「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 (1996)

近代生物技術在植物病原眞菌偵測及診斷之應用

陳隆鐘 余瑞卿 賴學珍 王志宏
國立中興大學植物病理學系所

摘要：植物檢疫與植物防疫是未來植物保護的工作重點之一。而植物病原眞菌之偵測鑑定與診斷技術將是植物檢疫與植物防疫的工作一環。免疫技術(immunological techniques)及核酸技術(nucleic acid techniques)進行植物病原眞菌偵測、診斷與鑑定爲一較新技術。血清技術常利用的方法計以多株抗體、單株抗體爲反應基質進行偵測(polyclonal and monoclonal antibodies as reagents)、酵素連結免疫吸附測定分析法(enzyme-linked immunosorbent assay)、免疫螢光及免疫金蛋白標識測定分析(immunofluorescence and immunogold labeling)、核酸技術包括核酸探針(nucleic acid probes）製作，及以偵測診斷爲主之核酸探針雜合反應 (nucleic acid hybridization based detection techniques)、點雜配分析(dot-blot hybridization assay)、限制酵素輿圖多型性分析(restriction fragment length polymorphisms analysis)、DNA 聚合酵素連鎖反應增幅法(DNA polymerase chain reaction)、任意引子 DNA 聚合酵素連鎖反應增幅法(random amplified polymorphic DNA -RAPD)、去氧核醣核酸指紋分析法(DNA fingerprinting)等技術。近年來，由於爲使形態相近的不同菌株(種)，或同種不同亞種及生理小種的菌株能夠提供便利的鑑別技術，於是利用粒線體核酸之多複本(high copy number)特性與不同菌株間皆會有特殊的差異加以應用核酸限制酵素切割片段多型性(RFLP)分析種間及種內差異性及菌株之間粒線體核酸多型性及變異性，更進一步由粒線體核酸選殖技術篩選出與田間菌株皆可產生交互作用的專一性核酸探針，以期能應用在田間病害之偵測。目前在菌株(種)快速鑑別與類緣關係的研究探討上，以任意引子 DNA 聚合酵素連鎖反應技術(RAPD)及 DNA 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction，PCR) 爲快速靈敏且可大量應用於實際偵測診斷應用上。目前爲止，新技術之應用使植物病原眞菌之偵測、診斷與鑑定進入了新里程碑，其實際應用層面及輔助分類鑑定診斷與偵測將是另一值得開發的新科技。

關鍵詞：生物技術、植物病原眞菌、偵測、診斷。

前 言

早期有相當多學者利用蛋白質電泳圖譜，同功異構酵素分析，進行植物病原眞菌菌系系統(phylogenetic)之間的親緣關係的探討。但由於眞核生物DNA核酸序列中具有許多introns，經轉錄後並不能表現於mRNA上；即不能形成特定或重要蛋白質產物，因此藉由蛋白質產物分析菌系關係上較形困難。近年來，由於近代生物技術(modern biotechnology)的進步，所以技術被廣泛應用在植物病原眞菌之偵測、診斷與鑑定，而使植物病原眞菌之分類與偵測、檢定更具客觀性。

隨著全世界農產品貿易自由化的潮流影響，農產品的輸出入等將益形增加複雜化。因此，植

物檢疫與植物防疫將是未來植物保護的工作重點之一，而植物病原眞菌之偵測、鑑定與診斷技術即將是植物檢疫與植物防疫的工作中極爲重要的一環。如此一來，可以少用農用化學品將使產量、品質等損失減少而達到良好之植物保護。也由於快速偵測診斷生物技術的發展使植物育種學家可快速在植物體內確定或操作重要基因，而植物病理學家也可以利用新的偵測診斷技術發現植物病原菌在植物組織內的存在及感染位置，而更能快速、精確與敏感的偵測，以利病原微生物與植物組織間之關係的瞭解，進一步更可以瞭解病原性基因的起源及其調控。

1987年在歐洲召開有關於血清技術(單株抗體)及DNA探針技術知識與經驗的會議，接著，1990年在蘇格蘭，共同集結專家學者進行快速偵測技術研討會議。由於這二次會議，加速近代生物技術在植物病原微生物快速偵測的腳步。目前，近代生物技術利用於植物病源眞菌偵測診斷技術者包括免疫血清技術與核酸技術。免疫血清技術研究過程中，目前須進一步克服其廣泛使用性、適用性與操作性的瓶頸。如何取得較專一性的融合瘤技術乃是較具重要的研究開發重點。

