

自萵苣露菌罹病葉直接解序全長段露菌 ITS 與其親緣性分析

蕭貴郁 李敏郎*

臺中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所農藥應用組

摘要

蕭貴郁、李敏郎* 2011 自萵苣露菌罹病葉直接解序全長段露菌 ITS 與其親緣性分析 植保會刊 53 : xxx – xxx

本研究針對萵苣露菌(*Bremia lactucae*)核糖體轉錄區間 DNA (internal transcribed spacer region of the ribosomal DNA, ITS rDNA)之解序及偵測，設計專一性引子對，並探討引子對之靈敏度、田間罹病葉及臘葉標本之偵測應用與直接自罹病葉增幅露菌 ITS 之方法可行性，並依據 ITS 分析萵苣露菌菌株間之親緣性。以廣效引子對 ITS1/ITS4 解序之 *B. lactucae* ITS 特定片段，篩選設計引子對 BL1 (5'-GTTGCATTGCCTTGAATTTG-3') 及 BL2 (5'-AACCGAAGCTAATTAACTGCG-3')，BL1/BL2 引子對專一性之靈敏度，每次反應中只要有 10 pg *B. lactucae* DNA 即可增幅清楚之特定產物，即使在 2.5×10^5 pg 萵苣 DNA 背景值情況下，也可增幅出萵苣露菌特定 DNA 片段。田間萵苣感染露菌後，不論葉片是否產生病徵，BL1/BL2 引子對確實增幅出 *B. lactucae* 專一性片段，證實其感染狀況；又以 2006 年萵苣露菌病臘葉標本為偵測對象，亦

*通訊作者。E-mail: mllee@tactri.gov.tw

可增幅出萵苣露菌之特定片段。若於田間萵苣罹病葉直接增幅露菌 ITS，易受萵苣及微生物干擾，然利用 ITS1/BL2 及 BL1/ITS4 兩組引子對直接擴增出 2 段萵苣露菌 ITS 片段，經解序組合成全長段之萵苣露菌 ITS 序列，本研究證實專一性及廣效性引子對之組合模式，可增幅並組合出全長段萵苣露菌 ITS 序列，此一引子對組合方法，可做為直接自罹病葉上增幅出絕對寄生菌 ITS 模式及鑑定工具。以 ITS 為萵苣露菌菌株親緣性之分析標的，其結果顯示大部分萵苣露菌被分成同群，不因區域而有差別，而同屬不同種之 *Bremia* spp. 則依菊科寄主植物而各自成群，顯示菊科露菌具有高寄主專一性，據此建議將來自同屬或鄰近種寄主之露菌菌株歸為同種較為妥適。

(關鍵詞：萵苣、萵苣露菌、專一性 ITS 引子對、廣效性 ITS 引子對、組合式引子對、親緣性分析)

緒言

萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 性喜冷涼氣候，原產於地中海沿岸，目前葉用萵苣為臺灣重要葉菜類蔬菜之一，根據農糧署農情資源網記載，2009年萵苣全臺栽培面積3250公頃⁽¹⁾，其生長期間常見的真菌病害包含：露菌病 (*Bremia lactucae* Regel)^(3,4,5)、灰黴病 (*Botrytis cinerea* Pers. : Fr.)、圓星病 (*Cercospora lactucae-sativae* Sawada)、炭疽病 (*Gloeosporium chrysanthemi* Hori.)、黑斑病 (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.)、菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary)⁽²⁾、白粉病 (*Podosphaera fusca* (Fr.) U. Braun & Shishkoff (syn. *Sphaerotheca fusca* (Fr.) Blumer))^(2,7)及疫病 (*Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff.)⁽¹⁵⁾等。在萵苣種植過程中，因萵苣露菌病發病適溫在 16~22 °C⁽⁶⁾，常發生於冷涼潮濕季節及濃霧重露時期，因此在秋冬及冬春季節的露菌病尤其嚴重，

是萵苣生產的限制因子，本病害由萵苣露菌 (*B. lactucae*) 引起，對不同生長期之萵苣皆具侵染能力⁽¹³⁾，初期病徵發生於葉背，大部分的情況下，較大的葉脈可以限制病斑的擴大⁽¹²⁾，罹病葉在高濕情況下，會產生白色絨毛狀的菌絲及孢囊，雖然*B. lactuca*很少使萵苣植株死亡，但是葉片上的斑點和黃化現象，嚴重影響萵苣生長及品質，且容易造成運送及儲存過程時的腐敗⁽²⁵⁾。

萵苣露菌為絕對寄生菌，無法進行分離培養，只能由植株上之病徵及孢囊加以鑑定。現今分生檢驗技術普遍，可利用真菌之特定DNA片段，設計專一性探針，來檢測植株內之特定病原真菌。目前露菌大多利用ITS之序列設計專一性引子加以檢測，已發表的專一性引子對包括毛豆露菌 (*Peronospora manshurica* (Naoum.) Syd.)⁽¹⁸⁾、菸草露菌 (*Peronospora tabacina* Adam)⁽¹⁷⁾、北懸鉤子 (*Rubus arcticus* L.) 露菌 (*Peronospora sparsa* Berk.)⁽²⁰⁾、胡瓜露菌 (*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curt) Rostovzev) 及十字花科露菌 (*Hyaloperonospora parasitica* (Pers. : Fr.) Fr.)^(8, 9)。根據Choi *et al.*(2007)⁽¹⁰⁾ 發表之韓國萵苣露菌ITS序列，全長2458 bp，此一具有長片段ITS的現象也存在於其他露菌屬真菌中，例如*Basidiophora*、*Paraperonospora*、*Plasmoverna* spp.^(10, 25)。因其為長片段無法由廣效性引子對直接解序，需由中間序列設計引子對，分兩段自兩端向內分別解序後，再比對組合成超過2000 bp之全長段ITS序列，其解序工作遠比其他低於1000 bp ITS之菌類來的繁複。

田間萵苣被露菌感染後，常伴隨複合感染或污染其他菌類之現象，若自田間罹病葉直接收集露菌菌絲或孢囊進行DNA萃取，或直接以ITS廣效性引子對直接增幅，常有其他菌類污染之虞，無法獲得單獨之露菌ITS序列，因此進行露菌DNA萃取前，須先將田間萵苣露菌病罹病葉以濕室培養方式，促使其產生大量孢囊後，將孢囊製成懸浮液，人工接種在健康萵苣植株上，使其葉片發病後，再自病斑上取得菌絲及孢囊，才進行DNA萃取與ITS解序工作。然而人工接種到發病的過程中，稍一不慎，又容易受到其他菌類污染，因此在絕對寄生菌的DNA收集上，必須非常小心謹慎，否則容易遭致污染與誤判。

為克服上述ITS解序問題，本研究根據萵苣露菌ITS部分序列設計萵苣露菌之專一性引子對，測定該引子對專一性與靈敏度，同時測試其對田間萵苣露菌罹病葉與臘葉標本之偵測能力外，並探討自萵苣露菌罹病葉直接增幅、解序及組合出全長段ITS的可行性，做為將來絕對寄生菌自罹病葉直接增幅出全長段ITS序列的模式與菌株鑑別工具。本研究經採樣取得臺灣萵苣露菌菌株及其ITS後，將所臺灣所分離之萵苣露菌菌株與世界各地之萵苣露菌進行親緣性分析，以期了解各地萵苣露菌菌株是否呈現區域差異，做為日後鑑定萵苣露菌菌株來源之重要參考依據。

材料與方法

供試病葉及菌株之來源

從苗栗縣通霄鎮、雲林縣西螺鎮、台中縣新社鄉、南投縣國姓鄉及草屯鎮等蔬菜產區，採集萵苣露菌病葉攜回實驗室，於解剖顯微鏡下夾取葉片表面的菌絲及孢囊，移入1.5 ml離心管中，且將病健部分別以解剖刀切下，秤重達0.1 g後，置於1.5 ml離心管中，將其暫時儲存於-20 °C，做為露菌及病葉DNA萃取之來源。

