

開發臺灣尖镰孢菌之分子檢測技術

黃麗年^{1,2}、林依佳¹、溫辰杰¹、陳以錚³、朱盛祺⁴、林盈宏^{1,5,*}

¹ 國立屏東科技大學植物醫學系，屏東縣，臺灣

² 得揚生物科技有限公司，屏東縣，臺灣

³ 臺灣香蕉研究所技術服務組，屏東縣，臺灣

⁴ 行政院農業委員會苗栗區農業改良場，苗栗縣，臺灣

⁵ 國立屏東科技大學植物醫學教學醫院，屏東縣，臺灣

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

摘要

黃麗年、林依佳、溫辰杰、陳以錚、朱盛祺、林盈宏。2020。
開發臺灣尖镰孢菌之分子檢測技術。植物醫學62(4): 1-12。

尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 寄主範圍相當廣泛，可感染超過 100 種作物，並使作物發生萎凋病。本病原為土壤傳播性病原真菌，可藉由根部傷口或是自然開口侵入植物，受感染之作物會出現葉片黃化、植株萎凋等病徵。目前對尖镰孢菌感染所造成的病害，目前尚無較為有效且安全之防治法可避免萎凋病發生時所造成的危害。因此監測田間尖镰孢菌族群量，或為避免此病原菌於田間傳播進而減少此病害大發生的可行策略之一。為了達到快速檢測田間尖镰孢菌之目的，本研究針對尖镰孢菌建立一套快速檢測平台。自尖镰孢菌基因組中設計專一性之引子對 LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 與探針 pLNH，搭配聚合酶連鎖反應 (PCR) 與即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 技術，進行引子專一性及靈敏度分析，並將檢測反應條件最佳化後，導入香蕉黃葉病田間檢體的田間分子檢測工作中。結果顯示，本研究開發之檢測方法對臺灣來源之尖镰孢菌具專一性，且兩項 real-time PCR 技術 (包含 SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR) 對具病徵的香蕉假莖中香蕉黃葉病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) 之帶菌檢出率為 100%。在 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 三項技術中，對無病徵香蕉假莖中的香蕉黃葉病菌之帶菌檢出率，以該兩項 real-time PCR 檢測方法對病原的檢出率為最高，皆達 93.8%。未來希望能將此檢測平台應用於各種尖镰孢菌帶菌檢體之檢測工作，於田間及早篩檢出帶菌檢體，藉此擬定適當的防治策略，進而有效減少此類病害發生時造成的經濟損失。

關鍵詞：作物萎凋病、植物病原檢測、SYBR green-based real-time PCR、TaqMan probe-based real-time PCR、植物帶菌檢測

緒言

镰孢菌屬 (*Fusarium* spp.) 之病原菌能對多種作物造成危害，其中以尖镰孢菌 (*F. oxysporum*) 為最受矚目的植物病原真菌之一⁽²¹⁾。尖镰孢菌可存於活體或已腐敗的植株殘體內，並能殘存於土壤中多年，其寄主範圍廣泛，可引起上百種植物之維管束萎凋 (vascular wilt)，是許多作物栽培過程中的一大限制因子⁽⁵⁾。

尖镰孢菌為土傳播病原菌 (soil-borne pathogens)，尖镰孢菌能產生大分生孢子 (macroconidia) 與小分生孢子 (microconidia)，且能以厚膜孢子 (chlamydospores) 的形式在土壤中長期存活⁽¹⁾，可殘存達數十年之久。尖镰孢菌感染作物所造成的危害方式，以番茄萎凋病菌為例簡述如下：當適當寄主存在時，萎凋病菌可隨之發芽，穿透側根形成的裂縫或藉由根部傷口進入輸導組織，於維管束內大量繁殖後造成維管束堵塞，使養分及水分無法輸送，進而使受害植株呈現黃化與萎凋等病徵，最終導致植株死亡⁽³⁾。

根據尖镰孢菌可感染的寄主種類，可將其區分為多種分化型 (*forma specialis*, f. sp.)，目前有記錄的尖镰孢菌分化型已超過 150 種以上⁽¹¹⁾，其寄主包括許多重要的經濟作物。例如造成香蕉黃葉病之病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc)，其普遍存在於香蕉栽培產區土壤中，被認為是香蕉栽培過程中最具破壞性的病害之一⁽⁴⁾；由 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon) 造成的西瓜蔓割病，是西瓜栽培過程中具危害性的病害，亦為西瓜生產的主要限制因素之一⁽¹⁶⁾；以及由 *F. oxysporum* f. sp.

2 J. Plant Med.

lycopersici (Fol) 所造成之番茄萎凋病，是番茄重要的病害，嚴重發生時會造成重大經濟損失⁽¹³⁾；*F. oxysporum* f. sp. *cepae* 能感染大蒜，造成大蒜發生大蒜基腐病⁽⁶⁾。目前對尖镰孢菌引起植物病害致病機制之了解仍然有限，也尚無經濟、有效且同時安全的防治方法能防除此病害。作物萎凋病之所以難以防治，乃因尖镰孢菌之厚膜孢子具有厚壁結構，能抵抗環境逆境與化學藥劑⁽¹⁷⁾，目前尚難以透過單一化學或生物防治措施進行有效防治⁽⁸⁾，且土壤受病原菌汙染後田間帶菌量會逐年上升，並以厚膜孢子的形式在田間土壤或是植物根系間殘存多年⁽¹²⁾，在作物之各生長期皆能感染危害，因此於全球各地發生日益嚴重。

為了更有效率地偵測病原菌，至今已有許多生物技術被發展成為檢測工具，其中 PCR 技術已被開發成為快速檢測病原 DNA 的一種分析方法⁽¹⁰⁾；real-time PCR 技術也已被應用於各領域，成為一項更靈敏且快速的分子檢測分析工具，於食品和臨床診斷、醫院衛生、殺真菌劑測試或農業監測等方面進行應用⁽²⁸⁾。分子檢測其優點為相較於以往之分離、鏡檢等鑑定方法更加快速，又其檢測方式於分子層面進行，而更加準確，但仍具設備與耗材較昂貴、需要專業人員操作等缺點。目前針對尖镰孢菌之分子檢測技術，已知由 Lin 等學者找到對尖镰孢菌具專一性之分子標誌 (Fn₃₂₇)⁽¹⁷⁾，但該尖镰孢菌分子標誌技術，尚未被應用於作物萎凋病之田間植物檢體的檢測工作上。因此，本研究針對此尖镰孢菌專一性分子標誌，設計出一組新的檢測用引子對及探針，測試引子專一性及靈敏性後，用於田間香蕉檢體的檢測工作上，以確認此檢測系統於田間應用之可行性。本研究構建的尖镰孢菌快速檢測平台，可用以協助篩選出帶病的田間蕉株。未來此檢測平台應可用於即早檢測出田間不同作物之尖镰孢菌帶菌檢體，藉此擬定合適的防治策略，以避免此病害發生時對農業所造成的經濟損失。

