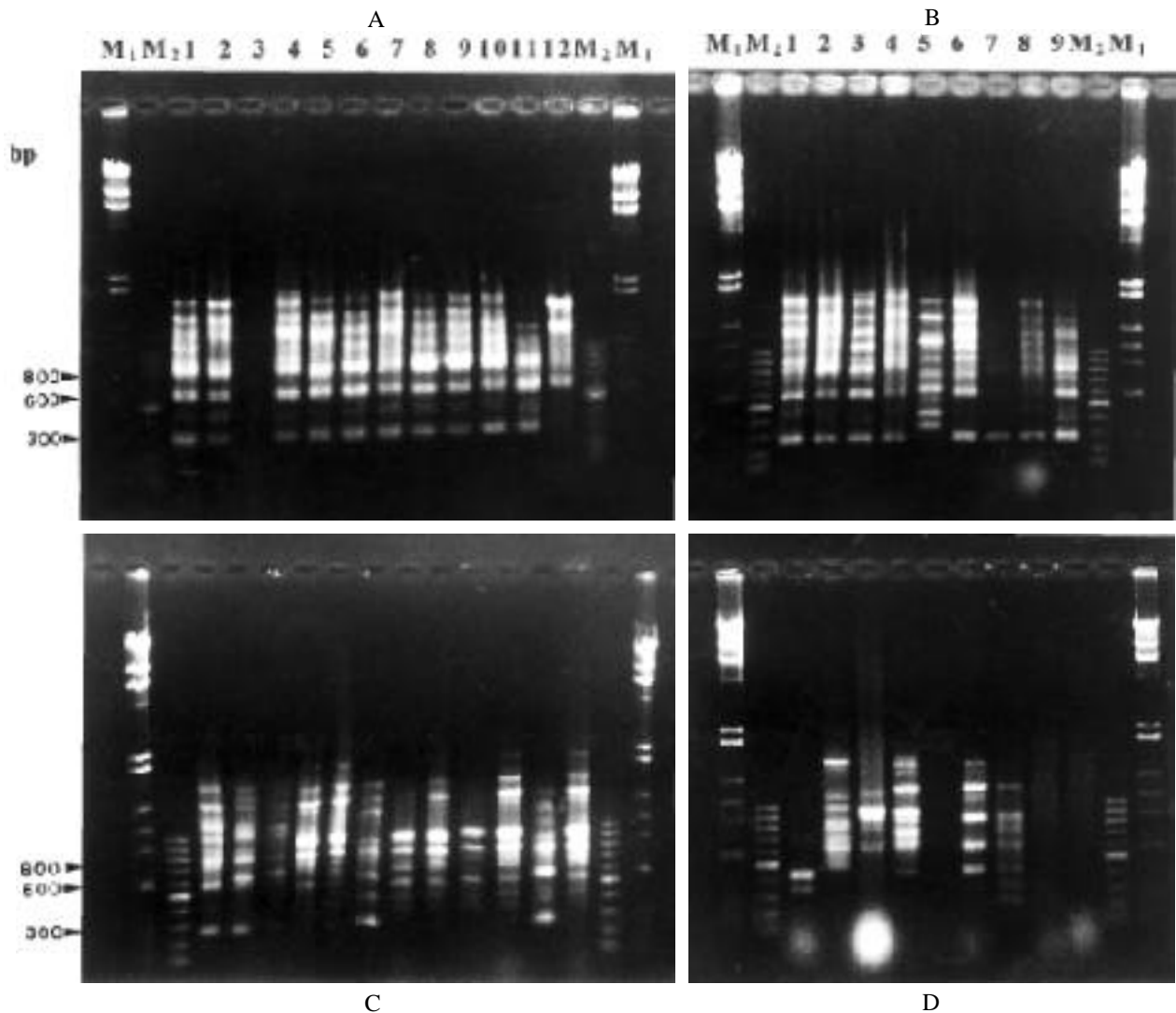
在所有的引子對中以 PB80-1F (5'ACGAGATGCGAG AGGTTGAA3') / PB80-1R (5'GGGGGATAGGGCAC TTTGT3') 能自 *B. cinerea* 增幅出具專一性 890 bp 的條帶 (圖四, A), 自 *B. elliptica* 增幅出具專一性的 381 bp 的條帶 (圖四, C), 及在鐵砲百合灰黴病菌可增幅出 881 bp 的條帶 (圖四, B), 但對其它的對照組菌株全量核酸則無任何產物產生 (圖四, D)。

