

# 利用核糖體核酸內轉錄間隔區鑑別 台灣地區炭疽病菌菌株

陳富永 林孟姿 蔣慕琰\*

台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

(接受日期：中華民國 92 年 12 月 31 日)

## 摘 要

陳富永、林孟姿、蔣慕琰\* 2004 利用核糖體核酸內轉錄間隔區鑑別台灣地區炭疽病菌菌株 植保會刊 46 : 15 - 26

炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 是台灣地區普遍存在的真菌之一，也是農業上重要的一屬植物病原真菌；由於它的種類繁多，正確而快速的分類鑑定，對於此真菌的研究、利用或防治相當重要。本研究利用台灣地區 23 株炭疽病菌菌株，以 PCR CITS1 及 CITS4 引子對，增幅各菌株之核糖體核酸 (ribosomal DNA, rDNA) 之內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) (ITS1-5.8S-ITS2)，再以 7 種限制酶 *Bam* HI、*Bst* UI、*Eco* RI、*Msp* I、*Pvu* II、*Sau* 3AI 和 *Scr* FI 剪切，可得到各菌株呈現不同型式之核酸片段。以 *Bst* UI 可產生最多種的核酸條帶型式，共有 12 種；其次為 *Scr* FI 和 *Msp* I 兩種限制酶，分別產生 10 種類型的條帶組合；*Eco* RI 及 *Sau* 3AI 有 9 種；*Bam* HI 有 8 種；*Pvu* II 所產生的條帶類型最少，只有 7 種。以 *Bst* UI、*Pvu* II 和 *Eco* RI 三種限制酶所產生的多型性互相搭配所得到的區分效果最佳，依此限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 圖譜，可將 23 株供試炭疽病菌菌株，區分成 20 種核酸條帶類型。另一方面藉由樹狀關係圖，探討各菌株間之親疏關係。

(關鍵詞：炭疽病菌、內轉錄間隔區、PCR-RFLP、分類鑑定)

## 緒 言

炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 在世界各國都是生態上重要的一屬真菌，更是

農業上的重要病原真菌，造成多種農作物病害、形成重大損失；地處亞熱帶地區的臺灣地區亦不例外，高溫多濕的氣候，非常適合炭疽病菌的生長及繁衍，在許多植

\* 通訊作者。E-mail: myc@tactri.gov.tw

物上都可以找到它，其寄主範圍相當廣泛，包括了果樹、花卉和蔬菜等具有經濟價值的作物，以及雜草、林木等環境中的多種植物，有記錄的寄主植物種類至少有 176 屬 190 種之多<sup>(5)</sup>，在台灣農業生態系中佔有極高的重要性。

炭疽病菌種類相當繁多，1980 年代 Sutton 氏分類為 22 種，1992 年又重新整理，將之分類為 39 種，以及 8 種生理小種<sup>(23)</sup>；因此，炭疽病菌的分類鑑定一直是農業研究人員極重視的工作之一。傳統炭疽病菌的分類多利用分生孢子 (conidia)、附著器 (appressorium) 形態及大小、剛毛 (setae) 形態、培養性狀及病原性調查、配合生化性質之特性作為分類依據<sup>(1, 4, 18)</sup>。

近數十年來分子生物科學發展日新月異，生物體的每一個細胞中均含有其特有之去氧核糖核酸 (DNA) 序列，小自病毒，大至哺乳類動物、高等植物等，都是利用 DNA 儲存遺傳訊息，對於與 DNA 分子相關的化學結構、功能均研究得十分透徹，也由此發展出 DNA 操作技術，開發功能強大的分子生物技術；1984 年 PCR 問世後，由於此技術具有快速、靈敏、專一性且易於操作等優點，配合儀器及檢驗方法的推陳出新，使得 PCR 應用範圍極廣，包含了植物、動物及微生物方面等研究，其中應用在生物分類鑑定上更是一項利器。已有不少篇幅的報告，均利用分子生物技術鑑別炭疽病菌，例如同功酶 (isozyme) 比較、PCR 分析<sup>(10, 12, 16)</sup>、核糖體 DNA (rDNA) 分析<sup>(20)</sup>，和限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析<sup>(15)</sup>等。

最近的研究報告<sup>(11, 12, 24)</sup>顯示，內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 之探討愈來愈受重視，真核生物的核糖體基因為一呈縱線排列的重複性基因，每個重複單位中包含一段可被轉錄的密碼序列 (coding sequence) 和一段非轉錄的基因間

隔區 (intergenic spacer, IGS)，可轉錄的密碼序列中包含 18S、5.8S 及 28S rRNA 等三個基因，其中 5.8S rRNA 基因分別與 18S 及 28S rRNA 基因間各有一個 ITS 區域，在不同物種間，此三個 rRNA 基因的長度及序列相當一致，但在種內或個體間，ITS 區域之長度及序列常有很大的變異。因此，綜合 PCR 方法的優點及 ITS 並沒有重複序列的特性，使 ITS 的分析逐漸為人所接受，也有許多研究指出其可做為分類鑑定之依據<sup>(2, 3, 11, 12, 14, 20, 21, 24)</sup>。本研究藉由 PCR-RFLP 技術分析 rDNA 之內轉錄間隔區，探討臺灣地區炭疽病菌種之間的差異性，以及利用 RFLP 圖譜鑑別菌種的可行性；並根據 ITS 區域之分析結果，繪製各菌株之樹狀關係圖，探討菌株間遺傳演化上之親疏關係。