萵苣露菌及萵苣 DNA 萃取與儲存

萵苣露菌DNA以0.1 g萵苣露菌菌絲配合玻璃砂震盪法加以萃取⁽¹⁶⁾。萵苣DNA萃取則取0.1 g萵苣葉片加液態氮後研磨，利用修正後之染色體DNA純化試劑組(Genomic DNA Purification kit, GeneMark Technology Co. Ltd)操作流程⁽¹⁶⁾，抽取萵苣葉之基因體DNA。上述DNA濃度以光電比色計(Opron-3000®, UV/VIS Spectrophotometer)測定260 nm吸光值(A_{260})，估算其DNA濃度($\text{ng}/\mu\text{l}$)，並將DNA保存於-20 °C低溫冷凍櫃中備用。

萵苣露菌 ITS 解序

將1 μl 之15 μM ITS1和ITS4、2.5 μl 之10x buffer、2.5 μl 之2.5 mM dNTP、0.2 μl 之*Taq* Plus DNA polymerase(Bio Basic Inc., USA)、17.8 μl 之二次蒸餾水與1 μl 之50 ng/ μl *Bremia lactucae* DNA模板混合均勻後^(24, 30)，以自動溫度循環控制器(TGradient thermal cycler, Whatman Biometra GmbH, Germany)進行DNA增幅反應，增幅條件為94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min進行DNA變性 (denature)反應，再以94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s及72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s進行40次循環，進行黏合(annealing)及延伸(extension)增幅反應，最後以72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min結束PCR反應，PCR反應產物取10 μl 以1.5 %瓊膠膠體(agarose gel)進行電泳分析(100 V，35 min)，將電泳後之膠片取出以溴化乙錠(ethidium bromide)染色 10 min，於紫外光照下，以解剖刀切下分析後於瓊膠體上 ITS DNA片段，放置於微離心管中，以膠體回收試劑組 (Gel Elution Kit, GeneMark Technology Co. Ltd) 進行DNA回收⁽¹⁶⁾，並送交明欣生物科技有限公司(台北)進行解序後，進行萵苣露菌專一性引子對設計與測試。

萵苣露菌專一性引子對設計

將上述解序之*B. lactucae* ITS序列，以Biology WorkBench Version 3.2網站(<http://workbench.sdsc.edu>)上之Alignment Tools進行多序列並列分析 (multiple sequence alignment) (San Diego Supercomputer Center (SDSC), University of California, U.S.A.)，及利用National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine (NLM), U.S.A.) 網站之Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)軟體，篩選所有*B. lactucae*菌株皆具有相同之ITS DNA序列片段，而其他真菌種類不具有此序列片段，以此片段進行引子對設計，並以*B. lactucae*、健康萵苣葉片及兩者混和之DNA當模板，進行專一性PCR測試，PCR反應條件為每25 μl 中含有1 μl 之15 μM BL1、1 μl 之15 μM BL2、2.5 μl 之10x buffer、2.5 μl 之2.5 mM dNTP、0.2 μl 之*Taq* Plus DNA polymerase (Bio Basic Inc., USA)、16.8 μl 之二次蒸餾水與1 μl 之50 ng/ μl DNA模板，以自動溫度循環控制器進行DNA增幅

反應，增幅條件為94 °C 5 min進行DNA變性反應，再以94 °C 30 s、60 °C 30 s及72 °C 50 s進行35次循環方式進行黏合及延伸增幅反應，最後以72 °C、5 min結束PCR反應，將PCR反應產物取10 µl以1.5 %瓊膠進行電泳分析(100 V，35 min)，將電泳後之膠片取出以溴化乙錠染色10 min，取出置於紫外線下照相記錄所增幅出DNA片段。

專一性引子對之靈敏度測試

為測試設計之*B. lactucae*專一性引子對的靈敏度，於每反應中直接加入不同濃度之*B. lactucae* DNA模版，分別為 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10及1 pg，與*B. lactucae*專一性引子對BL1/BL2進行PCR反應；又進一步進行萵苣DNA對BL1/BL2引子對增幅效果之干擾測試，於10 pg的*B. lactucae* DNA中，分別混合加入 2.5×10^5 、 1×10^5 、 10^4 、 10^3 、0 pg 健康萵苣DNA為反應模版，進行BL1/BL2引子對PCR，反應條件與前述之「萵苣露菌專一性引子對設計」方法相同。

田間萵苣罹病葉及臘葉標本之萵苣露菌偵測效果

應用BL1/BL2引子對，對野外採集之萵苣露菌病罹病植株上有病徵和無病徵之葉片為偵測對象，並以萵苣露菌DNA及生長箱種植之健康寄主DNA作為對照進行PCR偵測。為了解乾燥之臘葉標本之萵苣露菌DNA是否可被增幅出特定片段，另外以2006年自苗栗縣西湖鄉及台中市新社區採集製作之萵苣露菌病臘葉標本為偵測對象，以萵苣露菌DNA作為對照進行萵苣露菌偵測。DNA萃取及PCR條件如上述之「萵苣露菌及萵苣DNA萃取與儲存」與「萵苣露菌專一性引子對設計」方法。

萵苣露菌罹病葉直接增幅露菌 ITS 之效果

以上述田間採集之萵苣罹病葉DNA為模版，測試廣效性及專一性引子對之特定組合，自萵苣露菌罹病葉直接增幅露菌ITS之效果。以ITS1/BL2及BL1/ITS4

兩組引子對分別進行萵苣露菌ITS片段之增幅及解序工作，DNA萃取、PCR條件及解序過程如上述之「萵苣露菌及萵苣DNA萃取與儲存」、「萵苣露菌專一性引子對設計」與「萵苣露菌 ITS 解序」方法。

萵苣露菌之物種演化分析

將所採集之 8 株萵苣露菌 (*Bremia lactucae*) ITS 序列，以及自 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下載之 8 株韓國萵苣露菌菌株、1 株德國萵苣露菌菌株及 1 株德國草原婆羅門參(*Tragopogon pratensis*)露菌(*Protobremia sphaerosperma*)菌株等 18 株露菌之 ITS2 與 ITS1-5.8S-ITS2 全長段序列做為比對序列(表一);另外自 NCBI 下載另外之 13 株 *B. lactucae*、4 株 *Bremia centaureae*、8 株 *B. microspore*、3 株 *B. ovate*、2 株 *B. saussureae*、3 株 *B. sonchicola* 與上述 17 株 *B. lactucae*，共 6 種 *Bremia* spp. 50 菌株，加上 4 株 *P. sphaerosperma*，合計共 54 菌株之 ITS1(表一) 序列進行排序，以 Clustal X 1.81⁽²⁸⁾ 將此 54 株 ITS1、18 株 ITS2 與 18 株 ITS1-5.8S-ITS2 鹼基序列分別載入後進行多重序列比對 (Multiple sequence alignment)。在 ITS 序列進行多重比對前，先調整雙序列比對(Pair alignment)與多重比對(Multiple alignment)之參數，雙序列比對參數之開放缺口懲罰值 (Gap opening penalty) 為 10，延伸缺口懲罰值 (Gap extension penalty) 為 0.1，DNA 加權矩陣模式 (DNA weight matrix) 為 IUB；多重比對參數之開放缺口懲罰值為 10，延伸缺口懲罰值為 0.2，延遲變異序列值 (Delay divergent sequence) 為 30%，DNA 轉換加權值 (DNA transition weight) 為 0.5，DNA 加權矩陣模式為 IUB，然後進行多重序列比對，將分析結果存成 nexus 格式後，以 PAUP* 4.0b10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Swofford, 2000) 軟體進行親緣性分析 (Phylogenetic analysis)。

