Plant Pathology Bulletin 16: 193-202, 2007

褐根病菌 *Phellinus noxius* 檢測用專一性引子對之開發

蔡志濃[1,2]　謝文瑞[1]　安寶貞[2,3]　楊淨棉[2]

[1] 台中市 國立中興大學 植物病理系

[2] 台中縣 行政院農業委員會農業試驗所

[3] 聯絡作者：電子郵件：pjann@wufeng.tari.gov.tw，傳眞：+886-4-23338162

接受日期：中華民國 96 年 12 月 14 日

摘　要

蔡志濃、謝文瑞、安寶貞、楊淨棉. 2007. 褐根病菌 *Phellinus noxius* 檢測用專一性引子對之開發. 植病會刊 16: 193-202.

以分離培養之 *Phellinus noxius*、*Phellinus aplahynus*、*Phellinus gilvus*、*Phellinus laevlgatus*、*Phellinus hoehnelii*、*Phellinus igniarius*、*Phellinus lnermis*、*Phellinus mombranaceus*、*Kretzchmaria* spp.、*Ganoderma australe*、*Ganoderma tropicum*、*Rosellinia necatrix*、*Phytophthora paracitica* 及 *Sclerotium rolfsii* 等菌株的 genomic DNA，應用聚合酵素連鎖反應技術 (polymerase chain reaction, PCR)，以通用性引子對 ITS1/ITS4 增幅核醣體核酸 (ribosomal DNA, rDNA) 之內轉錄區間 ITS1/5.8S/ITS2 之基因序列，經解序及多重序列比對後，依據 *P. noxius* ITS 區域之相同序列處設計出專一性引子對，正向引子 PN-1F (5'-agtttgcgctcatccatctc-3')，反向引子 PN-2R (5'-agccgacttacgccagcag-3')。應用 PN-1F/PN-2R 專一性引子對進行 PCR 反應，對供試之 *P. noxius* 菌株均可增幅出 414 bp 或 422 bp 長度之序列片段；而供試之其它菌株，皆無法增幅出任何片段。此專一性引子對偵測 *P. noxius* 之 DNA 時，靈敏度可達 0.01 ng。以相同之引子對進行 PCR 反應，偵測罹病之龍眼樹及相思樹根部組織，亦可增幅出預期之片段。因此本研究所設計之引子對 PN-1F/PN-2R 能用來快速診斷褐根病與輔助鑑定 *P. noxius*。

關鍵詞：褐根病菌、引子對

緒　言

在台灣造成林木、木本觀賞植物及經濟果樹立枯死亡之病原菌，主要有褐根病菌 (*Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunningham)、白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*)[9]、靈芝病菌 (*Ganoderma* spp.)[2]、疫病菌 (*Phytophthora* spp.)[5]、白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii*)、炭角菌 (*Xylaria* spp.) 及 *Kretzchmaria clavus*[2] 等，其中以褐根病菌危害最爲嚴重，約佔 50% 以上，且寄主範圍廣泛，目前褐根病蔓延全台灣，寄主已超過 120 餘種。目前褐根病之診斷，主要是以病徵及組織分離病原菌來鑑定，尚無研究報告利用分子生物技術來鑑定此病原菌。由於利用分子生物技術來診斷病害能達到快速且正確診斷的目的，能在植株未發現病徵前先偵測出病原菌，且一次能檢測數量較多之樣品。因此本研究應用聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，由病原菌核醣體核酸序列 (ribosomal DNA, rDNA) 中包含內轉錄區間序列 (internal transcribed spacer, ITS) 之 ITS1、5.8S 及 ITS2 區域，篩選專一性之核酸片段，並設計出專一性引子對，在病菌感染植株病徵尚未明顯出現之前，偵測出病原菌，以便及早做好防治措施。

材料與方法

供試病原菌

供試菌株 (表一) 包括 *Phellinus noxius*、*Phellinus*

aplahynus、*Phellinus gilvus*、*Phellinus laevlgatus*、*Phellinus hoehnelii*、*Phellinus igniarius*、*Phellinus lnermis*、*Phellinus mombranaceus*、*Kretzchmaria* spp.、*Ganoderma australe*、*Ganoderma tropicum*、*Rosellinia necatrix*、*Phytophthora paracitica* 及 *Sclerotium rolfsii*，各菌株培養於馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g, H_2O 1 L, PDA) 上，再經切取單菌絲尖端 (single-hyphae tip) 或經單孢 (single-arthospore) 分離後培養於 PDA 供試。

褐根病菌Genomic DNA之萃取純化

供試菌株移植於馬鈴薯葡萄糖液體 (potato dextrose broth, PDB, Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) 培養基，於 28℃ 下無光照之培養箱中振盪 (100 rpm) 培養 5-7 天，將菌絲挑出，以無菌去離子水 ddH^2O 洗兩次，再以冷凍乾燥機 (EYELA FDU-506) 乾燥 24 小時後，保存於 -20℃ 下備用。以修正過之染色體 DNA 純化試劑組 (Genomic DNA Purification kit, Genemark Technology Co., Ltd) 操作流程抽取褐根病菌 DNA，並以光電比色計 (Opron-3000, UV/VIS Spectrophotometer) 測定 260 nm 波長之吸光值 (A_{260})，估算出每一樣品之 DNA 濃度 (ng/ μl)，將此 DNA 保存於 -20℃ 下備用。

