

恆溫圈環形核酸增幅偵測技術於水稻徒長病菌篩檢之適用性探討

李婉均、余冠毅、陳思聿、梁瑀婕、鍾嘉綾、楊爵因*

¹ 國立臺灣大學植物病理與微生物學系

* 聯絡作者, email: jiueinyang@ntu.edu.tw

摘要

李婉均、余冠毅、陳思聿、梁瑀婕、鍾嘉綾、楊爵因。2019。恆溫圈環形核酸增幅偵測技術於水稻徒長病菌篩檢之適用性探討。植物醫學61(4): 11-20。

水稻徒長病為我國水稻重要病害，其病原真菌存於穀粒中，於育苗時期感染水稻苗，發病嚴重時對稻穀產量及品質影響甚鉅。本研究針對此病害於種苗時期之篩選需求，建立恆溫圈環形核酸增幅法 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 快速檢測技術。該技術挑選水稻徒長病菌cps/ks 基因，設計專一性LAMP引子。透過增幅效率結果分析，最終挑選在最適反應溫度63°C條件下表現最佳之引子組CPS-ID4。當目標核酸濃度超過50 pg/μl時，可在 90 分鐘內被該引子組成成功偵測。本研究所開發之技術專一性遠高於傳統PCR方法，可排除同屬中其他8種近似鐮孢菌之偵測，且能有效檢出14株不同來源之徒長病菌分離株。挑選9個水稻品種稻苗進行應用測試，發現該技術可成功偵測人工接種感染但尚未發病之全部受試品種之7天大水稻苗。本研究中開發之LAMP引子組，搭配hydroxy naphthol blue (HNB)染劑和偵測試紙，能於偵測終端快速顯示偵測結果，有效減少完成檢測判讀所需時間，亦大幅提升本技術應用於水稻苗期檢測和植物檢疫的潛力。

關鍵詞：水稻徒長病、恆溫圈環形核酸增幅偵測技術、鐮孢菌、種苗檢測

緒言

水稻徒長病為水稻秧苗期常見之真菌性病害。罹病苗株受病原鐮孢菌*Fusarium fujikuroi*產生之吉貝素 (gibberellin)、鐮孢菌酸 (fusaric acid)、伏馬毒素 (fumonisin) 等次級代謝物影響^(18,21)，致水稻徒長且桿細，株色偏淡、葉幅變小，葉片與葉鞘

的著生角變大，於莖節處會產生不定根，並引起維管束病變，最後導致全株萎凋。嚴重感染之植株，在秧苗期或是本田初期即死亡，而較輕微者進入本田期後病徵常會消失，直至分蘖期才又表現病徵⁽¹⁰⁾。徒長病於台灣田間罹病率約為5~10%，其中又以花東地區最為嚴重^(12, 17)。一般認為，種子帶菌是造成水稻幼苗罹病的主因，稻種帶菌率與此病於苗期和本田期罹病嚴重度具有密切相關性。然而，受檢測人力不足或對於病害辨識能力不均，及病原菌族群產生抗藥性⁽⁵⁾、稻種消毒過程操作不確實等問題之限制，2010年於稻種上的帶菌調查中，仍發現當時中部地區種苗業者所生產之稻種普遍受水稻徒長病菌污染⁽¹⁷⁾，自部分台東地區種苗業者收集稻種的檢出帶菌率甚至可達100%⁽¹²⁾。近年氣候變遷甚鉅，縱使我國農試單位將原稻種消毒藥劑撲克拉的推薦使用濃度提升，也加入新的推薦藥劑，台灣稻徒長病偶爾爆發的風險仍舊存在。

恆溫圈環形核酸增幅法 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是日本公司 Eiken Chemical Co. Ltd 於 2000 年所開發的核酸增幅技術。該技術運用目標序列分析，設計引子辨識目標序列中的六段區域，在搭配 Bst polymerase 的情況下，即可在一固定溫度中進行核酸增幅。與傳統 PCR 技術相比，此技術無需昂貴的溫度控制器，且有更高的專一性以及更快的增幅速度⁽²⁰⁾。LAMP技術亦可搭配特殊染劑 hydroxy naphthol blue (HNB)⁽⁹⁾ 或是試紙 lateral flow strip，於增幅反應終端快速顯色，相當容易判讀反應結果。由於此技術之運用操作技術門檻與儀器要求較低，並能更快獲得準確之檢驗結果，相當適合田間病原快速檢測，與時間壓力高的邊境檢疫。目前，此技術已廣泛的被應用在各種植物病原檢測，在真菌、細菌、病毒以及線蟲的植物病害都有運用此技術進行偵測的研究報導^(1, 7, 14, 16, 19, 31)。

本研究針對水稻徒長病研發LAMP病原檢測技術，並探討該技術應用在9個水稻品種 [包括我國常見7個粳稻栽培品種，臺南11號 (TN11)、臺梗8號 (TK8)、臺梗9號 (TK9)、臺梗16

號 (TK16)、臺農67號 (TNG67)、臺農71號 (TNG71)、桃園3號 (TY3)，一個高度抗性秈稻品種Budda及一個高度感病粳稻品種Zerawchanica karatals (ZK)] 之成效。期望未來能利用本病原分子檢測技術，於育苗初期進行病菌篩檢，確保植入本田種苗之健康性，有效促進田間水稻徒長病之防治管理。

材料與方法

一、真菌菌株

本研究中使用之鐮孢菌 (*Fusarium* spp.) 菌株種類及來源詳列於表一。菌株包含自我國發病田區採集分離之菌株⁽⁵⁾，及向財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 所購入之菌株。*Fusarium* spp. 培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA) 培養基，以12小時/12小時光照週期培養於24℃十日後使用。

