

西瓜與洋香瓜真菌性病 害之鑑定技術

撰文/關政平·吳明哲

前言

根據 2011 年農業統計年報，臺灣洋香瓜 (*Cucumis melo* L.) 種植面積為 3,184 公頃，主要產區分佈在台南縣市、嘉義縣、雲林縣、高雄縣、宜蘭縣等地區，以台南縣市為最主要產地。洋香瓜栽培品種雖呈多樣化，可區分為網紋香瓜群 (*var. reticulatus* Naud., *Cantalupensis* group)、光皮香瓜群 (冬甜瓜群) (*var. inodorous* Naud., *Inodorus* group) 及哈密瓜 (*var. saccharinus* Naud.) 三大類；西瓜則栽培面積為 11,715 公頃，遍布北中南東各地，以台南、雲嘉、花蓮地區等為最大宗，除在不同季節選用適當品種栽植外，栽培方法大致相同。

臺灣西瓜、洋香瓜的主要病害中，蔓枯病及炭疽病為外銷輸出種子常見且須檢測之病害種類。田間人員可以依賴 10-20 倍放大鏡進行診斷，依據病徵和真菌構造來做暫時的判斷。而以光學顯微鏡在 100 或 400 倍的放大倍率下仔細地觀察病原菌，亦可獲致初步的鑑定。但對於病害種類區分，使用傳統的方法仍受限於依據病徵及型態學來做診斷。有鑑於瓜類病害種類繁多，田間診斷十分不易且容易混淆，例如於初期感染蔓枯病和炭疽病之西瓜葉片上，症狀頗為相似，易造成防治決策的失誤，因此產業界亟需政府研發單位開發精確有效的檢驗技術，可以快速鑑定出病菌的存在與種類。

一般檢測方法介紹

(一) 外觀鏡檢法

對於檢測真菌性病害，利用顯微鏡觀察種子有無雜質，包括可能混有菌核、昆蟲殘體等，還可以發現諸如種子變色、畸形的症狀和由於種子表面的真菌子實體、休眠菌絲、孢子或細菌團侵蝕出現的種子損傷。其他如病毒性病害則可由寄主細胞質內所形成之特殊圓盤形或紡錘形結晶狀內含體作為判別之依據。

(二) 洗滌或培養檢測法

多應用於檢測真菌性病害，檢查附著在種子表面的病菌孢子，由於肉眼或放大鏡不易檢查，一般可用洗滌法檢驗方法。將送驗樣品分別放入三角瓶內，各注入蒸餾水，將附著在種子表面的病菌孢子洗下來，再使沉澱孢子再次懸浮，用玻棒將懸浮液滴於載玻片上，加蓋蓋玻片，用顯微鏡檢查，鑑定病原菌種類，也可推算每粒種子上的孢子量。本法可分為培養檢測法，如使用濾紙 (吸水紙) 培養檢測病原菌萌發分生孢子的形態特性，以及瓊脂培養檢測法，種子經過表面滅菌，放在適合的瓊脂培養基上培養。通過放大鏡檢查，與病原菌特徵核對鑑別，計算菌落數。此法可以檢測出一些潛伏在種子內部的真菌病原菌或腐生性菌種，如瓜類種子炭疽病或蔓枯病菌等。

