

中華醫事科技大學生物醫學研究所

碩士論文

*Fusarium oxysporum*之序列差異性分析

The DNA sequences diversity of *Fusarium
oxysporum*

研 究 生：陳怡君 (Yi-Jyun Chen)

指導教授：朱木貴 博士(Mu-Kuei Chu)

中華民國一百零二年七月

中文摘要

镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 為台灣地區田間常見的病原真菌，造成多種農作物包括香蕉、西瓜、香瓜等高經濟作物之病害，為台灣重要病害之一。本病原菌在早期多以顯微鏡下觀察型態來進行分類，近年使用 Polymerase chain reaction、Restriction fragment length polymorphism、Amplified fragment length polymorphism 等方法來進行分類。由於 *Fusarium oxysporum* 的宿主廣泛，對不同宿主產生分化型(Formae Special), 由於分化型日益增加，因此在分類工作需要更多的資料來判斷分化型的差異所在。本研究利用核酸序列比對方法去分析不同來源之 Internal Transcribed Spacer (ITS)、Intergenic Spacer (IGS)、Elongation Factor(EF)、Fusarium Osmotin Resistance (FOR)等之相似度分析，可了解不同分化型菌株核酸序列間之差異。研究成果顯示 FOR3 核酸序列及比對後相似度較高之序列資料的結果可區分成 8 個 Divisions，定序後之序列以 BLAST 搜尋 NCBI 資料庫發現此序列與 *Nectria* 及 *Gibberella* 的相似度較高其中 FDS 與 *Nectria* 其相似度 86% ;Fo. Tomato 和 Fo. Cucumber 與 *Gibberella* 相似度 80%。以 NCBI 搜尋作物的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 的不同來源之宿主分離株統整後進行相似度分析，分別建立 ITS、EF 及 BT2 的小型資料庫，經多序列比對後可發現 ITS 資料庫可分為 3 個 Divisions。EF 資料庫可分為 2 個 Divisions。BT2 資料庫可分為 2 個 Divisions。ITS、EF 及 BT2 核酸序列對不同宿主之分離株不具差異性，但多序列比對仍有顯示特異性序列，將有差異性之序列開發生物晶片之測試點，希望可依測試點所預測之特定反應型以區分宿主間的差異。

英文摘要

Fusarium oxysporum is a common pathogenic fungus in the fields of Taiwan. It causes serious diseases on plants including crops such as bananas, watermelons, melons and other economic crops, and it is one of the serious plant diseases in Taiwan. In the early stage, *Fusarium* was identified by the patterns under microscope. In recent years, the identify method often used is Polymerase chain reaction, Restriction fragment length polymorphism and Amplified fragment length polymorphism, etc. Because of the wide range of hosts, different Formae Special of *Fusarium oxysporum* are very much which is specific to their hosts and the association interaction between *Fusarium oxysporum* f.sp toxicity and hosts will be established. Since the increasing number of Formae Special, it is more and more difficult in identifying the *Fusarium oxysporum*. In this study, we utilized bioinformatics to analysis the similarity of nucleic acid sequence including Internal Transcribed Spacer (ITS), Intergenic Spacer (IGS), Elongation Factor (EF) and *Fusarium* Osmotin Resistance (FOR), etc. It can help us to find out the difference between different strains. The result shows FOR3 nucleic acid sequence and similarity higher, and the sequence data results can be divided into eight divisions, after sequencing and comparing to NCBI database found this sequence are similar with *Nectria* and *Gibberella*. The FDS and *Nectria* of similarity is 86%; the *Fo. Tomato*, *Fo. Cucumber* and *Gibberella* of similarity is 80%. By searching *Fusarium oxysporum* f. sp.'s crop from different host on NCBI and integrating similarity analysis, we established small databases for ITS, EF and BT2. The multiple sequence alignment results can be obtained from ITS database and can be divided into three divisions; EF database can be divided into two divisions; BT2

database can be divided into two divisions. ITS, EF and BT2 nucleic acid sequences of different host does not have any diversity, but still have specific sequence, these specific sequence will be designed to development the bio-chip test points, hope distinguish the diversity between the host by these test point.



致謝

最後的學生生涯在這短短的兩年裡終於要結束了，即將要邁向另一個開始。在碩士兩年裡也學到了不少，也有許多忘不了的快樂回憶。能順利完成碩士論文最感謝的，是我的指導教授朱木貴 博士，從二技入學到研究所這四年來他用心的教導我，做事需細心、寫作要有「起承轉合」的概念及在思考問題要符合邏輯，讓我在論文的撰寫或是在報告的重點整理都可以更加順利完成，也教會我很多待人處事的道理，辛苦老師這四年的教導，也很感謝您在這四年來的鼓勵及認真的指導我。其次要感謝口試委員李佩芳 博士及陳月茸 博士在百忙之中能抽空指導並給於我的論文寶貴的意見，使論文得以更加完整順暢。也要特別感謝台南區農業改良場吳雅芳副研究員提供本論文所需之菌株以及協助我在實驗中問題的探討，在此獻上十二萬分的感謝。

在這兩年裡也要特別感謝與我一起共事及共同討論實驗上的困難的同窗好友孟庭，我們一起在解決實驗上遇到的問題，互相分享實驗的經驗，也很感謝日常生活中她對我的照顧，哪裡有給你添麻煩的地方是我說不完的感謝。也要感謝記寧學姊、岳峯學長、彥鋒學長、雅文學姐及晴翔學姐等多位學長姐，給於我實驗上的指導和寶貴的經驗及知識。還要感謝在實驗上幫助過我的二技學弟妹們，有你們的幫助我才能順利完成碩士學業，也祝福你們能在未來及求學的路上能夠順利向上並完成。

最後感謝我的家人，謝謝我的父母及家人支持我完成碩士學業，在我就讀期間鼓勵我及幫助我，讓我可以專心的完成論文撰寫。僅以此論文獻給所有關心及愛我的人，願所有我愛的人及愛我的人都可以事事順心及如意。

目錄

論文審定書

中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
致謝	V
壹、 前人研究.....	2
一、 鐮孢菌介紹	2
二、 生理發育	3
三、 分類依據	4
四、 特異性核酸序列介紹	4
五、 生物資訊	5
六、 生物晶片	6
七、 研究方向	7
貳、 材料與方法.....	8
一、 材料	8
(一)、 菌株來源、培養及保存	8
二、 真菌 DNA 萃取.....	8
三、 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR).....	9
四、 PCR 產物之純化	9
五、 PCR 產物與質體之接合作用	9
六、 核酸轉型作用	10
七、 DNA 定序與引子組設計.....	10

八、 生物資訊分析	11
參、 結果與討論.....	12
一、 鑑定相關性基因之分析	12
二、 β -Tubulin (BT2) 基因序列之相似度分析	12
三、 Elongation Factor (EF) 基因序列之相似度分析	13
四、 Fusarium Osmotin Resistance (FOR3) 基因序列之相似度分析.....	13
五、 Internal Transcribed Spacer (ITS) 核酸序列之相似度分析	14
六、 生物晶片之設計	15
八、 引子組設計	16
肆、 文獻.....	18
圖表	23
表一、 NCBI 資料庫中不同鐮孢菌菌株之 ITS 序列及其相關資料。	24
表二、NCBI 資料庫中不同鐮孢菌菌株之 EF 序列及其相關資料。	25
表三、NCBI 資料庫中不同鐮孢菌菌株之 BT2 序列及其相關資料。	26
表四、寡核苷酸生物晶片之設計。	27
表五 A、BT2 測試點對不同分宿主分離株之雜合反應型。	29
表五 B、EF 測試點對不同宿主分離株之雜合反應型。	30
表五 C、FOR 測試點對不同宿主分離株之雜合反應型。	31
表五 D、ITS 測試點對不同宿主分離株之雜合反應型。	32
圖一、作物所分離 <i>Fusarium</i> 菌株的 BT2 核酸序列之相似度分析。	33
圖二、作物所分離 <i>Fusarium</i> 菌株的 EF 核酸序列之相似度分析。	34
圖三、不同來源之 <i>Fusarium</i> 染色體 DNA 以 FOR3-F 及 FOR3-R 引子組所 進行之 PCR 增幅。	35

圖四、不同來源 <i>Fusarium</i> 之 FOR3 基因序列以多序列比對軟體所進行之相似度分析。.....	36
圖五、作物所分離 <i>Fusarium</i> 菌株的 ITS 核酸序列之相似度分析。.....	37
圖六 A、FOR 基因之多序列比對及測試點所在位置。.....	38
圖六 B、FOR 基因之多序列比對及測試點所在位置。.....	39
圖七、EF 基因之多序列比對及測試點所在位置。.....	40
圖八 A、ITS 基因之多序列比對及測試點所在位置。.....	41
圖八 B、ITS 基因之多序列比對及測試點所在位置。.....	42
圖八 C、ITS 基因之多序列比對及測試點所在位置。.....	43
圖九、BT2 基因之多序列比對及測試點所在位置。.....	44
圖十、不同來源鐮孢菌 JN995193-EF-30 核酸序列之多序列比對及引子設計位置。.....	45
附錄	46
附錄一.....	47
附錄二.....	48

壹、前人研究

一、鐮孢菌介紹

Fusarium spp. 鐮孢菌為台灣地區田間常見的病原真菌，造成多種農作物之病害。由於鐮孢菌屬宿主廣泛包含：蘭花、茄子、西瓜、蕃茄、香蕉、蘿蔔、萵苣等重要經濟植物，對台灣農作物會造成重大的經濟損失，因而成為台灣重要病害之一（Lin et al., 2009）。目前研究也已證實除病害的影響外，鐮孢菌所分泌的毒素會存在於農作物所使用的肥料之中，導致農作物吸收後造成重大的經濟損失（Manuel et al., 2009；Jeffrey et al., 2011）。在台灣最常見的 *Fusarium spp.* 的種類分別為：尖鐮孢菌 (*F. oxysporum*)、念珠鐮孢菌 (*F. moniliforme*)、茄形鐮孢菌 (*F. solani*) 以及磚紅鐮孢菌 (*F. lateritium*) 等四種（藍，2006）。鐮孢菌的生長條件，普遍適合於溫帶及熱帶的環境當中（Jeffrey et al., 2011）。主要的傳播途徑是經由土壤及灌溉水源，而土壤傳播會使農作物發病時，持續性高而且難以控制（Manuel et al., 2012）。病徵通常會造成植物葉片枯黃萎凋、根部腐爛、根莖枯萎等病徵，由於 *Fusarium oxysporum f. sp.* 的孢子多存在於土壤中，經常造成農作物蔓割病導致枯萎死亡（Manuel et al., 2009；Jeffrey et al., 2011）。*Fusarium oxysporum* 又屬於 *Elegans* 群，本群內之 *Fusarium* 菌有橢圓形、單孢、散生之小孢（microconidia），鐮刀形大孢子為 *Elegans* 型 纖細優美之意，本群中有些種類具有孢子叢（Sporodochia），有的則為黏膜型孢子（pionnotes）（黃，2002）。孢子累積成堆時呈粉紅色（salmon color），但亦有褐白色或鮮豔之橘紅色（蔡，2006）。分生孢子梗與菌絲垂直生出，分枝成為孢子叢（黃，2002）。厚膜孢子（chlamydo spores）圓形或橢圓型，頂生或間生，單孢，無子囊世代（黃，2002）。而 *F. oxysporum* 的生長特性為生長快速、氣生菌絲由少至多不等，白色至淺紫色；孢子堆散生，顏色有桔色，黃色至黃褐色等；在培養基底部常有藍色的菌核、培養基

背面常為無色,有者呈灰白,桔色,黃褐色,褐色,淡紫色或暗藍色,暗紫色等(黃,2002)。鐮孢菌在顯微鏡下觀察的型態分為三大種:大分生孢子、小分生孢子、厚膜孢子(附錄一),有時會形成特殊的鐮刀型孢子。過去研究中發現顯微鏡下觀察大分生孢子的間隔有的只有1個縱隔;有的是0到3個縱隔數,在早期的文獻中是以型態來做為分類依據,但是因生理發育不盡相同,因此以型態來做為分類的方法會有一定的困難(Hans et al., 2009)。所以研究人員就開始探討真菌的生理發育,發現可分為有性世代及無性世代(謝,1998)。有些鐮孢菌在人類身上會造成疾病,目前已有文獻指出臨床上有少部分的*Fusarium oxysporum f. sp.*的個案(Ali Rezaei et al., 2012)。通常都是當人類免疫功能低下或者不全時會感染人類造成疾病,而一般感染人類的機會並不大(Manuel et al., 2012)。

