

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 臺灣疫病菌基因型之研究 (II)

計畫編號：NSC87-2313-B-002-042

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：劉瑞芬 臺大植病系

## 一、中文摘要

疫病菌 *Phytophthora parasitica* Dastur (= *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan) 是本省非常重要的植物病原菌。其屬於較嗜高溫菌，在本省之分佈主要集中於中南部，可危害之寄主種類繁多。研究顯示，從不同寄主分離到之疫病菌在形態及生理特徵上都有相當差異，接種試驗也發現菌系間病原性有差別，寄主範圍也不同，可能已有分化現象。本計畫之目的擬藉 DNA 指紋分析來探討自不同寄主植物所分離到之疫病菌菌株基因型的變異情形。為了尋求適合的核酸探針，我們除了進行疫病菌基因庫之篩選外，也嘗試探討以反轉錄轉位子序列作為探針進行 DNA 指紋分析的可行性。目前的研究結果顯示，疫病菌確實帶有 Ty1-*copia* group 反轉錄轉位子序列；以之為探針進行基因組南方雜合反應時，供試菌株之雜合圖譜呈現明顯的多型性。實驗結果也顯示，在一般培養條件下，這一個轉位子不具有轉位能力。因此，其在不同疫病菌分離株之存在情形或可反映出這些菌株彼此之間的類緣關係。為了進一步探討這一個核酸片段在疫病菌有性與無性繁殖過程中的遺傳特性，我們另外還進行了兩項分析，目前實驗仍在進行當中，短期內應可獲得明確結果。

關鍵詞：反轉錄轉位子、疫病菌、基因型、DNA 指紋分析、核酸探針。

### Abstract

*Phytophthora parasitica* Dastur (= *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan), being able to attack a wide variety of plants, is a very notorious plant pathogen in the central and southern Taiwan. Crops of great

economical importance such as citrus, tobacco, dieffenbachia, lily, cymbidium, etc., all are targets of this pathogen. It has been shown that there are variations in the morphology, pathogenicity, and virulence among *P. parasitica* isolated from different host species, indicating that differentiation may have arisen in *P. parasitica* isolated from different host species. The purpose of this study was to analyze the genotypes of *P. parasitica* by DNA fingerprinting. To search for probes appropriate for DNA fingerprinting analysis, 20 clones were randomly selected from the genomic library of *P. parasitica*. Subsequently, DIG-labeled probes were prepared from each clone and used in genomic Southern hybridization. Besides, the possibility that retrotransposon may serve as a genetic marker was also investigated at the same time. Fortuitously, results obtained from the latter approach have been very inspiring. It has been found that there indeed exist Ty1-*copia* retrotransposons in *P. parasitica*, as revealed by the presence of reverse transcriptase sequences. Analysis by genomic Southern hybridization using retrotransposon sequence as a probe indicated that polymorphisms exist among *P. parasitica* isolates tested. To determine its genetic stability, RNA was prepared from this fungus and analyzed by Northern hybridization as well as reverse-transcriptase-polymerase chain reaction. No signal was detectable, indicating that this retroelement is unable to transpose. In addition, the genetic stability of this sequence throughout the asexual and sexual reproduction cycles of *P. parasitica* is now

being investigated as well.

Keywords: *Phytophthora parasitica* Dastur, DNA fingerprinting, genotypes, retrotransposon

## 二、緣由與目的

疫病菌 *Phytophthora parasitica* Dastur 之寄主種類非常廣，重要果樹、觀賞植物及花卉，像鳳梨、柑桔、百香果、百合、火鶴花、蘭花、蔓綠絨與黃金葛，及一些重要盆花植物等都是其肆虐對象(1, 2, 5-7)。安 (3) 最近之調查結果更顯示，疫病菌在本省之寄主種類至少包括 46 屬 54 種作物，是本地非常重要的植物病原真菌。由於疫病菌的寄主範圍這麼廣，在本省的為害情形又十分嚴重，在考量本菌之防治策略時，勢必得先對各不同寄主分離到之疫病菌株的特性，包括這些菌株的來源是否相同、對其他寄主植物之致病情形如何、及其病原性之差異等問題有所認識，才能擬出有效對策。之前的研究顯示，自不同寄主分離到之疫病菌株對不同作物所表現之病原性與致病力不盡一致 (10, 12, 16)。安之研究 (3) 也指出，自其它寄主分離到之疫病菌株均不能感染萬年青或煙草，或致病力非常弱，而自煙安草分離到之疫病菌株雖可為害其它寄主植物，卻不能為害萬年青。此外，自萬年青分離到之菌株對其它接種植物之致病力一般比較弱，也不能感染煙草，顯示菌系間病原性有差別，寄主範圍也不同，可能已有分化現象。事實上，依據病原性、形態、生理等特性之差別，本地疫病菌大概可分為四個類型 (4)，分別是(一)、typical type A，可危害一般疫病菌之寄主，但不危害煙草，為多犯性，從前被稱為 *P. parasitica* var. *parasitica* (或 *P. nicotianae* var. *parasitica*)；(二)、煙草型