專一性引子對對灰黴病菌偵測的敏感度

取 *B. cinerea* (TTF106) 及 *B. elliptica* (SKL820) 基因體核酸 100 ng 做十倍系列稀釋, 以引子對 PB80-1F / PB80-1R 進行核酸增幅時, 其偵測敏感度可 10^{-5} 及 10^{-4} ng (圖五)。

討 論

由 mtDNA 經內限制酵素剪切片選殖之核酸探針片段與供試菌株之全 DNA 進行點雜合 (dot hybridization) 反應中, 不論核酸探針片段源自於 *B. cinerea* 或 *B. elliptica* 菌株, 彼此皆有交互反應產生。在測試中採自於草屯同一塊田中的 7 株玫瑰灰黴病菌菌株, 除核酸探針 BE83-4B 外, 其他 5 個探針對此 7 株玫瑰灰黴病菌菌株在結果上有明顯差異, 因此顯示這些探針的種內一致性不足外, 也顯示在同一塊田中的灰黴病菌, 並非同一親源, 彼此就存有遺傳差異性, 值得進一步詳細探討與研究。



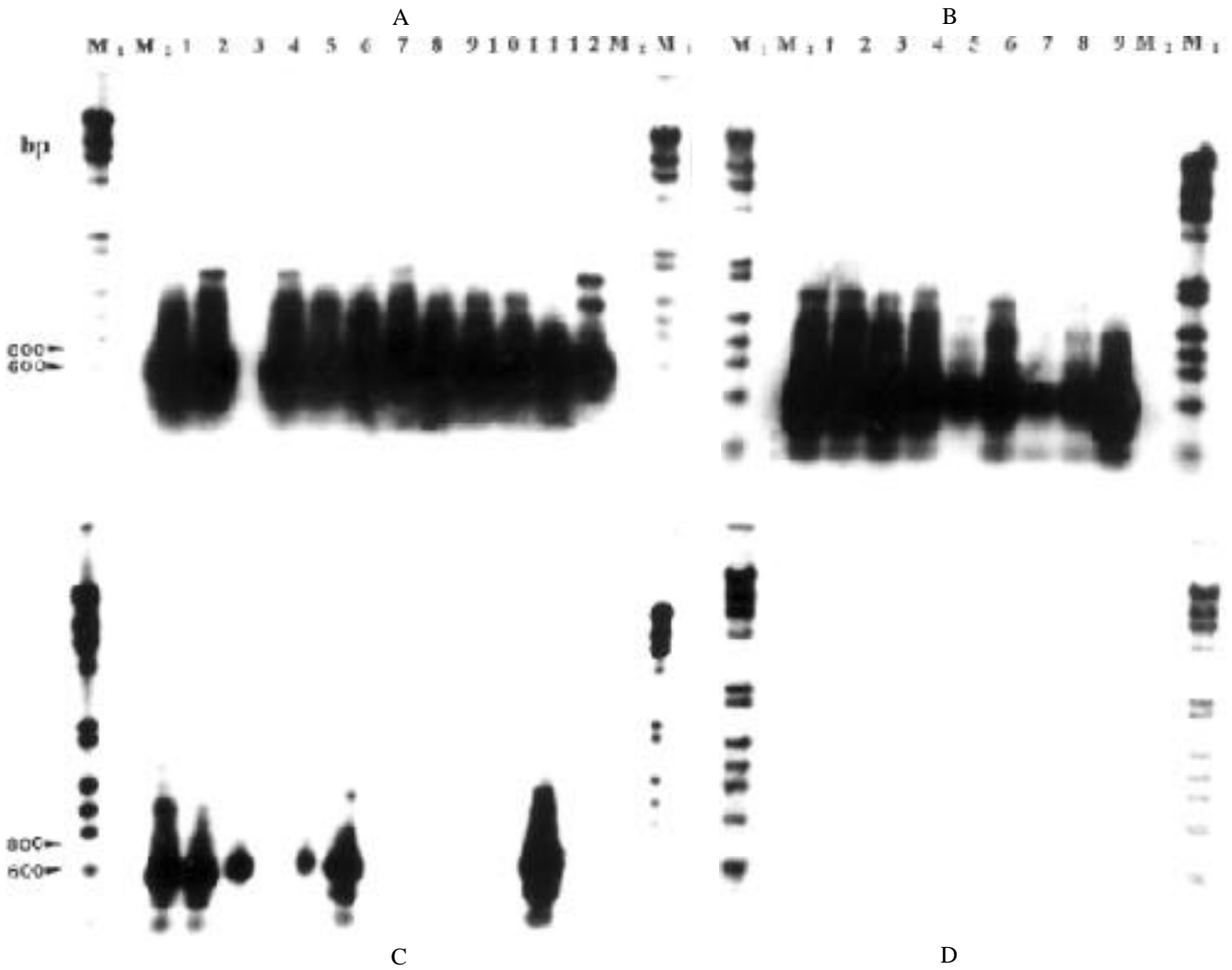
圖一、灰黴病菌與其它供試菌株應用 OPB-17 引子，經 RAPD 分析後所得之多形性電泳圖譜。

