EJ112199800095

植物保護學會會刊 40：95～108, 1998

荔枝露疫菌粒線體核酸探針之選殖與分析

陳隆鐘[1] 賴學珍[1] 李崇正[1] 鍾依紋[1] 葉瑩[2] 安寶貞[3]

1.台中市 國立中興大學植物病理學系
2.台北市 行政院農業發展委員會植物保護科
3.台中縣霧峰鄉 臺灣省農業試驗所

（接受日期：民國86年12月29日）

摘 要

陳隆鐘、賴學珍、李崇正、鍾依紋、葉瑩、安寶貞 1998 荔枝露疫菌粒線體核酸探針之選殖與分析 植保會刊 40：95 - 108.

利用三種內限制酵素 *Eco*R I、*Hinc* II 及(*Eco*R I + *Sac* I)剪切荔枝露疫菌 PL024 菌株之粒線體核酸，將所得核酸片段與pUC 18載體黏合並進行選殖，結果選殖到4個選殖株 A2-3、HC3、HC9及ES6，其插入片段大小各爲 0.6 kb、0.4 kb、0.65 kb及0.6 kb，分別製備爲核酸探針。並以墨點漬染法與25株荔枝露疫菌粒線體核酸進行雜合反應，均有雜合交互作用。另以17株*Phytophthora*菌株及*Pythium splendens*的全量核酸與核酸探針A2-3、HC3、HC9及ES6進行雜合反應，結果HC3、HC9、ES6核酸探針與*Pythium splendens*皆無雜合交互作用；ES6核酸探針與17株*Phytophthora*菌株沒有任何雜合交互作用，A2-3 核酸探針除*Phytophthora cryptogea*外都有雜合交互作用，顯示ES6核酸探針比A2-3、HC3及HC9核酸探針對荔枝露疫菌較具有專一性。經墨點漬染測試，ES6核酸探針的靈敏度可測到100 fg濃度的露疫菌粒線體核酸。

(關鍵詞：荔枝露疫菌、粒線體核酸、核酸探針、墨點漬染法)

緒 言

荔枝露疫病 (downy blight)，又名霜霉病，是荔枝果實上一種嚴重的病害[5]。病原菌主要危害近成熟的果實，有時亦可危害花、青果、根和葉片[1]。受害初期果實表面出現褐色不規則病斑，發病嚴重時，全果變黑，果肉腐爛流出黃褐色汁液並散發強烈的酒味及酸味。引發荔枝露疫病的病原眞菌爲荔枝露疫菌 (*Peronophythora litchii*

Chen ex Ko *et al.*)，臺灣荔枝露疫菌首先由陳其昌博士於1934年發現，此菌屬於卵菌綱 (Oomycetes)，露菌目 (Peronosporales)，露疫菌科 (Peronophythoraceae)，露疫菌屬 (*Peronophythora*)[2,8]。

露疫病菌需要靠風雨傳播，病原菌隨罹病果實掉落後，潛藏於土壤中，待翌年雨季，病原菌藉雨水飛濺至花穗及果實，成爲初次感染源。露疫菌的發生與空氣中的相對濕度有密切的關係，如4～7月間遇久雨不晴的梅雨季節，發病情形會較嚴重，花穗及綠色幼果亦會受感染而脫落[6]。就整棵樹而言，樹冠下部果實最早發病且情形嚴重。果實收穫後於貯藏運輸期亦會受到露疫菌感染而導致整箱果實腐爛。

荔枝是本省重要亞熱帶經濟果樹，栽培面積爲一萬兩千多公頃，年產量高達十二萬公噸，政府於近年來更積極推廣荔枝的外銷工作，因此產量需求及運輸保存等技術之問題爲荔枝栽培的重點。又因近年來夏季多雨時期常造成露疫病的發生，由此看來露疫菌於田間生態的存活情形與爲防治露疫病所產生的抗藥性等問題爲值得研究調查的方向。由於生物技術快速發展，目前藉著基因的選殖技術進步，可自病原菌之基因體中選殖出具有特異性之核酸片段，且廣泛應用於探討眞菌的遺傳特性，例如利用限制酵素切割片段多型性(RFLPs)比較菌株間的異同[7,11]，或是以酵素切割所得核酸片段進行核酸探針的選殖，再由選殖成功的核酸探針做爲眞菌之偵測及鑑定[12]。例如Stammler等人由*Phytophthora fragaroiae* var. *rubi*的粒線體核酸限制片段，選殖得到一個1.5kb的核酸探針，配合RFLPs的方法，可區分*P. fragariae* var. *fragariae*及*P. fragariae* var. *rubi*[11]。Kim等人將50株具病原性的*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*之粒線體核酸，進行RFLPs分析，並選殖7個探針與各菌株進行反應，可將菌株區分爲六個RFLP群[7]。Martin也曾以粒線體核酸的片段製成核酸探針區分*Pythium oligandrum*及*P. sylvaticum*[9]。

本研究目的在以露疫菌粒線體核酸爲材料進行RFLPs比較，並利用酵素切割片段進行選殖製備成核酸探針，以輔助鑑定本菌之用。另以*Phytophthora* spp.、*Pythium* spp.之核酸與荔枝露疫菌核酸探針經由點漬測試 (dot-blot assay) 以篩選出專一性高的核酸探針。

本研究擬測試核酸探針的靈敏度，供露疫菌在快速檢疫偵測上應用，並於未來配合*in-situ* PCR技術，輔助露疫菌田間生態調查，同時利用篩選出的核酸探針與其他卵菌門 (Oomycota) 眞菌進行同源性比較，進而探討其親緣與演化上的關係。