核酸偵測技術的發展日新月異，其中包括核酸探針的製作及以偵測診斷爲主之核酸探針雜合反應、點漬雜配分析、限制酵素切割片段輿圖分析、DNA聚合酵素連鎖反應增幅法、任意引子DNA 聚合酵素連鎖反應增幅法、去氧核醣核酸指紋分析法等技術。而這些技術已廣泛應用於植物病原眞菌致病基因、相同菌株(種)內不同生理小種的鑑定以及田間實際病害偵測等方面之應用。近來由於PCR技術的進步，目前在菌株(種)快速鑑別與親緣關係的研究探討上，以任意引子DNA聚合酵素連鎖反應技術(RAPD)及DNA聚合酵素連鎖反應(PCR)爲快速靈敏且可大量應用於實際偵測診斷應用上，隨著生物科技的進步，快速偵測技術將會有成功的一日。本文將以免疫技術、核酸技術分別介紹其在植物病原眞菌偵測、診斷與應用可行性之探討。

血清技術在植物病原眞菌偵測及診斷之應用

利用血清技術進行植物體內外之病原眞菌偵測

在自然界中，有相當多的重要植物病原眞菌性病害，尤其是危害莖部之土傳性病害，在診斷上頗爲困難。但如果早期傳染時便能診斷出來，則對病害防治具有相當大的幫助。如果能發展出快速診斷技術將可減少作物損失及不必要之藥劑噴灑。一般而言，免疫血清技術具有快速、敏感及專一性高的特性，可偵測由植物病原眞菌所造成的病害，也同時依研究目的，如植物病原眞菌流行病偵測之研究、及植物病原眞菌定性定量研究、診斷鑑定等。

但利用血清診斷技術以及單株抗體技術 (MAbs) 偵測感染植物之病原眞菌專一性所需時間較長。相反的，利用上述技術偵測植物病毒卻是較爲進步且快速，其主要原因之一；因大部分病原眞菌可以利用光學顯微鏡檢查其菌絲構造或有性與無性器官，因此可以用此來鑑別眞菌。第二個理由乃因植物病原眞菌生活史複雜、有性無性生殖器官繁多，其免疫診斷技術研發過程中較難獲得專一性抗血清。如由眞菌胞子或菌絲片段、培養過濾液、可溶性抽出液所製備之抗血清，當利用於免疫擴散法偵測可得到較具專一性結果，但如果用免疫螢光技術 (IF) 偵測或酵素連結免疫吸附測定分析法(ELISA)可能會得到較不具專一性之結果[9,10]。像此類之抗血清可廣泛分析相關屬種與寄主分子發生交互反應[9,10,26]。Barker & Pitt (1988) 從受炭疽病菌(*Collectotrichum* spp.)感染秋海棠球莖中製備出對炭疽病菌具專一性之多株抗體抗血清，後來又有許多學者一直期待增加其專一性，但是其反應力價反而降低[6]。有一些研究者企圖稀釋非專一性抗體，或者利用血清白

牛白(bovine serum albumin (BSA))中止一些非專一性反應，如此一來以競爭型偵測交互反應即可減少許多問題[33]。但是如果以同科、同屬、同種等生理小種或菌株所獲得之多株抗體或濃縮的抗血清去進行免疫擴散(immunodiffusion)、免疫電泳(immunoelectrophresis)或免疫點漬法(electroblot immunoassay)常導致失敗[9,10,15]。

目前偵測診斷用之單株抗體(monoclonal antibodies)研發進展

一般而言，要獲得眞菌專一性之單株抗體，須藉由融合瘤技術[34]。係利用融合瘤細胞培養技術進行具專一性抗體之骨髓瘤細胞與 lymphocytes 結合，因此如果要從眞菌培養過程中之過濾液來獲得單專一性之單株抗體是一件非常困難的事。截至目前爲止，僅有部分從感染植物之眞菌獲得單株抗體的例子成功，Ianelli 等人擬以單株抗體(MAbs)區分 *Fusarium oxysporum* 的 form species (f. sp) 爲第一個研究單株抗體應用於植物病原眞菌偵測診斷之例子[28]。Banowetz 等人利用單株抗體技術只能偵測小麥的 wheat bunt fungi 中的二個種(species)的冬孢子。以診斷植物病原眞菌爲目的之單株抗體 (MAbs) 的製備是有相當程度的困難性，但在區別或診斷 *Phytophthora cinnamomi*[26]，*Phytophthora megasperma* var. *glycinea*[59] 及 *Pythium aphanidermatum*[18] 開發種與種之間或種專一性之單株抗體，已很清楚指出其間尙有極大發展潛力。但是由 Hardhaw *et al.*, 及Estrada-Garcia 等人所獲得之單株抗體僅能以 *Pythium* 及 *Phytophthora* 屬所產生之游走子(zoospores)進行測試，而以感染之植物或土壤進行偵測則比較有效[19]。Wong 等人利用免疫螢光技術(IF)成功進行香蕉萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) 之具厚壁厚膜胞子 race 4 及 race 1分析[59]，Deway 等人製作出荷蘭榆樹病(Dutch elm disease) 菌 *Ophiostoma* (*Ceratocystis*) *ulmi* 及 穀物之眼點病(the eye-spot) 菌 *Pseudocercosporella* 及水稻儲藏之穀粒惡化病原眞菌 *Hamicola lanuginosa* 及 *Penicillium islandicum* 等竿株抗體，因此其潛力無窮[18,19]。