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis showed random amplified polymorphic DNA band patterns of isolates of *Botrytis* spp. and other fungi using primer OPB-17. Tracks are as follows; A1: WFF101, A2: CJF02, A3: nd, A4: PLF104, A5: TJL105, A6: TTF106, A7: TTF107, A8: TTL108, A9: TTF109, A10: WFFr110, A11: TTF111, A12: WFF112, B1: TTF113, B2: TTF114, B3: TTF115, B4: PLS116, B5: WFS117, B6: SPL120, B7: FSF119, B8: JZFr118, B9: CYF501, C1: CJF801, C2: CYF802, C3: EPL803, C4: CSL804, C5: CSL805, C6: CSL806, C7: Be85-1-4, C8: Be85-1-8, C9: Be-li-10, C10: Be83-2-10, C11: Be-3-3, C12: Be-85-3-9, D1: SFF002, D2: ASPOO2, D3: MCOO1, D4: 804002, D5: 804023, D6: 804026, D7: 804031, D8: *Lilium hybridum* Oriental (casablanca), D9: *Lilium hybridum* Asiatic (elita), Lanes marked M₁, biotinylated Lambda DNA-*Hind* III and M₂, 100 bp ladder marker.

由於真菌的粒腺體核酸 (mtDNA) 分子量比較小且具有定性，又粒腺體核酸經熱失活之後回復的能力比染色體核酸來得穩定，因此粒腺體核酸更適合於分子演化上的研究 (1, 18)。本實驗以限制酵素剪切灰黴病菌粒線體核酸進行不同片段的選殖及基因庫的構築，從中篩選之核酸探針片段皆和 *Mucor* sp. 有反應其和 Ricker 氏等人 (1991) 所進行之實驗有類似的結果 (13)，主要因素為探針之核酸片段皆大於 700 bp 易存在一些跨屬的核酸序列，但仍可利用其內不同之核酸序列進行鑑定之利用。核酸探針

pBE83-4B 與所收集之 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 菌株皆有反應，因比本實驗已再進一步進行其核酸序列解序，作為專一性 primer 之設計參考。

由於 RAPD 分析，可快速藉逢機引子增幅種內共同存在之多型性核酸片段，有利於專一性之核酸片段之篩選 (1)。利用 RAPD 進行灰黴病菌 DNA 的增幅時，皆可發現 *Botrytis cinerea*、*B. elliptica* 及 *B. gladiolorum* 大多菌株皆有一些主要之相同及差異的條帶產生，可再進一步將上述經 RAPD 增幅反應之 DNA 圖譜照片，探討及分析不同菌



圖二、灰黴病菌與其它供試菌株應用 OPB-17 引子，經 RAPD 分析後所得之多形性電泳圖譜，以核酸探針 pBCE80 對電泳之 DNA 片段進行南方氏雜配之結果。

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis showed random amplified polymorphic DNA bands of isolates of *Botrytis* spp. and other tested fungi using primer OPB-17, and Southern hybridization analyses of these electrophoretic DNA preparations hybridized with Fluorescein NEBlot-PhototopeTM-labeled DNA probe 800bp from pBCE80. Tracks are as follows; A1: WFF101, A2: CJF02, A3: nd, A4: PLF104, A5: TJL105, A6: TTF106, A7: TTF107, A8: TTL108, A9: TTF109, A10: WFFr110, A11: TTF111, A12: WFF112, B1: TTF113, B2: TTF114, B3: TTF115, B4: PLS116, B5: WFS117, B6: SPL120, B7: FSF119, B8: JZFr118, B9: CYF501, C1: CJF801, C2: CYF802, C3: EPL803, C4: CSL804, C5: CSL805, C6: CSL806, C7: Be85-1-4, C8: Be85-1-8, C9: Be-li-10, C10: Be83-2-10, C11: Be-3-3, C12: Be-85-3-9, D1: SFF002, D2: ASPOO2, D3: MCOO1, D4: 804002, D5: 804023, D6: 804026, D7: 804031, D8: *Lilium hybridum* Oriental (casablanca), D9: *Lilium hybridum* Asiatic (elita), Lanes marked M₁, biotinylated Lambda DNA-*Hind* and M₂, 100 bp ladder marker.