二、核酸萃取

本研究中之真菌核酸萃取自以無菌刮勺自培養基表面搜

集約0.1克菌絲樣本，水稻種苗核酸樣本則為單株水稻苗。兩者皆以液態氮於研鉢中冷凍，以研杵磨碎後裝入1.5 mL 離心管中。核酸抽取流程參照 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., USA) 廠商建議之流程，萃取得之核酸冷凍保存於-20℃。

三、偵測目標基因挑選與引子設計

由於水稻徒長病菌中參與吉貝素合成之相關基因的表現，與徒長病菌在侵入水稻後形成共質體 (symplast) 的能力具高度相關性⁽²⁸⁾，故本研究挑選參與吉貝素合成之相關基因作為偵測目標。首先，自NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫中序列數量較足的基因中，挑選合成路徑中重要基因 *ent-copalyl diphosphate/ent-kaurene synthase (cps/ks)* gene^(26, 27) 作為候選目標基因。接著，利用PRISE 2軟體 (PRImer SElector 2)⁽¹³⁾，針對此基因區段設計通用引子組FF-CPS1F/FF-CPS1R (表二)，並透過PCR反應增幅本研究所欲測試之目標菌株之該基因片段。隨後，再參照Bent等人⁽³⁾ 所敘述之方法，運用pGEM[®]-T Easy Vector System I 克隆系統 (Promega Corp., USA) 進行片段選殖、質體純化，再以ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit和ABI 3730xl DNA Analyzer

表一、本研究所使用之 *Fusarium* spp. 真菌菌株列表

TABLE 1. List of *Fusarium* spp. used in this study

Fungus	Strain	Geographical origin	Provider
<i>Fusarium fujikuroi</i>	NCHU_IL001	Ilan, Taiwan	Jenn-Wen Huang
<i>F. fujikuroi</i>	Ff009	Ilan, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff018	Hualien, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff032	Hualien, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff230	Miaoli, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff268	Changhua, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff269	Changhua, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff273	Taichung, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff275	Taichung, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff276	Nantou, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff426	Yunlin, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff469	Tainan, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff557	Yunlin, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. fujikuroi</i>	Ff715	Taitung, Taiwan	Chia-Lin Chung
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	JR01	—	Jenn-Wen Huang
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	4-13	—	Jenn-Wen Huang
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	ML357	—	Pei-Che Chung
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	ML359	—	Pei-Che Chung
<i>F. proliferatum</i>	FPR30301	—	Chia-Lin Chung
<i>F. subglutinans</i>	BCRC_33526	—	BCRC ¹
<i>F. verticillioides</i>	FVR30301	—	Chia-Lin Chung
<i>F. verticillioides</i>	Fv730	—	Chia-Lin Chung

¹ BCRC: Bioresource Collection and Research Center

表二、針對 *F. fujikuroi* cps/ks 基因偵測所設計之PCR與LAMP引子組**TABLE 2.** The traditional PCR and LAMP primer sets designed for *F. fujikuroi* detection targeting cps/ks gene

引子組	引子序列
FF-CPS	Traditional PCR
FF-CPS1F	5'-CTTGTGCGCAAGACTGCTTT-3'
FF-CPS1R	5'-GTCCTTGCCTTGGAGCAGAT-3'
CPS-ID4	LAMP
FIP	5'-GCACCTGGCCAGTGAAGATCAT-GCGCACACCTCGTCCCT-3'
BIP	5'-TGGAGCATCTCCGGCTTGG-AACATTGCTCGATTCCGCA-3'
F3	5'-AGTGGTCACTACAGAAATCC-3'
B3	5'-AGAAAACCTCGGCACGGCC-3'
CPS-ID34	LAMP
FIP	5'-CATGGAAGCTGTCGCTGGGC-CCTTGTGATGGTCTGGTG-3'
BIP	5'-GCTCATCGGTCCGGTAGCCCA-CAGATCCCGCACATTGCA-3'
F3	5'-GGCCCTGGCTAAGTTTCC-3'
B3	5'-TTTTACTTGGGTCGGATGCA-3'
CPS-ID95	LAMP
FIP	5'-ACAGTGGCAATGGTATCAGCA-AGCGAGTGAGAGTATCCTCA-3'
BIP	5'-GGCCCTGGCTAAGTTTCCATT-GCCGGTATTCGGTATGTC-3'
F3	5'-GTTGAGCACGCTGTTGGT-3'
B3	5'-AGCACATGGAAGCTGTGCG-3'

(Applied Biosystems, Foster City, CA) 進行定序。PCR增幅反應條件為：94°C 加熱 2 分鐘，再以下列溫度連續反應30個循環，包含94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 20 秒，最後以72°C 反應5分鐘進行核酸增幅。序列以Geneious Prime2019軟體 (Geneious, <https://www.geneious.com>) 進行解序與排列分析後，使用線上軟體PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co., Ltd., Japan) 預設步驟設計LAMP的專一性引子組。

四、專一性、泛用性、敏感性測試

自前述方法所設計出的3組LAMP候選引子組中，挑選增幅效率最好的引子組，繼續進行專一性、泛用性、敏感性等測試。LAMP增幅反應皆使用Loopamp DNA Amplification Kit (EIKEN CHEMICAL Co., Ltd, Japan) 試劑套組，反應溶液比例參照廠商建議，反應溫度設定為63°C，時間設定為90分鐘。以前述目標序列所構築的質體，做10倍序列稀釋後，作為LAMP反應之標準偵測模板。敏感性測試以不同濃度的 *F. fujikuroi* 之gDNA敏感性測試，核酸樣本濃度分別為 1 ng、100 pg、50 pg、25 pg、10 pg/μl。LAMP反應過程中，以RealTime Turbidimeter LA-500 (Eiken Chemical Co., Ltd., Japan) 進行即時濁度偵測。專一性與泛用性試驗的部分，測試標的則包含所有前述萃取之真菌全核酸。每處理組皆有三重複試驗。