材料與方法

露疫菌菌株來源及保存

荔枝露疫菌、疫病菌及腐霉菌菌株 (表一及表二) 除自行前往臺灣各地採集並分離者外，尚有由中興大學植物病理學系曾德賜教授、東吳大學微生物系汪碧涵博士提供。供試之露疫菌與疫病菌株主要利用10% V-8 液瓊脂斜面培養基 (V-8 juice agar slant, 10% V-8 juice agar, Campbell Company, USA) 培養於26℃定溫箱中。腐霉菌主要利用馬鈴薯胡蘿蔔斜面培養基 (PCA slant, potato-carrot agar, Sigma chemical company, USA)，培養於26℃定溫箱中。上述三種供試菌株之長期保存方法，是以佈滿菌絲之洋菜圓盤置於無菌水中並放置10-20℃定溫箱中。

露疫菌總量去氧核糖核酸及粒線體去氧核糖核酸之純化方法

露疫菌總量去氧核糖核酸及粒線體去氧核糖核酸之抽出方法，係取由冷凍乾燥

機 (Labconco LYPH-LOCK^R, Kansas, USA) 乾燥後的菌絲研磨成菌絲粉末，取1g的菌絲粉末加入15 ml萃取緩衝液 (extraction buffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethnol, 1% (w/v) SDS)，放置於65℃水浴，處理10~20分鐘。此混合液加入7.5 ml 5 M的醋酸鉀 (potassium acetate) 置於冰上20分鐘後，在4℃下，以10000 *g*離心30分鐘 (Sigma, 2K15, USA)，取上澄液，加入0.7倍體積之異丙醇 (isopropanol) 及2.5 ml 10 M之醋酸銨 (ammonium acetate)並置於室溫下1小時；再將此溶液以4℃，10000 g離心30分鐘，倒出上清液同時加入TE緩衝液 (50mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) 溶解沉澱物，隨後加入與溶液等體積的phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 輕緩搖動均勻混合，以4℃，10000 *g*離心30分鐘；再加入等體積chloroform/ isoamyl alcohol (24:1 (v/v)) 於10000 *g*離心30分鐘；將離心後所得之上清液加入0.7倍的異丙醇 (isopropanol) 與0.1倍體積3M之醋酸鉀 (potassium acetate) 置於-20℃中1小時，再於4℃，以10000 *g* 離心30分鐘，經離心後所得之沉澱物即爲全量去氧核糖核酸，將此總量核酸溶解於TE緩衝液中保存於-20℃冷凍櫃中。由上述方法純化所得之總量核酸，利用CsCl/ bisbenzimide (20 μg/ ml, Sigma, MO, USA) 超高速離心法，置於超高速離心機 (Hitachi 85-72; Rotor, RPS 50-2, Takeda Katsuta, Japan) 中，在20℃下，以45000 *g*離心24小時。離心後隨即抽出粒線

表一、荔枝露疫菌菌株來源

Table 1. Sources and isolates of *Peronophythora litchii* tested in this study

Isolates	Location
PL001	南投 草屯 (Tsaotun, Nantow)
PL002	台中 太平 (Taiping, Taichung)
PL003	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL004	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL005	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL007	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL009	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL010	嘉義 民雄 (Minhsiung, Chiayi)
PL011	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL012	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL013	台中 太平 (Taiping, Taichung)
PL014	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL016	嘉義 民雄 (Minhsiung, Chiayi)
PL017	南投 草屯 (Tsaotun, Nantow)
PL018	南投 雙冬 (Shuangtung, Nantow)
PL019	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL020	南投 草屯 (Tsaotun, Nantow)
PL021	台中 太平 (Taiping, Taichung)
PL022	南投 中興新村 (Chunghsin Village, Nantow)
PL023	嘉義 民雄 (Minhsiung, Chiayi)
PL024	嘉義 竹崎 (Chuchi, Chiayi)
PL025	南投 草屯 (Tsaotun, Nantow)
PL026	南投 草屯 (Tsaotun, Nantow)
PL027	嘉義 民雄 (Minhsiung, Chiayi)

表二、測試核酸探針專一性的*Phytophthora*菌株及*Pythium*菌株來源

Table 2. Location and isolates of *Phytophthora* and *Pythium* tested in this study

Isolates		Host
Phytophthora parasitica	PPCa7-2 A2	*Dianthus caryphyllus* L. (康乃馨)
Phytophthora parasitica	PPCa4-5-1 A1	*Dianthus caryphyllus* (康乃馨)
Phytophthora parasitica	PPAn1-1 A2	*Anthurium* sp. (火鶴花)
Phytophthora parasitica	PPCy1-1 A2	*Cymbidium Sineusis* Willd. (四季蘭)
Phytophthora parasitica	PPCy5 A2	*Cymbidium Sineusis* Willd. (觀音素心蘭)
Phytophthora parasitica	PPT1-4 A2	*Nicotiana tabacina* L. (煙草)
Phytophthora palmivora	PPaCa3-1 A2	*Cattleya* spp. (嘉德利蘭)
Phytophthora palmivora	PPaCa4-1 A1	*Cattleya* spp. (嘉德利蘭)
Phytophthora capsici	PCa12 A1	*Capsicum annunm* L. (辣椒)
Phytophthora capsici	PCaBb7-2 A1	*Gypsophila paniculata* L. (滿天星)
Phytophthora cryptogea	PCrC4 A1	*Dianthus caryphyllus* L. (康乃馨)
Phytophthora cryptogea	PCrG2-2 A1	*Gerbera jamesonii* H. (非洲菊)
Phytophthora citrophthora	PCA4-2 A1	*Anthurium* sp. (火鶴花)
Phytophthora citricola	PCtW3 H	*Syzygium samarangese* Lamk (蓮霧)
Phytophthora drechsleri	PDC1-3 A1	*Maranta arundinacea* L. (竹芋)
Phytophthora melonies (*P. drechsleri*)	PD A1	*Cucumis sativus* L. (胡瓜)
Phytophthora colocasiae	PCO A2	*Colocasia formosana* Hayata (芋)
Pythium splendens		*Anthurium* sp. (火鶴花)
Pythium aphanidermatum	USA	
Pythium coloratum	Taichung	
Pythium deliense	USA	
Pythium mamillatum	USA	
Pythium paroecandrum	USA	
Pythium torulosum	USA	
Pythium ultimum var. *ultimum*	USA	
Pythium dissotocum	USA	
Pythium catinulatum	USA	
Pythium splendens	USA	
Pythium spinosum	Taichung	
Pythium periilum	Tainan	Brassica
Pythium myriotylum	Taichung	
group F	Taichung	Hibiscus
group G	Taichung	Brassica
Pythium irregulare	Taichung	Scallion

