

比較以PCR為基礎之方法檢測臺灣甜瓜帶萎凋病菌 種苗之效率

張再得¹、吳榮彬²、蘇士閔³、林盈宏^{1*}

¹ 國立屏東科技大學植物醫學系，屏東縣，臺灣

² 國立臺東專科學校園藝暨景觀科，臺東縣，臺灣

³ 行政院農業委員會種苗改良繁殖場，台中市，臺灣

* 聯絡作者，E_mail: pmyhlin@mail.npust.edu.tw

摘要

張再得、吳榮彬、蘇士閔、林盈宏。2020。比較以PCR為基礎之方法檢測臺灣甜瓜帶萎凋病菌種苗之效率。植物醫學62(1): 1-12。

由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) 所引起的甜瓜萎凋病為甜瓜栽培過程中的限制因子。Fom 能以種子進行傳播，且臺灣曾有 Fom race 2 感染甜瓜之記錄，為了減少 Fom 傳播所造成之經濟損失，有效的種子與種苗健康檢測法可在甜瓜種植前或種子（苗）出口前及早偵測種苗或種子帶菌情形，將有助於避免此病原菌的傳播與危害。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 與即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)，因具有快速、高靈敏、高專一性的特點，近年來被大量的用於植物病原的檢測工作上。本研究使用國際上已發表對 Fom race 2 具專一性引子對 Fa15F/Fa15R，開發出臺灣甜瓜萎凋病菌帶菌種子之檢測方法，係利用一般 PCR 技術 (conventional PCR)、SYBR green 螢光染劑即時定量聚合酶連鎖反應技術 (SYBR green-based real-time PCR) 及 TaqMan probe 螢光染劑即時定量聚合酶連鎖反應技術 (TaqMan probe-based real-time PCR)，開發出適用於臺灣甜瓜萎凋病中常見的 Fom 菌株與帶菌種子之檢測方法。結果顯示，本研究開發之檢測方法皆可有效檢測出 10% 至 50% 帶菌率之甜瓜種子；另在甜瓜帶菌幼苗檢測中，檢出率以 SYBR green-based real-time PCR 之檢測方式，針對幼苗下胚軸檢體達 100%，為最高檢出率之系統。未來將進一步利用本研究開發的甜瓜萎凋病菌檢測技術應用在甜瓜種子及種苗診斷偵測實務上，以降低病原菌之危害衝擊。

關鍵詞：甜瓜病害、防檢疫、病原真菌檢測、即時核酸檢測技術

緒言

甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 具豐富的營養，為重要的果菜類作物之一⁽²⁵⁾。臺灣 2018 年甜瓜栽植面積為 4, 281 公頃，產量為 57, 723 公噸⁽⁴⁾。根據行政院農委會的資料顯示，甜瓜每公頃收益約新臺幣41.5萬元⁽³⁾，遠高於葫蘆科作物中產值第二高的絲瓜 (25.7萬元)。

甜瓜萎凋病 (*Fusarium wilt of melon*) 為甜瓜萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, Fom) 感染所引起之維管束病害 (vascular wilt)。Fom 最早於 1993 年美國明尼蘇達州首次被報導，之後北美洲、歐洲、亞洲及大洋洲均陸續有 Fom 的紀錄。臺灣的 Fom 最初於 1979 年被報導，並於 1999 年鑑定出臺灣的 Fom 為第二型生理小種 (race 2)⁽⁵⁾。Fom 能以大分生孢子 (macroconidia)、小分生孢子 (microconidia)、厚膜孢子 (chlamydospora) 及菌絲體 (mycelium) 作為田間感染源引發甜瓜萎凋病。當 Fom 遇到寄主時，可利用菌絲體或發芽管 (germ tube) 侵入甜瓜根部，受感染的甜瓜會於幼苗期出現胚軸腐敗 (hypocotyl rot)、幼苗猝倒 (damping-off) 等病徵⁽⁵⁾，於結果期 Fom 會使甜瓜果實表面出現病斑，潮濕時於病斑處長出菌絲⁽²⁰⁾，進而使甜瓜種子帶菌，最終會導致全株植物萎凋及死亡。當甜瓜萎凋病嚴重發生時，其所造成甜瓜的產量損失曾高達 100%⁽¹⁷⁾。此外，Fom 可於死亡的植物殘體上成為新的感染源，並透過受感染的移植苗、灌溉水、土壤或種子進行病原菌傳播⁽⁶⁾。綜合上述，在臺灣大規模採種甜瓜時，可能同時採收到罹病植株之果實，使帶有 Fom 之種子，輸送至其他地區，引起病害之發生。

甜瓜種子為我國主要出口果品種子之一，在近十年來，出口總值約為 10 萬美元，亞洲、歐洲、東南亞及澳大利亞等地之國家皆為我國主要出口國⁽²⁾。而 Fom 可殘存於種子，在甜

2 J. Plant Med.

瓜上被認為是一種全球重要的種媒性 (seed-borne) 病原⁽²⁴⁾。根據我國最新的輸出植物種子特定病原檢測作業要點，目前國內對於特定植物種子上的真菌病原已公布了四種檢查方法，包含以標準濾紙法 (standard blotter test, SBT) 檢測十字花科黑腳病菌 (*Phoma lingam*)、以冷凍濾紙法 (deep freezing blotter test, DFB) 檢測瓜類蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*)、以紙巾測試法 (paper toweling test) 檢測菜豆炭疽病菌 (*Colletotrichum lindemuthianum*)、以培養基檢測法 (medium culturing test, MCT) 檢測豌豆葉斑病菌 (*Ascochyta pisi*)，上述檢測方法雖然準確，但皆需至少一週的時間才有可能獲得檢測結果。

台灣於 2017 年甜瓜類蔬菜育苗需求為 2,766 萬株，產值約為 1 億 7 千 28 萬元⁽²⁾，移植病徵不明顯且受感染甜瓜種苗有利於病原體於田間的擴散，田間去除尖鏽孢菌極其困難⁽¹⁶⁾，然而目前確認種苗是否帶有甜瓜萎凋病菌的方法，目前僅有如以目測法觀察種苗生長情形或以選擇性培養基分離 Fom⁽¹⁶⁾但後續仍須以人工接種法確認病原性，若能及早確認甜瓜種苗是否帶有 Fom，對於擬定合適的管理措施來控制甜瓜萎凋病的發生極有幫助。

現今常用的聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，是於 1983 年所發展出的一種核酸增幅 (nucleic acid amplification) 技術，近年來被廣泛應用於植物病原的檢測工作中⁽¹⁾。Luongo 等人 (2012)⁽¹⁷⁾ 於 2012 年利用隨機增幅多型性核酸 (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD) 技術，篩選出對 Fom race 2 具專一性的分子標誌 (molecular marker)，並依此分子標誌序列，設計出 Fom race 2 專一性引子對 (Fa15F/Fa15R) 該特異性分子標誌之基因庫登錄編號 (GenBank accession number) 為 JN183059，該引子對能以聚合酶連鎖反應法增幅出大小為 301 bp 的分子標誌。

對於甜瓜萎凋病菌帶菌種子的檢查方法，國內外目前均無相關資料可供使用，而國際上對種苗的檢測：López-Mondéjar 等人於 2012 年以 TaqMan probe-based real-time PCR 系統，檢測出溫室苗圃中未顯示出病徵的 Fom 帶菌種苗⁽¹⁶⁾。因此本研究目的即為開發並建立臺灣甜瓜萎凋病菌帶菌種子及種苗檢測平台，希望能及早檢測甜瓜種子是否受 Fom 污染及確認種苗是否帶菌。本研究中評估 Fom race 2 之專一性引子對 Fa15F/Fa15R，對臺灣 Fom 分離株是否具專一性，並搭配 PCR 及本研究所建立之 real-time PCR 技術，建構出帶菌種子及種苗快速檢測流程，以應用於未來甜瓜種子及種苗出口檢疫上，避免此病原菌的傳播與危害。