親緣性分析則以下列 2 種分析方式進行，第一種以再取樣法 (bootstrap) 重複取樣 1000 次，配合鄰聚法 (Neighbor Joining) 演算之遺傳距離法 (genetic

distance method) ，第二乃以啟發式搜尋法 (heuristic search) 進行最大儉約法 (maximum parsimony) ，以上述方法進行分析時，均以 *P. sphaerosperma* 為外群 (outgroup)^(11, 20, 27, 28) ，與 *Bremia* spp. 進行親緣關係分析，其結果以系統演化樹狀圖(phylogram)之遠近表示萵苣露菌各菌株間之親緣性關係。

結果

萵苣露菌 ITS 專一性引子對設計及測試

將 *B. lactucae* 已解序之部分 ITS DNA 序列，利用 NCBI 及 Biology WorkBench Version 3.2 網站，來與其他真菌 ITS 序列作並列分析，篩選出 *B. lactucae* 之特有片段，設計了 BL1 (5'-GTTGCATTGCCTTGAATTTG-3')/BL2 (5'-AACCGAAGCTAATTAAGCTGCG-3') 引子對，並測試 BL1/BL2 引子對之專一性，結果顯示 BL1/BL2 引子對可使單獨含 *B. lactucae* DNA，以及萵苣與 *B. lactucae* 混合之 DNA 反應液，皆增幅出一條 1235 bp 大小之特定片段，但萵苣 DNA 及空白對照之反應液則無 (圖一)。

專一性引子之靈敏度測試

於萵苣露菌 BL1/BL2 引子對靈敏度試驗中，將不同萵苣露菌 DNA 濃度之模版加入 BL1/BL2 引子對 PCR 反應，結果發現每反應中含有 10 pg 之 *B. lactucae* DNA，即可清晰地增幅出萵苣露菌之特定片段 (圖二)。在萵苣 DNA 對專一性引子對之干擾分析，其結果顯示在加入萵苣 DNA 最高測試濃度 2.5×10^5 pg 時，仍能成功的增幅出萵苣露菌的特定片段 (圖三)。

田間萵苣罹病葉及臘葉標本之萵苣露菌偵測效果

以萵苣露菌 BL1/BL2 引子對，直接偵測萵苣露菌病罹病田中之有病徵和無病

徵萬苳葉，及實驗室收集之田間萬苳露菌病之臘葉標本，結果顯示，有病徵和無病徵葉片皆可增幅出萬苳露菌的特定片段，生長箱中栽培之健康萬苳則無，證實BL1/BL2引子對確實可自萬苳露菌罹病葉片內偵測出特定的萬苳露菌片段（圖四）。而以2006年萬苳露菌病臘葉標本偵測時，該標本亦被BL1/BL2增幅出萬苳露菌的特定片段（圖五）。

萬苳露菌罹病葉上直接增幅露菌 ITS 之效果

本研究嘗試直接自萬苳露菌病之罹病葉萃取DNA，配合專一性及廣效性引子對組合之BL1/ ITS4及ITS1/BL2兩組引子對（圖六），分別對萬苳露菌ITS進行增幅與解序工作，PCR反應結果，可分別獲得由ITS2-28S rDNA (LSU) 及18S rDNA (SSU) -ITS1-5.8S rDNA-ITS2兩個片段，其長度分別為2127（圖七、2和3）及1658 bp（圖七、5和6），經解序比對兩片段序列，確實可組成一完整之萬苳露菌ITS全長段序列。

萬苳露菌之物種演化分析

將國內分離及 NCBI 收集之 50 株 *Bremia* spp. 及 4 株 *Protobremia sphaerosperma* 之 ITS1 以遺傳距離法或簡約法進行親緣性分析，其結果顯示除了來自奧地利 *B. lactucae* 菌株(Brlaau01-3, Brlaau06)自成一群，Brlaau04 與 Brlaau05 各自獨立外，*B. lactucae* 菌株大都自成一群，但是韓國 *B. lactucae* SMK19258、SMK19357 與 *B. ovata* 菌株自成一群，以及韓國 *B. lactucae* SMK19842、SMK19951 與 *B. saussureae* 自成一群，其他如 *B. microspora*, *B. centaureae* 與 *B. sonchicola* 也各自形成一群，由此樹狀圖可清楚呈現 *Bremia* spp. 具有強烈的寄主專一性特徵（圖八）。若將 *B. lactucae* 以及 *P. sphaerosperma* 之 ITS2 及 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 全長段 ITS 進行親緣性分析，其結果顯示所分析之 *B. lactucae* 可區分成三群，其中韓國 *B. lactucae* 菌株 SMK19842 及 SMK19951 自成一群，而 SMK19357 及 SMK19258 自成一群，其餘 *B. lactucae* 與 8 株臺灣

菌株自成一類 (圖九、十)。

討論

露菌為絕對寄生菌，在植物感染後尚未發病前，或於田間偵測最初感染源時，利用分子生物技術偵測及鑑定絕對寄生菌，具有快速、靈敏及專一之優點，且可免除露菌無法培養之困擾。本試驗設計了萵苣露菌 ITS 專一性引子對 BL1/BL2，可專一性地辨識及檢測 DNA 內是否含有萵苣露菌 (圖一)，亦可應用於檢測田間萵苣是否感染露菌 (圖四) 及鑑定臘葉標本上之露菌菌株 (圖五)。本研究設計之萵苣露菌專一性引子對 BL1/BL2，在只有萵苣露菌 DNA 模版之 PCR 反應中，其偵測靈敏度為 10 pg (圖二)，然而當 10 pg 萵苣露菌 DNA 以萵苣 DNA 稀釋到 25000 倍時，依然可成功增幅出萵苣露菌之特定片段 (圖三)。目前 BL1/BL2 引子對除可用於偵測臺灣採集之萵苣露菌菌株外，經比對國外萵苣露菌 ITS 序列，亦可應用於偵測國外之萵苣露菌菌株。ITS1/BL2 及 BL1/ITS4 引子對組合可增幅並比對組成萵苣露菌 ITS 序列，建立臺灣萵苣露菌菌株 ITS 資料庫，目前已建立臺灣西部地區 8 個不同萵苣露菌菌株 (表一)。

絕對寄生菌 ITS 在解序過程中常遭遇到下列問題，首先是罹病葉常伴隨複合感染或污染，在收集萵苣露菌菌絲及孢囊時容易被其他菌類干擾及污染，其次為 ITS 解序所使用之引子對常為真菌 ITS 廣效性引子對，能增幅所有真菌的 ITS 片段，若無法去除其他菌類的 DNA，常常增幅到其他真菌之 ITS 產物，增加序列判讀上的困難，為突破上述所提及之可能產生的干擾，嘗試直接利用萵苣露菌罹病葉 DNA 當模版，以專一性及廣效性引子對組合之 ITS1/BL2 及 BL1/ITS4 兩組引子對的組合增幅模式 (圖六)，確實可以增幅 (圖七) 及組成萵苣露菌 ITS 全長段序列，雖然 ITS1 及 ITS4 為廣效性引子對，因 BL1 及 BL2 是由萵苣露菌 ITS 序列設計之專一性引子，交叉組合後仍能從罹病葉 DNA 中增幅出萵苣露菌