(或 type B)，可危害煙草，從前稱為 *P. parasitica* var. *nicotianae* (或 *P. nicotianae* var. *nicotianae*)；(三)、黛粉葉型與 (四)、枇杷型；後兩者在形態、生理、與病原性各面都與 typical types 有相當差異。這些疫病菌在遺傳組成上是否均一，抑或已經發生某種程度之分化，以及這些分化是否直接關係到疫病菌病原性、形態及生理等各項性質之差異是很有趣而且重要的課題。本計劃擬藉 DNA 指紋分析來探討不同寄主植物分離到之疫病菌株的基因型及變異情形，期能對本省疫病菌菌種基因型之結構及可能存在之分化情形有所瞭解，也可作為未來進行疫病菌病原性及族群遺傳相關研究之參考。

## 三、結果與討論

為了獲得適用的核酸片段以便進行 DNA 指紋分析，我們首先自疫病菌基因庫任意挑選了 20 個 clones，再逐一製備核酸探針，並進行基因組南方雜合分析 (genomic Southern hybridization analysis)。實驗結果顯示，其中惟有編號 88 之 clone 比較有趣；以 *Eco*R1 或 *Xho*I 等限制 酵解疫病菌 DNA，並以 88 為核酸探針進行南方雜合分析時，分離自煙草之疫病菌株所呈現的雜合圖譜很明顯地與其他供試菌株不同。不過，由於這一個探針只能偵測到 1-2 個核酸片段，並不適用於 DNA 指紋分析，我們另外還嘗試探討反轉錄轉位在疫病菌之存在情形，及以之為核酸探針進行 DNA 指紋分析的可行性。

反轉錄轉位子為一段可在染色體上進行移動的序列，但與一般轉位子不同的是，其在移動過程中必須先將序列轉錄成 RNA，並由反轉錄 將此 RNA 轉換成雙股 DNA 後，再插入新的位置 (9)。而由於反轉錄轉位子每次進行轉位時都得複製出一

份新的序列，一旦進駐生物體內後，其拷貝數常會越累積越多，是生物體內重複性序列的重要組成。目前已有一些研究顯示，自基因庫篩選重複性序列以便進行 DNA 指紋分析時，研究人員所獲得的事實上就是一些反轉錄轉位子序列 (10, 14, 15)。為了探討反轉錄轉位在疫病菌之存在情形，我們首先以反轉錄之保守性序列進行聚合-連鎖反應，並獲得一個與預期長度接近之 DNA 片段。進一步進行 TA 選殖及序列分析的結果顯示，其核酸序列 (編號 G2Ty-1) 與果蠅、酵母菌、及煙草等的 Ty1-*copia* group 反轉錄轉位子的反轉錄序列之相似度將近 60%。胺基酸序列分析的結果也顯示，其包含序列 SLYXLKQAXRXW；這個序列是 Ty1-*copia* group 反轉錄轉位在反轉錄區域具有指標意義的重要保守性序列 (13)。因此疫病菌非常可能含有 Ty1-*copia* group 反轉錄轉位子。

以 *Eco*RI 酵解基因組 DNA，並以 G2Ty-1 為探針進行南方雜合分析時，疫病菌分離株 91195 總共呈現將近 20 個雜合條帶，分離株 87112 所呈現之雜合條帶則多達 25 個，而且各菌株所呈現之雜合圖譜有明顯的多型性，顯示此核酸片段有相當潛力可應用於 DNA 指紋分析。為了瞭解 G2Ty-1 的遺傳穩定性，我們首先探討在一般培養條件下，疫病菌反轉錄轉位子會不會轉位。由於反轉錄轉位子轉位時一定得表現反轉錄，因此我們進行了北方雜合分析與反轉錄-聚合-連鎖反應，以便偵測反轉錄轉位子 RNA 之表現情形，不過截至目前為止都偵測不到反轉錄轉位子之 RNA，顯示在目前的培養條件下，疫病菌反轉錄轉位子很有可能無法進行轉位，因此其在各疫病菌分離株之分佈情形相當程度即呈現了這些菌株彼此之間的類緣關

