

溴化乙錠與溴化丙錠在植物病原 檢測技術上之應用

蘇士閔¹、陳薏瑤²、邱燕欣³

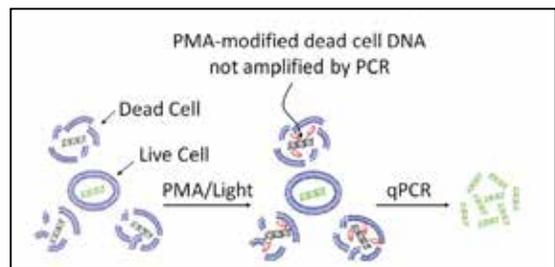
一、前言

利用聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 為基礎的分子生物技術進行目標微生物檢測，是現在的主流檢測方法。雖然 PCR 是針對特定的 DNA 片段進行增幅而達到檢測目標微生物的目的，但卻無法辨識偵測到的細菌是死菌或活菌。因此，目前國際上對於檢測植物病原細菌的方法通常會使用 1-2 種培養基進行培養，除觀察其菌落形態外，也能確認目標病原細菌是否為活菌，但是培養步驟會增加檢測流程約 2-3 天。目前國外已有學者嘗試將溴化乙錠 (ethidium monoazide, EMA) 與溴化丙錠 (propidium monoazide, PMA) 應用在植物病原檢測工作上，希望以更節省時間的方法達到正確檢測活菌的效果。

二、EMA、PMA 是什麼

EMA 與 PMA 是一種具光反應的 DNA 染劑。當死亡或受傷微生物的細胞壁及細胞膜受到破壞時，EMA 與 PMA 染劑即能進入微生物體內，經光照後與 DNA 進行

共價結合而箝合在微生物 DNA 上，然後在進行 PCR 反應時被 EMA 與 PMA 箝合的 DNA 即無法被增幅；而活菌的細胞壁是完整的，EMA 與 PMA 染劑無法進到微生物體內。因此利用 EMA 與 PMA 可以區隔活菌與死菌，排除無感染風險的死菌造成的陽性檢測結果。結合 EMA 或 PMA 與 PCR 技術，可檢測出目標環境或對象中攜帶的活菌量，避免被死菌影響，同時亦可取代培養步驟，因而節省相當多的時間。目前對於檢測人類或動物病原細菌，或空氣等環境中的細菌，應用 EMA 或 PMA 結合 PCR 技術已有相當多的報導。



(圖片來源：<http://www.omicsbio.com.tw>)

三、EMA 與 PMA 之應用情形

轉糖鏈球菌 (*Streptococcus mutans*) 是

¹ 種苗改良繁殖場種苗經營課 助理研究員

² 種苗改良繁殖場種苗經營課 約用助理

³ 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

造成人類齲齒及感染性心內膜炎等疾病的重要病原菌。利用 EMA 與 PMA 染劑搭配即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) 可快速且有效地針對口腔中唾液與齲齒的樣本進行轉糖鏈球菌的檢監測。對於人類的伺機性病原菌綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 同樣也可藉由 PMA-qPCR 進行檢測。國內勞工安全衛生研究所為監測職場環境中的活性細菌量，經測試後發現 PMA-qPCR 技術可定量空氣中的總活性細菌量，未來可能應用於分析，包括家禽舍、畜牧場、木材行、水稻田、蔬菜田及醫療院所等環境空氣中的細菌濃度。在偵測環境中活性金黃色葡萄球菌方面也顯示以 PMA 搭配 qPCR 是一可行方法。

四、植物病原檢測之應用

EMA 或 PMA 染劑在植物病原檢測上，目前應用案例較少。黃龍病菌 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) 是世界各地柑橘產區的重要病原，它會侵入柑橘韌皮部造成柑橘樹勢衰弱，進而降低產量，但黃龍病菌不易培養，因此利用 EMA-qPCR 技術可檢測柑橘植株體內黃龍病菌的活菌量。*Alternaria* 屬是一類常見於鮮果、穀物或蔬菜上的病原真菌，此類病原菌具有分泌真菌毒素 (mycotoxin) 的能力，所以在食品安全上相當受到重視。因為活菌才具有分泌毒素的能力，所以透過 PMA-qPCR 技術可檢測出食物或食品上實際帶有的 *Alternaria* 活菌量，減少過度評估帶菌量的可能性。

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 是全世界廣泛分佈的重要病原細菌，寄主範

圍大，能感染超過 30 科、200 種以上的植物，其中包括番茄、馬鈴薯等重要經濟作物。2016 年于氏等人結合 PMA 與傳統 PCR 技術，針對茄科青枯病菌建立了一套能區分活菌與死菌的快速檢測方法。瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Aac) 也是國際上重要的植物病原細菌，除經土壤傳播外，因其可藉由種子傳播和瓜類作物多屬高經濟作物、種子價值高的特性，而受到各國檢疫單位與種子公司的重視。2016 年 Tian 等人為能有效、快速地檢測 Aac，應用 PMA 取代傳統的培養基，改為結合 qPCR 技術，更能有效、即時地檢測出西瓜或甜瓜種子上的 Aac 活菌。

五、結語

時效性在大量依靠檢測技術的現代社會相當受到重視，尤其在全球貿易的快速脈動影響下，時間就是金錢，種子在世界各地的流動與貿易同樣處在這條急流中。檢測技術除要求快速外，正確性與靈敏度亦不可偏廢。在國際種子檢查協會 (International Seed Testing Association, ISTA) 公告的種子健康 (seed health) 檢查方法中，植物病原細菌檢測多是利用 (半) 選擇性或鑑別性培養基培養出活菌後，搭配病原性測定 (即接種病原菌至寄主植物) 為內容，係以正確性為主要考量。近幾年隨著 PCR 技術普及，已陸續取代病原性測定，以求提升時效性。檢測技術研究的快速進展已經大幅縮短檢測時間，未來進一步地落實在種子種苗病原檢測服務上，將能更有效率地協助種子種苗業者減少時間成本的支出。