體核酸之亮帶，並以等體積之水飽和異丙醇 (dH_2O-saturated isopropanol)反覆抽取去除bisbenzimide，再將水層取出加入1/10體積之NaOAc (pH5.2)及2倍體積之無水酒精，於-80℃靜置2小時後，以10000*g*離心15分鐘，離心所得之沉澱物爲粒線體核酸，以70%酒精沖洗沉澱物，待眞空乾燥後保存於-20℃中。

粒線體核酸限制酵素切割片段之圖譜分析

取0.5 μg的粒線體核酸置於總體積爲10 μl的緩衝溶液中，以16種限制酵素*Apa* I、*Bam*H I、*Bgl* II、*Bst* XI、*Cla* I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hinc* II、*Hind* III、*Kpn* I、*Nci* I、*Not* I、*Pst* XI、*Pvu* II、*Sac* I及*Sca* I（Promega Inc., USA）進行剪切，於剪切處理後以1.5%洋菜凝膠、1X TAE緩衝液進行電泳分析。電泳分析使用的分子量標記爲Lambda DNA/ *Hind* III digested marker (New England Biolabs Inc., MA, USA)。DNA片段大小的估計主要依據其在電泳時相對於分子量標記的移動距離進行估計。

粒線體核酸片段選殖

以pUC18質體作爲選殖 (cloning) 過程的載體 (vector)。核酸片段選殖過程爲下述：取3 μg的粒線體核酸以限制酵素*Eco*R I、*Hinc* II、(*Eco*R I + *Sac* I)等組合進行剪切；經剪切後的粒線體核酸以1%的洋菜凝膠進行電泳分析，由電泳之結果分析將所要的DNA片段及載體DNA使用相同的限制酵素處理，並利用GENECLEAN II kit (BIO 101 Inc., USA) 回收洋菜凝膠中的DNA片段。將回收之片段加入T_4 DNA ligase (Stratagene™, USA) 以進行選殖片段與載體DNA的黏接，置於16℃，16小時後得到重組核酸 (recombinant DNA)。將重組核酸加入200 ml的*Escherichia coli* DH5 α勝任細胞懸浮液中，在冰浴中處理30分鐘後，再以42℃熱處理3分鐘，最後以冰浴處理5分鐘，放入1 ml LB液體培養基，於37℃培養1小時；隨後於4℃，以4000 *g*離心5分鐘，收集菌液，去除約1 ml的上層培養液，再將其懸浮，並以塗佈平板法將其塗抹於含有50 μg/ml ampicillin (Sigma chemical Co.,Sf. Louis, MI, USA) 的LB固態培養基上。此時培養基中含有80 μg/ml新鮮X-gal及20 mM IPTG (Gold Biotechnology Inc., USA)，便於進行藍 / 白色菌落的篩選。若爲白色的菌落則可能是含有選殖片段的轉形株 (transformants)，仍需進行質體抽取、限制酵素剪切及電泳分析以確認其爲選殖成功者。而藍色的菌落則表示不含有選殖片段者。

核酸探針之製備

取含有插入DNA片段的重組質體DNA大約1 μg，稀釋至終體積爲34 μl。將其置於沸水中煮5分鐘，使 DNA 雙股變單股後，迅速移置於冰上，約5分鐘後取出，並短暫的離心以集中混合液，依次序加入下列各溶液：10 μl 5X labeling mix (含有random biotinylated octamers)，5 μl dNTP mix (含有dNTPs 及bio-dUTP) 及1 μl DNA polymerase-Klenow fragment，於37℃處理1小時。加入5 μl的0.2M EDTA，pH 8.0以終止反應，並加入5 μl的4 M LiCl及150 μl的100%酒精置於-70℃冷凍櫃中，至少30分鐘將核酸探針沉澱下來。以10000 rpm離心10分鐘，將離心下來的沉澱物，以70%的冰酒精洗去多餘的鹽類，乾燥後溶於20 μl的TE緩衝液溶液中置於-20℃保存備用。

