

使用 Real-time PCR 檢測引起西瓜蔓枯病菌的方法評估

關政平^{1,*} 黃彥華² 曾清山¹ 林宗俊³ 石信德⁴

摘要

關政平、黃彥華、曾清山、林宗俊、石信德。2014。使用 Real-time PCR 檢測引起西瓜蔓枯病菌的方法評估。台灣農業研究 63(2):151–158。

本研究根據西瓜蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*) 的 rDNA 設計出專一性的引子對及利用 real-time PCR 法與 TaqMan 螢光探針進行 *D. bryoniae* 之檢測並與傳統 PCR 法作比較，結果顯示 real-time PCR 法較傳統 PCR 法靈敏度提高約 100 倍。利用 real-time PCR 法偵測被 *D. bryoniae* 在感染的西瓜組織，結果發現 *D. bryoniae* 主要分布在西瓜的莖部。本研究使用 real-time PCR 法可增幅出 *D. bryoniae* 的專一性核酸片段，並檢測感染西瓜組織及種子中之 *D. bryoniae* 核酸，將可提供西瓜蔓枯病之病害檢測與病菌量化之判定。

關鍵詞：西瓜蔓枯病、*Didymella bryoniae*、Real-time PCR、診斷技術。

前言

蔓枯病 (gummy stem blight) 係由子囊菌 *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm [*Mycosphaerella citrullina* (C. O. Sm.)] 所引起的葫蘆科作物之病害。*D. bryoniae* (無性世代為 *Ascochyta cucumeris* Fautr. & Roum.) 會感染包括有西瓜、甜瓜、南瓜及胡瓜等葫蘆科作物的莖、葉、花及果實，罹病之瓜類葉片、葉柄及莖部會有褐色病變，所產生子囊孢子及柄孢子再經由風及雨水傳播至其他植株 (Sitterly & Keinath 1996)。果實及花卉受到感染後，會導致果實內部腐爛並且使其種子遭到污染 (Keinath *et al.* 1995)。此外，此病菌可存活於種子、空氣及土壤中 (Keinath 2011)，並在溫暖和潮濕的天氣條件下，能迅速殺死葫蘆科作物的藤蔓，產生蔓枯的現象 (Bala & Hosein 1986; McGrath *et al.* 1993; Sitterly & Keinath 1996)。

目前廣泛用於檢測種子是否帶有 *D. bry-*

oniae 之方法為種苗出芽 (grow-out) 或種子轉漬 (blotter assays) 試驗。這些方法須具有廣大的育苗場地，直接利用肉眼觀察種苗之病徵與發病情形或利用鏡檢等技術加以判斷，惟此等方法需要時間、空間、密集的勞力及需有對病原菌之專業知識才能判斷病徵 (www.seedhealth.org)。綜觀過去在種苗的檢測方法，已有諸多利用 PCR 方法進行檢測的研究報告：如以 PCR 檢測甘藍種子是否帶有 *Alternaria radicina* (Pryor & Gilbertson 2001) 及西瓜果斑病病害 (Ha *et al.* 2009)；使用 real-time PCR 檢測洋蔥種子是否帶菌 *Botrytis* spp. (Chilvers *et al.* 2007) 等。西瓜是世界上重要的瓜類作物之一，在 2008 年全世界種植西瓜的面積約有 3,752,568 ha，產量約有 99,194,223 Mg (FAO 2008)。而在台灣，其種植面積約有 12,665 ha，居所有蔬菜作物之冠 (COA 2008)。許多由真菌類所引起的疾病，會使西瓜產量大幅減少，其中由 *D. bryoniae* 所引起的蔓枯病則為西瓜最嚴重的病害之一。

投稿日期：2013 年 11 月 12 日；接受日期：2014 年 4 月 7 日。

* 通訊作者：pcr123@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

因此，本研究的目的是在於開發專一性強、靈敏度高及快速的 real-time PCR 方式，藉以確認西瓜種苗是否帶有 *D. bryoniae*，為防治此病害提供一個有效的鑑定工具。

材料與方法

植物總量 DNA 之純化

將西瓜組織切下，用液態氮急速冷凍後研磨成粉，取 0.1 g 研磨樣品用 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promege, USA) 純化出總量 DNA，保存於 -80°C 備用。