種及菌系間之群集關係。Van Der Vlugt-Bergmans 等氏 (19) 亦曾利用 RAPD 技術，可有效的輔證同一群菌株間其核酸增幅圖譜有較近的親緣性，因此可進一步搜集國外灰黴病菌菌株，進一步瞭解其和我國存在之灰黴病菌菌株之遺傳差異性，以提供進出口檢疫之偵測佐證。Kerssies 等氏亦利用 RAPD 分析進行瞭解灰黴病菌在田間的演化情形 (9)，因此可進而利用本研究結果中主要的條帶進行灰黴病菌檢測，而次要條帶則可作為種間及種內鑑定以及田間灰黴病菌之族群異動與菌種變異之鑑控。

以引子 OPW-05，進行灰黴病菌 DNA 隨機增幅核酸多型性分析時，*Botrytis cinerea* 菌株除 CJFr118 外皆有 450 bp 左右之條帶產生，而 JZFr118 菌株為所有的菌株中唯一來自非花卉作物 (四季豆) 的灰黴病菌菌株，且引子 OPB-17 亦有相同的結果。以 PCR 進行 *B. elliptica* 增幅上亦可將百合灰黴病菌菌株區分為寄主為鐵砲百合或非鐵砲百合。然而本實驗中所發現的這些現象是否與其感染不同的寄主有密切的關聯，值得進一步研究探討。在本研究中並將 RAPD 產物製備成核酸探針進行南方漬染法分析測


```

ACGGGAACCGAGGAAACAGAGAGATGTCATTGGGAAGAAAAGGTAGACAAATCAGACTCAATGC 60
OPB17→
AATAGTTATAGUTAIUAAAATTAAGTTGATCCCTAATAAGACTAATCAATCATTTCGAAGC 120
TATAGCTCTTATGGAAAGATTGATCATCATGTGAAATTTGATCAAAATTGACACAAATTAU 180
ATAGATTCTAGAGTGGTAAAGTTATCCCTGAATGTTGACATTGTAGACGAGAGACGAGAAGC 240
AGATGGGACAGGTTGAAAGTGTATCTGCCATTGTTGGGCAAGTTGCTAATATCTGTTCTAG 300
PB80-1F →
AGCAATATTCGAAACCAATGGUATCTACGTACCCAAATGACACTACATTATCCCATACCGATA 360
AGGTTGCGATCGAGCACAAACATGACCCACACCGGATGCCGAAUATAGGTCUACCUATAGA 420
TTUCCUGGUAATATTCACCTTTTACACTACCTTCCCAGAGTTTGTGTTTGCTAATTCCCTTCT 480
ACGTCCAAATCCCTACCTTTTCTATTTTGAGTACCTCTCTGTGTTACTGCTTGCTTACTATC 540
TGTTGCTTACTACTTAATTAACGCTTATGAGCACCCCCACACCTAAGGTGGAAGTAATCA 600
CAAGTTGCCCTATCCCTCTCGTTTCGAAATATGGCCCTACCCCTTCCCTCTCTCTAAT 660
←PB80-1R
ACCTTGGTATTTTCCUCCUCCUGAATTCCTCCCAAGAATTTTATGAAGTTCGGGTCTT 720
GTTTTTTCTACTCCGGCCGAATCGAAATAAAGGGTCCCTTTCTAGTTCCCCUATAAAAC 780
CTTGGGTTCCGTTTCCCTCCCTCCGGGGGGGAAATCCCTCGTTCCCT
← OPB17

```

圖三、轉殖株 pBCE80 之 830 bp 嵌入 DNA 片段的核苷酸序列。

Fig. 3. Nucleotide sequence of the inserted fragment of pBCE80 containing 830 bp from *Botrytis elliptica* isolate Be3-3.