材料與方法

病原菌分離及鑑定

本研究分別從高屏地區收集疑似患病之甜瓜檢體，在無菌操作台內切下病健部組織，利用 1% 次氯酸鈉 (Clorox) 進

表一、本研究所使用之菌株

TABLE 1. Isolates used in this study

Samples No.	Isolates	Host
1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-TDC-F006	Melon
2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-TDC-F007	Melon
3	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-TDC-F008	Melon
4	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-TDC-F009	Melon
5	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-TDC-F010	Melon
6	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-TDC-F011	Melon
7	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-YJL-F053	Melon
8	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> PM-YJL-F054	Melon
9	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>anoetochili</i> PM-YHL-F002	Anoetochilus
10	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> PM-YHL-F003	Asparagus bean
11	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> PM-YHL-F019	Gladiolus
12	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> PM-YHL-F031	Lettuce
13	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i> PM-YHL-F035	Lily
14	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> PM-YHL-F042	Tomato
15	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> PM-YHL-F045	Watermelon
16	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> PM-YJL-F040	Banana
17	<i>F. oxysporum</i> PM-YJL-F056	Melon
18	<i>F. oxysporum</i> PM-TDC-F012	-(soil)
19	<i>F. solani</i> PM-YJL-F055	Melon
20	<i>F. acuminatum</i> PM-YHL-F018	Bermuda grass
21	<i>F. verticillodes</i> PM-YHL-F056	Rice
22	<i>Alternaria</i> sp. PM-TDC-F016	Melon
23	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> PM-TDC-F013	Melon
24	<i>Colletotrichum</i> sp. PM-TDC-F014	Melon

行消毒，並以無菌水漂洗 2 次後，置於水瓊脂培養基 (water agar, WA; Difco) 上進行分離及純化，再以馬鈴薯瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA; Difco) 進行菌株的繼代及繁殖，培養於 24°C 生長箱內，無光照培養 7 天，以供後續實驗使用。將 8 株具病原性之甜瓜萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, Fom) 菌株，以及不同寄主來源 (金線蓮、長豇豆、唐蒼蒲、萵苣、百合、番茄、西瓜及香蕉) 具病原性之尖鏽孢菌菌株 8 株，2 株無病原性之尖鏽孢菌 (甜瓜之內生菌與土壤中分離出之腐生菌)，3 株具病原性之不同種鏽孢菌株 (*F. solani*、*F. acuminatum*、*F. verticillodes*) 及 3 株具病原性之非鏽孢菌株 (*Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum* sp.、*Alternaria alternata*)，做為供試檢體 (表一)，以評估本研究採用之引子是否對臺灣來源之甜瓜萎凋病菌具專一性。8 株不同 Fom 菌株經過病原性測定，病原性測定為將生長於 PDA 平板上之 Fom 菌絲刮下，拌入滅菌 3 次之砂質土壤內，並與無菌土壤混和，製成每公克 (g) 土壤中含有 10⁴ 顆分生孢子 (10⁴ conidial spores/g)，以長出 6-8 片真葉的甜瓜植株 (品種為嘉玉)，經斷根處理種植於病土中，2 週確認其出現半側萎凋之病徵。不同菌株來源之 DNA 以核糖體內轉錄區 (internal transcribed spacer) 之引子 ITS1/ITS4⁽²³⁾ 經聚合酶連鎖反應 (PCR) 及電泳 (gel electrophoresis) 分析後，將產物委託基龍米克斯生物科技進行定序 (sequencing)，並與美國國家生物訊息中心 (National center for biotechnology information, NCBI) 之資料庫 (Genbank) 進行序列比對，以完成本研究所使用的供試菌株之分子鑑定。

引子靈敏度分析

標準DNA (standard DNA) 製備

標準 DNA 為帶有專一性片段 (Fa15F/Fa15R 所增幅) 之質體 DNA，其製備流程分述如下：利用 PCR 搭配 Fa15F/Fa15R⁽¹⁷⁾ 引子對，針對上述經分離、純化、病原性測定及分子鑑定確認為 Fom 菌株 (PM-TDC-F009)，萃取其基因組 DNA 進行核酸擴增及電泳分析，獲得預期約 301 bps 大小的 DNA 條帶後，以 Micro-Elute DNA Clean/Extraction Kit (GMBiolab Co, Ltd., Taichung city, Taiwan) 進行膠體回收純化單一片段，再利用 pGEM-T cloning kit (GMBiolab Co, Ltd., Taichung city, Taiwan) 接合 (ligation) 回收後的產物片段至載體 (vector) 上，再轉型 (transformation) 至大腸桿菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 勝任細胞 (competent cell) 內，並以含有 100 ppm 胺苄青黴素 (ampicillin) 的 Luria-Bertani 培養基 (LB, MDBio, Inc., Taipei city, Taiwan) 進行培養。選殖成功的轉殖株 (PM-TDC-C010) 利用 Plasmid Miniprep purification kit (GMBiolab Co, Ltd., Taichung city, Taiwan) 萃取其質體 DNA，此質體 DNA 即做為標準 DNA (standard DNA)，經 SPECTROstar Nano 全光譜吸收光判讀儀 (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) 量測萃取後 DNA 之 O.D. 值 (values of optical density)，並定量成 10^9 至 10^2 套 (copies) 後以 PCR 技術及 real-time PCR 技術進行靈敏度分析⁽¹⁵⁾。

基因組DNA (genomic DNA) 製備

基因組 DNA 為生物體內之完整 DNA 序列，其製備方法如下：以秤藥匙刮下長滿 9 公分培養皿之 Fom 與其他真菌菌絲並以液態氮磨碎後，參考 Dellaporta 等學者 (1983)⁽⁹⁾ 與 Lin 等學者 (2013)⁽¹⁵⁾ 的方法，萃取真菌基因組 DNA，再將純化後真菌基因組 DNA 回溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 中，經 SPECTROstar Nano 全光譜吸收光判讀儀量測萃取後 DNA 之 O.D. 值，並定量成 2 至 2×10^{-7} 奈克 (ng) 後以 PCR 技術及 real-time PCR 技術進行靈敏度分析。

菌絲體樣本製備

修改 Schilling 等學者 (1996)⁽²¹⁾ 所使用之菌絲樣品製備法，待平板上的 Fom 菌絲長滿後，利用秤藥匙刮下菌絲體 (mycelia)，將菌絲體烘乾 5 小時後秤重，並取 10 mg 的乾燥菌絲混和 200 μ L ddH₂O (於反應管中加入 2 μ L 菌絲溶液)，經 10 倍序列稀釋後 (定量成 10^{-1} 至 10^{-6} mg)，以 PCR 技術及 real-time PCR 技術進行引子靈敏度分析。

PCR技術及電泳分析

以 PCR 技術搭配已發表針對 Fom 第二型生理小種 (race 2) 之專一性引子對 Fa15F/Fa15R⁽¹⁷⁾ 進行待測檢體分析，並以核醣體內轉錄區之引子對 ITS1/ITS4⁽¹⁸⁾ 為 PCR 內控制組。本試驗使用 PCR 試劑為 1X PCR Dye Master Mix II (GMBiolab Co, Ltd., Taichung, Taiwan)，PCR 儀器使用 T100TM Thermal Cycler

(Bio-Rad Laboratories., Co., Ltd., Hercules, CA, USA)，文獻中引子 Fa15F/Fa15R 的 PCR 反應條件為：(1) 94°C 3 分鐘；(2) 94°C 30 秒鐘、60°C 30 秒鐘、72°C 30 秒鐘，總共 30 循環；(3) 72°C 5 分鐘。最後將 PCR 產物於 2% 洋菜凝膠 (agarose) 中以 100V 35 分鐘進行電泳分析，並利用 Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad Laboratories., Co., Ltd., Hercules, CA, USA) 照膠系統觀察電泳分析結果。

Real-time PCR技術

以 SYBR green-based real-time PCR 技術搭配專一性引子對 Fa15F/Fa15R 進行待測檢體分析，試劑及反應條件如下：使用試劑為 1X KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit Master Mix Universal (Kapa Biosystems., Inc., Wilmington, MA, USA)，反應條件為：(1) 95°C 5 分鐘；(2) 95°C 10 秒鐘、60°C 20 秒鐘，總共 40 循環；(3) 循環結束後以每秒升溫 0.1°C 進行產物之熔解曲線分析 (melting curve analysis, 60°C-97°C)。