ITS 片段，經解序及組合成一完整之全長段 ITS 序列。此一引子對組合增幅模式無須收集、純化莠苣露菌之菌絲或孢囊，直接由病葉萃取 DNA 且增幅莠苣露菌 ITS 片段，不僅節省人力及時間，大幅度的提高了解序的效率，更避免了其他真菌的干擾，得到完整的莠苣露菌全長段 ITS 序列。絕對寄生菌如 *Puccinia horiana*⁽²³⁾、*P. psidii*⁽¹⁹⁾、*P. striiformis f. sp. tritici*⁽³¹⁾、*Phakopsora pachyrhizi*⁽¹⁴⁾等銹病菌，以及 *Phyllactinia guttata*⁽²⁶⁾、*Erysiphe pulchra*⁽²⁶⁾、*E. alphitoides*⁽²²⁾等白粉病菌皆已發表 ITS 專一性引子對，皆可應用此一「專一性與廣效性」ITS 引子對之配對組合，直接自絕對寄生菌感染之罹病部位增幅及解序，獲得全長段之絕對寄生菌 ITS 序列，此一「專一性與廣效性」組合模式不僅解決了無法自罹病葉直接增幅出全長段 ITS 的困難，亦是本研究針對絕對寄生菌菌株鑑定上的首次突破，可做為其它絕對寄生菌或非絕對寄生菌進行菌株鑑定時，快速並準確的應用在菌株鑑定模式上。

Choi *et al.*⁽¹¹⁾ 經由 28S rDNA 上的 D1/D2/D3 區域、*cox2* 基因及 ITS1 三種序列，以 minimum evolution, maximum likelihood 及 Bayesian methods 進行親性分析，並應用群聚分析(cluster analysis)方式分析孢囊長、寬、長寬比等形態分類的結果，顯示受測之 *Bremia* spp.可依 *B. lactucae*, *B. microspora*, *B. ovate*, *B. saussureae* 及 *B. sonchicola* 等 5 種分成 5 群，而 *B. elliptica* 在親緣性方面，則是與 *B. lactucae* 很接近，歸為同群，只是 *B. elliptica* 的寄主是山莠苣(*Lactuca indica*)，不是莠苣(*L. sativa*)。本研究之結果(圖八至十)與前述 Choi *et al.* (2011) 以分子與形態雙重分析的結果相比，均呈現 *Bremia* spp.和同屬或同種寄主之間具有非常高的寄主專一性，而與地域性則關係不密切，然而於 NCBI 登錄為 *B. lactucae* 奧地利菌株中⁽²⁹⁾，Brlaau01-03 與 Brlaau06 自成一類，Brlaau04 與 Brlaau05 各自獨立在外，這些 *B. lactucae* 奧地利菌株的寄主皆非莠苣屬，且同樣跟寄主具有高度關連性，而與其他來自於莠苣屬之 *B. lactucae* 分群，這些菌株應重新分類及命名。本研究在分析 *B. lactucae* ITS1 時，除 8 株臺灣莠苣露菌菌株外，另外採用其他國家之 *B. lactucae* 菌株，以及不同 *Bremia* spp.菌株，由結果

明顯呈現 *B. centaureae* 菌株自成一類，而 *B. lactucae* 韓國菌株 SMK19357、SMK19258 與來自黃鵪菜(*Youngia japonica* (L.) DC.) 的韓國 *B. ovata* 菌株自成一類(圖八)，然而比對 Choi *et al.* ⁽¹¹⁾ 報告之表一的 NCBI GenBank 登錄號(accession number)，可明顯看出 Choi 文章內的 *B. ovata* 菌株 KUS-F19357 與 KUS-F19258，分別就是本研究依據 NCBI GenBank 登錄的 *B. lactucae* 菌株 SMK19357 與 SMK19258，而 *B. saussureae* 菌株 KUS-F19842 與 KUS-19951，分別就是 NCBI GenBank 登錄的 *B. lactucae* 菌株 SMK19842 與 SMK19951，由此可見 Choi 於 NCBI Genbank 上的 *Bremia* sp. 種名登錄有誤，NCBI GenBank 登錄號 DQ235799 及 DQ235800 菌株應修正為 *B. ovata*，而 DQ235793 及 DQ235794 菌株應為 *B. saussureae*，由本研究之 ITS2 及 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 分析結果，也呈現 SMK19258 及 SMK19357，SMK19842 及 SMK19951 自成 2 群(圖九、十)，與先前 ITS1 分析結果相同(圖八)，由於親緣樹狀圖均呈現 *Bremia* spp. 具有非常高的寄主專一性特徵，因此對於 *Bremia* spp. 之分類鑑定，在沒有更好的分類方式前，由 ITS 分子鑑定與系統演化推估結果，建議仍以同屬或同種之寄主植物做為 *Bremia* spp. 分類的依據較為妥適^(11,20,27,28)。

文獻

1. 98 年農業統計年報。農情報告資源網。行政院農業委員會農糧署。
<http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=21668>
2. 徐世典、張東柱、張清安、蔡進來、蔡東纂。2002。台灣植物病害名彙第四版。中華民國植物病理學會。386 頁。
3. 徐鴻皋。1988。萵苣露菌病—掃描式電子顯微鏡研究。博士論文。國立中興大學。130 頁。
4. 黃晉興。2005。菊科蔬菜病害。台灣農家要覽農作篇(三)。P174-177。

5. 劉興隆。1993。臺中區農業改良場研究彙報。41：1-9。
6. 羅朝村。2005。蔬菜有機栽培之病害管理。265-232 頁。有機農業生產技術研討會專輯。
7. Braun, U. 1987. A Monograph of the Erysiphales (Powdery Mildews). Beihefte zur Nova Hedwigia. 89: 1-700.
8. Casimiro, S., Moura, M., Ze-Ze, L., Tenreiro, R., and Monteiro, A. A. 2004. Internal transcribed spacer 2 amplicon as a molecular marker for identification of *Peronospora parasitica* (crucifer downy mildew). J. of Appl. Microbiol. 96: 579-587.
9. Chen, L. S., Cheng, C. W., Chen, R. S., and Tsay, J. G. 2006. Identification of two downy mildew fungi in Taiwan based on the internal transcribed spacer of the ribosomal region. Plant Prot. Bull. 48: 53-64.
10. Choi, Y. J., Hong, S. B., and Shin, H. D. 2007. Extreme size and sequence variation in the ITS rDNA of *Bremia lactucae*. Mycopathologia 163: 91-95.
11. Choi, Y. J., Thines, M., Runge, F., Hong, S. B., Telle, S., and Shin, H. D. 2011. Evidence for high degrees of specialisation, evolutionary diversity, and morphological distinctiveness in the genus *Bremia*. Fungal Biol. 115: 102-111
12. Crute, I. R. 1979. Lettuce mildew caused by *Bremia lactucae*--destroyer of quality. ARC Res. Rev. Agric. Res. Counc. 5: 9-12.
13. Dickinson, C. H. and Crute, I. R. 1974. The influence of seedling age and development on the infection of lettuce by *Bremia lactucae*. Ann. Appl. Biol. 76: 49-61.
14. Frederick, R. D. 2006. PCR methods for the identification and detection of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. United States Department of Agriculture patents. Patent No.: US 7097975 B1
15. Ho, H. H., Ann, P. J., and Chang, H. S. 1995. The genus *Phytophthora* in Taiwan Institute of Botany, Acad. Sin. Mon. Ser. 1586pp.

