

香蕉黃葉病菌分子檢測技術之發展現況

林盈宏¹、林依佳¹、張碧芳^{2,3,*}¹ 國立屏東科技大學植物醫學系，屏東縣，台灣² 國立中興大學植物病理學系，台中市，台灣³ 國立中興大學永續農業創新發展中心，台中市，台灣

* 通訊作者，電子郵件：pfchang@nchu.edu.tw

摘要

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60(3): 1-8。

香蕉 (*Musa* spp.) 包含香蕉 (banana) 與大蕉 (plantains)，被廣植於全球濕潤的熱帶與亞熱帶地區，為世界最重要的果樹之一。香蕉黃葉病 (Fusarium wilt of banana) 又名香蕉巴拿馬病 (Panama disease) 於世界各地普遍發生且具高度危害潛力，嚴重危害東亞、東南亞、非洲與拉丁美洲的香蕉產業，是全球香蕉生產主要限制因子。以準確的方法來監控植物的健康與早期檢測出病原菌，一向是病害管理策略上重要基石。近年來，由於分生技術的快速發展，新興的分生技術逐漸被用來協助診斷植物病害或檢測病原菌，如聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)、恆溫環狀擴增法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 及隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應 (insulated isothermal polymerase chain reaction, iiPCR) 等分生技術，已被用來快速且專一地檢測香蕉黃葉病菌，這些技術最大的優勢在於其專一性高且更有效率，因此相當具有應用潛力與優勢。本文簡述香蕉黃葉病菌分子檢測技術的發展現況，並期待這些技術未來能協助維持田間衛生、幫助香蕉黃葉病田間預警工作，藉由避免該病原的傳播，進而減少香蕉黃葉病造成的經濟損失。

關鍵詞：香蕉、香蕉黃葉病、香蕉巴拿馬病、香蕉黃葉病菌、生理小種、分子檢測

緒言

香蕉 (*Musa* spp.) 包含香蕉 (banana) 與大蕉 (plantains) 原產於東南亞地區 (Southeast Asia)，為許多發展中國家的主要糧食作物^(5,33)。由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (簡稱 Foc) 造成的香蕉黃葉病 (Fusarium wilt of banana)，又稱香蕉巴拿馬病

(Panama disease)，是香蕉產業的重要限制因子⁽⁴⁾。香蕉黃葉病為多循環病害 (polycyclic disease)，可藉由受黃葉病菌感染之吸芽、假莖等罹病植體的移植 (transplantation) 來傳播⁽¹⁰⁾，灌溉用水、耕作栽培時使用的農機具、甚至人員的鞋具等，亦為香蕉田內黃葉病菌快速擴散之重要因子⁽¹³⁾，使此相當難以防除。受感染的香蕉從下位葉葉緣開始出現黃化萎凋的病徵，而後會造成假莖褐化與縱裂，至發病後期全株萎凋死亡⁽³²⁾。為了減少黃葉病菌對香蕉產業造成的威脅與經濟損失，近年來，已有聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)、恆溫環狀擴增法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 及隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應 (insulated isothermal polymerase chain reaction, iiPCR) 等分子技術 (表一)，被發展來協助檢測或鑑定香蕉黃葉病菌，本文簡述這些快速且具高專一性的分子檢測技術之發展現況，並期待這些技術，未來能協助田間蕉株的健康管理、預防此病原菌之田間傳播、監控與預警田間香蕉黃葉病之發生、協助維持田間衛生，以幫助香蕉黃葉病田間預警工作，進而大幅減少香蕉黃葉病對香蕉產業造成的衝擊。

香蕉黃葉病菌之生態

香蕉黃葉病菌為土傳性病原真菌 (soil-borne fungal pathogen)，能產生三種無性孢子 (asexual spores)，包含大分生孢子 (macroconidia)、小分生孢子 (microconidia) 與厚膜孢子 (chlamydoconidia)。大分生孢子呈直立狀 (straight) 至鐮刀狀 (slightly sickle-shaped)、薄壁 (thin-walled)，具 3 至 5 個隔膜 (septa)；小分生孢子為腎形 (kidney-shaped) 至橢圓形 (elliptic)；球形 (globular) 至橢圓形厚膜孢子^(10,29)，大多單生或串生形成於菌絲上。黃葉病菌可行腐生或以厚膜孢子休眠於土壤中，甚至可殘存長達 30 年之久⁽³⁰⁾，藉此度過不良環境，待香蕉寄主出現時隨即侵入感染危害新植蕉苗⁽¹³⁾。