五、與傳統PCR比較

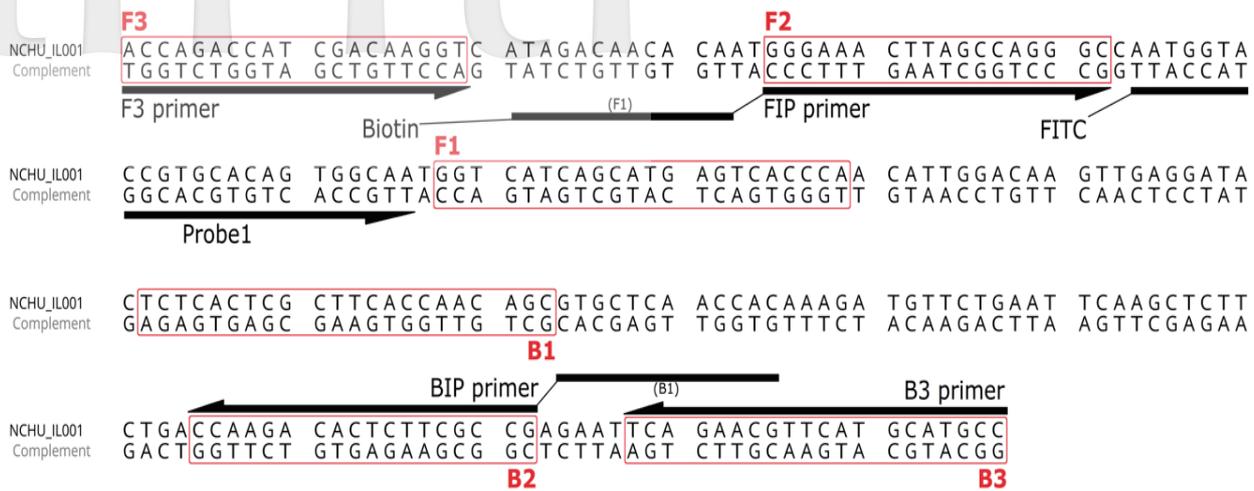
Amatulli等人⁽²⁾ 針對水稻徒長病菌 *F. fujikuroi* 開發專一性PCR偵測技術，使用引子組Fuji1F / TEF1R。此部分測試以純培養之真菌全核酸作為材料，分析該技術與本研究內開發之技術對於相同標的物之偵測效果。本試驗針對 *Fusarium* 屬內數個相近菌種 (表一) 進行專一性測試。PCR反應總體積為10μl [包含5.1μl PCR water、1 μl 0.5M Tris buffer (pH8.3)、1μl 0.025M MgCl₂、0.5μl 10g/L BSA、0.5μl 2.5mM dNTP mix (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan)、0.4μl 10mM primer pair (Genomics BioSci & Tech Co., Ltd, Taiwan)、0.1μl Taq polymerase (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 及1μl template DNA]。反應條件為：95°C 加熱5分鐘，再以下列溫度連續反應35個循環，包含以94°C 變性40秒、63°C 黏合40秒、72°C 延伸40秒，最後以72°C 反應5分鐘。傳統PCR試驗結果以後述膠體電泳方法進行分析。

六、水稻苗應用性測試

本研究以不同濃度 *F. fujikuroi* 接種桃園三號之稻苗實際檢測敏感性，並以9個水稻品種測試其應用性。(一) 病原菌接種濃度測試：將桃園三號水稻種子浸泡在55°C 溫水中10分鐘，再移至室溫靜置於ddH₂O中2天。後將種子埋於濕潤土壤中，並置於暗室內2天催芽。後將發芽種子浸入含有濃度10⁶、10⁵、10⁴、10³、0 spores/mL之 *F. fujikuroi* 孢子懸浮液中1小時接種，再移入28°C 光照生長箱中生長7天，使其生長成苗。將全株苗依前述方法萃取核酸，進行LAMP反應，並且利用 RealTime Turbidimeter LA-50015 (Eiken Chemical Co., Ltd., Japan) 偵測即時濁度。(二) 品種測試：挑選我國常見7個梗稻栽培品種 [臺南11號 (TN11)、臺梗8號 (TK8)、臺梗9號 (TK9)、臺梗16號 (TK16)、臺農67號 (TNG67)、臺農71號 (TNG71)、桃園3號 (TY3)、一個高度抗性梗稻品種Budd及一個高度感病梗稻品種 Zerawchanica karatals (ZK)]。試驗分為兩組，一組接種病原菌 *F. fujikuroi* NCHU_IL01，另一組未接種病原菌。病原菌的接種方式，為將浸種3天的發芽水稻種子浸入含有濃度為10⁵ spores/mL之 *F. fujikuroi* 的孢子懸浮液中過夜培養，再移入日間溫度約32°C、夜間溫度約28°C之恆溫人工培養室中，暗室處理2天後，培養於12小時光照週期下7天，後抽取水稻苗核酸進行檢測。每處理組皆有三重複試驗。

七、反應產物之顯色方法

本研究使用膠體電泳、HNB染色和lateral flow strip試紙等三種方式，作為反應產物之顯色方法比較。(一) 膠體電泳：取LAMP反應產物總體積3μl 與1μl 6X DNA loading dye (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 混合。將2% agarose gel (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 浸於含有0.5X TBE buffer之 Owl separation system (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)。加入LAMP產物後，以電壓110伏特運行30分鐘。後以1% ethidium



圖一、CPS-ID4引子組及探針在水稻徒長病菌*cps/ks*基因序列中的結合位置。各引子 (F3, B3, FIP, BIP)以黑色箭頭標出，增幅目標以紅色框標示。

Fig. 1. The CPS-ID4 primers and probe binding position on partial region of *cps/ks* gene. CPS-ID4 was designed to target the six red-boxed regions. The binding sites of primers (F3, B3, FIP, BIP) of CPS-ID4 and the specific Probe1 were marked with black arrows.

