

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 (III)

計畫編號：NSC88-2313-B-002-009

執行期限：87年8月1日至88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) 可危害之寄主種類繁多，是本省非常重要的植物病原菌。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。本計畫試以疫病菌反轉位子，PARTN1，之局部序列為遺傳標記進行疫病菌基因型分析，以便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。對 46 株疫病菌菌株進行基因組南方雜合分析的結果顯示，各菌株所呈現之雜合圖譜變異性相當大，但以 PARTN1 為核酸探針確實可以明確區分自煙草、萬年青、或枇杷所分離到之疫病菌株；之前的研究也顯示這些菌株不論在病原性、型態、或生理等特性都與典型疫病菌株有所差異。因此以反轉位子序列為探針進行基因型分析確實可以反映出菌株間的類緣關係，至於其他供試菌株之雜合圖譜為何變化多端仍待進一步深入研究。

關鍵詞：反轉位子、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. 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, using reverse transcriptase sequence of PARTN1 as a genetic marker. PARTN1 is a copia-like retrotransposon identified in this fungus. A total of 46 *P. parasitica* isolates were analyzed. The results indicate that, although the hybridization patterns obtained for each isolate are highly polymorphic, PARTN1 can indeed distinguish *P. parasitica* isolated from (1) tobacco, (2) dieffenbachia, or (3) loquat, which are known as atypical *P. parasitica*. Thus, PARTN1 could be very useful in studies on the phylogenetics and population biology of *P. parasitica*.

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

二、緣由與目的

疫病菌 *Phytophthora parasitica* Dastur (= *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan) 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菌株均不能感染萬年青或煙草，或致病力非常弱，而自煙草分離到之疫病菌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)、典型疫病菌，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，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、與病原性各方面都與典型疫病菌有相當差異。這些疫病菌是否已經發生某種程度之分化，以及這些分化如何影響到疫病菌病原性、形態及生理等各項性質之差異是我們很感興趣的課題。

反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位子序列 (10, 14, 15)。目前的研究發現，疫病菌主要帶有兩類屬於 Ty1-copia group 之反轉位子，PARTN1 與 PARTN2 (之前暫時稱為 parX 與 parY；?)。本計劃擬以 PARTN1 之局部序列為探針進行 DNA 指紋分析，以便解析自不同寄主植物分離到之疫病菌菌株之基因型，期能對本省疫病菌基因型之結構及其可能存在之分化情形有所瞭解，俾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

為了瞭解疫病菌無性繁殖過程中，PARTN1 分佈圖譜之存在情形，我們以四個菌株 731-0, 991-3-1, PPPr 1-1, 及 PPT 2-1 進行無性繁殖，並收集各菌株連續五個無性世代的菌絲 DNA 進行基因組南方雜合分析，結果發現各供試菌株連續五個無性世代所呈現之雜合圖譜相當一致，並沒有發生明顯的變化，顯示在南方雜合圖譜可偵測的範圍內，PARTN1 在疫病菌無性世代遺傳過程相當穩定，並無明顯轉位現象發生，可進一步用來進行 DNA 指紋分析。

進一步以 PARTN1 局部序列為核酸探對 46 個疫病菌菌株進行 DNA 指紋分析時，發現各菌株所呈現之雜合圖譜變異性相當大，不過來自煙草的分離株，包括 PPT 1-1、PPT 1-2、PPT 2-1、PPT 2-4、PPT 3-1、與 PPT 4-1 的雜合圖譜完全一樣；來自萬年青 (PPD

1 與 PPD 2-1) 及枇杷 (95023 與 95034) 的分離株也各自呈現特定圖譜，顯示前述三類被區分為非一般型菌株的分離株各自有特定的基因型。另外值得一提的是，96085 雖然也是分離自枇杷，但其一般特性有別於前述兩個枇杷分離株，95023 與 95034，而比較接近典型的疫病菌 (Chern *et al.*, 1998)。由 PARTN1 之雜合圖譜來看，96085 之基因型也確實與 95023/ 95034 不同。此外，自港坪里芝麻所分離到的疫病菌菌株之 PARTN1 雜合圖譜與前述六株煙草的基因型一樣，但一樣是自煙草所分離到之 PPT 5 則差異頗大，顯示此株疫病菌之起源可能與其他煙草分離株相當不同。因此，以反轉位子序列為探針進行基因型分析確實可以反映出菌株間的類緣關係。而至於為何其他供試菌株所呈現之 PARTN1 雜合圖譜變異相當大，這是否意味著事實上 PARTN1 仍在進行轉位，則待進一步探討。

四、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. 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.
9. 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.
10. Chern, L.L., P.J., Ann, and H.R., Young. 1998. Root and foot rot of loquat in Taiwan caused by *Phytophthora*. Plant Dis. 82, 651-656.
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. 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.
- 14.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.
- 15.Lee, H.C., Huang, W.H., Ann, P.J., and Liou, R.F. 1998. *Phytophthora parasitica* Dastur contains two different types of Ty1-copia retrotransposon. (Abs.) Plant Pathol. Bull. 7, 213.
- 16.Matheron, M.E. and Matejka, J.C. 1990. Differential virulence of *Phytophthora parasitica* recovered from citrus and other plants to rough lemlon and tomato. Plant Dis. 74, 138-140.