修正後之 DNA 純化流程如後：取 20 mg 的乾燥菌絲放入研缽中，以液態氮急速冷凍研磨後，移入 1.5 ml 的微量離心管中。加入 360 μl 的萃取緩衝液 A (Extraction buffer A)，40 μl 的萃取緩衝液 B (Extraction buffer B)、和 4 μl 的 RNase A solution，震盪 10 秒鐘後置於 65℃ 乾浴槽內作用 15 分鐘。加入 130 μl 的 Precipitation solution，以上下反覆混合均勻，置於冰上冰浴 5 分鐘。離心 5 分鐘 (室溫，14000 rpm)。Spin filter 先與 collection tube 組合後，將離心後的上層液轉置於 Spin filter，離心 2 分鐘 (室溫，14000 rpm)。將下層液收集到新的 1.5 ml 的微量離心管中。加入 1.5 倍體積的結合液 (binding solution)，並將混合液以吸管混合均勻。將 spin column 置於 collection tube 上，取 650 μl 的混合液至 Spin column，離心 1 分鐘 (室溫，13000 rpm)，倒去離心後的濾液。將剩下的混合液重複上一步驟。加入 700 μl 清洗液 (wash solution) 後，離心 1 分鐘 (室溫，13000 rpm)。倒去濾液，重複鹽洗一次。倒去濾液後，再離心 3 分鐘 (室溫，14000 rpm)。將 Spin column 移到新的 1.5 ml 微量離心管，以 60℃ 乾浴 5 分鐘。取 100 μl 的 Elution solution (70℃ 預熱 10 分鐘) 加入 Spin column 中，靜置 2 分鐘，再離心 1 分鐘 (室溫，13000 rpm)，所得的 DNA 母液保存於 -20℃。

ITS核酸定序

聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)：將所分離保存之褐根病菌各菌株 DNA，增幅分析其rDNA內轉錄區間 (internal transcribed spacers)。利用通用性引子對 (universal primers) ITS1 (tccgtaggtgaacctgcgg) 及 ITS4 (tcctccgcttattgatatgc) 進行 PCR反應，增幅出含有 rDNA ITS1/5.8S/ITS2 之全長段片段，反應組成包括 0.2 μM 引子對、0.2 μg 模板 DNA (template DNA)、1 倍反應緩衝液、200 μM dNTP (Genemark Technology Co., Ltd, Taiwan)、1U ZyMTaq polymerase (Zymeset Biology, Taiwan)，加無菌去離子水 (ddH_2O) 使 PCR 反應總體積爲 25 μl。以 Perkin Elmer Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystem, USA) 進行 PCR 反應，其反應條件如下：94℃，3 分鐘 → 94℃，45 秒；50℃，45 秒；72℃，45 秒，共 35 個循環→ 72℃，7 分鐘，最後以 1.5% Agarose gel/0.5 X TBE 緩衝液進行核酸電泳分析，並以溴化乙烯 (ethidium bromide, EtBr) 染色觀察。

PCR 產物的選殖：取0.2 μg PCR產物，加入 50 ng pGEM-T Easy 載體 (Promega , Madison, WI, USA)， 1 倍 T4 DNA ligase buffer, 1 U T4 DNA ligase，於 16℃ 水浴中進行接合反應 12-16 小時。接著將接合反應後之產物與勝任細胞 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 均勻混和，並靜置冰上 30 分鐘，經由 42℃ 熱處理 90 秒，再放置冰上 5 分鐘，以進行細胞轉型作用 (transformation)。加入 900 μl TSB-G 培養液 (10 g LB (Luria-bertaini), 50 g PEG6000, 25 ml DMSO, 5 ml 1 M $MgSO_4$, 5 ml 1 M $MgCl_2$, 980 μl TSB, 20 μl 的 1 M Glucose) 於 37℃ 振盪培養 1 小時，再以 5000 rpm 離心 5 分鐘後，移去上層液，懸浮剩餘 100 μl 之菌液，均勻塗抹含 ampicillin (150 μg/ml) 及 X-gal (1.6 μg) 之 LB (Luria-bertaini) 平板培養基，於 37℃ 培養 12-16 小時，最後選取轉型成功之白色菌落培養至 LB 培養基，再以 ITS1/ITS4 引子對，配合 PCR 反應，確定條帶無誤，以供進一步測試之用。

質體 **DNA** 的萃取：*E. coli* 接種於含 ampicillin 150 μg/ml 之 LB 培養基，於 37℃ 振盪培養過夜。取 1.5 ml 菌液，於微量離心管中，以 5000 rpm 離心 5 分鐘後，倒去上清液，沉澱物加入 100 μl solution I (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM glucose)，劇烈振盪，將沉澱完全打散。慢慢加入 200 μl solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)，蓋上管蓋後將管子反覆上下搖動。將離心管置冰浴中，加入 150 μl solution III (3 M potassium phosphate, 11.5% glacial acetic acid)，混合均勻，但不可劇烈振盪，放置冰浴中

表一、本研究使用之供試菌株

Table1. Fungal isolates used in this study

Species	Host	Isolate
Phellinus noxius	-	CBS 170.32*[1]
P. noxius	*Cinnamomum osmophloeum* (cinnamon)	PN 095004
P. noxius	*Cinnamomum osmophloeum* (cinnamon)	PN 095005
P. noxius	*Kigelia pinnata* (sausage tree)	PN 14.1
P. noxius	*Ficus microcarpa* (small-leafed banyan)	PN 21
P. noxius	*Murraya paniculata* Jack. var. *paniculata* (common jasmine orange)	PN 25.1
P. noxius	*Cinnamomum camphora* (camphor tree)	PN 32.1
P. noxius	*Annona squamosa* (custard apple)	PNA 4.1
P. noxius	*Cinnamomum camphora* (camphor tree)	PNCC 1.1
P. noxius	*Prunus mume* (plum)	PNP 1.2
P. noxius	*Pyrifolia pyrifolia* (pear)	PNP 4.2
P. noxius	*Pyrifolia pyrifolia* (pear)	PNP 8.1
P. noxius	*Pyrifolia pyrifolia* (pear)	PNP 9.1
P. noxius	*Dimocarpus longana* (longan)	PNLn 5.1
P. noxius	*Dimocarpus longana* (longan)	PNLn 9.2
P. noxius	*Dimocarpus longana* (longan)	PNLn 10.1
P. noxius	*Dimocarpus longana* (longan)	PNLn 11.1
P. noxius	*Dimocarpus longana* (longan)	PNLn 14.2
P. aplahynus	*Castanopsis carlesii*	TFRI 34**
P. gilvus	*Castanopsis carlesii*	TFRI 1022**
P. laevlgatus	*Bauhinia variegate* (orchid-tree)	TFRI 634**
P. hoehnelii	-	TFRI 500**
P. igniarius	*Ficus* sp. (Ficus)	TFRI 1162**
P. lnermis	-	TFRI 02**
P. mombranaceus	-	TFRI 468**
Rosellinia necatrix	*Averrhoa carambola* (carambola)	RN 9.1
Ganoderma australe	*Prunus persica* (peach)	G 35.1
Ganoderma tropicum	*Delonix regia* (flame tree)	G 37.1
Kretzchmaria sp.	*Mimusops kauki* (mimusops)	KL 2.1
Kretzchmaria sp.	*Litchi chinensis* (litchi)	KL 3.1
Phytophthora parasitica	*Lilium longiflorum* (lily)	FPP-1
Sclerotium rolfsii	*Lilium longiflorum* (lily)	FSR 049

[1] * isolate provided by Centraalbureau voor Schimmelcultures ;
** isolates provided by Dr. C. C. Chang, Taiwan Forestry Research Institute.