以 TaqMan probe-based real-time PCR 技術搭配專一性引子對 Fa15F/Fa15R 與螢光探針 TDCpr1 (5'-FAM-TGCCACATGGACATTAT-MGB-NFQ-3') 進行待測檢體分析，試劑及反應條件如下：使用試劑為 1X KAPA SYBR[®] PROBE qPCR Kit Master Mix Universal (Kapa Biosystems., Inc., Wilmington, MA, USA)，反應條件為：(1) 95°C 5 分鐘；(2) 95°C 10 秒鐘、60°C 20 秒鐘，總共 40 循環。

甜瓜帶菌種子檢測

不同帶菌率的種子之備製方式參考 Sousa 等人⁽²²⁾ 之方法：將農友種苗股份有限公司所提供之無菌甜瓜種子放置於長滿 Fom 菌絲的平板上，7 天後備製成帶菌種子，之後與未帶菌之甜瓜種子依比例進行混合，並以 400 顆種子為單位，混合出不同帶菌率的種子，包含 50%、40%、30%、20%、10% 帶菌率的種子，經適當取樣方式後依前述基因組 DNA 製備之方法萃取帶菌種子之核酸，萃取後之核酸經適當稀釋後 (已試過最佳稀釋倍率)，即可利用 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan-based real-time PCR 進行檢測分析，本試驗共進行三重複，每個重複抽樣三次，若有一次獲得正檢出，即代表該重複獲得正檢出結果。

甜瓜帶菌幼苗檢測

甜瓜帶菌幼苗病徵分級參考 Killebrew 等人⁽¹⁴⁾ 於 1993 年之研究：將幼苗受病原菌感染時，出現幼苗猝倒及胚軸腐敗的病徵嚴重程度，分成不同級數，包含 0 級為無病徵、1 級病徵為幼苗胚根出現褐化、2 級病徵為幼苗胚根皆褐化、3 級病徵為幼苗下胚軸出現褐化病徵、4 級病徵為幼苗下胚軸皆褐化，以及 5 級病徵為種子萌芽前胚根腐爛。並將病害嚴重度 (disease severity) 進行平均，評估甜瓜種子接種 1 天後以及種植後 1 至 7 天發病情形。將平板接種 1 天後的甜瓜種子，種

植 1-7 天後，每天分別取幼苗的下胚軸 (hypocotyls)，對無病徵的幼苗進行病原菌分離，並以前述核酸萃取方法同時萃取甜瓜幼苗組織 (將胚根、下胚軸及子葉進行分別取樣)，將萃取後之核酸定量至 20 ng，以 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 技術進行分子檢測分析。

甜瓜帶菌種子定量分析

將上述模擬甜瓜帶菌種子之 DNA，以 SPECTROstar Nano 全光譜吸收光判讀儀量測純化後 DNA 的 O.D. 值，並轉換成 DNA 濃度，以 SYBR green-based real-time PCR 定量分析之結果，對甜瓜種子之反應總 DNA 量進行迴歸分析，來比較不同帶菌率甜瓜種子間之 Fom 生物量 (bio-mass)。

甜瓜帶菌幼苗定量分析

將甜瓜種苗接種 Fom 1 天後進行播種，取播種發芽 1 天後之幼苗胚根、下胚軸及子葉樣本，分別進行病原菌分離及核酸萃取後，將純化後之帶菌組織 DNA 以 SPECTROstar Nano 全光譜吸收光判讀儀量測純化後 DNA 的 O.D. 值，並轉換成 DNA 濃度，利用 SYBR green-based real-time PCR 技術搭配引子組 Fa15F/Fa15R 進絕對定量分析，以評估受感染的甜瓜幼苗不同部位之 Fom 生物量。

統計分析

以最小顯著差異法 (Least significant difference, LSD)，在 5% 顯著水準之下進行數據之統計分析。

結 果

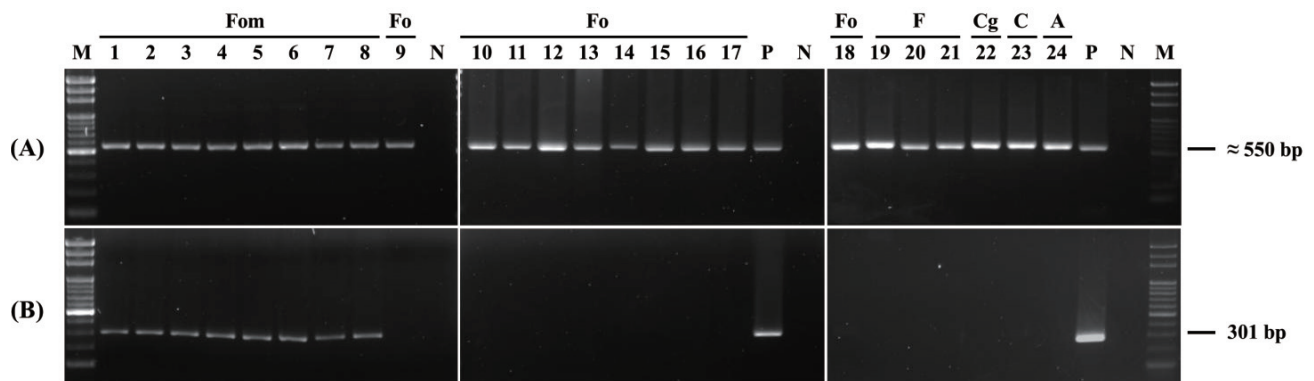
專一性引子對臺灣菌株之檢測適用性測試

甜瓜萎凋病菌第二型生理小種專一性引子 Fa15F/Fa15R，可專一性地從臺灣 Fom 菌株 DNA 中增幅出符合預期產物大小為 301 bp 的 DNA 條帶片段，而對能感染其他作物的尖鏽孢菌菌株 (*Fusarium oxysporum*)，包含金線蓮 (*Anoectochilus*)、長豇豆 (*Asparagus bean*)、唐菖蒲 (*Gladiolus*)、萵苣 (*Lettuce*)、百合 (*Lily*)、番茄 (*Tomato*)、西瓜 (*Watermelon*)、香蕉 (*Banana*) 等、無病原性之尖鏽孢菌菌株、不同種之鏽孢菌菌株 (*Fusarium* spp.) 及非鏽孢菌 (non-*Fusarium*) 等，皆不具擴增性 (圖一)。

引子靈敏度測試

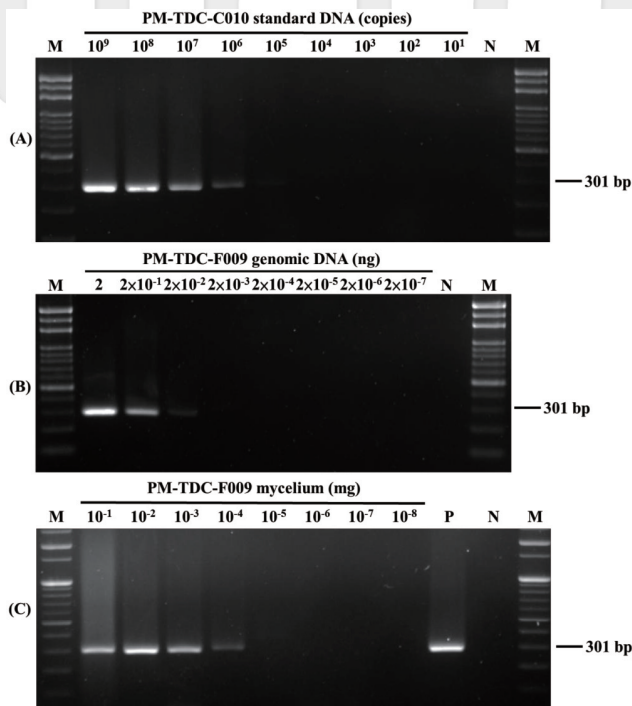
本研究採用之引子 Fa15F/Fa15R 對不同 Fom 檢體之檢測靈敏度結果如圖二至圖四。若採用 PCR 為技術核心，使用標準 DNA 做為檢體時，PCR 的檢測極限為 10^6 copies (圖二A)；使用基因組 DNA 為檢體時，檢測靈敏度達 200 皮克 (pg) (圖二B)；菌絲溶液為檢體時，本系統則可測得 1 微克 (μ g) 的菌絲 (圖二C)。