16. Hsiao, J. P., Wang, I. C., and Lee, M. L. 2007. Sensitivity and application of *Albugo*-specific primers to detection of *Albugo* spp. on Amaranthaceae, Portulacaceae and radish. *Plant Prot. Bull.* 49: 197-212.
17. Lai, P. S., Chen, R. S., and Tsay, J. G. 2003. Detection of *Peronospora tabacina* by PCR-mediated method based on ITS sequences. *Plant Prot. Bull.* 45: 389-390(Abstract).
18. Lai, P. S., Lien, T. J., Chen, R. S., and Tsay, J. G. 2004. The occurrence of downy mildew of vegetable soybean and its detection by PCR. *Plant Prot. Bull.* 46: 155-162.
19. Langrell, S. R. H., Glen, M., and Alfenas, A. C. 2008. Molecular diagnosis of *Puccinia psidii* (guava rust) - a quarantine threat to Australian eucalypt and Myrtaceae biodiversity. *Plant Pathol.* 57: 687-701.
20. Lee L. and Tai, M. C. 2009. On the specialization of *Bremia lactucae* on compositae. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 28: 16–25.
21. Lindqvist, D., Koponen, H., and Valkonen, J. P. T. 1998. *Peronospora sparsa* on cultivated *Rubus arcticus* and its detection by PCR based on ITS sequences. *Plant Dis.* 82: 1304-1311.
22. Mougou, A., Giresse, H. X., Dutech, C., and Desprez, M. L. 2010. Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Annals of Forest Sci.* 67: 9.
23. Pedley, K. F. 2009. PCR-Based Assays for the Detection of *Puccinia horiana* on *Chrysanthemums*. *Plant Dis.* 93: 1252-1258.
24. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
25. Scherm, H., and van Bruggen, A. H. C. 1994. Weather variables associated with

- infection of lettuce by downy mildew (*Bremia lactucae*) in coastal California. *Phytopathology* 84: 860-865.
26. Shi, A., Kantartzi, S. K., Mmbaga, M. T., and Chen, P. Y. 2009. Differentiation of two pathogens of powdery mildew disease in flowering dogwood (*Cornus florida*) by PCR-mediated method based on ITS sequences. *J. of Phytopath.* 157: 274-279.
 27. Thines, M., Runge, F., Telle, S., and Voglmayr, H. 2010. Phylogenetic investigations in the downy mildew genus *Bremia* reveal several distinct lineages and a species with a presumably exceptional wide host range. *Eur. J. Plant Pathol.* 128: 81-89.
 28. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acid Res.* 25(24): 4876-4882.
 29. Voglmayr, H., and Constantinescu, O. 2008. Revision and reclassification of three *Plasmopara* species based on morphological and molecular phylogenetic data. *Mycol. Res.* 112: 487-501.
 30. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M. A. Innis ed., *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, 482 pp.
 31. Zhao, J., Wang, X. J., Chen, C. Q., Huang, L. L., and Kang, Z. S. 2007. A PCR-based assay for detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat. *Plant Dis.* 91: 1669-1674.

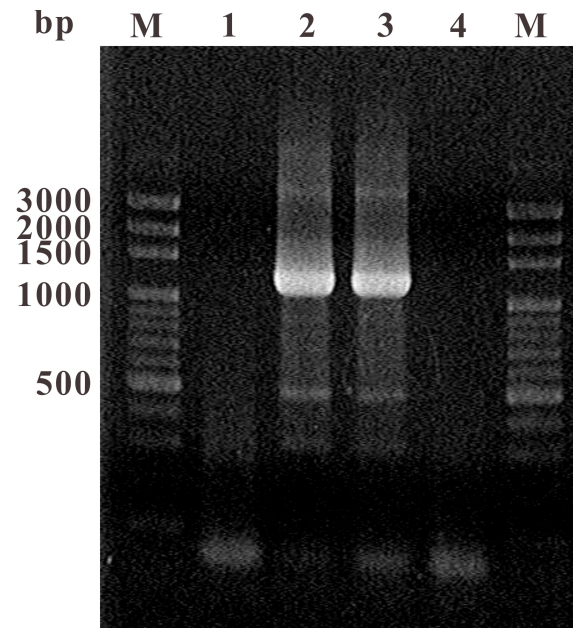
ABSTRACT

Hsiao, K. Y. and Lee, M. L.* 2011. Direct amplification of whole ITS sequence of *Bremia lactucae* from infected lettuce and phylogenetic analysis of *B. lactucae*. **Plant Prot. Bull.** **xx: xxx-xxx.** (Pesticide Application Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufong, Taichung 41358, Taiwan (R.O.C.))

The design, sensitivity and detection effect of *Bremia lactucae* specific primers, the direct amplification of the whole ribosomal internal transcribed spacer (ITS) from the infected lettuce leaves, and the phylogenetic analysis of *B. lactucae* based on ITS sequence were conducted in this study. BL1 (5'-GTTGCATTGCCTTGAATTTG-3') / BL2 (5'-AACCGAAGCTAATTAACTGCG-3') were designed as the *B. lactucae* specific primers. The sensitivity of BL1/BL2 primers was 10 pg *B. lactucae* DNA in each PCR reaction, even the lettuce DNA was as high as 2.5×10^5 pg in the DNA mixture. The BL1/BL2 primers amplified the specific ITS fragment of *B. lactucae* in these infected leaves and proved the infectious status even though the disease symptom was not observed. Furthermore, the BL1/BL2 also amplified the specific ITS fragments of *B. lactucae*-infected herbarium specimen collected in 2006. With the combination of common ITS primers and BL1/BL2 primers, two pairs of primers ITS1/BL2 and BL1/ITS4 were used to directly amplify the ITS sequences of *B. lactucae* from the infected lettuce leaves. Two fragments were amplified, sequenced, compared and merged into one sequence to be the whole ITS sequence of *B. lactucae*. The ITS1/BL2 and BL1/ITS4 primers were proved to be the useful tools in directly amplifying the whole ITS sequence of *B. lactucae* species from infected lettuce samples even the samples' DNA was mixed with the DNA of lettuce and other microorganisms. The results of phylogenetic analysis of *B. lactucae* based on ITS sequences showed that most *B. lactucae* isolates were clustered in the same clade, and

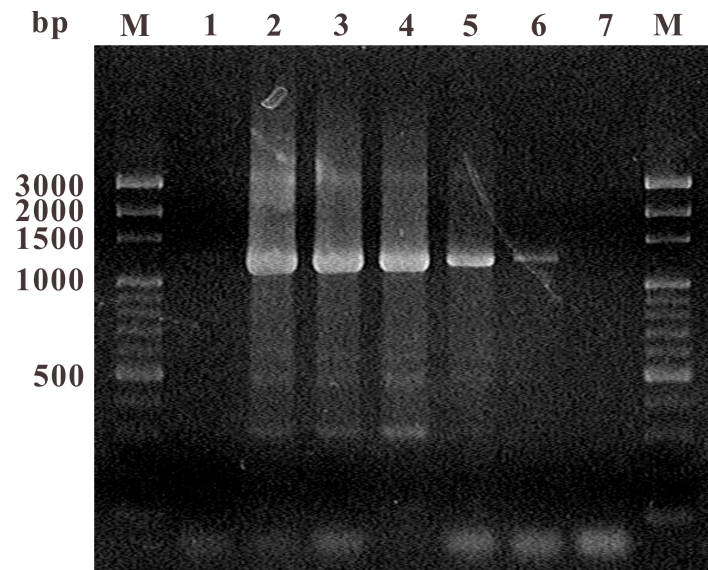
no relationship between the isolates and the locations of isolate origins. Other *Bremia* species on Compositae were also clustered in the individual clades, and each clade corresponded to individual host plant. This result showed that those downy mildews from Compositae were highly host specific. Therefore, it suggested that the taxonomy of *Bremia* spp. should correspond to their hosts of the same genus or closely related-species.