5 分鐘。然後以 12000 rpm 離心 5 分鐘。吸取上清液至另一離心管，加 2 倍體積無水酒精，混合均勻，於室溫靜置 5 分鐘，再以 12000 rpm 離心 10 分鐘。倒去上清液，沉澱物以 70% 酒精清洗二次，每次各以 12000 rpm 離心 1 分鐘，待沉澱物乾燥後，以無菌去離子水 (ddH_2O) 溶解。將質體DNA送定序。

DNA 定序與比對分析：DNA 之定序委由昕穎生物科技股份有限公司 (Bioscience Co., Ltd. Taiwan) 以自動化核酸序列分析儀 (ABI 3730) 進行核酸序列定序工作。並利用 Vector NTI 9.0 生物資訊分析程式 (InforMax, INC., U.S.A.) 進行序列接合與分析比對。

褐根病菌專一性引子對之設計

褐根病菌增幅所得的 ITS 區段經解序後，以 Vector NTI 9.0 生物資訊分析程式 (InforMax, INC.,U.S.A) 分別與 *P. aplahynus*、*P. gilvus*、*P. laevlgatus*、*P. hoehnelii*、*P. igniarius*、*P. lnermis*、*P. mombranaceus*，*Kretzchmaria* spp. 及 *G. australe*、*G. tropicum*、*R. necatrix*、*P. paracitica*、*S. rolfsii* 菌株等病原增幅所得的 ITS 區段，進行序列相似性比對與分析，並針對 *P. noxius* ITS1 與 ITS2 區域序列具相同之序列與跟上述菌株具差異性之序列設計專一性引子對。

專一性引子對 (PN-1F/PN-2R) 測試

供試 DNA 之菌株如表一。專一性引子測試之反應

組成包括0.2 μM 專一性引子對、0.2 μg 模板DNA、1倍反應緩衝液、200 μM dNTP (Genemark Technology Co., Ltd, Taiwan)、1U ZyMTaq polymerase (Zymeset Biology, Taiwan)，加 ddH_2O 使 PCR 反應總體積爲 25 μl。以 Perkin Elmer Thermal Cycler 9700 進行 PCR 反應，其反應條件如下：94℃，3 分鐘 → 94℃，30 秒；60℃，30 秒；72℃，45 秒，共 35 個循環 → 72℃，7 分鐘，最後以 1.5 % Agarose gel/0.5X TBE 緩衝液進行核酸電泳分析與 EtBr 染色後觀察引子對之專一性。

專一性引子對 (PN-1F/PN-2R) 靈敏度測試

專一性引子靈敏度測試之反應組成份爲：1 倍反應緩衝液、200 μM dNTP (Genemark Technology Co., Ltd, Taiwan)、濃度 20, 10, 1, 0.1, 0.01 ng, 1, 0.1 pg 系列稀釋後之褐根病菌菌株 PN095004 與 PNP 4.2 之 genomic DNA、0.2 μM 專一性引子對、1U ZyMTaq polymerase (Zymeset Biology, Taiwan)，加 ddH_2O 使 PCR 反應總體積爲 25 μl。以 Perkin Elmer Thermal Cycler 9700 進行 PCR 反應，其反應條件同上。