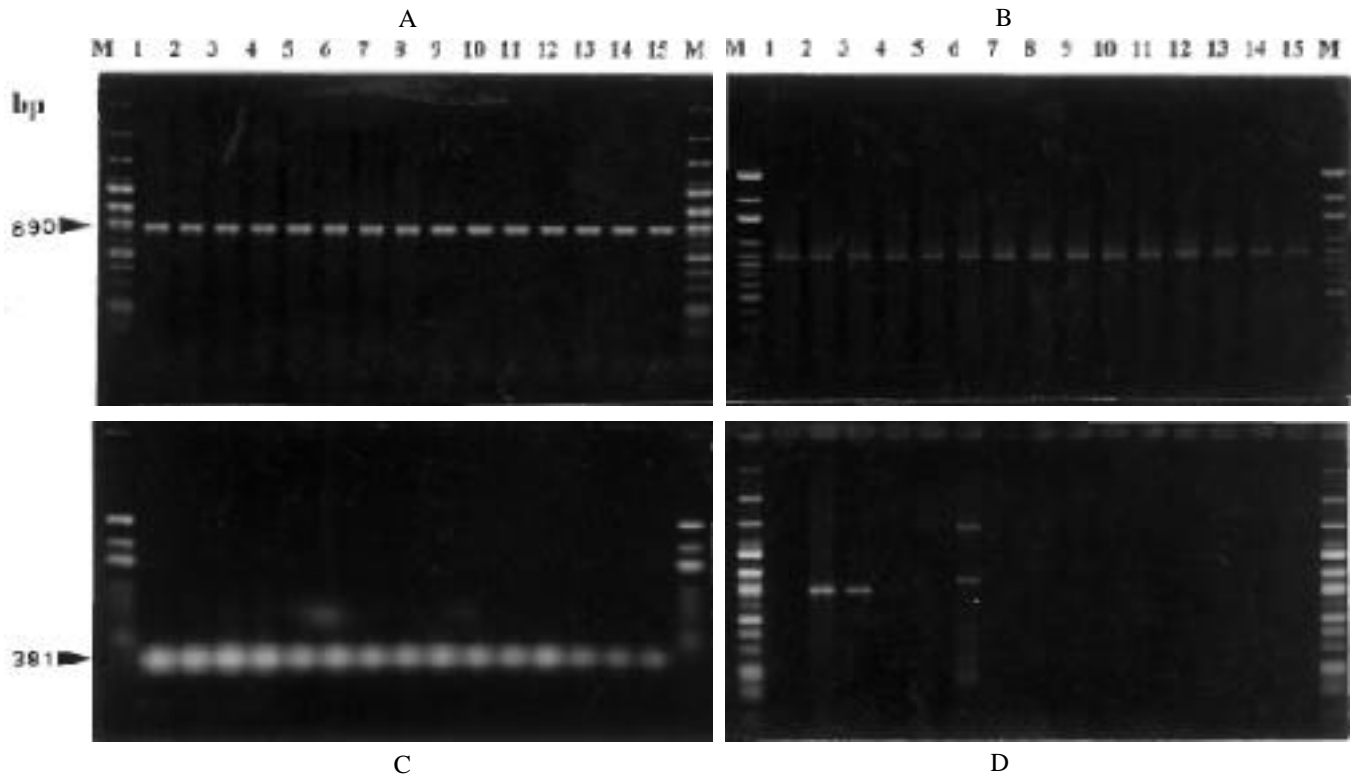
試所增幅的產物，結果顯示同一引子在 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 核酸增幅中可得相同的產物，並從南方漬染法分析測試結果可得在 *B. cinerea* 核酸增幅中，不同大小條帶之核酸片段彼此存在極高的同源性，相對於 *B. elliptica* 核酸增幅中，此現象並不明顯。從灰黴病菌皆有、對照組真菌菌株則皆無之條帶進一步殖解序以作為只能對標的菌株有增幅反應產生之專一性引子之設計。引子對 PB80-1F / PB80-1R 能專一性自 *B. cinerea* 增幅出 890 bp 的條帶，從 *B. elliptica* 增幅出 381 bp 及在鐵砲百合灰黴病菌增幅出 881 bp 的條帶，且對其它的對照組菌株之全量核酸則無任何產物產生。再將 PCR 產物製備成核酸探針進行南方漬染法分析測試所增幅的產物，結果顯示自 *B. cinerea* 增幅出 890 bp 的條帶與在鐵砲百合灰黴病菌增幅出 881 bp 的條帶並無同源性（結果未示），因此可利用引子對 PB80-1F / PB80-1R 有效偵測 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 的菌株，並可輔以 890 bp 的核酸探針鑑別 *B. cinerea* 和 *B. elliptica*。本研究以引子對 PB80-1F / PB80-1R 進行 *B. cinerea* 及 *B. elliptica* 分生孢子偵測時可分別測至 39 與 156 個分生孢子（結果未展示），換算其可純化獲得之基因體核酸約為 10^{-5} 及 10^{-4} ng 與本報告中進行 *B. cinerea* 及 *B. elliptica* 基因體核酸增幅時，其偵測敏感度可至 10^{-5} 及 10^{-4} ng 結果一