(Key words: lettuce, *Bremia lactucae*, specific ITS primers, common ITS primers, combined primers, phylogenetic analysis)



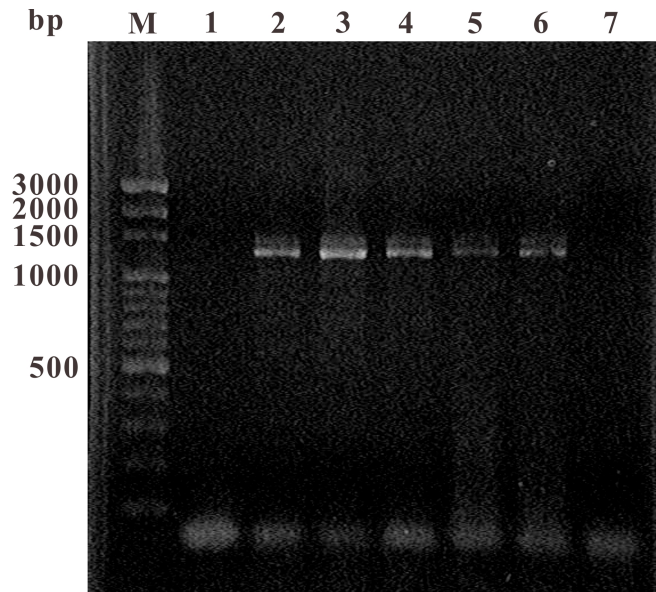
圖一、萵苣露菌引子對 BL1/BL2 之專一性測試。直欄 M：100 - 3000 bp 核酸梯狀標誌；1：空白對照組；2：萵苣露菌 DNA；3：萵苣露菌與萵苣之混合 DNA；4：萵苣 DNA。

Fig. 1. Specificity test of *Bremia lactucae* primers BL1/BL2. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1, blank control; 2, DNA of *Bremia lactucae*; 3, DNA mixture of *B. lactucae* and lettuce; 4, DNA of lettuce.



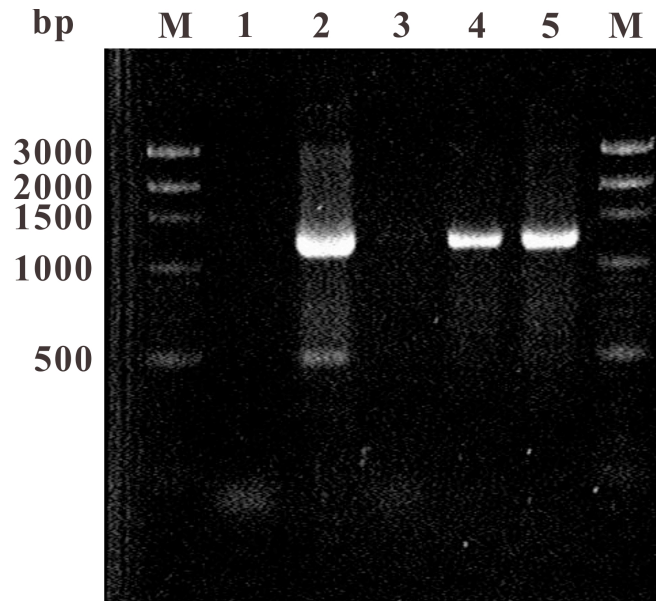
圖二、萵苣露菌專一性引子對 BL1/BL2 之靈敏度測試。直欄 M：100 - 3000 核酸梯狀標誌；1：空白對照組；2-7：萵苣露菌 DNA 分別為 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 及 1 pg。

Fig. 2. Sensitivity test of specific primers BL1/BL2 of *Bremia lactucae*. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1, blank control; 2-7, *B. lactucae* DNA were 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 and 1 pg, respectively.



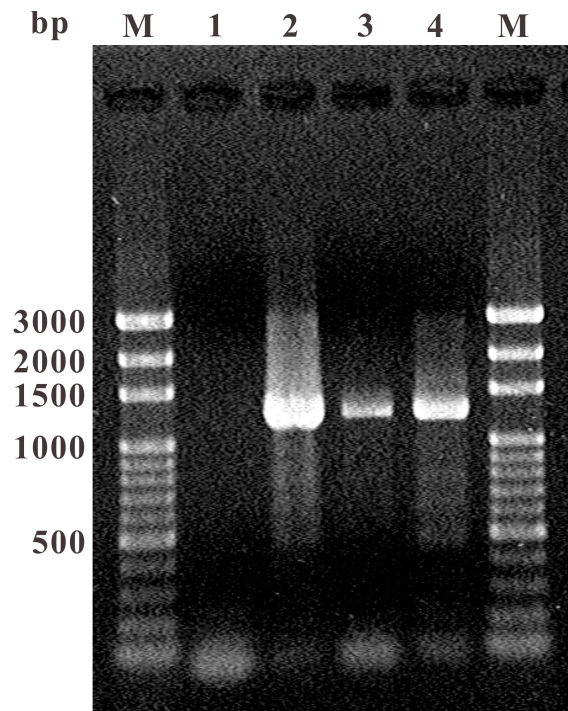
圖三、萵苣 DNA 對萵苣露菌專一性引子對 BL1/BL2 增幅效果之干擾測試。直欄 M: 100 - 3000 核酸梯狀標誌; 1: 空白對照組; 2-6: 皆含有 10 pg 萵苣露菌 DNA, 且分別混合加入 2.5×10^5 、 1×10^5 、 10^4 、 10^3 、0 pg 萵苣 DNA; 7: 2.5×10^5 pg 萵苣 DNA。

Fig. 3. The interfering test of lettuce DNA on the ITS amplified effect of specific primers BL1/BL2 of *Bremia lactucae*. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1, blank control; 2-6, each mixture containing 10 pg of *B. lactucae* DNA and 2.5×10^5 、 1×10^5 、 10^4 、 10^3 、0 pg of lettuce DNA, respectively; 7, 2.5×10^5 pg of lettuce DNA.



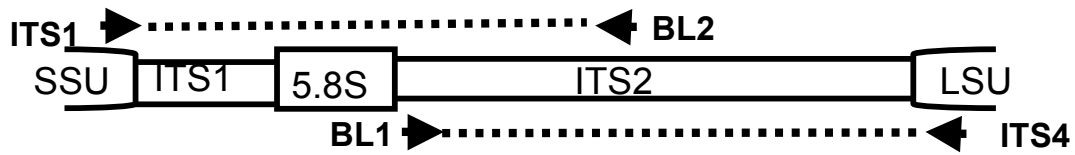
圖四、萵苣露菌專一性引子對 BL1/BL2 之田間萵苣感染露菌之偵測效果。直欄 M：100 - 3000 核酸梯狀標誌；1：空白對照組；2：萵苣露菌 DNA；3：萵苣 DNA；4：無病徵之田間萵苣 DNA；5：有病徵之田間萵苣 DNA。

Fig. 4. Detective effect of BL1/BL2 specific primers of *Bremia lactucae* on the infected lettuce in field. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1, blank control; 2, DNA of *B. lactucae*; 3, DNA of lettuce; 4, DNA of *B. lactucae*-infected lettuce without symptom; 5, DNA of *B. lactucae*-infected lettuce with symptom.



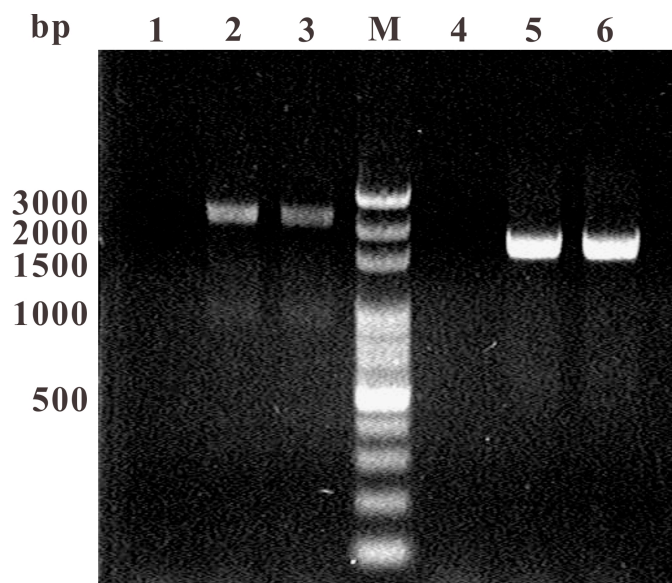
圖五、萵苣露菌專一性引子對 BL1/BL2 對萵苣露菌臘葉標本之偵測效果。直欄 M：100 - 3000 核酸梯狀標誌；1：空白對照組；2：萵苣露菌 DNA；3、4：萵苣露菌病臘葉標本 DNA。

Fig. 5. Detective effect of BL1/BL2 specific primers of *Bremia lactucae* on the herbarium specimen of downy mildew of lettuce. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1, blank control; 2, DNA of *B. lactucae*; 3 and 4, DNA of the herbarium specimen of downy mildew of lettuce.