病原菌來源及菌絲總量 DNA 之純化

本研究使用之菌種與參考菌種，包括獲自食品工業研究所、嘉義大學蔡竹固教授、中興大學曾國欽、黃振文教授等及自行分離之菌株，如表 1。所有供試菌株皆經單孢分離並培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA, Potato dextrose agar, Difco, USA)。供試菌株培養至 PDA 培養基並於 25°C 下培養 8–14 d 後。以去離子水將供試菌株之菌絲刮洗下來，並以 13,000 rpm 離心 2 min，除去上清液後，收菌

絲用液態氮急速冷凍研磨成粉，備用。取 0.1 g 磨碎之菌絲樣品以前述之試劑套組純化出供試菌株之總量 DNA，並保存於 -80°C 備用。

引子設計

利用 Primerplex 2.0 (USA) 軟體，針對 *D. bryoniae* 的 rDNA ITS 核酸序列及植物核酸序列進行引子設計。根據所獲得的序列，找出數個保留性高的區域，設計出對應之專一性引子 (表 2)，供檢測使用。即時螢光定量所使用的螢光探針是來自 Roche Applied Science 的 probe#89 (Roche, USA)。此螢光探針是一段專一性結合於 rRNA 的基因序列，探針的 5' 端標定 FAM (6-carboxyfluorescein acronym fam)，其 3' 端標定 BHQ-1 (Black Hole Quencher-1)，每合成一次新鏈就有一次螢光信號釋放，所發出的綠色螢光利用儀器偵測每次聚合酶鏈鎖反應循環後產物總量。

聚合酶鏈鎖反應

PCR 所使用的藥劑為 Super-Run Taq DNA Polymerase (Protech, PT-53-250U)。於 0.2 mL 微量離心管中分別加入去離子水 18.5 μ L、10 \times PCR buffer 2.5 μ L、10 mM dNTP 0.5 μ L、

表 1. 使用 real-time PCR 及 PCR 檢測 *Didymella bryoniae* 分離株及西瓜常見病原菌之結果。

Table 1. Specificity of real-time PCR and conventional PCR assay for the detection of watermelon pathogens.

Fungal/bacterium	Code	Host	Source ^z	PCR ^y	Q-PCR ^x
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	AAC33	Watermelon	Kuo-Chan Tzeng	-	-
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	E0702	Watermelon	Jwu-Guh Tsay	-	-
<i>Glomerella magna</i>	A0601	Watermelon	Jwu-Guh Tsay	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	AGI-IB	Rice	Jenn-Wen Huang	-	-
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	PA01	Cabbage	Jenn-Wen Huang	-	-
<i>Colletotrichum nigrum</i>	BCRC 35149	Watermelon	BCRC	-	-
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	BCRC 35030	Watermelon	BCRC	-	-
<i>Fusarium</i> spp.	GL0905-2 (F8)	Watermelon	Jwu-Guh Tsay	-	-
<i>Didymella bryoniae</i>	DB-10	Watermelon	Jwu-Guh Tsay	+	+
<i>Ascochyta cucumeris</i>	BCRC 35163	Watermelon	BCRC	+	+
<i>Ascochyta cucumeris</i>	BCRC 35243	Watermelon	BCRC	+	+
<i>Didymella bryoniae</i>	D1-D10	Watermelon	This study	+	+

^z BCRC is the Bioresource Collection and Research Center, Hsin-Chu, Taiwan; Dr. Jwu-Guh Tsay, Department of Nutritional Science, Chiayi University, Chiayi, Taiwan; Drs. Kuo-Chen Tzeng and Jenn-Wen Huang, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

^y Detection of the PCR product on 3% agarose gel; +, PCR product detected; -, no product detected.

^x (+) indicates a cycle threshold (Ct) < 35; (-) indicates a Ct > 35.

表 2. 本試驗所使用之引子與核酸探針。

Table 2. Primers and probes used in this study.

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Temp. (°C)	Amplicon (bp)	Modification
Di-real-61-F1	ACCAGCCTGGACTGAGGTC	60	61	
Di-real-61-R1	GGCCGCTTACAGCCATTA	60	61	
89 probe ^z	GGATGCTG			5'-FAM 3'-BHQ1

^z FAM: 6-carboxyfluorescein acronym fam, BHQ-1: Black Hole Quencher-1.