## 材料與方法

### 炭疽病菌來源

供試菌株為食品工業發展研究所，生物資源保存及研究中心 (Bioresources Collection and Research Center, BCRC) 所保存分離自台灣地區之已知炭疽病菌菌株 (表一)。

### DNA 製備

炭疽病菌以 PDA (potato dextrose agar) 平板培養於 25°C，6 - 8 天，再移至 50 ml PDB (potato dextrose broth) 中振盪培養 5-7 天 (25°C，100 rpm)，將培養液過濾可得到菌絲體，秤取 0.5 g，以液態氮研磨成粉狀，加入 1.5 ml 之解離緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.2，50 mM EDTA，3% SDS，1% 2-mercaptoethanol) 混合均勻，取 1 ml 移至微量離心管，置於 65°C 水浴 40 分鐘。然後加入 1 ml 之 phenol (TE buffer saturated)，振盪混勻後以 10,000 rpm (Hettich EBA12) 離心 10 分鐘，取上層液，加入等量之 phenol

表一、供試炭疽病菌菌株種類、編號和分離源（菌株來源：生物資源保存及研究中心）

Table 1. All 23 *Colletotrichum* species used in this study obtained from the Bioresources Collection and Research Center (BCRC)

Species	BCRC No.	Host
<i>C. arachidis</i> Sawada	35170	<i>Arachis hypogaea</i> (花生)
<i>C. capsici</i> (Sydow) Butler & Bisby	35148	<i>Capsicum frutescens</i> (甜椒)
<i>C. catechu</i> Sydow	35035	<i>Areca catechu</i> (檳榔)
<i>C. cingulata</i> (Stoneman) Spaulding & Schrenk	35150	<i>Persea americana</i> (酪梨)
<i>C. coccodes</i> (Wallroth) Hughes	35114	<i>Solanum tuberosum</i> (馬鈴薯)
<i>C. coffeicola</i> Tassi.	35191	<i>Coffea arabica</i> (咖啡)
<i>C. dracaenae</i> Allescher	35019	<i>Dracaena</i> sp.(虎斑木)
<i>C. falcatum</i> Went	35083	<i>Saccharum officinarum</i> (甘蔗)
<i>C. gloeosporioides</i> (Penzig) Penzig & Saccardo	35073	<i>Vitis vinifera</i> (葡萄)
<i>C. gloeosporioides</i> (Penzig) Penzig & Saccardo	35178	<i>Averrhoa carambola</i> (楊桃)
<i>C. gloeosporioides</i> Penzig	35283	<i>Mangifera indica</i> (芒果)
<i>C. graminicola</i> (Cesati) Wilson	35067	<i>Eleusine indica</i> (牛筋草)
<i>C. lagenarium</i> (Passerini) Ellis & Halsted	35030	<i>Cucumis sativus</i> (胡瓜)
<i>C. liliacearum</i> (Schweinitz) Ferraris	35268	<i>Lilium</i> spp. (百合)
<i>C. lunatum</i> Ellis & Everhart	35102	<i>Zygocactus truncatus</i> (螃蟹蘭)
<i>C. musae</i> (Berkeley & Curtis) von Arx	35116	<i>Musa sapientum</i> (香蕉)
<i>C. nigrum</i> Ellis & Halsted	35149	<i>Capsicum annum</i> (辣椒)
<i>C. orchidearum</i> f. <i>cymbidii</i> Allesch.	35042	<i>Cymbidium sinense</i> (國蘭)
<i>C. papayae</i>	35175	<i>Carica papaya</i> (木瓜)
<i>C. passifloricolum</i> Sawada	35137	<i>Passiflora edulis</i> (百香果)
<i>C. pestis</i> Massee	35291	<i>Piper longum</i> (荖花)
<i>C. spinaciae</i> Ellis & Halsted	35154	<i>Spinacia oleracea</i> (菠菜)
<i>C. truncatum</i>	35712	<i>Phaseolus limensis</i> (菜豆)

重複一次。將上層液移至新的離心管，加入 2  $\mu$ l RNase A (ribonuclease A, 4 mg/ml, Gene Mark) 置於 37°C 反應 30 分鐘，再加入等體積 phenol / chloroform (1 : 1, v : v)，振盪混勻後以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，取上層液加入等體積的 chloroform/ isoamylalcohol (24 : 1, v : v, Amresco, USA) 振盪混勻後以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，取上層液，移至新的離心管，加 0.6 倍體積的 isopropanol 及 20  $\mu$ l 的 3 M NaOAc (pH 8.0)，靜置於零下 20°C 中 1 小時，再以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，倒

掉上清液，加 50  $\mu$ l 之 70% 酒精潤洗沉澱物後隨即倒出，將沈澱物抽氣乾燥，最後溶於 400  $\mu$ l TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) 中。

#### PCR 反應

聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 以 PerkinElmer DNA Thermal Cycler 480 儀器進行。樣品 DNA 取 200 ng 做為模版 (template DNA)，核酸引子 CITS1 (5'-GCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3') 和 CITS4 (5'-GCCTCCGC

TTATTGATATGC-3')<sup>(12)</sup>，各為 0.5 mM；PCR 反應內容物為預先混合 DNA 聚合酶、核苷酸及其他反應必須離子之試劑組 (PCR Master Mix, Gene Mark)，反應液之最終濃度為 1.25 unit 之 *Taq* DNA polymerase、1.75 mM MgCl<sub>2</sub>、以及 200 μM dATP、200 μM dTTP、200 μM dCTP、200 μM dGTP，反應體積為 50 μl，置於 0.6 ml 之微量離心管，液面再加 25 μl 之礦物油，以防止反應液體蒸散。連鎖反應之循環溫度及時間如下：94°C 4 分鐘；接著為進行 40 個循環的 95°C 1 分鐘、52°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘，最後為 72°C 7 分鐘。