在土壤中的香蕉黃葉病菌厚膜孢子，會受香蕉根部的分

2 J. Plant Med.

表一、近年來被發展用來檢測與鑑定香蕉黃葉病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 之分子技術

TABLE 1. Molecular techniques for the detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Techniques	Target races	Amplification primers		Primers/probes sequences (5'-3')	Amplicon length (bp)	References
		Target sequences/genes	Names			
Polymerase chain reaction (PCR)	Race 4 (R4)	Foc ₂₄₂ (partial sequence of EU379562)	Foc-1 (Forward primer, F)	CAGGGGATGTATGAGGAGGCT	242	(20)
			Foc-2 (Reverse primer, R)	GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC		
Duplex PCR	Tropical race 4 (TR4)	Intergenic spacer (IGS) of rDNA	FocTR4-F (F)	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG	463	(5)
			FocTR4-R (R)	CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA		
PCR	R4	KF548063 (Foc-SIX8a) & KF58064 (Foc-SIX8b)	Foc-SIX8-F (F)	CGAAGTGCGCCATATAAGACT	770	(7)
			Foc-SIX8-R (R)	CACCTGCTTGCTCCTTATCC		
PCR	Subtropical race 4 (ST4)	Foc-SIX8b	Foc-SIX8b-F (F)	CGTCCTTACTTATATACCCTCTCAA	595	(7)
			Foc-SIX8b-F (R)	GGCCTAATCCACACAACA		
Real-time PCR	R4	Foc ₂₄₂	FocSc-1 (F) FocSc-1 (R)	CAGGGGATGTATGAGGAGGCTAGGCTA GTGACAGCGTCGTCTAGTTCCCTGGAG	242	(22)
Single-tube duplex real-time fluorescence PCR (SDRF-PCR)	Race 1 (R1)	SCAR marker of FJZ3	Foc1-0422F1 (F)	AGGTGAGAAATCTGTTGAGTCTCGAT	100	(39)
			Foc1-0422R1 (R)	AACTCCTTCACCAGCCTTTCG		
			Foc1-0422P1 (Probe, P)	Cy5-AGCATGGCAGGTCGT-BHQ3		
SDRF-PCR	R4	SCAR marker of XJZ2	Foc4-0422F2 (F)	GGCTCCAGACCGACAAGATAT	100	(39)
			Foc4-0422R2 (R)	TGCTTGCCCTTGATTCTGACT		
			Foc4-0422P2 (P)	FAM-ATAATCGAACAGTTTGCG-BHQ1		
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	R4	EF155535	F3 (Forward outer primer)	AGGACCTCTTCGAATGGCA	213 (F3/B3)	(15)
			B3 (backward outer primer)	GACGCTGCAGCTATGACAA		
			FIP (Forward inner primer, F1c-F2)	GGTGGCTCAATAGCCCAGTGAA- CCGATACCTGTGAAGTCGC		
			BIP (Backward inner primer, B1c-B2)	CGACATCATCAGCATCTCCGCT- AGCTTTGGCTCTTGACAG		
Real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (RealAmp)	TR4	FJ985561 (IGS of rDNA)	F3 (=FocTR4-F)	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG	472 (F3/B3)	(40)
			B3 (=FocTR4-R)	CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA		
			FIP (F1c-F2)	ATTCAAGCCGATTGACGGATT- GGATATGTAGAGAATGTGGTGG		
			BIP (B1c-B2)	CCAGAGTCGGGTCTAGGGTAG- AGGCGATTGAAGTTGACTAC		
RealAmp	R4	EF155535	F3 B3 FIP (F1c-F2)	CGAATGGCAAGAGTCTGTT TGTTCTGCCAGTTTGACG GAGCGGGTGGCTCAATA- CGATACCTGTGAAGTCGC	217 (F3/B3)	(28)

承上

Techniques	Target races	Amplification primers		Primers/probes sequences (5'-3')	Amplicon length (bp)	References
		Target sequences/genes	Names			
			BIP (B1c-B2)	CGCTGGCTTCCGAAACTACT-TGACAAGAACCACAGGAAGC		
Insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR)	R4	EU379562	iiFoc-1 (F)	CAGGGGATGTATGAGGAGGCTA	104	(21)
			iiFoc-2 (R)	CGGAAACAGACTCTTGCCATTC		
			iipFoc-1 (P)	FAMACCACGCGATGAGATT-MGB-NFQ		

泌物而活化發芽 (germination)，發芽後之菌絲 (hyphae) 能從香蕉根部傷口或直接由香蕉幼嫩的側根部侵入表皮，透過皮層細胞進入維管束導管組織內，病原菌會在導管內繁殖，並在其內產生大量分生孢子 (conidia)，做為次級感染源 (secondary inoculum)，發芽之分生孢子產生菌絲後，可逐漸向上蔓延並大範圍地佔據香蕉維管束組織，造成寄主香蕉水分與養分的輸導受阻，而使受感染的香蕉從下位葉葉緣開始出現黃化萎凋的病徵，而後會造成假莖褐化與縱裂，至發病後期全株萎凋死亡，而且至病害環後期之香蕉黃葉病菌可在腐爛香蕉組織內形成休眠厚膜孢子，當香蕉因罹病而完全腐敗後，其厚膜孢子可再次汙染土壤並於土壤內殘存多年，土壤中的厚膜孢子即成為下次病害環中的初級感染源 (primary inoculum)。目前針對此病害尚無較為經濟、方便、有效且對環境友善的防治方法，能保護香蕉避免受到此病原的危害^(31, 32)。此外，根據文獻記載，黃葉病菌可透過灌溉用水、耕作栽培所使用的農機具等進行傳播⁽¹³⁾，並能內生於蕉園內常見的雜草中，目前已知蕉園內之中間寄主有節節草 (*Commelina diffusa*)、長柄菊 (*Tridax procumbens*)、孟仁草 (*Chloris inflata*) 等，因此前述田間雜草亦為黃葉病菌之可能感染源⁽²⁹⁾。