D. bryoniae 正向引子 (Di-real-61-F1) 1 μ L、*D. bryoniae* 反向引子 (Di-real-61-R1) 1 μ L、Taq Polymerase 及 5 μ M 待測西瓜或其病原菌的總量 DNA 1 μ L，總體積 25 μ L 進行 PCR 反應。反應條件為 94°C 持續 3 min；95°C 持續 30 s、60°C 持續 30 s、72°C 持續 30 s，共 35 個循環 (cycle)；最後再以 72°C 反應 7 min。PCR 反應的機器為 Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA)，最後取 5 μ L PCR 產物進行 3% 膠體電泳，經由 EtBr 染色後，以 UV 光照相並分析結果。

即時螢光定量聚合酶鏈鎖反應

Real-time PCR 所使用的試劑為 FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science)。於 0.2 mL 微量離心管中分別加入去離子水 6.8 μ L、5 μ M 待測西瓜或其病原菌的總量 DNA 1 μ L、2 \times FastStart Universal Probe Master (Rox) 10 μ L、10 μ M *D. bryoniae* 正向引子 (Di-real-61-F1) 1 μ L、10 μ M *D. bryoniae* 反向引子 (Di-real-61-R1) 1 μ L 及 Roche#89 probe 0.2 μ L，總體積 20 μ L 進行 PCR 反應。反應條件如下：50°C 持續 5 min、95°C 持續 3 min 和 40 個循環的 95°C 持續 3 s、60°C 持續 1 min。real-time PCR 反應的機器為 ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA)。

偵測靈敏度試驗

為測定所設計的探針序列之靈敏度，將萃取自 *D. bryoniae* 菌絲或分生孢子的總量 DNA 以 10 倍序列稀釋後，利用傳統 PCR 及 real-time PCR 進行測試。將 *D. bryoniae* 總量 DNA 從 50 ng 至 50 fg 的負對數值 (-log) 與即

時螢光聚合酶反應後得到相對應的 Ct 值，製作標準曲線方程式；即縱座標為 Ct 值，橫坐標為總量 DNA 濃度的負對數值 (-log)，每個數據點代表由 3 次獨立試驗所得到得平均 Ct 值。線代表 DNA 濃度與 Ct 值之間的線性迴歸分析。

西瓜組織中 *D. bryoniae* 之定量分析

為測定 *D. bryoniae* 在西瓜組織中分佈的情形，將西瓜幼苗 (株高約為 25–30 cm) 之 2 片下位葉，噴灑 *D. bryoniae* 之分生孢子懸浮液 (1×10^6 spores mL⁻¹)，將西瓜苗套袋並放置於陰暗處 1 d 後，打開套袋並移入溫室中持續培養約 2 wk，待西瓜幼苗葉片出現病斑後。取罹病之西瓜的不同部位 (根、莖、上位葉、側芽、下位葉) 及植株周邊土壤進行總量 DNA 萃取，並調整樣品之總量 DNA 濃度為 50 ng，每個反應 3 重複，以 real-time PCR 進行定量分析。此外，本研究將 *D. bryoniae* 之人工帶菌西瓜種子分作 3 個試驗組 (A1、A2、A3) 及未帶菌之健康西瓜種子 (B1、B2、B3) 進行檢測，每組各取兩顆種子進行純化總量 DNA，同時以傳統 PCR 與 real-time PCR 分析。

結果

D. bryoniae 專一性試驗

為確定所設計的引子對及探針之專一性，首先以 PCR 方法針對西瓜常見病害之病原菌 (表 1) 進行檢測，再由瓊脂凝膠電泳分析，經瓊脂凝膠電泳分析的結果顯示僅在 DB10、BCRC35163 及 BCRC 35243 等 *D. bryoniae* 菌株出現大小 61 bp 產物之核酸片段，對其他類

