

菌核病菌的分類及PCR鑑定技術

沈原民

摘要

在台灣，菌核病菌引起作物病害相當普遍，我們回顧一些菌核病菌分類結果，及應用PCR技術輔助鑑定之文獻，用以支持物種的鑑定。1979年，Kohn, L. M.認為只有3個主要引起植物病害的*Sclerotinia*物種，分別為*Sclerotinia sclerotiorum*、*S. minor*、*S. trifoliorum*。以PCR鑑定、偵測及序列比對方面，*Sclerotinia*屬內的ITS序列差異小，而SSU rDNA、*RPB2*、*G3PDH*、*HSP60*基因序列雖有可能提供足夠的特徵差異，但目前僅有*S. sclerotiorum*的研究資料。2007年，Hirschhäuser與Fröhlich利用*laccase2 (lcc2)* genes開發multiplex PCR檢測方法，設計通用的reverse primer: MP_UniR，及對*S. sclerotiorum*、*S. minor*分別具有專一性的forward primer: MP_SsF, MP_SmF，對*S. sclerotiorum*增幅出632 base pairs (bp)、*S. minor*增幅出835 /bp/之片段。目前資料庫中可供比對的菌核病菌*lcc2* gene序列有一個物種以上，適合針對菌核病菌的*lcc2* gene以PCR或序列比對的方法輔助菌核病菌診斷。

前言

菌核病菌為子囊菌門(Ascomycota) *Sclerotinia*屬的真菌，特色為不形成無性的分生孢子(conidia)，而產生菌核(Sclerotium)作為長期存活的構造，該屬真菌可引起多種植物病害，最普遍的菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*寄主範圍超過400種植物⁽²⁾。在台灣，菌核病菌引起作物病害亦相當普遍⁽¹⁾，我們研究中南部地區的經濟作物病害時，也面對到菌核病菌。從在植物上引起的病徵、病兆、分離出的真菌初步形態、ITS(Internal transcribed spacer)部份序列等特徵，我們能夠診斷菌核病菌(*Sclerotinia* sp.)，但卻沒有充足的證據完全地支持真菌物種的鑑定結果，因此，我們回顧一些目前普遍被接受的菌核病菌分類結果，及應用PCR (polymerase chain reaction; 聚合酶鏈鎖反應)技術支持與輔助鑑定之文獻，提供我們實驗方向，並將相關內容作為本場專題討論的題目，大致以文獻的時間順序說明，與同仁分享。

內容

一般生物的特徵，可從不同尺度的形狀、顏色、質地來描述，由個體、或生物樣本的表徵差異，生物學家區分不同類別，將不同種類區分開來，或將不同的個體歸納在同一個群體內。物種(species)即為最基本的單位，能夠互相交配並產生

有生殖能力的後代的個體被歸為同一個物種，生物學家從不同類別的群體中選取有代表性的標本，各給予一個合法的名字(學名)，再將其他有相同特徵的樣本，歸納到名字之下，此即生物的分類(或歸類)。真菌的分類有其特殊之處，在於同一種真菌具有有性世代(可產生有性孢子)的學名與無性世代(可產生無性孢子)的學名，有許多真菌(常見如：不完全菌)產生有性孢子的頻率遠不如產生無性孢子的頻率，因此無性的分生孢子的特徵在真菌鑑定上有其重要性。然而，本文的主角：菌核病菌(*Sclerotinia* sp.)，其無性世代不產生分生孢子，因此可使用的形態特徵相對較少，或須特定環境條件才能誘導有性的子囊孢子形成。過去，*Sclerotinia*屬的名字因分類學家的選擇，涵蓋許多Sclerotiniaceae的其他種類，有250種以上的學名被放在*Sclerotinia*屬⁽⁶⁾，到了1979年，Kohn, L. M.探討相關特徵，給予*Sclerotinia*屬更侷限的定義，認為只有3個主要的引起植物病害的*Sclerotinia*物種，以下將由此開始討論菌核病菌的形態與分類。

