

莧科、馬齒莧與蘿蔔白銹菌專一性引子對之 敏感度與其偵測應用

蕭茹萍¹ 王怡靜² 李敏郎^{1*}

¹ 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

² 苗栗縣苗栗市 大倫國中

(接受日期：2007年9月30日)

摘 要

蕭茹萍、王怡靜、李敏郎* 2007 莧科、馬齒莧與蘿蔔白銹菌專一性引子對之敏感度與其偵測應用 植保會刊 49 : 197 – 212

本研究針對莧科、馬齒莧科、旋花科及十字花科等白銹菌 (*Albugo* spp.) 設計專一性引子對，並探討這些引子對之敏感度與其偵測應用。利用序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified regions, SCARs) 篩選白銹菌之專一性片段，設計其特定片段之引子對，並以它種白銹菌株做對照，進行聚合酶鍊鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 測試此引子對之專一性，結果顯示 Abw260 (abw260-up: 5'-cgacaagtaccttctacatc-3'; abw260-dw: 5'- gatgta ggaaggtacttgtcg-3') 可專一性偵測白莧及紅莧白銹菌 (*A. bliti*) ; Abl258 (abl258-up: 5'-aaggctgtataggcttatgc-3'; abl258-dw: 5'-gactgtggtcgacatgattta-3') ; Abp260 (abp260-up: 5'-gcgttctgttttagcgtta-3'; abp260-dw: 5'-gacacgagtgcaagtcacat -3) 則可分別偵測烏莧白銹菌 (*A. bliti*) 和馬齒莧白銹菌 (*A. portulacae*) ; 及 Acr250 (acr250-up: 5'-atgtgaagcgaacgagtg-3'; acr250-dw: 5'-ttagtggtcatcgctcttc-3') 可偵測蘿蔔和山東白菜白銹菌 (*A. candida*) 。在白銹菌專一性引子對之敏感度方面，則為每反應液中含有 100 pg 白銹菌 DNA 即可測出。至於白銹菌孢囊數量與專一性引子對敏感度之關係，則以玻璃砂 (Glass beads) 震盪法萃取孢囊 DNA 後進行分析，結果顯示含有 4 顆白銹菌孢囊 DNA 模版者即可被測出，含 17 顆孢囊可增幅較大量之專一性片段。以白銹菌接種後而尚未產生病徵之白莧、紅莧、烏莧、馬齒莧及蘿蔔等寄主植物進行測試，結果顯示白銹菌專一性引子對可增幅出接種之白銹菌特定片段，對照組之健康植株則無此特定片段，並進一步偵測不同天數之接種葉，於接種三天後之葉片 DNA 中，明顯地偵測出白銹菌，因此本研究所設計之白銹菌專一性引子對，可應用於白銹菌輔助鑑定、偵測及監測等用途。

* 通訊作者。E-mail: mllee@tactri.gov.tw

(關鍵詞：莧科白銹菌、馬齒莧白銹菌、蘿蔔白銹菌、專一性引子對、敏感度、偵測)

緒 言

臺灣常見易感染白銹菌 (*Albugo* spp.) 之寄主植物有莧科 (*Amaranthaceae*) 中之白莧 (*Amaranthus mangostanus* L.)、紅莧 (*Am. mangostanus* forma *ruber*)、烏莧 (*Am. lividus* L.)⁽¹⁾ 和石竹科 (*Caryophyllaceae*) 之滿天星 (*Alternanthera sessilis* (L.) R. Brown)⁽⁶⁾，十字花科中之 (*Cruciferae*)^(12, 13, 14) 蘿蔔 (*Raphanus sativus* L.)、芥菜 (*Brassica juncea* (L.) Czern.)、白菜 (*B. rapa* L. spp. *chinensis* Jusl.) 和山葵 (*Wasabia japonica* (Miq.) Matsum.)，旋花科 (*Convolvulaceae*) 中之甕菜 (*Ipomoea aquatica* Forsk.)⁽⁶⁾、蕃薯 (*I. batatas* (L.) Lam.)⁽⁵⁾，及馬齒莧科 (*Portulacaceae*) 之馬齒莧 (*Portulaca oleracea* L.)⁽¹⁾ 等。在臺灣夏季蔬菜生產過程中，由白銹菌引起之白銹病，嚴重影響蔬菜產量與品質，使蔬菜田生產無法進行連作。白銹菌主要為害子葉及葉片，於葉背上產生白色、黃色或紫紅色突起表面之游走孢子囊堆 (*sori*)，罹病部位之葉表則呈現黃綠色或黃色病徵。發病末期罹病部位黃化、枯萎，嚴重時整葉脫落，植株枯死⁽¹⁾。

白銹菌屬卵菌綱，為植物絕對寄生菌，目前文獻中記載的白銹菌共有 41 種^(8, 15)，該菌主要以卵孢子及游走孢子囊存活於土壤中⁽³⁾。以莧菜白銹菌為例，田間初次感染源主要來自土壤，藉雨水飛濺或灌溉水污染莧菜子葉或本葉，孢囊在葉表存在水膜時，約 20-40 分鐘後即可釋放游走孢子，游走孢子經由氣孔完成侵入感染過程。在游走孢子侵入植物內 4-5 天後，即可在葉背形成游走孢子囊堆，再經 3-4 天後，游走孢子囊堆破裂釋出游走孢子囊，形成田間二次感染源⁽³⁾。游走孢子囊可隨

風、雨水飛濺或灌溉水傳播，短時間內造成大面積為害⁽³⁾。故白銹菌之病徵出現後，極可能在短時間內擴大感染，若能於未發病之植株中事先偵測出白銹菌，先行加以預防感染或阻斷傳播途徑，便能抑制白銹菌傳播速度，達到防治目的。由於白銹菌無法以一般培養基進行病原菌之分離與培養，因此利用分子層次方式進行偵測與監測，不失為解決之方法。

植物病害之診斷與鑑定所需之時間與技術，常隨著病原菌種類之不同而有所差異。近年來，應用分子層次所發展的鑑定技術漸趨成熟，Paran 及 Michelmores (1993) 以逢機增幅多型性 DNA 片段圖譜法 (*random amplified polymorphic DNA, RAPD*)⁽¹⁴⁾ 為基礎，將 RAPD 所得之特有片段加以定序，依所得之核酸序列設計成具有專一性之引子對，用以鑑別對萵苣露菌 (*Bremia lactucae* Regel) 具有抗病能力之萵苣品系，並將此法稱之為序列特徵化增幅區域 (*sequence characterized amplified regions, SCARs*)⁽¹⁰⁾，為 RAPD 法之延伸應用，比起 RAPD 只做隨機引子的電泳圖譜分析更具序列專一性辨識。Armstrong (2007) 以白銹菌 (*Albugo candida*) 與其寄主植物 (*Lepidium oleraceum*) 核糖體 DNA 轉錄區間序列 (*internal transcribed spacer, ITS*) 之差異片段，設計專一性引子對偵測寄主中之白銹菌⁽⁷⁾，此研究為單一白銹菌之偵測，但不同白銹菌間 ITS 序列差異不大，較難應用於開發不同白銹菌之專一性引子對。因此本研究目的乃以 SCARs 之技術，開發鑑別不同白銹菌之專一性引子對，分析該引子對之專一性與敏感度，與其應用於偵測田間罹病植株之可行性。