係。此外，為了探討 G2Ty-1 在疫病菌無性繁殖過程中的穩定性，我們收集疫病菌孢子囊、刺激其釋放游走子 (zoospore)、待游走子發芽後進行繼代培養，目前已收集到第五代，近期內即擬進行南方雜合反應，以便分析各代疫病菌株間，反轉錄轉位子雜合圖譜之異同情形。另一方面，為了瞭解以 G2Ty-1 為核酸探針進行南方雜合分析時，圖譜上各個雜合條帶的遺傳性質，及其在疫病菌有性繁殖過程的穩定性，我們也嘗試選取分屬於 A<sup>1</sup> 與 A<sup>2</sup> 配對型之疫病菌菌株進行對峙培養、分離 A<sup>1</sup> 與 A<sup>2</sup> 配對產生之卵孢子 (oospore)，再參照 Ann and Ko (1988) 建立卵孢子發芽系統。由於卵孢子發芽條件不容易掌握，這部份的研究進度稍有延宕，不過現在已經不成問題了，即將進一步進行南方雜合分析，以便判斷雜合圖譜上各個條帶在 F1 的分離情形。

#### 四、計畫成果自評

我們的研究結果顯示，在疫病菌所發現之反轉錄轉位子序列具有相當潛力可作為進行疫病菌 DNA 指紋分析時所需要之核酸探針。不過，在正式進行 DNA 指紋分析之前，一定得先對這個序列的基本遺傳性質有所了解。在進行其遺傳穩定性測試時，碰到的困難主要來自建立卵孢子發芽系統，這一部份工作耗費相當多時間，所幸目前問題都已經解決了。

#### 五、參考文獻

1. 安寶貞。1989。台灣柑桔之疫病。台灣省農業試驗所專刊 27, 212-221。
2. 安寶貞。1995a。台灣蘭花之疫病。植

- 保會刊 4, 152-162。
3. 安寶貞。 1995b。 疫病菌 *Phytophthora parasitica* 之病原性及生物學研究。 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果 報告。
  4. 安寶貞。 1997。 Personal communication。
  5. 安寶貞、羅朝村、謝庭芳。 1992。 台灣百合之疫病。 植保會刊 34, 65-69。
  6. Ann, P.J. 1992a. *Phytophthora* diseases of ornamental plants in Araceae in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 1, 79-89.
  7. Ann, P.J. 1992b. New diseases and records of some important flower plants caused by *Phytophthora parasitica* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 1, 166-173.
  8. Ann, P.J. and Ko, W.H. 1988. Induction of oospore germination of *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 78, 335-338.
  9. Boeke, J.D. and Sandmeyer, S.B. 1991. Yeast transposable elements, p. 193-261. In The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: genome dynamics, protein synthesis, and energetics, vol. 1. Broach, Pringle, and Jones (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. USA.
  10. Bonnet, P., Maia, N., Tello-Marquina, J., and Venard, P. 1978. Pathogenic capacity of *Phytophthora parasitica* [Dastur]: Factors on variability and concept of parasitic specialization. Ann. Phytopathol. 10, 15-29.
  11. Diolez, A., Marches, F., Fortini, D., and Brygoo, Y. 1995. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 103-108.
  12. Erwin, D.C. 1964. A strain of *Phytophthora parasitica* from okra and its sexual compatibility with isolates from citrus. Phytopathology 54, 114-115.
  13. Flavell, A.J., Dunbar, E., Anderson, R., Pearce, S.R., Hartley, R., and Kumar, A. 1992. Ty1-*copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. Nucl. Acid Res. 20, 3639-3644.
  14. Hamer, J.E., Farrall, L., Orbach, M.J., Valent, B., and Chumley, F.G. 1989. Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9981-9985.
  15. He, C., Nourse, J.P., Kelemu, S., Irwin, J. A., Manners, J. M. 1996. Cg T1: a non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. Mol. Gen. Genet. 252, 320-331.
  16. Matheron, M.E. and Matejka, J.C. 1990. Differential virulence of *Phytophthora parasitica* recovered from citrus and other plants to rough lemon and tomato. Plant Dis. 74, 138-140.