病原菌包括 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*、*Colletotrichum lagenarium*、*Colletotrichum orbiculare*、*Colletotrichum higginsianum*、*Colletotrichum nigrum*、*Fusarium* spp.、*Glomerella magna* 及 *Rhizoctonia solani* 等，以及作為負對照組之健康的西瓜與無菌水皆無 PCR 產物生成，可初步確定此引子對 *D. bryoniae* 具有專一性。相同的樣品使用 real-time PCR 分析，結果顯示僅在 D1-D10、DB10、BCRC35163 及 BCRC 35243 等 *D. bryoniae* 菌株皆為正反應 (表 1)，對於前述其他類病原菌以及健康的西瓜與作為負對照組之無菌水皆無反應 (表 1)。由上述兩個試驗結果顯示，本研究設計的引子對和探針在傳統 PCR 及 real-time PCR 之測試中均對 *D. bryoniae* 具有高度專一性。

D. bryoniae 靈敏度試驗

為了得知試驗方法對 *D. bryoniae* 的靈敏度，使用純化自 *D. bryoniae* 菌絲的總量 DNA (50 ng) 作為試驗用之核酸模板，經 10 倍系列稀釋後，利用傳統 PCR 法及 real-time PCR 法進行分析，並比較兩種檢測法靈敏度的差異。根據 real-time PCR 結果並設定 Ct 值為 35 以內為陽性反應，結果顯示 *D. bryoniae* 菌絲的總量 DNA 可被偵測的最低量為 0.5 pg (圖 1A)。若將傳統 PCR 法的產物經瓊脂凝膠电泳分析，可增幅出 61 bp 之 *D. bryoniae* 之專一性核酸片段 (圖 1C)，結果顯示 *D. bryoniae* 菌絲的總量 DNA 可被偵測的最低量為 50 pg。由上述結果，顯示利用 real-time PCR 法檢測 *D. bryoniae* 菌絲的總量 DNA 之靈敏度高於傳統 PCR 法達 100 倍。將上述 real-time PCR 所測試之 *D. bryoniae* 菌絲總量 DNA 經由 10 倍系列稀釋進行靈敏度試驗，並將其結果繪製標準曲線，縱座標為 Ct 值，橫坐標為 *D. bryoniae* 菌絲總量 DNA (*D. bryoniae* 菌絲的總量 DNA 經 10 倍系列稀釋，從 50 ng 至 5 fg) 的負對數值 (-log)，*D. bryoniae* 菌絲總量 DNA 的標準曲線方程式為 $Y = 3.034X + 17.663$ ； $R^2 = 0.999$ (圖 1B)。根據繪製之標準曲線的結果顯示準確性及 Ct 與螢光值相關性佳。

西瓜不同組織帶菌量試驗

為了得知當西瓜被 *D. bryoniae* 感染時，此病菌在植株上的分佈情形，將罹病之西瓜植株的側芽、上位葉、下位葉、葉脈、莖、根及根部附近的土壤純化其總量 DNA 後，以 real-time PCR 法分析，並將所偵測到的 Ct 值帶入由靈敏度試驗繪製而成的標準曲線公式中，可推得各部位的 *D. bryoniae* 總量 DNA 的含量，分別為側芽組織 0.42 pg、上位葉 0.07 pg、下位葉 0.31 pg、葉脈 0.09 pg 及莖 1,208 pg (圖 2)，此外，根、根部附近的土壤、及作為負反應對照組之健康的西瓜與無菌水皆無偵測到螢光訊號。由上述結果，顯示 *D. bryoniae* 主要分布在罹病西瓜植株的莖部，其帶菌量遠較其他受感染部位高，在下位葉及側芽則有少量菌被檢測出來。另外，測試 *D. bryoniae* 之人工帶菌西瓜種子，結果發現利用傳統 PCR 與 real-time PCR 法皆可檢測出 A-1、A-2 及 A-3 三批西瓜種子為陽性反應，另三批 (B-1、B-2、B-3) 西瓜種子則為陰性反應 (表 3)，顯示 real-time PCR 與傳統 PCR 法皆可用於檢測受 *D. bryoniae* 污染之西瓜種子。

表 3. 利用傳統 PCR 與 real-Time PCR 檢測 *Didymella bryoniae* 之人工帶菌種子。

Table 3. Evaluation of conventional PCR and real-time PCR for the detection of *Didymella bryoniae* in artificially infested seeds.

Seed sample ^z	Bioassay ^y	Detection	
		PCR	real-time PCR
A-1	+ ^x	+	+ (34.43) ^w
A-2	+	+	+ (34.67)
A-3	+	+	+ (34.97)
B-1	-	-	-
B-2	-	-	-
B-3	-	-	-

^z Seeds provided by Tsung-Chun Lin.