二、生理發育

由於鐮孢菌的生理發育可分為有性生殖及無性生殖兩大類別:有性生殖的真菌會透過基因重組使序列有重新排列組合,會經由菌絲間的連結進行有絲分裂因此在基因序列上會有些許差異,連帶型態上也有些許差異,通常顯微鏡下含有孢子擔或孢子囊之有性生殖組織(謝,1998)。無性生殖雖不會進行有絲分裂但在顯微鏡下與有性生殖的型態有相當大的差異,其在顯微鏡下可見大分生孢子或小分生孢子(蔡,2006)。但無性世代可轉換進行有絲分裂,當真菌所寄生之物種,遇到可相容之菌株接觸在一起時,才會產生有性世代,這是相當不容易的,這個現象也解釋了為何真菌多以無性世代的型態來描述(黃,2003)。除了生理發育會導致分類上的困難還有另一個原因為Formae Special分化型,可產生不同種類的分化型態使菌株對宿主具有特異性,因此宿主的特異性對於*Fusarium oxysporum f.sp.*的致病能力間建立複雜的關係(José et al., 2010)。所以必須更加了解病原體的多樣性,才能夠針對作物

的防疫及疾病的管理 (Gerda et al., 2009)。

三、分類依據

早期文獻指出分類*Fusarium*的方法是依據顯微鏡下的型態來做為分類，但在1935年發現依據型態分類並不是非常好的方法，有些分生孢子並非是絕對的，還有因宿主廣泛造成Formae Special分化型導致分類上的困難，因此近年來利用多種技術來分析如：Polymerase chain reaction (PCR)、Restriction fragment length polymorphism (RFLP)、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)等方法。大部分的分類都使用前面兩者。其它文獻中也有不同的分類方法像是Vegetative compatibility groups (VCGs)被用來做為區分DNA的基本工具 (Gerda et al., 2009)；Multi locus sequence typing (MLST)也可以用來做菌株鑑定 (Scheel et al., 2013)。

四、特異性核酸序列介紹

由於宿主種類繁多而有不同的分化型導致在分類上有一些困難所以目前常用的核酸序列為 ITS (internal transcribed spacer)、IGS (Intergenic spacer)，EF基因 (elongation factor) 及FOR基因 (Fusarium Osmatin Resistance)等 (Hyeseung et al., 2010; Gayatri et al., 2009; Visentin et al., 2009; Patiño et al., 2004; Amatulli et al., 2010)。首先介紹ITS序列，其序列屬於ribosomal RNA，基因所分佈的位置在於18S與28S之間。因此，設計引子做PCR鑑定並做序列比對分析，依據的序列比對分析的結果來做為分類的根據，依據此特性來進行序列分析比對及親緣性分析。IGS基因是屬於ribosomal RNA，目前已經有文獻證明此基因是一個很好檢測鐮孢菌標記，所分佈的位置在於5.8S之內，為染色體內的重覆單元，是基因間隔的非轉錄間隔區，所以設計引子進行PCR鑑定並做序列比對分析及親緣性分析 (Gerda et al., 2009; Visentin et al., 2009;

Patiño et al., 2004)。EF基因以及EF-1 α (translation elongation factor 1- α)都是屬於延長基因是一種蛋白質，主要的功能就是幫助菌絲在宿主上成長，主要存在的位置於核糖體，當真菌附著在於農作物宿主上時，會活化EF基因而使真菌在宿主身上快速生長，進而使農作物發病或是破壞維管束使養分無法順利輸送，導致農作物無法順利生長進而死亡 (Romberg et al., 2007; Amatulli et al., 2010)。最後介紹FOR基因，由於osmotin對致病性真菌較為敏感尤其是*Fusarium oxysporum*。osmotin同時也會與細胞漿膜相互作用發出細胞死亡的訊號；是一種抗真菌蛋白基因；當過度表現時可在適鹽性的菸草細胞中培養會誘導植物發病，但在轉殖植物中則會延緩作物發病 (Hyeseung et al., 2010)。

五、生物資訊

過去二十年間，研究人員已完成超過1000個完整的微生物基因序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>)。這些豐富的序列訊息可讓我們了解細菌的生理和生物的演化距離，包含所有的生物資訊，像是鑑定蛋白質編碼基因和之後的功能註解及基因產物 (Lian et al., 2011)。「後基因體時代」主要可讀取所有生物訊息，目前已有利用相似性搜尋的程序來解讀訊息，例如James (2006) 等人利用耐鹽基因分析小麥在鹽分高的地區可抵抗高鹽生長的重要性；Genin與Boucher (2004) 利用已經全部解序完畢之*Ralstonia solanacearum* GMI100基因體，研究此細菌如何演化以適應不同寄生植物，以及其必要的致病性基因調控分子的機制 (Genin et al., 2004)。還有利用統計學的方式或軟體來檢測特定的序列尋找基因。例如Melissa和Chris (2012) 利用生物資訊分析與比較同源痘病毒基因，開發了同源痘病毒及群數據庫系統集中分析 (Melissa et al., 2012)。此外國內防檢局也建立了植物病毒生物資訊庫，可提供防疫相關工作人員方便使用與操作介面跟自動統計及比對系統，可迅速供給資訊以判定病毒是否屬於台灣地區本土病毒，不受限於國際網路

(Melissa et al., 2012)。可做為防止境外植物病毒入侵、追蹤境外病毒或進行貿易諮商談判之基本工具 (Melissa et al., 2012)。現在可藉由生物資訊的方式來製做抗真菌的標靶藥物。例如Banerjee (2011) 利用生物資訊發現葡萄糖6磷酸合成酶為一種新的抗真菌藥物標靶可以抑制真菌細胞壁的生成途徑，可做為人類用藥(Banerjee et al., 2011)。

六、生物晶片

「生物晶片」一詞源於1980年代，主要是應用生物分子於電腦晶片上，但事實上它和半導體所使用的矽晶片是完全不同的 (陳。2005；路。2004)。目前大家所討論的生物晶片是將生物材料，如DNA 或蛋白質，藉由機械以陣列 (array) 形式密集點分佈在固體材質 (例如載玻片) 上，由於玻片上的點陣列密度通常都非常的高，也因此常將之稱為微陣列 (microarray) (路。2004)。Microarray 技術可同步快速地進行大量生化感測與反應，可用以檢測蛋白質、核酸或組織等生物或醫學檢體，現已被廣泛應用在基因體學 (genomics)、藥劑開發 (drug discovery) 和毒理學 (toxicology) 等相關的研究與應用。生物晶片的種類發展上可分為cDNA 晶片 (complementary DNA chip)、寡核苷酸晶片 (oligonucleotide chip)、蛋白質晶片 (protein chip) 和微實驗室晶片 (lab-on-a-chip) 等 (Narayana Rao et al., 2012)。

本研究未來會朝向設計生物晶片中的寡核苷酸晶片鑑定菌種。而寡核苷酸晶片的主要原理與cDNA晶片類似，主要通過鹼基互補配對進行雜交，來檢測對應片段是否存在、有多少量存在。它與cDNA晶片的本質差別在於寡核苷酸晶片固定的探針為特定的DNA寡核苷酸片段 (Epstein et al., 2000)。基因表達晶片的兩個重要參數是檢測靈敏度和特異性 (Dinh et al., 2000)。寡核苷酸晶片序列選擇經過優化，利用合成的一定長度 (如20, 30, 70-mer等) 的寡核苷酸單鏈探針代替全長cDNA點樣，製成晶片。其優點無需擴增，防止擴

增失敗影響實驗；減少非特異性雜交，能有效區分有同源序列的基因；雜交溫度均一，提高雜交效率；減少二級結構 (Epstein et al., 2000)。上述特點使得寡核苷酸晶片的應用日益廣泛。高密度的寡核苷酸晶片作為一個有力的工具可廣泛用於分析基因組之數據，與傳統的凝膠分析方法比較起來，具有成本低、高通量、高度自動化的優點，寡核苷酸晶片已廣泛用於遺傳變異掃描、分子條編碼、基因表達檢測及測序、藥物篩選和新藥開發 (Dinh et al., 2000)。已有文獻是用生物晶片表現豬的角膜基因序列與人類的角膜基因序列雜合後的角膜可移植於人類身上使用，並且可在移植後觀察是否有排斥反應或其它發炎現象，也可以解決亞洲國家角膜移植短缺的情形 (Mee et al., 2009)。

七、研究方向

本次研究為*Fusarium oxysporum f. sp.* 菌株，分析其核酸序列時，係先使用PCR進行基因複製，並且利用生物資訊資料庫搜尋序列之比對分析。利用NCBI資料庫搜尋核酸序列 (ITS、EF) 等資料，分析*Fusarium spp.* 的種類。分析的資料為 *Fusarium spp.* 菌株為尖鏟孢菌的分化型 (*Fusarium oxysporum f. sp.*) 研究中用到的序列如:ITS (internal transcribed spacer)、EF (elongation factor)、IGS (intron gains)、FOR (fusarium osmatin Resistance) 等核酸序列來進行菌株間的差異分析。本研究方法是利用NCBI資料庫中與*Fusarium oxysporum f. sp.* 相關基因及致病性基因之序列設計引子對來分析6株菌株在*Fusarium oxysporum f. sp.* 的種類，核酸序列是否有差異性，並利用PCR原理進行複製及基因解碼，經過生物資訊比對分析後將了解6株菌株是否有異同之處，再進一步進行分類。本研究將利用生物資訊所比對出的序列差異來設計生物晶片之寡核苷酸晶片 (Oligonucleotide chip) 之引子來準確鑑定其它*Fusarium oxysporum f. sp.* 菌種。

貳、材料與方法

一、材料

(一)、菌株來源、培養及保存

本實驗所使用的供試驗菌株為 *Fusarium oxysporum f.sp.* 總共為 6 株鐮孢菌株。來源是由台南市新化區農業改良場吳雅芳副研究員所提供，*Fusarium oxysporum f. sp.* 之菌株分別為：*Fusarium oxysporum f. sp. decemcellulare* (FDS1)、*Fusarium oxysporum f. sp. decemcellulare* (FDS2)、*Fusarium oxysporum f. sp. decemcellulare* (FDS3)、*Fusarium oxysporum f. sp. mangiferae* (FM1)、*Fusarium oxysporum f. sp. tomato* (FOTO) 及 *Fusarium oxysporum f. sp. cucumber* (FOCU) 六株菌株，於顯微鏡下形態不同。供試菌株以 PDA 培養基 (Potato Starch (from infusion) 4g、Dextrose 20g Agar 15g :1L)，培養時會分泌色素，顏色會從暗紅色到紫色，有些菌絲也會分泌出橘色色素，有時也會因為培養基的不同因而產生不同色素。平板培養，培養於室溫 25°C，三到七天後進行後續之實驗。

二、真菌 DNA 萃取

將培養三到七天的真菌，用藥勺刮取 50 mg 到 100 mg 置入微量離心管中，加入海砂(sterile sand)約 100 mg 及 500 μ l extraction buffer (100mM Tris, pH 8.0、10mM EDTA、2 % SDS、100 μ g/mL Proteinase K、1 %-mercaptoethanol (2ME))，以研磨棒磨碎後置入 60°C 水浴 1 小時，加入 5 M NaCl 250 μ l 及 10 % CTAB 75 μ l 並置入 65°C 水浴 10 分鐘後。以 12000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液置入 Spin Filter 以 12000 rpm 離心 2 分鐘，利用 99 % 絕對酒精 1000 μ l 沉澱 DNA，並放置 -20°C 冰箱 1 小時，以 12000 rpm 離心 2 分鐘，用 70 % 酒精 1000 μ l 以 12000 rpm 離心 2 分鐘重覆動做一次。放入 45°C 到 60°C 烘箱 30 分鐘蒸發殘餘酒精，並加入 50 μ l 去離子水 (ddH₂O) 回溶

DNA，將萃取的 DNA 置入-20°C 冰箱備用。

三、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

本次研究所使用的機器為 Select Cyclor (LTC9600-G Select BioProducts)，PCR 反應試劑:內含 2.5mM dNTP 1 μ l (Gene Mark)、primer forward(5 μ M)與 reverse (5 μ M)各 1 μ l、template DNA 3 μ l、10X PCR buffer 2 μ l、Taq polymerase 0.2 μ l (5U/ μ l)，並加入去離子水 (ddH₂O)反應體積為 20 μ l。反應的熱循環溫度及時間如下:先以 95°C 反應 5 分鐘使 DNA 完全變性，接著 95°C 反應 30 秒，適當的反應溫度 30 秒開始黏合，72°C 反應 30 秒進行延伸等三步驟進行 30 次的循環，最後 72°C 反應 5 分鐘完全延伸。