南方氏轉漬法

洋菜凝膠電泳分析後，將膠體置於0.2 N HCl漂洗5分鐘，進行去嘌呤作用 (depurine)。隨後將洋菜膠片置於變性溶液 (denature solution: 0.5 M NaOH; 1.5 M NaCl,

pH 7.5) 中漂洗30分鐘，使 DNA 由雙股變成單股。用去離子水漂洗膠體兩次再將洋菜凝膠置於中和溶液 (neutralization solution: 1 M Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5) 中漂洗30分鐘，以中和其鹼性。隨後剪下一塊與洋菜凝膠大小相當的Immobilon-S membrane，並將其以2倍的SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate) 緩衝液潤溼，使用MilliBlot™-VP vaccum transfer system (Millipore Americar Bionetics Inc., USA) 進行轉漬。使用20倍SSC緩衝液爲轉漬溶液，將DNA轉漬到上述薄膜上，置於乾淨的Whatman™ 3MM paper上，以80℃烘箱眞空烘乾30分鐘。完全乾燥後，置於UV Stratalinker 1000 (Stratagene™, USA)內進行聯結 (crosslink)，使DNA固定於濾膜上。加入30 ml的前雜合溶液 (prehybridization solution: 6X SSC, 5X Denhartes reagent, 0.5% SDS, 200 μl denatured salmon sperm DNA) 於68℃進行前雜合1小時，然後將已標幟好之核酸探針，用沸水煮5分鐘使其變性；再冰浴5分鐘維持其單股形態。之後加入前雜合反應溶液中，以相同條件下進行核酸雜合6-8小時。其後將薄膜取出以2X SSC，0.1% SDS溶液於室溫下漂洗5分鐘，並重複一次。再以0.1X SSC，0.1% SDS 溶液於68℃下漂洗兩次，每次15分鐘。然後將其置於另一個核酸雜合反應袋中，以便進行偵測反應。將 blocking solution（5% SDS; Phosphate buffer, pH 7.2）加入此雜合反應袋中，大約每平方公分的薄膜使用0.1 ml的溶液，在室溫下溫和的搖動約5分鐘，將其倒出後再加入streptavidin (以blocking solution稀釋至終濃度爲1 μg/ml，大約每平方公分的薄膜，使用0.05 ml)，在室溫下溫和的搖動，約5分鐘使其反應，隨後倒出此溶液，加入wash solution I （即blocking solution稀釋10倍，每平方公分的薄膜使用0.1 ml的溶液) 漂洗兩次，每次5分鐘。之後，倒去此溶液，加入 biotinylated alkaline phosphatase (以 blocking solution稀釋至終濃度爲0.5 μg/ml，並且每平方公分的薄膜使用0.05 ml) 搖晃反應5分鐘。再將此溶液倒出，以wash solution II (10mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, pH 9.5） 漂洗兩次，每次5分鐘。漂洗完後將其倒出，迅速加入1X Lumigen-PPD （每平方公分使用0.025 ml） 於雜合反應袋中，溫和的搖動約5分鐘，使其反應。打開雜合反應袋，將其內的溶液盡可能的倒出，並將袋子均勻壓平後封起來，以X-ray底片 (Amersham, Hyperfilm™-MP, USA) 進行壓片，大約1小時後可獲得最適當的訊號強度。

墨點漬染試驗法 (dot-blot assay)

取核酸樣本各1 μg，加上300 μl變性溶液 (denature buffer: 0.4N NaOH, 10 mM EDTA, pH 8.0) 於90℃的水浴煮10分鐘，再置於冰上5分鐘。將處理過後的核酸樣本以96孔墨點抽吸轉漬器MilliBlot™ Systems (Millipore Americar Bionetics Inc., USA) 使吸附於硝化纖維膜，並以紫外光照射固定DNA於濾膜上，再以核酸探針進行雜合反應。再藉由上述之偵測反應觀察雜合反應訊號強弱及產生與否。

結　果

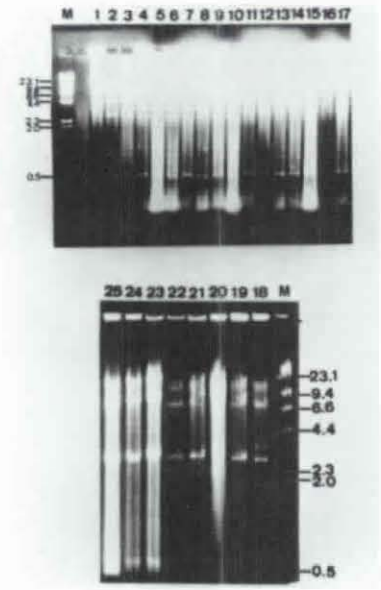
粒線體核酸限制酵素剪切片段多型性分析

以25株荔枝露疫菌菌株 (表一) 的粒線體核酸經*Eco*R I內限制酵素剪切後，將各菌株粒線體核酸剪切成5-6條片段。分子量分別爲0.6至14 Kb之間 (圖一)。另外，再取PL024菌株的粒線體核酸分別使用限制酵素：*Apa* I、*Bam*H I、*Bgl* II、*Bst* XI、*Cla* I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hinc* II、*Hind* III、*Kpn* I、*Nci* I、*Not* I、*Pst* XI、*Pvu* II、*Sac* I 及*Sca* I 進行剪切酵素處理，以 0.7% 的洋

菜凝膠進行電泳分析，PL024 粒線體核酸具有*Bgl* II、*Cla* I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hinc* II、*Hind* III、*Nci* I 、*Sac* I及*Sca* I 限制酵素的剪切切位 (圖二)。將經限制酵素剪切的粒線體核酸，以洋菜凝膠進行電泳分析後，再與 λ DNA經*Hind* III剪切的標準分子量片段進行估算，可以得知各片段的大小。PL024 菌株粒線體核酸用限制酵素：*Bgl* II / *Eco*R I、*Cla* I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hinc* II、*Hind* III、*Nci* I、*Sac* I / *Eco*R I 及 *Sca* I剪切後，可以算出其粒線體核酸總合分子量爲33-37 Kb之間 (表三)，有些經酵素剪切過的核酸片段小於 0.5 Kb，無法藉由電泳膠片估算出其分子量大小，故此先省略不予計算而用 "*" 標示。