^y Examined by tissue blotter or light microscopy.

^x +: Positive result; -: Negative result.

^w Cycle threshold value.

討論

蔓枯病是一種嚴重的西瓜病害，主要在葉

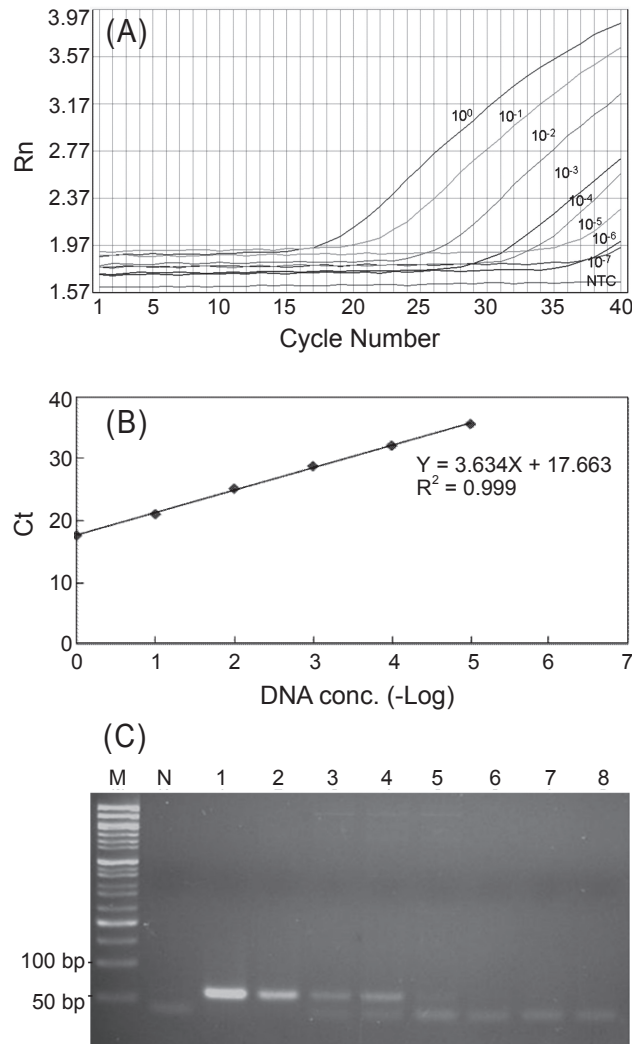


圖 1. 比較 real-time PCR 法 (A, B) 與 PCR 法 (C) 檢測 *Didymella bryoniae* 菌絲總量 DNA 靈敏度試驗。(A) 每條曲線代表稀釋後的總量 DNA 濃度值，縱座標：螢光訊號 (Rn)、橫座標：Cycle Number。(B) *D. bryoniae* 的標準曲線。*D. bryoniae* 總量 DNA 通過即時螢光聚合酶反應後得到相對應的 Ct 值。縱座標：Ct 值，橫座標：總量 DNA 濃度值。(C) 傳統 PCR 檢測 *D. bryoniae* 菌絲總量 DNA 靈敏度試驗。Lane1-8 代表稀釋後的總量 DNA 濃度值 (以 10 倍序列稀釋 *D. bryoniae* 總量 DNA 從 5 ng 至 0.5 fg)，N 代表未含有 DNA 模板的負對照。

Fig. 1. Sensitivity comparisons of real-time PCR and conventional PCR assays for the detection of *Didymella bryoniae*. (A) Amplification plot of 10-fold serial dilutions of the total DNA by the real-time PCR. (B) The standard curve of 10-fold serial dilutions of *D. bryoniae* total genomic DNA. (C) Amplification of 10-fold serial dilutions of the total genomic DNA. Lanes1-8, total DNA of *D. bryoniae* infected melon; N, no template control.

