

疫病菌分子檢測技術

劉瑞芬

國立台灣大學植物病理學系 電子郵件信箱：rfliou@ccms.ntu.edu.tw

摘 要

疫病菌 (*Phytophthora* spp.) 危害果樹、蔬菜及花卉等多種重要作物，常造成嚴重損失，是非常重要的病原真菌。一般進行疫病診斷時，得先自罹病組織分離菌株，再根據形態特徵及生理特性進行病原菌鑑定。為了簡化鑑定流程，近年來已有越來越多的分子檢測技術被開發出來，這些技術以專一性核酸序列配合南方雜合分析或聚合酶連鎖反應進行疫病菌快速檢測，不僅操作簡便，也可節省不少時間。本文針對如何篩選疫病菌種專一性核酸序列及常用疫病菌分子檢測方法做一簡要的介紹，以提供大家參考。

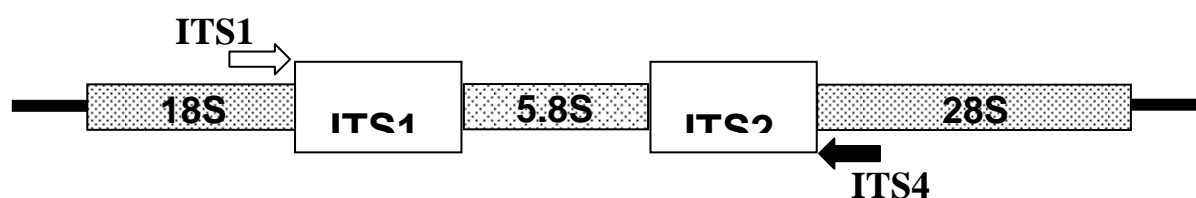
關鍵字：疫病菌、晚疫病菌、分子檢測技術、核糖體ITS、聚合酶連鎖反應

緒 言

台灣地區由於地處亞熱帶與熱帶，加上四週環海，氣候潮濕多雨，非常適於疫病菌 (*Phytophthora* spp.) 之生存，根據Ho *et al.* (1995) 之記載，目前本地疫病菌已經記錄的共有38種，其中經確認之有效種 (valid species) 達23個之多，幾乎包括全世界疫病菌有效種之半數。這些疫病菌中對作物為害比較嚴重的約有十餘種，包括*P. capsici* Leonian, *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian, *P. citricola* Sawada, *P. cinnamomi* Rands, *P. colocasiae* Raciborski, *P. cryptogea* Pethybridge & Lafferty, *P. drechsleri* Tucker (= *P. melonis* Katsura), *P. infestans* (Montagne) de Bary, *P. palmivora* (Butler), 及*P. parasitica* Dastur等，它們大多數屬於土壤傳播性病原菌，危害果樹、蔬菜及花卉等多種重要作物，造成嚴重損失(張，1983；孫，1991；安，1995；Ann, 2000)。進行疫病診斷時，得先自罹病組織分離菌株，不僅功夫繁瑣，所需耗費的時間也相當長；此外，疫病菌之分類與鑑定主要根據形態特徵與生理特性(Waterhouse, 1963, 1970; Stamp *et al.*, 1990)，一般人很難在短時間內融會貫通，往往需要學養豐富的專家學者才能勝任愉快。相對於傳統分類工作所展現的複雜性，分子檢測技術由於操作快速簡便，而且容易規格化，已逐漸成為鑑定植物病原的重要工具 (Henson and French, 1993; Martin *et al.* 2000)。針對疫病菌巨分子所開發的檢測技術主要包括核酸特性及免疫分析(Bausher and Sweeney, 1991; Benson, 1991)，由於核酸相關技術已蔚為主流，本文將針對目前已開發之疫病菌分子(核酸)檢測技術做一簡要的介紹，重點主要包括如何篩選疫病菌種專一性核酸序列、常用核酸分析技術及晚疫病菌分子檢測技術。