粒線體核酸限制酵素剪切片段選殖

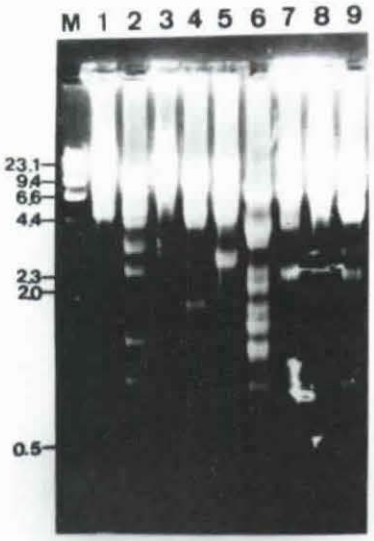
將 PL024 菌株的粒線體核酸分別以 *Eco*R I、*Sac* I / *Eco*R I、*Hinc* II 剪切後，回收小於1 Kb的核酸片段，與pUC18載體黏合後，經轉形作用 (transformation) 送入 *E.coli* DH5菌株中，使用X-gal，IPTG 及 ampicillin抗生素進行篩選，挑取白色菌落，以獲得含有插入粒線體核酸片段的選殖株。爲確定其選殖是否成功，乃將選殖株以小量製備方式抽取其質體 DNA，經限制酵素剪切後，進行電泳分析，除比較其分子量外，並將選殖株的插入片段以



圖一、25株露疫菌菌株其粒線體核酸經*Eco*R I限制酵素剪切後之電泳分析圖。

Fig. 1. Electrophoric separation of *Eco*R I-digested mtDNAs of 25 isolates from *Peronophythora litchii*.

M: Marker; λ DNA *Hind* III digested.The isolate was: Lane 1, PL001; Lane 2, PL002; Lane 3, PL003; Lane 4, PL004; Lane 5, PL005; Lane 6, PL006; Lane 7, PL007; Lane 8, PL009, Lane 9, PL010; Lane 10, PL011; Lane 11, PL012; Lane 12, PL013; Lane 13, PL014; Lane 14, PL016; Lane 15, PL017; Lane 16, PL018; Lane 17, PL019; Lane 18, PL020; Lane 19, PL021; Lane 20, PL022; Lane 21, PL023; Lane 22, PL024; Lane 23, PL025; Lane 24, PL026; Lane 25, PL027.



圖二、露疫菌PL024菌株粒線體核酸經不同限制酵素剪切後之電泳分析圖。

Fig. 2. Electrophoretic separation of restriction enzymes digested mtDNAs from *Peronophythora litchii*.

M: Marker; λ DNA digested with *Hind* III; Lane 1: with *Bgl* II digested; Lane 2: with *Cla* I digested; Lane 3: with *Eco*R I digested; Lane 4: with *Eco*R V digested; Lane 5: with *Hinc* II digested; Lane 6: with *Hinc* III digested; Lane 7: with *Nci* I digested; Lane 8: with *Sac* I digested; Lane 9: with *Sca* I digested

表三、露疫菌 PL024 菌株粒線體核酸限制酵素剪切片段長度

Table 3. Restriction fragment sizes (in kilo base pairs) of mtDNA of a isolate PL024 of *Peronophythora litchii*

Emzyme / Fragment	*Bgl* II/ *Eco*R I	*Cla* I	*Hinc* III	*Hind* III	*Eco*R I	*Eco*R V	*Nci* I	*Sac* I/ *Eco*R I	*Sac* I
1	13.369	9.997	11.848	11.512	13.411	12.811	13.849	13.632	11.275
2	9.568	8.329	6.557	6.149	11.021	8.316	8.384	7.200	6.960
3	4.397	5.046	4.88	3.784	6.979	4.511	6.165	5.987	4.900
4	3.907	4.145	4.361	3.239	2.791	3.829	4.121	4.622	4.361
5	2.987	3.019	2.838	2.376	0.604	1.947	2.513	2.746	2.974
6	0.599	2.430	2.659	2.072		1.831	0.619	1.099	2.455
7		1.334	0.767	1.684				0.767	0.985
8		0.962		1.483				0.564	
9				1.243					
10				1.168					
11				0.909					
12				0.757					
13									
14									
Total	34.82	35.24	33.91	36.37	34.81	33.25	35.65	36.62	33.91

GENECLEAN II Kit進行回收，製備成核酸探針，另外將露疫菌粒線體核酸，用同樣限制酵素剪切後，進行南方漬染分析，以確定其爲粒線體核酸上的選殖片段 (圖三)。結果選殖到A2-3、ES6、HC3、HC9四個選殖株。A2-3、ES6、HC3、HC9 選殖株的插入片段(insert fragment)大小分別爲0.6 Kb、0.6 Kb、0.4 Kb及0.65 Kb。經標幟過的核酸探針與25株露疫菌粒線體核酸以點漬分析方法進行雜合，結果與每株菌株都有反應。選殖株的插入片段經回收後，以 *Bgl* II、*Cla* I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hinc* II、*Hind* III、*Nci* I、*Sac* I 及*Sca* I 限制酵素剪切，以1.4%洋菜凝膠進行電泳分析。由限制酵素剪切的片段估算大小後，可得其相關的限制酵素切位，進而得到限制酵素的圖譜 (restriction mapping)(圖四)。

篩選專一性核酸探針

本研究利用四組選殖露疫菌核酸片段與*Phytophthora* spp.總量核酸進行 南方氏轉漬雜合反應，以分析其是否對露疫病菌具有高專一性。結果HC3 核酸探針只與Pal A2 (*Phytophthora palmivora*)有雜合反應；A2-3 核酸探針除了Pcrc、Pcr (*Phytophthora cryptogea*)菌種外，都有雜合反應；HC9核酸探針與Par 1 (*P. parasitica*)、Pal A2 (*P. palmivora*)、Pcr (*P. cryptogea*)、Pcitro (*P. citrophthora*)及Pd (*P. drecheleri*)菌有雜合反應；而ES6核酸探針則與這 18株測試菌株都無雜合反應 (圖五)。