材料與方法

病原菌分離及鑑定

本研究分別自各地區收集疑似罹患萎凋病之植物檢體，在無菌操作台內切下病健部組織，利用1% 次氯酸鈉 (sodium hypochlorite, Clorox) 進行消毒，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，再以馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA, Difco) 進行菌株的繼代及繁殖。並以後文所述之基因組 DNA (genomic DNA) 製備法，製備供試菌株 DNA 後作為供試樣本，以評估本研究採用之檢測用引子對，是否對臺灣萎凋病菌分離株具檢測專一性 (供試菌株列如表一)。並以不同菌株來源之 DNA，利用核糖體內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer) 引子組 ITS1/ITS4⁽³⁰⁾ 經 PCR 及電泳分析後，將產物委由基龍米克斯

生物科技公司進行定序，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 之製備流程分述如下：利用 PCR 搭配本研究依據尖镰孢菌專一性分子標誌 Fn327 之序列⁽¹⁷⁾，設計出對尖镰孢菌具檢測專一性之引子對 LNHF_nF-1/LNHF_nR-1。針對上述經分離、純化、病原性測定及分子鑑定確認為作物萎凋病菌之各菌株，萃取其基因組 DNA 進行尖镰孢菌專一性分子標誌 Fn327 之核酸擴增及電泳分析，獲得預期大小的 DNA 條帶 (327 bp) 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。接著利用 pGEM-T cloning kit (GMBiolab Co, Ltd., Taichung city, Taiwan) 將回收後的產物片段接合至載體上，再轉殖至大腸桿菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 勝任細胞內，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) 量測質體 DNA 的 O.D. 值 (values of optical density)，並以軟體 (DNA Copy Number and Dilution Calculator, Thermo Fisher Scientific Inc.) 定量成 10^7 至 10^2 套 (copies) 後，以 PCR 技術及 real-time PCR 技術進行後續靈敏度分析。

基因組 DNA (genomic DNA) 製備

以秤藥匙刮下長滿 9 公分培養皿之病原菌菌絲加入液態氮於研鉢中磨碎後，參考 Dellaporta 等學者 (1983)⁽⁷⁾ 的方法萃取真菌基因組 DNA，再將純化後之真菌基因組 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 10^1 至 10^5 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

參考 Schilling 等學者 (1996)⁽²⁷⁾ 所使用之菌絲樣品製備法並加以修改：待平板上的尖镰孢菌長滿平板後，利用秤藥匙刮下菌絲體 (mycelium)，將菌絲體烘乾 5 小時後秤重，並取 10 mg 的乾燥菌絲混合 100 μ L ddH₂O，經 10 倍序列稀釋後，以 PCR 技術及 real-time PCR 技術進行引子靈敏度分析。

表一、尖镰孢菌检测用引子對之專一性測試

TABLE 1. Specificity assays of the primers used in this study

Diseases and species	Isolate code numbers	Geographic locations	PCR-based identification methods used in this study		
			ITS1/ITS4a	FnSc-1/FnSc-2b	LNHFnF-1/LNHFnR-1
Fusarium wilt of anoectochilus/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>anoectochili</i>	YHL-F002	Nantow, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of asparagus bean/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	YHL-F003	Changhua, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of balsam pear/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momordicae</i>	YHL-F006	Changhua, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of banana/ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	ATCC 38741	Taiwan	+	+	+
	ATCC 76243	Queensland, Australia	+	+	+
	ATCC 76257	Honduras	+	+	+
	ATCC 76262	Taiwan	+	+	+
	ATCC 96289	southeastern Queensland, Australia	+	+	+
	ATCC 96290	southeastern Queensland, Australia	+	+	+
	HTS-F054	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F055	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F056	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F057	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F058	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F059	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F060	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F061	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F062	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F063	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F064	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F065	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F066	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F067	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F105	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F106	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F107	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F108	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F109	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F110	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F111	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F112	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F113	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F114	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F115	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F116	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F117	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F118	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F119	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F120	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	HTS-F121	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	YHL-F015	Nantow, Taiwan	+	+	+
	YJL-F044	Pingtung, Taiwan	+	+	+
	YJL-F068	Pingtung, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of gladiolus/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	YHL-F019	Taiwan	+	+	+

4 J. Plant Med.

承上頁

Fusarium wilt of lettuce/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	YHL-F021	Taoyuan, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of lily/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i>	YHL-F035	Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of loofah/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>luffae</i>	YHL-F038	Nantow, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of melon/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	TDC-F008	Kaohsiung, Taiwan	+	+	+
	TDC-F009	Kaohsiung, Taiwan	+	+	+
	TDC-F011	Kaohsiung, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of radish/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	YHL-F041	Nantow, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of strawberry/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	LNH-F038	Pingtung, Taiwan	+	+	+
Fusarium wilt of tomato/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	ATCC 76616	California, USA	+	+	+
Fusarium wilt of watermelon/ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	ATCC 18467	South Carolina, USA	+	+	+
	ATCC 42006	Taiwan	+	+	+
	ATCC 62940	Texas, USA	+	+	+
Endophyte from melon/ <i>F. oxysporum</i>	YJL-F056	Kaohsiung, Taiwan	+	—	—
Saprophyte from soil/ <i>F. oxysporum</i>	TDC-F012	Kaohsiung, Taiwan	+	—	—
Bakanae disease of rice/ <i>F. verticillioides</i>	YHL-F056	Taiwan	+	—	—
Balsam pear/anthracnose/ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LNH-F032	Pingtung, Taiwan	+	—	—
Cordana leaf spot of banana/ <i>Cordana musae</i>	LNH-F011	Pingtung, Taiwan	+	—	—
Rice sheath blight/ <i>Rhizoctonia solani</i>	SMS-F012	Pingtung, Taiwan	+	—	—
Rice sheath blight/ <i>Rhizoctonia solani</i>	SMS-F013	Miaoli, Taiwan	+	—	—
Scabby fruit canke of guava/ <i>Pestalotiopsis psidii</i>	TDC-F002	Pingtung, Taiwan	+	—	—

^a The conserved primer set ITS1/ITS4 was used to amplify and sequence the ~500-bp rDNA region used for the identification of the internal transcribed spacers 1 (ITS1), 5.8S rDNA, and ITS2 of the fungal pathogens used in this study.