為提升檢測靈敏度，後續利用 real-time PCR 技術來提高 Fa15F/Fa15R 的引子檢測靈敏度，若採用 SYBR green-based real-time PCR 為技術核心，對標準 DNA 的檢出極限為 10^2 copies，亦可表示此技術應可測出 10^2 個 Fom 的細胞，經迴歸分析後此系統的結果可獲得一公式為 $y = -3.1677x + 42.853$ 的標準曲線，其判斷係數 (R^2) 為 0.9941 (圖三A)。若檢體改採基因



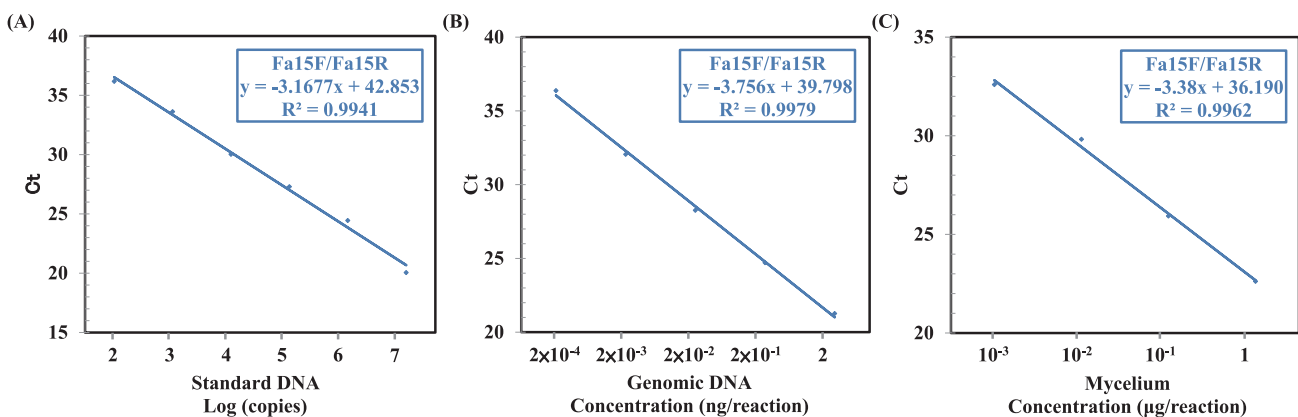
圖一、以臺灣菌株為檢體進行引子專一性測試。

Fig. 1. PCR amplification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom), eight *formae speciales*, one endophyte and one saprophyte of *F. oxysporum* (Fo), three *Fusarium* spp. (F), and three non-*Fusarium* (*Colletotrichum gloeosporioides*, Cg; *Colletotrichum*, C; *Alternaria alternata*, A) with two different primer sets (A) ITS1/ITS4, and (B) Fa15F/Fa15R. PCR amplification was performed using 20 ng genomic DNA extracted from each isolate. Lanes 1-8: *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race 2; Lane 9: *F. oxysporum* (endophyte); Lane 10: *F. oxysporum* f. sp. *anoectochili*; Lane 11: *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*; Lane 12: *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*; Lane 13: *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*; Lane 14: *F. oxysporum* f. sp. *lilii*; Lane 15: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Lane 16: *F. oxysporum* f. sp. *niveum*; Lane 17: *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; Lane 18: *F. oxysporum* (saprophyte); Lane 19: *F. solani*; Lane 20: *F. acuminatum*; Lane 21: *F. verticillioides*; Lane 22: *Colletotrichum gloeosporioides*; Lane 23: *Colletotrichum* sp.; Lane 24: *Alternaria alternata*; P: PCR control using 20 ng gDNA of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* as the template; N: negative control using sterile ddH₂O as the template; M: molecular markers of Gen-100 DNA ladder (GMBiolab Co. Ltd., Taichung, Taiwan).



圖二、本研究開發之 PCR 系統對 (A) 標準DNA、(B) 基因組 DNA 及 (C) 菌絲體之檢測靈敏度測試。

Fig. 2. Sensitivity evaluation of the primer set Fa15F/Fa15R in PCR amplification. Serial dilutions of (A) standard DNA pTDC-C010 (ranging from 10^9 to 10^1 copies), (B) genomic DNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) PM-TDC-F009 (ranging from 2 to 2×10^{-7} ng), and (C) mycelium of PM-TDC-F009 (ranging from 10^{-1} to $10^{-8} \times 10^{-7}$ mg) were subjected to PCR assay. The locations of corresponding 301 bp DNA bands are indicated on the right. P: PCR control using 20 ng genomic DNA of Fom as the template; N: negative control using sterile ddH₂O as the template; M: molecular markers of Gen-100 DNA ladder (GMBiolab Co. Ltd., Taichung, Taiwan).

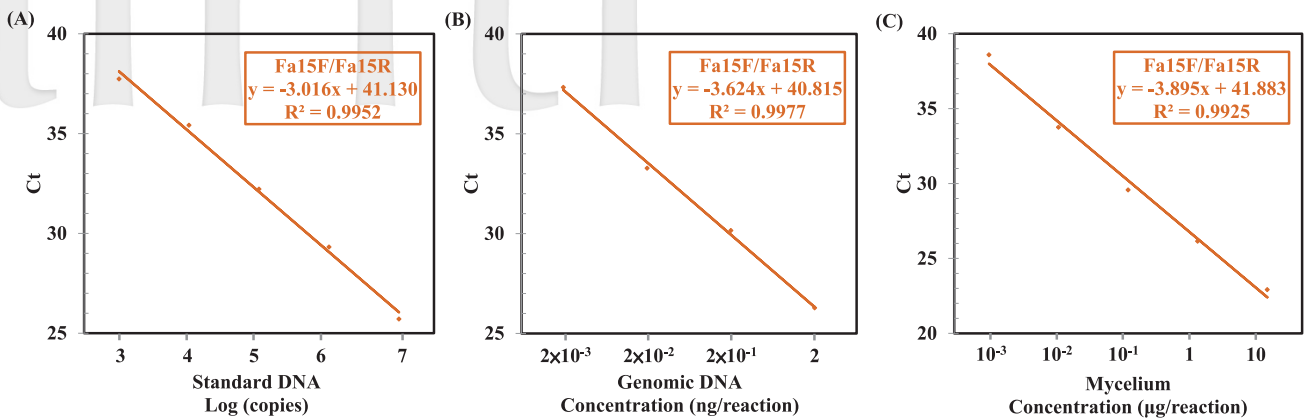


圖三、本研究開發之 SYBR green-based real-time PCR 系統對 (A) 標準 DNA、(B) 基因組 DNA 及 (C) 菌絲體之檢測靈敏度測試。

Fig. 3. Sensitivity evaluation of the SYBR green-based real-time PCR assay with primer sets Fa15F/Fa15R. Serial dilutions of (A) standard DNA pTDC-C010 (ranging from 10^7 to 10^2 copies), (B) genomic DNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) PM-TDC-F009 (ranging from 2 to 2×10^{-4} ng), and (C) mycelium of PM-TDC-F009 (ranging from 1 to 10^{-3} μ g) were subjected to SYBR green-based real-time PCR assay. The standard curves were created by plotting the samples against the corresponding Ct (Cycle of threshold) value.

