草莓萎凋病菌之分子檢測技術

張碧芳[1,2,*]、張道禾[1,2]、林盈宏[3,4]、林雯琪[1]、李玟儀[1]、張文苡[1]、楊子葳[3]
[1.] 國立中興大學植物病理學系
[2.] 國立中興大學永續農業創新發展研究中心
[3] 國立屏東科技大學植物醫學系
[4] 國立屏東科技大學植物醫學教學醫院
* 聯繫人 E-mail: pfchang@nchu.edu.tw

摘　要

本研究團隊於 2017-2018 年期間利用前人所設計之引子對 FofraF/FofraR 進行聚合酵素連鎖反應（PCR），測試其對臺灣本土草莓萎凋病菌 （*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *fragariae* Winks & Williams, Fofra） 之專一性，結果顯示以 FofraF/FofraR 引子對進行 PCR 除對供試的臺灣本土草莓萎凋病菌之再現性不佳，且在西瓜蔓割病菌（*F. oxysporum* f. sp. *niveum*）、番茄萎凋病菌（*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*）和香蕉黃葉病菌（*F. oxysporum* f. sp. *cubense*）等菌株也曾產生大小相近的增幅片段，確定 FofraF/FofraR 引子對並不適用於檢測臺灣草莓萎凋病菌。然而菌株樣品若同時利用 2019 年新發表的 Frag_F/Frag_R 引子對和前述 FofraF/FofraR 引子對與韓國學者再設計之 Fofra qF/Fofra qR 引子對分別進行 PCR，因其針對草莓萎凋病菌之再現性不佳，仍需接種草莓確認其病原性。故臺灣草莓萎凋病菌之檢測技術仍需要繼續研究，希望未來能開發出對草莓萎凋病菌具專一性且再現性佳的分子檢測技術。

關鍵詞：分子檢測、草莓、草莓萎凋病菌、聚合酵素連鎖反應

引　言

草莓學名為 *Fragaria* × *ananassa* Duchesne，是薔薇科（Rosaceae）、草莓屬（*Fragaria*）的多年生草本作物，性喜冷涼，生長在溫帶地區如日本、韓國、澳洲等地。草莓風味佳且含有多種養分，深受國人喜愛，是重要的經濟作物之一。根據統計至 2018 年為止，臺灣草莓的栽培面積約為 500 公頃，在臺灣的總產值已經超過 14

億。僅在苗栗地區的栽種面積就有 454 公頃，尤其集中在大湖地區（行政院農業委員會，2018）。草莓為大湖地區重要的經濟作物，也是最重要的觀光休閒產業。然而自 2012 年開始，臺灣苗栗縣大湖、獅潭及其他草莓栽種地區已經陸續發現新的草莓病害，經鑑定為草莓萎凋病，由草莓萎凋病菌（*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *fragariae* Winks & Williams，簡稱 Fofra）所引起，其病徵包括：植株矮化、新葉偏上生長、黃化、葉部萎凋乾枯、冠部及根部壞疽、維管束褐化，最後導致植株死亡（陳等人，2017）。此真菌病原最早在西元 1965 年於澳洲首次報導（Winks and Williams, 1965），隨後相繼在於日本、韓國、西班牙、中國和美國等地陸續有草莓萎凋病的報導（Okamoto et al., 1970; Kim et al., 1982; Arroyo et al., 2009; Zhao et al., 2009; Koike et al., 2009; Williamson et al., 2012）。臺灣安氏等人於 2012 年曾有草莓萎凋病的初步報導（安等人，2012），而國立中興大學植物病理學系黃振文教授研究室已經從罹病的草莓植株分離出超過 30 株的草莓萎凋病菌分離株，並確定該些菌株為有寄主專一性之草莓萎凋病菌（陳等人，2017）。

鐮孢菌（*Fusarium* spp.）是廣泛存在自然界的真菌，其中又以尖鐮孢菌 *F. oxysporum* Snyder & Hanson 引起的病害為最嚴重，可以感染超過 100 種植物（Armstrong and Armstrong, 1981; Smith, 2007），然而目前尚無有效的化學藥劑來防治由尖鐮孢菌引起的作物萎凋病，且 *F. oxysporum* 可以藉由厚膜孢子於土壤中存活達數十年之久，難以滅除，往往造成各連作田中作物萎凋或蔓割病害大發生，因此，種植抗病品種或以抗病根砧嫁接，是最好的防治方法（陳等人，2003）。然而在沒有抗病品種或合適的抗病根砧之下，防止病原菌進入田間是最根本的方法，因此開發快速檢測作物萎凋病菌以達到正確偵測與診斷非常重要。