^b The specific primer set FnSc-1/FnSc-2 designed Lin et al. (2010) was used for for comparison with the novel primer set LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 in the molecular detection assays of *Fusarium oxysporum*.

供試分生孢子製備

切取病原菌之菌絲塊放入馬鈴薯葡萄糖液態培養基 (potato dextrose broth, PDB) 中培養，放置於 28℃ 震盪培養箱培養 1 週後，以濾紙 (No.1, Advantec, Japan) 將孢子濾下，並使用血球計數器 (hemacytometer, Reichert Bright-Line, Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) 於光學顯微鏡 (Carl Zeiss, Axioskop 2 plus, Germany) 下進行計算與定量後，經 10 倍序列稀釋以 PCR 技術及 real-time PCR 技術進行引子靈敏度分析。

上述檢體準備完成後，將標準 DNA、基因組 DNA、菌絲體樣本與分生孢子以所述之濃度進行 PCR，並以凝膠電泳判讀各引子對此四種樣本之檢測極限，將其可測得之最低濃度作為靈敏度測試結果。

引子專一性測試

本研究利用各種尖鏢孢菌之臺灣分離株與美國典型培養物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 之國際菌株 (所有供試菌株詳列如表一)，測試本研究所設計之 LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 引子對是否對尖鏢孢菌具專一性，各分離株至少完成三次專一性測試。於 PCR 中以對真核生物內轉錄間隔區所設計之引子對 ITS1/ITS4⁽³⁰⁾ 作為 PCR 反應內控制對照組，

並以 Lin 等學者於 2010 年所發表對尖鏢孢菌具專一性之引子對 FnSc-1/FnSc-2 和本研究中所設計之引子對 LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 進行引子對專一性比較 (所有引子序列詳列如表二)。

PCR 技術及電泳分析

以 PCR 技術搭配本研究中所開發之專一性引子對 LNHF_nF-1 (5'-CGCCAGAGGACCCCTAAACT-3') /LNHF_nR-1 (5'-TCGATGCCAGAACCAAGAGA-3') 進行待測檢體分析，引子設計以 primer express 3.0 程式，確認引子及探針 GC 比 (GC content) 及 T_m值 (Melting Temperature, T_m value) 符合引子設計原則，且同時使用 Oligo 7 軟體確認引子、探針及 DNA 模板間不易形成 duplex formation 或 hairpin formation，引子序列並於美國國家生物訊息中心資料庫中進行核酸序列 (Nucleotide BLAST) 比對，初步確認對尖鏢孢菌具專一性。以核醣體內轉錄間隔區之引子對 ITS1/ITS4⁽³⁰⁾ 為 PCR 反應內控制對照組。PCR 反應總體積為 20 µl，包含 10 µl 2X KAPA Taq ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA) (2X KAPA Taq Buffer, 0.4 mM dNTPs, 0.02 units/µl KAPA Taq DNA Polymerase)、0.5 µl 10 µM forward primer、0.5 µl 10 µM reverse primer、8 µl ddH₂O、1 µl DNA (20 ng/µl)。PCR 儀器使用

表二、本研究所使用之引子序列

TABLE 2. Primers used in this study

Primer names (Forward/Reverse)	Primer sequences (5'-3')	Annealing temperatures (°C)	Amplicons (bp)	References
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG/ TCCTCCGCTTATTGATATGC	55	≈500~700	(30)
FnSc-1/FnSc-2	TACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAG/ TTGAGGAACGCGAATTAACGCGAGTC	62	327	(17)
LNHFnF-1/LNHFNR-1	CGCCAGAGGACCCCTAAACT/ TCTCTTGGTTCTGGCATCGA	60	100	This study

T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories., Co., Ltd., Hercules, CA, USA)。PCR 反應條件為：(1) 94°C 1.5 分鐘；(2) 94 °C 30 秒鐘、62°C 30 秒鐘、72°C 30 秒鐘，總共30 循環；(3) 72 °C 10 分鐘；ITS1/ITS4⁽³⁰⁾ 與 FnSc-1/FnSc-2⁽¹⁷⁾ 引子對的 PCR 反應條件為則分別參照原始文獻所描述。最後將 PCR 產物於 2% 洋菜凝膠中以 100V 35 分鐘進行電泳分析，並利用 Gel Doc™ 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 LNHFnF-1/LNHFNR-1 進行待測檢體分析，試劑及反應條件如下：反應總體積為 20 µl，包含 10 µl 2X KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix Universal (Kapa Biosystems., Inc., Wilmington, MA, USA) (2X KAPA SYBR FAST qPCR Buffer, 0.4 mM dNTPs, 0.02 units/µl KAPA SYBR FAST DNA Polymerase)、0.5 µl 10 µM forward primer、0.5 µl 10 µM reverse primer、8 µl ddH₂O、1 µl DNA (20 ng/µl)。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)。

為了比較非專一性螢光 real-time PCR 技術與專一性螢光 real-time PCR 技術，對於各式受測檢體之檢測結果進行比較。本研究以 TaqMan probe-based real-time PCR (一種專一性螢光 real-time PCR 技術) 技術，搭配本研究設計之專一性引子對 LNHFnF-1/LNHFNR-1 與 TaqMan 螢光探針 pLNH (5'-FAM-GTAACTTCTGAGTAAAACC-MGB-3')，進行待測檢體分析，試劑及反應條件如下：反應總體積為 20 µl，包含 10 µl 2X KAPA PROBE FAST qPCR Kit Master Mix Universal (Kapa Biosystems., Inc., Wilmington, MA, USA) (2X KAPA® PROBE FAST qPCR Buffer, 0.4 mM dNTPs, 0.02 units/µl KAPA Taq HotStart DNA Polymerase)、0.5 µl 10 µM forward primer、0.5 µl 10 µM reverse primer、8 µl ddH₂O、1 µl DNA (20 ng/µl)。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。前述兩 real-time PCR，儀器皆使用 CFX96 Touch™ (Bio-Rad

Laboratories., Co., Ltd., Hercules, CA, USA)。

田間帶菌檢體之分析

為了驗證本研究所開發之檢測技術，對田間檢體之檢測適用性，本研究以帶有香蕉黃葉病菌之田間香蕉假莖作為此模擬試驗檢測平台之田間檢體，並將本研究所開發之檢測技術，應用於不同患病程度的香蕉假莖檢體之帶菌檢測分析中。各病程香蕉假莖 DNA 萃取方法詳參照 Lin 等學者⁽²⁰⁾，將各香蕉 DNA 檢體分別以 PCR、SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR 進行分子檢測。病程分級方式係以香蕉假莖褐化之情形，將病徵區分成：無病徵、輕度病徵 (香蕉假莖剖面組織壞死程度小於三分之一)、中度病徵 (香蕉假莖剖面組織壞死程度介於三分之一至三分之二間) 及重度病徵 (香蕉假莖剖面組織壞死程度三分之二以上)⁽¹⁸⁾。試以不同病程香蕉檢體，來驗證與比較本研究所開發之分子檢測系統是否適合應用於帶菌植株檢體之分子檢測實務上。