組 DNA 時，系統中若含有 200 飛克 (fg) 標的菌株之 DNA 時即可獲得穩定的正檢出結果，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.756x + 39.798$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.9979 (圖三B)。若系統中含有為菌絲溶液檢體達 1 ng 以上時，即可獲得穩定的正檢出結果，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.38x + 36.190$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.9962 (圖三C)。這些結果指出，前述三種檢體於本研究的試驗濃度下，皆能獲得線性結果，因此本 SYBR green-based real-time PCR 系統適合做為後續對帶菌檢體進行定量分析的核心技術。

若採用 TaqMan probe-based real-time PCR 為技術核心，對檢測標準 DNA 的檢出極限為 10^3 copies，亦可表示此技術應可測出 10^3 個 Fom 的細胞，略低於前述 SYBR green-based real-time PCR 系統，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.016x + 47.162$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.9952 (圖四A)。本系統可穩定測得最低至 2 pg 的基因組 DNA，靈敏度同樣略低於前述 SYBR green-based real-time PCR 系統，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.714x + 40.945$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.9989 (圖四B)，此結果顯示 TaqMan probe-based real-time PCR 系統若以前述標準 DNA 或基因組 DNA 為檢體，該系統的靈敏度皆略低於前述 SYBR green-based real-time PCR 系統。若檢測對象為菌絲溶液時，靈敏度與 SYBR green-based real-time PCR 系統相仿，可達 1 ng，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.776x + 41.35$ 的標準曲線，判斷係數為 0.996 (圖四C)。綜上結果，若以 TaqMan probe-based real-time PCR 做為核心技術，於本研究的試驗條件濃度下，檢體為標準 DNA、基因組 DNA 或為菌絲溶液時，皆能獲得線性結果 (即回歸分析中的判斷係數皆大於 0.99，近趨於 1)。



圖四、本研究開發之 TaqMan probe-based real-time PCR 系統對 (A) 標準 DNA、(B) 基因組 DNA 及 (C) 菌絲體之檢測靈敏度測試。

Fig. 4. Sensitivity evaluation of the TaqMan probe-based real-time PCR assay with primer sets Fa15F/Fa15R and TaqMan probe TDCpr1. Serial dilutions of (A) standard DNA pTDC-C010 (ranging from 10^7 to 10^3 copies), (B) genomic DNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) PM-TDC-F009 (ranging from 2 to 2×10^{-3} ng), and (C) mycelium of PM-TDC-F009 (ranging from 10 to 10^{-3} μg) were subjected to TaqMan probe-based real-time PCR assay. The standard curves were created by plotting the samples against the corresponding Ct (Cycle of threshold) value.

表二、以 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 系統檢測不同帶菌率之甜瓜種子

TABLE 2. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom)-contaminated seeds by using the PCR, SYBR green-based real-time PCR, and TaqMan probe-based real-time PCR assays

Molecular detection methods	Fom-contaminated ratio (%) ^a						P ^b	N ^c
	50%	40%	30%	20%	10%	0%		
PCR	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	- (0/3)	+	-
SYBR green-based real-time PCR	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	- (0/3)	+	-
TaqMan probe-based real-time PCR	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	- (0/3)	+	-

^a Four hundred Fom-contaminated seeds were prepared by mixing proper amounts of Fom-contaminated and Fom-free seeds.

^b For the positive control, 20 ng of Fom (PM-TDC-F009) genomic DNA was used as a DNA template in the molecular detection assays.

^c For negative control, sterile ddH₂O was used instead of DNA template.

檢測帶菌種子

本研究將前述 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 檢測系統導入帶菌甜瓜種子之檢測試驗中，試驗結果如表二。以 400 顆種子為單位做為檢測對象時，三個系統皆可於 10% 帶菌率的種子檢體中獲得全檢出的結果，顯示前述三種技術皆適用於檢測帶菌率高於 10% 之甜瓜萎凋病菌帶菌種子。

檢測帶菌幼苗

本研究將前述 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 檢測系統導入甜瓜帶菌幼苗之檢測分析中，試驗結果如表三。本研究將甜瓜種子先以人工接種帶菌一天，再將帶菌種苗播種發芽 1-7 天觀察後，即發現於發芽後第 4 天時開始出現根腐的病徵 (圖五)，且種苗病勢 (disease severity) 隨著播種後有越顯嚴重的情形 (圖五)。而在尚未出現可見病徵 (前 1-3 天) 的種苗之下胚軸中，若先將病原菌

經分離後再以 PCR 確認病原的方式，對這些未顯現病徵的檢體的病原檢出率分別為 52.38%、33.33%、60.00%。

而若將這些帶菌種苗的下胚軸經核酸萃取並定量後，直接以前述三個系統進行病原菌分子檢測，這些帶菌種苗經播種發芽 1-7 天後的檢體，自 PCR 系統中獲得的正檢出率分別為 0.00%、3.70%、0.00%、41.18%、41.18%、38.10%、63.64%；而自 TaqMan probe-based real-time PCR 系統中獲得正檢出率的結果明顯高於 PCR 系統中所檢測到的，且隨著病勢發展，整體上所有結果呈現正檢出率有上升的趨勢，1-7 天分別為 52.38%、59.26%、68.00%、82.35%、76.47%、90.48%、95.45%；若改以 SYBR green-based real-time PCR 系統對帶菌種苗進行檢測試驗，則此些帶菌種苗對甜瓜萎凋病菌的檢出率為全檢出。顯示相較於使用其他兩種方法 (包含 plate-out/PCR assays 與 *in-planta* PCR)，以 real-time PCR 對帶菌種苗直接進行病原菌測定 (*in-planta* real-time PCR)，能獲得更佳的正檢出率結果，其中又尤以 SYBR green-based real-time PCR 系統的檢

表三、比較 PCR、SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR 檢測方法對甜瓜幼苗之帶菌檢出率

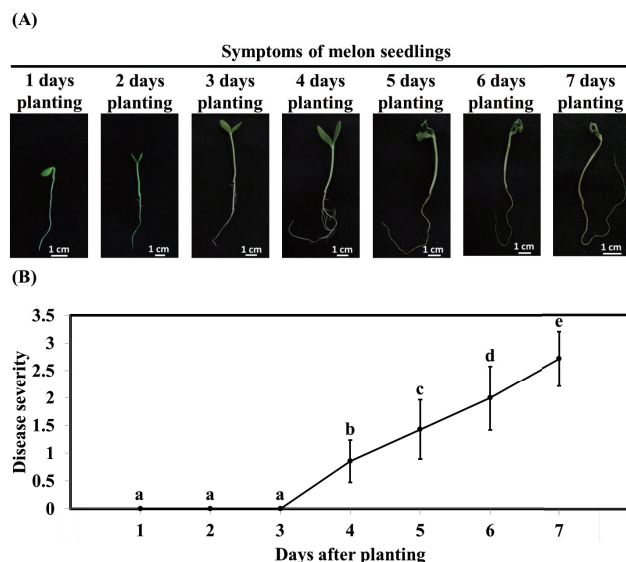
TABLE 3. The *in-planta* detection rate of symptomatic and asymptomatic melon seedlings infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) by using the PCR, SYBR green-based real-time PCR, and TaqMan probe-based real-time PCR assays

Days after planting	Symptoms	Disease severity ^a	Plate-out/PCR assays (%) ^b	<i>In-planta</i> detection		
				PCR (%)	Real-time PCR (%)	
					SYBR green-based	TaqMan probe-based
7	Symptomatic	2.714 ± 0.488	NC ^c	14/22 (63.64%)	22/22 (100.00%)	21/22 (95.45%)
6	Symptomatic	2.000 ± 1.000	NC	8/21 (38.10%)	21/21 (100.00%)	19/21 (90.48%)
5	Symptomatic	1.429 ± 0.535	NC	7/17 (41.18%)	17/17 (100.00%)	13/17 (76.47%)
4	Symptomatic	0.857 ± 0.378	NC	7/17 (41.18%)	17/17 (100.00%)	14/17 (82.35%)
3	Asymptomatic	0.000 ± 0.000	15/25 (60.00%)	0/25 (0.00%)	25/25 (100.00%)	17/25 (68.00%)
2	Asymptomatic	0.000 ± 0.000	9/27 (33.33%)	1/27 (3.70%)	27/27 (100.00%)	16/27 (59.26%)
1	Asymptomatic	0.000 ± 0.000	11/21 (52.38%)	0/21 (0.00%)	21/21 (100.00%)	11/21 (52.38%)

^a Mean of disease severity scores are shown: 0 = no symptoms, 1-3 = increasingly severe root-hypocotyl necrosis, 4 = post-emergence damping-off, and 5 = pre-emergence damping-off.