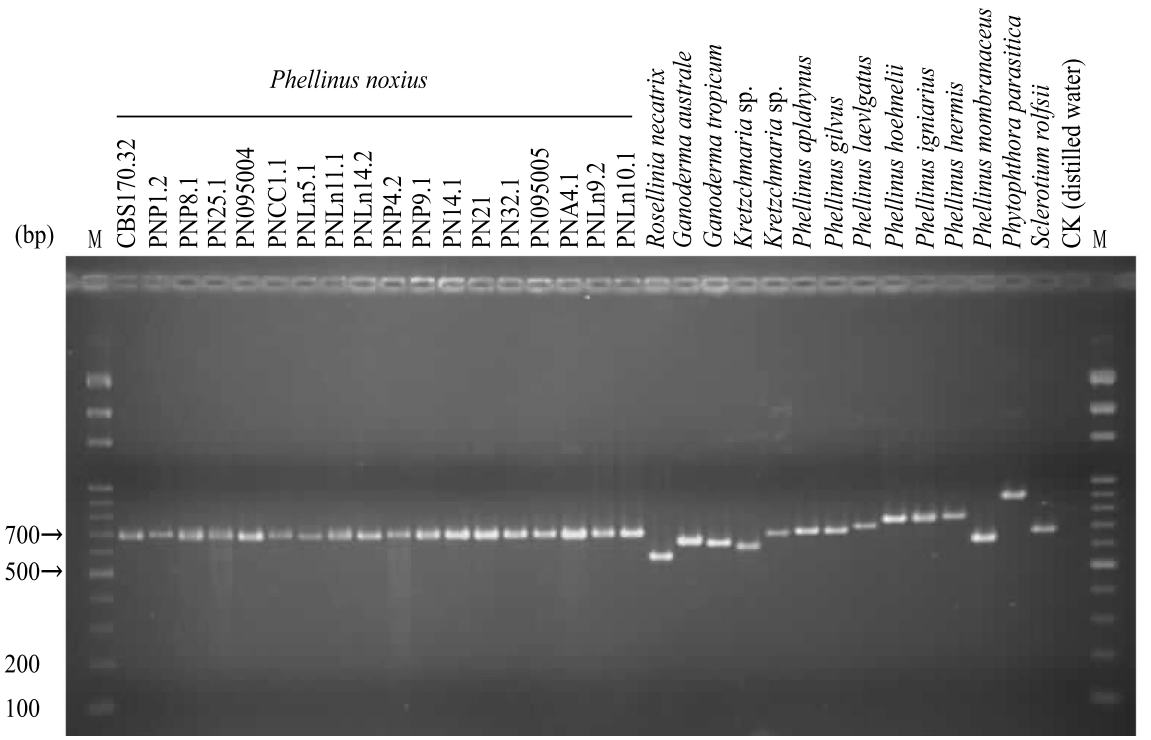
應用專一性引子對 (PN-1F/PN-2R) 偵測田間之褐根病菌

由田間採回之龍眼樹及相思樹褐根病病根，及兩者未發病之根部，切取組織後，以液態氮冷凍乾燥磨粉，分別取 0.2 g 粉末，與上述褐根病菌 genomic DNA 之萃取純化步驟相同，以上述專一性引子對 (PN-1F/PN-2R) 測試之相同方法，進行 PCR 反應與 EtBr 染色，測試專一性引子對偵測植株病組織之能力。

結 果

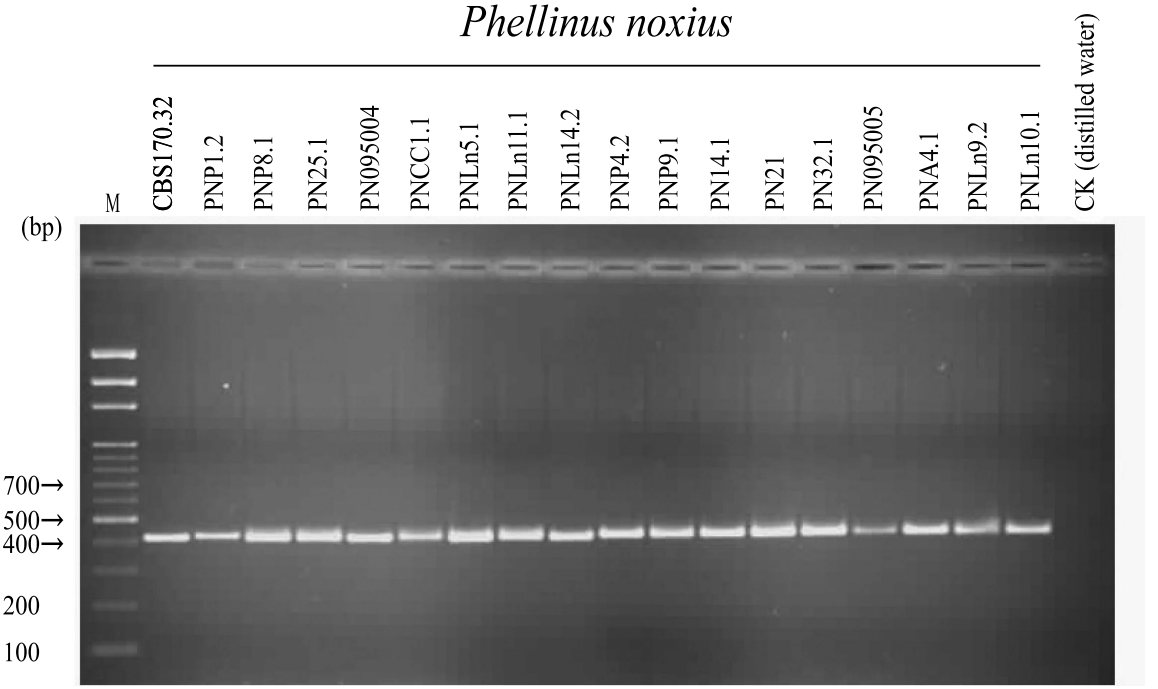
專一性引子對之設計

以通用性引子對 ITS1/ITS4 增幅各供試菌株 rDNA 之 ITS1/5.8S/ITS2 序列，計增幅 *P. noxius* 菌株 18 支，與 *P. aplahynus*、*P. gilvus*、*P. laevlgatus*、*P. hoehnelii*、



圖一、利用通用引子對 ITS1 及 ITS4 對 *Phellinus noxius* 及其他造成根腐之病菌 (*P. aplahynus*、*P. gilvus*、*P. laevlgatus*、*P. hoehnelii*、*P. igniarius*、*P. lnermis*、*P. mombranaceus*，*Kretzchmaria* spp.、*Ganoderma australe*、*G. tropicum*、*Rosellinia necatrix*、*Phytophthora paracitica*、*Sclerotium rolfsii*) genomic DNA 進行 PCR 反應之結果。M 爲 100 bp marker。

Fig. 1. The PCR product bands of the genomic DNA of *Phellinus noxius* and other root rot fungi (*P. aplahynus*, *P. gilvus*, *P. laevlgatus*, *P. hoehnelii*, *P. igniarius*, *P. lnermis*, *P. mombranaceus*, *Kretzchmaria* spp., *Ganoderma australe*, *G. tropicum*, *Rosellinia necatrix*, *Phytophthora paracitica*, *Sclerotium rolfsii*) using primers ITS1 and ITS4. M, 100 bp marker.



圖二、褐根病專一性引子對 PN-1F/PN-2R 對褐根病菌 DNA 進行 PCR 增幅反應之結果，CBS170.32、PNP1.2、PNP8.1、PN25.1、PN095004、PNCC1.1、PNLn5.1、PNL n11.1及 PNLn14.2 爲 414 bp；PNP4.2、PNP9.1、PN14.1、PN21、PN32.1、PN095005、PNA4.1、PNLn9.2 及 PNLn10.1 爲 422 bp。M 爲 100 bp marker。

Fig. 2. PCR amplification of template DNA from *Phellinus noxius* using *P. noxius* specific primer. The CBS170.32、PNP1.2、PNP8.1、PN25.1、PN095004、PNCC1.1、PNLn5.1、PNL n11.1and PNLn14.2 isolates were 414 bp；PNP4.2、PNP9.1、PN14.1、PN21、PN32.1、PN095005、PNA4.1、PNLn9.2 and PNLn10.1 isolates were 422 bp. M, 100 bp marker.