結 果

尖鏽孢菌專一性引子對之檢測適用性測試

本研究以 Lin 等學者於 2010 年所發表，對尖鏽孢菌具專一性之引子對 FnSc-1/FnSc-2 和本研究中所設計之引子對 LNHFnF-1/LNHFNR-1，進行引子對專一性比較，各分離株至少完成三次專一性測試。由結果顯示，兩組尖鏽孢菌檢測用引子對，皆可專一性地從各種尖鏽孢菌之臺灣分離株與美國典型培養物保藏中心之國際菌株 DNA 中增幅出符合預期產物大小為 327 bp 與 100 bp 的 DNA 條帶片段，其中對寄主作物包含金線蓮 (anoectochilus)、長豇豆 (asparagus bean)、苦瓜 (balsam pear)、香蕉 (banana)、唐菖蒲 (gladiolus)、萵苣 (lettuce)、百合 (lily)、絲瓜 (loofah)、甜瓜 (melon)、蘿蔔 (radish)、草莓 (strawberry) 番茄 (tomato)、西瓜 (watermelon) 等之不同分化種皆具擴增性 (結果詳列如表一)，而其他非尖鏽孢菌株 (包含 *F. verticillioides*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Cordana*

表三、尖镰孢菌檢測技術之檢測極限

TABLE 3. Detection limit of the molecular detection methods used in this study.

Samples	PCR-based detection	Real-time PCR-based detections	
		SYBR green-based real-time PCR	TaqMan probe-based real-time PCR
Standard DNA (copies)	1.00E+06	1.00E+03	1.00E+02
Genomic DNA (pg)	1.00E+02	1.00E+01	1.00E+02
Spores	1.00E+03	1.00E+00	1.00E+00
Mycelium (ng)	1.00E+02	1.00E+00	1.00E+01

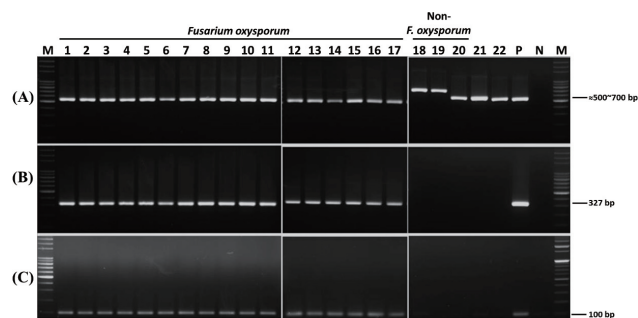
musae、*Rhizoctonia solani*、*Pestalotiopsis psidii* 等) 與尖镰孢菌無病原性菌株，則無法擴增出條帶，部分 PCR 增幅產物之核酸電泳結果示如圖一。顯示此檢測用專一性引子對國內外來源之尖镰孢菌具檢測適用性，且兩受測引子組於各作物萎凋病菌之專一性上無差異性。

引子靈敏度測試

本研究所開發之 PCR 檢測系統，可用於快速鑑定尖镰孢菌菌株，而此套 PCR 檢測系統對尖镰孢菌標準 DNA 的檢出極限為 10^6 copies、對尖镰孢菌基因組 DNA 的檢出極限為 100 pg、對尖镰孢菌菌絲檢體的檢出極限為 100 ng、對尖镰孢分生孢子的檢出極限為 10^3 個分生孢子 (經試驗五次重複後，結果列如表三)。為了提升對尖镰孢菌各式檢體之檢測靈敏度，本研究新設計出一組檢測用引子組 LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 並搭配 SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR 技術來提升此套檢測技術之檢測靈敏度，經試驗五次重複後，此兩套檢測技術對尖镰孢菌不同檢體之檢測靈敏度結果示如圖一至圖四。

當採用 SYBR green-based real-time PCR 為核心技術時，對尖镰孢菌標準 DNA 的檢出極限為 10^3 copies (表三)，經回歸分析後此系統的結果可獲得一公式為 $y = -3.348x + 42.416$ 的標準曲線，其判斷係數 (R^2) 為 0.999 (圖二 A)。若檢體為尖镰孢菌基因組 DNA 時，系統中若含有高於 10^{-1} pg 標的菌株 DNA 時，即可獲得穩定的正檢出結果 (表三)，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.766x + 22.377$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.990 (圖三 A)。若系統中含有菌絲檢體達 1 ng 以上時，即可獲得穩定的正檢出結果 (表三)，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -4.075x + 9.999$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.998 (圖四 A)。若系統中含有 1 顆分生孢子以上時，即可獲得穩定的正檢出結果 (表三)，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.405x + 32.235$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.997 (圖五 A)。

若改採 TaqMan probe-based real-time PCR 為技術核心，檢測標準 DNA 的檢出極限為 10^2 copies (表三)，經回歸分析