圖六、BL1/ITS4 及 ITS1/BL2 兩組引子對自萵苣露菌病罹病葉直接增幅，以及其所解序組合之萵苣露菌 ITS DNA 片段示意圖。

Fig. 6. Scheme for the direct amplification and sequencing of *Bremia lactucae* ITS from *B. lactucae* infected lettuce with two paired primers, BL1/ITS4 and ITS1/BL2.



圖七、以 ITS1/BL2 及 BL1/ITS4 兩組引子對 PCR 增幅罹病葉中萵苣露菌 ITS DNA 片段。直欄 M:100 - 3000 核酸梯狀標誌;1、4:空白對照組;1-3:以 ITS1/BL2 進行 PCR;4-6:以 BL1/ITS4 進行 PCR;2、3 及 5、6:反應液中含罹病植株 DNA。

Fig. 7. Amplification of *B. lactucae* ITS DNA from *B. lactucae* infected leaf by PCR with BL1/ITS4 and ITS1/BL2 primers. M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1 and 4, blank control; 1-3, amplifying with ITS1/BL2 primers; 4-6, amplifying with BL1/ITS4 primers; 2, 3, 5, and 6, DNA of *B. lactucae*-infected plant in the PCR mixture.

表一、親緣性分析所用之臺灣及 NCBI¹ *Bremia* spp. 及 *Protobremia sphaerosperma* 菌株一覽表。

Table 1. Taiwan and NCBI¹ isolates of *Bremia* spp. and *Protobremia sphaerosperma* used in the phylogenetic analysis.

Species	Host ²	Isolate	Sequence	NCBI GebBank Accession No.	Location
<i>B. lactucae</i>	<i>Lactuca sativa</i>	TWCT	ITS1, ITS2, whole ITSs	- ³	Caotun, Nantou, Taiwan
		TWCL	ITS1, ITS2, whole ITSs	-	Jhongli, Taoyuan, Taiwan
		TWDS	ITS1, ITS2, whole ITSs	-	Dasi, Taoyuan, Taiwan
		TWSHr	ITS1, ITS2, whole ITSs	-	Sihu, Miaoli, Taiwan
		TWSHs	ITS1, ITS2, whole ITSs	-	Sihu, Miaoli, Taiwan
		TWSL	ITS1, ITS2, whole ITSs	-	Siluo, Yunlin, Taiwan
		TWSS	ITS1, ITS2, whole ITSs	-	Sinshe, Taichung, Taiwan
		TWWF	ITS1, ITS2, whole ITSs	-	Wufong, Taichung, Taiwan
<i>Hemistepta lyrata</i>		SMK19842	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235793	Korea
		SMK19951	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235794	Korea
<i>Lactuca sativa</i>		SMK19415	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235795	Korea
		SMK19108	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235796	Korea
<i>L. indica var laciniata</i>		SMK18913	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235797	Korea
		SMK20331	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235798	Korea
<i>Youngia denticulata</i>		SMK19258	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235799	Korea
<i>Y. japonica</i>		SMK19357	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ235800	Korea
<i>Lactuca sativa</i>		GERM1102	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ665664	Germany
		Brlakr01	ITS1	EU287743	Korea
		Brlakr02	ITS1	EU287742	Korea
		Brlakr03	ITS1	EU287741	Korea
		Brlakr04	ITS1	EU287740	Korea
<i>L. indica var. laciniata</i>		Brlakr05	ITS1	Eu287739	Korea
<i>Centaurea jacea</i>		Brlaau01	ITS1	EF553505	Austria

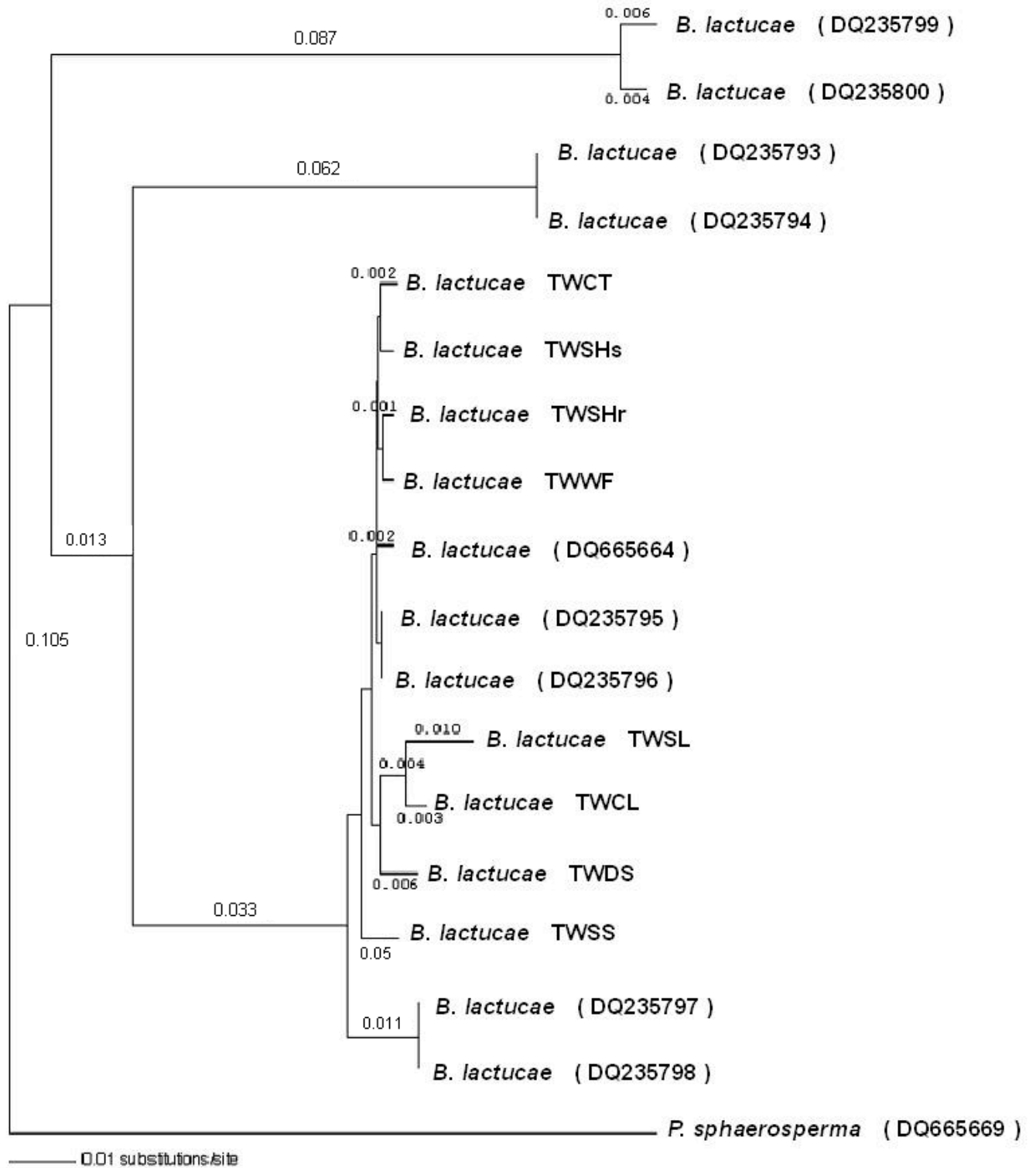
Species	Host ²	Isolate	Sequence	NCBI GebBank Accession No.	Location
	<i>Cyanus segetums</i>	Brlaau02	ITS1	EF553504	Austria
	<i>Centaurea pullata</i>	Brlaau03	ITS1	EF553503	Austria
	<i>Hieracium murorum</i>	Brlaau04	ITS1	EF553498	Austria
	<i>Taraxacum officinale</i>	Brlaau05	ITS1	EF553497	Austria
	<i>Cirsium arvense</i>	Brlaau06	ITS1	EF553496	Austria
	<i>Lactuca serriola</i>	Brlaau07	ITS1	EF553495	Austria
	<i>L. sativa</i>	Brlauk01	ITS1	AF241770	United Kingdom
<i>B. sonchicola</i>	<i>Sonchus asper</i>	Brsokr01	ITS1	EU287759	Korea
		Brsokr02	ITS1	EU287758	Korea
		Brsokr03	ITS1	EU287757	Korea
<i>B. saussureae</i>	<i>Hemistepta lyrata</i>	Brsakr01	ITS1	EU287756	Korea
		Brsakr02	ITS1	EU287755	Korea
<i>B. ovata</i>	<i>Youngia japonica</i>	Brovkr01	ITS1	EU287754	Korea
		Brovkr02	ITS1	EU287753	Korea
	<i>Y. denticulata</i>	Brovkr03	ITS1	EU287752	Korea
<i>B. microspora</i>	<i>Ixeris polycephala</i>	Brmikr01	ITS1	EU287751	Korea
		Brmikr02	ITS1	EU287750	Korea
		Brmikr03	ITS1	EU287749	Korea
	<i>I. dentata</i>	Brmikr04	ITS1	EU287748	Korea
		Brmikr05	ITS1	EU288747	Korea
		Brmikr06	ITS1	EU287746	Korea
	<i>I. chinensis</i>	Brmikr07	ITS1	EU287745	Korea
		Brmikr08	ITS1	EU287744	korea
<i>B. centaureae</i>	<i>Cyanus montanus</i>	Brceau01	ITS1	EF553502	Austria
		Brceau02	ITS1	EF553501	Austria
			ITS1	EF553500	Austria