核酸技術在植物病原菌偵測及診斷上之應用

近年來，由於生物技術(biotechnology)的進步，於是很多專家學者開始嘗試使用細胞遺傳(cytogenetic)，生化層次(biochemical)及其他的分子特性，於眞菌偵測、診斷與分類研究上，而使眞菌偵測、診斷、分類更具客觀性。若從 DNA上著手研究菌系系統之間的關係，則會有較完整的序列存在。一般來說，眞菌的粒腺體核酸 (mtDNA)分子量較小，較易作爲研究樣本以便進一步分析並了解其特性。

眞菌粒腺體核酸的特性：

眞菌的粒腺體核酸 (mtDNA)除了少數爲直線形外 (slime mold, *Physarum ephalpolycum, Hansenula mrakii*)，大都爲雙螺旋環狀分子。其粒腺體核酸的分子量大小大約從18.9 kbp (*Torulopsis glabrata*) 到176kbp (*Agaricus bitorquis*)。所以，其眞菌粒腺體核酸分子量大小的差異可運用在偵測、診斷與分類上，如 *Schizophyllum* spp.[50,51]. *Ustilago* spp.[56]. Oomycetes [33]. *Coprinus* spp.[55] 菌之粒線體核酸之研究。Schildkraut 等人發現細菌、眞菌、動物及噬菌體的DNA與CsCl成線性函數之特定比例存在，隨即Villa和Storck 藉由14種眞菌之研究發現：nuclear DNA (nDNA)與 mitochondria DNA(mtDNA)在氯化銫梯度密度(CsCl density gradient) 達一定平衡時，可將之個別分離出來，而且粒腺體核酸在其全核酸(total DNA)中所佔的量非常少，一般而言，其粒腺體核酸

的G+C含量百分比會低於染色體核酸,或有些的粒腺體核酸之G+C含量百分比會接近於染色體核酸，依此特性，所以可在含有螢光染劑 4,-6-diamidine-2-phenylindole(DAPI) 或 bisbenzimide 之情況下，以氯化銫梯度離心將粒腺體，從全量核酸中分離而得[20,43]。並且，由於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，再加上粒腺體核酸分子量較小，比較能夠做詳細解析，所以一般上來說，粒腺體核酸更適合於分子演化上的研究[53]。

眞菌粒腺體核酸探針之選殖與應用：

目前，藉著基因選殖的發展與進步，可自病原菌之基因體中選殖出具有特異性之核酸片段，以應用於植物病原菌上之鑑定與偵測，更進一步應用於病害之診斷。而粒腺體核酸探針製備乃是先將粒腺體核酸與適當的載體(vector)，經內限制酵素(restriction enzyme)消化後，再經由黏結酵素(ligase)進行黏結反應(ligation)，並轉形(transform)至容易增殖且方便篩選之菌株中，最後即可由獲得之轉形株(transformants)中篩選出攜帶有核酸片段之轉形株，並分離出崁入之核酸片段(insert)，再加以標識 (labeling)成爲探針(probe)。由於核酸探針具有較穩定的偵測特性，且較血清探針擁有更精確而穩定的效果[39,41]，所以近年來核酸探針已被廣泛的應用在生物科學的領域上。而在植物病理學的研究上，基因選殖技術及核酸探針之研製也已廣泛地應用在致病基因的探討[40,49]，相近菌種及菌種內不同生理小種的鑑別[46]，如：*Sclerotinia* spp.[35]、*Fusarium* spp.[36]、*Fusarium melonis*[23]、*Peronosclerospora sacchari*[60]、*Gaeumannomyces graminis*[61]、*Verticillium dahliae*[44]，以及田間實際病害之偵測等方面[41]。而近來，由於爲了在形態相近的不同菌種、或同種不同亞種及生理小種的菌株，能夠提供便利的鑑別技術。於是利用粒腺體核酸爲多複本(high copy number)之核酸分子特性[8]與不同菌株間核酸序列中皆會有特殊的差異[39]，加以應用於核酸限制酵素輿圖多型性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)分析種間及種內之差異性[36]及菌株之間粒腺體核酸的多型性及變異性[7]，更進一步由粒腺體核酸選殖之技術，篩選出與屬內菌種皆可產生交互作用的專一性探針，以期能應用在田間病害之偵測[41,46]。例如Martin 和Kistler 研究*Pythium* spp. 粒腺體核酸之RFLPs，發現有些菌株種內之相似度在80% 以上，而菌株種間之相似度大多小於30% ，所以可以了解各菌種內的粒腺體核酸之傳承應相當穩定[38]；Martin 以*Pythium oligandrum* 粒腺體核酸經確認某一特異性之核酸片段後，將其作爲核酸探針，以區分*Pythium oligandrum* 及*Pythium sylvaticum*[37]；Chen等人研究*Pythium* spp. 種間之核糖體核酸的限制片段圖譜，發現種間大致上都相似，相對地，在其粒腺體核酸限制輿圖圖譜的相似度卻只有20% 。Stammler等人研究*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*，運用粒腺體核酸基因選殖之際述及探針之研製，得到一個1.5kb的粒腺體核酸探針，配合RFLPs的方法，將可區分*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* 及*Phytophthora fragariae* var. *rubi*，且將此探針與其他*Phytophthora* spp. 菌種進行核酸雜合反應，結果顯示同種內的菌株會呈現相似的圖譜，相對地，其種間的差異性則較大[52]。Goodwin等人亦針對*Phytophthora parasitica* 之粒腺體核酸，選殖出具有高度專一性之核酸探針，並加以嘗試偵測土壤及感病植株中之病原菌[22]。Kistler等人研究由 *Fusarium oxysporum* 粒腺體核酸限制酵素片段圖譜，發現小種之間具有地域性的分岐現象[31]。Kim等人分析*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 粒腺體核酸之RFLPs，並選殖七段粒腺體核酸片段，進行混合探針與菌株之核酸雜合反應，並將此病原菌可區分爲六個RFLP群，此些群之間的相似性最高爲90%，最低爲65%[29]。此外，Kim等人又以相同的混合探針，針對*Fusarium*