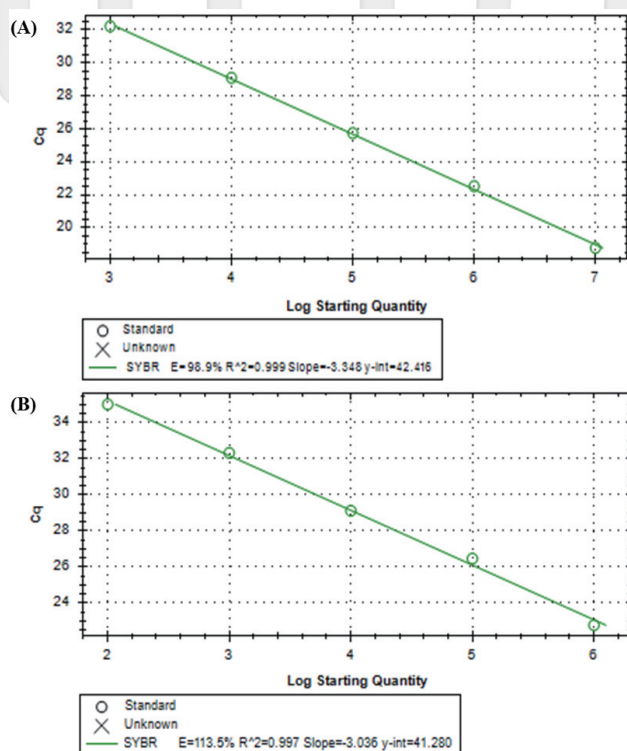


圖一、尖镰孢菌專一性引子對之 PCR 檢測適用性測試。以三組引子 (A) ITS1/ITS4、(B) F_nSc-1/F_nSc-2、(C) LNHF_nF-1/LNHF_nR-1，對不同尖镰孢菌分化型 (*Fusarium oxysporum*，編號 1-17) 菌株、非尖镰孢菌 (Non-*F. oxysporum*，編號 18-20) 菌株及內生性 (編號 21) 與腐生性尖镰孢菌 (編號 22) 之基因組 DNA 進行引子專一性測試。P：為國際菌株編號 ATCC 38741 之正對照。N：無菌去離子水之負對照。M：DNA 標準品 (Gen-100 DNA ladder, GMbiolab Co. Ltd., Taichung, Taiwan)。

Fig. 1. Specificity test results of the primer sets F_nSc-1/F_nSc-2 and LNHF_nF-1/LNHF_nR-1. PCR amplification of seventeen *Fusarium oxysporum* isolates, three non-*F. oxysporum* (*Rhizoctonia solani* and *F. verticillioide*) isolates and one endophyte and one saprophyte of *F. oxysporum* with three different primer sets (A) ITS1/ITS4, (B) F_nSc-1/F_nSc-2, and (C) LNHF_nF-1/LNHF_nR-1. PCR amplifications were performed using 20 ng genomic DNA extracted from each isolate. Lanes 1: *F. oxysporum* f. sp. *anoectochili*; Lane 2: *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*; Lane 3: *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*; Lane 4: *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*; Lane 5: *F. oxysporum* f. sp. *lilii*; Lane 6: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Lane 7-9: *F. oxysporum* f. sp. *niveum*; Lanes 10-13: *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; Lane 14: *F. oxysporum* f. sp. *raphani*; Lane 15: *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*; Lane 16: *F. oxysporum* f. sp. *momordicae*; Lane 17: *F. oxysporum* f. sp. *luffae*; Lanes 18-19: *Rhizoctonia solani*; Lane 20: *F. verticillioide*; Lane 21: *F. oxysporum* (endophyte); Lane 22: *F. oxysporum* (saprophyte); P: PCR control using 20 ng genomic DNA of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ATCC 38741 as the template; N: negative control using sterile ddH₂O as the template; M: DNA markers of Gen-100 DNA ladder (GMbiolab Co. Ltd., Taichung, Taiwan).

後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.035x + 41.280$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.997 (圖二 B)；本系統可穩定測得最低至 10^{-2} pg 的基因組 DNA (表三)，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -3.360x + 20.511$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.999 (圖三 B)；若檢測對象為菌絲溶液時，檢測極限可達 10^{-1} ng (表三)，經回歸分析後此系統結果可獲得一公式為 $y = -4.039x + 7.433$ 的標準曲線，判斷係數為 0.998 (圖四 B)；若系統中含有 1 顆分生孢子以上時 (表三)，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 $y = -3.3589x + 35.136$ 的標準曲線，其判斷係數為 0.997 (圖五 B)。

此結果指出，前述四種檢體於本研究的試驗濃度下，皆能於兩 real-time PCR 系統中獲得線性結果 (判斷係數大於 0.95)，因此本研究所開發之 real-time PCR 系統適合做為後續分析帶菌



圖二、LNHFfN-1/LNHFfN-1 檢測用引子對，於 (A) SYBR green-based real-time PCR 與 (B) TaqMan probe-based real-time PCR 下，針對經序列稀釋之尖鏽孢菌標準 DNA (10^7 to 10^2 copies standard DNA) 進行靈敏度測試。

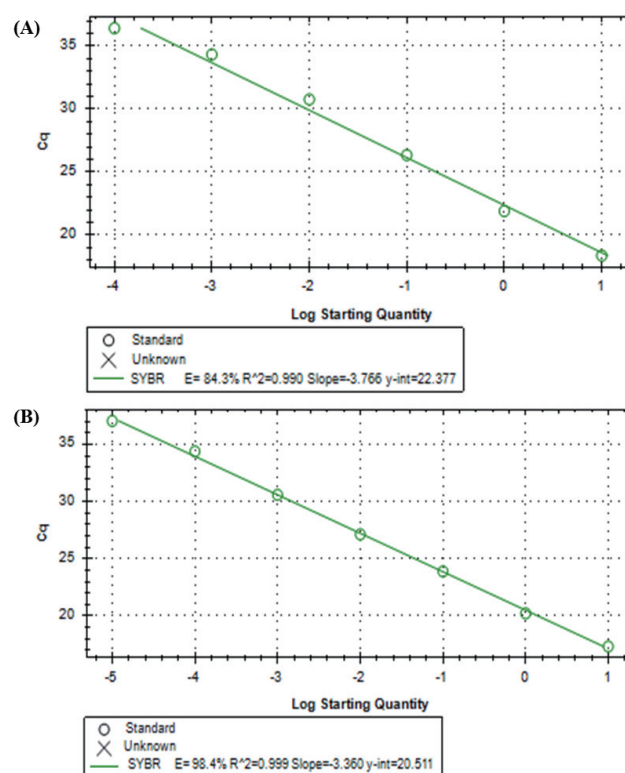
Fig. 2. Sensitivity evaluation of the molecular detection assays based on (A) SYBR green-based real-time PCR and (B) TaqMan probe-based real-time PCR with primer set LNHFfN-1/LNHFfN-1. Serial dilutions of standard DNA (ranging from 10^7 to 10^2 copies) from *Fusarium oxysporum* were subjected to real-time PCR assays.