#### 電泳分析

將 PCR 複製產物取 10 μl 加入 2 μl 追蹤染料 (Tracking dye, 含 bromophenol blue) 混合，以 2% 瓊脂膠片 (內含 ethidium bromide, 0.5 μg/ml) 在 0.5 倍濃度之 TBE 緩衝液中，以電壓 100V 進行電泳 35 分鐘，膠片取出於紫外光燈箱上觀察，以拍立得 (Polaroid 667) 照相記錄。

#### 限制反應

各樣本 DNA 之 PCR 產物取 1 μg，分別使用 *Bst* UI、*Pvu* II、*Scr* FI (NEB)、*Eco* RI、*Sau* 3AI、*Msp* I 和 *Bam* HI (Promega) (表二) 等 7 種限制酶剪切，反應溫度 37°C、

作用時間 4 小時。再以 2% 瓊脂膠片 (22 × 20cm)，在 0.5 倍濃度之 TBE 緩衝液中，電壓 150V 3 小時，再以 200V 電壓 1 小時 40 分鐘進行電泳，以獲得較佳之分離效果；電泳結束後以 Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics) 影像軟體，擷取電泳核酸條帶成影像檔，並進行條帶分子量大小及核酸片段型態分析。

#### 資料分析

根據限制酶剪切後在電泳膠片上呈現之條帶有無，比較菌株間之相關性。以 Jaccard's 係數<sup>(7)</sup> ( $S_j = N_{AB} / (N_{AB} + N_A + N_B)$ ， $N_{AB}$  代表兩菌株共有的條帶數， $N_A$ 、 $N_B$  分別代表兩菌株各自獨有的條帶數) 計算兩兩菌株之相似度，再將所有比較結果排列成一個三角矩陣，以 Statistica 統計軟體 (StatSoft, USA) 之不加權平均重方式 (unweighted pair-group method analysis, UPGMA) 進行群叢分析 (clustering)，繪出樹狀關係圖。

## 結 果

#### 菌體 DNA 製備、PCR 反應

以 23 株炭疽菌株的液體培養菌絲體抽取總 DNA，最後溶於 400 μl TE buffer，每個菌株約可得 8-10 μg 之 DNA；各取

表二、炭疽病菌菌株之內轉錄間隔區經 7 種限制酵素剪切產生的多型性型態數

Table 2. Polymorphic patterns of the ITS region of *Colletotrichum* species digested with 7 restriction enzymes

Restriction enzyme	Recognition sequence	No. of polymorphic patterns
<i>Bam</i> HI	5'...G <sup>▼</sup> GATCC...3'	8
<i>Bst</i> UI	5'...CG <sup>▼</sup> CG...3'	12
<i>Eco</i> RI	5'...G <sup>▼</sup> AATTC...3'	9
<i>Msp</i> I	5'...C <sup>▼</sup> CGG...3'	10
<i>Pvu</i> II	5'...CAG <sup>▼</sup> CTG...3'	7
<i>Sau</i> 3AI	5'... <sup>▼</sup> GATC...3'	9
<i>Scr</i> FI	5'...CC <sup>▼</sup> NGG...3'	10

200 ng 做為模板 DNA，使用針對 rRNA 基因保守序列設計之 CITS1 及 CITS4 引子對，黏合溫度 52°C，進行 40 個循環的 PCR，每個菌株均能在設定之 PCR 條件下增幅 ITS 區域 (ITS-5.8S-ITS)，其 PCR 複製產物的大小介於 540-605 bp 之間(表三)，近四分之三菌株的 PCR 產物介於 550-580 bp 之間，其中 550-559 bp 者有四株，包括 BCRC35042 及 35712 為 550 bp，

BCRC35067 及 35035 為 555 bp；560-569 bp 者有四株，包括 BCRC 35268、35291 及 35154 為 560 bp、BCRC35170 為 565 bp；570-579 bp 者有四株，包括 BCRC 35114 及 35073 為 570 bp、BCRC35148 及 35178 為 575 bp；580-589 bp 者有五株，包括 BCRC 35283 及 35149 為 580 bp、BCRC35191、35102 及 35116 為 585 bp。

表三、炭疽病菌之內轉錄間隔區之 PCR 產物經 RFLP 分析後之各種分類型  
Table 3. PCR products of the ITS region from *Colletotrichum* species analyzed by RFLP