四、PCR 產物之純化

當 PCR 產物並非單一條帶，將 agarose 切取所需的條帶大小回收膠體，並用吉恩馬克公司之 DNA clean/Extraction Kit 純化所回收的膠體，步驟如下:計算膠體的重量並加入等量體積的 binding solution。置入水浴槽中 60°C 至膠體完全溶化。置入 spin column 及 collection tube 所組合的離心管中離心 (12000 rpm，2min)去除下層液，再以 700 μ l wash solution 做清洗的動作重複兩次 (12000 rpm，1min)。然後空轉 15 分鐘以離去多餘的酒精，在置於 45°C 到 60°C 中烘乾約 5 分鐘，用以蒸散酒精。之後將 collection tube 換成新的微量離心管後將 DNA 回溶於 20 μ l 無菌水中，並集中收集之 DNA 置於-20°C 冰箱備用。

五、PCR 產物與質體之接合作用

使用 pGEMT-Easy Vector Systems (Promega, Madison, USA) 將所分離純化後的 DNA 產物構築在 pGEMT-T Easy 載體上。取 4 μ l 純化的 DNA 產

物，加入 5 μ l 的 2 X 黏接緩衝液，0.5 μ l 的 pGEMT-T Easy Vector (50 ng)，0.5 μ l 3U/ μ l 的 T4DNA ligase，使總體積為 10 μ l，於溫室反應 1 小時後，置於 4 $^{\circ}$ C 作用 10 小時以上，所得產物將進一步做轉型作用。

六、核酸轉型作用

使用吉恩馬克公司之勝任細胞 *E.coli* DH5 α ，取 25 μ l 大腸桿菌勝任細胞，加入 10 μ l 上述的接合產物，置於冰上 30 分鐘後，42 $^{\circ}$ C 水浴 1 分鐘半，加入 800 μ l LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ C，120 rpm 震盪培養 1 小時，取 50 μ l 菌液及含有 ampicillin (100 μ g/mL)、X-gal (100 μ g/mL)及 IPTG (100 μ g/mL)的 LB 平板培養基上 (1 % trypton, 5 % yeast extract, 0.5 % NaCl, pH7.0, 1.5 % Agar)。於 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養，篩選具有插入序列之白色菌落做進一步確認。

七、DNA 定序與引子組設計

將每個 PCR 產物選殖於 pGEM-T easy vector 後，挑選含具插入序列的轉型株或是 PCR 單一條帶產物直接以 4 $^{\circ}$ C 送至源資生物科技股份有限公司定序，其使用儀器為自動化核酸定序儀 (automated DNA sequence, Applied Biosystems, ABI3730, Taiwan)，利用 BigDye Terminators 螢光標記，所有反應均在同一個試管中進行，每個樣本可由電腦自動解讀平均 1kb 的有效數據。引子設計是利用 NCBI 之 nucleotide 網頁搜尋 *Fusarium oxysporum f.sp.* 等致病性菌種資料庫，進行相似度比對例如瓜類(西瓜、香瓜)的致病性菌株；花卉(蘭花、菊花)的致病性菌株；球根類(蕃薯、馬鈴薯)的致病性菌株等，以有差異性的序列片段設計引子，並委託源資生物科技股份有限公司合成引子，其中 FOR3 基因是參考 Hyeseung Lee (2010) 文獻中所設計之序列。

八、生物資訊分析

本研究之單一序列比對系統利用 NCBI 的 Blast 軟體進行序列分析；多序列比對則是利用 European Bioinformatics Institute 之 Clustal W (Multiple Sequences Alignment) 進行基因多序列比對分析，設計引子以及搜尋 *Fusarium oxysporum* f. sp. 不同來源鐮孢菌相關疾病之核酸序列，建立小型資料庫並做親緣關係分析 (表一~三)。



參、結果與討論

一、鑑定相關性基因之分析

本研究利用 NCBI 資料庫搜尋特定核酸序列，分別建立 ITS、IGS、EF 及 FOR 等之核酸資料庫，然後以 Clustal W 軟體進行多序列比對，利用序列間之差異設計引子組。引子組搭配 PCR 技術對不同來源之 6 株 *Fusarium* 菌株的染色體進行分析，共分析 15 對引子組 (GU934523-1-ITS1-25、GQ131884-2-ITS2-360、JX885462-18S-40、JQ423257-Nh-IGS-1、AY554242-ITS1-26、AY554242-ITS1-26'、EU926244-28S-1、EU926244-28S-1'、FOR3、M38139-28S-1、JN995193-EF-30、JX397805-e3-2、HE583296-EF-40、AB000124-Pg1-389 及 DQ452423-Nh-tEF-1)，其中只有 2 對 (FOR3 及 JN995193-EF-30) 可複製出特定條帶，FOR3 引子組經 PCR 後可複製出 700bp 條帶，而 FDS2-Fo-EF-30 可複製出 657bp 條帶 (附錄二)。複製出之條帶經選殖定序後，進行 BLAST 及多序列之比對分析。

二、 β -Tubulin (BT2) 基因序列之相似度分析

本研究參照 NCBI 搜尋作物的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 分離株之 BT2 之核酸序列為一種細胞骨架，將相似度較高之序列建置小型資料庫 (共 11 筆)，然後以多序列分析軟體 ClustalW 進行親緣關係分析。結果可將小型資料庫區分為 2 個群組 (Divisions A 及 B)。Division A 包括蕃薯、香蕉及香瓜的 BT2 核酸序列其相似度 98 %；Division B 只有蕃茄的 BT2 核酸序列分離株其相似度 45 %。結果證明不同來源鐮孢菌 BT2 核酸序列可分 2 個群組 (Divisions)，而 BT2 核酸序列之差異應可鑑別宿主來源為蕃茄之分離株 (圖一)。結果可發現宿主間雖可分成二群，但宿主間的差異性小，不符合預期。但多序列比對仍然有差異，希望依據有差異的地方開發生物晶片且預測反

應型(Pattern)之結果得到宿主間的差異(表五 A)。

三、Elongation Factor (EF)基因序列之相似度分析

利用 JN995193-EF-30-F 引子組對 6 株不同來源 *Fusarium* 分離株進行 PCR 分析，其中只有 FDS2 可增幅出 657 bp 的基因片段，序列以 BLAST 分析發現其與 *Nectria* 的相似度為 88 %。再根據 NCBI 搜尋作物的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 分離菌株之 EF 核酸序列，將相似度較高之序列建置小型資料庫 (共 17 筆) 及 FDS2-FO-EF 菌株，然後以多序列分析軟體 ClustalW 進行親緣關係分析。結果可將小型資料庫區分為 2 個群組 (Divisions A 及 B)。Division A 包括人類、香蕉、香瓜、西瓜、蕃茄及蕃薯的 EF 核酸序列其相似度 97 %；Division B 只有 FDS2-FO-EF 之分離株其相似度 50 %。結果證明不同來源鐮孢菌 EF 核酸序列可分為 2 個群族 (Divisions)，而 EF 核酸序列之差異應可鑑別 FDS2-FO-EF 之分離株 (圖二)。結果可發現宿主間可分成二群，但宿主間的差異性小，除 FDS2-FO-EF 之菌株有較大差異之外，其它宿主不符合預期。但多序列比對仍然有差異，希望依據有差異的地方開發生物晶片且預測反應型(Pattern)之結果得到宿主間的差異(表五 B)。

四、Fusarium Osmotin Resistance (FOR3) 基因序列之相似度分析

利用 FOR3 引子組對 6 株不同來源 *Fusarium* 分離株進行 PCR 分析，其中的 5 株分離株可增幅出 700 bp 的基因片段 (圖三)。選殖及定序後，此序列以 NCBI 之 BLAST 軟體分析可搜尋出相似度較高之序列(*Gibberlla*、*Nectria*、*Magnaporthe*、*Colletotrichum*、*Myceliophthora*)，進一步以多序列分析軟體 ClustalW 分析菌株間 FOR3 基因的相似度，結果可區分為 8 個群組 (Divisions A、B、C、D、E、F、G 及 H)。其中的五株菌株可區分成 Division A 包括 *Fusarium oxysporum f. sp. decemcellulare* (FDS1) 及 *Fusarium*

oxysporum f. sp. decemcellulare (FDS2) 其相似度 100% 與 *Nectria* 的 Division B 其相似度 86% ; Division C 只有 *Fusarium oxysporum f. sp. mangiferae* (FM) 與 *Fusarium oxysporum f. sp. tomato* (FOTO) 及 *Fusarium oxysporum f. sp. cucumber* (FOCU) 的 Division D 其相似度 96% ; Division D 包括 *Fusarium oxysporum f. sp. tomato* (FOTO) 及 *Fusarium oxysporum f. sp. cucumber* (FOCU) 其相似度 99% 與 *Gibberella* 的 Division E 其相似度 80% (圖四)。由此結果可發現宿主間比對後並無太大的差異，不符合預期。宿主間的分化型並無相關性，希望可在收集更多的資料來達到宿主之間的差異。但多序列比對之結果仍有差異，希望依據有差異的地方開發生物晶片且預測反應型(Pattern)之結果得到宿主間的差異(表五 C)。

五、 Internal Transcribed Spacer (ITS) 核酸序列之相似度分析

本研究參照 NCBI 搜尋作物的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 分離菌株之 ITS 核酸序列，將相似度較高之序列建置小型資料庫 (共 10 筆)，然後以多序列分析軟體 Clustal W 進行親緣關係分析，結果可將小型資料庫區分為 3 個群組 (Divisions A、B 及 C)。Division A 包括蘿蔔及蕃薯的 ITS 核酸序列其相似度為 99% ; Division B 只有蕃茄的 ITS 核酸序列其相似度 99% ; Division C 包括西瓜、香蕉、香瓜其相似度為 99%。結果可證明不同來源鐮孢菌 ITS 核酸序列可分為 3 個群組，而 ITS 核酸序列之差異應可鑑別宿主來源為瓜類、香蕉、蘿蔔、蕃薯及蕃茄之分離菌株 (圖五)。結果可發現以 ITS 核酸序列之宿主雖可分成三群，但宿主之間的差異性小，不如預期。但多序列比對仍然有差異，希望依據有差異的地方開發生物晶片且預測反應型(Pattern)之結果得到宿主間的差異。(表五 D)

六、生物晶片之設計

不同菌株之 FOR 核酸序列與其它 5 筆 FOR 核酸序列進行多序列比對，可得到多序列比對結果(圖六)。圖六 (A 及 B) 之結果顯示在不同區域都有特異性序列存在，分別設計 13 個測試點，理論上這些測試點對 Apple、Wheat、Paddy 及 Cantaloupe 等宿主分離株進行生物晶片分析時將可產生特定的反應型(Pattern) (圖六 A 及圖六 B)。EF 的部分以 NCBI 搜尋作物的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 分離菌株之 EF 核酸序列將相似度較高之序列建置小型資料庫，分析 17 筆 EF 核酸序列進行多序列比對，可得到多序列比對結果(圖七)。圖七之結果顯示在不同區域都有特異性序列存在，分別設計 8 個測試點，理論上這些測試點對 Tomato、Banana、Sweet potato、Melon、Radish、FDS2-EF 等宿主分離株進行生物晶片分析將可產生特定的反應型(Pattern) (圖七)。ITS 的部分以 NCBI 搜尋作物的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 分離菌株之 ITS 核酸序列將相似度較高之序列建置小型資料庫，分析 10 筆 ITS 核酸序列進行多序列比對，可得到多序列比對結果(圖八)，圖八 (A、B 及 C) 之結果顯示在不同區域都有特異性序列存在，分別設計 17 個測試點，理論上這些測試點對 Tomato、Banana、Sweet potato、Melon 及 Radish 等宿主分離株進行生物晶片分析將可產生特定的反應型(Pattern) (圖八 A、圖八 B 及圖八 C)。最後 BT2 的部分以 NCBI 搜尋作物的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 分離菌株之 BT2 核酸序列將相似度較高之序列建置小型資料庫，分析 11 筆 EF 核酸序列進行多序列比對，可得到多序列比對結果(圖九)，圖九之結果顯示在不同區域都有特異性序列存在。分別設計 8 個測試點，理論上這些測試點對 Tomato、Banana、Sweet potato、Melon 及 Radish 等宿主分離株進行生物晶片分析將可產生特定的反應型(Pattern) (圖九)。以上測試點的溫度均控制在 55 °C 到 58 °C(表四)。