如何選取疫病菌種專一性核酸序列

一般在建立真菌分子鑑定技術時，應考慮之因子主要包括準確性、靈敏度、及操作方便性，其中又以“準確性”為首要考量，如何獲得種專一性核酸序列以作為檢測標的因此成為重要關鍵。早期在選取種專一性核酸序列時，最常用的方法為自基因庫 (genomic library) 篩選專一性序列，由於疫病菌基因組含有相當數量之重複性序列 (repetitive sequence) (Judelson and Randall, 1998)，進行基因庫篩選時所得到的幾乎都屬於這一類序列 (Goodwin *et al.*, 1989; Goodwin *et al.*, 1990a; Ersek *et al.* 1994)；應用重複性序列設計種專一性核酸探針或引子對可增加檢測敏感度，是開發疫病菌分子檢測技術時相當好的選擇 (Judelson and Messenger-Routh, 1996; Judelson and Tooley, 2000)。此外，也有學者根據疫病菌特有的基因，例如誘導蛋白 elicitin，之序列設計種專一性核酸引子對 (Coelho *et al.*, 1997; Lacourt and Duncan, 1997)，或以逢機增幅多型性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 尋找種專一性核酸片段 (Schubert *et al.* 1999)。不過，由於序列容易取得，核糖體ITS (ribosomal internal transcribed spacer) 已逐漸成為近幾年來最常被選用的序列 (White *et al.* 1990; Martin *et al.* 2000)。和其他真核生物一樣，疫病菌所含有之核糖體RNA (ribosomal RNA, rRNA) 基因數相當多，這些基因所攜帶之遺傳訊息自5'端至3'端依序包括18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA (圖一)，當進行rRNA轉錄反應時，這些序列會一起被轉錄出來，但ITS1與ITS2隨後被剪除，18S, 5.8S, 及28S rRNA則在經過適當修飾之後用於核糖體之組合。rRNA由於得發揮一定的功能，其序列在跨物種間呈現相當程度之保守性。相對的，ITS因為不encode任何功能，蘊藏之序列歧異度比較大，非常適合用來進行類緣關係分析與種專一性分子鑑定標記之開發 (Lee and Taylor, 1992; Lee *et al.* 1993; Tooley *et al.* 1997; Jyan *et al.* 2002)。擬分析疫病菌之ITS序列時，可以通用引子對ITS1及ITS4 (White *et al.* 1990) 增幅疫病菌之ITS1-5.8S rRNA-ITS2 核酸片段，再進行分子選殖與核酸定序。此外，目前Genbank已累積相當數量之疫病菌ITS序列資料，因此也可以自Genbank收集各種疫病菌之ITS1與ITS2序列，再以PileUp (Devereux *et al.* 1984) 或CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) 等程式進行多序列併列分析 (multiple sequence alignment)，以便根據歧異度較高的區域設計專一性核酸引子對或探針。



圖一、疫病菌核糖體RNA基因結構之簡單示意圖；箭頭所標示為真菌通用引子ITS1與ITS4之對應位置。

疫病菌分子檢測技術

在偵測種專一性序列之存在情形時，所使用的方法主要包括南方雜合分析 (Southern and dot/slot hybridization analysis) (Goodwin *et al.* 1989, 1990a; Lee *et al.* 1993; Judelson and Messenger-Routh, 1996)與聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) (Ersek *et al.* 1994; Lacourt and Duncan, 1997; Trout *et al.* 1997; Judelson and Tooley, 2000; Jyan *et al.* 2002)；這些方法各有其優缺點，主要可根據敏感度、操作難易程度及所需花費時間加以考量。一般而言，南方雜合分析之步驟比較複雜，所需耗費之時間也較長，但值得一提的是，Levesque *et al.* (1998)以 reverse dot blot hybridization 所開發的疫病菌 (*P. cinnamomi*)及腐黴菌(*Pythium spp.*)檢測系統已初步運用“生物晶片”的概念。相對於雜合分析，PCR 因操作容易、敏感度高，且所需花費時間比較短，是近年來開發疫病菌分子檢測技術時主要採用之方法(表一) (Lacourt and Duncan, 1997; Trout *et al.* 1997; Judelson and Tooley, 2000; Jyan *et al.* 2002)。PCR 看似簡單，實則受許多因素影響，在建立 PCR 檢測技術時，除了設計專一性核酸引子對之外，還得就採樣方法、樣品核酸製備、引子黏合溫度(annealing temperature)及時間等尋求最佳反應條件，以提昇檢測敏感度及再現性。以 PCR 進行疫病菌分子檢測時，得先自植物組織或土壤樣品抽取核酸、以種專一性核酸引子對進行 PCR，再以瓊脂膠體電泳分析增幅產物以觀察預期長度之核酸片段的的存在情形。此外，也可以在進行 PCR 後，先以限制酶切割增幅產物，再進行瓊脂膠體電泳分析，亦即利用核糖體 ITS 的限制片段長度多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)進行疫病菌分子鑑定(Ristaino *et al.* 1998)。近年來，也有學者以 PCR 結合 colorimetric hybridization assay (Coelho *et al.* 1997)或酵素連結免疫吸附測定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)進行疫病菌分子檢測(Bailey *et al.* 2002)，這類方法可一次分析大量樣品，但步驟繁瑣、耗費時間長，敏感度也未必比瓊脂膠體電泳分析好(Somai and Keinath, 2002)。