(三) 生物技術緣起-分子生物診斷方法之應用

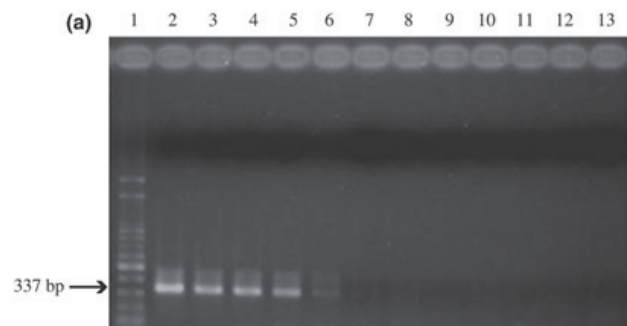
自 1953 年 Watson 與 Crick 發表關於去氧核醣核酸的構造之後，開啟分子生物學的新頁。隨著分子生物學的進展，許多原來應用在研究上的方法，也漸漸應用在疾病診斷上。此種應用核酸、蛋白質等細胞內巨分子作為診斷工具所建立的方法可統稱為分子檢驗技術。分子診斷是一門利用鑑定病原菌之核酸或蛋白質為基礎之技術，較傳統使用型態學之鏡檢或由病徵判斷之方法更有效且提高精確性與靈敏性。分子檢驗技術主要以直接或間接偵測核酸分子做為疾病診斷的技術。核酸的組成簡單，無論是 DNA 或 RNA，均是由四種核苷酸分子所組成，因此，核酸的組成成分，較容易偵測。現今的分生技術已可在短時間內，利用體外合成放大的方式，大量產生核酸以供使用。核酸容易操作、純化、定序，因此偵測核酸，成為相當簡單的工作。大量的核酸技術開發應用上，例如偵測核酸的技術，可以配合於西瓜或洋香瓜栽種田之病害調查所需。另外核酸操作、純化和定序相對於蛋白質容易，且方法也不斷改進與簡化步驟為研發方向，多種以核酸檢測為主的技術都已進入成熟階段。

目前使用分子生物學的方式於蔓枯病及炭疽病原的鑑定種苗病害應用，主要方式有：

1. PCR 檢測技術

已是應用非常廣泛之分子生物技術，首先需要針對待測檢體目標基因之核酸序列設計一小段與其互補之核酸片段，稱為引子，由於核酸複製需要兩邊往復反應，因此需要兩條成對的引子，針對病原菌的特定基因序列設計專一性的引子對。目前最常使用於診斷微生物的分子檢測技術為聚合酵素鏈鎖反應技術，簡稱 PCR，其原理為利用微生物基因體中特異性的核酸序列，設計「專一性引子對」，藉由引子對不斷黏合、延展、分開的重複步驟，將特異性的核酸片段增幅百萬倍，經過洋菜膠電泳後可以看到反應帶。因此可將瓜類仍無病徵之初期感染或是潛伏期帶菌之不可見的微量微生物，在短時間內

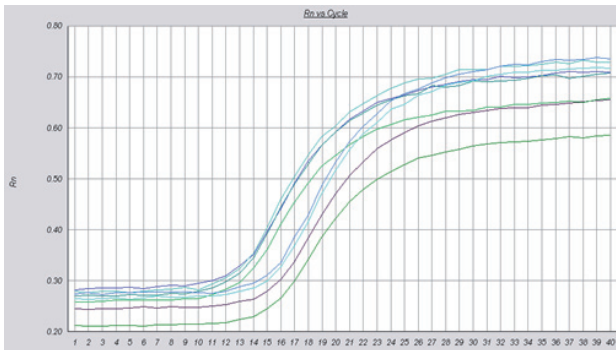
擴增為可見的反應條帶，藉此了解該植物是否感染特定病原菌(圖一)。PCR 在診斷之應用廣泛，可以用來診斷基因突變、病原微生物(真菌、細菌、病毒、及線蟲等)診斷。其優點是快速，敏感度高。在微生物鑑定上，相較於細菌培養需時 1-3 日，進行鑑定可能需要到 7 日，真菌分離與培養鑑定，如炭疽菌與蔓枯病菌皆須純培養分離至產孢形成等過程，一般需要費時 3-4 周以上的時間才能完成鑑定，利用 PCR 檢測技術檢測或鑑定則相對快速，快者在收集採樣後數小時即可完成檢測，確定採樣組織或葉片感染之病原微生物種類。



圖一 以一般 PCR 檢測感染之炭疽病菌之西瓜種子

2. 即時定量 PCR

藉由 PCR 擴增的原理，使極微量的 DNA 放大，並經由光學系統，達到即時偵測的目的；經由每一次 PCR 擴增循環，將其生成反應產物之螢光數值記錄下來，待反應全部完成之後，將每個檢體的 cycle number 與 PCR 產物的螢光數值相關位置做圖，可得到一反應曲線圖形，完整地呈現 PCR 反應中每一個 cycle 中 PCR 產物的生成情形(圖二)。Real-time PCR 是利用熱循環步驟使微量 DNA 樣本進行擴增達到放大的目的，但是最後並不是以洋菜膠電泳進行結果判讀，而是在反應中加入 DNA 結合染劑或是螢光探針 (Fluorescent probe)，並針對每個 cycle 所產生的螢光量進行偵測。理論上 PCR 產物隨著 cycle 增加，而螢光數值也伴隨著 PCR 產物一起增加；Real-time PCR 會紀錄每一個 PCR cycle 中螢光