*oxysporum*的五個亞種(formae speciales)之粒腺體核酸多型性分析研究，發現各亞種所呈現的圖譜不只一種，且有些亞種之間的相似性高於亞種之內的相似性[30]。所以，可將此病原菌各菌系之間作成系統樹，可作爲亞種之間演化上的一種依據。此外，重要病原眞菌中利用RFLP技術做菌系判別及類緣關係探討成功的例子尙有*Leptosphaeria korrae*[55]、*Armillaria mellea*[4]、*Sclerotinia* spp.[35]、*Fusarium* spp.[32]、*Phytophthora* spp.[19,22,33,46]。目前在菌種快速鑑別與類緣關係的研究探討上，另一快速且可應用於大量材料的技術是：Random amplified polymorphic DNA (RAPD)[56,57]及聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction；PCR)[47]。PCR是應用在少量的DNA上，且必需要有特定的寡核甘酸引子(oligonucleotide primers) 才能增幅 (amplify) 少量的DNA，而RAPD則是應用在隨意利用一個小且短、任意設計的引子(arbitrarily-designed primer)達到增量少量的DNA，所以RAPD又稱爲Arbitrarily primed- PCR(AP- PCR)。此兩種方法皆具靈敏性，且可快速運用在大量的材料上。如：Punja 等人利用幾個常用增幅粒腺體DNA9(mtDNA)及核DNA(nuclearDNA)的引子，使用在*Sclerotium rolfsii*的全DNA上，利用12種不同的限制酵素分析PCR產物，再篩選出能夠有效區別不同寄主、地區及菌絲親合性群的有效引子，以進一步分析[27]。Quellet及Seifert 等人針對 *Fusarium graminearum* 菌株利用RAPD分析篩選出具有特異性且能應用於鑑別的片段，再利用解序(sequencing) 此具專一性的片段之後，以PCR 增量，使能運用在田間快速鑑別此病原菌之存在。Assigbetse等人以*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*篩選出具致病性之RAPD markers，以期能鑑定此病原菌的病原性族群 (pathogenicity group) 及分類。此外，尙有一些利用此技術成功的例子，如應用在*Fusarium solani*[24]、*Colletotrichum graminicola*[25]、*Leptosphaeria maculans*[21]、*Gaeumannomyces graminis*[60]、*Neurospora crassa*[57] 等菌系之分類。所以目前爲止，針對植物病原眞菌的分類與鑑定上，此技術衍然已成爲一種新興且普遍的方法。爲了達到對病原菌做快速的偵測(detection)及診斷(diagnosis)的目的，製備菌株專一性的核酸探針配合點漬試驗(dot-blot assay)應爲較理想的方法。Sauer, K. M., 等人由*Ophiosphaerella herpotricha*的基因庫篩選到一個1.5kb的探針，利用點漬法測試29個*O. herpotricha*菌株和其他三十株眞菌及細菌的核酸與此核酸探針的反應，結果顯示此探針會很專一的與*O. herpotricha*菌株產生明顯的反應，此外將此核酸探針配合點漬法，可由200mg的染病植株根部萃取的核酸中偵測病原菌的存在，以點漬法測出此核酸探針(^{32}P 標識)的靈敏度可達到10pg核酸量，相當於1 μg 冷凍乾燥菌絲所具有的核酸量。由於點漬試驗法一次可篩檢許多樣本，將此法應用於病原菌的偵測實爲經濟、快速、且簡便的方法[48]。