一、菌核病菌之分類檢索

Kohn提出引起植物病害的菌核病菌檢索表如下：

- I. 由野外或田間採得的菌核，或培養在PDA(potato destrose agar)培養基於15-20°C上產生的菌核所作的檢索表：
 1. 菌核及菌絲具有任一下列特徵：a)具有clamp connections；b)具有dolipore septa(使用位相差顯微鏡或包埋在aniline blue/glycerine溶液).....擔子菌(Basidiomycetes)
 1. 菌核及菌絲上述兩特徵皆無.....2
 2. 有分生孢子(conidia).....非*Scelrotinia*，參考*Verticillium*, *Phaeosclerotinia*, *Monilinia*, *Pycnopeziza*, *Scleromitrua*, *Botryotinia*, *Gloeotinia*, *Septotinia*, *Cristulariella*等
 2. 無分生孢子，除了phialidic "spermatia"之外(Myrioconium).....3
 3. 具有維度不固定的mantling sclerotial stroma及小型菌核("sclerotiuless")形成在mantle的氣生菌絲上.....*Stromatinia*
 3. 非上述特徵.....4
 4. Sclerotial medulla含有寄主細胞，或在培養時菌核至少有部份埋入洋菜.....*Ciborinia*, *Myriosclerotinia*, "*Sclerotinia*" kernerii
 4. Sclerotial medulla無受害生物組織，或在培養時菌核形成在洋菜表面之上.....5
 5. Sclerotial rind單層，由外壁色深且棍棒狀(clavate)的細胞構成....."*Sclerotinia*" tuberosa
 5. Sclerotial rind由2-6層外壁色深且球狀(globose)的細胞構成.....6
 6. 菌核大量生成，散生在整個菌落，培養時有時相連，個別菌核長0.5-2 mm.....*Sclerotinia minor*
 6. 菌核只產生於菌落的邊緣，形成同心環狀、放射線形或其他樣式，個別菌核長2-20 mm.....7

7. Sclerotial rind由球狀的細胞組成的textura prismatica組成，延伸出rind之外成直立的tomentum菌絲.....*Sclerotinia trifoliorum*

7. Sclerotial rind由球狀的細胞組成的textura prismatica組成，無tomentum.....
Sclerotinia sclerotiorum

II. 由從菌核長出的子囊盤(包括自然界採得或實驗室取得的)作成的檢索表

1. 子囊盤杯狀、有柄、產在有完整分化的rind與medulla之菌核上，有分生孢子形成.....非*Sclerotinia*

1. 子囊盤杯狀、有柄、產在有完整分化的rind與medulla之菌核上，無分生孢子形成，除了phialidic "spermatia"之外(*Myrioconium*).....2

2. Sclerotial medulla含有寄主細胞，或在培養時菌核至少有部份埋入洋菜.....*Ciborinia*, *Myriosclerotinia*, "*Sclerotinia*" *kernerii*

2. Sclerotial medulla無受害生物組織，或在培養時菌核形成在洋菜表面之上.....3

3. 具有維度不固定的mantling sclerotial stroma及小型菌核形成在mantle的氣生菌絲上，子囊盤只產生在mantling sclerotial stroma上.....*Stromatinia*

3. 非上述特徵

4. 子囊盤ectal excipulum外層由prosenchymatous細胞組成，常嵌於膠質內..... "*Sclerotinia*" *tuberosa*

4. Ectal excipulum由球狀的細胞組成，膠質有或無.....*Sclerotinia*(5)

5. 子囊孢子的大小有兩型，在子囊裡分開為大小兩型，四核，子囊孢子的長/寬比 ≤ 2.0*Sclerotinia trifoliorum*

5. 子囊孢子的大小較一致，在子囊裡無法區分開...6

6. Ectal excipulum在子囊盤邊緣由球狀的細胞組成，子囊孢子四核.....*Sclerotinia minor*

6. Ectal excipulum在子囊盤邊緣由prosenchyma朝外側垂直於子囊盤表面，子囊孢子二核，子囊孢子的長/寬比 > 2.0*Sclerotinia sclerotiorum*

二、菌核病菌的PCR鑑定技術

1988年，Kohn等人⁽⁷⁾以RFLP(restriction fragment length polymorphism)呈現核酸差異的樣式，加強將*Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor*區分為三個種類的論點。之後，不同團隊進行子囊菌或病原菌研究時，或多或少解開菌核病的部份序列，以說明演化的過程或作為檢測的標的，相關結果可供以PCR引子對偵測病原菌，或直接從序列比對輔助鑑定。