依照香蕉黃葉病菌對不同蕉種的致病性 (pathogenicity)，可被區分為幾個生理小種 (race)⁽³²⁾：香蕉黃葉病菌第一型生理小種 (race 1) 能感染栽培種大米七 (Gros Michel，基因型為AAA) 及絲蕉 (Silk，基因型為AAB)，目前全球各地多以種植華蕉品系 (Cavendish) 來克服第一型生理小種的危害；第二型生理小種 (race 2) 能感染基因型為ABB的稜指蕉 (Bluggoe) 及其他相近栽培種；第三型生理小種 (race 3) 則能感染赫蕉屬 (*Heliconia* spp.)，但由於赫蕉為觀賞用蕉種且不屬於 *Musa* 屬，因此目前已有學者主張應將第三型生理小種自黃葉病菌的生理小種中剔除而獨立為一新的分化種⁽³⁰⁾；而目前全球發生最普遍且最具危害性的第四型生理小種 (race 4) 則能在全球各地攻擊基因型AAA (如Cavendish、Gros Michel)、AAB (如Apple、Taiwan Latundan等)、ABB (Bluggoe) 及AA (如Pisang Lilin) 等食用蕉^(31, 32)，此外，黃葉病菌第四型生理小種根據棲息地區、營養

體親和群 (vegetative compatibility group, VCG) 及發病強度的不同，又可細分為熱帶第四型 (tropical race 4, TR4) 與亞熱帶第四型 (subtropical race 4, ST4)^(7, 10)。由目前研究指出，熱帶第四型香蕉黃葉病菌被認為是一個分布範圍最廣的生理小種，Ploetz⁽³¹⁾ 指出包括澳大利亞 (Australia)、中國 (China) 的華南、廣東、廣西、印度尼西亞 (Indonesia)、馬來西亞 (Malaysia)、菲律賓 (Philippines) 及台灣 (Taiwan) 等地皆有香蕉黃葉病菌熱帶第四型危害當地香蕉的記錄。近年來，此生理小種也在約旦 (Jordan)⁽⁹⁾ 及莫三比克 (Mozambique)⁽¹⁾ 境內被發現，顯現此生理小種對於香蕉產業的威脅性日漸擴大^(31, 32)。營養親合群主要依據病原菌之間的異核體 (heterokaryon) 之形成，而被區分成不同營養親合群，各營養親合群與生理小種間關係複雜，例如第一型生理小種隸屬於 VCG 0123、VCG 0124、VCG 0125、VCG 0128、VCG 01210、VCG 01217 及 VCG 0128 等；第二型生理小種隸屬於 VCG 0124、VCG 0125、VCG 0128 及 VCG 01214；亞熱帶第四型生理小種隸屬於 VCG 0120、VCG 0126、VCG 0129、VCG 0211 及 VCG 01215 等、熱帶第四型生理小種則隸屬於 VCG 0121、VCG 0122 及 VCG 01213/16⁽⁷⁾。亞熱帶第四型生理小種被認為不容易感染於熱帶地區栽植之華蕉品系，但熱帶第四型卻在溫度適宜時能感染亞熱帶地區所栽種之華蕉品系⁽³¹⁾，因此熱帶第四型被認為是目前危害香蕉產業最嚴重的香蕉黃葉病菌生理小種，可感染目前幾乎所有對香蕉黃葉病菌其他生理小種具抗性之栽培品種，影響甚鉅。

一般植物病理研究法於鑑定香蕉黃葉病菌之瓶頸

一般診斷植物病害慣用的方法，大多是直接依照病組織上的病徵 (symptom) 與病兆 (sign)，並搭配透過光學顯微鏡鏡檢的方式，依據所看到的病原菌型態進行初步判定^(17, 24)，接著再以完成柯霍式法則 (Koch's postulates)⁽¹⁹⁾ 的方式來確認造成該生物性病害之病因。但利用型態特徵 (morphological characteristics) 來鑑定香蕉黃葉病菌，需對鐮孢菌 (*Fusarium*) 的分類有相當程度的了解⁽¹⁹⁾。尤其尖鐮孢菌 (*Fusarium*

oxysporum, Fo) 能夠引起超過 100 種作物，出現維管束萎凋 (vascular wilt) 或根腐 (root rot) 等病徵⁽¹⁷⁾，植物病理學家根據其可感染寄主的種類不同，將尖鏽孢菌進一步區分為具寄主專一性的不同分化型 (*forma specialis*, f. sp.)，而同一分化型中依照可感染之栽培種差異，更被細分為不同生理小種。一般人不太容易辨識出鏽孢菌種間的型態差異，因此未具備鏽孢菌型態鑑定能力之鑑定人員，單以鏡檢方式就能準確鑑定出鏽孢菌甚至是尖鏽孢菌實有難度，且區分不同分化型及生理小種，更需要輔以接種試驗才能夠完成，然而以接種試驗來鑑定尖鏽孢菌的分化型與生理小種，雖然準確卻需花費較長的時間，無法達到田間或防檢疫實務的需求⁽²⁴⁾。