Species	BCRC No.	PCR product (bp)	Restriction enzyme patterns <sup>1)</sup>						
			<i>Scr</i> FI (10)	<i>Pvu</i> II (7)	<i>Bst</i> UI (12)	<i>Sau</i> 3AI (9)	<i>Msp</i> I (10)	<i>Eco</i> RI (9)	<i>Bam</i> HI (8)
<i>C. arachidis</i>	35170	565	F	G	E	B	F	A	A
<i>C. cingulata</i>	35150	600	C	F	C	D	C	C	B
<i>C. coccodes</i>	35114	570	E	E	D	I	E	D	A
<i>C. coffeicola</i>	35191	585	A	G	G	A	A	A	A
<i>C. dracaenae</i>	35019	590	D	F	K	E	D	C	F
<i>C. falcatum</i>	35083	540	J	A	J	H	H	H	H
<i>C. capsici</i>	35148	575	A	G	A	B	A	A	A
<i>C. gloeosporioides</i>	35073	570	A	G	A	B	A	A	A
<i>C. gloeosporioides</i>	35178	575	A	G	L	B	A	A	A
<i>C. gloeosporioides</i>	35283	580	A	G	L	A	A	A	A
<i>C. graminicola</i>	35067	555	H	D	H	C	B	F	C
<i>C. lagenarium</i>	35030	545	G	B	F	F	G	E	G
<i>C. liliacearum</i>	35268	560	A	G	L	B	A	A	A
<i>C. lunatum</i>	35102	585	I	E	I	D	B	B	E
<i>C. passifloricolum</i>	35137	605	I	E	I	D	B	B	E
<i>C. musae</i>	35116	585	A	E	I	D	I	C	E
<i>C. nigrum</i>	35149	580	B	F	B	C	B	B	D
<i>C. orchidearum</i>	35042	550	A	C	G	B	A	A	A
<i>C. papayae</i>	35175	605	I	E	K	D	B	B	E
<i>C. catechu</i>	35035	555	A	G	L	B	A	I	A
<i>C. pestis</i>	35291	560	A	G	L	B	A	I	A
<i>C. spinaciae</i>	35154	560	D	B	H	G	J	I	G
<i>C. truncatum</i>	35712	550	J	A	J	H	H	G	H

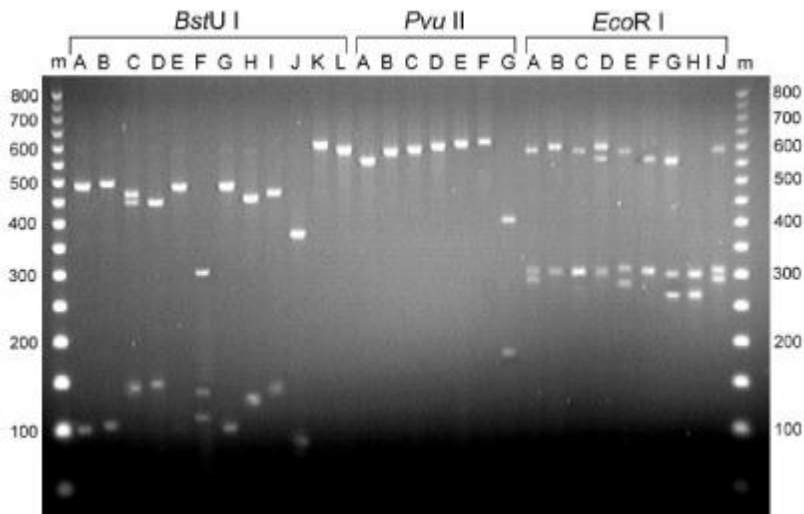
<sup>1)</sup> The number under each enzyme represents the total number of patterns observed from the 23 species. Letters in a column denote the pattern associated with the specific enzyme; the same letters from different columns are not comparable.

### 限制 剪切、RFLP 分析

各菌株 PCR 產物經濃度計算後，各取 1  $\mu$ g DNA，以 7 種核酸內切限制酶：*Bam* HI、*Bst* UI、*Eco* RI、*Msp* I、*Pvu* II、*Sau* 3AI 和 *Scr* FI 分別剪切後，產生多種多型性核酸條帶，藉由 DNA 標準品(50 bp DNA Step Ladder, Promega)比對估計，利用 Gel-Pro analyzer 影像分析軟體將不同酵素所產生的每種核酸條帶大小數字化，再分別以英文字母 A-L 分群(圖一)。由於酵素剪切後之片段小至數十個鹼基對(base pair)，部分之核酸片段大小也很接近，故必須以 2% 膠片進行長距離電泳(22  $\times$  20cm 膠片)，以達到最佳之分析效果；根據電泳分離的結果，*Bst* UI 限制酶所產生之多型性最高，共產生 12 種核酸條帶類型，將之分別以 A-L 編碼(表三)；其次為 *Scr* FI 和 *Msp* I 兩種限制酶，分別產生 10 種類型的條帶組合，依次以 A-J 編排；*Eco* RI 及 *Sau* 3AI 有 9 種，以 A-I 編排；*Bam* HI 有 8 種，

以 A-H 編排；*Pvu* II 所產生的條帶類型最少，只有 7 種，以 A-G 編排。

七種限制酶中，*Bst* UI 產生之核酸條帶型式達 12 種最多，但仍不足以將 23 株菌株一一鑑別，必須配合其他限制酶之多型性組合，才能得到最多的辨識菌種數；當 *Bst* UI 無法分辨的核酸片段組合出現時，即不同菌種但有相同的核酸條帶類型，則與其他的酵素配合，例如 *C. graminicola* 與 *C. spinaciae* 經 *Bst* UI 剪切後，同為 H 型，但 *Msp* I 可將二者分成 B 型和 J 型，除了 *Msp* I 以外，其他酵素也可將之分成相異的類型；另外比較特殊的是 *C. lilicearum* 與 *C. pestis*，*Bst* UI 將二者皆分成 L 型，其他酵素 *Scr* FI、*Pvu* II、*Sau* 3AI、*Msp* I 及 *Bam* HI 亦然，都將之分類在相同的核酸型，只有 *Eco* RI 例外，可將其各自分類為 A 型及 I 型；而 *C. coffeicola* 與 *C. orchidearum*，只有 *Pvu* II 有最明確的分類結果，分別為 G 型和 C 型。雖然 *Scr* FI