晚疫病菌分子檢測技術

晚疫病菌(*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary)可在馬鈴薯與蕃茄引起晚疫病，是世界性重要病原真菌；由於晚疫病菌可存活於馬鈴薯塊莖，而馬鈴薯又以塊莖進行繁殖，一旦帶病種薯被栽植於田間，再遇到合適之環境因子，即可能造成嚴重危害。因此，選用健康種薯是晚疫病防治工作中相當重要的一環。為了改善種薯檢測技術，目前已有多種晚疫病菌分子檢測方法被開發出來。這些方法主要以核糖體 ITS 為分析標的，進行檢測時，可以 NaOH 自小量馬鈴薯塊莖粗抽核酸(Wang *et al.* 1993)、以種專一性核酸引子對進行 PCR，再以瓊脂膠體電泳分析增幅產物以便觀察特定長度之核酸片段的的存在情形；研究結果發現，即使在觀察不到病徵的情況下，仍可自帶病種薯增幅出預期長度之核酸片段，顯示以分子技術應用於馬鈴薯健康種薯檢測時，不僅操作簡易快速，檢測敏感度也相當好(Tooley *et al.* 1997; Trout *et al.* 1997; Jyan *et al.* 2002)。Judelson and Randall (1998)的研究顯示，晚疫病菌所帶核糖體 RNA 之基因數約為 820。為了提昇偵

測敏感度，Judelson and Tooley (2000)以晚疫病菌特有之重複性序列開發晚疫病菌檢測技術，此序列在晚疫病菌基因組之重複次數高達 14,000，因此據以開發出來之檢測技術的敏感度顯得比核糖體 ITS 好(表一)；若進一步以 nested PCR 進行檢測，敏感度還可再提高 10 倍，是目前成效最好的檢測方法。

結 論

近年來由於分生技術的蓬勃發展，微生物相關研究的進展可謂一日千里，其中各式各樣分子標記的開發與應用不僅大大拓展我們在植物病原微生物生態、族群遺傳及流行病學等研究領域的視野，也有效改善了我們進行病害診斷與鑑定的能力，不過，由於真菌病害發生所涉及的因素十分複雜，以分生技術進行病原真菌檢測雖然具有操作簡便、節省時間及容易規格化等優點，在執行面上仍有不少改善空間，若能進一步充分結合疫病菌發病生態所提供的訊息當能開發出更具實效性的檢測技術。