分子檢測方法之簡介

快速並準確地檢測甚至監測出特定病原，對於減少病害的發生與傳播及擬定有效的防治策略是相當重要的⁽⁴⁾。由於分生技術的快速發展，近年已有許多分子技術被應用於檢測植物病原菌，尤以 DNA 為基礎的分子檢測方法則最常被使用，此些方法主要是根據特定 DNA 或具保守性的基因序列 (conserved gene sequence)，如：核糖體核酸 (ribosomal DNA, rDNA) 內轉錄基因間隔區 (internal transcribed spacer, ITS)、轉譯延長因子 1 alpha (translation elongation factor-1 alpha, TF-1 alpha)、粒線體小亞基 (mitochondrial small subunit) 等，這些保守性基因序列往往具種內差異性，可作為類源關係 (phylogeny) 分析時的良好基因標的⁽¹⁹⁾。此外，也可利用 DNA 指紋技術 (DNA fingerprinting technique)，如限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、隨機增幅多型性片段 (random amplification of polymorphic DNA, RAPD)、擴增片段長度多型性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 等常用技術，來構建特異性指紋圖譜，藉此找出具物種特異性的分子標誌 (molecular marker)，再利用序列特異性擴增區域 (sequence characterized amplified region, SCAR) 分析法，搭配如聚合酶連鎖反應、即時聚合酶連鎖反應、恆溫環狀擴增法等核酸擴增技術，來進行特定病原之分子檢測⁽¹⁶⁾。

香蕉黃葉病菌分子檢測技術之發展

1. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

現今常用的聚合酶連鎖反應，是於 1983 年所發展出的一個核酸擴增技術，其反應過程包括變性 (denature)、黏合 (annealing)、延長 (Extension) 等三個步驟，藉由 *Thermus aquaticus* 的 DNA 聚合酶，即 *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq* DNA polymerase)，可在短時間內大量擴增目標 DNA 片段⁽¹²⁾。Liu 氏利用隨機增幅多型性核酸 (RAPD) 技術，篩選出對香蕉黃葉病菌第四型生理小種具專一性的分子標誌，命名為 OPA02₄₀₀⁽²³⁾，該特異性分子標誌之基因庫登錄編號 (GenBank accession number) 為 EU379562，與基因庫登錄編號 EF155535 序列完全

相同。並由 Chang 氏依此分子標誌序列，設計出香蕉黃葉病菌第四型生理小種專一性引子，該專一性引子能以聚合酶連鎖反應法增幅出大小為 242 bp 的分子標誌⁽³⁾ (後命名為 Foc242)，此分子標誌可用於專一性檢測出受感染香蕉中的黃葉病菌熱帶第四型與亞熱帶第四型生理小種^(18, 20)。Dita 等人⁽⁵⁾ 於 2010 年根據香蕉黃葉病菌核糖體核酸 (rDNA) 非轉錄基因間隔區 (intergenic spacer region, IGS) 的兩個單點多型性序列 (single nucleotide polymorphisms)，設計出專一性引子，並搭配雙重引子聚合酶連鎖反應法 (duplex PCR)，來檢測高度危害性的香蕉黃葉病菌熱帶型第四型生理小種⁽⁵⁾。Fraser-Smith 等人⁽⁷⁾ 於 2014 年以次世代定序策略 (next generation sequencing) 找到香蕉黃葉病菌可能的效應蛋白基因 *SIX8* (putative effector gene *SIX8*, *Secreted In Xylem 8*)，並根據該基因序列設計兩組特異性引子，分別對香蕉黃葉病菌第四型與亞熱帶第四型生理小種有專一性⁽⁷⁾。

2. 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)

於 1996 年時，Heid 等人⁽¹¹⁾ 提出了即時聚合酶連鎖反應技術，隨著植物病理學家這二十年來的努力，此技術已成為檢測植物病原菌的常用方法⁽²⁾。其原理為在傳統聚合酶連鎖反應溶液中添加螢光物質，隨著反應循環數增加，目標 DNA 產物濃度倍數成長，反應期間螢光物質與目標 DNA 產物結合並激發出螢光，藉由儀器偵測螢光訊號後可由電腦分析計算出產物生成量。一般而言，即時聚合酶連鎖反應法的準確度 (accuracy) 與敏感度 (sensitivity) 都優於一般聚合酶連鎖反應法，因此更適應用於定量檢體中的病原菌⁽⁸⁾。目前即時聚合酶連鎖反應法可依螢光標識物特性區分為兩大類：即非特異性螢光染料 (non-specific fluorescent dyes) 與特異性螢光探針 (specific fluorescent probe) 等兩大類。