^b The plate-out and further PCR identification assays were used to confirm that the symptomatic and asymptomatic melon hypocotyls were Fom-infected testers.

^c NC= not conducted



圖五、帶菌種子播種發芽後之 (A) 病徵 (symptoms) 與 (B) 病勢 (disease severity) 發展評估。

Fig. 5. (A) Symptoms and (B) disease severity evaluation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*-infected melon seedling. Mean of disease severity scores are shown: 0 = no symptoms, 1-3 = increasingly severe root-hypocotyl necrosis, 4 = post-emergence damping-off, and 5 = pre-emergence damping-off. Means followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ according to Least-Significant difference (LSD) test.

測結果為最佳。

此外，為了瞭解不同取樣部位，對未顯現可見病徵的帶菌種子之病原菌檢出率是否有影響，本研究亦將對此病原菌正檢出率最佳的兩套系統，用於對播種發芽 1 天後尚未顯現可見病徵的檢體 (包含胚根、下胚軸及子葉) 之帶菌測定上，結果顯示：SYBR green-based real-time PCR 系統對於該些種苗之胚根、下胚軸及子葉的病原正檢出率分別為 96.43%、100.00%、

表四、比較 SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR 方法對甜瓜種植一天後無病徵幼苗不同部位之帶菌檢出率

TABLE 4. The detection rate of radicles, hypocotyls and cotyledons of asymptomatic melon seedlings infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by using the SYBR green-based real-time PCR and TaqMan probe-based real-time PCR assays

Tissue	Real-time PCR (%)	
	SYBR green-based	TaqMan probe-based
Radicles	27/28 (96.43%)	18/28 (64.29%)
Hypocotyls	28/28 (100%)	16/28 (57.14%)
Cotyledons	25/28 (89.29%)	25/28 (89.29%)

89.29%，整體高於 TaqMan probe-based real-time PCR 系統中所獲得的正檢出率結果 (64.29%、57.14%、89.29%) (表四)，且 SYBR green-based real-time PCR 系統中，種苗的下胚軸為該系統的最佳檢體採樣部位 (病原菌測定結果為全檢出)。

甜瓜帶菌種子定量分析

本研究將最佳檢測系統 SYBR green-based real-time PCR 導入帶菌種子之定量分析試驗中，病原菌定量結果如表五，顯示當受病原菌污染的種子比例越高，整體上於系統中所能測得的病原菌含量越高：含有 10% 至 50% 受污染的甜瓜種子之含菌量為每 ng 的種子 DNA 中含有 $(5.75 \pm 4.36) \times 10^1$ 至 $(2.02 \pm 0.86) \times 10^2$ pg 的 Fom DNA，整體而言隨著受污染的種子比例越高，整體含菌量就越高，其中含 50% 帶菌種子樣本中之含菌量，約為含 10% 帶菌種子樣本的 3.5 倍，此實驗結果符合預期。此外，於含有 10% 受污染的甜瓜種子樣本中之絕對含菌量為 $(1.73 \pm 1.31) \times 10^3$ (表五)，仍遠高於目前本系統之檢測極限 (200 fg)，顯示本技術對於檢測更低帶菌比例的帶菌種子具檢測應用性。

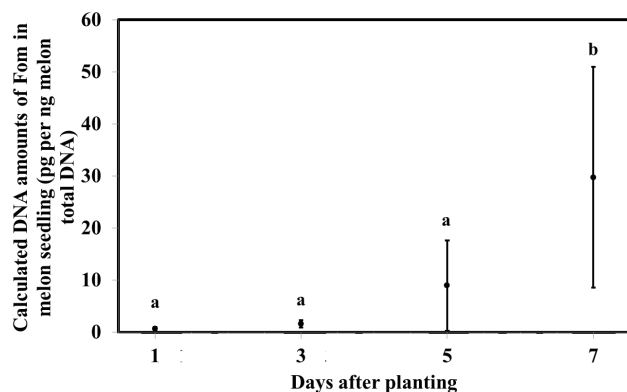
表五、以 SYBR green-based real-time PCR 方法進行甜瓜種子之帶菌生物量分析

TABLE 5. Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) in Fom-contaminated seeds by using the SYBR green-based real-time PCR assay

Sample	Fom-contaminated ratio (%) ^a	Calculated <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> DNA amounts (pg per ng melon seed total DNA) ^b	Calculated <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> DNA amounts (pg per real-time PCR reaction)
Fom-contaminated seeds	50%	$(2.02 \pm 0.86) \times 10^2$	$(8.10 \pm 3.45) \times 10^3$
Fom-contaminated seeds	40%	$(2.15 \pm 1.71) \times 10^2$	$(6.46 \pm 5.14) \times 10^3$
Fom-contaminated seeds	30%	$(1.97 \pm 1.51) \times 10^2$	$(5.91 \pm 4.53) \times 10^3$
Fom-contaminated seeds	20%	$(1.79 \pm 1.22) \times 10^2$	$(3.57 \pm 2.45) \times 10^3$
Fom-contaminated seeds	10%	$(5.75 \pm 4.36) \times 10^1$	$(1.73 \pm 1.31) \times 10^3$

^a Four hundred Fom-contaminated seeds were prepared by mixing proper amounts of Fom-contaminated and Fom-free seeds.

^b Mean \pm standard deviation is presented from triplicate samples collected from three sampling batch of Fom-contaminated seeds, each batch of four hundred Fom-contaminated seeds.



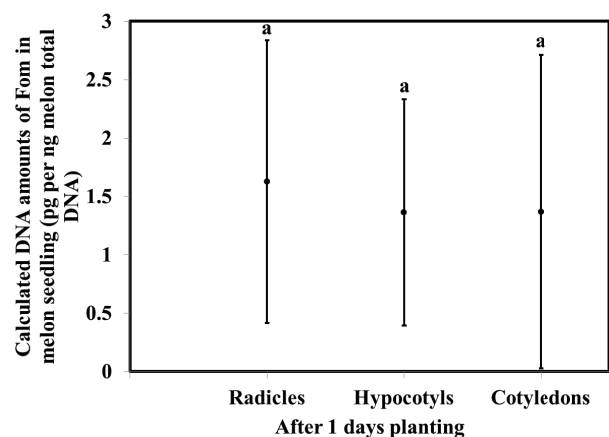
圖六、以本研究之最佳檢測系統 SYBR green-based real-time PCR 對種苗之帶菌生物量分析結果。

Fig. 6. Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) in Fom-infected melon seedling using the SYBR green-based real-time PCR assay. Means followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ according to Least-Significant difference (LSD) test.

甜瓜帶菌幼苗定量分析

本研究將最佳檢測系統 SYBR green-based real-time PCR 導入帶菌種苗之定量分析試驗中，病原菌定量結果如圖六，顯示當隨著帶菌種苗播種發芽時間越久，整體上於系統中所能測得的病原菌含量越高：種苗播種發芽後 1-7 天之含菌量為每 ng 的種苗 DNA 中含有 $(2.98 \pm 2.12) \times 10^1$ 至 $(7.26 \pm 2.95) \times 10^1$ pg 的 Fom DNA，且第 7 天之下胚軸中含菌量達最高峰，約為播種發芽後第 1 天的 41 倍。

此外，本研究亦將最佳檢測系統 SYBR green-based real-time PCR 導入未顯現可見病徵的帶菌種苗之不同部位含菌量定量分析試驗中，病原菌定量結果如圖七，顯示人工帶菌種苗播種一天後，帶菌種苗之各部位，整體上於系統中所能測得的病原菌含量差異不顯著：帶菌種苗的胚根、下胚軸、子葉之總 DNA 中，含菌量分別為每 ng 的種苗 DNA 中分別含有 1.63、1.36、1.37 pg 之的 Fom DNA (圖七)。



圖七、以本研究之最佳檢測系統 SYBR green-based real-time PCR 對種苗各部位之帶菌生物量分析結果。

Fig. 7. Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) in radicles, hypocotyls and cotyledons of melon seedlings infected by Fom by using the SYBR green-based real-time PCR. Means followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ according to Least-Significant difference (LSD) test.