致。以引子對 PB80-1F / PB80-1R 進行 *B. elliptica* 基因體核酸增幅時，其偵幅產物較進行 *B. cinerea* 基因體核酸增幅時為弱，以圖二的南方氏雜配結果，推測因素為此偵幅之核酸片段以低重覆序列存在於 *B. elliptica* 基因體核酸中，目前正進一步實驗佐證中。

又百合植株栽培生長最適合的溫度為 15 ~ 20 C 之間，25 C 以上則花的品質下降，8 C 以下則生長停頓。由田間調查所得結果顯示目前在百合栽種時期和灰黴病菌適合發病的環境（低溫高濕）互相吻合，以致環境適合時，灰黴病大量發生。由於百合灰黴病菌 (*B. elliptica*) 防治上目前仍無推廣藥劑，且許多報告顯示 *B. cinerea* 菌株已有抗藥性的產生 (2, 3)，亦有許多研究報告指出進行灰黴病菌防治時，若能瞭解其生理特性便可有效降低病害的發生 (8, 12, 20)，因此若能完整掌握田間的生態資料，再配合田間快速病原菌偵測，應可提供農民田間病害管理模式之參考。

謝 辭

本研究承蒙行政院農委會計畫 87 生技-2-2-糧-04 補助經費，特此致最大之謝忱，又研究中承臺灣省農業藥物毒



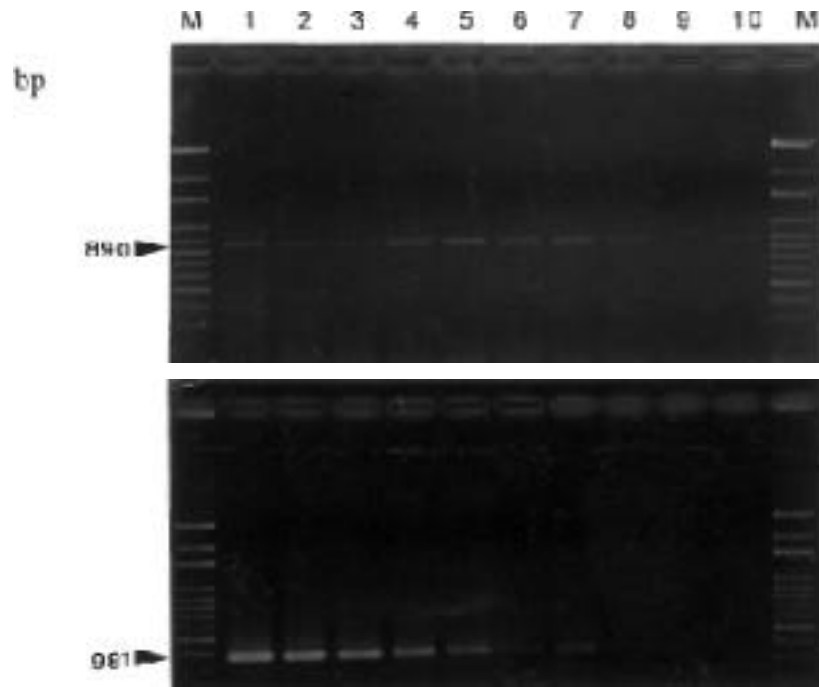
圖四、灰黴病菌及供試菌株利用 PB80-1F/PB80-1R 引子對，經 PCR 增幅後所得之電泳圖譜。