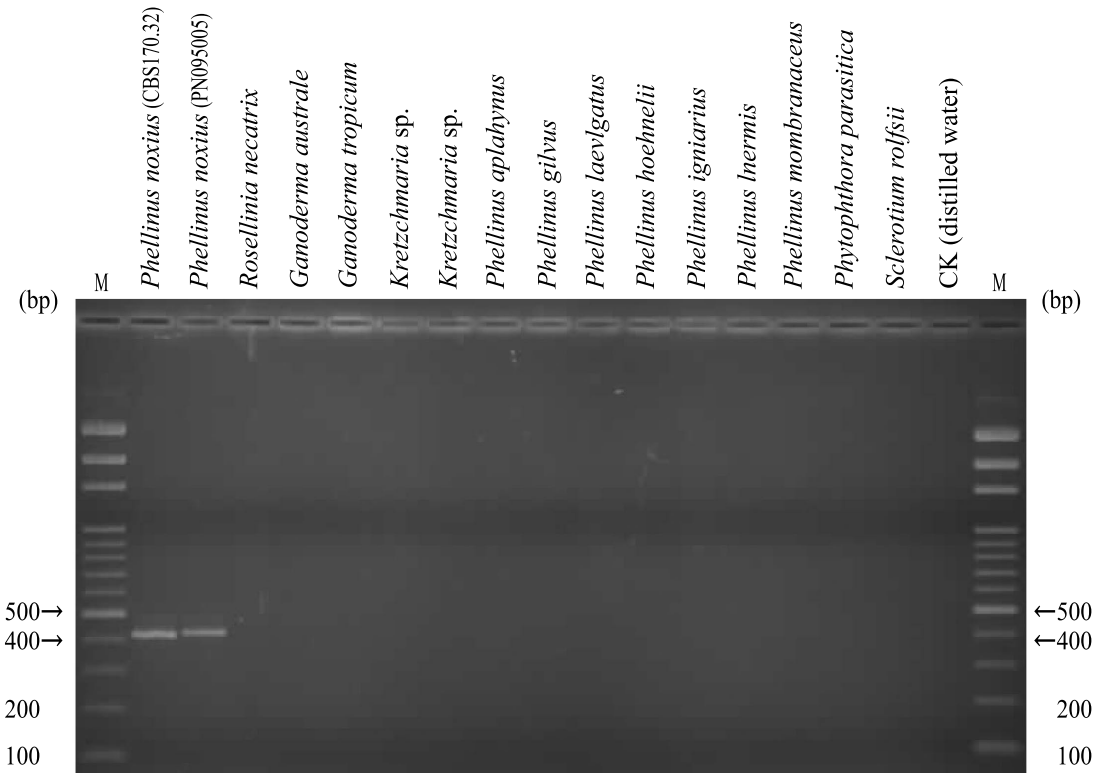
P. igniarius、*P. lnermis*、*P. mombranaceus*、*Kretzchmaria* spp.、*G. australe*、*G. tropicum*、*R. necatrix*、*P. paracitica*、*S. rolfsii* 等菌株，增幅之產物大小如圖一，經解序及序列比對後 *P. noxius* ITS1/5.8S/ITS2 序列長度分別有 606 bp 及 614 bp 兩型，由於 56～75 bp 及 459～477 bp 基因序列完全相同，且 GC 含量合宜，但與其他不同種供試眞菌之歧異度則相當大，因此以此兩段序列設計爲專一性引子對，正向引子 PN-1F (5'-agtttgcgctcatccatctc-3')，反向引子 PN-2R (5'-agccgacttacgccagcag-3')，引子長度爲 20/19 mer，TM 值爲 60/62℃。應用此專一性引子對進行 PCR 反應，其反應之增幅條件經試驗後設定爲：94℃，3 分鐘 → 94℃，30 秒；60℃，30 秒；72℃，45 秒，共 35 個循環 → 72℃，7 分鐘，最後以 1.5 % Agarose gel/0.5X TBE buffer 進行核酸電泳分析，反應結果確認 PN-1F/PN-2R 引子對供試之 *P. noxius* 皆能產生專一性片段，預期增幅產物片段大小爲 414 bp 及 422 bp。

PN-1F/PN-2R引子對之專一性

以褐根病菌專一性引子對 (PN-1F/PN-2R) 分別對 18 支褐根病菌進行專一性測試，經 PCR 反應後，專一性引子對褐根病菌皆可增幅出預期產物片段大小爲 414 bp 及 422 bp 之專一性片段 (圖二)。另外，褐根病菌專一性引子對於 *Phellinus* 不同種菌株 *P. aplahynus*、*P. gilvus*、*P. laevlgatus*、*P. hoehnelii*、*P. igniarius*、*P. lnermis*、*P. mombranaceus*、*Kretzchmaria* spp.、*G. australe*、*G. tropicum*、*R. necatrix*、*P. paracitica* 與 *S. rolfsii* 的 DNA 進行 PCR 增幅反應後，則並未發現任何增幅產物 (圖三)。

PN-1F/PN-2R 引子對之靈敏度

分別利用 20, 10, 1, 0.1, 0.01 ng, 1, 0.1 pg 系列稀釋後之褐根病菌 PN095004 與 PNP 4.2 菌株 genomic DNA 爲模板，進行專一性引子對之靈敏度測試。反應中添加 0.2 μM 引子對 (PN-1F/PN-2R) 時，含 0.01 ng 以上之褐根病菌模板 DNA 皆可增幅出明顯的專一性產物，且在含有 1 pg 模板 DNA 時仍可獲得微量增幅產物 (圖四)。