材料與方法

供試白銹菌菌株採集與繁殖

於雲林縣西螺蔬菜專業區、台中縣后里鄉與神岡鄉和南投縣埔里鎮，採集白銹菌感染之白莧、紅莧、烏莧、滿天星、馬齒莧、甕菜與蘿蔔等罹病植株，攜回溫室內進行種植。每星期以消毒過之種子播種於罹病植株附近，定期以該植物寄生之白銹菌孢囊懸浮液(1×10^6 sporangia/ml)進行人工接種，使健康植株感染發病，維持白銹菌在寄主植物上之繁殖，提供本試驗所需之白銹菌游走孢子囊。

白銹菌及其寄主 DNA 萃取與儲存

自上述溫室繁殖之白銹菌分別收集其游走孢子囊及病株葉片至 1.5 ml 微量離心管，以修正後之染色體 DNA 純化試劑組 (Genomic DNA Purification kit, GeneMark Technology Co. Ltd) 操作流程，抽取白銹菌之基因體 DNA，並以光電比色計 (Opron-3000[®], UV/VIS Spectrophotometer) 測定 260 nm 吸光值(A_{260})，估算 DNA 之濃度($\text{ng}/\mu\text{l}$)，將此一 DNA 保存於 -20°C 低溫冷凍櫃中備用。修正後之染色體 DNA 純化流程如後所敘：取 2 mg 白銹菌游走孢子囊或 100mg 病葉置於 1.5 ml 離心管中，此一離心管加液態氮急速冷凍後，以研磨棒將離心管內之游走孢子囊或葉片磨成粉末，加入 350 μl 萃取液混合均勻，再加入 4 μl 蛋白質分解酵素 K 母液 (proteinase K stock solution)，輕微混合後以 56°C 水浴 1 h，加入 300 μl DNA 黏合溶液 (binding solution)，經 4°C 10,000 g 離心 5 min，將懸浮液移入旋轉圓柱管 (spin column) 中經 4°C 10,000 xg 離心 1 min，去除下層濾液後，於旋轉圓柱管中加入 350 μl 清洗液 (wash solution) 後，以 4°C 10,000 g 離心 1 min，去除下層濾液後，再重複此清洗步驟兩次並去除下層濾液後，以 4°C 14,000 g

離心 5 min，將此一旋轉圓柱管換到新的離心管中，以 60°C 乾浴 5 min 後，加入以 70°C 預熱 10 min 之 50 μl 無菌水，經 4°C 10,000 xg 離心 1 min 後，收集下層濾液並保存於 -20°C 中。

以序列特徵化增幅區域設計白銹菌之專一性引子對

以序列特徵化增幅區域法 (sequence characterized amplified regions, SCARs)⁽¹⁰⁾ 篩選白銹菌之專一性片段，必須先利用白銹菌之隨機增幅多型性 DNA 片段 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)⁽¹⁴⁾ 圖譜分析方法尋找白銹菌各菌株間及與其寄主間之差異性 DNA 片段產物，並將此 DNA 片段進行回收、純化及定序，依此 DNA 片段之序列設計引子對，並測試此引子對之專一性及敏感度，以下為 SCARs 法之步驟。

白銹菌之隨機增幅多型性 DNA 片段圖譜分析

將上述白銹菌及其未罹病寄主之 DNA 各取 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，以隨機增幅多型性 DNA 片段圖譜法 (RAPD)⁽¹⁴⁾ 進行分析，本試驗共用 S121~S380 共 220 支及 S221~S260 等 40 支隨機引子對 (Bio Basic Inc., Canada)。試驗進行之條件為每 25 μl 中含有 1 μl 之 5 μM primer、2.5 μl 之 10x buffer、2.5 μl 之 2.5 mM dNTP、0.1 μl 之 Taq Plus DNA polymerase (Bio Basic Inc., USA)、17.9 μl 之二次蒸餾水與 1 μl 之 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ DNA 模板，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°C 、5 min 進行 DNA 變性 (denature) 反應，再以 94°C 30 s、 40°C 30 s 及 70°C 60 s 進行 40 次循環，以進行黏合 (annealing) 及延伸 (extension) 增幅反應，最後以 70°C 10 min 結束 PCR 反應，將 PCR 反應產物取 10 μl 以 1.5% 瓊膠 (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, 取出置於紫外線下照相記錄 RAPD 所增幅出 DNA 片段, 比對不同隨機引子對(random primers)所增幅出各菌株差異性 DNA 片段後, 重複此一引子對增幅試驗, 確定該菌株之差異性 DNA 片段再現性與穩定性後, 將這些片段進行選殖及解序, 以便設計白銹菌之專一性引子對。

DNA 片段回收

於紫外光照下, 以解剖刀切下 RAPD 分析後於瓊膠體上具差異性之 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: 在含膠體之微離心管中加入 350 μ l DNA 黏合溶液(binding solution), 並放置於 60 $^{\circ}$ C 乾熱器作用 15 min 使膠體融化, 再將膠體溶液移入旋轉圓柱管(spin column)中經 4 $^{\circ}$ C 10,000 g 離心 1 min, 去除下層濾液後, 於旋轉圓柱管中加入 700 μ l 清洗液(wash solution)後, 以 4 $^{\circ}$ C 10,000 g 離心 1 min, 去除下層濾液後, 再重複此清洗步驟兩次並去除下層濾液後, 以 4 $^{\circ}$ C 14,000 g 離心 5 min, 將此一旋轉圓柱管換到新的離心管中, 以 60 $^{\circ}$ C 乾浴 5 min 後, 加入以 70 $^{\circ}$ C 預熱 10 min 之 30 μ l 無菌水, 經 4 $^{\circ}$ C 10,000 g 離心 1 min 後, 收集下層濾液之目標 DNA 片段水溶液。

DNA 片段定序

利用 yT&A 選殖載體試劑組(yT&A Cloning kit, Yeastern Biotech Co., Ltd.), 將上述回收之目標 DNA 片段移入 1.5 ml 微量離心管內, 加入 1 μ l ligation buffer A 和 1 μ l ligation buffer B 後, 再加入 2 μ l yT&A 載體(yT&A vector)和 T4 DNA ligase, 最後加無菌水使混合液總體積為 10 μ l, 混合均勻後, 將裝有此混合液的微量離心管置於 4 $^{\circ}$ C 處理 16 h, 進行 yT&A 載體與目標 DNA

片段之黏合反應。另外, 取出-80 $^{\circ}$ C 保存之大腸桿菌勝任細胞 (*Escherichia coli* competent cell), 以室溫之水浴解凍約 1/3 體積時, 立即加入 5 μ l 上述的黏合反應液, 且置於冰上 30 min, 立即將含有此混合液之微量離心管以 42 $^{\circ}$ C 乾浴 2 min 後, 在置於冰上 5 min, 加入 500 μ l 的 Luria-Bertani (LB) 培養液(10 g/l pancreatic digest of casein, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7.0), 將此離心管放置於 37 $^{\circ}$ C 之轉殖載體恆溫培養箱中, 以左右旋轉之轉速 225 rpm 培養 50 min 後, 立即在無菌狀態下, 將此混合液塗佈到含有 25 μ g/ml Kanamycin、40 μ g/ml X-gal 和 40 μ g/ml IPTG 的 LB 平板培養基(10 g/l pancreatic digest of casein, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, 1.5% agar, pH 7.0), 置於 37 $^{\circ}$ C 培養 11-16 h。若有白色菌落出現, 挑數個白色單一菌落分別加入含有 25 μ g/ml Kanamycin 的 LB 培養液, 於轉殖載體恆溫培養箱 (37 $^{\circ}$ C、轉速 225 rpm) 中培養 16 h, 取 1 μ l 菌液以前述 RAPD 之條件進行 PCR, 來進一步確認此菌株含有與目標 DNA 片段黏合之質體, 再將此菌株之少許菌液送交明欣生物科技有限公司 (台北) 進行解序後, 進行白銹菌專一性引子對設計與測試。