Species	Host ²	Isolate	Sequence	NCBI GebBank Accession No.	Location
		Brceau04	ITS1	EF553499	Austria
<i>Protobremia</i>	<i>Tragopogon pratensis</i>	Pbspge01	ITS1	GU216232	Germany
<i>sphaerosperma</i>	<i>T. orientalis</i>	Pbspau01	ITS1	EF553489	Austria
		Pbspau02	ITS1	EF553488	Austria
		Pbspge02	ITS1, ITS2, whole ITSs	DQ665669	Germany

¹NCBI URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

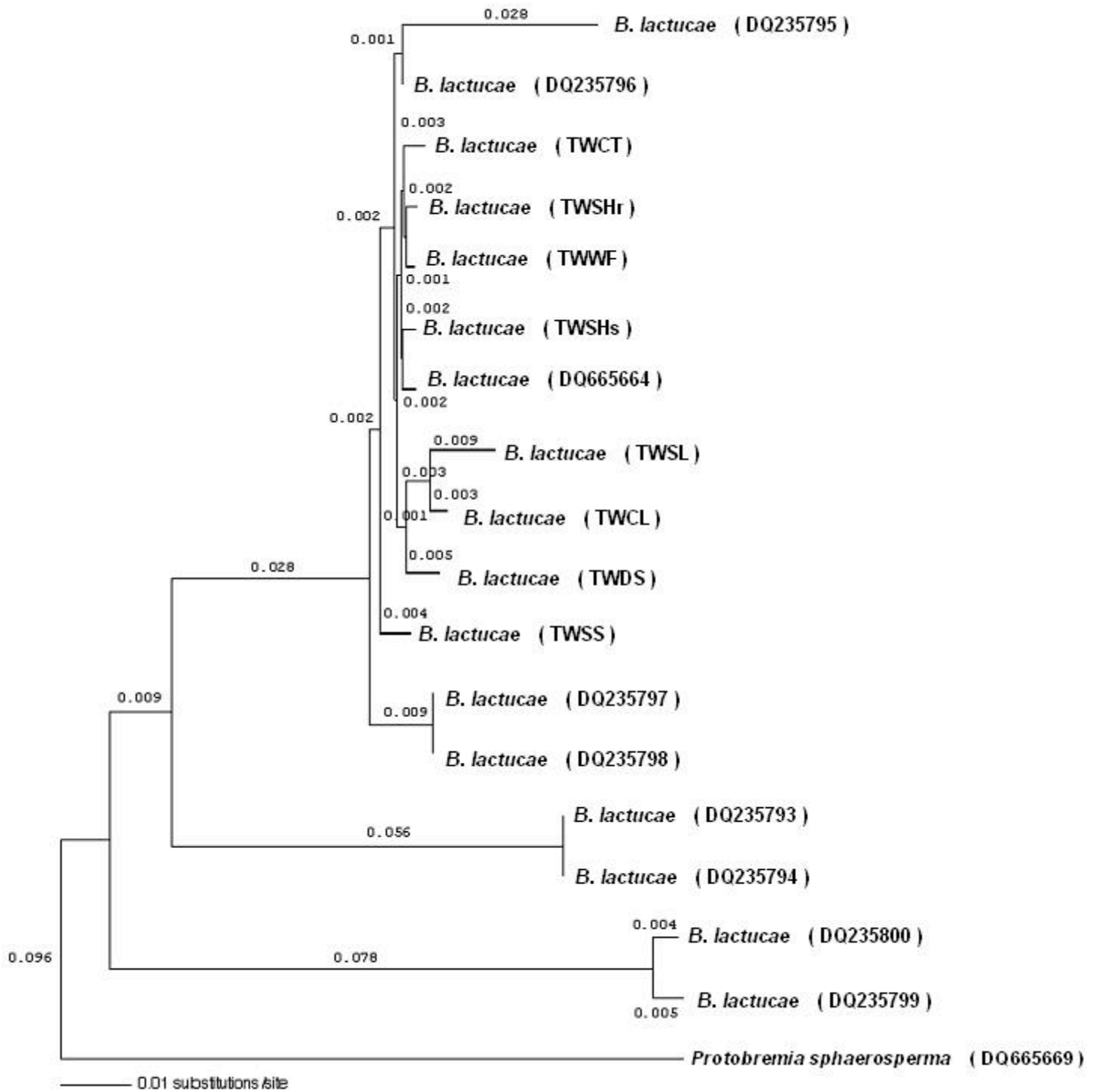
²Hosts were isolated in Taiwan or recorded in references 6, 7 and 25.

³Not registered.



圖九、*Bremia* spp.和 *Protobremia sphaerosperma* ITS2 rDNA 序列以再取樣／鄰聚法和儉約法分析所得之親緣樹狀圖。

Fig. 9. Phylogenetic tree for the *Bremia* spp. and *Protobremia sphaerosperma* based on the internal transcribed spacer 2 rDNA sequences by the bootstrap/neighbor-joining and parsimony methods.



圖十、*Bremia* spp.和 *Protobremia sphaerosperma* ITS rDNA 序列以再取樣／鄰聚法和儉約法分析所得之親緣樹狀圖。

Fig. 10. Phylogenetic tree for the *Bremia* spp. and *Protobremia sphaerosperma* based on the internal transcribed spacer rDNA sequences by the bootstrap/neighbor-joining and parsimony methods.