圖三、褐根病專一性引子對 PN-1F/PN-2R 對 *Phellinus noxius* 及其他造成根腐之病菌 (*P. aplahynus*、*P. gilvus*、*P. laevlgatus*、*P. hoehnelii*、*P. igniarius*、*P. lnermis*、*P. mombranaceus*，*Kretzchmaria* spp.、*Ganoderma australe*、*G. tropicum*、*Rosellinia necatrix*、*Phytophthora paracitica*、*Sclerotium rolfsii*) DNA 進行 PCR 反應之結果，*P. noxius* 可被增幅出 414 bp (CBS170.32) 及 422 bp (PN095005) 產物，其他則無。M 爲 100 bp marker。

Fig. 3. PCR amplification of template DNA from *Phellinus noxius* and other root rot fungi (*P. aplahynus*, *P. gilvus*, *P. laevlgatus*, *P. hoehnelii*, *P. igniarius*, *P. lnermis*, *P. mombranaceus*, *Kretzchmaria* spp., *Ganoderma australe*, *G. tropicum*, *Rosellinia necatrix*, *Phytophthora paracitica*, *Sclerotium rolfsii*) using *P. noxius* specific primer. M, 100 bp marker.

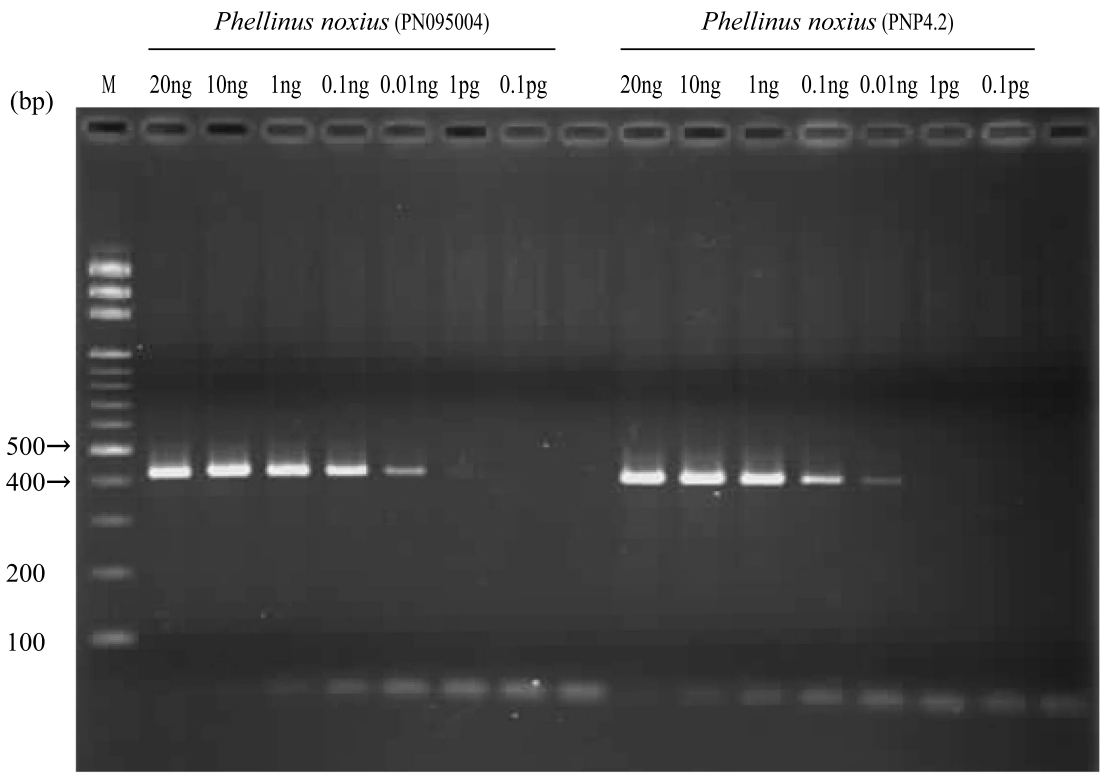
應用專一性引子對 (PN-1F/PN-2R) 偵測田間之褐根病菌

以所設計之引子對 PN-1F/PN-2R 偵測罹患褐根病之龍眼樹及相思樹根部組織，經 PCR 反應後均可在約 422 bp 處產生條帶，而健康之組織則未見條帶 (圖五)，顯示此專一性引子對能偵測到相思樹及龍眼樹之罹病組織。