引用文獻

1. 安寶貞。1995。台灣蘭花之疫病。植保會刊 4: 152-162。
2. 孫守恭。1991。台灣土傳性病害研究之回顧與展望。植保會刊 33: 1-16。
3. 張和喜。1983。台灣作物疫病現況。 植保會刊 25: 231-237。
4. Ann, P.J. 2000. New diseases and records of flowering potted plants caused by *Phytophthora* species in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 9: 1-10.
5. Bailey, A.M., Mitchell, D.J., Manjunath, K.L., Nolasco, G., and Niblett, C.L. 2002 Identification to the species level of the plant pathogens *Phytophthora* and *Pythium* by using unique sequences of the ITS1 region of ribosomal DNA as capture probes for PCR ELISA. FEMS Microbiol. Lett. 207: 153-158.
6. Bausher, M.G. and Sweeney, M.J. 1991. Field detection of citrus blight using immunological techniques. Plant-Dis. 75: 447-450.
7. Benson, D.M. 1991. Detection of *Phytophthora cinnamomi* in azalea with commercial serological assay kits. Plant Dis. 75: 478-482.
6. Coelho, A.C., Cravador, A., Bollen, A., Ferraz, J.F.P., Moreira, A.C., Fauconnier, A., and Godfroid, E. 1997. Highly specific and sensitive non-radioactive molecular identification of *Phytophthora cinnamomi*. Mycol. Res. 101: 1499-1507.
7. Devereux, J., Haerberli, P., and Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucl. Acids Res. 12: 387-395.
8. Ersek, T., Schoelz, J.E., and English, J.T. 1994. PCR amplification of species-specific

- DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2616-2621.
9. Goodwin, P.H., Kirkpatrick, B.C., and Duniway, J.M. 1989. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 79: 716-721.
 10. Goodwin, P.H., Kirkpatrick, B.C., and Duniway, J.M. 1990a. Identification of *Phytophthora citrophthora* with cloned DNA probes. Appl. Env. Microbiol. 56: 669-674.
 11. Goodwin, P.H., English, J.T., Neher, D.A., Duniway, J.M., and Kirkpatrick, B.C. 1990b. Detection of *Phytophthora parasitica* from soil and host tissue with a species-specific DNA probe. Phytopathology 80: 277-281.
 12. Henson, J.M. and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 81-109.
 13. Ho, H. H., Ann, P. J., and Chang, H. S. 1995. The genus *Phytophthora* in Taiwan. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 15.
 14. Judelson, H.S. and Messenger-Routh, B. 1996. Quantitation of *Phytophthora cinnamomi* in avocado roots using a species-specific DNA probe. Phytopathology 86: 763-768.
 15. Judelson, H.S. and Randall, T.A. 1998. Families of repeated DNA in the oomycete *Phytophthora infestans* and their distribution within the genus. Genome 41: 605-615.
 16. Judelson, H.S. and Tooley, P.W. 2000. Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. Phytopathology 90: 1112-1119.
 17. Jyan, M.H., Huang, L.C., Ann, P.J., and Liou, R.F. 2002. Rapid detection of *Phytophthora infestans* by PCR. Plant Pathol. Bull. 11: 25-32.
 18. Lacourt, I. and Duncan, J.M. 1997. Specific detection of *Phytophthora nicotianae* using the polymerase chain reaction and primers based on the DNA sequence of its elicitor gene ParA1. Eur. J. Plant Pathol. 103: 73-83.
 19. Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1992. Phylogeny of fungus-like protist *Phytophthora* spp., inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Mol. Biol. Evo. 9: 636-653.
 20. Lee, S.B., White, J., and Taylor, J.W. 1993. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. Phytopathology 83: 177-181.
 21. Levesque, C.A., Harlton, C.E., and de Cock, A.W.A.M. 1998. Identification of some Oomycetes by reverse dot blot hybridization. Phytopathology 88: 213-222.
 22. Liew, E.C.Y., MacLean, D.J., and Irwin, J.A.G. 1998. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer regions of the ribosomal DNA. Mycol. Res. 102: 73-80.
 23. Martin, R.R., James, D., and Lévesque, C.A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 38: 207-239.