本實驗室研究以白絹病菌粒腺體DNA進行數次轉型實驗，後篩選出重組質體804002-69、804002-14、804002-96、804002-28、804021-43、804021-67、804021-53、804021-29 和*Sclerotium rolfsii*、*Sclerotinia sclerotiorum*及*Rhizoctonia solani*之全量DNA進行點雜配(dot hybridization)反應。根據實驗結果比較分析，以探針804021-53 較具專一性。再以探針804021-53進行南方雜合實驗，白絹病菌菌株之總量核酸呈現相似的圖譜。由於粒腺體核酸探針能應用核酸分子特性[8]與不同菌株間核酸序列中皆會有特殊的差異，加以應用於核酸限制酵素切割片段多型性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)分析種間及種內之差異性[39]及菌株之間粒腺體核酸的多型性及變異性[7]，篩選出與屬內菌種皆可產生交互作用的專一性探針，以期能有效地應用在田間病害之偵測上。所以未來的研究方向，將著重於RFLP分析種間及種內之差異性，對白絹病菌分類上亦有所貢獻。利用探針804021-53以點雜配法進行探針品質評估時，可有效偵測到菌株804027全

DNA濃度至10^{-6} μg，偵測探針804021-53粒腺體核酸片段時有效濃度爲10^{-7} μg。探針804021-53進行組織漬染偵測帶菌球莖，以點雜配法進行百合種球(白雪內、外鱗片，白狐貍內、外鱗片以及白雪、白狐貍種球外土壤萃取液)以點雜配法進行組織敏感性測定時，偵測有效濃度各爲10^{-5} μg、10^{-6} μg、10^{-6} μg、10^{-7} μg、10^{-7} μg、10^{-7} μg。由此可知，菌核在球莖鱗片上殘存之處(內鱗片及外鱗片中)皆有可能存在(1)。參考以上的研究，希望由粒腺體核酸選殖出具有專一性的探針，

表一、從感染植物之病原眞菌獲得之單株抗體

Table 1. Monoclonal antibodies raised against plant-invading fungi (Dewey, 1992)

Fungus	Nature	Immunogen (amount per injection)	Freund's adjuvan	Route early	Booster	Screening method	specificity	MAb class	Reference
Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici*	Spores	107	+	i.p.	i.p.	ELISA-spores	Genus	NGl	Ianelli *et al.* (1983)
Tilletia sp.	Spores Spore extracts	3 mg	-	i.p.	i.v.	ELISA-spores	NSG	IgM	Banowetz *et al.* (1984)
Phytophthora cinnamomi	Zoospores	2x107	-	i.p.	i.p.	IF-zoospores	NSG	NG	Hardhan *et al.* (1986)
Sirococcus strobilinus	Hyphal fragments	1 mg	+	i.p.	i.v.	ELSIA-sol. Ag NS Genus	IgM，IgG	Mitchell & Sutherland (1986)	
Glomus occultum	Spore	50000	-	i.p.	i.p.	ELISA-spores	Species	IgG	Wright *et al.* (1987)
Phytophthora megasperma f. sp. *glycinea*	Culture filtrate	0.15 mg protein	+	i.p.	NG	ELISA-sol.Ag Western blot	NSG	IgM,IgG,IgA	Wycoff *et al.* (1987)
Fusarium oxysporum f.sp.*cubense*	Conidia Hyphal fragments	8x07 40 mg	-			IF	NSG Race specific	IgM	Wong *et al.* (1988)
Armillaria mellea	Hyphal fragments	NG	+/-	i.p.	NG	ELISA-hyphal fragments	NSG	ND	Fox & Hahne (1989)
Ophiostoma ulmi	Hyphal fragments	3 mg	+	i.p.	i.v.	ELISA-sol.Ag	Species & genus	IgG，IgM	Dewey *et al.* (1989a)
Humicola lanuginosa	SW	150 mg protein	-	i.p.	i.p.	ELISA-SW	Genus*	IgM	Dewey *et al.* (1989b)
Penicillium islandicum	SW	500 mg protein	-	i.p.	i.p.	ELISA-SW	Species	IgG	Dewey *et al.* (1990)
Pythium	Zoospores	NG	NG	NG	NG	IF-zoospores	Zoospores & cysts,genus & species	NG	Callow *et al.* (1987) Estrada-Garcia *et al.* (1989)

將來能應用在田間病株之篩選，或由球根花卉上球莖鱗片中篩選出白絹病菌菌核殘存的位置，證明白絹病菌菌核是否會殘存於球根上，造成進口球根污染本土之栽培區。此專一性之探針亦可應用RFLP於白絹病菌菌株之分類與鑑定上，或與具有產生菌核的病原菌間之類源探討；進一步更可延伸於白絹病菌致病基因之研究上。