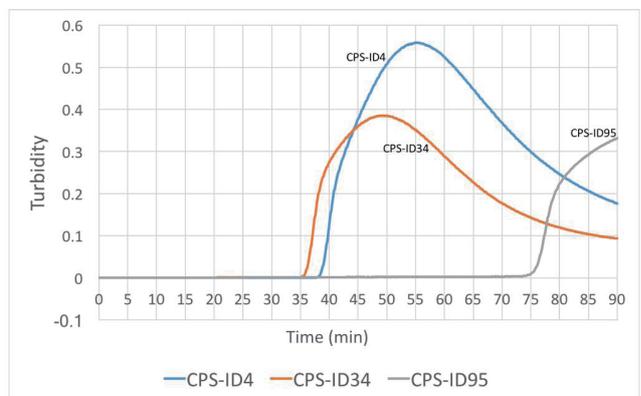
bromide (Bioshop Canada Inc., Canada) 將膠體染色10分鐘後，再以dH₂O褪染10秒鐘，最後以Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 擷取影像。分析使用1.5 μl的100bp DNA ladder (Biomax Scientific Co., Ltd., Taiwan) 作為增幅片段大小之參考。(二) HNB染色：在LAMP反應前，加入120μM hydroxyl naphthol blue (Dojindo Laboratories Co. Ltd, Japan) 於總反應物中，反應完成後觀察顏色變化，並拍照與對照組進行呈色比較分析。若有增幅反應，產物會由深紫色轉而呈現天藍色。(三) Lateral flow strip試紙：試紙套組選用Milenia® GenLine HybriDetect (Milenia Biotech GmbH, Giessen, Germany)。根據目標序列F2到B2間的區域 (圖一)，設計專一性DNA探針並於5'端以FITC標記 (Genomics BioSci & Tech Co., Ltd., Taiwan)。接著，利用5'端 biotin 標記之 FIP primer (Genomics BioSci & Tech Co., Ltd., Taiwan) 進行LAMP反應。LAMP反應完成後加入20 pmol之專一性DNA探針，再以63°C 進行10分鐘雜合反應。取雜合反應產物10μl加入150μl dipstick assay buffer中與之混合，最後將試紙浸入混合液中，靜置5分鐘待其顯色並拍照。若有增幅反應，產物會於試紙上特定位置顯示紫紅色條帶，反之則無。

結果

一、LAMP技術開發

本研究在 *cps/ks* gene 序列上所設計之PCR通用引子組 FF-CPS1F/FF-CPS1R，針對多種 *Fusarium* spp.進行PCR增幅的結果

顯示，*F. fujikuroi* 的相似種 *F. proliferatum* 和 *F. verticilloides* 皆無法被增幅出預設的目標序列⁽²⁹⁾，故以水稻徒長病菌*cps/ks* gene為標的共設計三組LAMP引子組 (表二)。以相同濃度目標序列構築質體，比較此三組引子組LAMP反應的增幅效率的結果顯示，CPS-ID4和CPS-ID34兩個引子組濁度提升的時間，較CPS-ID95早約30分鐘，有較好的增幅效率 (圖二)。以目標序列構築質體作為測試材料，進行90分鐘LAMP反應後，電泳分析結果顯示CPS-ID4引子組具有偵測 *F. fujikuroi* 之專一性，而CPS-ID34 引子組雖可偵測 *F. fujikuroi*，卻對於*F. oxysporum* ML357菌株和*F. oxysporum* JR01 菌株上也有增幅的情形，甚至在未添加模板的控制組中也有非專一性的偽陽性增幅⁽²⁹⁾。以CPS-ID4引子組對真菌全核酸進行專一性測試時，90分鐘LAMP



圖二、三組LAMP引子組於濃度10⁶ copies/μl目標序列構築質體之增幅效率比較。

Fig. 2. The efficiency test result of three LAMP primer sets for *F. fujikuroi* by using 10⁶ copies/μl target sequence cloned plasmids as template.

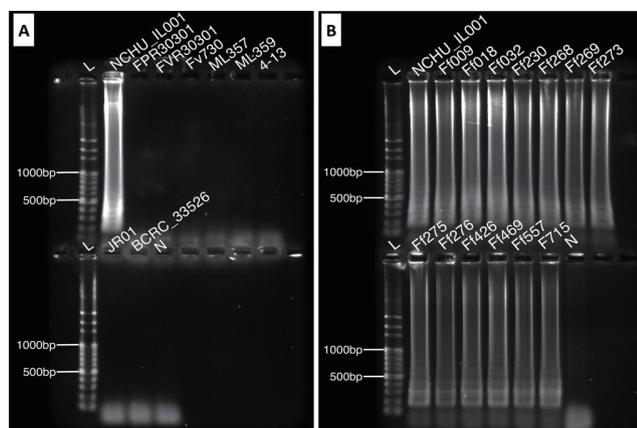
反應後的電泳分析，顯示僅只有 *F. fujikuroi* 會被成功增幅 (圖三A)。泛用性測試則顯示，14 株不同來源之 *F. fujikuroi* 菌株皆可以被 CPS-ID4 引子組成成功增幅 (圖三B)。因 CPS-ID4 具有高度的種內專一性及泛用性，因此選擇該引子組成後續測試。以真菌抽取之核酸為測試材料，CPS-ID4 的偵測敏感性可以達到 50 pg/ul (圖四)。