日本 Suga 等學者曾發表對草莓萎凋病菌具專一性的引子對供聚合酵素連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）檢測（Suga et al., 2013），但由於臺灣氣候較日本溫暖潮濕，病原菌的變異度較大，因此本研究團隊在 2017-2018 年執行防檢局計畫期間持續收集臺灣的草莓萎凋病菌株，以日本發表之 PCR 法測試其對臺灣菌株之適用性及專一性，並希望以 Random Amplified Polymorphic DNA（RAPD）特異性 DNA 條帶或 rDNA 定序比對序列之差異等方式來找出對臺灣草莓萎凋病菌具專一性的序列，進而設計 PCR 引子對，以開發臺灣草莓萎凋病菌之專一性 PCR 檢測技術。

材料與方法

真菌核酸萃取

真菌核酸 DNA 之萃取採用洪氏等人（2008）之傳統核酸萃取法、市售之核酸萃取套組（Genomic purification kit, GeneMark, Taiwan）或利用微波爐法快速萃取核酸。洪氏等人（2008）的方法取 1 g 之乾燥菌絲進行核酸萃取；核酸萃取套組方法參照該套組所附之操作流程，以約 30 mg 之凍乾菌絲進行核酸萃取；微波爐快速萃取核酸法修改參照 張景宜 (2005) 與 Saini 等人（1999）的方法，以無菌牙籤沾取培養基中之菌絲，並將菌絲混入 200 μL 之萃取液 （TE buffer; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0），於 1.5 mL 微量離心管中 均勻震盪後，以功率為 600 W 之微波爐在全功率下加熱處理一分鐘後，將粗萃取液置於冰上一分鐘，高速離心（17,000 × g, 5 分鐘）後取上清液用做後續之分析。

聚合酵素連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）

將前述所萃取之 DNA 稀釋十倍後取 1 μL（約 10 ng）作為 PCR 之模板（template） DNA，所使用之 PCR 引子對如表一，其中 FnSc-1/FnSc-2 為適用於所有尖鐮孢菌 *F. oxysporum* 之專一性引子對，其他引子對為前人發表可檢測草莓萎凋病菌 Fofra 之專一性引子對。PCR 反應條件如表一所示，結束後再以 72° C 延伸 10 分鐘完成 PCR 反應。之後以 1.5 或 2.5% 瓊脂膠體電泳分析 PCR 產物之核酸條帶，預期合成片段大小如表一所示。

隨機增幅多型性核酸（Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD）技術

將前述所萃取之 DNA 取 1 μl 作為 PCR 之模板（template）DNA。參考 Lin 等人於 2009 與 2010 年（Lin et al., 2009; 2010）發表針對 *F. oxysporum* 所設計之 RAPD 引子對進行增幅。PCR 反應條件為 94℃ 90 秒；之後以 94℃ 30 秒，分別以 36℃ 30 秒 5 次、34℃ 30 秒 5 次及 32℃ 30 秒 20 次，於 72℃下反應 1 分鐘，共計 30 個循環，結束後再以 72℃延伸 10 分鐘完成 PCR 反應。 以 1.5% 瓊脂膠體電泳分析 RAPD 產物之核酸條帶，尋找差異性片段。

結果與討論

本研究團隊先以 2013 年日本學者發表之 FofraF/FofraR 引子對（Suga et al., 2013）進行 PCR 測試所蒐集到的草莓萎凋病菌（Fofra），但發現經接種測試對草莓有病原性的 Fofra 菌株，有部分無法以 FofraF/FofraR 引子對增幅出 239 bp 的目標條帶（其序列如圖一），或是部分 Fofra 菌株的 PCR 結果再現性不佳，甚至曾在西瓜蔓割病菌（*F. oxysporum* f. sp. *niveum*，簡稱 Fon）、番茄萎凋病菌（*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*）和香蕉黃葉病菌（*F. oxysporum* f. sp. *cubense*）等樣品中增幅出大小約 239 bp 的 DNA 條帶，其中 Fon 的 DNA 條帶經定序後，和 Fofra 的目標核酸序列只有少數幾個單一核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism，SNP）位點。因此確定 FofraF/FofraR 引子對無法適用於檢測臺灣草莓萎凋病菌株，後續以隨機增幅多型性核酸（RAPD）技術，尚未篩選到可以利用之專一性核酸片段。