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis showing polymerase chain reaction patterns of isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica* and other tested fungi using primers PB80-1F/PB80-1R. Tracks are as follows; A1: WFF101, A2: CJF02, A3: WFFr103, A4: PLF104, A5: TJL105, A6: TTF106, A7: TTF107, A8: TTL108, A9: TTF109, A10: WFFr110, A11: TTF111, A12: WFF112, A13: TTF113, A14: TTF114, A15: TTF115, B1: EPL803, B2: CSL806, B3: WDF809, B4: Be85-1-4, B5: Be85-1-8, B6: Be-li-10, B7: Be83-2-10, B8: Be-3-3, B9: Be-85-3-9, B10: Be-li-1-16, B11: Be-2-2, B12: Be-12-1, B13: Be12-9, B14: Be-69-5-2, B15: Be-69-2-5, C1: CJF801, C2: CYF802, C3: CSL804, C4: CSL805, C5: HLL807, C6: YCL808, C7: SGL810 C8: SGL811, C9: SGL812, C10: SGF813, C11: SGF814 C12: SGF815, C13: SGL816, C14: SGL818, C15: SGL819, D1: TWL502, D2: WFFr103, D3: JZFr118, D4: Alternaria, D5: ASPOO2, D6: CKS001, D7: MCOO1, D8: 804002, D9: 804023, D10: 804031, D11: 804026, D12: SFF002, D13: *Lilium hybridum* Oriental (casablanca), D14: *Lilium hybridum* Asiatic (elita), D15: *Lilium hybridum longiflorum*, Lanes marked M are X174 *Hae* III digest and 100 bp ladder marker.

物試驗所楊秀珠博士、李敏郎、蘇秋竹先生，台中省農業試驗所謝廷芳先生，國立嘉義技術學院童伯開教授，花蓮農改場陳任芳女士、后里及神岡花農王建誠與鄭義田先生等甚多協助，在此誌謝。

引用文獻

1. 陳隆鐘、余瑞卿、賴學珍、王志宏. 1996. 近代生物技術在植物病原真菌偵測及診斷之應用. 「植物保護新科技研討會」專刊、臺灣省農業試驗所特刊第 57 號 pp. 23-34.
2. 童伯開、黃啟鐘、曾素玲、蔡竹固. 1994. 臺灣柿灰黴病的發生及化學防治. 植物保護會刊36:53-63.
3. 楊秀珠. 1993. 觀賞植植物灰黴病之發生與防治. 167-177頁. 中華植物保護學會「臺灣花卉病蟲害研討會」專刊. 台中. 277頁.
4. Bossi, R., Cole, L., Spier, A. D., and Dewey, F. M. 1994. Monoclonal antibody-based ELISA for detection on mycelial antigens of *Botrytis cinerea* in fruits and vegetables. Pages 165-173 in: Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi Identification, Detection and Quantification. A. Schots, F. M. Dewey, and R. P. Oliver(eds), CAB International Press, Cambridge. 267 pp.
5. Cheah, L. H., Burge, G. K., and Dobson, B. G. 1993. First report of *Botrytis cinerea* on *Limonium perigrinum*. Plant Dis. 77:1063 (Abstr. in English).
6. Coley-smith, J. R., Verhoeff, K., and Jarvis, W. R. 1980. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London. 318 pp.
7. Doss, R. P., Chastagner, G. A., and Riley, K. L. 1984. Techniques for inoculum production and inoculation of leaves with *Botrytis elliptica*. Plant Dis. 68: 854-856.



圖五、灰黴病菌 *B. cinerea* 和 *B. elliptica* 菌株之基因體核酸經序列稀釋，利用 PB80-1F/PB80-1R 引子對，經PCR增幅後所得之電泳圖譜。

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis showing polymerase chain reaction patterns of isolates of *Botrytis cinerea* (TTF106, A) and *B. elliptica* (SKL820, B) using PB80-1F/PB80-1R primers. Test amount of total genomic DNA was added to the reaction mixture at 100 ng (lane 1), 10 ng (lane 2), 1 ng (lane 3), 100 pg (lane 4), 10 pg (lane 5), 1 pg (lane 6), 0.1pg (lane 7), 0.01pg (lane 8), and 0.001pg (lane 9). And lane 10 is the control test by using water. Lane marked M is Bio100 DNA Ladder™ (PROtech Technology Ent. Co., Ltd. R.O.C.).