非特異性螢光染料法，係利用可嵌合於 DNA 雙股間的非特異性螢光染料 (例如 SYBR green) 對雙股 DNA 進行螢光染色，隨著目標雙股 DNA 於聚合酶連鎖反應過程中擴增而增加，即時偵測反應中螢光訊號累積的情形，同時定量檢體中的目標物。此種方法的優點是，僅需設計出一組專一性引子而不需在反應過程中加入特異性螢光探針，因此相對於特異性螢光探針式的即時聚合酶連鎖反應，所需的反應成本較為低廉，但本系統的缺點，乃是無法分辨特異性產物與非特異性產物 (常見如引子自黏合和非專一性產物等) 之螢光訊號而造成實驗誤差，因此較不容易排除偽陽性 (false positive) 的反應。Lin 等人⁽²²⁾ 於 2013 年即根據 Foc242 DNA 標誌序列，以非特異性即時聚合酶連鎖反應技術，開發出香蕉黃葉病菌第四型生理小種之檢測方法，該學者開發出的檢測方法再現性極高，可測得微量標的 DNA (10^{-6} ng) 與香蕉黃葉病菌分生孢子 (20 spores)，且可對患病香蕉組織的黃葉病菌進行絕對定量⁽²²⁾。

特異性螢光探針則是根據目標 DNA 的專一性序列所設計，並在所設計之序列兩端標記上螢光染料報導物 (fluorescent

reporter dye) 與螢光染劑抑制物 (quencher dye) 這兩種不同能階之分子而成為螢光探針 (常見如 TaqMan 探針), 螢光探針在游離態時, 報導物被激發時所發出的螢光, 會以螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的原理轉移至抑制物上, 此時儀器無法測得報導物的螢光訊號。因 Taq DNA 聚合酶, 具有 5' 至 3' 外切酶 (exo-ribonucleases) 活性, 因此能在反應過程中以外切酶活性將前方 DNA 序列以 5' 端至 3' 端的方向切除, 因此 TaqMan 探針若能專一性的鏈結上於目標 DNA 上, 隨著目標 DNA 被擴增時, TaqMan 探針被 Taq DNA 聚合酶水解, 而使螢光染劑報導物與抑制物分離, 此時儀器可測得報導物的螢光訊號, 隨著 DNA 產物的增加, 改變後的螢光訊號強度也隨之增強, 進而達到及時偵測的目的。此外, 使用特異性螢光探針更容易獲得專一性的結果, 且可以藉由不同的螢光波長的探針, 於同一樣本下同時進行多目標即時聚合酶連鎖反應 (multiplex real-time PCR), 功能相當強大, 但由於除須設計一組專一性引子外, 尚須於反應過程中加入特異性螢光探針, 因此所需的反應成本較為昂貴。Yang 等人於 2015 年⁽³⁹⁾ 即以特異性螢光探針系統, 發表以單管雙重即時定量螢光聚合酶連鎖反應 (single-tube duplex real-time fluorescence PCR, SDRF-PCR), 同時檢測香蕉黃葉病菌第一型與第四型生理小種, 此系統的檢測標的, 即是 Li 等人⁽¹⁶⁾ 於 2012 年所發表, 疑似為第四型生理小種的致病相關基因, 此套系統對香蕉黃葉病菌第一型與第四型生理小種具專一性, 對標準 DNA 選殖株 (clone of standard DNA) 的檢測極限為 10^{-7} ng, 靈敏度為該學者系統之聚合酶連鎖反應的一百倍 (10^{-5} ng)⁽³⁹⁾。

3. 恆溫環狀擴增法 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

近年來恆溫環狀擴增法逐漸被應用於檢測植物病原, 此技術為 2000 年時, 日本學者 Notomi 與其團隊所發表的核酸擴增技術⁽²⁷⁾, 由於恆溫環狀擴增法是利用一種具股置換能力 (strand displacement) 的 DNA 聚合酶 (*Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase, *Bst* DNA polymerase) 來進行核酸擴增, 因此有別於聚合酶連鎖反應中所須要進行的循環式升降溫反應, 恆溫環狀擴增法能於恆溫下 (約 65°C) 進行核酸擴增反應, 於理想狀態下整個反應過程僅需時約 60 分鐘, 被認為是一套更快速的核酸擴增技術。

欲進行恆溫環狀擴增反應時須根據目標核酸序列設計出 3 組引子對, 分別為外引子對 (outer primers)、內引子對 (inner primers) 以及環狀引子對 (loop primers), 若能從目標物序列的特異區中設計出適合的引子, 將有機會能以恆溫環狀擴增反應專一性地擴增出標的核酸片段, 但與其他核酸擴增技術相比, 設計出適用於此技術之專一性引子對的難度較高, 但也由於此 3 組引子對可同時辨識目標物的 6 個特異性區段, 因此恆溫環狀擴增反應技術被認為是一個專一性極高的核酸擴增技術。