討 論

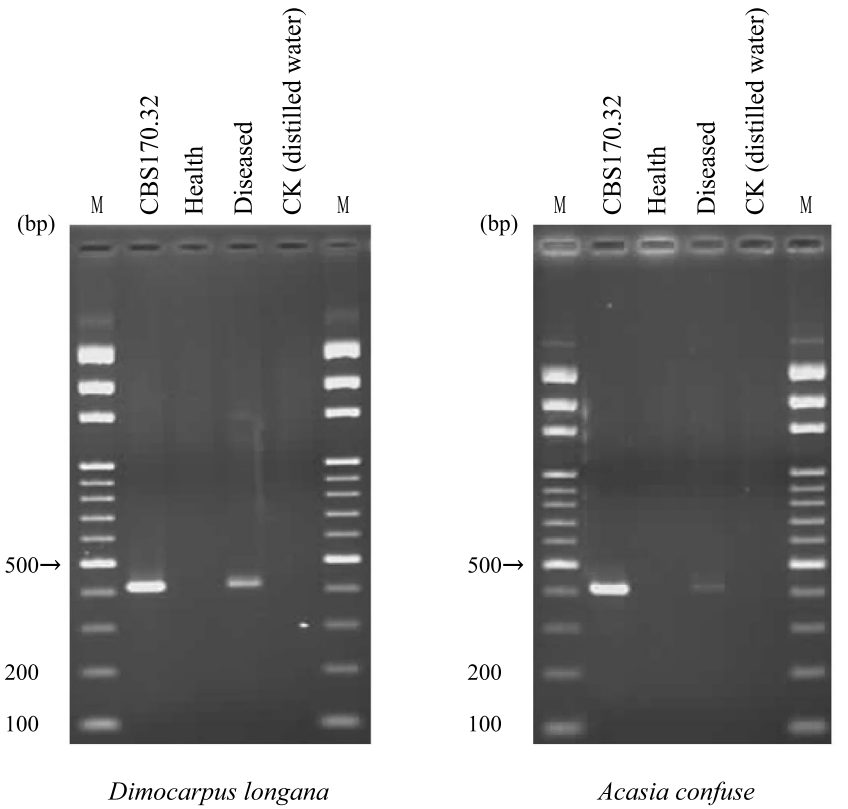
褐根病爲亞洲、非洲、大洋洲及澳洲熱帶與亞熱帶地區果樹、特用作物及林木重要之根部病害[1]，病原菌危害根部，造成根部組織腐敗，而導致全株萎凋枯死。褐根病菌爲多犯性，寄主超過 200 餘種，在國外主要危害咖啡[10]、茶[13]、刺桐[11]、破布子[15]、橡膠樹[14]、可可[7]、樹豆[8]、松樹[3] 等；Sawada 於 1928、1942 及 1943 年記錄褐根病菌 (*Fomes lamaensis*) 於台灣發生，寄主遍及 18 種植物，近年來，許多林木、觀賞植物及經濟果樹皆有褐根病的發生，調查發現其寄主已超過 120 餘種[1]，海拔 1000 公尺以下之果樹、觀賞植物與林木皆有發病記錄。褐根病的地上部病徵可分爲慢性與急性立枯兩種，慢性立枯在地上部病徵出現後約 2-3 年或更久罹病植株才會死亡；急性立枯則在地上部病徵出現 1-2 星期便會造成植株死亡，主要原因爲 *P. noxius* 危害樹木的根系組織達 70～80% 以上時，植株出現地上部病徵，此時輸導組織嚴重受損，導致水份及養份之輸送受到阻礙而死亡。褐根病根部病徵，罹病組織變褐色，腐朽後並長出褐色網狀線紋，病根的表皮上覆有褐色菌絲塊，並黏沾土塊石粒，與白紋羽病菌及靈芝病菌引起之立枯病有別。

利用分子生物技術來診斷、鑑定及偵測病原菌之研究方法相當多，包括血清抗體及 PCR 技術等。其中 PCR 技術可配合核酸逢機多型性分析 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制酵素片段長度多型性分析 (restriction fragment length polymorphisms



圖四、褐根病菌專一性引子對 PN-1F/PN-2R 增幅褐根病菌菌株 PN095004 及 PNP4.2 DNA 靈敏度測試之結果。M 爲 100 bp marker。

Fig. 4. Sensitivity analysis of PCR for *Phellinus noxius* isolates PN095004 and PNP4.2. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. M, 100 bp marker.



圖五、利用褐根病菌專一性引子對 PN-1F/PN-2R 與 PCR 反應，檢測龍眼樹及相思樹根部組織之結果。CBS170.32 爲萃取菌株之 DNA，Health 爲健康之植物組織，Diseased 爲罹病之植物組織，CK 爲無菌水，M 爲 100 bp marker。

Fig. 5. Detection of *Phellinus noxius* by PCR. Samples from the infected tissues of *Dimocarpus longana* and *Acasia confuse*. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. CBS170.32, the genomic DNA of CBS170.32 isolate; Health, healthy tissue; Diseased, infected tissue; CK, sterile distilled water. M, 100 bp marker.

analysis, RFLP analysis) 及核酸指紋圖譜分析 (DNA fingerprinting) 等。由於 PCR 技術因爲操作簡便且效率高，最被廣泛的利用。利用 PCR 反應，配合高度專一性及靈敏度的引子對，可在短時間內測知正確結果，因此最常被應用。目前在病原眞菌的鑑定及偵測上，rDNA 序列的被應用最爲普遍[6]，眞菌 rDNA 序列的組成可分爲二部份，分別爲高度保留區 (well conserved region)，包括 18S、5.8S 及 28S；以及變異性區域 (variable region) 包含內轉錄區間 ITS1 與 ITS2 序列，因此近年的研究報告，高度保留區 18S 及 28S 在屬內相同度高，可設計引子對，用於屬間之區別；而變異性高的區域 ITS1 及 ITS2 在種內之相同度甚高，可設計專一性引子對，用於種內之鑑定[12]；另一方面，藉由 rDNA 所設計之引子對，亦可針對土壤、植體或者其它環境中之微生物進行檢測[4, 16]。

而利用 ITS 區域序列片段設計引子對，用於種內眞菌鑑定，在褐根病菌方面，目前尚無任何研究報告，因此筆者以多年來收集之褐根病菌菌株，將其 rDNA 之 ITS1/5.8S/ITS2 區域解序後，及與其它可能造成植株立枯死亡之病原菌，如 *R. necatrix*、*Ganoderma* spp.、*Phytophthora* spp.、*S. rolfsii*、*Kretzchmaria* spp. 及 *Phellinus* 不同種之菌株進行序列比對後，設計出專一性引子對 PN-1F/PN-2R。褐根病菌不同菌株 rDNA 之 ITS1/5.8S/ITS2 區域經解序後，長度分別有 606 bp 及 614 bp 兩種型態，因此利用專一性引子對 PN-1F/PN-2R 增幅出之預期產物大小分別有 414 bp 或 422 bp 之專一性片段。應用引子對 PN-1F/PN-2R 進行 PCR 反應，對於在台灣分離到之 *P. noxius* 及由荷蘭菌種保存中心來之菌株 CBS170.32 皆可增幅出預期之片段，對其它菌株，包括 *R. necatrix*、*Ganoderma* spp.、*Phytophthora* spp.、*S. rolfsii*、*Kretzchmaria* spp. 及林業試驗所提供之 *Phellinus* 不同種之菌株，則無法增幅出任何片段。至於其他國家之 *P. noxius* 菌株，原則上應可以增幅出專一性片段，因同一種菌的 ITS 序列相同度一般均在 98% 以上。但因無其他國家之菌株供試，且由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上之基因庫 (GenBank) 亦無任何之 *P. noxius* 菌株可供比對，因此本研究設計出之引子對 PN-1F/PN-2R 對國外之 *P. noxius* 菌株之專一性如何？則有待收集更多之國外菌株進一步分析。本專一性引子對分別是由 ITS1 及 ITS2 區域序列中所設計，此兩區域序列在不同種間之歧異度大，且在同種內亦可能存在些許不同，因此在此兩區域序列中設計出引子對，專一性相對較高。