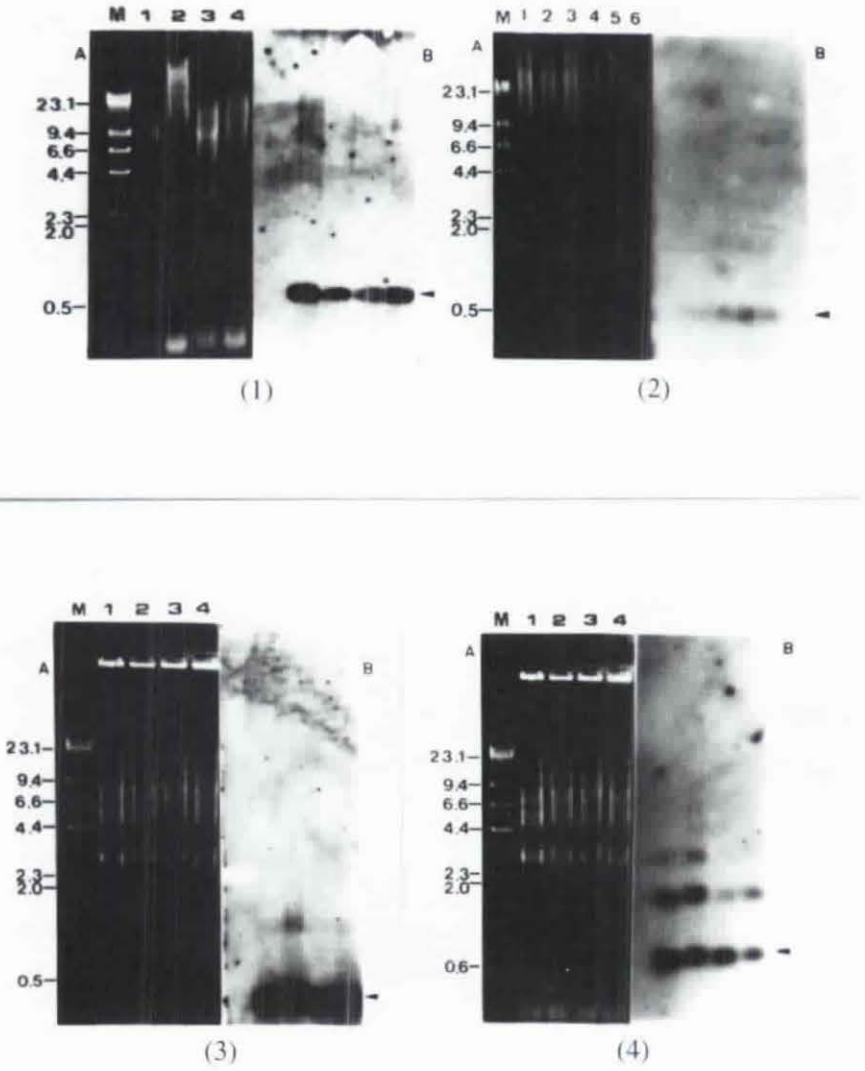
另外分別將此四個核酸探針與16株 *Pythium* spp.(表三) 的總量核酸進行點漬雜合作用。結果A2-3與P8、P10、P16、P22、P23、P25、P90及P263有雜合反應。HC9與P8、P10、P16、P18、P22、P25、P30、P90、P211、P263及P118皆有雜合反應。HC3核酸探針除了P2、P8、P43、P118以外都有雜合反應，而ES6與各菌株沒有明顯的雜合訊息出現 (表四)。

核酸探針品質評估

取PL024菌株之粒線體核酸1 μg，做一系列的10倍稀釋 (核酸濃度1 μg ~1 fg)，經點漬分析與ES6核酸探針進行雜合反應，結果核酸探針能偵測到100 fg濃度的露疫菌粒線體核酸反應。

討　論

由露疫菌PL024菌絲粒線體核酸經 *Eco*R I 、(*Eco*R I + *Sac* I)及*Hinc* II 所選殖到的A2-3、ES6、HC3及HC9選殖核酸片段，皆與露疫病菌具有雜合反應。由這些片段製成的核酸探針與17株*Phytophthora*及*Pythium splendens*進行核酸探針專一性測試，結果ES6與各菌株沒有明顯的雜合反應；A2-3核酸探針除了Pcrc及Pcr菌株外都有雜合反應、HC3、HC9核酸探針與 *Phytophthora* spp.及*Pythium splendens*有不同程度之雜合反應。另外將A2-3、HC3、HC9及ES6核酸探針與16株*Pythium* spp. (表二)，進行墨點分析方法，結果A2-3、HC3與HC9這16株 *Pythium* spp.多少都有雜合交互作用，四個核酸探針對P3及P23都沒有雜合交互作用。A2-3、HC3、HC9核酸探針與16株*Pythium* spp.(表二) 有不同程度的雜合訊號。在四個探針與17株*Phytophthora* spp.及*Pythium splendens*之全量核酸的南方雜合反應中，發現ES6與各菌株間沒有明顯的雜合訊息。總括上述三種雜合反應結果，ES6核酸片段爲目前較符合本研究要求之核酸探針。另本研究未來應以收集更多露疫菌及*Phytophthora*、*Pythium*菌株，以進行南方墨點漬染法偵測分析，以確立核酸探針的專一性。目前在核酸探針品質評估方面，經點漬試驗發現，ES6核酸探針的靈敏度可測到100 fg濃度的露疫菌粒線體核酸之存