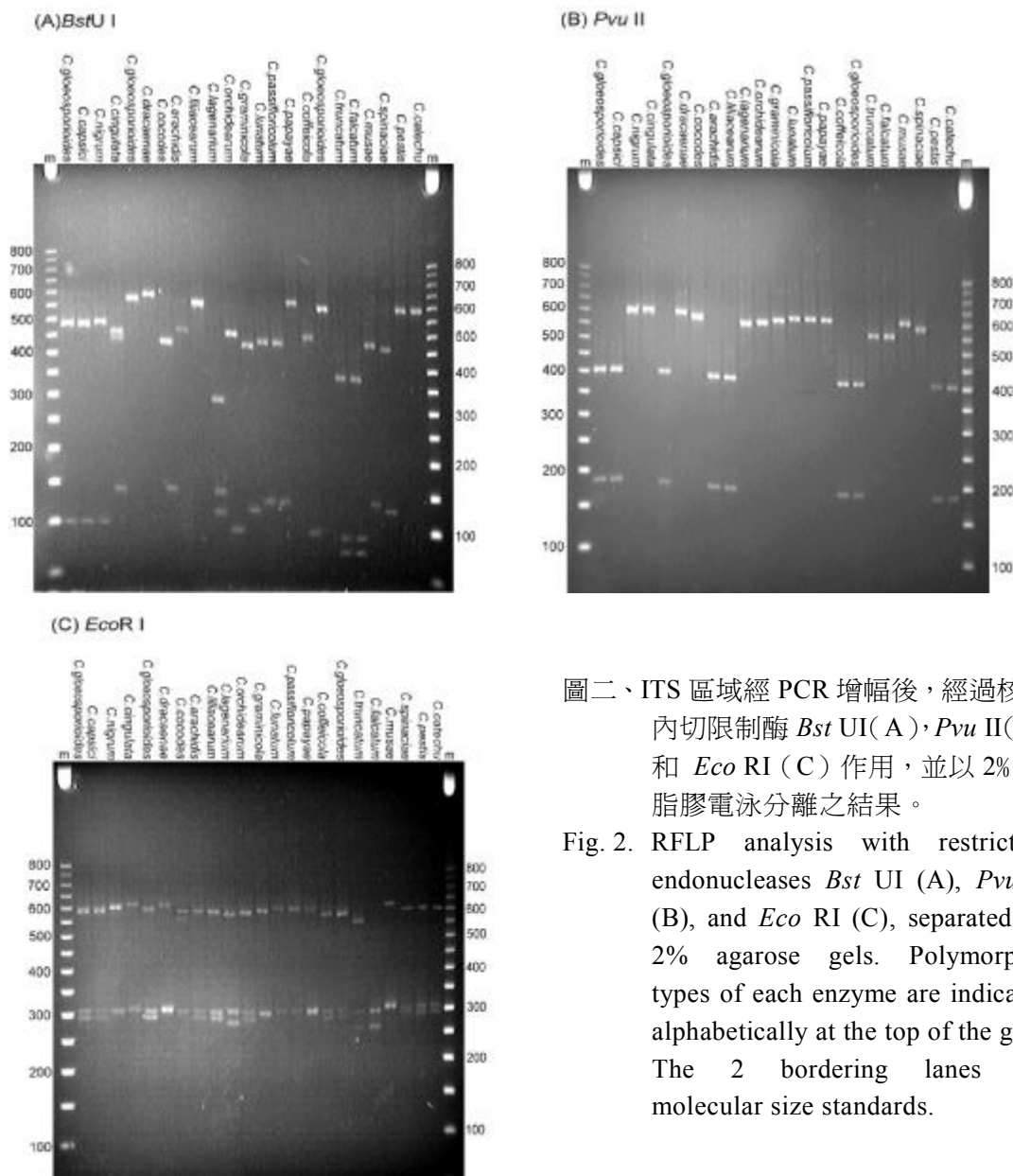


圖一、炭疽病菌之 PCR 產物經限制酶 *Bst* UI、*Pvu* II 及 *Eco* RI 作用後可供判別之核酸片段型式。*Bst* UI 共產生 A-L 十二種片段組合、*Pvu* II 共產生 A-G 七種、*Eco* RI 則產生 A-J 十種。

Fig. 1. Band patterns of the PCR-amplified ITS region digested with restriction enzymes *Bst* UI, *Pvu* II, and *Eco* RI used for species identification. Letters under each enzyme indicate different band patterns of specific enzymes.

與 *Msp* I 的核酸條帶類型多於 *Pvu* II 與 *Eco* RI，但其分類型與 *Bst* UI 雷同、卻少於 *Bst* UI，部份 *Bst* UI 無法分辨的核酸片段組，*Scr* FI 與 *Msp* I 同樣無法區別，但卻可藉由 *Pvu* II 與 *Eco* RI 的配合加以分辨。然而，尚有三組未能分類之炭疽病菌菌株，*C. capsici* 與 *C. gloeosporioides* (BCRC35073) 的所有限制酶片段型式相同 (*Bst* UI-

A)、*C. lunatum* 與 *C. passifloricolum* 相同 (*Bst* UI-I)、*C. catechu* 與 *C. pestis* 相同 (*Bst* UI-M)。綜合以上所述，*Bst* UI、*Pvu* II 及 *Eco* RI 的分類效果最佳 (圖二)，三種限制酶搭配可以得到最好的鑑定結果。合計此 7 種限制酶，共可將 23 株供試炭疽病菌菌株分成 20 種核酸條帶類型。