白銹菌引子對設計與專一性測試

將上述白銹菌差異 DNA 序列解序後, 以 Oligo 4.0(Wojciec Rychlik, 1989-1991)進行專一性引子對設計⁽⁹⁾, 待合成專一性引子對後進行專一性測試。受測白銹菌菌株包括蘿蔔、白萹、紅萹、烏萹、滿天星、甕菜與馬齒萹等。引子對之專一性測試則以 PCR 進行⁽¹¹⁾, 專一性測試之 PCR 反應條件為每 25 μ l 中含有 1 μ l 之 15 μ M forward-primer、1 μ l 之 15 μ M reverse-primer、2.5 μ l 之 10x buffer、2.5 μ l 之 2.5 mM dNTP、0.1 μ l 之 Taq Plus DNA

polymerase(Bio Basic Inc., USA) 、16.9 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 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 進行 DNA 變性反應,再以 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 及 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s 進行 35 次循環,以進行黏合及延伸增幅反應,最後以 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 結束 PCR 反應,將 PCR 反應產物取 10 μl 以 1.5% 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染色 10 min,取出置於紫外線下照相記錄所增幅出 DNA 片段。若是此一引子對在其它菌株 DNA 模板增幅出類似片段,則重新設計此一引子對,或重複上述 RAPD 法找尋其它差異性 DNA 片段後,另外設計引子對重複進行上述之專一性試驗,直到具有差異性 DNA 片段產生為止。

玻璃砂震盪法萃取白銹菌孢囊 DNA

為了解孢囊數量和專一性引子之敏感度關係,以玻璃砂震盪法萃取馬齒莧白銹菌孢囊 DNA⁽¹⁶⁾,將白銹菌孢囊收集於 0.5 ml 小型離心管中,懸浮於 220 μl DNA 萃取溶液(0.1 M Tris-HCl, pH 8.0、0.05 M EDTA, pH 8.0)、0.7% β -mercaptoethanol、1% sodium dodecyl sulphate 和 RNase),懸浮於 DNA 萃取溶液的白銹菌孢囊,於顯微鏡下進行孢囊濃度定量,計算出孢囊數量後,經連續 10 倍稀釋後製成 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$ 顆孢囊懸浮液,再分別加入 0.2 g 已滅菌之玻璃砂(0.5 mm 直徑),以震盪器(VORTEX-GENIE 2[®], Scientific Industries, Inc.)最高速震盪 10 min 後,放置於預熱 95 $^{\circ}\text{C}$ 的乾熱器上加熱 10 min,取出放置於室溫下冷卻,接著以桌上型離心機最高速離心 5 min,將上清液移至 1.5 ml 離心管中,加入去離子水使總體積達 500 μl ,且加入等體積(500 μl)的 phenol:chloroform:isoalcohol(25:24:1, pH 8.0),經震盪器震盪 5 分鐘,以桌上型離心機 12,000 rpm 離心 5 min,取出上層之水層部分 400 μl

溶液於新的 1.5 ml 離心管中,加入 1 ml 預冷 95%酒精和 40 μl 的 3 M 醋酸鈉,混和均勻後置於-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷凍庫進行酒精沈澱 2 h,取出後以桌上型離心機 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13,000 rpm 離心 15 min,再倒除上清液之後用預冷之 70%酒精清洗管壁,利用乾熱器加熱至 70 $^{\circ}\text{C}$ 蒸發殘餘酒精,最後溶解於 30 μl 去離子水,製成濃度分別為 3.3 $\sim 3.3 \times 10^5$ 顆/ μl 白銹菌孢囊 DNA 溶液,分別取 2 μl (6.7 $\sim 6.7 \times 10^5$ 顆之馬齒莧白銹菌孢囊 DNA) 進行下列孢囊數量與專一性引子對之敏感度測試。

白銹菌專一性引子對之敏感度

為測試設計之白銹菌專一性引子對的敏感度,進行兩種敏感度測試,其一於每反應中直接加入不同白莧白銹菌 DNA 模板濃度(2,000、1,000、100、10 及 0 pg/ μl)及其專一性引子對 Abw260 進行分析;其二為了解含有多少顆白銹菌孢囊 DNA 萃取液,才可被白銹菌專一性引子對增幅出差異性 DNA 片段產物,於每反應中加入上述玻璃砂震盪萃取之 $6.7 \sim 6.7 \times 10^5$ 顆馬齒莧白銹菌孢囊 DNA 與其專一性引子 Abp260 進行 PCR 試驗,另外為了解多少孢囊 DNA 模版可被專一性引子對大量增幅出特定片段,以 1~9 μl 之 3.3 顆/ μl 白銹菌孢囊 DNA 溶液(3.3~29.7 顆之馬齒莧白銹菌孢囊 DNA)為模版進行 PCR。兩種敏感度測試之 PCR,除了 DNA 模版不同外,其餘條件與「白銹菌引子對設計與專一性測試」之反應相同。

白銹菌專一性引子對之偵測應用

應用上述設計之白銹菌專一性引子對,分別對健康及接種後尚未產生病徵之白莧、紅莧、烏莧、馬齒莧及蘿蔔植株葉片進行偵測;並以真核生物核糖體 DNA 轉錄區間序列(internal transcribed spacers, ITS)之共通引子對 ITS1 和 ITS4⁽¹³⁾進行 PCR 作為對照組,確定樣品中含有植株或

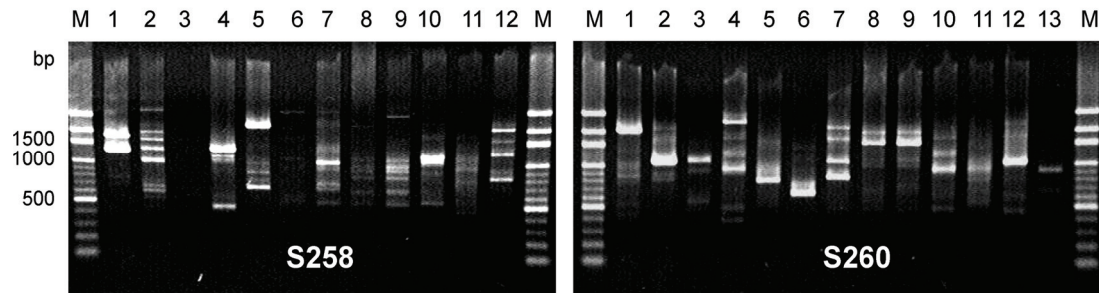
白銹菌 DNA 之確實存在。並採集台中、雲林、南投和馬祖等產地之白銹菌病株進行相同之偵測。另外，為了解白銹菌感染植株多少天後，才可被專一性引子偵測到，將紅莧以人工接種白銹菌⁽⁴⁾，分別萃取接種後 0~7 天之接種葉 DNA，並與 Abw260 引子對進行 PCR 反應。DNA 萃取及 PCR 條件如上述之「白銹菌及其寄主 DNA 萃取與儲存」與「白銹菌引子對設計與專一性測試」方法。