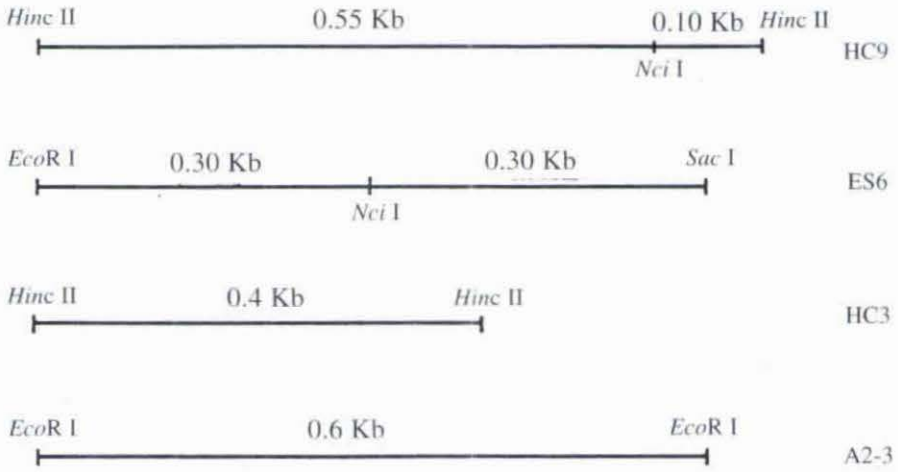


圖三、經限制酵素剪切之露疫菌粒線體核酸與核酸探針的核酸雜合分析。(1) 經*Eco*RI處理的粒線體核酸與核酸探針A2-3之南方雜合反應；(2) 經*Eco*R I/ Sac I (Lane 1-5)、*Eco*R I (Lane6) 處理的粒線體核酸與核酸探針ES6之南方雜合反應；(3) 經*Hinc* II處理的粒線體核酸與核酸探針HC3之南方雜合反應；(4) 經*Hinc* II處理的粒線體核酸與核酸探針HC9之南方雜合反應。A：電泳分析圖；B：南方雜合反應；M：Marker：以*Hind* III剪切之 λ DNA。

Fig. 3. *Peronophythora litchii* mtDNA restriction fragments hybridized to DNA probes. (1) *Eco*RI digests hybridized to A2-3 probe; (2) *Eco*R I/ *Sac* I (Lane 1-5), *Eco*R I (Lane 6) digests hybridized to ES6 probe; (3) *Hinc* II digests hybridized to HC3 probe; (4) *Hinc* II digests hybridized to HC9 probe.

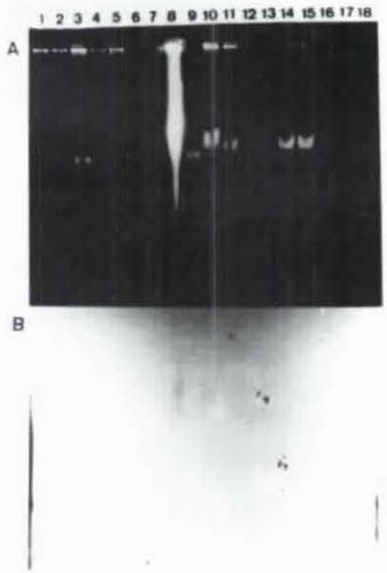
A: Electrophoric analyses pattern; B: Southern bolt hybridization

M: Marker, λ DNA/ *Hind* III digested. (1) Lane 1: PL024, Lane 2: PL001, Lane 3: PL002, Lane 4: PL003; (2) Lane 1: PL005, Lane 2: PL006, Lane 3: PL007 Lane 4: PL024, Lane 5: PL009, Lane 6: PL024; (3) Lane 1: PL024, Lane 2: PL012, Lane 3: PL013, Lane 4: PL014; (4) Lane 1: PL016, Lane 2: PL017, Lane 3: PL024, Lane 4: PL018.



圖四、核酸探針A2-3、ES6、HC3、HC9之限制酵素圖譜。

Fig. 4. Restriction maps of probes A2-3, ES6, HC3 and HC9.



圖五、核酸探針ES6與17株*Phytophythora* spp.及*Pythium splendens*之全量核酸的雜合反應。菌種編號請參見表二。A：電泳分析圖；B：南方雜合反應。

Fig. 5. *Phytophythora* spp. and *Pythium splendens* total DNAs hybridized to probe ES6.

A: Electrophoretic analyses pattern; B: Southern blot hybridization. Lane 1: Par 1, Lane 2: Par 4, Lane 3: PPCa 4-5-1, Lane 4: Par 7-2, Lane 5: Par 9373, Lane 6: Par 90174, Lane 7: Pal A1, Lane 8: Pal A2, Lane 9: Pcr, Lane 10: Pcrc, Lane 11: Pca, Lane 12: Pcol, Lane 13: Pcitri, Lane 14: Pcitro, Lane 15: Pcap, Lane 16: Pd, Lane 17: Pme, Lane 18: Psp.

表四、核酸探針ES6、A2-3、HC3、HC9與16株腐霉菌種 (*Pythium* spp.) 及1株疫病菌種 (*Phytophythora palmivora*) 的全量核酸進行點漬雜合測試之結果

Table 4. Results of dot blotting of total DNAs from 16 isolates of *Pythium* species and *Phytophythora palmivora* probed with DNA probes ES6, A2-3, HC3 and HC9

Isolates[1)]	DNA Probes			
	ES6	A2-3	HC3	HC9
Phytophythora palmivora	-2)	+/-	+/-	+/-
Pythium splendens	-	+/-	-	+/-
Pythium aphanidermatum	-	+/-	+/-	+/-
Pythium coloratum	-	+/-	+/-	-
Pythium deliense	-	+	-	+
Pythium mamillatum	-	+	+	+
Pythium paroecandrum	-	+	+	+/-
Pythium torulosum	-	-	-	+
Pythium ultimum var. *ultimum*	-	+	+/-	+
Pythium dissotocum	-	+	+	+/-
Pythium catinulatum	-	+	+	+
Pythium spinosum	-	+/-	+	+
Pythium periilum	-	+/-	-	-
Pythium myriotylum	-	+	+/-	+
group F	-+/-	+/-	-	
group G	-	+	+/-	+
Pythium irregulare	-	+/-	-	+/-

1) The isolates were listed in Table 2.