24. Panabieres, F., Marais, A., Trentin, F., Bonnet, P., and Ricci, P. (1989) Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species. *Phytopathology* 79: 1105-1109.
25. Ristaino, J.B., Madritch, M., Trout, C.L., and Parra, G. 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification of the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 948-954.
26. Schubert, R., Bahnweg, G., Nechwata, J., Jung, T., Cooke, D.E.L., *et al.* 1999. Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *Eur. J. For. Pathol.* 29: 169-188.
27. Scott, D.L., Clark, C.W., Fyffe, A.E., Walker, M.D., and Deah, K.L. 1998. The differentiation of *Phytophthora* species that are pathogenic on potatoes by an asymmetric PCR combined with single-strand conformation polymorphism analysis. *Lett. App. Microbiol.* 27: 39-44.
28. Somai, B.M. and Keinath, A.P. 2002. Development of PCR-ELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from related *Phoma* species. *Phytopathology* 86: 710-716.
29. Stamp, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., and Hall, D. J., 1990. Revised tabular Key to the species of *Phytophthora*. *Mycol. Pap.* 162. *Comm. Mycol. Ins.* Kew, Surrey, England.
30. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
31. Tooley, P.W., Bunyard, B.A., Carras, M.M., and Hatziloukas, E. 1997. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1467-1475.
32. Trout, C.L., Ristaino, J.B., Madritch, M., and Wangsomboondee, T. 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant Dis.* 81: 1042-1048.
33. Wang, H., Qi, M., and Cutler, A.J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucl. Acids Res.* 21: 4153-4154.
34. Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Pap.* 92. *Comm. Mycol. Inst.* Kew, Surrey, England.
35. Waterhouse, G.M. 1970. The genus *Phytophthora*-diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers. *Mycol. Pap.* 122. *Comm. Mycol. Inst.* Kew. Surrey, England.
36. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR protocols: a guide to

methods and applications”, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T. White, and M. Innis (eds.), Academic Press, USA.

表一、疫病菌(*Phytophthora* spp.)分子檢測技術

Species	Target sequence	Method	Sensitivity ^a	Reference
<i>Phytophthora</i> spp.	Repetitive DNA	RFLP		Panabieres <i>et al.</i> (1989)
<i>P. parasitica</i>	Species-specific repetitive DNA	Southern hybridization	1 ng	Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>P. citrophthora</i>	Species-specific repetitive DNA	Southern hybridization		Goodwin <i>et al.</i> (1990a)
<i>P. parasitica</i>	Species-specific repetitive DNA	Dot blot hybridization		Goodwin <i>et al.</i> (1990b)
<i>Phytophthora</i> spp.	Ribosomal ITS	Dot blot hybridization	1 ng	Lee <i>et al.</i> (1993)
<i>P. citrophthora</i> & <i>P. parasitica</i>	Species-specific sequence	PCR	1 ng	Ersek <i>et al.</i> (1994)
<i>P. cinnamomi</i>	Species-specific repetitive sequence	Dot blot hybridization	5 pg	Judelson & Messenger-Routh (1996)
<i>P. cinnamomi</i>	the cinnamomin gene	PCR followed by colorimetric hybridization assay	250 fg	Coelho <i>et al.</i> (1997)
<i>P. parasitica</i>	the parasiticein gene	PCR	100 zoospores	Lacourt & Duncan (1997)
<i>P. infestans</i>	Ribosomal ITS	PCR	1~10 pg	Tooley <i>et al.</i> (1997)
<i>P. infestans</i>	Ribosomal ITS	PCR		Trout <i>et al.</i> (1997)
<i>P. cinnamomi</i>	Ribosomal ITS	Reverse dot blot hybridization		Levesque <i>et al.</i> (1998)
<i>Phytophthora</i> spp.	Ribosomal DNA	PCR followed by RFLP		Ristaino <i>et al.</i> (1998)
<i>Phytophthora</i> spp.		Asymmetric PCR followed by SSCP		Scott <i>et al.</i> (1998)
<i>P. medicaginis</i>	Ribosomal ITS	PCR		Liew <i>et al.</i> (1998)
<i>P. infestans</i>	Species-specific repetitive sequence	PCR	10 fg	Judelson and Tooley (2000)
<i>Phytophthora</i> spp.	Ribosomal ITS	PCR ELISA		Bailey <i>et al.</i> (2002)
<i>P. infestans</i>	Ribosomal ITS	PCR	1 pg	Jyan <i>et al.</i> (2002)

^a “Sensitivity” indicates the minimal amount of fungal DNA detectable by the method.