另外，本實驗室亦用限制酵素剪切露疫菌 PL024 菌株粒線體核酸，以 pUC18 載體黏合插入片段進行基因庫選殖，選殖到 4 個選殖株 A2-3、HC3、HC9及ES6。分別將其製備爲核酸探針再與 25 株露疫菌粒線體核酸以點漬測試進行雜合反應，結果都有雜合交互作用。另再利用 17 株 *Phytophthora* 菌株及 *Pythium splendens* 的全量核酸進行雜合反應，結果顯示 ES6 探針對露疫菌較具有專一性。另外這四個探針與 16 株 *Pythium* 菌株之總量核酸(total DNA)進行點漬分析，測試核酸探針的專一性，結果四個探針對這 16 株腐霉菌都有不同程度的訊號產生。經點漬測試，ES6 探針的靈敏度可測到 100 fg 濃度的露疫菌粒線體核酸[3]。除此之外，染色體外基因之利用亦是一重要研究課題，如眞菌質體狀去氧核醣核酸(plasmid-like DNAs)亦是獨立遺傳系統。因此其具有良好之遺傳穩定性。由本實驗室研究採集發現立枯絲核菌相同菌絲融合群間之菌株其質體狀DNA (plasmid-like DNAs) 具有相當高之同源性(homology)[2,11,12,13,14]。開發選殖質體狀DNA (plasmid-like DNAs) 爲某些病原眞菌之偵測診斷用核酸探針是可行之點。由於近代生物技術的進步，很多植物病原眞菌之生活史、生態特性、遺傳特性慢慢被瞭解後，除將可加速植物病原性眞菌致病基因的探討外，更可幫助眾人進行快速生態偵測及診斷檢疫等利用，實爲未來重要研究方向與課題。

參考文獻

1. 余瑞卿。1995。白絹病菌生理特性及其核酸探針製備與分析。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文，台中，96 頁。
2. 廖家德。1994。台灣立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn) 第四融合群菌株質體狀去氧核醣核酸的歧異性及其核酸定序。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文，台中，63 頁。
3. 賴學珍。1995。露疫菌粒線體核酸探針的選殖與分析。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文，台中，73 頁。
4. Anderson, J. B., Petsche, D. M., and Smith, M. L. 1987. Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea.* Mycologia. 79:69-76.
5. Banowetz G. M., Trione E. J., and Smith J. M. B. 1984. Immunological comparisons of teliospores of two wheat bunt fungi, Tilletia species using momoclonal antibodies and antisera. Mycologia 76: 51-62
6. Barker, I., and Pitt, D. 1988. Detection of the leaf curl pathogen of anemones in corms by enzymeimmunosorbent assay (ELISA). Plant Pathology 37; 417-22.
7. Beckmann, J.S., and Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement methodologies, mapping and cost. Theor. Appl. Genet. 67:35-43.
8. Bruns, T. D., Palmer, J. D., Shumard, D. S., Grossman, L. I., and Hudspeth, M. E. S. 1988. Mitochondrial DNAs of *Suillus* : three fold size change in molecules that share a common gene order. Curr. Genet. 13:49-56.