結 果

以逢機增幅多型性 DNA 片段圖譜法篩選白銹菌之差異性片段

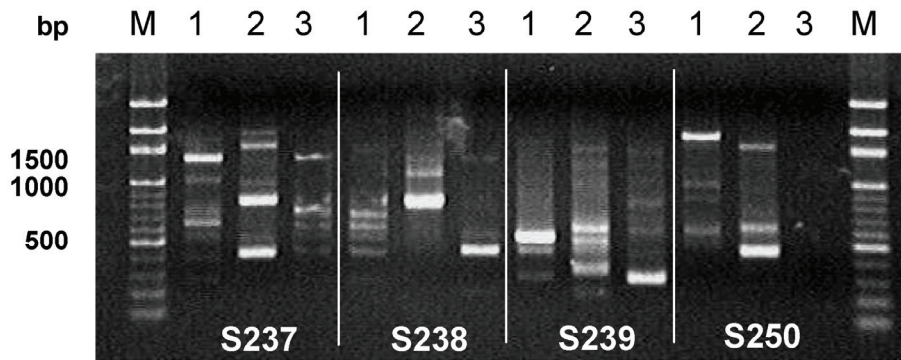
以 RAPD 法分析各白銹菌菌株之差異性片段產物，隨機引子 S260

(5'-ACAGCCCCCA-3')可擴增出白莧、紅莧、馬齒莧和甕菜等白銹菌菌株之單一且與寄主不同大小之 DNA 片段(圖一)。S258(5'-GAGGTCCACA-3')可明顯擴增出大約 1300 bps 和 1700 bps 左右之鳥莧白銹菌 DNA 片段，寄主植物則無此兩片段(圖一)，但進一步以 S258 引子增幅不同區域採集而來之鳥莧白銹菌菌株 DNA，僅部分地區菌株出現 1700 bps 之片段，故只針對 1300 bp 之差異性片段進行分析。針對蘿蔔白銹菌與其寄主之 RAPD PCR 中，隨機引子 S250(5'-ACCTCGGCAC-3')增幅蘿蔔白銹菌，可得一大小為 1700 bps 的片段(圖二)，而在蘿蔔植物與空白對照組皆未出現此片段。針對以上 RAPD 分析所得之不同白銹菌菌株之差異性片段，進行定序、專一性序列選殖和引子合成及測試。



圖一、以隨機引子對 S258 及 S260 經逢機增幅多型性 DNA 片段圖譜分析法所得之白銹菌 DNA 片段產物。直欄 M, 100 - 3000 bp 核酸梯狀標誌；1, 鳥莧白銹菌 DNA；2, 白莧白銹菌 DNA；3, 紅莧白銹菌 DNA；4, 滿天星白銹菌 DNA；5, 馬齒莧白銹菌 DNA；6, 甕菜白銹菌 DNA；7, 鳥莧健康植株 DNA；8, 白莧健康植株 DNA；9, 紅莧健康植株 DNA；10, 滿天星健康植株 DNA；11, 馬齒莧健康植株 DNA；12, 甕菜健康植株 DNA；13, 空白對照組。

Fig. 1. RAPD products of *Albugo* spp. generated by random primers S258 and S260. Lane M, 100 - 3000 bp DNA ladder marker; 1, DNA of *A. bliti* from *Amaranthus lividus*; 2, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus*; 3, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus* forma *ruber*; 4, DNA of *A. bliti* from *Alternanthera sessilis*; 5, DNA of *A. portulacae*; 6, DNA of *A. ipomoeae-aquatica* from *Ipomoea aquatica*; 7, DNA of *Am. lividus*; 8, DNA of *Am. mangostanus*; 9, DNA of *Am. mangostanus* forma *ruber*; 10, DNA of *Al. sessilis*; 11, DNA of *Portulaca oleracea*; 12, DNA of *I. aquatica*; 13, blank control.



圖二、以隨機引子對 S237、S238、S239 及 S250 經逢機增幅多型性 DNA 片段圖譜分析法所得之蘿蔔白銹菌及其寄主 DNA 片段產物。直欄 M, 100 - 3000 bp 核酸梯狀標誌；1, 蘿蔔白銹菌 DNA；2, 健康蘿蔔植株 DNA；3, 空白對照組。

Fig. 2. RAPD products of *Albugo candida* and *Raphanus sativus* generated by random primers S237 - S239 and S250. Lane M, 100 - 3000 bp DNA ladder marker; 1, DNA of *A. candida*; 2, DNA of *Raphanus sativus*; 3, blank control.

白銹菌引子對之專一性測試

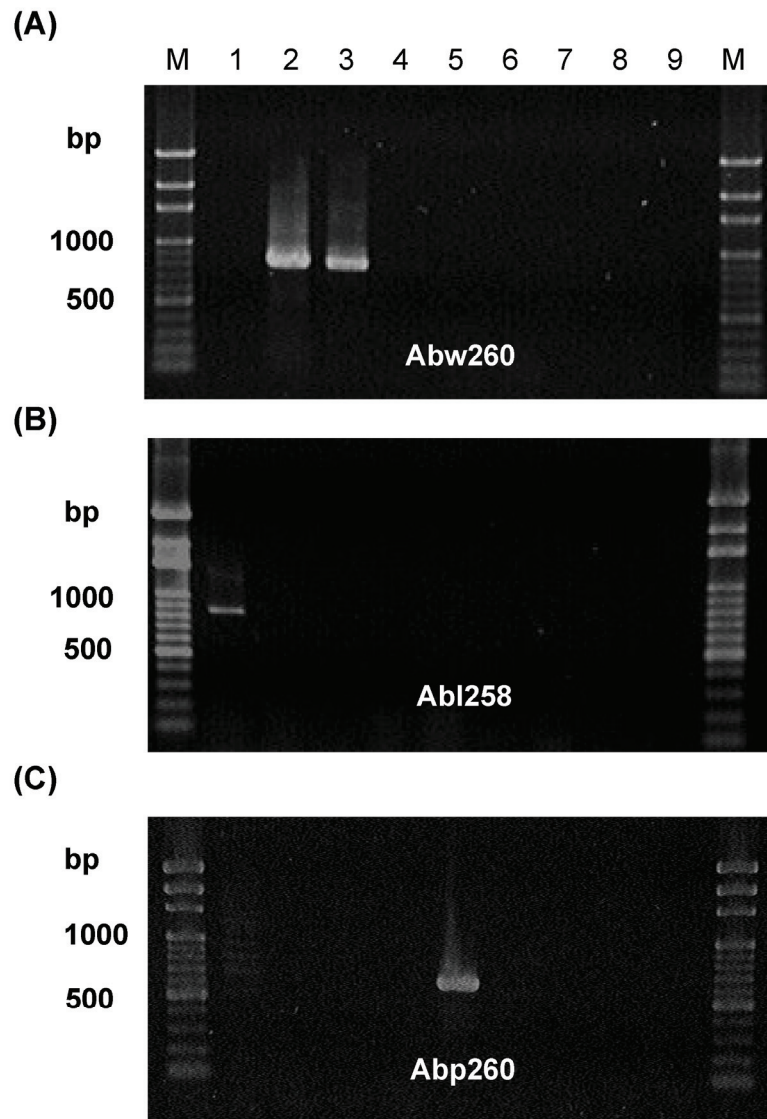
以上述 RAPD 法所產生之不同白銹菌差異性 DNA 片段來設計專一性引子對，並進行專一性測試，結果顯示依白莧白銹菌 (*A. bliti*) 設計之 Abw260 引子對 (abw260-up: 5'-cgacaagtaccttctacatc-3'; abw260-dw: 5'-gatgtaggaaggtactgtcg-3') 僅能增幅出 831 鹼基對之白莧白銹菌及紅莧白銹菌專一一段，但無法增幅出同為 *A. bliti* 之烏莧白銹菌菌株 (圖三、上)；而烏莧白銹菌 (*A. bliti*) 設計之 Abl258 引子對 (abl258-up: 5'-aaggcttgataggcttatgc-3'; abl258-dw: 5'-gactgtggtcgacatgattta-3') 也僅能增幅出 867 鹼基對之烏莧白銹菌專一一段，無法增幅出同為 *A. bliti* 之白莧及紅莧白銹菌菌株 (圖三、中)。利用馬齒莧白銹菌 (*A. portulacae*) 設計之 Abp260 引子對 (abp260-up: 5'-gcgcttctgttgatgcgta-3'; abp260-dw: 5'-gacacgagtgcaagtcacatc-3')，只能增幅出 637 鹼基對馬齒莧白銹菌之專一一段 (圖三、下)。以蘿蔔白銹菌 (*A. candida*) 設計之 Acr250 引子對 (Acr250-up:

5'-atgtgaagcgggaacgagtgt-3'; Acr250-dw: 5'-ttagtgtcatcgctcttc-3')，都可增幅出 694 鹼基對之蘿蔔及白菜白銹菌專一一段 (圖四)。因此，Abw260 可為白莧及紅莧白銹菌株之專一性引子對，而 Abl258 則為烏莧白銹菌株之專一性引子對；Abp260 為馬齒莧白銹菌株之專一性引子對；Acr250 為蘿蔔及白菜白銹菌株之專一性引子對。

白銹菌專一性引子對敏感度測試

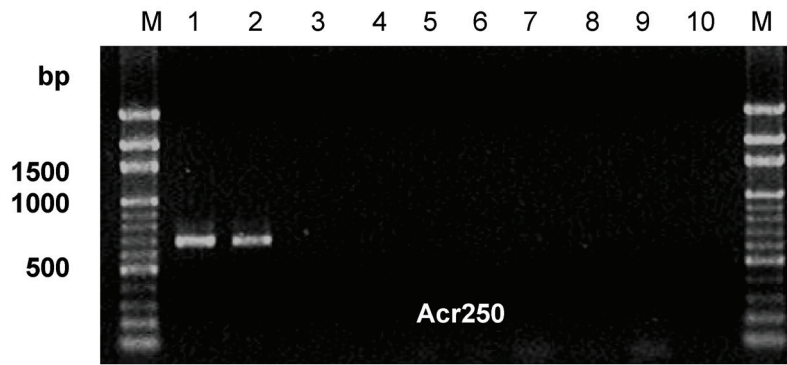
以不同濃度之白莧白銹菌 DNA 為模版，配合 Abw260 專一性引子對進行敏感度測試，結果顯示當白莧白銹菌 DNA 濃度為 10 pg/μl 時，可被 Abw260 專一性引子對增幅出 DNA 片段產物，但是該 DNA 片段並不明顯，而白莧白銹菌 DNA 濃度在 100 pg/μl 以上時，均可被清楚地增幅出特定之 DNA 片段 (圖五)，其它白銹菌專一性引子對之敏感度，亦有相同結果。

進一步探討多少顆白銹菌孢囊所萃取之 DNA 於 PCR 反應中，可被專一性引子對明顯地增幅出特定 DNA 片段，以不同數量馬齒莧白銹菌孢囊所萃取之 DNA 進行



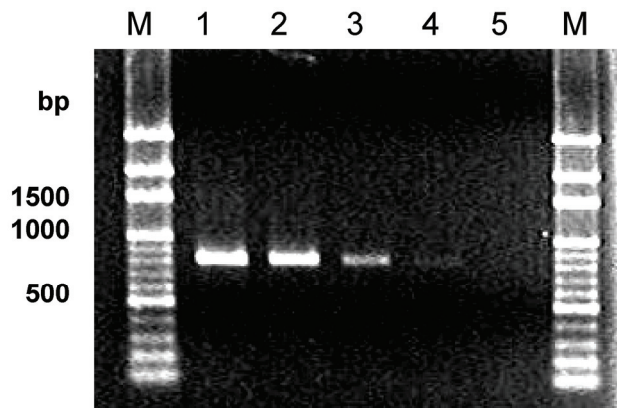
圖三、Abw260(上)、Abl258(中)及 Abp260(下)等白銹菌引子對之專一性測試。直欄 M, 100 - 3000 bp 核酸梯狀標誌；1, 烏莧白銹菌 DNA；2, 白莧白銹菌 DNA；3, 紅莧白銹菌 DNA；4, 滿天星白銹菌 DNA；5, 馬齒莧白銹菌 DNA；6, 蕘菜白銹菌 DNA；7, 白菜白銹菌 DNA；8, 蘿蔔白銹菌 DNA；9, 空白對照組。

Fig. 3. Specificity test of *Albugo*-specific primers Abw260(top), Abl258(middle) and Abp260(bottom). Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1, DNA of *A. bliti* from *Amaranthus lividus*; 2, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus*; 3, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus* forma *ruber*; 4, DNA of *A. bliti* from *Alternanthera sessilis*; 5, DNA of *A. portulacae* from *Portulaca oleracea*; 6, DNA of *A. ipomoeae-aquaticae* from *Ipomoea aquatica*; 7, DNA of *A. candida* from *B. rapa* spp. *chinensis*; 8, DNA of *A. candida* from *Raphanus sativus*; 9, blank control.



圖四、蘿蔔白銹菌引子對 Acr250 之專一性測試。直欄 M, 100 - 3000 bp 核酸梯狀標誌；1, 蘿蔔白銹菌 DNA；2, 白菜白銹菌 DNA；3, 蘿蔔植株 DNA；4, 烏莧白銹菌 DNA；5, 白莧白銹菌 DNA；6, 紅莧白銹菌 DNA；7, 滿天星白銹菌 DNA；8, 馬齒莧白銹菌 DNA；9, 甕菜白銹菌 DNA；10, 空白對照組。

Fig. 4. Specificity test of *Albugo candida* primers Acr250. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1, DNA of *A. candida* from *Raphanus sativus*; 2, DNA of *A. candida* from *B. rapa* spp. *chinensis*; 3, DNA of *R. sativus*; 4, DNA of *A. bliti* from *Amaranthus lividus*; 5, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus*; 6, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus* forma *ruber*; 7, DNA of *A. bliti* from *Alternanthera sessilis*; 8, DNA of *A. portulacae* from *Portulaca oleracea*; 9, DNA of *A. ipomoeae-aquatica* from *Ipomoea aquatica*; 10, blank control.



圖五、白莧白銹菌專一性引子對 Abw260 之敏感度測試。直欄 M, 100 - 3000 核酸梯狀標誌；1-4, 白莧白銹菌 DNA 濃度分別為 2000、1000、100 及 10 pg/μl；5, 空白對照組。

Fig. 5. Sensitivity test of specific primers Abw 260 of *Albugo bliti* from *Amaranthus mangostanus*. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1-4, concentrations of *A. bliti* from *Am. mangostanus* were 2000, 1000, 100 and 10 pg/μl, respectively; 5, blank control.