1995年，Gargas與Taylor⁽⁴⁾探討子囊菌下Discomycetes的系統分類，利用到一筆*S. sclerotiorum*的small subunit(SSU) rDNA gene序列。2002年，Freeman等人⁽³⁾為了偵測空中的菌核病菌孢子，解出菌核病菌的internal transcribed spacer(ITS)序列，由ITS序列設計引子對SSFWD與SSREV用以鑑別*S. sclerotiorum*與*Botrytis cinerea*，不過，由於*Sclerotinia*屬內的ITS序列差異小，上述引子對無法區分*S. sclerotiorum*與其他種類的菌核病菌。2005年，Staats等人⁽⁹⁾以*S. sclerotiorum*作為外群探討

*Botrytis*屬的分子系統分類與演化，*S. sclerotiorum*的*RPB2* (DNA-dependent RNA polymerase subunit II), *G3PDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *HSP60* (heat-shock protein 60)三個protein-coding genes被解序出來，與*Botrytis*屬的這些基因序列相比較。

2007年，Hirschhäuser與Fröhlich⁽⁵⁾嘗試利用*laccase2* (*lcc2*) genes區別相近的菌核病菌種類，並開發用於multiplex PCR檢測。他們首先應用nested-PCR解序*S. sclerotiorum*, *S. minor*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena*的*lcc2* gene，而後設計一個對上述四種真菌通用的reverse primer: MP_UniR，及對上述四種真菌各具專一性的forward primer: MP_SsF, MP_SmF, MP_BcF, MP_MfF，同時運用這些引子對可以multiplex PCR同時偵測這四種真菌，對*S. sclerotiorum*增幅出632 base pairs (bp)、*S. minor*增幅出835 bp、*B. cinerea*增幅出553 bp、*M. fructigena*增幅出446 bp之片段，相關技術可能用以快速、精確地偵測農產品上的植物病原菌。而Meng等人(8)後來應用Hirschhäuser與Fröhlich⁽⁵⁾所開發出來的MP_SsF與MP_UniR作為專一性引子對，使用PCR診斷與序列比對來輔助鑑定*S. sclerotiorum*。

結語

鑑定菌核病菌時，除了觀察子囊盤與子囊孢子的形態之外，可就菌核之大小、排列與菌核外的絲狀構造加以區別。PCR方法或核酸序列比對，可以輔助菌核病菌的鑑定，在現在的應用層面，不同核酸序列片段有不同特性，菌核病菌ITS序列適合與其他真菌比較，但在*Sclerotinia*屬不同種類間的差異較小；SSU rDNA、*RPB2*、*G3PDH*、*HSP60*基因序列雖有可能提供足夠的特徵差異，但目前僅有*S. sclerotiorum*的研究資料，須有更多菌核病菌種類的研究結果後，才更適合用於輔助菌核病菌鑑定；而針對*lcc2* gene可利用PCR方法增幅出不同大小的片段，且目前資料庫中菌核病菌的*lcc2* gene序列有一個物種以上，可供比對不同種類，當無法取得多種不同菌核病物種或標準菌株相互比對時，目前適合針對菌核病菌的*lcc2* gene以PCR或序列比對的方法輔助菌核病菌診斷。

參考文獻

1. 中華民國植物病理學會 2002 台灣植物病害名彙 p. 48~50。
2. Bolton, M. D., B. P. H. Thomma and B. D. Nelson. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol. Plant Pathol. 7: 1-16.
3. Freeman, J., E. Ward, C. Calderon and A. McCartney. 2002. A polymerase chain reaction(PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. Eur. J. Plant Pathol. 108: 877-886.

4. Gargas, A. and J. W. Taylor. 1995. Phylogeny of Discomycetes and early radiations of the apothecial Ascomycotina inferred from SSU rDNA sequence data. *Exp. Mycol.* 19: 7-15.
5. Hirschhäuser, S. and J. Fröhlich. 2007. Multiplex PCR for species discrimination of Sclerotiniaceae by novel laccase introns. *Int. J. Food Microbiol.* 118: 151-157.
6. Kohn, L. M. 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology.* 69: 881-886.
7. Kohn, L. M., D. M. Petsche, S. R. Bailey, L. A. Novak and J. B. Anderson. 1988. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathology.* 78: 1047-1051.
8. Meng, S. X. B. M. Wu, R. L. Ludy, C. L. Fraley and N. K. Osterbauer. 2011. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on whitloof chicory (*Cichorium intybus* L.) in Oregon. The 3rd NPDN National Meeting Berkeley, California.
9. Staats, M., P. van Baarlen and J. A. L. van Kan. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* 22: 333-346.