八、引子組設計

利用 NCBI 之 nucleotide 網頁搜尋 *Fusarium oxysporum f.sp.* 核酸序列並用 Blast 比對出適當的核酸序列 JN995193-EF-30 (圖十)，圖中黑框所標示的區域為引子組設計之範圍。其中 FOR3 基因是參考 Hyeseung Lee (2010) 文獻中所設計之序列，委託源資生物科技股份有限公司合成引子。然而本次研究所使用菌株數量太少，導致多組引子的結果無法出現專一性條帶，本次設計的引子最多只能用來做測試菌株之用，並不能代表本次所設計的引子於其它菌株無法增幅出同等大小之條帶。測試的引子序列由 NCBI 資料庫中所比對出來之核酸序列，宿主來源有瓜類(西瓜及香瓜)、花卉(蘭花及百合)、球根(蕃薯)等相關致病性菌株應可偵測瓜類、花卉及球根的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 之菌株，同時希望可以偵測本次研究的 6 株菌株，但結果卻不如預期，引子名稱及序列特性請參照附錄二。因此本次所設計的引子，如要能在 6 株菌株之核酸序列能有顯著表現，可能須重新設計引子或再收集其它相關致病性基因序列做進一步的檢測，再者收集其它相關致病性的 *Fusarium oxysporum f. sp.* 之菌株，並萃取出 DNA 進行 PCR 的測試。要在短時間內收集不同來源之菌株樣品在作業上有些許困難，因此透過 NCBI 先找尋不同來源的鐮孢菌之核酸序列係以分析多序列比對相似度。無法批出專一條帶在其它文獻有發現，因為宿主與病原菌會進行相互作用可能導致基因編碼變異甚至有些毒力因子的傳播使宿主加速死亡，如有性生殖或是有兩個以上的細胞核會造成基因重組而使菌種受到牽連而進化，有一些鐮孢菌種所使用的 rRNA 分析親緣性關係也可能是有多種非同源性的菌種存在(Gerda et al., 2009)。另一種可能由於 ITS 核酸序列編碼變異性相當大，很可能因為單一編碼不同而導致在 PCR 增福時無法順利得到所需要的大小 (Ali Rezaei et al., 2012)。因此可以從 ITS 的序列變化進行觀察利用 IUPAC 的編碼以重新設計引子組 (Hans et al., 2009)。如果菌株為有性

世代就會進行有絲分裂造成基因序列重組使基因編碼在短時間內有所改變，有其它文獻指出 DNA 序列中 ITS 區域的基因已有被證明在鐮孢菌的發育系統中為無效系統，即使再其它的真核菌種分類群有成功檢測出 ITS 相關信息 (Gayatri et al., 2009)。然而，有的基因位點突變性相當高，IGS 就是一種。IGS 基因存在於 *Fusarium oxysporum f. sp.* 的 intron 位置中因保留性高，相對的突變性高所以在 PCR 複製偵測時無法順利表現該序列應該有的條帶大小 (José et al., 2010)。利用 ribosomal RNA 序列分析 *Fusarium oxysporum f. sp.* 菌株的不同，但結果顯示每種菌株都有不同的生理發育，其宿主也不同，而 *Fusarium oxysporum f. sp.* 會分支並對應在不同的宿主上，且型態都有些微的差異，因此表明了有些菌株的核酸序列會獨立替換，且自行發展親緣性關係，以 DNA 序列分析親緣性是不可或缺的方法 (Hans et al., 2009)。

本次研究只使用 PCR 及 MSA 分析 *Fusarium oxysporum f. sp.* 之菌株間的差異性所以使用方法也不多，日後可以繼續嘗試其它方法或是朝向設計生物晶片中的寡核苷酸晶片做大量的菌種鑑定以及前言所提到的 REMI 方法。REMI 方法是攜帶 DNA 中的限制性內切酶的在真菌體內進行作用，並以內切酶做標記。然而 REMI 毒力突變體很大，約 30%-50% 尚未標記的轉型內切酶而以 DNA 整合並不是完全隨機的，該基因區域會呈現轉錄性高的基因區域。另外有插入誘導的方法其最大的優點是可以完整的將真菌的細胞插入原生質體中，可順利大量複製 DNA 因可得到較高的數量，有利於後續的轉型實驗及便於標記的辨識，而近年研究發現此方法可以針對插入開放閱讀框架之區域或是啟動子區域 (Manuel et al., 2009)。

肆、文獻

1. 藍清隆。2006。作物镰孢萎凋病菌之快速檢測。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會。75-81 頁。
2. 路光暉。2004。生物晶片在防疫檢疫害蟲鑑定上之應用。物重要防疫檢疫害蟲診斷鑑定研習會專刊。119-125 頁。
3. 黃莉嫻。2003。以核糖體核酸基因內轉錄區之序列鑑定臨床黴菌。國立成功大學碩士論文。91 頁
4. 黃振文。2002。镰孢菌的分類系統概論。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會刊。208-244 頁。
5. 謝廷芳。1998。菌核類真菌之鑑定。檢疫防疫植物病原真菌鑑定研討會專刊 239-251 頁。
6. 蔡文城。2006。臨床微生物學。九洲圖書文物有限公司出版。1107-1142 頁。
7. 陳冠名。2005。生物晶片技術產學合作在動植物疾病害蟲診斷研發之探討。松山工農學報。73-88 頁。
8. Ali Rezaei-Matehkolaei., Koichi Makimura., Sybren de Hoog.G., Mohammad Reza Shidfar., Kazuo Satoh., Mohammad Javad Najafzadeh and Hossein Mirhend. 2012. Multilocus differentiation of the related dermatophytes *Microporum canis*, *Microporum ferrugineum* and *Microporum audouinii*. *J Med Microbiol* vol. 61: 1 57-63
9. Christina M Scheel., Steven F Hurst., Gloria Barreiros., Tiayomi Akiti., Marcio Nucci and S Arunmozhi Balajee., 2013. Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. *BMC Infectious Diseases* , 13:49

doi:10.1186/1471-2334-13-49.

10. Charles B Epstein and Ronald A Butow. 2000 .Microarray technology — enhanced versatility, persistent challenge. *Biotechnology*. 11:36–41.
11. Coleman Jeffrey J., Muhammed Maged ., Kasperkovitz Pia V., Vyas Jatin M. and Eleftherios Mylonakis., 2011. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol*. 115(12): 1279–1289.
12. Gayatri Gurjaevr., Maneesha Barve., Ashok Giri., Vidya Gupta., 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia*. 101(4):484-95.
13. Genin, S., and Boucher, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol*. 42:107-34.
14. Gerda Fourie., Steenkamp E. T., Gordon T. R. and A. Viljoen. 2009. Evolutionary Relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* Vegetative Compatibility Groups. *Appl Environ Microbiol*. 75(14): 4770–4781.
15. Hans-Josef Schroers., Kerry O'Donnell., Sandra C. Lamprecht., Patricia L. Kammeyer Stuart Johnson., Sutton. Deanna A., Rinaldi. Michael G., Geiser. David M. and Summerbell. Richard C. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia*. 101(1):44-70.
16. Hyeseung Lee., Barbara Damsz., Woloshuk Charles P., Bressan Ray A. and Narasimhan Meena L. 2010. Use of the plant defense protein osmotin to identify *Fusarium oxysporum* genes that control cell wall Propertie. *Eukaryotic Cell*. 9(4):558. DOI: 10.1128/ED.00316-09.
17. James RA., Davenport RJ., Munns R. 2006. Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiol*.

142(4):1537-47.

18. José J. de Vega-Bartol., Raúl Martín-Dominguez., Brisa Ramos., María-Asunción García-Sánchez., and José María Díaz-Mínguez. 2010. New Virulence Groups in *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*: The Expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology*. 101:470-479.
19. Kamalika Banerjee., Utkarsh Gupta., Sanjay Gupta., Sanjeev Kumar Sharma., Chakresh Kumar Jain., 2011. Functional co-evolutionary study of glucosamine-6-phosphate synthase in mycoses causing fungi. *Bioinformation*. 7(1):5-8.
20. Lin Ying-Hong. , Chang Jing-Yi ., Liu En-Tzu ., Chao Chih-Ping ., Huang Jenn-Wen and Chang Linda Pi-Fang . 2009. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology* Volume 123, Issue 3: pp 353-365
21. Lin Ying-Hong., CHEN Kan-Shu, LIOU Tsung-Dao, HUANG Jenn-Wen and CHANG Pi-Fang Linda. 2009 .Development of a molecular method for rapid differentiation of watermelon lines resistant to *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*. *Botanical Studies* 50: 273-28
22. Lian, Z., Frank, J. V., Yong, Q. H., Bo. L. J., Ji, L. T., Yuquan, X., Alfred, P. and Ya, W. H. 2011. Gene discovery by genome-wide CDS re-prediction and microarray-based transcriptional analysis in phytopathogen *Xanthomonas campestris*. *BMC Genomics*. 12:359.
23. López-Berges MS., DI Pietro A., Daboussi MJ., Wahab HA., Vasnier C., Roncero MI., Dufresne M., Hera C. 2009. Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* by large-scale transposon

tagging. Mol Plant Pathol. 10(1):95-107. doi:
10.1111/j.1364-3703.2008.00512.

24. Mee Kum Kim., Joo Youn Oh., Jung Hwa Ko., Hyun Ju Lee., Jin Ho Jung., Won Ryang Wee., Jin Hak Lee., Chung-Gyu Park., Sang Joon Kim., Curie Ahn., Seung-Jun Kim and Seung Yong Hwang. 2009. DNA Microarray-Based gene expression profiling in porcine keratocytes and corneal endothelial cells and comparative analysis associated with Xeno-related Rejection. J Korean Med Sci ; 24: 189-96 J Korean Med Sci. 24(2): 189–196. doi: 10.3346/jkms.2009.24.2.189
25. Melissa, S. and Chris, U. 2012. Bioinformatics for Analysis of Poxvirus Genomes. Vaccinia Virus and Poxvirolog. Methods Mol Biol. 890:233-58. doi: 10.1007/978-1-61779-876-4_14.
26. Manuel S. López-Berges., Javier Capilla., David Turrà., Lukas Schafferer, Sandra Matthijs., Christoph Jöchl., Pierre Cornelis., Josep Guarro., Hubertus Haas and Antonio Di Pietro. 2012. HapX-Mediated Iron Homeostasis Is Essential for Rhizosphere Competence and Virulence of the Soilborne Pathogen *Fusarium oxysporum*. The Plant Cell. Vol. 24: 3805–3822.
27. Amatulli M. T., Spadaro D., Gullino M. L., Garibaldi A. 2010 .Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. Plant Pathology Vol. 59 5: 839–844.
28. Patiño B., Mirete S., González-Jaén M.T., Mulé G., Rodríguez M.T. and Vázquez C. 2004. PCR Detection Assay of Fumonisin-Producing *Fusarium verticillioides* Strains. Journal of Food Protection Vol. 67: 1278-1283.

29. Prof. Venkat Narayana Rao T., Sai Sukruthi.G and Gloria Raj. 2012. Biochip Technology –A Gigantic Innovation. IJETAE .Volume 2, Issue 3 : 2250-2459.
30. Romberg, Mk and Davis, Rm. 2007. Host Range and Phylogeny of *Fusarium solani f. sp. eumartii* from Potato and Tomato in California. Plant disease: an international journal of applied plant pathology 91(5): 585-592.
31. Tuan Vo-Dinh and Brian Cullum. 2000. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics . Fresenius J Anal Chem . 366 :540–551.
32. Visentin I, Tamietti G, Valentino D, Portis E, Karlovsky P, Moretti A, Cardinale F. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. Mycol Res. 1137-45.