檢體的核心技術。

檢測田間帶菌香蕉檢體

本研究將 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 等檢測系統，導入對不同罹病程度的田間蕉株檢體之檢測試驗中，不同罹病程度之蕉株檢體被分群為無病徵、輕度病徵、中度病徵與重度病徵假莖檢體，各種病徵檢體各採集來自 16 個不同蕉株，共 64 個樣本，這些檢體於進行分子檢測前，先分別取樣進行病原菌分離確定假莖檢體中帶有香蕉黃葉病菌後，再以 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 技術進行分子檢測分析，檢測結果如表四。

於無病徵與輕度病徵的檢體中，PCR 檢測技術可分別檢測篩檢出 43.8% (7/16) 與 87.5% (14/16) 的帶菌樣本；此時 SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR 檢測系統，對無病徵與輕度病徵的樣本之檢出率則分別為 93.8% (無病徵，15/16) 與 100% (輕度病徵，16/16)；此三套檢



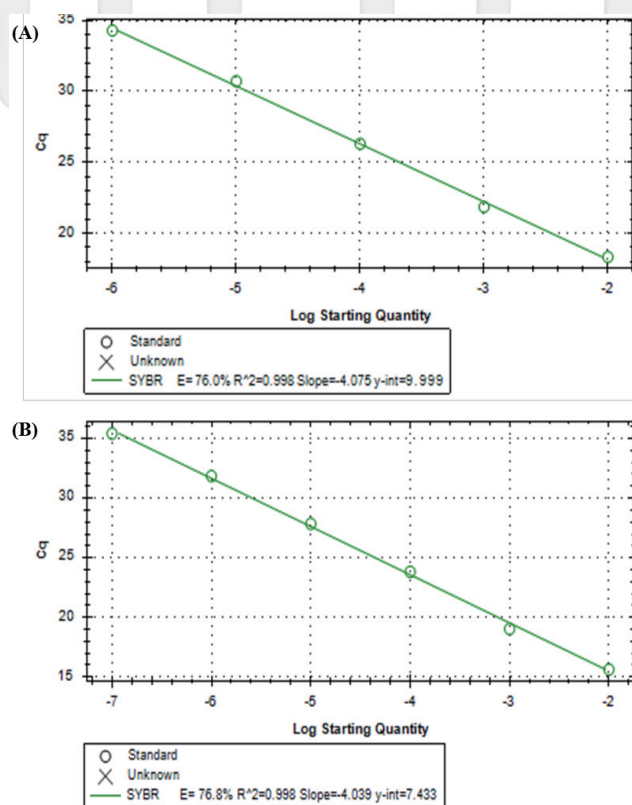
圖三、LNHFfN-1/LNHFfN-1 檢測用引子對，於 (A) SYBR green-based real-time PCR 與 (B) TaqMan probe-based real-time PCR 下，針對經序列稀釋之尖鏽孢菌基因組 DNA (10^1 to 10^5 ng genomic DNA) 進行靈敏度測試。

Fig. 3. Sensitivity evaluation of the molecular detection assays based on (A) SYBR green-based real-time PCR and (B) TaqMan probe-based real-time PCR with primer set LNHFfN-1/LNHFfN-1. Serial dilutions of genomic DNA (ranging from 10^1 to 10^5 ng) of *Fusarium oxysporum* were subjected to real-time PCR assays.

測系統對中度病徵與重度病徵檢體之檢出率則皆為全檢出。此結果顯示：本研究中的 real-time PCR 檢測系統相較 PCR 檢測系統，更適合被應用於篩檢輕症之帶菌香蕉假莖檢體 (表四)。

討 論

根據筆者的經驗，當檢體核酸品質不佳時，FnSc-1/ FnSc-2 引子對之增幅產物中，容易出現引子二聚體 (primer dimer)。若要進行檢體定量時，使用 FnSc-1/ FnSc-2 引子對則容易發生結果判讀不易等問題。因此本研究依據尖鏽孢菌專一性分子標誌 Fn327 序列⁽¹⁷⁾，另設計出新的檢測用專一性引子對 LNHFfN-1/ LNHFfN-1 與螢光探針 pLNH，並藉此開發出對臺灣來源尖鏽孢菌菌株具專一性之 PCR、SYBR green-based real-time PCR 及 TaqMan probe-based real-time PCR 等分子檢測技術。Fn₃₂₇ 位於 ITS 區域中，其為真核生物的核糖體基因內一呈縱線排列的重

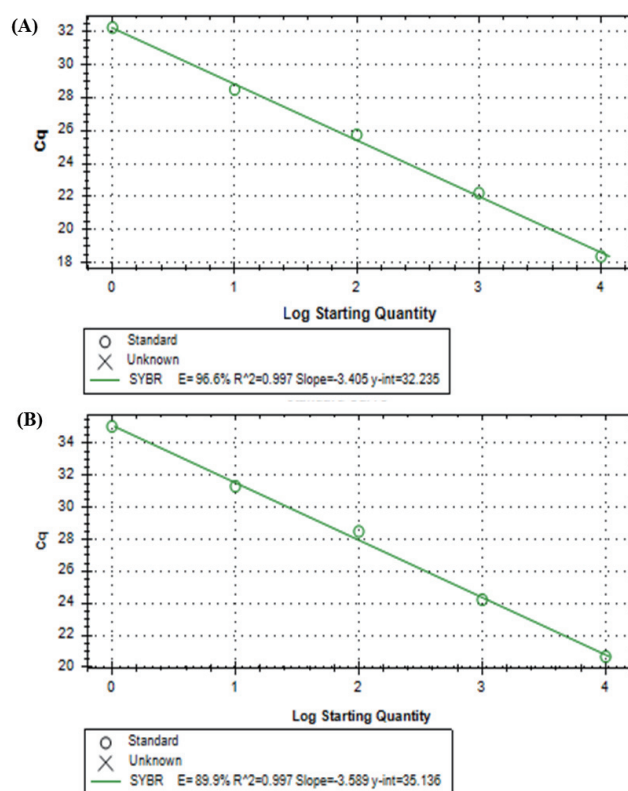


圖四、LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 檢測用引子對，於 (A) SYBR green-based real-time PCR 與 (B) TaqMan probe-based real-time PCR 下，針對經序列稀釋之尖鏽孢菌菌絲體 (10^{-2} to 10^{-7} mg mycelium) 進行靈敏度測試。

Fig. 4. Sensitivity evaluation of the molecular detection assays based on (A) SYBR green-based real-time PCR and (B) TaqMan probe-based real-time PCR with primer set LNHF_nF-1/LNHF_nR-1. Serial dilutions of mycelium (ranging from 10^{-2} to 10^{-7} mg) of *Fusarium oxysporum* were subjected to real-time PCR assays.