和莖上產生病變。雖然果實不一定受 *D. bryoniae* 影響，但當葉片及莖受到感染時，會造成其果實的產量和質量的損失。本研究結果顯示，在西瓜之莖及葉組織均可檢測出 *D. bryoniae* 之存在。目前防治本病的主要方法，包

括抗病品種的選育、耕作防治及化學防治，耕作防治包括：確實移除疑似罹病之作物殘株、不保存及不使用疑似感染蔓枯病之種子、瓜類作物與青蔥進行輪作及避免瓜類作物的生產環境保持在潮濕的狀態等；化學防治包括：種子

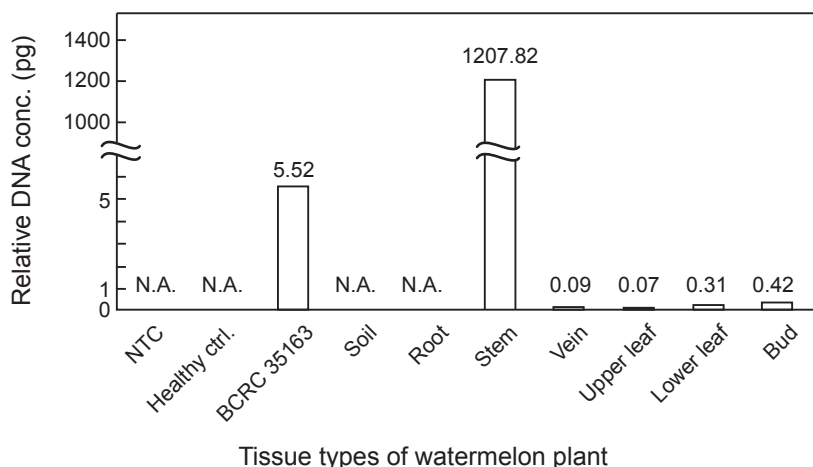


圖 2. 利用 real-time PCR 偵測西瓜不同部位之 *Didymella bryoniae*。檢測樣本包括各部位西瓜組織 (根、莖、上位葉、側芽、下位葉)、土壤、健康西瓜葉片與未含有模板 DNA 之反應。

Fig. 2. Relative quantification of *Didymella bryoniae* by real-time PCR from various parts (root, stem, upper leaf, bud, lower leaf) of watermelon seedlings and those from soil. Healthy ctrl, healthy plant as negative control; NTC, no template control.

催芽前需先泡過消毒液、建議使用 mancozeb 及 benomyl 等防治真菌的藥劑，並避免植栽暴露在有 *D. bryoniae* 的環境下等 (Keinath 1995)。

在蔓枯病菌的檢測上，Somai *et al.* (2002) 使用 PCR 方法檢測 *D. bryoniae* RGI DNA，其靈敏度達 100 pg，另外一個分離菌 *D. bryoniae* RGII 靈敏度達 10 pg。此外，Somai *et al.* (2002) 另發展 PCR 結合免疫分析的 PCR-ELISA 方法檢測 *D. bryoniae* RGI，其雖具有菌體 DNA 定量之優點，但靈敏度僅 10 ng，若以此 PCR-ELISA 方法檢測 *D. bryoniae* RGII 可測到靈敏度則為 1 ng。Ha *et al.* (2009) 使用 real-time PCR 法檢測 *D. bryoniae*，可測得的 DNA 濃度為 1 pg，本研究利用 real-time PCR 法可檢測 *D. bryoniae* 菌絲的總量 DNA 的最低量為 0.5 pg，結果與 Ha *et al.* (2009) 的研究結果相近。本研究、Somai *et al.* (2002)、Ha *et al.* (2009) 檢測的靈敏度皆不盡相同，造成結果不同之原因，除了方法、操作步驟尚包括使用的分離株或不同來源菌株不同等因素。在進行 PCR 試驗部分，本研究利用傳統 PCR 法可偵測到 *D. bryoniae* 菌絲的總量 DNA 的最低量為 50 pg，雖與 Somai *et al.* (2002) 及