圖表

表一、 NCBI資料庫中不同鐮孢菌菌株之ITS序列及其相關資料。

菌種名	註冊碼	宿主	來源
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	EF590328	Banana	USA
<i>Fusarium oxysporum f. sp. melonis</i>	DQ016233	Melon	USA
	FR852561		Italy
<i>Fusarium oxysporum f. sp. raphani</i>	GU001862	Radish	Italy
	GQ914739		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. batatas</i>	DQ831895	Sweet potato	USA
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	DQ452455	Tomato	Korea
	DQ452454		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. niveum</i>	EU588397	Water melon	China
	JQ045291		

表二、NCBI資料庫中不同鐮孢菌菌株之EF序列及其相關資料。

菌種名	註冊碼	宿主	來源
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	AF008488	Banana	South Africa
	AF008494		USA
	AF008492		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. melonis</i>	HE585983	Melon	Italy
	HE585984		USA
	DQ837696		
Fusarium oxysporum strain	FJ985660	Human	USA
	GU170564		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. raphani</i>	AB674271	Radish	Japan
	FJ985441		USA
<i>Fusarium oxysporum f. sp. batatas</i>	FJ985368	Sweet potato	USA
	FJ985352		
	AY337717		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	DQ452431	Tomato	Korea
	JQ965461		China
<i>Fusarium oxysporum f. sp. niveum</i>	FJ985410	Water melon	USA
	FJ985278		

表三、NCBI資料庫中不同鐮孢菌菌株之BT2序列及其相關資料。

菌種名	註冊碼	宿主	來源
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	AF008529	Banana	USA
	AF008521		
	AF008525		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. melonis</i>	AF008539	Melon	USA
	AF008524		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. raphani</i>	AB587041	Radish	Japan
	JQ965486		China
	JQ965493		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. batatas</i>	AF008519	Sweet potato	USA
	AY337716		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	AY641578	Tomato	Israel

表四、寡核苷酸生物晶片之設計。

測試點	序列	熔點(Tm)
BT2-5	GCT CAC AAT GTC CTG ATC ATG CG	57
BT2-7	ACC TCC AGA CCG GTC AGT GC	57
BT2-57	TCG GTG CTG CTT TCT GGC AAA CC	58
BT2-105	GAC AGC AAT GGT GTC TAC AAC GGT	57
BT2-170	CTG CTG ATT TCC GCA ACG GTC	56
BT2-241	GCG GGG GAT GCT CAC AAT GTT TAT	57
BT2-303	TGG AAA CAA CTG GGC CAA GGG T	56
BT2-340	GTG TCT ACT TCA ACG AGG TAT GC	55
EF-30	CCA GCA TGC TGA GAC TCG C	55
EF-52	CGA CCA CTG TGA GTA CTC TCC T	56
EF-70	GCA CCA TCT GCT CGA CCC TC	57
EF-145	TTT GCA TCC TCG TCG TTG AAG CC	57
EF-162	GTC AAC ATA CTG ACA TCG TTT CAC AGA	56
EF-305	GCT ACC CCG CTC GAG ACC	57
EF-363	GCG TTT GCC CTC TTA ACC ATT CTC	57
EF-519	ACG CGC TGG GTT GCT TGA C	55
FOR-1	AGT TCA CTG TGA CCA GCT ACC TCT	57
FOR-25	ATC CCT GAG TGG GGA TTC GAG	56
FOR-30	TGG GGA TTC GAG AAG CGA GTT C	56
FOR-66	TTC GAG AAG CGA GTC CAT TGC GAT	57
FOR-80	TGG GGC TTC GAG AAG CGA GTC	58
FOR-178	CGC ATC CAT CCG ACA CTC AAA TG	57
FOR-181	ATC GAT CCG GGC ATC AAA TGC CC	58
FOR-271	GAC AAC GTG TCC GAT AAT GCG TC	57
FOR-300	GAC AAC GTG TCC GAT AAT GCG TC	57
FOR-390	CGC GGA TGC GGC CGG T	56
FOR-425	CGG TCG AGC CGG CAG AGA	57
FOR-429	CGT GGC AGA GGC TGT TGA G	55
FOR-430	CCG TCA CGG ATG CTG TTG AGA	56
ITS-15	GGT TTC CGG TAG GTG AAC CTG AC	58
ITS-60	GTT TTA ACA TAC CAC TGA ATG TTG CGG A	57
ITS-62	AGT TTC ATC ATT ACC GAG TTG CGA TTT	55
ITS-87	ATC AGG CCC GGC CGG G	56
ITS-229	CCA ACG GTA CCA GCA AAA TGT TGG	57

ITS-308	AGG GTC CAG GGT AGG TAC AG	55
ITS-335	CGC GTT AAT TCG GCC GTT CCT C	58
ITS-366	CTT GGT GGA ATT CCG TCG ATA GGA	57
ITS-651	ATG CGA GCG GTG TAG GGT AGG	58
ITS-381	CGT GCA ACC CTC AAG CAC AG	55
ITS-409	GCT TCC ATA GCG TGT CCA GTA GT	57
ITS-515	GGA TGA ATA CCC GCT GGC TAG	56
ITS-830	CTC GGG CCA GTA CTT GTC TGG	58
ITS-1010	GCC GGG TAG GTA AAA GTA AAA AAG TTG	56
ITS-1779	GCC ACG GAC CTC GCA TGA C	57
ITS-2100	CCT CGG CAG CGG GGG G	58
ITS-2216	CCG CTA GCA GAT GGG CTC TG	57

以NCBI生物資訊軟體搜尋不同來源鐮孢菌之基因序列，多序列比對後將有差異之部分計做為生物晶片之應用，溫度皆控制在55°C到58°C。

表五A、BT2測試點對不同分宿主離株之雜合反應型。

宿 主 測 試 點	Banana	Melon	Radish	Sweet potato	Tomato
*BT2-5	-	-	+	-	-
BT2-7	-	-	-	+	-
BT2-57	-	-	+	-	-
BT2-105	-	-	+	-	-
BT2-170	-	-	-	-	+
BT2-241	-	-	-	+	-
BT2-303	-	-	-	-	+
BT2-340	-	-	-	+	-

+：雜合後為陽性反應 -：雜合後陰性反應

*(BT2-5= 基因-序列位置)

表五B、EF測試點對不同宿主分離株之雜合反應型。

宿 主 測 試 點	Banana	FDS2-EF	Human	Melon	Radish	Sweet potato	Tomato	Water melon
*EF-30	-	+	-	-	-	-	-	-
EF-52	-	-	+	-	-	-	-	-
EF-70	-	-	+	-	-	-	-	-
EF-145	-	-	-	-	-	+	-	-
EF-162	-	+	-	-	-	-	+	-
EF-305	-	-	-	+	-	-	-	-
EF-363	-	-	-	-	-	-	-	-
EF-519	-	-	-	-	-	-	-	-

+：雜合後為陽性反應 -：雜合後陰性反應

*(EF-30= 基因-序列位置)

表五 C、FOR 測試點對不同宿主分離株之雜合反應型。

宿主 測試點	Apple	Cantaloupe	Cucumber	Mango	Paddy	Tomato	**Unknown	** Unknown	** Unknown	Wheat
*FOR-1	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
FOR-25	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
FOR-30	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
FOR-66	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
FOR-80	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
FOR-178	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
FOR-181	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
FOR-271	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
FOR-300	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
FOR-390	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
FOR-425	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FOR-429	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
FOR-430	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+：雜合後為陽性反應 -：雜合後陰性反應

*(FOR-1= 基因-序列位置)

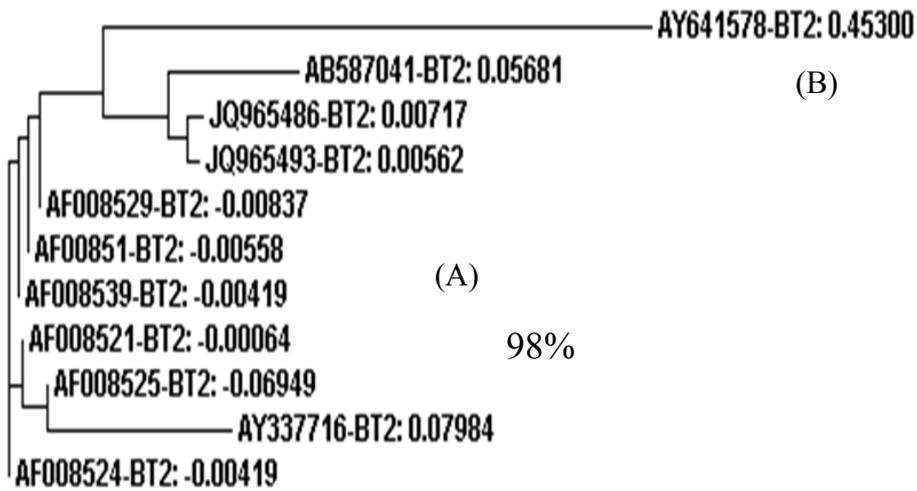
** (宿主尚未確定)

表五 D、ITS 測試點對不同宿主分離株之雜合反應型。

測試點 \ 宿主	Banana	Melon	Radish	Sweet potato	Tomato	Water melon
*ITS-15	+	-	-	-	-	-
ITS-60	-	+	-	-	-	-
ITS-62	-	-	+	-	-	-
ITS-87	-	+	-	-	-	-
ITS-229	-	+	-	-	-	-
ITS-308	-	-	-	+	-	-
ITS-335	-	+	-	-	-	-
ITS-366	-	-	+	-	-	-
ITS-381	-	+	-	-	-	-
ITS-409	-	+	-	-	-	-
ITS-515	-	+	-	-	-	-
ITS-830	-	-	+	-	-	-
ITS-1010	-	-	+	-	-	-
ITS-1779	-	-	+	-	-	-
ITS-2100	-	-	+	-	-	-
ITS-2216	-	-	+	-	-	-

+：雜合後為陽性反應 -：雜合後陰性反應

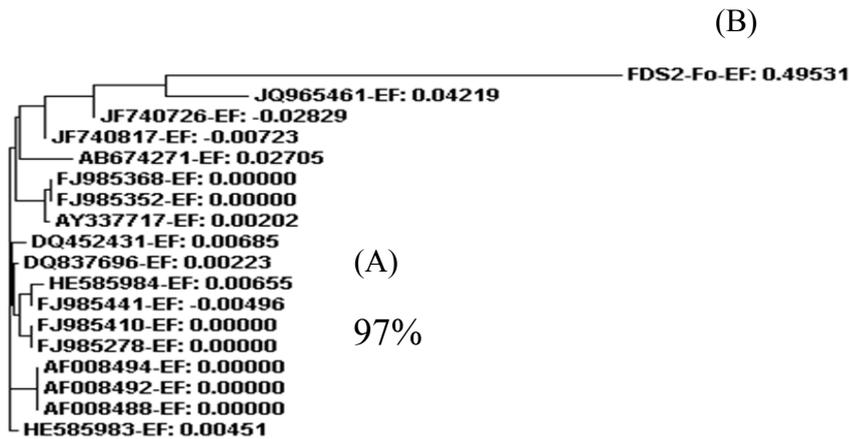
*(ITS-15= 基因-序列位置)



圖一、作物所分離*Fusarium*菌株的BT2核酸序列之相似度分析。

本親緣關係分析圖是不同來源鐮孢菌之BT2核酸序列，可區分為二個群組 (Divisions)。以蕃薯、香蕉、香瓜等12個分離菌株其相似度98%；蕃茄分離菌株其相似度45%。

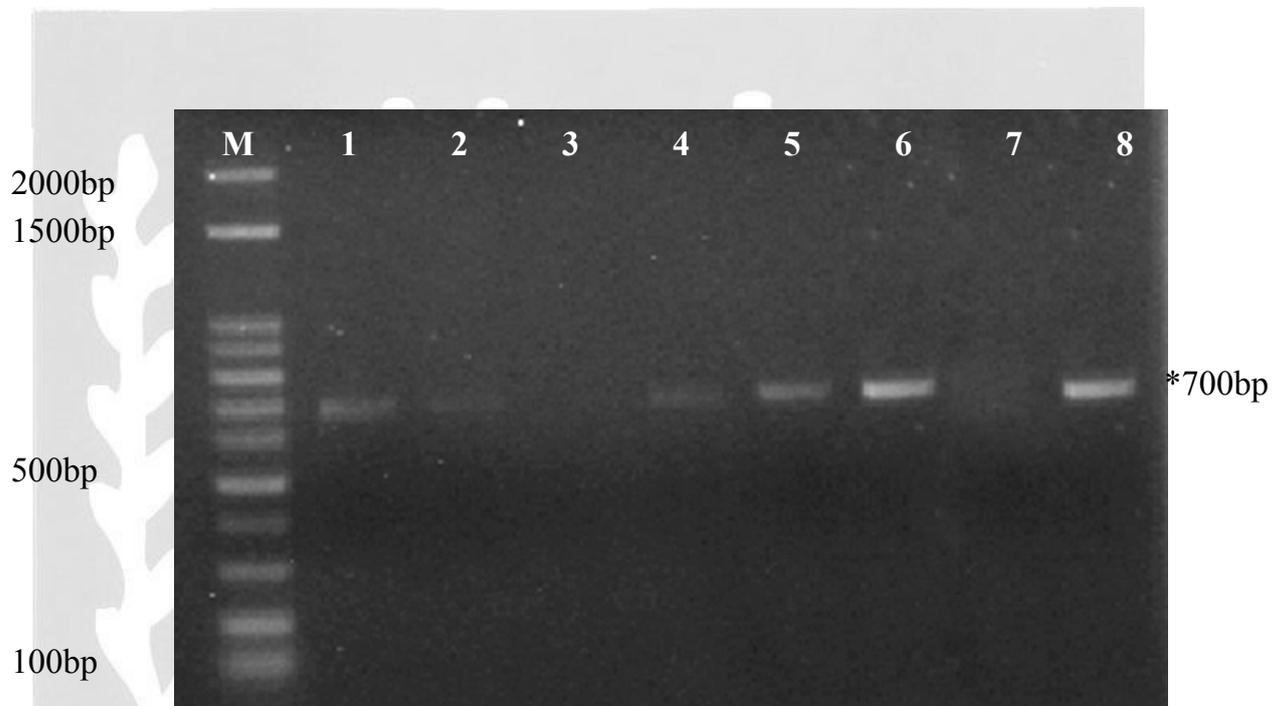
(註冊碼 AY641578 宿主為蕃茄、註冊碼 AF008529、AF008521 及 AF008525 宿主為香蕉、註冊碼 AF008519 及 AY337716 宿主為蕃薯、註冊碼 AF008539 及 AF008524 宿主為香瓜、註冊碼 AB587041、JQ965486 及 JQ965493 宿主為蘿蔔)