二、應用性測試

萃取接種 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 *F. fujikuroi* spores/mL 的水稻苗核酸，進行 90 分鐘 CPS-ID4 LAMP 反應，再利用電泳顯像分析，結果顯示接種濃度 10^4 spores/mL 以上的水稻苗皆可被成功偵測 (圖五A)。搭配 HNB 染劑染劑結果，有增幅反應者產物呈現天藍色，與膠體電泳呈現之結果完全相符；未有增幅反應之組別呈現深紫色 (圖五B)。利用試紙進行顯色，同樣在接種濃度 10^4 spores/mL 以上的處理組中皆於 test line 有深色沉澱，未接種的對照組或接種 10^3 spores/mL 的處理組則無 (圖五C)。實際測試 CPS-ID4 LAMP 技術於 9 個水稻品種之病菌偵測使用情形，於 90 分鐘 LAMP 反應後搭配 HNB 呈色方法，結果顯示所有受試之接種組樣本都有成功被檢出，而對照組皆無增幅 (圖六)。

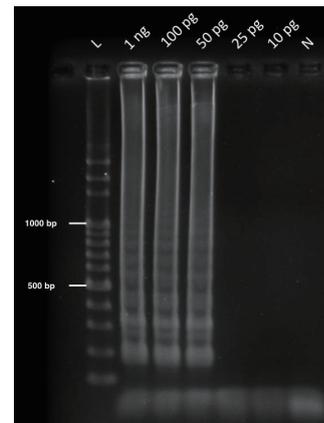
三、傳統 PCR 方法之專一性與敏感性

傳統 PCR 技術中使用的 Fuji 1F/ TEF1R 引子組，在針對



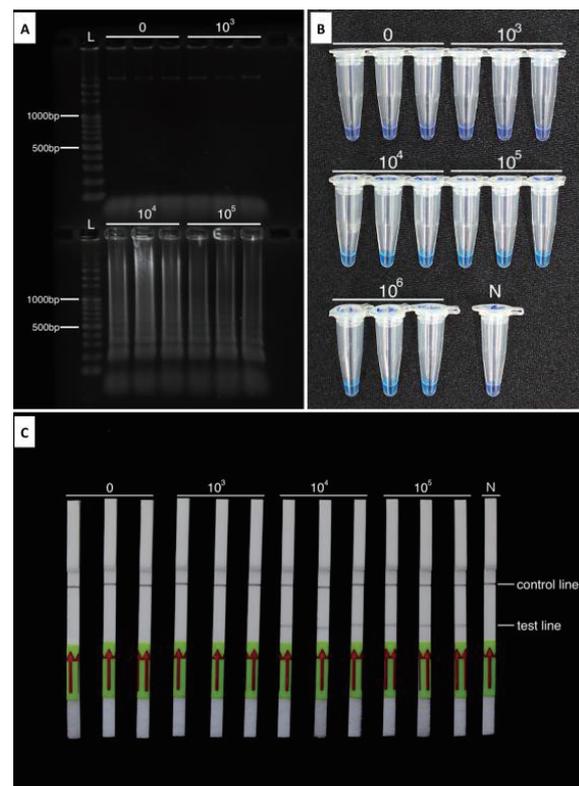
圖三、CPS-ID4 LAMP 引子組對於 *Fusarium* 屬內菌種之 (A) 專一性與 (B) 泛用性測試結果。*F. fujikuroi* 樣本為 NCHU_IL001、Ff009、Ff018、Ff032、Ff230、Ff268、Ff269、Ff273、Ff275、Ff276、Ff426、Ff469、Ff557、Ff715 等菌株；*F. proliferatum* 樣本為 FPR30301；*F. verticillioides* 樣本為 FVR30301、Fv730；*F. oxysporum* 樣本為 ML357、ML359、4-13、JR01；*F. subglutinans* 樣本為 BCRC_33526。L 為 DNA ladder，N 為無模板之負對照組。

Fig. 3. The CPS-ID4 LAMP test result for *F. fujikuroi* (A) specificity and (B) general application. (NCHU_IL001: *Fusarium fujikuroi*; FPR30301: *F. proliferatum*; FVR30301, Fv730: *F. verticillioides*; ML357, ML359, 4-13: *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*; JR01: *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; BCRC_33526: *F. subglutinans*) In (B), all 14 tested samples are different *F. fujikuroi* isolates. L: ladder, N: negative control.



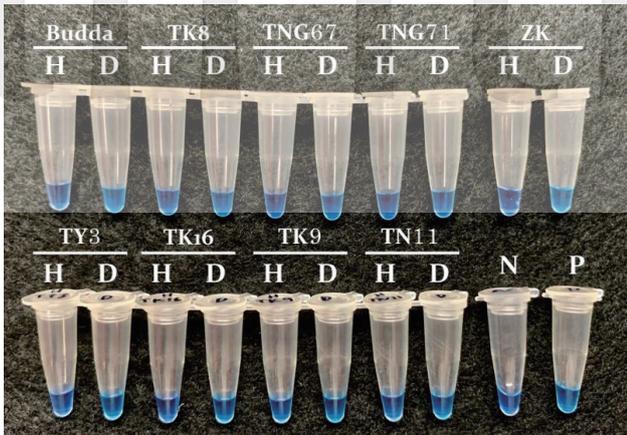
圖四、CPS-ID4 LAMP 引子組於 *F. fujikuroi* 之 gDNA 濃度敏感性測試結果。核酸樣本濃度分別為 1 ng、100 pg、50 pg、25 pg、10 pg/ul。L 為 DNA ladder，N 為無模板對照組。

Fig. 4. The sensitivity test result of CPS-ID4 LAMP primer set using genomic DNA of *F. fujikuroi* as template. The DNA concentration was diluted to 1 ng/ul, 100 pg/ul, 50 pg/ul, 25 pg/ul, 10 pg/ul. L: ladder, N: negative control.