而 2018 年，韓國學者以日本學者發表之 FofraF/FofraR 引子對所增幅出的 239 bp 目標片段，從中設計出 Fofra qF/Fofra qR 引子對（Hong et al., 2018），以該引子對進行 PCR 可以在 Fofra 菌株樣品中增幅出 123 bp 的目標條帶（其序列如圖一），並開發出定量 PCR 檢測技術，以這組引子對來測試臺灣的菌株，也不完全適用。

此外，美國加州有一群學者在 2019 年發表一個可供偵測 Fofra 的基因座，並設計出 Frag_F/Frag_R 引子對（Burkhardt et al., 2019），以該引子對進行 PCR 可以在 Fofra 菌株樣品中增幅出 176 bp 的目標條帶（其序列如圖二），但似乎比日本學者發表的 FofraF/FofraR 引子對更不適用於臺灣的菌株。

本研究團隊的初步結果顯示，如果以日本學者發表的 FofraF/FofraR 引子對，搭配美國學者發表的 Frag_F/Frag_R 引子對，再加上韓國學者重新設計的 Fofra qF/Fofra qR 引子對進行三個單獨的 PCR，分別可獲得 239 bp、176 bp 和 123 bp 的目標條帶，則可以確定是草莓萎凋病菌株。即三種引子對都有在 PCR 增幅出目標條帶者確認是草莓萎凋病菌；只有 1-2 組引子對可以 PCR 增幅出目標條帶者不一定是草莓萎凋病菌；而 PCR 都沒有增幅出目標條帶者也不一定不是草莓萎凋病菌，應由後續接種試驗證實是否為草莓萎凋病菌。

結　語

病害防治首重病原菌的診斷鑑定，確定發病原因才能對症下藥，然而草莓萎凋病目前無防治藥劑，其病原菌又是可以厚膜孢子殘存於土壤數十年的尖鐮孢菌，尤其容易因為農民的走動（鞋子或衣物沾附帶菌土壤、植物殘體或介質）、操作器械工具、灌溉水及無病徵的走莖或幼苗而傳播，因此開發快速又準確的草莓萎凋病菌分子檢測技術實為必須，由於目前已發表的三種供試引子對針對草莓萎凋病菌之 PCR 結果再現性不佳，仍需後續接種試驗證實其病原性。未來希望能夠開發出更專一且再現性佳之分子檢測技術，避免臺灣草莓產業受到草莓萎凋病的危害。

參考文獻

1. 行政院農業委員會。2018。107 年農業統計年報。行政院農業委員會編印。台北。
2. 安寶貞、蔡志濃、徐子惠、楊正偉、林筑蘋。2012。草莓萎凋病之研究初報。植物病理學會刊 21: 148-149。
3. 洪爭坊、張碧芳、黃久菱、萬宥伶、黃振文。2008。萵苣萎凋病菌的生理小種鑑定與抗病品種篩選。植物病理學會刊 17(3): 233-242。
4. 張景宜。2005。香蕉黃葉病菌的分子鑑定及其於罹病香蕉苗之偵測技術。中興大學植物病理學碩士論文。84 頁。
5. 陳甘澍、劉政道、張碧芳、黃振文。2003。西瓜抗蔓割病品種之篩選與其抗病遺傳分析。植物病理學會刊 12(3): 173-180。
6. 陳冠霖、張碧芳、黃振文。2017。臺灣草莓萎凋病菌之生理生化特性分析。植物醫學 59(4): 13-22。DOI:10.6716/JPM.201712_59(4).0003
7. Armstrong, G. M. and J. K. Armstrong. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy (Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Cook, R.J. Eds.). Pages 391-399. University Park, PA: Penn. State Univ. Press, 457 pp.
8. Arroyo, F. T., Y. Llergo, A. Aguado, and F. Romero. 2009. First report of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on strawberry in Spain. Plant Disease 93(3): 323. DOI: 10.1094/PDIS-93-3-0323B
9. Burkhardt, A., P. M. Henry, S. T. Koike, T. R. Gordon, and F. Martin. 2019. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* from infected strawberry plants. Plant Disease 103(5):1006-1013. DOI: 10.1094/PDIS-08-18-1315-RE.
10. Hong, S. W., D.-R. Kim, J. S. Kim, G. Cho, C. W. Jeon, and Y.-S. Kwak. 2018. Development qRT-PCR protocol to predict strawberry Fusarium wilt occurrence. The Plant Pathology Journal 34(3): 163-170. DOI: 10.5423/PPJ.OA.12.2017.0265.
11. Kim, C. H., H. D. Seo, W. D. Cho, and S. B. Kim. 1982. Studies on varietal resistance and chemical control to the wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum*. Korean Journal of Plant Protection 21(2): 61-67.
12. Koike, S. T., S. C. Kirkpatrick, and T. R. Gordon. 2009. Fusarium wilt of

strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. Plant Disease 93(10): 1077. DOI: 10.1094/PDIS-93-10-1077A.

13. Lin Y.-H., J.-Y. Chang, E.-T. Liu, C.-P. Chao, J.-W. Huang, and P.-F. L. Chang. 2009. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. European Journal of Plant Pathology 123(3): 353–365. DOI: 10.1007/s10658-008-9372-4.
14. Lin, Y.-H., K.-S. Chen, J.-Y. Chang, Y.-L. Wan, C.-C. Hsu, J.-W. Huang, and P.-F. L. Chang. 2010. Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. New Biotechnology 27(4): 409-418. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.05.005.
15. Saini, H. S., M. Shepherd, and R. J. Henry. 1999. Microwave extraction of total genomic DNA from barley grains for use in PCR. Journal of the Institute of Brewing 105(3): 185-190. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00018.x.
16. Smith, S. N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus Fusarium with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. Plant Pathology Bulletin 16: 97-120.
17. Suga, H., Y. Hirayama, M. Morishima, T. Suzuki, K. Kageyama, and M. Hyakumachi. 2013. Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Plant Disease 97(5): 619-625. DOI: 10.1094/PDIS-07-12-0663-RE.
18. Okamoto, H., S. Fujii, K. Kato, and A. Yoshioka. 1970. A new strawberry disease ‘Fusarium wilt’. Plant Protection Science 24: 231-235.
19. Williamson, M., D. Fernandez-Ortuno, and G. Schnabel. 2012. First report of Fusarium wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in South Carolina. Plant Disease 96 (6): 911. DOI: 10.1094/PDIS-02-12-0164-PDN.
20. Winks, B. L. and Y. N. Williams. 1965. A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science 22: 475-479.
21. Zhao, X., W. Zhen, Y. Qi, X. Liu, and B. Yin. 2009. Coordinated effects of root autotoxic substances and *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *fragariae* on the growth and replant disease of strawberry. Frontiers of Agriculture in China 3 (1): 34-39. DOI: 10.1007/s11703-009-0006-1

表一、 草莓萎凋病菌之 PCR 引子和反應資訊

Table 1. PCR primer and program information for *Fuarium oxysporum* f. sp. *fragariae*

Primer name	Primer sequence (5'-3')	PCR program	Product size (bp)	References
FnSc-1 FnSc-2	TACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAG TTGAGGAACGCGAATTAACGCGAGTC	94˚C 90 s 94˚C 30 s, 62˚C 30 s, 72˚C 60 s (30 cycles) 72˚C 10 min	327	Lin et al., 2010
Fofra qF Fofra qR	TTCGCTCCTCCCATACAA AAACCACGCAGAGAGTAAA	95˚C 1 min 95˚C 15 s, 51˚C 15 s, 72˚C for 45 s (40 cycles)	123	Hong et al., 2018
FofraF FofraR	CAGACTGGGGTGCTTAAAGTT AACCGCTAGGGTCGTAACAAA	94˚C 2 min 94˚C 1 min, 63˚C 1 min, 72˚C 1 min (30 cycles)	239	Suga et al., 2013
Frag_F Frag_R	GTGAGACGGACATCTTGAAG AGGAACATTTCCAGCACCGA	95˚C 2 min 95˚C 30 s, 56˚C 30 s, 72˚C 30 s (35 cycles) 72˚C 5 min	176	Burkhardt et al., 2019