複性基因區域，而在不同物種間 ITS 區域的長度與序列間，常有很大的變異，適合搭配 PCR 技術來區分不同的物種。由本研究之試驗結果證實：LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 引子對，能專一性地於尖鏽孢菌核酸中擴增此專一性分子標誌 Fn₃₂₇，此分子標誌也已被證實對尖鏽孢菌具專一性⁽¹⁷⁾。此外，此分子標誌，對無病原性之尖鏽孢菌菌株不具擴增性。這些結果意味著，尖鏽孢菌間的病原性 ITS 演化或具相關性。未來我們將持續蒐集臺灣不同地區之尖鏽孢菌菌株，來驗證此檢測系統對更多尖鏽孢菌臺灣分離株是否皆具專一性。

本研究所開發的 PCR 檢測系統與 Lin 等學者於 2010 年所發表之 PCR 檢測系統相比，對尖鏽孢菌基因組 DNA 的檢測極限相當，皆為 10^2 pg⁽¹⁷⁾，但若考慮到對核酸檢體品質的容忍性，我們仍優先推薦使用 LNHF_nF-1/LNHF_nR-1。此外，本研究所開發之 SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR，對尖鏽孢菌各種檢體的檢測靈敏度均優於 PCR 檢測系統 (表三)，而此兩項 real-time PCR 系統均可



圖五、LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 檢測用引子對，於 (A) SYBR green-based real-time PCR 與 (B) TaqMan probe-based real-time PCR 下，針對經序列稀釋之尖鏽孢菌分生孢子 (10^0 to 10^4 conidial spores) 進行靈敏度測試。

Fig. 5. Sensitivity evaluation of the molecular detection assays based on (A) SYBR green-based real-time PCR and (B) TaqMan probe-based real-time PCR with primer set LNHF_nF-1/LNHF_nR-1. Serial dilutions of conidial spore (ranging from 10^0 to 10^4 spores) of *Fusarium oxysporum* were subjected to real-time PCR assays.

被用來快速篩檢尚未出現病徵的帶菌香蕉檢體，且檢出率達 93.8% (表四)，若檢體為帶病徵的香蕉假莖時，此兩項技術對尖鏽孢菌的檢測率皆可達 100%；此時若以 PCR 檢測系統對無病徵的帶菌香蕉檢體進行篩檢時，PCR 系統對病原菌的正檢出率僅為 43.8% (表四)。這些結果顯示：比較本研究開發的 PCR 與 real-time PCR 兩種技術，對尖鏽孢菌各供試檢體的靈敏性：若以標準 DNA、基因組 DNA、菌絲體及分生孢子作為供試檢體時，real-time PCR 系統皆優於 PCR 系統；若比較 SYBR green-based real-time PCR 與 TaqMan probe-based real-time PCR 兩系統，TaqMan probe-based real-time PCR 對於尖鏽孢菌標準 DNA、基因組 DNA 及菌絲體之檢測靈敏度，約十倍於 SYBR green-based real-time PCR (表三)；檢體若改採為尖鏽孢菌分生孢子，兩項技術之檢測靈敏度結果則相當 (表三)。

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)，均可用於快速檢測出攜帶香蕉黃葉病菌的帶菌香蕉假

表四、以尖镰孢菌检测技术进行田间带菌蕉株检测之分子检测

TABLE 4. Comparison of the molecular methods for *in-planta* field-detection

<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> -infected banana samples ^a	PCR-based detection		Real-time PCR-based detections			
	Positive	Negative	SYBR green-based real-time PCR		TaqMan probe-based real-time PCR	
			Positive	Negative	Positive	Negative
Symptomless pseudostems ^b	7	9	7	9	7	9
Mild symptom pseudostems	14	2	14	2	14	2
Moderate symptom pseudostems	16	0	16	0	16	0
Severe symptom pseudostems	16	0	16	0	16	0
Total (%)	53 (82.8%)	11 (17.2%)	63 (98.4%)	1 (1.56%)	63 (98.4%)	1 (1.56%)

^a A total of 64 varying symptomatic banana pseudostems were used for *in-planta* detection assays.^b Sampling criteria of infected banana pseudostems were adhered to according to Lin *et al.* (2020)

莖，且對無病徵與輕度病徵檢體的正檢出率均優於 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 技術之花費成本為 PCR < SYBR green-based real-time PCR < TaqMan probe-based real-time PCR；花費時間為 TaqMan probe-based real-time PCR < SYBR green-based real-time PCR < PCR、對尖镰孢菌檢體靈敏度為 TaqMan probe-based real-time PCR > SYBR green-based real-time PCR > PCR、對各種病程的香蕉假莖帶菌檢體的檢出率為 TaqMan probe-based real-time PCR = SYBR green-based real-time PCR > PCR。因此，若不考量技術成本，檢體若為尖镰孢菌各式檢體（包含標準 DNA、基因組 DNA、菌絲體及分生孢子等），我們推薦使用之優先順序為 TaqMan probe-based real-time PCR > SYBR green-based real-time PCR > PCR；若有技術成本考量，且檢體為重症帶菌香蕉假莖（包含中度與重度病徵等），我們推薦使用之優先順序為 PCR > SYBR green-based real-time PCR > TaqMan probe-based real-time PCR；若檢體為輕症帶菌香蕉假莖（包含無病徵與輕度病徵等），我們推薦使用之優先順序為 SYBR-green-based real-time PCR > TaqMan probe-based real-time PCR > PCR。

綜合上述，本研究利用對尖镰孢菌具專一性之引子對 LNHF_nF-1/LNHF_nR-1與螢光探針 pLNH，搭配 PCR、SYBR green-based real-time PCR 或 TaqMan probe-based real-time PCR 等技術，開發出對尖镰孢菌與植株帶菌檢體的篩檢技術。而本研究開發之檢測方法皆可更快地檢測出帶有黃葉病菌的香蕉假莖檢體。

本研究所開發之尖镰孢菌檢測技術於香蕉黃葉病的分子檢測上應為可行，然而在其他作物上之衍伸應用，則尚屬未知。在不同作物的分子檢測工作中，受測檢體中病原菌含量與分子檢測技術的靈敏度，往往與正檢出結果具關連性。而受尖镰孢菌感染之不同作物上，其感染嚴重程度與檢體上含菌量亦通常具正相關。目前已有一些的尖镰孢菌不同分化型的檢測技術被

開發 (2, 9, 14, 16, 19, 22-26, 29)。未來在不同作物上，不妨可參考學者們已發表的核酸萃取系統，試著將其套用至本尖镰孢菌檢測系統中，應能獲得不錯的檢測結果。未來擬進一步利用本研究開發的尖镰孢菌檢測技術，輔助受尖镰孢菌危害的其他作物診斷偵測實務，或應用於植物病理學的相關研究上，藉此降低此病原菌對農業生產的危害衝擊，或對各種作物萎凋病提出更有效的防治策略。

謝 辭

感謝國立中興大學植物病理學系張碧芳教授提供本研究所需之美國典型培養物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 之國際菌株 DNA，以及科技部計畫編號 105-2311-B-020-001 (開發尖镰孢菌之泛用型現地檢測技術平台) 經費支持，謹此謝忱。