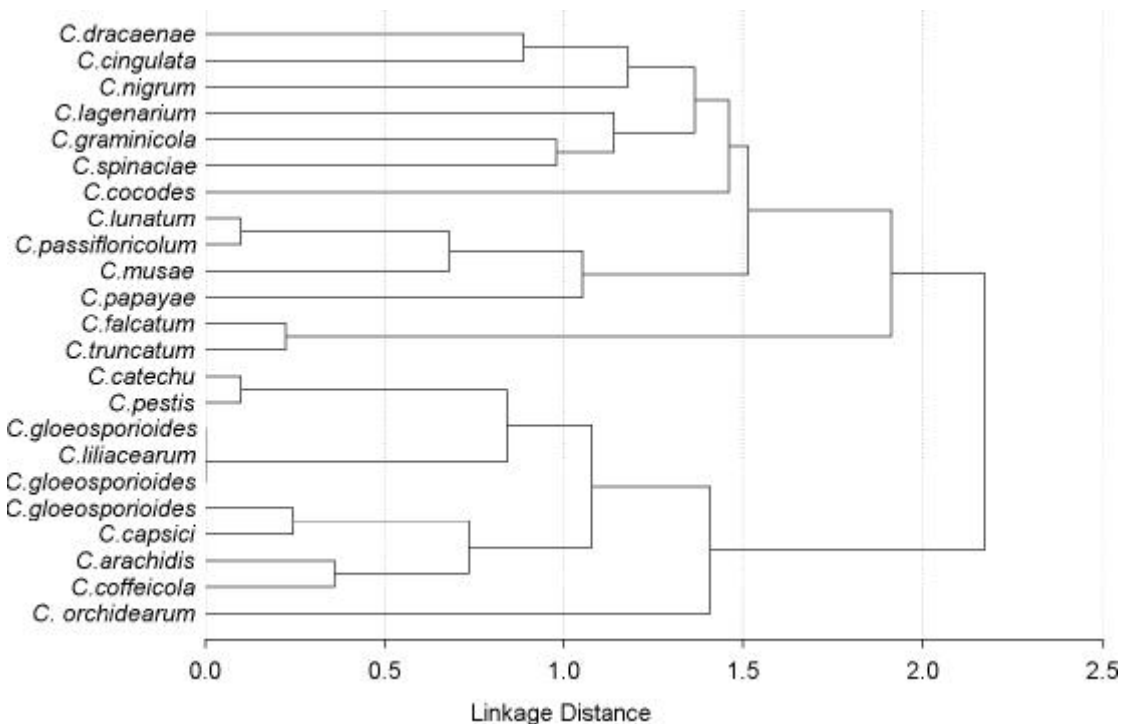
圖二、ITS 區域經 PCR 增幅後，經過核酸內切限制酶 *Bst* UI (A)，*Pvu* II (B) 和 *Eco* RI (C) 作用，並以 2% 瓊脂膠電泳分離之結果。

Fig. 2. RFLP analysis with restriction endonucleases *Bst* UI (A), *Pvu* II (B), and *Eco* RI (C), separated by 2% agarose gels. Polymorphic types of each enzyme are indicated alphabetically at the top of the gels. The 2 bordering lanes are molecular size standards.

### 菌株群叢分析

比較各菌株 ITS 區域 DNA 以限制酶剪切後之 DNA 片段組成，計算兩兩菌株間之 Jaccard's 相關係數，可得到 0 至 1 的數字，若係數為 0 代表兩菌株的 DNA 片段組成完全不同、若係數為 1 則代表兩菌株的 DNA 片段組成完全相同，介於 0 與 1 之間則顯示其相關聯之親疏，愈接近 1 則兩者之遺傳關聯性較接近。再將所得係數排列而成之三角矩陣帶入 Statistica 統計軟體，運算後即可得一樹狀關係圖。以單一限制酶剪切結果輸入所得之樹狀圖，出現多組菌株之相關係數相同，無法顯示其遺傳親疏；將 *Bst* UI、*Pvu* II 及 *Eco* RI 三種限制酶剪切之結果組合，可得 35 個 DNA 片段，亦即 35 個分析單位 (assay units)，以此計

算出之係數帶入所得之樹狀圖，可將 23 個菌株之親疏關係表現出來。分析結果顯示 (圖三)，各菌株依相關距離排列出兩兩之親疏關係，以 0 至 2.5 的距離度量，在相關距離約 2.17 處，區分成主要的兩群，各自擁有 13 及 10 個菌株；在大的群中，最接近的是 *C. lunatum* 與 *C. passifloricolum*，其相關距離約為 0.2、而 *C. falcatum* 及 *C. truncatum* 兩株與其它菌株最疏遠，距離約為 1.92，平均相關距離 1.03；在小的一群中，有三株菌株 *C. gloeosporioides* (35178)、*C. gloeosporioides* (35283)、*C. liliacearum* 之距離為 0，最為接近，而 *C. orchidearum* f. *cymbidii* 與其它菌株最疏遠，距離約為 1.4，平均相關距離 0.58。



圖三、以 *Bst*U I、*Pvu* II、*Eco*R I 三種限制酶剪切 23 株炭疽菌株 ITS 區域 DNA 產生之條帶，經 UPGMA 群叢分析所產生之樹狀關係圖。各菌株以編號代表 (見表一)。

Fig. 3. Dendrogram of 23 *Colletotrichum* species based on the RFLP patterns of the ITS region digested by the restriction enzymes *Bst* UI, *Pvu* II, and *Eco* RI.