Ha *et al.* (2009) 等人在 PCR 靈敏度的檢測結果略為不同，但本研究進一步在 real-time PCR 方法的靈敏度試驗較傳統 PCR 方法明顯提升 100 倍以上。許多植物組織特別是種子可能帶有抑制 PCR 之物質而造成偽陰性反應之檢測結果 (DeBoer *et al.* 1995)，如前人在檢測甘藍種子是否帶有 *Alternaria radicina* (Pryor *et al.* 2001) 及洋蔥種子是否帶有 *Botrytis spp.* 之報告 (Chilvers *et al.* 2007)。由本研究結果顯示，由種子萃取核酸並未對所使用之 real-time PCR 或 PCR 方法造成干擾反應之問題，兩者均可檢測西瓜種子是否帶有 *D. bryoniae* 之總量 DNA。

real-time PCR 法所使用的引子對及螢光探針，可專一地偵測到 *D. bryoniae*，且較傳統 PCR 檢測技術具有有更高的靈敏度；另外本法亦具有定量菌量之優點，過去的研究文獻提及受此病原菌感染之果實及花會導致其果實內部腐爛並且感染至種子 (Keinath *et al.* 1995)，且此病害可存活於種子中 (Keinath 2011)，顯示此病菌能經由種子帶菌之可能性很高。本研究所研發之 real-time PCR 方法將可使用於種子檢疫及作物早期診斷之工具，進而採取防治本病害的因應措施。

引用文獻

- Bala, G. and F. Hosein. 1986. Studies on gummy stem blight disease of cucurbits in Trinidad. *Trop. Agric.* 63:195–197.
- COA. 2008. COA Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan, Annual Report of Agricultural Statistics, Taiwan. Taipei. 69 pp. (in Chinese)
- Chilvers, M. I., L. J. du Toit, H. Akamatsu, and T. L. Peever. 2007. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Dis.* 91:599–608.
- DeBoer, S. H., L. J. Ward, X. Li, and S. Chittaranjan. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of Blotto. *Nucleic Acids Res.* 23:2567–2568.
- FAO. 2008. FAO Yearbook (Production). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italy. (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100e/i0100e.pdf>)
- Ha, Y., A. Fessehaie, K. S. Ling, W. P. Wechter, A. P. Keinath, and R. R. Walcott. 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 99:666–678.
- Keinath, A. P. 1995. Fungicide timing for optimum management of gummy stem blight epidemics on watermelon. *Plant Dis.* 79:354–358.
- Keinath, A. P. 2011. From native plants in central Europe to cultivated crops worldwide: The emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. *Hort-Science* 46:532–535.
- Keinath, A. P., M. W. Farnham, and T. A. Zitter. 1995. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbits. *Phytopathology* 85:364–369.
- McGrath, D. J., L. Vawdrey, and I. O. Walker. 1993. Resistance to gummy stem blight in muskmelon. *Hort-Science* 28:930–931.
- Pryor, B. M. and R. L. Gilbertson. 2001. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. *Plant Dis.* 85:18–23.
- Sitterly, W. R. and A. P. Keinath. 1996. Gummy stem blight. p.27–28. *in*: Compendium of Cucurbit Diseases. (Zitter, T. A., D. L. Hopkins, and C. E. Thomas, eds.) American Phytopathological Society Press. St Paul. 120 pp.
- Somai, B. M., A. P. Keinath, and R. A. Dean. 2002. Development of PCR-ELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from Related *Phoma* species. *Plant Dis.* 86:710–716.

Evaluation of Real-time PCR Assay for Detection of *Didymella bryoniae*

Cheng-Ping Kuan^{1*}, Yen-Hua Huang², Ching-Shan Tseng¹, Tsung-Chun Lin³, and Hsin-Der Shih⁴

Abstract

Kuan, C. P., Y. H. Huang, C. S. Tseng, T. C. Lin, and H. D. Shih. 2014. Evaluation of Real-time PCR assay for detection of *Didymella bryoniae*. J. Taiwan Agric. Res. 63(2):151–158.

In this study, a specific and highly sensitive real-time PCR assay with TaqMan probe was developed as a tool for the diagnosis of gummy stem blight of watermelon by targeting the rDNA genes of *Didymella bryoniae*. In addition, the real-time PCR assay was compared to a conventional PCR method with their specificity and sensitivity on the detection of *D. bryoniae* in culture and in *planta*. The real-time PCR assay was effective for quantifying the fungal genomic DNA in the infected plants. This method was highly specific to *Didymella* and it was about one hundred times more sensitive than the conventional PCR method. The real-time PCR assay developed is a valuable tool for detection and titer quantitation of gummy stem blight diseases on watermelon.

Key words: Gummy stem blight, *Didymella bryoniae*, Real-time PCR, Detection.

Received: November 12, 2013; Accepted: April 7, 2014.

* Corresponding author, e-mail: pcr123@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.