引用文獻

1. 柯勇。2003。作物病害與防治。藝軒圖書出版社。29 pp。
2. Abd-Elsalam, K. A., Asran-Amal, A., Schnieder, F., Migheli, Q., and Verreet, J. A. 2006. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton roots by PCR and real-time PCR assay. J. Plant Dis. Protect. 113:14-19.
3. Agrios, G. N. 2005. Genetics of virulence in pathogens and of resistance in host plants. In: Agrios, G. N. Plant pathology. Academic Press, pp 525.
4. Alison E. Robertson. 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.
5. Almasi, M. A., Dehabadi, S. M. H., Moradi, A., Eftekhari, Z.,

- Ojaghkandi, M. A., and Aghaei, S. 2013. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant Pathol. Microbiol. 4:177.
6. Chand, S. K., Nanda, S., Mishra, P., and Joshi, P. K. 2017. Multiple garlic (*Allium sativum* L.) microRNAs regulate the immunity against the basal rot fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Plant Sci. 257:9-21.
7. Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Reporter 1:19-21.
8. Deltour, P., França, S. C., Pereira, O. L., Cardoso, I., De Neve, S., Debode, J., and Höfte, M. 2017. Disease suppressiveness to *Fusarium* wilt of banana in an agroforestry system: influence of soil characteristics and plant community. Agr. Ecosyst. Environ. 239:173-181.
9. Dubey, S. C., Priyanka, K., and Upadhyay, B. K. 2014. Development of molecular markers and probes based on TEF-1 α , β -tubulin and ITS gene sequences for quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by using real-time PCR. Phytoparasitica 42:355-366.
10. Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Oxford University Press 19:1394.
11. Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ploetz, R. C., Gordon, T. R. and Viljoen, A. 2011. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae *specialis cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. Infect. Genet. Evol. 11:533-542.
12. Fravel, D., Olivain, C., and Alabouvette, C. 2002. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist 157:493-502.
13. Huang, C. H., Tsai, P. T., and Vallad, G. E. 2016. Development of a TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection and Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Soil. J. Phytopathol. 164:7-8.
14. Kashiwa, T., Inami, K., Teraoka, T., Komatsu, K., and Arie, T. 2016. Detection of cabbage yellows fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in soil by PCR and real-time PCR. J. Gen. Plant Pathol. 82:240-247.
15. Lin, Y. H., Chang, J. Y., Liu, E. T., Chao, C. P., Huang, J. W., and Chang, P. F. L. 2009a. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. Eur. J. Plant Pathol. 123:353-365.
16. Lin, Y. H., Chen, K. S., Huang, J. W., Liou, T. D., and Chang, P. F. L. 2009b. Development of a molecular method for rapid differentiation of watermelon lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Bot. Stud. 50:273-280.
17. Lin, Y. H., Chen, K. S., Chang, J. Y., Wan, Y. L., Hsu, C. C., Huang, J. W., and Chang, P. F. L. 2010. Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. New Biotechnol. 27:409-418.
18. Lin, Y. J., Lin, H. K., and Lin, Y. H. 2020. Construction of Raman spectroscopic fingerprints for the detection of *Fusarium* wilt of banana in Taiwan. PLoS One 15:e0230330.
19. Lin, Y. H., Lai, P. J., Chang, T. H., Wan, Y. L., Huang, J. W., Huang, J. H., and Chang, P. F. L. 2014. Genetic diversity and identification of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Taiwan. Eur. J. Plant Pathol. 140: 721-733.
20. 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. *cubense* race 4. PLoS One 11:e0159681.
21. 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.
22. 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.
23. Okubara, P. A., Harrison, L. A., Gatch, E. W., Vandemark, G., Schroeder, K. L., and Du Toit, L. J. 2013. Development and evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. Plant Dis. 97:927-937.
24. Pasquali, M., Marena, L., Fiora, E., Piatti, P., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2004. Real-time polymerase chain reaction for identification of a highly pathogenic group of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* on *Argyranthemum frutescens* L. J. Plant Pathol. 86:53-59.
25. 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.
26. Petkar, A., and Ji, P. 2017. Infection courts in watermelon plants leading to seed infestation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Phytopathology 107:828-833.
27. 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.
28. Schnerr, H., Niessen, L., and Vogel, R. F. 2001. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler™-PCR using SYBR®Green I for continuous fluorescence monitoring. Int. J. Food Microbiol. 71:53-61.
 29. 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.
 30. 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.

ABSTRACT

Huang, L.-N.^{1,2}, Lin, Y.-J.¹, Wen, C.-J.¹, Chen, Y.-J.³, Chu, S.-C.⁴, and Lin, Y. H.^{1,5,*} 2020. Development of the molecular methods for rapid detection of *Fusarium oxysporum* in Taiwan. J. Plant Med. 62(4): 1-12.

*Corresponding author, E-mail: pmyhlin@mail.npust.edu.tw

Fusarium oxysporum, soil-borne pathogenic fungus, can host more than 100 kinds of crops and lead to withering crop disease. The counterpart can be rooted through the wound or natural opening invasion, resulting in leaf yellowing, withering symptoms. There are several specialized forms (known as *forma specialis*, f. sp.), which can infect different hosts. *F. oxysporum*, the top 5 fungal pathogens in the world, can infect more than 100 different hosts, provoking severe losses in crops; furthermore, there are no chemicals that can control Fusarium wilt safely, economically and effectively. Therefore, this study aims to develop molecular methods of rapid detection of *F. oxysporum* based on PCR, SYBR green-based real-time PCR, and TaqMan probe-based real-time PCR assays with a novel primer set LNHF_nF-1/LNHF_nR-1. The results illustrate that the primer set was specific to *F. oxysporum* in Taiwan. By using the two real-time PCR detection methods, all the results can be positive. At the same time, meet *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc)-infected symptomatic banana (including mild, moderate, or severe symptoms of pseudostems) by the two real-time PCR assays. When detecting the asymptomatic banana pseudostems, its results, detection rates, PCR, TaqMan probe-based real-time PCR, and SYBR green-

based real-time PCR assays were 43.8% (7/16), 93.8% (15/16), and 93.8% (15/16), respectively. This can indicate that the two real-time PCR assays with the primer set LNHF_nF-1/LNHF_nR-1 has high applicability for the early detection of Foc-infected pseudostems of banana. Two real-time PCR assays, therefore, have the potential to serve as the rapid, specific, and sensitive tools for the routine detection of *F. oxysporum* in the field.

Keywords: Fusarium wilt, phytopathogen detection, SYBR green-based real-time PCR, TaqMan probe-based real-time PCR, *in-planta* detection