討 論

本研究利用對 Fom race 2 具專一性之引子對 Fa15F/Fa15R，開發出對臺灣來源的 Fom 菌株具專一性的分子檢測技術，此對專一性引子經其他學者的研究證實可區分出不同生理小種之 Fom⁽¹⁷⁾，然而我們尚未能於臺灣個甜瓜產區中蒐集到其他生理小種之 Fom 菌株，且臺灣亦尚未被報導有其他非 race 2 的甜瓜萎凋病菌，因此未來應持續於臺灣蒐集不同地區之 Fom 菌株，來驗證此套檢測系統對臺灣未來可能出現的 Fom 其他生理小種是否具區別性。

Real-time PCR 技術是一具高發展性的技術，目前已應用於不同作物上確認種子是否攜目標植物病原真菌，例如西瓜蔓割病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)⁽¹⁹⁾、羅勒萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *basilica*)⁽¹⁸⁾、菜豆萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*)⁽²²⁾ 等尖鏽孢菌及其他真菌如菠菜種子上的大麗輪枝菌

(*Verticillium dahliae*)⁽¹⁰⁾ 與洋蔥種子上的洋蔥頸腐病菌 (*Botrytis* spp.)⁽⁸⁾ 等。

本研究所開發的兩項 real-time PCR 檢測系統 (包含 SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR)，均可用於快速鑑定臺灣的 Fom 菌株及與檢測出攜帶 Fom 的帶菌種苗及種子，且對各式檢體的檢測靈敏度均優於前述已發表的 PCR 檢測系統。此外，本研究中所使用之 PCR、SYBR-green-based real-time PCR、TaqMan probe-based real-time PCR 技術，之技術差異為：花費成本 (SYBR-green-based real-time PCR > TaqMan probe-based real-time PCR > PCR)、花費時間 (TaqMan probe-based real-time PCR > SYBR-green-based real-time PCR > PCR)、靈敏度 (SYBR-green-based real-time PCR > TaqMan probe-based real-time PCR > PCR)。

於本研究中，此兩項 real-time PCR 系統皆可被用來快速篩檢無病徵的帶菌甜瓜種苗，其中尤以 SYBR green-based real-time PCR 技術對 Fom 的檢出率可達 100% 為最佳，此時若以 PCR 檢測系統對無病徵的帶菌甜瓜種苗進行篩檢時，PCR 系統對病原菌的正檢出率幾乎為零 (表二)。此外，本研究以 TaqMan probe-based real-time PCR 系統篩檢無病徵帶菌種苗時 (種子接種後種植 3 天)，對 Fom 正檢出率最高僅達 68.00%，顯示 SYBR green-based real-time PCR 系統的靈敏度優於 TaqMan probe-based real-time PCR 系統，與文獻中學者利用 TaqMan probe-based real-time PCR 技術檢測甜瓜無病徵帶菌幼苗 (接種 15 天後)，最高正檢出率僅達 6 成之結果類似⁽¹⁶⁾，根據圖三C及四C的結果，以 SYBR green-based real-time PCR 系統檢測菌絲樣本 (含 PCR 抑制物質) 時，其斜率大於 TaqMan probe-based real-time PCR系統 (-3.38>-3.895)，顯示以 Fa15F/Fa15R 引子搭配 SYBR green-based real-time PCR 之 PCR 效率較高，因此推測在檢出較複雜的帶菌種苗樣本時，SYBR green-based real-time PCR 靈敏度較高。綜合上述，本研究所開發之 SYBR green-based real-time PCR 檢測系統，為篩檢無病徵帶菌幼苗之目前最優檢測系統。

本研究以人工模擬帶菌的方式來評估 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 等系統，是否可用於篩檢出甜瓜帶菌種子，結果顯示：於本研究的試驗條件之下，三項技術皆適用於篩檢出 10-50% 帶菌率之帶菌種子。然而在西瓜蔓割病菌的文獻例子中，學者描述了於花期及結果期接種西瓜蔓割病菌時，種子常呈現帶菌不均勻性 (heterogeneity)，並可能導致種子的內部感染⁽¹⁹⁾，由於現階段對田間甜瓜種子自然帶菌的方式與途徑尚未明朗，本研究所開發之分子檢測技術未來應可應用於甜瓜種子帶菌之田間病理學研究上。種子帶菌與種植後植株發病程度之往往呈正相關，因此未來亦可將本研究所開發之 SYBR green-based real-time PCR 系統用於評估種子上的 Fom 生物量，作為快速篩檢種苗的重要參考指標。此外，經學者指出較小的菜豆種子 (cv.

Bountiful) 上所含的菜豆萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) 的量，高於大粒種子 (cv. Ireland Creek Annie) 上的病原菌含量⁽²²⁾，至於甜瓜種子上帶有之 Fom 生物量，是否與甜瓜種子顆粒大小具關連性，未來可利用 SYBR green-based real-time PCR 系統釐清此問題，並以病原菌定量結果來預測帶菌種子對播種後實際發病情形。

臺灣目前只有 Fom race 2 的發現紀錄⁽⁵⁾，而本研究中所開發之技術未來可以套用至臺灣甜瓜種子出口前的帶菌篩檢上，藉此避免甜瓜萎凋病菌透過種子將此病原菌傳播至其他尚未出現 Fom race 2 的國家。本研究開發出對 Fom 標準 DNA、基因組 DNA、菌絲具高檢測靈敏度之檢測技術，為了使此些技術於應用上更為全面，未來擬續評估此些技術對 Fom 小分生孢子之檢測靈敏度。此外，雖然本研究中的人工帶菌種子因菌絲直接佈滿種子而使單顆種子含菌量極高，和自然帶菌種子上病原零星且不均勻分布有所不同，但本研究以 Fa15F/Fa15R 搭配 SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 技術檢測帶菌種子時，仍可在含有多顆的種子樣本 DNA (10-50% 帶菌種子) 中獲得全檢出結果，顯示此兩套技術應不受植物 DNA 之干擾，且對本研究中之各式檢體皆具高度的檢測靈敏度，因此此兩套技術應具高度潛力可實際用於偵測帶菌種子上，未來擬將針對更低帶菌率之種子進行實測，以確認此技術對更低濃度帶菌種子之靈敏度，或擬將自田間自染感然的甜瓜果實中進行隨機採種，以驗證本研究所開發之技術的檢測應用性。

根據國際種子檢查協會 (International Seed Testing Association, ISTA) 的規範中建議每 10,000 kg 的甜瓜種子最小報驗量為 150 g，因此，本研究推薦：可將複合樣品均勻減量至 150 g 後送至驗證單位 (Certification Body, CB) 進行檢驗，檢驗時取甜瓜種子的一次檢驗量 2,000 顆種子 (約 60 g) 進行篩檢，以確認甜瓜種子上是否攜帶病原菌，而本研究所開發之檢測系統是以 400 顆種子為單位，測量三次後決定種子該批次是否帶菌，故本研究之試驗結果即代表 1,200 種子之批次是否帶菌，未來擬將此取樣模式導入 ISTA 的規範建議中：為了檢驗 2,000 顆種子是否帶菌，擬將 2,000 顆分成 5 個批次，每一批次 400 顆種子，再以 SYBR green-based real-time PCR 檢測系統分別對各批次之供試種子進行帶菌篩檢，每 2,000 顆種子中若有一批次 (2,000 顆種子) 以上之樣本獲得正檢出結果，即代表此 2,000 顆種子中帶有 Fom，此套病原菌篩檢技術可做為每 10,000 公斤 kg 甜瓜種子批次之 Fom 帶菌種子檢查流程的核心技術，進而減少此病原菌因國際種子進出口時的散播風險。