圖五、CPS-ID4 LAMP 引子組於接種不同水稻徒長病菌濃度之水稻苗檢測成果，以 (A) 膠體電泳、(B) HNB 染色與 (C) 試紙顯色均反應相同偵測結果。L 為 DNA ladder，N 為無模板對照組。

Fig. 5. The application test result of the CPS-ID4 LAMP primer set on whole DNA of rice seedlings inoculated with different concentration of *F. fujikuroi*. Each seedling was inoculated with 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 and 0 spores/ml of spore suspension; 3 replicates for each treatment. (A) Electrophoresis gel analysis of LAMP products. (B) HNB staining analysis of LAMP products. (C) Lateral flow strip analysis of LAMP products. L: ladder, N: negative control.



圖六、CPS-ID4 LAMP引子組於9個水稻品種之偵測結果。H為未接種之處理組；D為有接種病原菌之處理組。N為無添加核酸之負對照組；P為添加目標基因質體之正對照組。

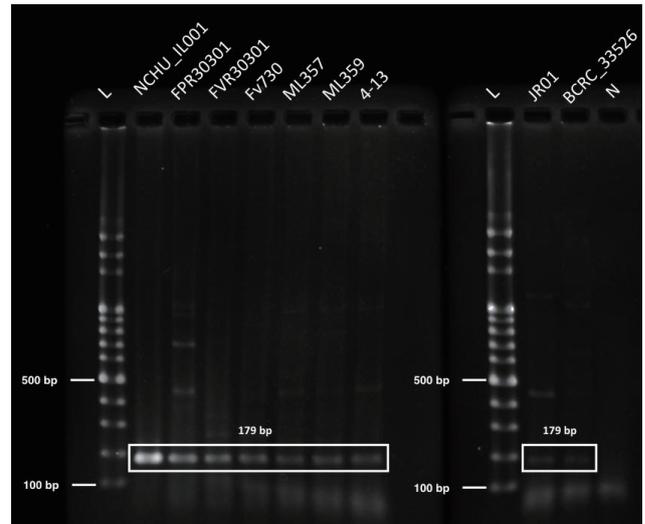
Fig. 6. The application test of CPS-ID4 LAMP primer set on 9 rice cultivars. H: Rice seedlings without inoculation of *F. fujikuroi*; D: Rice seedlings inoculated with 10^5 spores/ml of *F. fujikuroi*. N: Negative control; P: Positive control.

Fusarium 專一性的測試中，在目標物種之外，亦同時非專一性的增幅許多非目標物種之核酸；包含 *F. proliferatum*、*F. verticilloides*、*F. oxysporum* 及 *F. subglutinans* 等四種鐮孢菌 (圖七)。敏感性測試結果，則顯示該技術可成功偵測低至濃度為 10^2 copies/ μ l 的目標序列所構築之質體。

討 論

針對水稻徒長病的早期偵測的快速分子檢測的技術開發與研究較少，一些PCR偵測技術選用 *F. fujikuroi* 種內序列相似度高達99%的TEF基因中的elongation factor 1- α (EF-1 α) 片段序列作為偵測目標^(2, 5, 22)。然而，*F. fujikuroi* 的EF-1 α 序列與相似種 *F. proliferatum* 的序列相似度亦高達96%，故使用以該基因作為偵測目標的PCR技術⁽²⁾ 時，偶有偽陽性偵測結果的發生，為不讓人意外的現象。本研究針對 *F. fujikuroi* 開發LAMP偵測技術，選擇參與吉貝素合成途徑中的cps/ks基因⁽²⁶⁾，其序列與其他物種相似度甚低，不僅能確保其偵測專一性，更能避免偵測出田間不具致病能力的突變菌株。相近研究中，Zhang等人與Sunani等人^(24, 30) 亦是基於相似概念選擇參與吉貝素合成途徑中的NRPS31基因。運用本研究在cps/ks 基因序列上所設計之PCR通用引子組FF-CPS1F / FF-CPS1R進行核酸增幅，發現 *F. fujikuroi* 的相似菌種 *F. proliferatum* 和 *F. verticilloides* 皆無法被增幅。此偵測結果與前人報導僅有部分 *F. proliferatum* 菌株具有產生吉貝素的能力、而 *F. verticilloides* 則無之結果，亦確實相符^(23, 25)。

傳統上，研究者分離種子所攜帶的真菌並加以培養，經核



圖七、傳統PCR技術中所使用之Fuji1F/TEF1R引子組的專一性測試結果，顯出其對非目標 *Fusarium* 菌種依然會產生增幅。全部受測樣本皆增幅出大小為179 bp之片段。*F. fujikuroi* 樣本為NCHU_IL001；*F. proliferatum* 樣本為FPR30301；*F. verticilloides* 樣本為FVR30301、Fv730；*F. oxysporum* 樣本為ML357、ML359、4-13、JR01；*F. subglutinans* 樣本為BCRC_33526。L為DNA ladder，N為無模板對照組。

Fig. 7. The specificity test result of the traditional PCR assay using the primer pair Fuji/TEF1R showed its low specificity from amplifying fragments of non-target *Fusarium* species. The 179-bp amplicons appeared in all tested samples. NCHU_IL001: *Fusarium fujikuroi*; FPR30301: *F. proliferatum*; FVR30301, Fv730: *F. verticilloides*; ML357, ML359, 4-13: *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*; JR01: *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; BCRC_33526: *F. subglutinans*. L: Ladder., N: Negative control.