在結果判讀部分, 恆溫環狀擴增反應時會伴隨焦磷酸之累

積, 因此可以反應前後之混濁度作為恆溫環狀擴增反應成功的依據⁽²⁶⁾。此外, 也可於反應進行中加入 SYBR green I 等螢光染劑 (fluorescent dye)^(25, 26), 或羥基酚藍 (hydroxynaphthol blue, HNB)、硫酸銅 (CuSO_4)⁽⁶⁾ 等金屬離子指示劑, 以呈色結果作為反應成功的依據。Li 等人⁽¹⁵⁾ 於 2013 年以恆溫環狀擴增反應技術的原理, 依據基因庫登錄編號 EF155535 序列, 開發出香蕉黃葉病菌第四型生理小種之檢測技術, 並能以 SYBR green I 之呈色結果判讀檢測結果, 該學者所開發之恆溫環狀擴增反應技術具高度檢測靈敏性, 對香蕉黃葉病菌第四型生理小種純菌基因組 DNA (genomic DNA) 之檢測極限可達 10 fg, 此外, 該技術亦可用於檢測出帶有第四型生理小種之香蕉黃葉病菌的患病香蕉組織, 且檢出率達 100%⁽¹⁵⁾。Zhang 等人⁽⁴⁰⁾ 與 Peng 等人⁽²⁸⁾ 亦根據香蕉黃葉病菌的非轉錄基因間隔區 (FJ985561) 與特異性分子標誌 (EF155535), 以恆溫環狀擴增反應技術搭配即時聚合酶連鎖反應, 分別於 2013 年與 2014 年開發出檢測香蕉黃葉病菌熱帶第四型生理小種⁽⁴⁰⁾ 與第四型生理小種⁽²⁸⁾ 之即時螢光恆溫環狀擴增反應 (real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification, RealAmp) 技術, 此兩方法對標準 DNA 選殖株之檢測極限分別達 0.4 pg 與 3.82×10^3 copies; 對人工帶菌土樣之檢測極限則皆達 10^3 spores/g。

4. 隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應 (Insulated isothermal polymerase chain reaction, iPCR)

隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應, 為一相對新穎的核酸擴增法, 此技術是在 2002 年時, 由美國學者 Krishnan 與其團隊於 Science 期刊, 報導了一個新穎的熱對流式 PCR (convective PCR) 技術⁽¹⁴⁾, 此技術主要是運用瑞立-貝納 (Rayleigh-Benard) 熱對流原理, 利用固定於圓筒上下位置的溫度, 建立一種自然熱對流而不間斷的溫度梯度循環 (61°C 至 97°C), 成功達到 PCR 反應過程中需要的三個反應步驟的溫度。由於熱對流式 PCR 無需經過反覆的升溫降溫過程, 因此大幅縮短反應時間。而此隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應技術, 是一個快速、簡單、可重複性的檢測分析方法, 並具現地 (on-site) 檢測能力, 因此已被應用於部分檢測領域, 且被國際學者所認同, 至今已應用於蝦類病毒檢測^(34, 35, 36)、飼料帶病原檢測⁽³⁷⁾、寵物病毒檢測⁽³⁸⁾ 等。此外, 隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應技術也可用來輔助傳統病原鑑定與檢測法, 各種方法可統合成一套檢測流程, 同時達到快速、準確、方便等特性, 進而完成現地檢測病原之最終目的。於 2016 年, Lin 等人⁽²¹⁾ 再次依據特異性分子標誌序列 EU379562, 以隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應技術, 開發出香蕉黃葉病菌第四型生理小種之快速檢測技術, 此檢測技術對香蕉黃葉病菌標準 DNA 選殖株與純菌基因組 DNA 之檢測極限更低, 分別達 1 copy 與 1 fg, 且此技術不需進行後續電泳分析, 即可於 60 分鐘內完成隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應, 以檢測出田間自然感染之不同病程患病蕉株上的香蕉黃葉病菌, 並對受病原菌感染後之輕微病徵或無病徵之帶菌香蕉假莖具高度檢出率