9. Chard, J. M., Gray, T. R. G., and Frankland, J. C. 1985a. Purification of an antigen characterisitic for *Mycena galopus.* Trans. Brit. mycol. Soc. 84:463-466.
10. Chard, J. M., Gray, T. R. G., and Frankland, J. C. 1985b. Use of an anti-Mycena galopus serum as an immunofluorescent reagent. Trans. Brit. mycol. Soc. 84: 235-241.
11. Chen, L. C., Miyasaka, A., Miyashita, S., Ehara, Y., and Hashiba, T. 1992. Genetic relatedness of plasmid-like DNA in isolates from anastomosis group 4 of *Rhizoctonia sola*ni. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 58: 286-291.
12. Chen, L. C., and Liao, J. T. 1993. Comparative studies on plasmid-like DNAs from some important crops in Taiwan. 6th International Congress of Plant Pathology P.156 (abstract)
13. Chen, L. C., and Liao, J. T. 1994. Studies on the presence of plasmid- like DNAs among *Rhizoctonia* spp. isolated from some important crops in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 3:316-323.
14. Dewey, F. M., and Brasier, C. M. 1988. Development of ELISA for *Ophiostoma ulmi* using antigen coated wells. Plant Pathology 37: 28- 35.
15. Dewey, F. M., Munday, C. J., and Brasier, C. M. 1989a. Monoclonal antibodies to specifie components of the Dutch Elm Disease pathogen *Ophiosioma ulm.* Plant Pathology 38: 9-20.
16. Dewey, F. M., MacDonald, M. M., and Pillips, S. I. 1989b. Development of monoclonal antibody -ELISA, -dot-blot and -dip-stick immunnoassays for *Humicola lanuginosa* in rice. J. Gen. Microbiol. ?135: 361- 374.
17. Dewey, F. M., MacDonald, M. M., Pillips, S. I., and Priestley. 1990. Development of monoclonal antibody-ELISA and -dip-stick immunnoassays for *Penicillium islandicum* in rice grains. J. Gen., Microbio. 136: 753-760.
18. Estrada-Garcia, M. T., Green, J. R., Booth, J. M., White, G., and Callow, J. A. 1989. Monoclonal antibodies to cell surface components of zoospores and cysts of the fungus *Pythium aphanidermatum* reveal species-specific antigens. Exp. Mycolo. 13:348-356.
19. Forster, H., Kinscherf, T. G., Leony, S. A., and Maxwell, D. P. 1989. Restricction fragment length polymorphisms of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soybean, alfalfa and fruit trees. Can. J. Bot. 67:529-537.
20. Garber, R. C., and Yoder, O. C. 1983. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondria, ribosomal, and plasmid components. Anal. Biochem. 135:416-422
21. Goodwin, P. H., and Annis, S. L. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2482-2486.
22. Goodwin, P. H., Kirkapatrick, B. C., and Duniway, J. M. 1989. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica.* Phytopathology 79:716-721.
23. Gordon, W\T. R., and Okamoto, D. 1992. Variation in mitochondrial DNA as an indicator of relationships between populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis.* Mycol. Res. 94:734-744.
24. Growhuret, R. N., Hawthorne, B.T., Rikkerink, E. H. A., and Templeton, M. D. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f.sp. *curcurbitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic DNA.

Curr. Genet. 20:391-396.

25. Guthrie, P. A. I., Magill, C. W., Frederiksen, R. A., and Odvody, G. N. 1992. Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Collectotrichum graminicola.* Phytopathology 82:832-835.
26. Hardham, A. R., Suzaki, E., and Perkin, J. L. 1986. Monoclonal antibodies to isolate-species and genus-specific components on the surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi.* Can. J. Bot. 64:311-21.
27. Harlton, C. E., Levesque, C. A., and Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium* (Athelia) *rolfsii* and related species. Phytopathology. 85:1269-1281.
28. Ianelli, D., Caparelli, R., Mariziano, F., Scala, F., and Noviello, C. 1983. Production of hybridoma secreting monoclonal antibodies to the genus *Fusarium.* Mycotaxon 17:523-532.
29. Kim, D. H., Martin, R. D., and Magill, C. W. 1992. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum.* Phytopathology 82:346- 356.
30. Kim, D. H., Martin, R. D., and Magill, C. W. 1993. Mitochondrial DNA (mt DNA) relatedness among formae speciales of *Fusarium oxysporum* in the curcurbitaceae. Phytopathology 83:91-97.
31. Kistler, H.C., Bosland, P.W., Benny, U., Leong, S., and Williams, P. H. 1987. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from cruwfers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. Phytopathology 77:1289-1293.
32. Kitagawa, T., Sakamoto, Y., Furumi, K., and Ogwra, H. 1983. Novel enzyme immunoassays for specific detection of various *Fusarium* species. Phytopathology 79:162-165.
33. Klassen, G. R., McNabb, S. A., and Dick, M. W. 1987. Comparison of physical maps of ribosomal DNA repeating units in *Pythium, Phytophthora* and *Apodachlya.* J. Gen. Microbiol. 133:2953-2959.
34. Kohler, g., and Milstein, C. 1975. Countinous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:595-597.
35. Kohn, L. M., Petsche, D. M., Bailey, S. R., Novak, L. A., and Anderson, J. B. 1988. Restriction fragment length polymorphosms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. Phytopathology 78: 1047-1051.
36. Manicom, B. O., Bar-Joseph, M., Rosmer, A., Vigodsky-Hass, H., and Kotze, J. M. 1987. Potential application of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria.* Phytopathology. 77:669-672.
37. Martin, F. N. 1991. Selection of DNA probes for isolate identification of two *Pythium* spp. Phytopathology 81:742:746.
38. Martin, F. N., and Kistler, H. C. 1990. Species specific banding patterns of restriction endonuclease digested mitochondrial DNA from the genus *Pythium.* Exp. Mycol. 14:32-46.
39. Michelmore, R. W., and Hulbert, S. H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 25:383-404.