## 討 論

台灣地區屬於亞熱帶海島型氣候，極適合各種微生物的滋長，豐富的植物資源以及多樣而密集的農作物栽種，更提供真菌一個絕佳的生存環境，因此可以找到各式各樣不論是寄生性或腐生性真菌。炭疽病菌是極容易在植物性材料上分離得到的一屬真菌，它的種類相當繁多，涉及的植物種類也很廣，有些更是重要的病原真菌，對農業經營有著重大的影響；但是這些炭疽病菌卻不僅止於感染農作物，有更多的非農作物是這些炭疽病菌的寄主。雜草上的病原真菌就一直不太被重視的一群，但這其中不乏也會感染農作物的病原菌，或者可以利用來做為雜草生物防治媒介的病原菌，很值得進一步研究。雜草上分離得到的炭疽病菌種類相當多樣，由菌落及分生孢子形態區別這些分離株所歸屬的種，常囿於培養條件、巨觀形態類似、分類鑑定經驗不足等因素，無法快速而正確地鑑定菌種；利用 PCR、RFLP 技術，分析炭疽病菌基因體核酸的差異，進而鑑定其分類地位，提供一客觀而精確可行的工具，藉以輔助傳統分類鑑定方法，彌補外觀形態鑑定上的不足。因此，建立炭疽病菌標準菌株之 RFLP 分子標誌型式，將是龐大分類不明或未知的炭疽病菌族群，利用核酸鑑定分類的第一步。

核糖體基因由於其序列高度保守及無所不在的性質，使得其基因序列成為建構親緣關係的重要工具，而其基因間隔區卻存在著高度的變異，隨著 PCR 技術的發展，內轉錄間隔區 (ITS) 被愈來愈多的研究領域採用，探討族群的變異與分化、親緣關係、品種鑑定...等課題，例如在植物方面應用於文心蘭亞族 (*Oncidiinae*) 品種分析<sup>(3)</sup>、白茅 (*Imperata cylindrica*) 族群遺傳變異<sup>(9)</sup>、蔗屬植物 (*Saccharum*) 親緣分析<sup>(2)</sup>；在真菌的研究上應用於鑑別

*Pythium* 菌株<sup>(17)</sup>、炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 種的鑑定與偵測...等。尤其在炭疽病菌的研究上應用極多<sup>(6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22)</sup>，包括種間親緣分析、設計專一性引子偵測特定菌種、種間 RFLP 多型性鑑別...等。

內轉錄間隔區比核糖體 RNA (rRNA) 基因區具有更高的變異性，增幅跨越 ITS 及 5.8S rRNA 基因的這段區域，並以限制酶剪切分析其核酸條帶型式，證明在炭疽病菌菌株的鑑定上是可行的；本研究以七種限制酶剪切，各獲得 7-12 種核酸片段組，其中 *Bst* UI、*Pvu* II 及 *Eco* RI 三種限制酶的搭配，能夠鑑定最多種的炭疽病菌菌株。Martinez-Culebras 等人的研究<sup>(12)</sup>，以與本研究相同的引子對，鑑別引起草莓炭疽病的菌株，針對 80 個品系、分屬於 8 個種的 *Colletotrichum* 分離株，增幅 ITS 區域後，以 9 種限制酶 (*Alu* I, *Ban* II, *Hin* fI, *Msp* I, *Mvn* I, *Pvu* II, *Rsa* I, *Sau* 3AI, 及 *Scr* FI) 剪切，區分出 7 種分類型，以 *Mvn* I、*Pvu* II、及 *Scr* FI 三種限制酶的搭配，能得到最佳的鑑定結果。其中的 *Mvn* I (Boehringer Mannheim) 即本研究中使用的 *Bst* UI (New England Biolabs)，由於不同公司生產而有不同的名稱，但其辨識的 DNA 切位相同 (5'-CGCG-3')。本研究使用 7 種限制酶，亦找出其中 3 種，能夠將 23 種炭疽病菌區分成 20 個分類型，是炭疽病菌核酸層次鑑定上的一項進展。未來可針對特定菌種的專屬 DNA 條帶，解讀其核酸序列，以期能設計針對炭疽病菌菌種開發的專一性核酸探針，並結合多個炭疽病菌菌種的專一性探針，製成生物晶片 (microchip)，將可應用於炭疽病菌準確而快速之偵測鑑定。

菌株群叢分析中，各菌株依據限制酶剪切後之核酸片段型態加以分群，在區分出的兩個群中，*C. dracaenae* 等 13 個菌株為一群，在這群中，*C. falcatum* 及 *C.*

*truncatum* 是相關距離接近的兩個菌株，而這兩種菌之分生孢子皆為新月形，大小形態亦近似，在演化上應有其關聯性；本群另兩個新月形孢子的菌株 *C. graminicola* 及 *C. spinaciae* 亦被區分為互相最接近的菌株，其它菌株則多為長橢圓形孢子之菌株。另一群是由 *C. catechu* 等 10 個菌株組成，其中 *C. gloeosporioides* (35178)、*C. gloeosporioides* (35283)、*C. liliacearum* 等三個菌株之相關距離為 0，顯示在經過限制酶之分析後，三個菌是沒有差異的；然而在這個群中有兩株新月形孢子之菌株 *C. liliacearum* 及 *C. capsici*，並未被區分在相接近的一組，另外有三株 *C. gloeosporioides* 菌株(35073、35178、35283)在分群時亦未完全被區分在同一分支，綜觀所有 23 株菌株群叢分析之結果，並未能顯現外觀形態上、或寄主植物種類上一個可遵循的法則，特別是分生孢子的形態，這個傳統炭疽病菌分類上重要的依循性狀<sup>(23)</sup>，無法完全反映在這個樹狀關係圖上。Sreenivasaprasad<sup>(21)</sup>等人亦曾指出這樣的矛盾，在其針對 18 個種的炭疽病菌所做的研究中，依照 ITS 區域的 DNA 序列繪製樹狀關係圖，並將所有供試菌株區分成六個群，充分顯現 ITS 區域的變異確實可做為種間鑑定之依據，但卻也發現部分新月形孢子的菌種被區分在不同的分類群，在其報告中指出，部分直圓柱形孢子的菌種歸群在第一群，卻也有部分歸在第六群，而這個第六群中也包括了一些像 *C. capsici* 這種具新月形孢子的菌種，而歸在第三至第五群中的菌種，則包含了直紡錘形到新月形孢子的菌種。真菌在外觀形態上的表現，與菌株間相互的親疏關係有多大的相關性，值得進一步探討。