(21), 明顯優於一般 PCR 的檢測系統。

結論與展望

經過近十年來許多學者的努力，已有一些如聚合酶連鎖反應、即時聚合酶連鎖反應、恆溫環狀擴增法及隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應等分子技術(表一)，被發展來快速檢測香蕉黃葉病菌，這些技術相對於一般病理診斷法，最大的優勢在於其專一性高，且對於操作者的植物病害診斷實務經驗較無要求，相當具有應用潛力與優勢。此外，上述分子檢測方法靈敏度很高，可用以檢測微量的香蕉黃葉病菌(甚至只攜帶幾個分生孢子之帶菌檢體)，因此在研究系統性感染，或對於病徵顯現前之初期病害診斷特別實用。雖然上述分子檢測技術經過多年來的發展，已漸被用於協助檢測香蕉黃葉病菌，然而該些技術至今在先天技術上或經濟上仍各有限制，因此在施行或推行於現地檢測實務上仍有其不足⁽¹⁹⁾，未來唯有發展更輕便簡易的檢測設備及操作流程，配合高生產力的生產系統，減少每個樣品所需耗費之成本，此些以分子檢測為基礎的香蕉黃葉病菌檢測法才有可能廣用於香蕉管理系統中。病害管理系統的目標在於適時適量的有效施用藥劑，並減少化學農藥的使用，過去就許多作物病害防治而言，通常只有在肉眼觀察病徵，判定病害發生危害程度已超過經濟損害門檻時才具體實行防治措施，近年來所發展的香蕉黃葉病菌分子檢測技術提供了合理客觀的方法，未來或許可以做為評判田間香蕉黃葉病的發生程度是否到達需要且值得防治的標準。此外，未來應建立出完善的田間帶菌香蕉與土樣檢體之快速核酸萃取、採樣模式與檢測流程，並將前述分子檢測技術導入田間黃葉病菌檢測工作以建立香蕉黃葉病田間預警系統。此些分子檢測技術未來或許可以協助監測田間香蕉黃葉病的發生，並搭配生物防治或其他田間栽培管理等方式進行田間病害之綜合管理，進而減少全球香蕉在經濟上的損失。最後期望此新興技術，將來能實際運用於各個領域，如田間病原菌族群監測、評估防治效果、抗病育種篩選平台等，讓香蕉病害綜合管理工作能更有效率。

謝辭

本文蒙國立台東專科學校助理教授吳榮彬博士協予文字潤飾，謹此謝忱。

引用文獻

- Butler, D., 2013. Fungus threatens top banana. *Nature* 504:195e196.
- Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., and Sánchez-Torres, P. 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. Pages 151-202 in: *Plant Pathology*. C. J. Cumagun ed. InTechOpen.
- Chang, J. Y. 2005. Molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and its detection in infected banana seedlings. Master Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 102pp. (in Chinese with English abstract).
- De Boer, S. H., and López, M. M. 2012. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:197-218.
- Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Jr, M. T., and Kema, G. H. J. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathol.* 59:348-357.
- Duan, Y. B., Ge, C. Y., Zhang, X. K., Wang, J. X., and Zhou, M. G. 2014. Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for *Botrytis cinerea* based on loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* 9:e111094.
- Fraser-Smith, S., Czişlowski, E., Meldrum, R. A., Zander, M., O'Neill, W., Balali, G. R., and Aitken, E. A. B. 2014. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Pathol.* 63:1044-1052.
- Gachon, C., Mingam, A., and Charrier, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J. Exp. Bot.* 55:1445-1454.
- Garcia, F. A., Ordonez, N., Konkol, J., Al Qasem, M., Naser, Z., Abdel wali, M., Salem, N. M., Waalwijk, C., Ploetz, R. C., and Kema, G. 2014. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 associated with Panama disease of banana outside Southeast Asia. *Plant Dis.* 98:694.
- Ghag, S. B., Shekhawat, U. K., and Ganapathi, T. R. 2015. Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. *Int. J. Pest Manag.* 61:250-263.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994.
- Henson, J. M., and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.
- Hwang, S. C., and Ko, W. H. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Dis.* 88:580-588.
- Krishnan, M., Ugaz, V. M., and Burns, M. A. 2002. PCR in a Rayleigh-Benard convection cell. *Science* 298:793.
- Li, B., Du, J., Lan, C., Liu, P., Weng, Q., and Chen, Q. 2013. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 135:903-911.