圖二、作物所分離 *Fusarium* 菌株的 EF 核酸序列之相似度分析。

本研究中 17 共有筆 *Fusarium* spp. 之 EF 基因序列，包括筆 3 香蕉分離株、2 筆蘿蔔分離株、3 筆蕃茄分離株、3 筆蕃薯分離株、3 筆香瓜分離株、2 筆西瓜分離株及 1 筆 FDS2-Fo-EF 基因序列，統整後以多序列比對軟體 ClustalW 分析其相似度。本親緣關係分析圖可區分為二個群組(Divisions)。人類、蕃茄、蘿蔔、蕃薯及香蕉分離株其相似度 97%，而 FDS2-Fo-EF-F 基因序列與其他分離株之相似度較低。

(註冊碼 DQ452431 及 JQ965461 宿主為蕃茄、註冊碼 AF008488、AF008494 及 AF008492 宿主為香蕉、註冊碼 FJ985368、FJ985352 及 AY337717 宿主為蕃薯、註冊碼 DQ837696、HE585983 及 HE585984 宿主為香瓜、註冊碼 FJ985410 及 FJ985278 宿主為西瓜、註冊碼 AB674271 及 FJ985441 宿主為蘿蔔、註冊碼 JF740726 及 JF740817 宿主為人類)
(FDS2-FO-EF:0.49531 中的 0.49531 為生物的演化距離)



圖三、不同來源之 *Fusarium* 染色體 DNA 以 FOR3-F 及 FOR3-R 引子組所進行之 PCR 增幅。

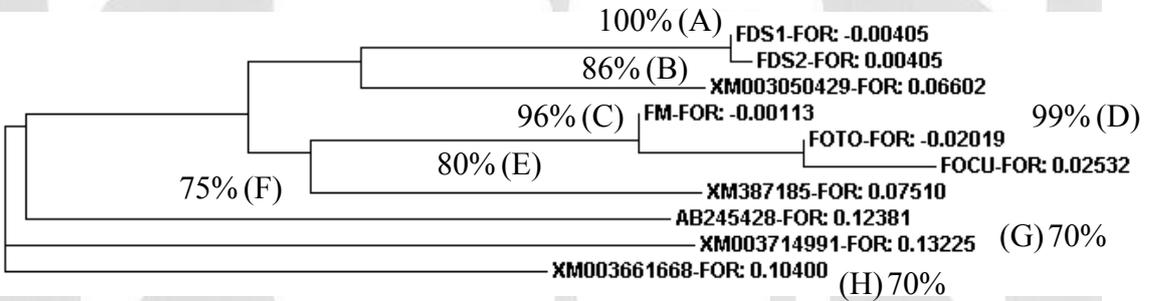
測試材料代號分別為 Lane1:FDS1、Lane2:FDS2、Lane3:FDS3、Lane4:FM、Lane5:F0to、Lane6:F0cu、Lane7:Negative control、Lane8:Positive control、Lane M:100 bp DNA marker。

* Lane1:FDS1、Lane2:FDS2、Lane4:FM、Lane5:F0to、Lane6:F0cu 等樣品以 PCR 增幅可產生 700bp 的條帶，表示菌株有 FOR 之基因序列。

```

XM003714991-FOR      AGGAGAAACGTGTTCTTGGAGCTATACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTACGTGC 91
XM003661668-FOR      AGGAGAAAGAGGATTCCTGGAGCTCTACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTACGTGC 91
AB245428-FOR         AGGAGAAAGCGATTCCTGGAGCTCTACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTACGTGC 91
FDS1-FOR             AGGAGAAAGCGATTCCTGGAGCTCTACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTITGTC 78
FDS2-FOR             AGGAGAAAGCGATTCCTGGAGCTCTACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTITGTC 78
XM003050429-FOR      AGGAGAAAGCGGTTCTTGGAGCTTAACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTITGTC 86
FOTO-FOR             AGGAGAAAGCGGTTCTTGGAGCTTAACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTITGTC 86
FOCU-FOR             AGGAGAAAGCGGTTCTTGGAGCTTAACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTITGTC 120
FM-FOR              AGGAGAAAGCGGTTCTTGGAGCTTAACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTITGTC 91
XM387185-FOR         AGGAGAAAGCGGTTCTTGGAGCTTAACTGGGAGAAAGGGCGTTCAGGCTCGGCTTITGTC 91
* * * * *
XM003714991-FOR      CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 151
XM003661668-FOR      CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 151
AB245428-FOR         CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 151
FDS1-FOR             CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 151
FDS2-FOR             CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 138
XM003050429-FOR      CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 151
FOTO-FOR             CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 146
FOCU-FOR             CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 180
FM-FOR              CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 121
XM387185-FOR         CGGAAAGACGAGGTTCCCAAGGCTGCCGCTCACAGCGTGTCAACACGCGCATGGCGGCTG 151
* * * * *
XM003714991-FOR      CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 211
XM003661668-FOR      CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 211
AB245428-FOR         CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 211
FDS1-FOR             CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 211
FDS2-FOR             CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 198
XM003050429-FOR      CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 211
FOTO-FOR             CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 206
FOCU-FOR             CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 240
FM-FOR              CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 181
XM387185-FOR         CACGTCATGCAAGGAGGAGCCACAGCGGCGCAAGAAAGGAGCGGAGAGGCTACCGCCAAAG 211
* * * * *
XM003714991-FOR      AGACCGGAGACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 271
XM003661668-FOR      AGACCGGAGACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 271
AB245428-FOR         AGACCGGAGACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 271
FDS1-FOR             AGACCGGATACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 271
FDS2-FOR             AGACCGGATACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 258
XM003050429-FOR      AGACCGGATACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 271
FOTO-FOR             AGACCGGATACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 266
FOCU-FOR             AGACCGGATACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 300
FM-FOR              AGACCGGATACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 241
XM387185-FOR         AGACCGGATACCGGCACTATTTCACCGATGACGTTGATGCGCTCTTTCAGCAGCATGAGG 271
* * * * *

```

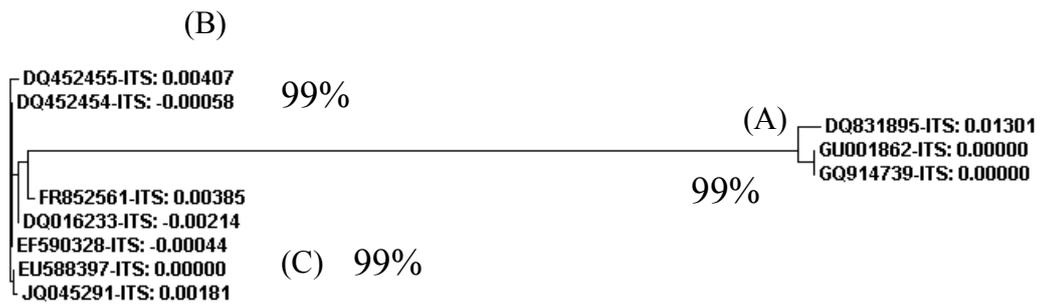


圖四、不同來源 *Fusarium* 之 FOR3 基因序列以多序列比對軟體所進行之相似度分析。

本研究中共有 6 株 *Fusarium spp.*，其中 5 株可複製出 FOR3 之基因序列，定序後以 NCBI 資料庫 BLAST 相似度較高之序列(*Gibberlla*、*Nectria*、*Magnaporthe*、*Colletotrichum*、*Myceliophthora*)，然後再以比對軟體 ClustalW 分析產生八個群組(Divisions)。A 組: *Fusarium oxysporum f. sp. decemcellulare* (FDS1)、*Fusarium oxysporum f. sp. decemcellulare* (FDS2) 其相似度 100% B 組:只有 *Nectria* 其相似度 86% C 組:只有 *Fusarium oxysporum f. sp. mangiferae* (FM) D 組: *Fusarium oxysporum f. sp. tomato* (FOTO)及 *Fusarium oxysporum f. sp. cucumber* (FOCU) E 組:只有 *Gibberlla* 其相似度 80% F 組:只有 *Colletotrichum* 其相似度 75% G 組:只有 *Magnaporthe* 其相似度 70% H 組:只有 *Myceliophthora* 其相似度 70%。

(註冊碼 XM003050429 : *Nectria*、註冊碼 XM387185 : *Gibberlla*、註冊碼 AB245428 : *colletotrichum*、註冊碼 XM003714997 : *Magnaporthe*、註冊碼 XM003661668 : *Myceliophthora*)

(FDS1-FOR:0.00405 中的 0.00405 為生物的演化距離)

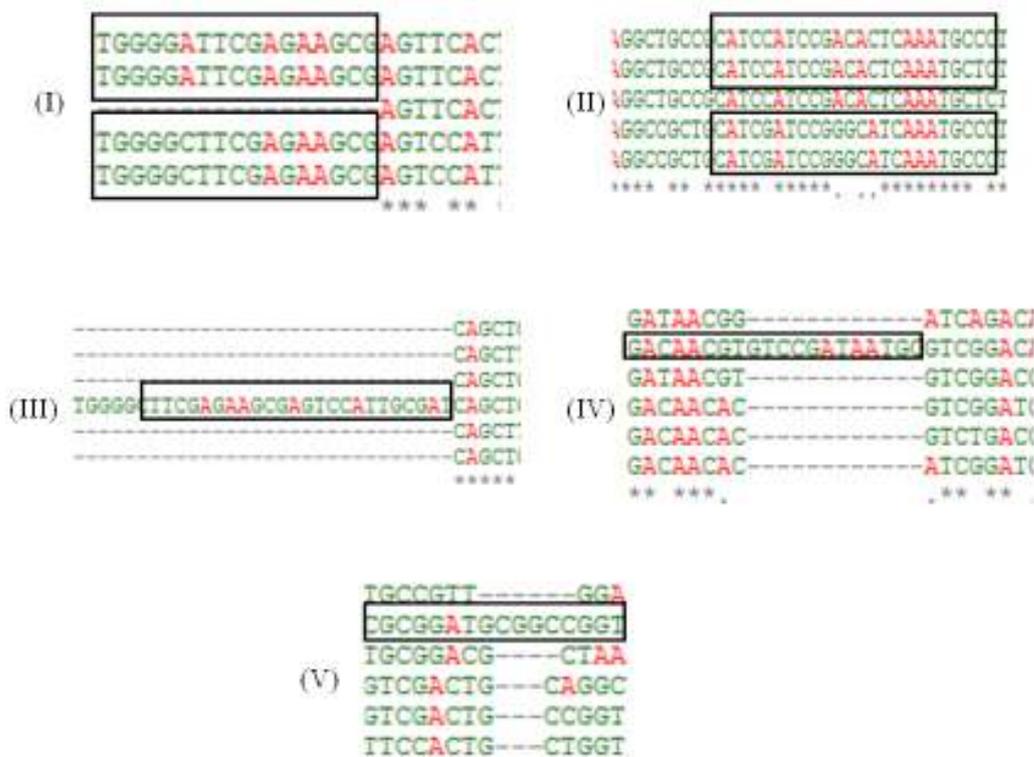


圖五、作物所分離*Fusarium*菌株的ITS核酸序列之相似度分析。

本親緣關係分析圖是不同來源鐮孢菌之ITS核酸序列，可區分為三群組 (Divisions)。以蘿蔔及蕃薯等3株分離菌株相似度為99%；蕃茄的ITS序列相似度為99%；西瓜、香蕉、香瓜的ITS序列相似度為99%。

(註冊碼 DQ452455 及 DQ452454 宿主為蕃茄、註冊碼 EF590328 宿主為香蕉、註冊碼 DQ831895 宿主為蕃薯、註冊碼 DQ016233 及 FR852561 宿主為香瓜、註冊碼 EU588397 及 JQ045291 宿主為西瓜、註冊碼 GU001862 及 GQ914739 宿主為蘿蔔)