8. Elad, Y., and Evensen, K. 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85:637-643.
9. Kerssies, A., and Bosker-van Zessen, A. I. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Dis.* 81:781-786.
10. Louis, C., girard, M., Kuhl, G., and Lopez-Ferber, M. 1996. Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* 86:934-939.
11. Mandel, M., and Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:109-118.
12. Raposo, R., Colgan, R., Delcan, J., and Melgarejo, P. 1995. Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 79:294- 296.
13. Ricker, R. W., Marois, J. J., Dlott, J. W., Bostock, R. M., and Morrison, J. C. 1991. Immunodetection and quantification of *Botrytis cinerea* on harvested wine grapes. *Phytopathology* 81:404-411.
14. Salinas, J., and Schots, A. 1994. Monoclonal antibodies-based immunofluorescence test for detection of conidia of *Botrytis cinerea* on cut flower. *Phytopathology* 84:351-356.
15. Salinas, J., Glandorf, D. C. M., Picavet, F. D., and Verhoeff, K. 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Neth. J. Pl. Path.* 95:51-64.
16. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467. Savage, S. D., and Sall, M. A. 1981. Radioimmunosorbent assay for *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 71:411-415.
17. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
18. Taylor, J. W. 1986. Topical review: Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Exp. Mycol.* 10:259-269.
19. Van Der Vlugt-bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F, Vant Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., and Van Kan, J.

- A. L. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphism in *Botrytis cinerea*. Mycol. Res. 97:1193-1200.
20. Wilcox, W. F. and Seem, R. C. 1994. Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. Phytopathology 84:264-270.

ABSTRACT

Chen, L. C.^{1,3}, Chen, T. Z.¹, Chen, H. L.¹, and Yeh, Y.² 1998. Establishment of molecular markers for detection and diagnosis of *Botrytis cinerea* and *B. elliptica*. Plant Pathol. Bull. 7:177-188. (¹ Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ² Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, R.O.C.; ³ Corresponding author: E-mail:lcchen@dragon.nchu.edu.tw ; Fax:04-2857990)

Botrytis cinerea is a widespread pathogen producing infections on more than 200 hosts. Hosts attack can occur before harvesting or later during transport or storage. And *B. elliptica* causal agent of leaf blight, inflicts serious losses cut flowers of lily in Taiwan. However, *B. cinerea* and *B. elliptica* have become one of the most important threats to the production, import and export of cut flowers and some important crops. However, detection of the fungus at the latent stage before packing for transitting is difficult because time consuming and tedious by classical methods. In this study we describe the development of DNA probe and polymerase chain reaction analysis to detection of *B. cinerea* and *B. elliptica*. A genomic library of mitochondrial DNA, digested with *EcoRI* restriction enzyme from isolates of WFFr103、EPL803 of *B. cinerea* and *B. elliptica* was constructed in the vector of pBluescript (SK+), and transformed into *E. coli* DH5 . Randomly selected recombinant clones designated as pBE83-8 (0.9 kb)、pBE83-4B (1.2 kb)、pBE83-7 (1.1 kb)、pBC26-9 (1.2 kb)、pBC29-9 (0.7 kb) and pBC29-2 (1.2 kb) were nonradioactive labelled with NEBlot-PhototopeTM. The sensitivity of DNA probe Be 83-8(0.9 kb) is highest up to 10⁻⁵ µg among all DNA probes from dot-blot hybridization analyses with total DNA of *B. cinerea* and *B. elliptica*. But the DNA probe of Be 83-4B(1.2 kb) hybridized with all isolates of *B. cinerea* and *B. elliptica*. According to RAPD band patterns analyses with primer OPB-17 to amplify DNA of *B. cinerea* and *B. elliptica* have the 300 bp、600 bp and 800 bp fragments in amplified DNA after gel electrophoresis. These 300 bp、600 bp and 800 bp fragments transformant clones were prepared for DNA probes, as pBCE30、pBCE60 and pBCE80. And the high specificity of DNA probes of pBCE30、pBCE60 and pBCE80 were proved with Southern hybridization with all isolates of *B. cinerea* and *B. elliptica*. For sets of primers of PB30-1R/PB30-1F、PB60-1R/PB60-1F and PB80-1F/PB80-1R were developed from the nucleotide sequences analysing of insert DNAs in pBCE30、pBCE60 and pBCE80, respectively, using total DNAs of *B. cinerea*、*B. elliptica* and another check fungus isolates as templates in PCR assay. The PB80-1F/PB80-1R primers set specifically amplified 890 bp DNA fragments from DNA of *B. cinerea*, and amplified 381 bp DNA fragments from DNA of *B. elliptica* but not DNA from any another check isolates as *Sclerotium rolfsii* and *Mucor* sp. Using of this highly specific and reliable detection could prove valuable for regulatory, epidemiological and ecological studies.

Key words: *Botrytis cinerea*, *B. elliptica*, DNA probes, polymerase chain reaction analysis.