16. Li, M. H., Yu X. T., Wang, H. F., Zhou, J. N., Xi, P. G., and Jiang, Z. D. 2012. Rapid detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 1 and race 4. *Sci. Agric. Sin.* 45:3971-3979. (In Chinese with English abstract)
17. Lievens, B., Rep, M., and Thomma, B. P. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Manag. Sci.* 64:781-788.
18. Lin, Y. H. 2008. Development of molecular methods for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 and *F. oxysporum* f. sp. *niveum*. PhD Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 100pp. (in Chinese with English abstract).
19. Lin, Y. H., and Lin, Y. J. 2016. Recent developments in the molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *J. Nat. Sci.* 2:e239.
20. Lin, Y. H., Chang, J. Y., Liu, E. T., Chao, C. P., Huang, J. W., and Chang, P. F. L. 2009. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:353-365.
21. Lin, Y. H., Lin, Y. J., Chang, T. D., Hong, L. L., Chen, T. Y., and Chang, P. F. L. 2016. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR) assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *PLoS ONE* 11:e0159681.
22. 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. *ubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 135:395-405.
23. Liu, E. T. 2003. Analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* using random amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction techniques. Master thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 72pp. (in Chinese with English abstract).
24. McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., and Ward, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 59:129-142.
25. Mori, Y., and Notomi, T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 15:62-69.
26. Niessen, L., and Vogel, R. F. 2010. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int. J. Food Microbiol.* 140:183-191.
27. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:E63.
28. Peng, J., Zhang, H., Chen, F., Zhang, X., Xie, Y., Hou, X., Li, G., and Pu, J. 2014. Rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 in soil by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification. *J. Appl. Microbiol.* 117:1740-1749.
29. Pérez-Vicente, L., Dita, M. A., and Martínez de la Parte, E. 2014. Regional workshop on the diagnosis of Fusarium wilt (Panama disease) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4: mitigating the threat and preventing its spread in the Caribbean. in: Technical Manual: prevention and diagnostic of Fusarium wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 (TR4). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
30. Ploetz, R. C. 2006. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Phytopathology* 96:653-656.
31. Ploetz, R. C. 2015a. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Prot.* 73:7-15.
32. Ploetz, R. C. 2015b. Fusarium wilt of banana. *Phytopathology* 105:1512-1521.
33. Su, H. J., Hwang, H. J., and Ko, W. H. 1986. Fusarium wilt of cavendish banana in Taiwan. *Plant Dis.* 70:814-818.
34. Tsai, Y. L., Lin, Y. C., Chou, P. H., Teng, P. H., and Pei-Yu Lee. 2012a. Detection of white spot syndrome virus by polymerase chain reaction performed under insulated isothermal conditions. *J. Virol. Methods* 181:134-137.
35. Tsai, Y. L., Wang, H. C., Lo, C. F., Tang-Nelson, Kathy., Lightner, D., Ou, B. R., Hour, A. L., Tsai, C. F., Yen, C. C., Chang, H. F. G., Teng, P. H., Lee P. Y. 2014. Validation of a commercial insulated isothermal PCR-based POKKIT test for rapid and easy detection of white spot syndrome virus infection in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS ONE* 9:e90545.
36. Tsai, Y. L., Wang, H. T. T., Chang, H. F. G., Tsai, C. F., Lin, C. K., Teng, P. H., Su, C., Jeng, C. C., and Lee, P. Y. 2012b. Development of TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (iiPCR) for sensitive and specific on-site pathogen detection. *PLoS ONE* 7:e45278.
37. Tsen, H. Y., Shih, C. M., Teng, P. H., Chen, H. Y., Lin, C. W., Chiou, C. S., Wang, H. T., Chang, H. F., Chung, T. Y., Lee, P. Y., and Chiang, Y. C. 2013. Detection of *Salmonella* in chicken meat by insulated isothermal PCR. *J. Food Prot.* 76:1322-1329.
38. Wilkes, R. P., Anis, E., Dunbar, D., Lee, P. A., Tsai, Y. L.,

- Lee, F. C., Chang, H. G., Wang, H. T., and Graham, E.M. 2017. Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection. *J. Feline Med. Surg.* 1:1098612X17712847. doi: 10.1177/1098612X17712847. (Online First)
39. Yang, L. L., Sun, L. X., Ruan, X. L., Qiu, D. Y., Chen, D. H., Cai, X. Q., and Li, H. P. 2015. Development of a single-tube duplex real-time fluorescence method for the rapid quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (FOC1) and race 4 (FOC4) using TaqMan probes. *Crop Prot.* 68:27-35.
40. Zhang, X., Zhang, H., Pu, J., Qi, Y., Yu, Q., Xie, Y., and Peng J. 2013. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in soil. *PLoS ONE* 8:e82841.

economic impacts of FWB on the banana industry.

Keywords: Banana, Fusarium wilt of banana, Panama disease, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Race, Molecular detection

ABSTRACT

Lin, Y.-H.¹, Lin, Yi-Jia¹, and Chang, P.-F. L.^{2,3,*} 2018. Current developments of molecular detection technology for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *J. Plant Med.* 60(3): 1-8.

*Corresponding author, Chang, P.-F. L., E-mail: pfchang@nchu.edu.tw

Bananas and plantains (*Musa* sp.) are cultivated in humid tropical and subtropical areas worldwide and are among the most important fruit crops in the world. Fusarium wilt of banana (FWB), which is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) and is commonly known as Panama disease, is a destructive disease that currently affects bananas in all banana-producing regions of the world, including Southern Asia, Southeast Asia, Africa, and Latin America. Accurate methods for monitoring plant health and detecting the pathogen in early stage are essential for formulating appropriate and timely disease management strategies to counteract the disease. Recently, an increasing number of molecular detection methods, such as conventional polymerase chain reaction (PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), real-time PCR, real-time LAMP (RealAmp), and insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR) assays, have been developed to specifically and rapidly detect Foc. These detection methods offer high degrees of detection sensitivity and specificity. Herein, we briefly review the molecular methods currently being used for the rapid and quantitative detection of Foc and monitoring of banana health, with the aim of providing the relevant technical information in order to encourage much needed research on reducing the dissemination of the pathogen and the