專一性引子 PCR，試驗結果顯示，加入約 7 顆白銹菌孢囊 DNA 含量，可被 Abp260 引子對增幅出特定、但不明顯之片段（圖六，左），但進一步分析顯示，約 4 顆孢囊亦可增幅出不明顯之專一性片段，17 顆白銹菌孢囊 DNA 含量，可擴增較大量之專一性片段（圖六，右），其他白銹菌孢囊之試驗亦有相同結果。

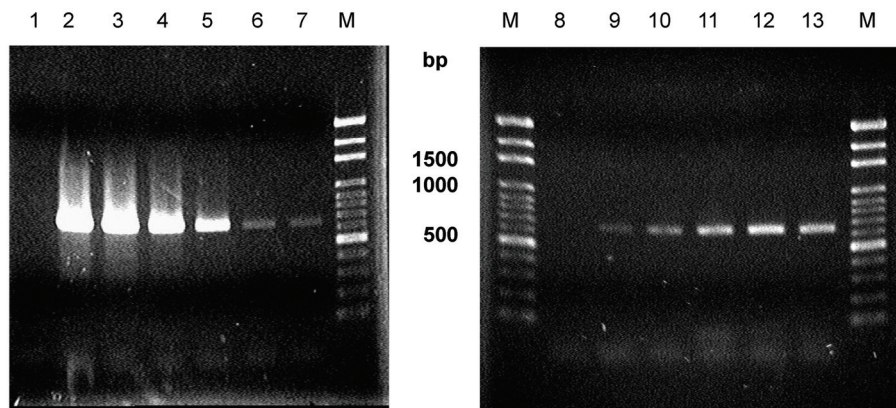
白銹菌專一性引子對之偵測應用

應用上述白銹菌專一性引子對偵測經人工接種而未發病之白莧及紅莧等寄主植物 DNA，結果顯示不同白銹菌專一性引子對皆可從個別白銹菌接種病株之未發病葉中，增幅出白銹菌專一性片段，健康植株者則無（圖七）。且採集不同區域產地之白銹菌病株進行偵測，亦可得到相同之結果。而 Abl258、Abp260 及 Acr250 專一性引子對也得到相同的偵測結果（圖八）。

另一方面為了解寄主植物於接種幾天後，即可被專一性引子偵測到，以 Abw260 引子對偵測人工接種之白莧葉片，結果顯示剛接種之葉片可偵測出殘留之微量白銹菌，接種三天後，即可被白銹菌專一引子對清楚的偵測到（圖九）。

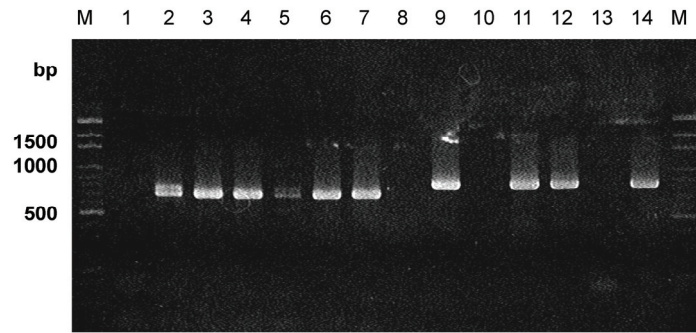
討 論

應用 SCARs 方式所設計之白銹菌專一性引子對，比起直接以隨機引子之 RAPD 法鑑定更具有再現性和專一性⁽¹⁰⁾，本研究亦得類似之結果（圖三、四），SCARs 需先利用 RAPD 分析後，再進行差異性片段之專一性引子設計，因 RAPD PCR 條件之黏合溫度較低且使用非專一性之隨機引子，若反應溶液使用之水中稍有污染，就會產生非標的產物，本試驗亦有相同困擾（圖一、二），但為針對不同白銹菌間及



圖六、馬齒莧白銹菌孢囊數量與其專一性引子 Abp260 對敏感度之關係。直欄 1、8，空白對照組；2-7，分別含有 6.7×10^5 、 6.7×10^4 、 6.7×10^3 、 6.7×10^2 、 6.7×10^1 及 7 顆馬齒莧白銹菌孢囊；9-13，自 3.3 顆孢囊/ μl 馬齒莧白銹菌 DNA 中各取 1、3、5、7 及 9 μl 進行 PCR。

Fig. 6. The relation between the amount of *Albugo portulacae* sporangia and the sensitivity of *Albugo*-specific primers Abp260. Lane 1 and 8, blank control; 2-7, DNA extracted from 6.7×10^5 , 6.7×10^4 , 6.7×10^3 , 6.7×10^2 , 6.7×10^1 and 7 sporangia of *A. portulacae*, respectively; 8-13, 1, 3, 5, 7 and 9 μl DNA extract of 3.3 *A. portulacae* sporangia / μl , respectively.



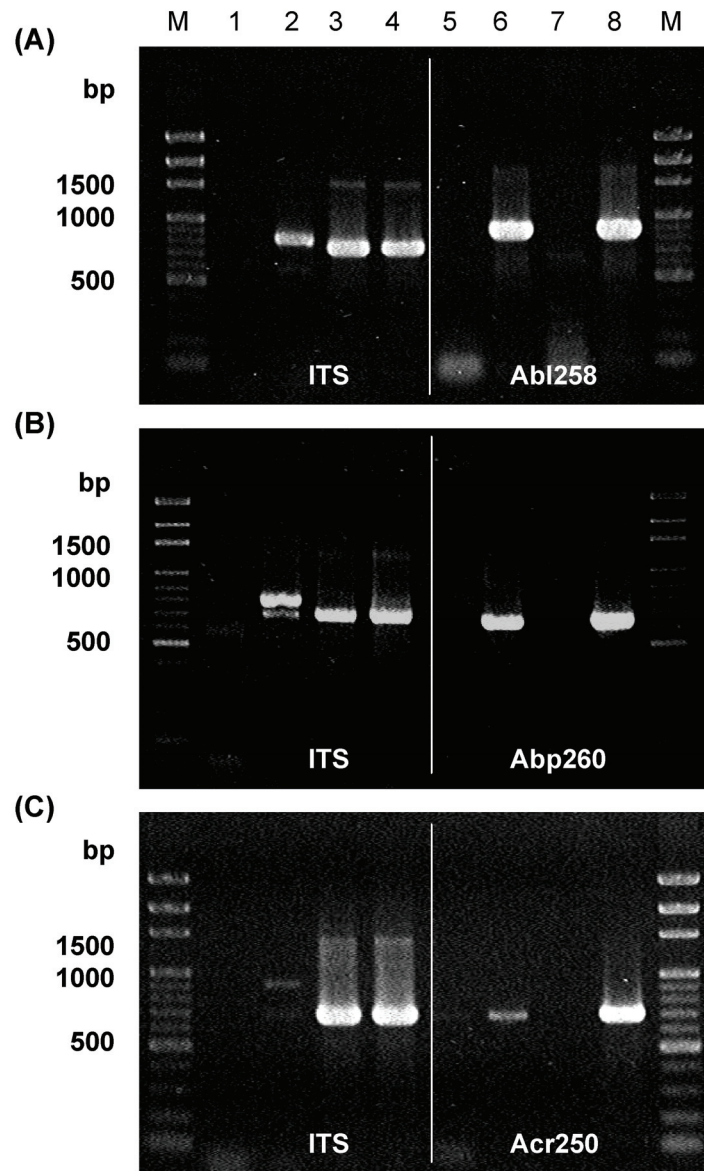
圖七、白莧白銹菌專一性引子對 Abw260 偵測罹病寄主之效果。1 到 7 使用 ITS1 和 ITS4 引子對為對照組進行偵測；8 到 14 是以白莧白銹菌專一性引子對 Abw260 進行偵測。直欄 M, 100-3000 bp 核酸梯狀標誌；1、8, 空白對照組；2、9, 白莧白銹菌 DNA；3、10, 健康白莧植株 DNA；4、11, 罹病白莧植株 DNA；5、12, 紅莧白銹菌 DNA；6、13, 健康紅莧植株 DNA；7、14, 罹病紅莧植株 DNA。