## 引用文獻

- 翁豐嶽、莊再揚。1995。臺灣芒果炭疽病菌之分群。植保會刊 37：295-309。
- 陳裕星、曾勝雄、沈勳。2001。食用紅甘蔗核糖體基因內轉錄間隔區之選殖與分析。臺中區農業改良場研究彙報 73：65-77。
- 黃勝忠、蔡奇助、易美秀。2002。利用分子標誌分析 rDNA 之 ITS 區域鑑定文心蘭亞族品種。臺中區農業改良場研究彙報 74：1-15。
- 楊秀珠。1998。炭疽病菌之鑑定。檢疫防疫植物病原真菌鑑定研討會專刊 199-232 頁。中華民國真菌學會暨中興大學農推中心印。台中。
- 蔡雲鵬 編。1991。臺灣植物病害名彙。3 版。中華植物保護學會暨中華民國植物病理學會。臺中。604 頁。
- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffmann, P., Mignouna, H. D., and Wolf, G. A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. Plant Pathol. 51: 63-71.
- Bridge, P. D. 1993. Classification, pp.219-242. In: J. C. Fry [ed.], Biological data analysis - a practical approach. Oxford University Press, New York, USA.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., and Timmer, L. W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. Phytopathology 86: 523-527.
- Chou, C. H., and Tsai, C. C. 1999. Genetic variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of *Imperata cylindrical* (L.) Beauv. var. *mayor* (Cogongrass) populations in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 40: 319-327.
- Freeman, S., Minze, D., Jurkevitch, E.,

- Maymon, M., and Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopatology* 90: 608-614.
11. Guillamon, J. M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, M., and Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392.
12. Martinez-Culebras, P. V., Barrio, E., Garcia, M. D., and Querol, A. 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 97-101.
13. Martinez-Culebras, P. V., Barrio, E., Suarez-Fernandez, M. B., Garcia-Lopez, M. D., and Querol, A. 2002. RAPD analysis of *Colletotrichum* species isolated from strawberry and the specific primers for the identification of *C. fragariae*. *J. Phytopathol.* 150: 680-686.
14. Martinez-Culebras, P. V., Querol, A., Suarez-Fernandez, M. B., Garcia-Lopez, M. D., and Barrio, E. 2003. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primers for their identification. *J. Phytopathol.* 151: 135-143.
15. Martin, M. P., and Garcia-Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 733-741.
16. Mesquita, A. G. G., Paula, T. J. Jr., Moreira, M. A., and de Barros, E. G. 1998. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. *Plant Dis.* 82: 1084-1087.
17. Paul, B. 2000. ITS1 region of the rDNA of *Pythium megacarpum* sp. nov., its taxonomy, and its comparison with related species. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 229-233.
18. Smith, B. J., and Black, L. L., 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant. Dis.* 74: 69-76.
19. Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E., and Mills, P. R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 265-281.
20. Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R., and Brown, A. E. 1994. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. *Mycol. Res.* 98: 186-188.
21. Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R., Meehan, B. M., and Brown, A. E. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* 39: 499-512.
22. Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A. E., and Mills, P. R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol.* 45: 650-655.
23. Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, pp. 1-26. In: J. A. Bailey and M. J. Jeger [eds.], *Colletotrichum:*

- biology, pathology, and control. CAB International, UK.
24. Valente, P., Gouveia, F. C., de Lemos, G. A., Pimentel, D., van Elsas, J. D., Mendonca-Hagler, L. C., and Hagler, A. N. 1996. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. FEMS Microbiol. Lett. 137: 253-256.

## ABSTRACT

**Chen, F. Y., Lin, M. T., and Chiang, M. Y.\* 2004. Identification of *Colletotrichum* species in Taiwan based on the internal transcribed spacer of the ribosomal region.** Plant Prot. Bull. 46: 15-26. (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan 413, ROC)

The internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA) has proven useful as a molecular marker to identify fungal species, including species of *Colletotrichum*. Twenty-three *Colletotrichum* isolates, which were isolated in Taiwan and used in this study were obtained from the Bioresources Collection and Research Center (BCRC). PCR products were generated from the region spanning the ITS and the 5.8S rRNA gene with primer pairs, CITS1 and CITS4, which correspond to the conserved sequences of the rDNA. Seven restriction endonucleases were used to digest the PCR products in order to generate restriction fragment length polymorphism (RFLP). The RFLP pattern derived from *Bst* UI, *Pvu* II, and *Eco* RI led to identification of the greatest number of species; that is, 20 classified types were recognized among 23 *Colletotrichum* isolates. Clustering analysis of these 23 isolates was also conducted based on the RFLP produced by those 3 restriction enzymes.

(Key words: *Colletotrichum* spp., ITS, PCR-RFLP, identification)

\*Corresponding author. E-mail: myc@tactri.gov.tw