40. Michelmore, R. W., Kesseli, R. V., Francis, D. M., Fortin, M. G., Paran, I., and Yang, C. H. 1992. Strategies for cloning plant disease resistance genes. Molecular Plant Pathology: a practical approach. 2:234-288. (Gurr, S. J., Mepherson, M. J. and Bowles, D. J.)
41. Miller, S. A., and Mastin, R. R. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 26:967-970.
42. Miyasaka, A., Chen, L. C., and Hashiba, T. 1990. Detection and properties of plasmid-like DNA in isolates from nine anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani.* J. Gen. Microbiol. ?136: 1791-1798.
43. Muller, W., and Gautier, F. 1975. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids (A-T- specific non-intercalacting DNA ligands). Eur. J. Biochem. 54:385-394.
44. Okoli, C. A. N., Carder, J. H., and Barbara, D. J. 1993. Molecular variation and sub-specific groupings within *Verticillium dahliae.* Mycol. Res. 97:233-239.
45. Panabieres, F., Marais, A., Trentin, F., Bonnet, P., and Ricci, P. 1989. Repetitive DNA polymorphisms analysis as a tool for identifying *Phytophthora.* Phytopathology 79:1105-1109.
46. Prenger, J., and Martin, F. N. 1993. Mapping and crosshybridization of mitochondrial DNA from several species of *Pythium.* Phytopathology 83:1423 (abstract).
47. 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 amplication of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.
48. Sauer, K. M., Hulbert, S. H., and Tisserat, N. A. 1993. Identification of *Ophiospaerella herpotricha* by cloned DNA probes. Phytopathology 83:97-102.
49. Sock, J., Rohringer, R., and Kolmer, J. A. 1994. Mitochondrial DNA of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae:* Molecular cloning, restriction map and copy number. Phytopathology 84:49-55.
50. Specht, C. A., Novotny, C. P., and Ullrich, R. C. 1983. Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the basidiomycetes *Schizophyllum commune.* Exp. Mycol. 7:336-343
51. Specht, C. A., Novotny, C. P., and Ullrich, R. C. 1992. Mitochondrial DNA of *Schizophyllum commune* restriction map, genetic map and model of in heritance. Curr. Genet. 22:129-134.
52. Stammler, G., Seemuller, E., and Duncan, J. M. 1993. Analysis of RFLPs in nuclear and mitochondrial DNA and the taxomy of *Phytophthora fragariae.* Mycol. Res. 97:150-156.
53. Taylor, J. W. 1986. Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. Exp. Mycol. 10:259-269.
54. Tisserate, N. A., Hulbert, S. H., and Nus, A. 1991. Identification of *Leptosphaeria korrae* by cloned DNA probes. Phytopathology 81:917- 921.
55. Weber, C. A., Hudspeth, M. E. S., Moone, G. P., and Grossman, L. I. 1986. Analysis of the mitochondrial and nuclear genomes of two basidiomycetes, *Coprinus violacea* and *Coprinus stercorarius.* Curr. Genet. 10:515-525.
56. Welsh, J., and McCelelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.
57. Williams, J. G. K., 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: 6531-6535.

58. Wong, W. C., White, M., and Wright, I. G. 1988. Production of monoclonal antibodies to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4. Letters in Applied Microbiology 6:39-42.
59. Wycoff, K. L., Jellison, J., and Ayers, A. R. 1987. Monoclonal antibodies to glyco-protein antigens of a fungal plant pathogen, *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea.* Plant Physiology 85:508-515.
60. Yao, C.L., Magill, C.W., Frederisksen, R. A., Bonde, M. R., Wang, Y., and Wu, P. S. 1991. Detection and identification of *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* and *G. graminis* var. *avenae* using a DNA probe and non-molecular methods. Mycol. Res. 96:737- 742.

Application of modern biotechnology on the detection and diagnosis of plant pathogenic fungi

L. C. Chen, R. C. Yu, S. C. Lai and J. H. Wong
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Abstract

Plant quarantine Plays an important role in the development of plant protection. Detection and diagnosis of plant pathogenic fungi is one of the major work of plant quarantine. Immunological techniques and nucleic acid techniques have been remarkable progress in the development of new techniques for detection and diagnosis of plant pathogenic fungi. Immunological techniques include polyclonal and monoclonal antibodies as reagents, enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence and immunogold labeling, and nucleic acid techniques include nucleic acid hybridization based detection techniques, dot-blot hybridization assay, restriction fragment length polymorphisms analysis, DNA polymerase chain reaction, random amplified, DNA-RAPP, DNA fingerprinting. The last 5-10 years have been remarkable progress in the development of new techniques for convenient identification of different isolates of similar morphology and physiological races, by using polymorphisms and variation of mitochondrial DNA, and further cloning of specific DNA probes for the detection and diagnosis of plant pathogenic fungi. At present, random amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction are the most speedy and sensitive methods for practical application on the detection and diagnosis of plantpathogenic fungi. Since now, new biotechnology have been progress for the detection and diagnosis, and further development of new technology for the identification, diagnosis and detection of plant pathogenic fungi.

Key words: Biotechniques, detection, diagnosis, plant pathogenic fungi.