Fig. 7. Detection of *Albugo* on the infected host plants with *Albugo*-specific primers Abw260. Lanes 1 - 7 using common primers ITS1/4 as control primers, and lanes 8 - 14 using *Albugo*-specific primers Abw260. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1 and 8, blank control; 2 and 9, DNA of *A. bliti* from *Amaranthus mangostanus*; 3 and 10, DNA of healthy *Am. mangostanus*; 4 and 11, DNA of *Albugo*-infected *Am. mangostanus*; 5 and 12, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus* forma *ruber*; 6 and 13, DNA of healthy *Am. mangostanus* forma *ruber*; 7 and 14, DNA of *Albugo*-infected *Am. mangostanus* forma *ruber*.

空白對照組之差異性片段所設計之引子於後續之測試，並不會於對照組中增幅出任何產物，故不影響專一性引子之個別專一性，由 SCARs 所設計之白銹菌專一性引子，不僅可區別不同白銹菌菌株（圖三、四），並可於寄主內專一性辨識白銹菌之存在（圖七、八）。白莧白銹菌專一性引子對 Abw260 可同時辨識白莧與紅莧白銹菌（圖三、上），且此兩種白銹菌於生物分類上具有很相近之親緣性⁽¹⁾。而在蘿蔔白銹菌之專一性引子對 Acr250 亦有相同情形，可辨識同為 *A. candida* 引起之山東白菜白銹菌（圖四）。應用 ITS1、ITS4 共同引子對增幅寄主植物和白銹菌之核糖體 DNA 轉錄區間序列 (internal transcribed spacer, ITS) 片段，結果顯示無論是否被白銹菌感染，均可增幅出特定單一片段，由

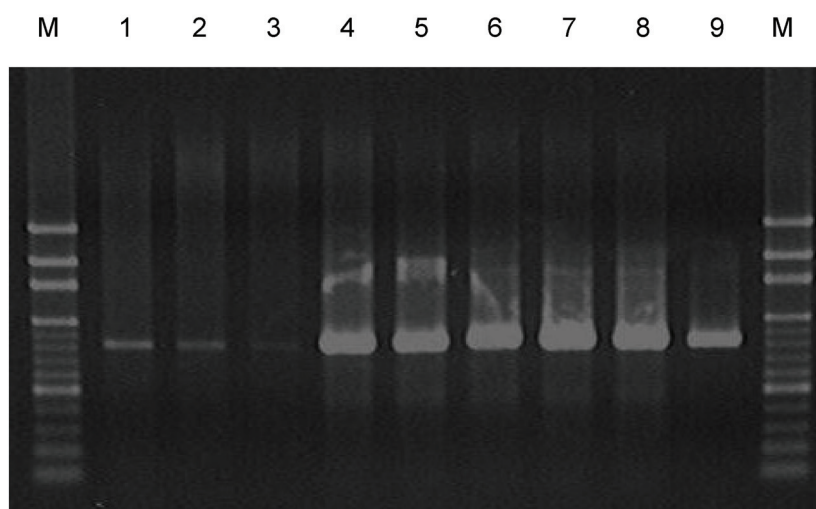
於感染白銹菌之寄主植物葉片 DNA 萃液中，白銹菌 DNA 遠低於植物 DNA，更不易於葉片中測得白銹菌之 ITS 片段，但白銹菌專一性引子對卻能專一性偵測出寄主植物葉片內之微量白銹菌 DNA（圖七、八），因此利用 SCARs 法所設計之白銹菌專一性引子對，可準確偵測出該寄主植物是否被白銹菌感染，換言之，即植物體內是否有白銹菌存在。

由馬齒莧白銹菌專一性引子對 Abp260 之敏感度測試結果，雖然反應中含 10 pg/μl DNA 模版已可顯示不明顯的片段，但於反應後之電泳分析和染色上容易造成誤差，若反應的週期數增加也易產生非專一性片段，每反應中白銹菌之 DNA 濃度達到 100 pg/μl 即可增幅出較大數量之專一性片段，可獲得較佳之白銹菌辨識度



圖八、Abl258 (上)、Abp260 (中) 及 Acr250 (下) 等白銹菌專一性引子對偵測罹病寄主之效果。1 到 4 使用 ITS1 和 ITS4 引子對為對照組進行偵測；5 到 8 是以白銹菌專一性引子對進行偵測。直欄 M, 100-3000 bp 核酸梯狀標誌；1、5, 空白對照組；2、6, 白銹菌 DNA；3、7, 健康植株 DNA；4、8, 罹病植株 DNA。

Fig. 8. Detection of *Albugo* on the infected host plants with *Albugo*-specific primers, Abl258(top), Abp260(middle) and Acr250(bottom). Lanes 1 - 4 using common primers ITS1/4 as control primers, and lanes 5 - 8 using *Albugo*-specific primers. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1 and 5, blank control; 2 and 6, DNA of *A. spp*; 3 and 7, DNA of healthy host plant; 4 and 8, DNA of *Albugo*-infected host plant.



圖九、Abw260 專一性引子對偵測人工接種後不同天數之寄主植物內白銹菌之效果。直欄 M, 100-3000 bp 核酸梯狀標誌；1 到 8 分別為第 0 到 7 天之紅莧葉片 DNA；9 為紅莧白銹菌 DNA。

Fig. 9. Detection of *Albugo* with *Albugo*-specific primers Abw260 on host plants after different inoculated days. Lane M, 100-3000 bp DNA ladder marker; 1 – 8, DNA of *Albugo*-inoculated leaves from 0 to 7 day, respectively; 9, DNA of *A. bliti* from *Am. mangostanus* forma *ruber*.