2) +: postitive signals; -: no signals; +/-: the very weak hybridization signals.

在，利用ES6核酸探針直接偵測植株本身是否感病，此靈敏度最少可偵測多少數量病原菌存在，目前正由後續實驗進行中。本研究或可將現在製備完成的核酸探針，藉由核酸序列解讀及引子 (primer) 設計，再輔以生物技術，諸如 *in situ* PCR與單元抗體 (monoclonal antibody) 之應用，發展出更快速，更靈敏的偵測方法，以達本研究專一性核酸探針偵測的最終目的。

ES6核酸探針與A2-3核酸探針其分子量大小相近，經由限制酵素圖譜分析，兩者差異頗大。且由南方雜合反應結果知道，其兩者並無同源性。而HC9核酸探針與露疫菌做南方雜合反應，結果除了本來的雜合帶之外，另有其他雜合帶，推測此菌株之粒線體核酸可能有多於一個複本 (copy number) 之HC9 DNA片段。或可利用這些核酸探針在RFLP分析與南方墨點法之差異程度比較露疫菌菌株間或與卵菌間的歧異度與親緣關係，與現今卵菌分類法相互比較，爲菌株分類與鑑定提供一新的依據。

謝　辭

本研究承蒙中興大學植病系曾主任德賜教授及周俊吉先生多所協助，在此誌謝。本研究承行政院農委會計劃 86 科技-1.1-糧-43(2) 輔助經費，特此致最大謝忱。

引用文獻

1. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1980. Oospore germination of *Peronophythora litchii*. Mycologia 72: 611-614.
2. Chen, C. C. 1961. A species of *Peronophythora* gen. Nov. parasitic on litchi fruit in Taiwan. Special Publ. Coll. Agric., Natl. Taiwan Univ. 10: 1-37.
3. Garber, R. C., and Yoder, O. C. 1983. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal and plasmid components. Anal. Biochem. 135: 416-422.
4. Goodwin, P. H., Kirkpatrick, B. C., and Duriway, J. M. 1989. Cloned DNA probe for identification of *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 79: 716-721.
5. Ho, H. H., Jiayun, L., and Longyin, G. 1984. Observation on asexual reproduction by *Peronophythora litchii*. Mycologia 76: 745-747.
6. Kao, C. W., and Leu, L. S. 1980. Sporangium germination of *Peronophythora litchii*, the causal organism of litchi downy blight. Mycologia 72: 737-748.
7. Kim, D. H., Martyn, R. D., and Mafill, C. W. 1992. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* sp. *niveum*. Phytopathology 82: 346-353.
8. Ko, W. H., Chang, H. S., Su, H. J., Chen, C. C., and Leu, L. S. 1978. Peronophythoraceae, a new family of Peronosporales. Mycologia 70: 380-384.
9. Martin, F.N. 1991. Selection of DNA probes useful for isolate identification two *Pythium* spp. Phytopathology 81: 742-746.
10. Martin, F. N., and Kistler, H. C. 1990. Species-specific banding pattern of restriction endonuclease-digested mitochondeial DNA from the genus *Pythium*. Exp. Mycol. 14: 32-46.
11. Stammler, G., Seemuller, E., and Duncan, J. M. 1993. Analysis of RFLPs in nuclear and mitochondrial DNA and taxonomy of *Phytophthora fragariae*. Mycol.Res. 97: 150-156.
12. Whisson, S. C., Macelean, D, J., Manners, J. M., and Irwin, J. A. G. 1992. Genetic relationships among Australian and North American isolates of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* assessed by multicopy DNA probes. Phytopathology 82: 863-868.

ABSTRACT

Chen, L. C.[1], Lai, S. C.[1], Lee, C. C.[1], Chung, Y. W.[1], Yeh, Y.[2], and Ann, P. J.[3] 1998. Cloning and analysis of mtDNA probes of *Peronophythora litchii*. Plant Prot. Bull. 40: 95-108. ([1]Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; [2]Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, R.O.C.; [3]Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

The mtDNA of *Peronophythora litchii* PL024 was digested with *Eco*R I, *Hin*c II and *Eco*R I / *Sac* I, and the DNA fragments were ligated with vector pUC18. And then the recombinated plasmids were transformated into *E. coli* DH5 α. There were four recombinat clones, designed as A2-3, HC3, HC9 and ES6 respectively. Their sizes are 0.6, 0.4, 0.65 and 0.6 kb. Probes A2-3, HC3, HC9 and ES6 showed strong signals in dot blot hybridization with 25 *P. litchii* isolates. Four probes hybridized with 17 *Phytophthora* isolates and *Pythium splendens*, and none of any hybridization signals were detected except probe A2-3. None of any hybridization signals was detected as ES6 probe hybridized with 17 *Phytophthora* isolates. Probe A2-3 hybridized with 17 *Phytophthora* isolates except *Phytophthora cryptogea*. Specificity of probe ES6 to *P. litchii* was higher than A2-3, HC3, HC9. In dot blotting analysis, a weak hybridization signals were shown when these four probes hybridized with 16 *Pythium* isolates, and ES6 probe was sensitive to mtDNA of *Peronophythora litchii* in concentration of 100 fg.

(Key words: *Peronophythora litchii*, mtDNA, DNA probes, dot blot hybridization)