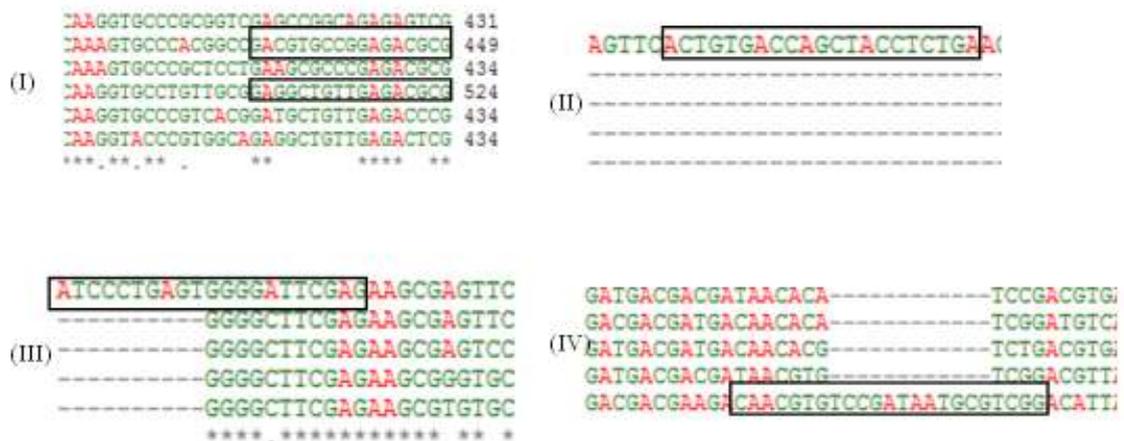
(DQ452455-ITS:0.00407 中的 0.00407 為生物的演化距離)



圖六 A、FOR 基因之多序列比對及測試點所在位置。

利用生物資訊軟體 ClustalW 分析核酸序列，將有特異序列插入、缺失及取代，可利用此差異性片段序列來設計生物晶片。可做為生物晶片之應用鑑別菌株之不同。

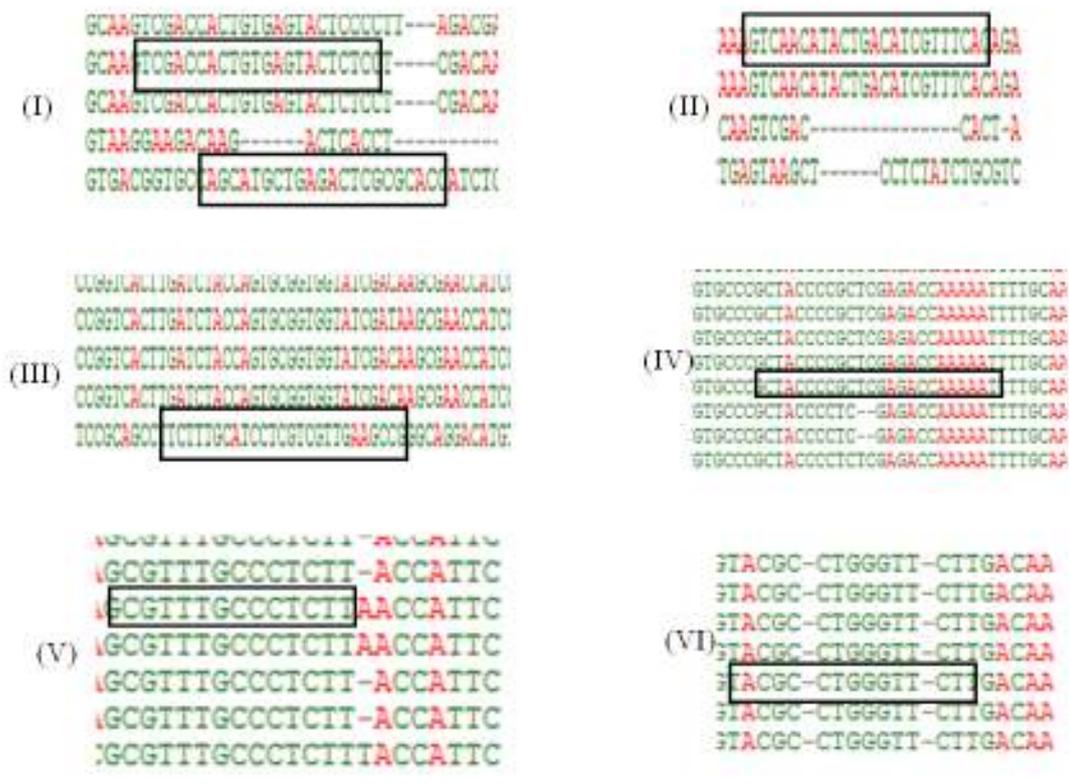
(圖 I 黑框處為 FOR-30 及 FOR-80 測試點之位置、圖 II 黑框處為 FOR-181 及 FOR-178 測試點之位置、圖 III 黑框處為 FOR-66 及 FOR-271 測試點之位置、圖 IV 黑框處為 FOR-390 測試點之位置、圖 V 黑框處為 FOR-429 測試點之位置、)



圖六 B、FOR 基因之多序列比對及測試點所在位置。

利用生物資訊軟體 ClustalW 分析核酸序列，將有特異序列插入、缺失及取代，可利用此差異性片段序列來設計生物晶片。可做為生物晶片之應用鑑別菌株之不同。

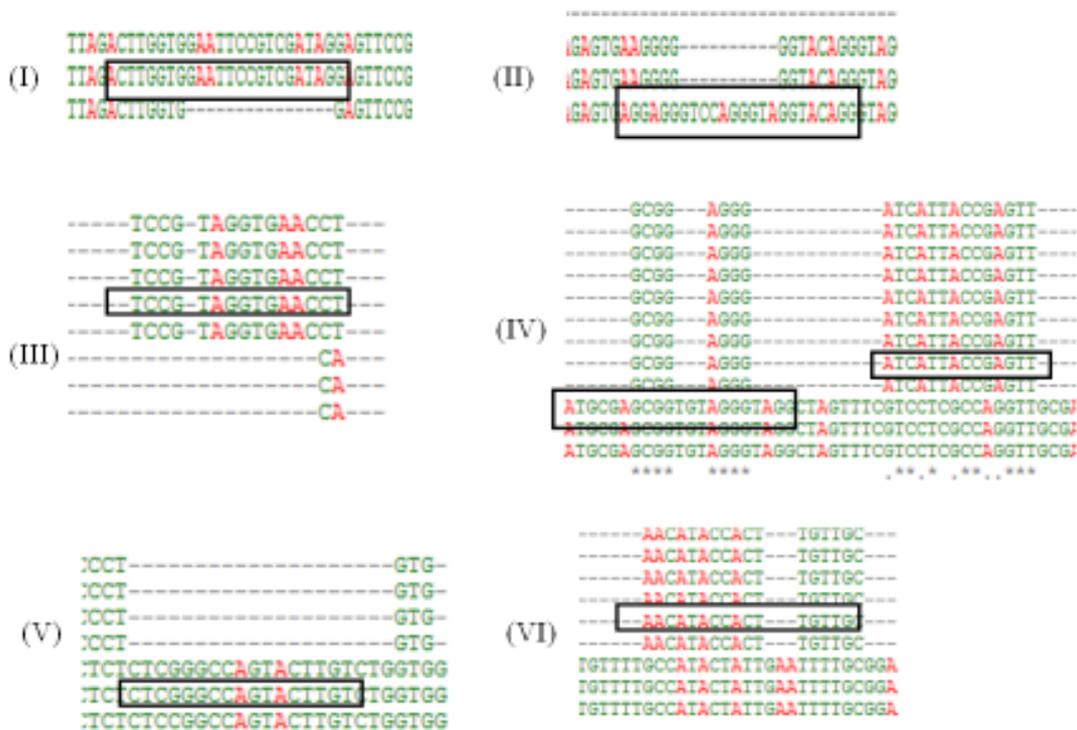
(圖 I 黑框處為 FOR-430 及 FOR-425 測試點之位置、圖 II 黑框處為 FOR-1 測試點之位置、圖 III 黑框處為 FOR-25 測試點之位置、圖 IV 黑框處為 FOR-300 測試點之位置)



圖七、EF 基因之多序列比對及測試點所在位置。

利用生物資訊軟體 ClustalW 分析核酸序列，將有特異序列插入、缺失及取代，可利用此差異性片段序列來設計生物晶片。可做為生物晶片之應用鑑別菌株之不同。

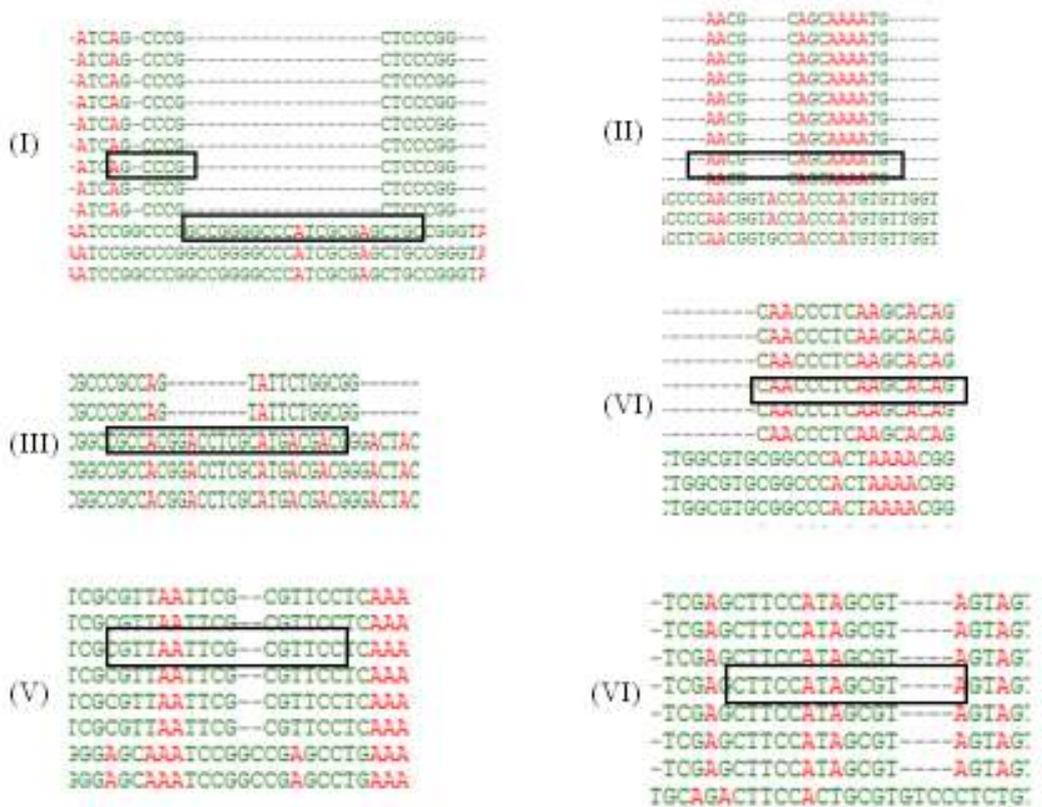
(圖 I 黑框處為 EF-70、EF-30 及 EF-52 測試點之位置、圖 II 黑框處為 EF-162 測試點之位置、圖 III 黑框處為 EF-145 測試點之位置、圖 IV 黑框處為 EF-305 測試點之位置、圖 V 黑框處為 EF-363 測試點之位置、圖 VI 黑框處為 EF-519 測試點之位置)