綜合上述，本研究利用對 Fom race 2 具專一性之引子對 Fa15F/Fa15R，搭配 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 等技術，開發出對甜瓜種子及種苗的篩檢技術。本研究開發之檢測方法皆可有效檢測出帶菌率為 10% 至 50% 之甜瓜種子，另在甜瓜帶菌種苗的檢測試

驗中，病原菌檢出率以 SYBR green-based real-time PCR 系統達 100% 為最高。未來擬進一步利用本研究開發的甜瓜萎凋病菌檢測技術，輔助甜瓜種子及種苗診斷偵測實務上，或應用於種子病理學的相關研究上，藉此降低此病原菌對甜瓜產業的危害衝擊，或對甜瓜萎凋病提出更有效的防治策略。此病原菌篩檢技術可套用於甜瓜萎凋病菌帶菌種子檢查流程，藉此減少此病原菌因國際種子進出口時的散播風險。

謝 辭

在此感謝農友種苗股份有限公司提供本研究所需之甜瓜種子，以及行政院農業委員會計畫編號 104農科-10.10.1-檢-B1 (建立甜瓜萎凋病菌之快速檢測技術平台)、105-救助調整-檢-02、106救助調整-檢-03-Z (強化植物有害生物防範措施-建立外銷種子病原檢測技術) 經費支持，謹此謝忱。

引用文獻

- 林盈宏、林依佳、張碧芳，2018。香蕉黃葉病菌分子檢測技術之發展現況。植物醫學期刊 60：1-8。
- 胡正榮，2017。甜瓜種苗產業發展現況與展望。種苗科技專訊 99：24-28。
- 農委會，2018a。農業統計年報。行政院農業委員會，台北。
- 農委會，2018b。農業統計要覽。行政院農業委員會，台北。
- 蔡竹固、陳瑞祥、童伯開，1999。台灣甜瓜蔓割病菌之生理小種。植物保護學會會刊41：139-143。
- Agrios, G. N. 2005. Vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). Pages 522-534 in: Plant Pathology, 5th ed. G. N. Agrios ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 922 pp.
- Berrada, H., Soriano, J. M., Mañes, J., and Pico, Y. 2006. Real-time quantitative PCR of *Staphylococcus aureus* and application in restaurant meals. J. Food Prot. 69:106-111.
- Chilvers, M. I., du Toit, L. J., Akamatsu, H., and Peever, T. L. 2007. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. Plant Dis. 91:599-608.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Reporter 1:19-21.
- Duressa, D., Rauscher, G., Koike, S. T., Mou, B., Hayes, R. J., Maruthachalam, K., Subbarao, K. V., and Klosterman, S. J. 2012. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Verticillium dahliae* in spinach seed. Phytopathol. 102:443-451.
- Gao, L., Feng, C., Li, B., Liu, T., Liu, B., and Chen, W. 2015. Detection of *Tilletia controversa* using immunofluorescent monoclonal antibodies. J. Appl. Microbiol. 118:497-505.
- Haegi, A., Catalano, V., Luongo, L., Vitale, S., Scotton, M., Ficcadenti, N., and Belisario A. 2013. A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible interactions with grafted melon genotypes. Phytopathology 103:802-810.
- Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., and Landa, B. B. 2010. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. Appl. Soil Ecol. 46:372-382.
- Killebrew, J. F., Roy, K. W., and Abney, T. S. 1993. Fusaria and other fungi on soybean seedlings and roots of older plants and interrelationships among fungi, symptoms, and soil characteristics. Can. J. Plant Pathol. 15:139-146.
- Lin, Y. H., Su, C. C., Chao, C. P., Chen, C. Y., Chang, C. J., Huang, J. W., and Chang P. F. L. 2013. A molecular diagnosis method using real-time PCR for quantification and detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. Eur. J. Plant Pathol. 135:395-405.
- López-Mondéjar, R., Beaulieu, R., Ros, M., and Pascual, J. A. 2012. SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. Crop Prot. 33:1-6.
- Luongo, L., Vitale, S., Haegi, A., and Belisario, A. 2012. Development of scar markers and PCR assay for *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 2-specific detection. J. Plant Pathol. 94:193-199.
- Pasquali, M., Piatti, P., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2006. Development of a real-time polymerase chain reaction for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed and roots. J. Phytopathol. 154:632-636.
- Petkar, A., and Ji, P. 2017. Infection courts in watermelon plants leading to seed infestation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Phytopathol. 107:828-833.
- Punja, Z. K., Parker, M., and Elmhirst, J. F. 2001. Fusarium wilt of field-grown muskmelon in British Columbia. Can. J. Plant Pathol. 23:403-410.
- Schilling, A. G., Moller, E. M., and Geiger, H. H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F.*

avenaceum. Phytopathology 86:515-522.

22. Sousa, M. V., Machado, J. D. C., Simmons, H. E., and Munkvold, G. P. 2015. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. Plant Pathol. 64:478-488.
23. White T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Innis M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White eds. Academic Press, New York. 482 pp.
24. Zhang, Z., Ren, W., Wang, J., Chen, W., Sang, C., and Chen, C. 2018. Resistance risk assessment of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* against phenamacril, a myosin inhibitor. Pestic. Biochem. Physiol. 147:127-132.
25. Zhu, Q., Wu, C., Sikandar, A., Liu, S., Gao, P., Wang, X., MA, H., Zu, Z., and Luan, F. 2016. Genome-wide association study of powdery mildew resistance in a worldwide collection of melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. Pages 50-53 in: Cucurbitaceae 2016, XIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, July 24-28, 2016, Warsaw, Poland. Cucurbitaceae 2016 Organizing Committee.

important. For the Fom molecular detection purpose, we developed three molecular methods to detect Fom-contaminated seedlings and seeds of melon by using PCR, SYBR green-based real-time PCR, and TaqMan probe-based real-time PCR assays. The data indicated that the race 2-specific primers Fa15F/Fa15R and the novel TaqMan probe TDCpr1 were specific to Fom in Taiwan. We were able to obtain all positive results by using the three detection methods when the DNA template was 10% to 50% (Fom-contaminated/Fom-free) of Fom-infected seeds. The detection rates of PCR, TaqMan probe-based real-time PCR, and SYBR green-based real-time PCR assays were 0%, 52.38%, and 100%, respectively, when the asymptomatic melon seedlings (1 day after plating) were used as test samples. These data indicated that the SYBR green-based real-time PCR assay with the primer set Fa15F/Fa15R has high applicability for the early detection of Fom race 2-infected seeds and seedlings of melons. This Fom race 2 SYBR green-based real-time PCR assay has the potential to serve as a rapid, specific, and sensitive tool for the routine detection of seeds and seedlings of melon contaminated by Fom race 2.

Keywords: melon disease, quarantine prevention, pathogenic fungus detection, real time nucleic acid detection techniques

ABSTRACT

Chang, T.-D.¹, Wu, Z.-B.², Su, S.-M.³, and Lin, Y.-H.^{1,*} 2020. Comparison of the efficiency of PCR-based methods for detecting *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* seeds and seedlings in Taiwan. J. Plant Med. 62(1): 1-12.

(1Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 912, Taiwan; 2Department of Horticulture, National Taitung Jr. College, Taitung 950, Taiwan; 3Section of Seed and Seedling Management, Seed Improvement and Propagation Station, Council of Agriculture, Taichung 426, Taiwan)
*Corresponding author: E-mail: pmyhlin@mail.npust.edu.tw)

Fusarium oxysporum f. sp. *melonis* (Fom) is a destructive phytopathogen that causes a seed-borne Fusarium wilt disease on melons (FWM). It is vitally important to recognize melon seedlings or seeds infected by Fom as rapidly as possible, preferably before the appearance of visual symptoms, in order to prevent the introduction and dissemination of Fom from diseased to healthy melon plants as much as possible, which could reduce the impact of FWM outbreaks. Development of a specific and efficient tool for Fom detection is