酸抽取後進行PCR增幅，最後完成定序與NCBI資料庫進行比對分析⁽⁸⁾，整個流程相當耗時。近年，許等人⁽¹⁰⁾ 提出使用半選擇性培養基，對於罹病組織與所帶之菌株進行培養，可透過分生孢子型態與菌絲生長速度，可將 *F. fujikuroi* 菌株與近似種 *F. proliferatum* 及 *F. verticilloides* 進行區隔。LAMP分子檢測技術的一大優勢，在於它不需要經歷分離菌株、配置特殊培養基、型態檢視，或使用昂貴的PCR或real-time PCR儀器；LAMP檢測只需要引子組、反應試劑與一個簡單的恆溫設備即可以進行反應。本研究開發之CPS-ID4 LAMP檢測技術，更在專一性與偵測效率遠優於傳統PCR檢測或分菌純培養定序。本技術搭配母需UV照射判別之HNB染劑顯色，直接在反應完成後以肉眼即能觀察顏色差異，可省去電泳判讀過程所需的時間。除此之外，本研究也同步建立試紙顯色方法，提供完全沒有顏色辨識主觀問題的結果判別方法，大大提升偵測結果的分析判讀準確性。

前人針對中部地區的大型育苗中心水稻種子的研究中指出，水稻徒長病菌的帶菌率相當高⁽¹²⁾。因此，若能將本研究之LAMP技術應用於我國稻種及稻苗抽樣檢測，則可以完全省略

分離、培養、觀察與定序等步驟，僅需短時間的反應即可確認是否有受到水稻徒長病菌的污染，成為未來進行田間病害調查時可選擇的非常有效率且準確的偵測方法。水稻苗應用性的敏感性於9個水稻品種之測試結果，成功展示該技術不會受到水稻品種的限制，且不論高度抗病的Budda與TNG67、中度抗病的TN11與TK16、中度感病的TNG71、高度感病的ZK^(4,5)，於接種後7天仍未產生明顯病徵時，均可透過本研究所開發之CPS-ID4 LAMP引子組，成功偵測出稻苗的帶病性，顯示本技術之未來實際運用價值。整體而言，本研究結果除了在水稻徒長病上提供了更優質的分子偵測技術外，也大幅提升水稻徒長病田間大規模調查之可行性，為未來我國水稻徒長病防疫系統奠定更厚實的基礎。

謝 辭

作者感謝國立中興大學植物病理學系黃振文教授與陳啟予教授、臺灣大學農業化學系林乃君教授、苗栗區農業改良場鐘珮哲副研究員提供實驗用菌株。本研究經費來自行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。

引用文獻

- Almasi, M., Dehabadi, S. 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*. J. Plant Pathol. Microbiol. 4:1-7.
- Amatulli, M. T., Spadaro, D., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2012. Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. Eur. J. Plant Pathol. 134:401-408.
- Bent, E., Loffredo, A., Yang, J. I., McKenry, M. V., Becker, J. O., Borneman, J. 2009. Investigations into peach seedling stunting caused by a replant soil. FEMS Microbiol. Ecol. 68:192 - 200.
- Chen, S. Y., Huang, K. J., Kuo, Y. F., Lai, M. H., Chen, Y. C. and Chung, C. L. 2015. Three modified methods for evaluation of bakanae disease resistance in rice seedlings. Plant Pathol. Bull. 24:201 - 210. (in Chinese)
- Chen, Y. C., Lai, M. H., Wu, C. Y., Lin, T. C., Cheng, A. H., Yang, C. C., Wu, H. Y., Chu S. C., Kuo, C. C., Wu, Y. F., Lin, G. C., Tseng M. N., Tsai, Y. C., Lin, C. C., Chen, C. Y., Huang J. W., Lin, H. A. and Chung, C. L. 2016. The genetic structure, virulence, and fungicide sensitivity of *Fusarium fujikuroi* in Taiwan. Phytopathology 106(6):624-635.
- Cheng, A. P. 2018. Exploring the transcriptome of rice seedlings affected by bakanae disease. Master Thesis. National Taiwan University, Taipei.
- Congdon, B. S., Kehoe, M. A., Filardo, F. F., and Coutts, B. A. 2019. In-field capable loop-mediated isothermal amplification detection of Turnip yellows virus in plants and its principal aphid vector *Myzus persicae*. J Virol. Methods 265:15-21.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A., and O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Pages 473-479 in: Molecular diversity and PCR-detection of toxigenic *Fusarium* Species and ochratoxigenic Fungi. Springer.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., and Hanaki, K. I. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Biotechniques 46:167-172.
- Hsu, C. C., Lai, M. H., Lin, C. C., Huang, J. W., and Chen, C. Y. 2013a. The correlation between seed inoculated with *Fusarium fujikuroi* and bakanae disease symptom occurring on adult rice plants. Plant Pathol. Bull. 22(4):381-388. (in Chinese)
- Hsu, C. C., Lai, M. H., Lin, C. C., Huang, J. W., and Chen, C. Y. 2013b. Standardization of the protocol for evaluating susceptibility of rice to the pathogen of bakanae disease. Plant Pathol. Bull. 22(3):291-299. (in Chinese)
- Huang, T. C., and Chu, S. C. 2009. The occurrence and control of rice bakanae disease in Taiwan. Proc. of Symp. on Achievements and Perspectives of Rice Production in Taiwan 29-43. (in Chinese)
- Huang, Y. T., Yang, J. I., Chrobak, M., and Borneman, J. 2014. PRISE2: Software for designing sequence-selective PCR primers and probes. BMC Bioinformatics 15(1):317.
- Kanzaki, N., and Futai, K. 2002. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. Nematology 4:35-41.
- Kuo, C. C., Liao, C. D., Huang, D. C., Chen, Y. C., and Chung, C. L. 2014. Investigation of rice bakanae disease in central Taiwan: Occurrence, pathogen identification, and fungicide resistance assay. Bull. of Taichung Dist. Agric. Res. and Extension Station 125:11-28. (in Chinese)
- Larrea-Sarmiento, A., Dhakal, U., Boluk, G., Fatdal, L., Alvarez, A., Strayer-Scherer, A., Paret, M., Jones, J., Jenkins, D., and Arif, M. 2018. Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific

- detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. Sci. Rep. 8:14298.
17. Liao, C. D., and Kuo C. C. 2009. The management of diseases and insect pests of rice seed and seedling in nursery. Seed & Nursery 11:1-10. (in Chinese)
 18. Niehaus, E. M., Kim, H. K., Münsterkötter, M., Janevska, S., Arndt, B., Kalinina, S. A., Houterman, P. M., Ahn, I. P., Alberti, I., Tonti, S., Kim, D. W., Sieber, C. M. K., Humpf, H. U., Yun, S. H., Güldener, U., and Tudzynski, B. 2017. Comparative genomics of geographically distant *Fusarium fujikuroi* isolates revealed two distinct pathotypes correlating with secondary metabolite profiles. PLoS Pathog. 13:e1006670.
 19. Niessen, L. 2013. Loop-mediated isothermal amplification-based detection of *Fusarium graminearum*. Methods Mol. Biol. 968:177-193.
 20. 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.
 21. Nyvall, R.F. 1989. Diseases of rice. Pages 385 – 425 in: Field Crop Diseases Handbook. Springer US.
 22. Ortega, S. F., Tomlinson, J., Hodgetts, J., Spadaro, D., Gullino, M. L., and Boonham, N. 2018. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of seedborne fungal pathogens *Fusarium fujikuroi* and *Magnaporthe oryzae* in rice seed. Plant Dis. 102(8):1549-1558.
 23. Rim, S. O., Lee, J. H., Choi, W. Y., Hwang, S. K., Seok, J. S., Lee, I. J., Rhee, I. K., and Kim, J. G. 2005. *Fusarium proliferatum* KGL0401 as a new gibberellin-producing fungus. J. Microbiol. Biotechnol. 15:809-814.
 24. Sunani, S. K., Bashyal, B. M., Rawat, K. Manjunatha, C., Sharma, S., Prakash, G., Krishnan, S. G., Singh, A. K. and Aggarwal, R. 2019. Development of PCR and loop mediated isothermal amplification assay for the detection of bakanae pathogen *Fusarium fujikuroi*. Eur. J. Plant Pathol. 154(3):715-725.
 25. Tsavkelova, E. A., Bömke, C., Netrusov, A. I., Weiner, J., and Tudzynski, B. 2008. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. Fungal Genet. Biol. 45:1393-1403.
 26. Tudzynski, B., and Höltter, K. 1998. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. Fungal Genet. Biol. 25:157-170.
 27. Tudzynski, B., Kawaide, H., and Kamiya, Y. 1998. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. Curr. Genet. 34:234-240.
 28. Wiemann, P., Sieber, C. M., Von Bargaen, K. W., Studt, L., Niehaus, E.-M., Espino, J. J., Huß, K., Michielse, C. B., Albermann, S., and Wagner, D. 2013. Deciphering the cryptic genome: genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. PLoS Pathog. 9:e1003475.
 29. Yu, G. Y. 2018. Development and application of a rapid detection assay of white-tip disease and bakanae disease on rice. Mater thesis. National Taiwan University. (in Chinese)
 30. Zhang, S. Y., Dai, D. J., Wang, H. D., and Zhang, C. Q. 2019. One-step loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Fusarium fujikuroi* in bakanae disease through NRPS31, an important gene in the gibberellic acid bio-synthesis. Sci. Rep. 9(1):3726.
 31. Zhou, Q.-j., Cai, Y., Gu, J.-f., Wang, X., and Chen, J. 2017. Rapid and sensitive detection of *Meloidogyne mali* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Eur. J. Plant Pathol. 148:755-769.

ABSTRACT

Wan-chun Lee, Guan-yi Yu, Szu-yu Chen, Yu-jie Liang, Chia-lin Chung, and Jiue-in Yang* 2019. The feasibility of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection technique for rice bakanae disease screening application plants. J. Plant Med. 61(4): 11-20.

*Corresponding author, J. W. Huang, E-mail:jiueinyang@ntu.edu.tw

Bakanae disease is an important rice disease in Taiwan. The pathogen remains in the grains and infects the rice seedling during the nursery stage, which severely affects the yield and the quality of grains when the disease outbreaks. Owing to the needs of screening out the disease-infected rice seedlings, a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) rapid detection technique was developed. Specific LAMP primer sets were designed to target the *cps/ks* gene of the pathogen *Fusarium fujikuroi*. After the amplification efficiency analysis of the optimum reaction temperature at 63°C, the best performed primer set, CPS-ID4, was finally picked. When the target pathogen gDNA concentration was higher than 50 pg/μl, it could be detected by CPS-ID4 in less than 90 minutes. In addition, the specificity of this assay was much higher than the traditional PCR method. It is capable of excluding 8 other *Fusarium* species that are closely related to *F. fujikuroi* while being able to detect all 14 tested *F. fujikuroi* isolates. Nine rice cultivar seedlings were selected for

F. fujikuroi inoculation to evaluate the assay's application potential. The positive outcomes demonstrated the successful detection ability of this assay on the symptomless 7-day-old rice seedlings. Lastly, this study showed the CPS-ID4 LAMP primer set worked well with rapid analysis techniques including hydroxy naphthol blue (HNB) dye and lateral flow strip, and that hugely improved the application potential of this assay for rice bakanae disease detection in the seedling nursery and plant quarantine.

Keywords: Rice bakanae disease, Loop-mediated isothermal amplification detection technique, *Fusarium* spp., Seedling screening