CACGATTCACACTAATATCTGACACCACCAGACTGGGGTGCTTAAAGTTTAT

FofraF

TACCATCCAGGACCACCTAATGCATAACTAAAATTTCGCTCCTCCCATACAAA

Fofra qF

ATCCAAATTTTGATGTCCACAAAAAGGCCCGATTCTCAATTAATAAATGAGA

CTTTGGAGAAAGTTTCTAGAAAATTGCTCAAATTTTACTCTCTGCGTGGTTT

Fofra qR

TTTGACCTCCCGACCGCTGCGTGTGCGCTGGCAGTGCTTTGTTACGACCCT

FofraR

AGCGGTTA

Adapted from Suga et al 2013 and Hong et al 2018

圖一、Suga 等人於 2013 年發表使用 HanRC 與 SkippyFC 引子對增幅所得之草莓萎凋病菌 DNA 片段。綠色區塊為 FofraF/FofraR 引子對序列，黃色區塊為 Hong 等人於 2018 年發表的 Fofra qF/Fofra qR 引子對序列

Fig. 1. Sequence of DNA fragment of *Fuarium oxysporum* f. sp. *fragariae* amplified by HanRC and SkippyFC primer sets published by Suga et al. (2013). Those boxed in green are FofraF/FofraR primers. Those boxed in yellow are Fofra qF/Fofra qR primers published by Hong et al. (2018)

ACAGGAGTGTTAGCCGTTTCAAAATAGTGCGTCCTGTCTCCCCCTCTCGAGCTCGTGCGTGC

AAGAACAATATAGGATCGTGCTGTTGATAGACTTACTTTGAACAAAGAAGTGTGTCACCGCC

CATGCGCATCCCAAGTGAGACGGACATCTTGAAGCAAGGAAGCGGACCCAGTGTCTTGGG

Frag_F

AGTTCTCATCAACCTTGGCGACATTGATGCTGCCACTTGCCTTTGGGCTCTGGATACTAACTC

CAGCAGCAATTCGAGTGCGATCCTTGACTTGATCGAGATGGGAAGTTTCGGTGCTGGAAAT

Frag_R

GTTCCTTGTACTATGCAAGAAACCACCCAGTGTGAATTGAGAAACAAATACGGATCCTGCA

GGCAAAAGACTTGGGTTAGCAACATGCACGTAA

Adapted from Burkhardt et al 2019

圖二、Burkhardt 等美國加州學者於 2019 年發表一段可供偵測草莓萎凋病菌之基因座，供設計 PCR 檢測引子對之用。紫色區塊為 Frag_F/Frag_R 引子對之區域

Fig. 2. A gene locus of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (Fofra) suitable for Fofra detection was used to design primers by Burkhardt et al. (2019). Those boxed in purple are Frag_F/Frag_R primers

Molecular Technique for *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*

Pi-Fang Linda Chang[1,2,*], Tao-Ho Chang[1,2,] Ying-Hong Lin[3,4,] Wen-Chi Lin[1],
Wen-Yi Li[1], Wen-Yi Chang, and Zi-Wei Yang[3]
1Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, R. O. C.
2Innovation and Development Center of Sustainable Agriculture (IDCSA), National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, R. O. C.
3Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R. O. C.
4Plant Medicine Teaching Hospital, General Research Service Center, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R. O. C.
*Corresponding author, E-mail: pfchang@nchu.edu.tw

Abstract

We assessed the specificity of the FofraF/FofraR primer pair from previous report to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (Fofra) in Taiwan via polymerase chain reaction (PCR) in 2017 and 2018. Results showed that using primer pair FofraF/FofraR for PCR could not generate reproducible results on the tested isolates of Fofra. Besides, FofraF/FofraR primer pair could produce DNA fragment of similar size in some other isolates such as F. *oxysporum* f. sp. *niveum, F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, and *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. It was obvious that FofraF/FofraR primer pair was not suitable for Fofra detection in Taiwan. When the Frag_F/ Frag_R primer pair was reported in 2019, this primer pair together with the above-mentioned FofraF/FofraR primer pair, and the redesigned Fofra qF/Fofra qR primer pair from Korea were used for PCR separately on the same isolates, the results still showed poor reproducibility. Therefore, the pathogenicity of Fofra isolates to strawberry still depends on the inoculation technique. Further study to develop the PCR detection technique for Fofra with specificity and reproducibility in the near future is warranted in Taiwan.

Key words: Fusarium oxysporum f. sp. fragariae, molecular detection, polymerase chain reaction, strawberry