PN-1F/PN-2R 專一性引子對靈敏度之測定，進行 PCR 後之結果顯示，所設計之引子對對 *P. noxius* 菌株 genomic DNA 最低可偵測到 0.01 ng，靈敏度高。另外以此引子對 PN-1F/PN-2R 直接應用於偵測田間罹病之植物組織，均可偵測到褐根病菌，且僅需 3-4 hr，十分快速。本研究之結果，所設計之專一性引子對 PN-1F/PN-2R 可應用於台灣褐根病之診斷，且可在短時間內達到快速、準確及靈敏之目的，期望於病徵未出現前先偵測出病原菌之存在，可因此掌握發病時機，及早準備防治措施，將來更可應用於苗木之檢疫上，遏止褐根病之蔓延。

謝 辭

本研究承蒙林業試驗所張東柱博士提供 *Phellinus* 不同種 (species) 之菌株，特致謝忱。

引用文獻

1. Ann, P. J., Chang, T. T., and Ko, W. H. 2002. *Phellinus noxius* brown root rot of fruit and ornamental trees in Taiwan. Plant Dis. 86:820-826.
2. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1988. Root rot of macadamia caused by *Ganoderma lucidum* and *Kretzchmaria clavus* in Taiwan. J. Agric. Res. China 37:424-429.
3. Bolland, L. 1984. *Phellinus noxius*: cause of a significant root-rot in Queensland hoop pine plantations. Aust. For. 47:2-10.
4. Borneman, J., and Hartin, R. J. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 66:4356-4360.
5. Chern, L. L., Ann, P. J., and Young, H. R. 1998. Foot and root rot of loquat in Taiwan caused by *Phytophthora*. Plant Dis. 82:651-656.
6. Cook, K. L., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Fleming, J. T., and Sayler, G. S. 2004. Evaluation of a plasmid-based 16S-23S rDNA intergenic spacer region array for analysis of microbial diversity in industrial wastewater. J. Microbiol. Methods 57:79-93.
7. Dennis, J. J. C. 1992. A new threat from brown root rot of cocoa, caused by *Phellinus noxius*, in Papua New Guinea. Plant Dis. 76:642.
8. Dennis, J. J. C. 1994. First report of pigeon pea root rot caused by *Phellinus noxius* in Papua New Guinea. Plant Dis. 78:316.
9. Duan, C. H., Tsai, W. H., and Tu, C. C. 1990. Dissemination of white root rot disease of loquate and its control. J. Agric. Res. China 39:47-54. (in Chinese)
10. Govindarajan, T. S. 1988. A review on the incidence of root diseases on coffee and their management. J. Coffee Res. 18:16-28.

11. Hodges, C. S., and Tenorio, J. A. 1984. Root disease of *Delonix regia* and associated tree species in the Mariana Island caused by *Phellinus noxius*. Plant Dis. 68:334-336.
12. 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.
13. Mouli, B. C. 1988. Root diseases of tea and their control. J. Coffee Res. 18:29-37.
14. Nandris, D., Nicole, M., and Geiger, J.P. 1988. Root-rot diseases of the rubber tree in the Ivory Coast. 1. Severity. Dynamics and characterization of epidemics. Can. J. For. Res. 18:1248-1254.
15. Neil, P. E. 1988. Root disease (*Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunn.) of *Cordia alliodora* in Vanuatu. Commonw. For. Rev. 67:363-372.
16. Weiland, J. J., and Sundsbak, J. L. 2000. Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. Plant Dis. 84:475-482.

ABSTRACT

Tsai, J. N.[1, 2], Hsieh, W. H.[1],Ann, P. J.[2, 3], and Yang, C. M.[2] 2007. Development of specific primers for *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull. 16: 193-202. ([1] Department of Plant Pathology, Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan; [2] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan; [3] Corresponding author, E-mail: pjann@wufeng.tari.gov.tw)

Phellinus noxius is a very destructive pathogen which attacks hundred species of woody plants in Taiwan in recent years. In order to develop a pair of specific primers for rapid and accurate diagnosis of the disease associated with the pathogen in the fields, the ribosomal DNA (rDNA) sequences in internal transcript spacer (ITS, including ITS1/5.8S/ITS2) regions from *P. noxius* and several other soil-borne fungi were studied. The test fungi included *P. noxius* (18 isolates), other *Phellinus species* (*P. aplahynus*, *P. gilvus*, *P. laevlgatus*, *P. hoehnelii*, *P. igniarius*, *P. lnermis*, *P. mombranaceus*), *Ganoerma australe*, *Ganoderma tropicum*, *Rosellinia necatrix*, *Kretzchmaria* spp., *Phytophthora paracitica* and *Sclerotium rolfsii*. The universal PCR primers ITS1/ITS4 were used to analyze the DNA sequences of ITS regions for these fungi. Based on the alignments of ITS sequences, a set of primers PN-1F/PN-2R was designed. The forward primer PN-1F sequence is "5'-agtttgcgctcatccatctc-3'" and the reverse primer PN-2R is "5'-agccgacttacgccagcag-3'". Using PN-1F/PN-2R primers for PCR amplification under a setup condition and the fungal genomic DNA as templates, a distinct 414 bp or 422 bp fragment were amplified form *P. noxius*, whereas no PCR products can be amplified from other soil-borne fungi. The PCR could amplify the fragments recognizable within 3-4 hr when concentration of purified DNA was higher or equal to 0.01 ng. Meanwhile, similar amplified fragments were obtained when the diseased root tissues of *Dimocarpus longana* and *Acasia confusa* from *P. noxius* infested fields were used as templates. Results presented here suggest that the primer pairs PN-1F/PN-2R can be efficiency in auxiliary identifying *P. noxius* and accurately and rapidly detecting diseases caused by the pathogen in the field.

Key words: *Phellinus noxius*, primer