(圖五)。一般田間白銹菌主要以孢囊的形式殘存成爲二次感染源⁽³⁾，且在人工接種試驗中，在適當的條件之下，只要少數白銹菌孢囊即可使寄主植株罹病，因此在未發病之植株上偵測出潛藏微量之白銹菌，是有其必要性的。但多少顆白銹菌孢囊存在時，才可被專一性引子測出？爲此需於 DNA 萃取前先計算孢囊數量，故利用玻璃砂震盪法來萃取孢囊 DNA，從研究結果中顯示大約 4 顆白銹菌孢囊 DNA 萃取液可擴增出不明顯的產物訊號，而 17 顆白銹菌孢囊 DNA 萃取液就可得到明顯的產物訊號(圖六)，本研究室亦進行白銹菌單孢囊 DNA 萃取及偵測，雖可測得但並非每次皆可增幅出專一片段。也曾嘗試偵測殘存於土壤中之白銹菌，但靈敏度並不高，可能是土壤所萃取之 DNA 溶液殘存許多如腐植酸(Humic acid)等 PCR 干擾物質⁽¹⁷⁾，故

需經稀釋來減少干擾物濃度使 PCR 反應順利，目前仍需修正萃取土壤中極少量白銹菌孢囊 DNA 之方法及提高白銹菌專一性引子對之敏感度，如此才能具備偵測田間土壤中殘存之白銹菌密度的應用價值。

在監測白銹菌之應用方面，白銹菌專一性引子皆可自接種後而尚未發病之寄主葉片中，增幅出白銹菌專一片段(圖七、八)，來自台灣中部及馬祖不同地區之白銹菌樣本，均可被偵測到特定片段。本研究顯示，白莧接種白莧白銹菌後至第二天時，於寄主葉片上幾乎無法增幅出白銹菌之專一片段，於第三天卻可清楚的偵測到植株中的白銹菌(圖九)，由此可知，已侵入葉片中之白銹菌，在第三天左右即開始於寄主葉內大量增生繁殖，若能及時阻止白銹菌形成游走孢子囊堆，即可避免及降低游走孢子囊釋放游走孢子所造成的感

染機會。另外在接種當天可偵測到白銹菌特定片段，顯示接種之白銹菌孢囊殘留在葉表上，接種一天後則無法增幅出特定片段，是否意味著白銹菌在接種後，在葉表上無法存活超過 2 天，此點尚待進一步試驗證明。

本研究所開發之白銹菌專一性引子對，可應用於偵測植株上之白銹菌，可做為早期診斷寄主植物是否已感染白銹菌但未發病之重要工具，對白銹病提供了最佳防治時機的重要依據，達到預防本病害發生與蔓延之機會。若能改良本法應用在偵測土壤中是否殘存白銹菌，如此可於寄主植物尚未種植前，種植非寄主植物或將土壤進行清潔動作，降低土壤中白銹菌殘存密度，防範田間初次感染源之擴散，達到「預防勝於治療」之植物病害管理目的。

引用文獻

1. 李敏郎、郭克忠。1998。台灣莧菜白銹病之發生。植保會刊 40：439-440（摘要）。
2. 李敏郎、謝文瑞。2003。台灣莧菜白銹菌之發生與其病原性之親源性分析。新世紀植物病理科技學術研討會專刊：81-98。
3. 李敏郎、謝文瑞。2003。莧菜白銹病之感染源與其病勢之發展。植病會刊 12：163-172。
4. 李敏郎、謝文瑞。2003。溫度對白銹菌游走孢子囊釋放游走孢子之影響。植病會刊 12：77-84。
5. 澤田兼吉。1919。台灣產菌類調查報告第一編。台灣總督府農事試驗場特別報告第 19 號：56。
6. 澤田兼吉。1922。臺灣產菌類調查報告第二編。臺灣農業部報告第 2 號：22-32。
7. Armstrong, T. 2007. Molecular detection and pathology of the oomycete *Albugo candida* (white rust) in threatened coastal cresses. Department of Conservation, Erihnyon. New Zealand. 18pp.
8. Choi, D., and Priest, M. J. 1995. A key to the genus *Albugo*. Mycotaxon 53: 261-272.
9. McPherson, M. J., and Møller, S. G. 2000. PCR Springer-Verlag New York Inc., New York, USA.
10. Paran, I., and Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85: 985-993.
11. 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.
12. Sawada, K. 1959. Eumycetes Genus *Albugo*, pp. 13-14. In: K. Sawada, [ed.], Descriptive Catalogue of Formosan Fungi XI. Coll. Agr. Nat. Taiwan Univ., Taipei. 268 pp.
13. 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: A. I. Michael, H. G. David, and J. S. John [eds.], PCR PROTOCOLS: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., London, United Kingdom. 481 pp.
14. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531.

15. Zhang, Z. Y., Wang, Y. X., and Liu, Y. L. 1984. Taxonomic studies on the family Albuginaceae of China. II. *Albugo* on Acanthaceae and know species of *Albugo* on Cruciferae. Acta Mycol. Sinica 3: 65-71.
16. Zhou G., W. W. Z., Ong T. and Chen B. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. Mol. Cell. Probes 14: 339-348.
17. Zhou, J., Bruns, M. A., and Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62: 316-322.

ABSTRACT

Hsiao, J. P.¹, Wang, I. C.², and Lee, M. L.^{1*} 2007. Sensitivity and application of *Albugo*-specific primers to detection of *Albugo* spp. on Amaranthaceae, Portulacaceae and radish. *Plant Prot. Bull.* 49: 197-212. (¹Division of Pesticide Application, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan (ROC); ²Miaoli Country Daluen Junior High School, Miaoli 36056, Taiwan (ROC))

Albugo species were collected from Amaranthaceae, Portulacaceae, Convolvulaceae and Brassicaceae in Taiwan. Specificity, sensitivity and application of these *Albugo*-specific primers were tested in the study. Sequence characterized amplified regions (SCARs) were used to screen the individual specific DNA region of *Albugo* spp. for design of *Albugo*-specific primers. Sensitivity of the primers was tested with different *Albugo* species by polymerase chain reaction. The results showed that *Albugo bliti* from *Amaranthus mangostanus* and *Am. mangostanus* forma *ruber* were identified specifically by Abw260 primers (abw260-up: 5'-cgacaagtacctctctacatc-3'; abw260-dw: 5'-gatgttaggaaggtactgtctg-3'); *A. bliti* from *Am. lividus*, and *A. portulacae* from *Portulaca oleracea* were identified specifically by Abl258 primers (abl258-up: 5'-aaggctgtataggcttatgc-3'; abl258-dw: 5'-gactgtggtcgacatgattta-3') and Abp260 primers (abp260-up: 5'-gcgttctgtttgtagcgtta-3'; abp260-dw: 5'-gacacgagtcaagtcacat-3'), respectively; *A. candida* from *Raphanus sativus* and *Brassica pekinensis* were identified specifically by Acr250 primers (acr250-up: 5'-atgtgaagcggacgagtg-3'; acr250-dw: 5'-ttagtggtcatcggtcttc-3'). Sensitivity of *Albugo*-specific primers was tested and 100 pg DNA was the least amount required in each reaction solution. The relationship between the amount of sporangia and sensitivity of these *Albugo*-specific primers were analyzed. The sporangial DNA was extracted by glass beads method. The result showed that 4 sporangia DNA/reaction could be detected with *Albugo*-specific primers, but positive PCR band was obtained with 17 sporangia DNA/reaction. In the detection application of these *Albugo*-specific primers, specific bands of inoculated *Albugo* spp. were observed distinctly with inoculated but symptomless leaves of *Am. mangostanus*, *Am. mangostanus* forma *ruber*, *Am. lividus*, *P. oleracea* and radish. No bands were amplified with control leaves of host plants. DNA was also extracted from leaves of different infected periods after inoculation and analyzed with *Albugo*-specific primers. The results showed that the specific bands of inoculated *Albugo* spp. were observed clearly three days after inoculation of host plants. Therefore, the *Albugo*-specific primers designed in this study could be applied to the identification, detection and monitoring of *Albugo* spp.

(Key words: *Albugo bliti*, *A. portulacae*, *A. candida*, specific primers, sensitivity, detective)

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