圖二 以即時定量核酸偵測系統檢測感染微量之炭疽病菌之西瓜種子

數值的情形，藉由分析 PCR cycle 與螢光數值這兩個因素之間的相對關係，進行實驗結果的判讀。農業試驗所近年來發展檢測瓜類炭疽病、蔓枯病、細菌性果斑病快速檢測技術等，成功發展出 PCR、即時定量 PCR 及新式快速分子診斷等技術。可以檢測甜瓜、西瓜等重要作物是否受到感染。本項檢測技術可以偵測出在感染組織中的病菌，其靈敏度較傳統 PCR 法提高 100-1,000 倍；使用本技術亦不須如傳統 PCR 方法需要經過電泳分析確認，有效縮短病菌檢測時間。

3. 恆溫增幅法

此基因擴增法是一項研究基因表現的新方法，能在恆溫的狀態下有效且快速地大量增幅核酸，此片段的專一性高，主要因為特殊的引子設計能在極短的時間內，專一地認出 6 個區域，所以不管是在作物品種鑑定、疾病快速檢定、甚至於 SNP 方面皆有一個很好的發展，近年來已應用到不同微生物的鑑定等及各種病原菌的檢測，經由此技術的發展，除達到具有專一性的反應，縮短檢測時間，亦達到節省勞力等優點。

4. 儀器定量進行高通量檢測的時代來臨

此類技術優點是可以進行大量的檢體檢測，並且可經由儀器快速反應後、分析結果及自動判讀；但缺點是儀器價格昂貴。近年來逐漸廣為應用之核酸檢定法，如核酸探針雜配法 (DNA probe

hybridization) 及結合聚合酵素連鎖反應，亦已被發展成為例行之種苗病害檢定法。農業試驗所已發展出可以於單步驟同時檢定炭疽病、蔓枯病與果斑病的 multiplex RT-PCR 流程。並且於最近進一步結合生物晶片雜配法，利用螢光結合方式發展的各病原專一性探針，可針對 PCR 反應之產物進行捕捉，再以明確而單純之化學顏色變化圖譜，預測 PCR 產物是否存在之事實，並提高其原來的靈敏度與精確性，此種生物晶片亦是未來病害診斷的新趨勢之一。

結論與展望

目前主要的分子檢測方式除蛋白質分子外仍多以 DNA 或 RNA 序列為主，在操作上，除了確認病原種類之鑑定外，並無需要每次耗費時間重複做核酸定序，而以病害診斷所開發的分子標誌技術也強調具專一性及靈敏性的特性。另外運用免疫診斷技術也是常見檢驗技術，如利用 ELISA 法、抗體連結磁珠吸附抗原等，但血清學診斷方式有些缺點是靈敏度較低，對於檢體處理方式不佳或病原菌含量低的檢體，容易造成偵測結果不穩定的現象。PCR 技術使用專一性之引子，可以提供正確與可信賴鑑定病原菌，然而 PCR 產物之觀察需要藉助電泳分析，經由 Ethidium bromide 染色或螢光劑染色，此過程需要較密集的人力與時間，因此檢體的檢驗數量也受到限制。農業試驗所發展出西瓜蔓枯病菌與炭疽病菌的特異性檢測技術，利用一般 PCR、即時定量 PCR 法檢測靈敏度至少在 pg 級以上，並能檢測出感染之西瓜炭疽病及蔓枯病病樣中的病菌。這對於種苗、種子在國際間交亦與進出口頻繁之檢疫工作上，利用適當的檢測工具快速而準確檢測植物病害更顯得異常重要。各種檢測方法，包括使用生物分析法至 PCR 相關技術或者發展出的各類型生物晶片均有它的價值，這些新方法不斷被研發出來，將對產業界提供更多有效的選擇與助益。

AgBIO

關政平 行政院農業委員會 農業試驗所生物技術組 助理研究員
吳明哲 行政院農業委員會 農業試驗所生物技術組 組長