圖八 A、ITS 基因之多序列比對及測試點所在位置。

利用生物資訊軟體 ClustalW 分析核酸序列，將有特異序列插入、缺失及取代，可利用此差異性片段序列來設計生物晶片。可做為生物晶片之應用鑑別菌株之不同。

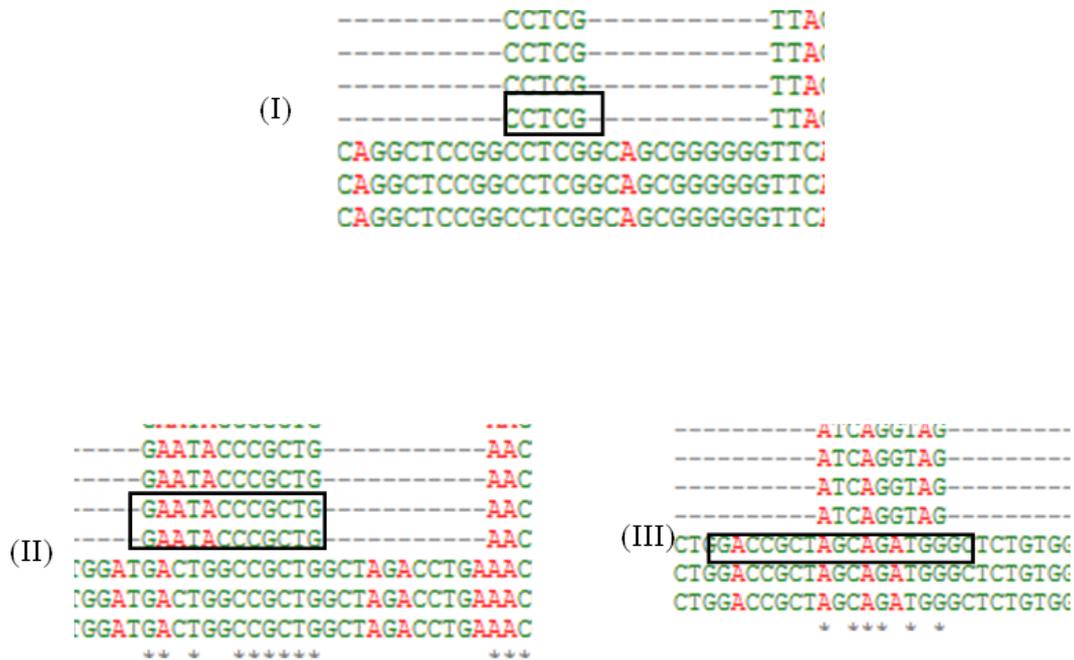
(圖 I 黑框處為 ITS-366 測試點之位置、圖 II 黑框處為 ITS-308 測試點之位置、圖 III 黑框處為 ITS-15 測試點之位置、圖 IV 黑框處為 ITS-651 及 ITS-62 測試點之位置、圖 V 黑框處為 ITS-830 測試點之位置、圖 VI 黑框處為 ITS-60 測試點之位置)



圖八 B、ITS 基因之多序列比對及測試點所在位置。

利用生物資訊軟體 ClustalW 分析核酸序列，將有特異序列插入、缺失及取代，可利用此差異性片段序列來設計生物晶片。可做為生物晶片之應用鑑別菌株之不同。

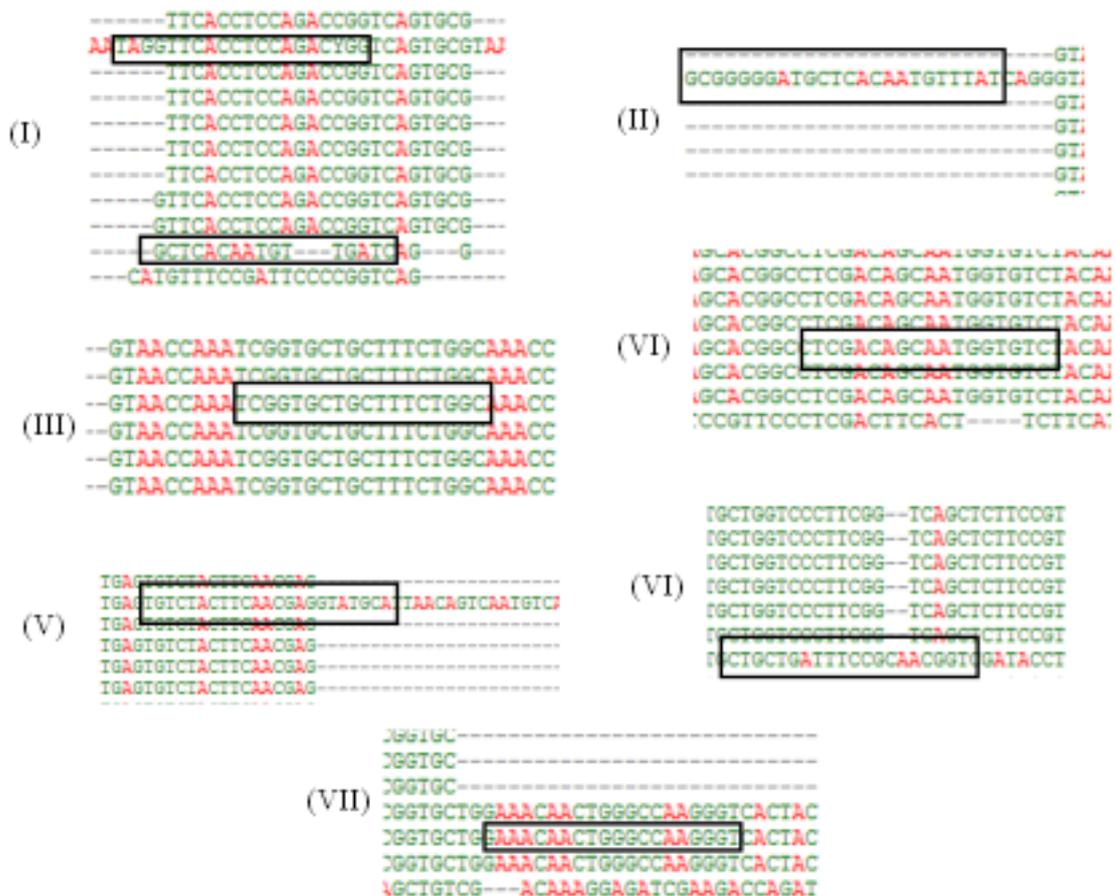
(圖 I 黑框處為 ITS-87 及 ITS-1010 測試點之位置、圖 II 黑框處為 ITS-229 測試點之位置、圖 III 黑框處為 ITS-1779 測試點之位置、圖 IV 黑框處為 ITS-381、圖 V 黑框處為 ITS-335 測試點之位置、圖 VI 黑框處為 ITS-409 測試點之位置)



圖八 C、ITS 基因之多序列比對及測試點所在位置。

利用生物資訊軟體 ClustalW 分析核酸序列，將有特異序列插入、缺失及取代，可利用此差異性片段序列來設計生物晶片。可做為生物晶片之應用鑑別菌株之不同。

(圖 I 黑框處為 ITS-2100 測試點之位置、圖 II 黑框處為 ITS-515 測試點之位置、圖 III 黑框處為 ITS-2216 測試點之位置)



圖九、BT2 基因之多序列比對及測試點所在位置。

利用生物資訊軟體 ClustalW 分析核酸序列，將有特異序列插入、缺失及取代，可利用此差異性片段序列來設計生物晶片。可做為生物晶片之應用鑑別菌株之不同。

(圖 I 黑框處為 BT2-7 及 BT2-5 測試點之位置、圖 II 黑框處為 BT2-241 測試點之位置、圖 III 黑框處為 BT2-57 測試點之位置、圖 IV 黑框處為 BT2-105 測試點之位置、圖 V 黑框處為 BT2-340 測試點之位置、圖 F 黑框處為 BT2-170 測試點之位置、圖 VII 黑框處為 BT2-303 測試點之位置)

```
GGCCACGTCGACTCTGGCAA
GGCCACGTCGACTCTGGCAA
GGCCACGTCGACTCTGGCAA
GGCCACGTCGACTCTGGCAA
```

```
GACGCTCCCGGTCACCGT
GACGCTCCCGGTCACCGT
GACGCTCCCGGTCACCGT
GACGCTCCCGGTCACCGT
```

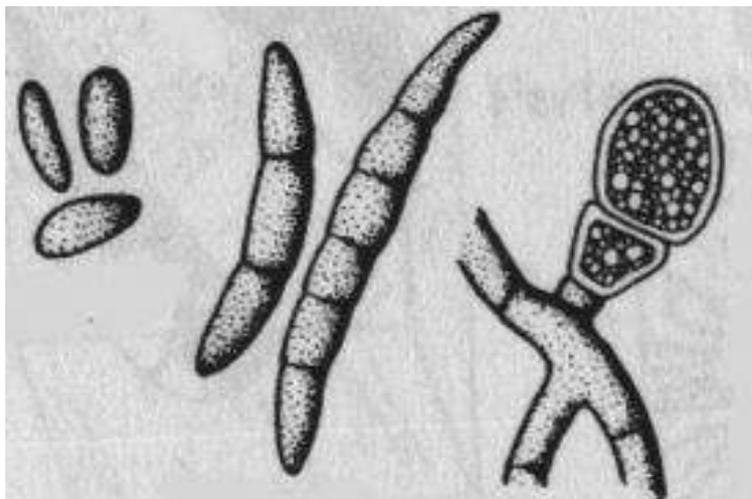
圖十、不同來源鐮孢菌 JN995193-EF-30 核酸序列之多序列比對及引子設計位置。

利用多序列比對軟體 ClustalW，可以了解菌株間之差異性然後設計出適合之引子組(JN995193-EF-30-F 與 JN995193-EF-645-R)，圖中黑框的位置分別為設計引子組

(上圖: JN995193-EF-30-F 5'-GGCCACGTCGACTCTGGCAA-3'與下圖: JN995193-EF-645-R : 5'-TGCCACTGGCCCTCGCAG-3')的區域。



附錄一



(A)

(B)

(C)

Fusarium 的孢子種類有小分生孢子(A)、大分生孢子(B)及厚膜孢子(C)。

出處：行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

<http://www.tactri.gov.tw/htdocs/plant/mllee/Fusarium.asp>

附錄二

Primer	sequence	大小	特性	
GU934523-1-ITS1-25-F	5'-CCGAGTTTACAACCTCCCAAAC-3'	149bp	由NCBI資料庫白術分離菌株 多序列比對而設計	
GU934523-1-ITS1-145-R	5'-AATAAATACCAAATGAGTCTTCAATG-3'			
GQ131884-2-ITS2-360-F	5'-AACCCCTCAAGCACAGCTTGG-3'	150bp		
GQ131884-2-ITS2-141-R	5'-CTTCAACCCCAAATTGCCGC-3'			
JX885462-18S-40-F	5'-TGGTGAACCAGCGGAGGGA-3'	554bp		
JX885462-18S-531-R	5'-TCGCCATAAGGATGGACTAG-3'			
JQ423257-Nh-IGS-1-F	5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAGAAT-3'	275bp	由NCBI資料庫康乃馨分離菌株 多序列比對而設計	
JQ423257-Nh-IGS-275-R	5'-ACCCCTTTAGCTCCGCTTC-3'			
AY554242-ITS1-26-F	5'-TGAGCTTAGGCAGGGACTTGTA-3'	702bp	由NCBI資料庫 <i>Fusarium oxysporum</i> 菌株 多序列比對而設計	
AY554242-ITS1-339-R	5'-GCTACAGAAGCAGCAACAGCA-3'			
AY554242-ITS1-26-F'	5'-GCTTCTGAAGCTGCTACTGCT-3'	702bp		
AY554242-ITS1-339-R'	5'-TGAGTTTAGGTAGGCTCTTGTA-3'			
EU926244-28S-1-F	5'-TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC-3'	627bp		由NCBI資料庫 <i>Fusarium oxysporum</i> 菌株 多序列比對而設計
EU926244-28S-627-R	5'-GCCCAGCGACTACTGGTAATGCG-3'			

EU926244-28S-1-F'	5'-TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC-3'	600bp	
EU926244-28S-600-R'	5'-TAGGAACGTGCTTCGCGCCAGG-3'		
FOR3-F	5'-ATCGAGTCTTGCCGACGAT-3'	700bp	參考Hyeseung Lee (2010) 文獻 所設計之序列
FOR3-R	5'-TGAGATCCGTCTTCAGGATC-3'		
M38139-28S-1-F	5'-GGCAACAGCTCAAATTTGAAATC-3'	158bp	由NCBI資料庫 <i>Fusarium decemcellulare</i> 菌 株多序列比對而設計
M38139-28S-158-R	5'-CAGCTTCCTCGAAATGTCTC-3'		
JN995193-EF-30-F	5'-GGCCACGTCGACTCTGGCAA-3'	657bp	由NCBI資料庫洋蔥分離菌株 多序列比對而設計
JN995193-EF-645-R	5'-TGCCACTGGCCCTCGCAG-3'		
JX397805.1-e3-2-F	5'-GGCGACTGGATTCTCTTCAC-3'	174bp	由NCBI資料庫穀物分離菌株 多序列比對而設計
JX397805.1-e3-174-R	5'-TCAGCTGTTCTGCAACACC-3'		
HE583296-EF-40-F	5'-AGNTCGACCACTGTGAGTACT-3'	660bp	由NCBI資料庫芒果分離菌株 多序列比對而設計
HE583296-EF-659-R	5'-GGGGTCACTAGTACAAGAACT-3'		
AB000124.1-Pg1-389-F	5'-CCCGACCATTTTCATCGTTGTCAA-3'	900bp	由NCBI資料庫香瓜分離菌株 多序列比對而設計
AB000124.1-Pg1-960-R	5'-TCTCAACCTGAACTACGCCG-3'		
DQ452423-Nh-tEF-1-F	5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGACTC-3'	714bp	由NCBI資料庫豌豆分離菌株 多序列比對而設計
DQ452423-Nh-tEF-741-R	5'-AAGAACTACTTCCTTCATGGTCA-3'		