

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

疫病菌致病分子機制之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-063-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學植物病理與微生物學系暨研究所

計畫主持人：劉瑞芬

計畫參與人員：顏豪志、鄭恬恬

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 10 月 5 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中進度報告

疫病菌致病分子機制之探討

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2313-B-002-063

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：劉瑞芬

共同主持人：

計畫參與人員：顏豪志、鄭恬恬

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐ 赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年☐ 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學植物病理與微生物學系

中華民國 93 年 10 月 5 日

中文摘要

疫病菌(*Phytophthora parasitica* Dastur, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)不僅寄主範圍廣泛，造成的危害也極為嚴重，是非常重要的植物病原真菌。近年來關於疫病菌誘導性物質及其在植物可能引發之抗病反應的研究頗多，但對於疫病菌因應植物訊息的傳入會啟動哪一類訊息傳導途徑，並引發哪些致病相關基因的表現目前仍不清楚。為了探討訊息傳導途徑 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway 在疫病菌致病過程之重要性，本研究首先進行疫病菌 MAP kinase 基因之選殖與特性分析。研究結果顯示，疫病菌至少含 4 個 MAP kinase 基因，分別命名為 ppmk1.1, ppmk1.2, ppmk2 與 ppmk3，其胺基酸序列與其他病原真菌之 MAP kinase 具有相當顯著之保守性。基因組南方雜合分析之結果顯示，疫病菌各含單一 copy 之 ppmk1.1, ppmk1.2 及 ppmk3 基因，但除 ppmk2 基因外，可能還有其他 ppmk2 同源性序列。這些 MAP kinase 在疫病菌生理、生活史及致病過程可能扮演之角色仍待進一步探討。

關鍵詞：疫病菌、致病機制、MAP kinase

Abstract

Phytophthora parasitica Dastur (= *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan), an oomycete plant pathogen, caused severe diseases in a wide variety of plant species. In eukaryotes, the MAP kinase pathways are activated in response to a wide variety of extracellular signals, and thereby regulate the processes of growth, differentiation, and pathogenesis in many organisms. As a first step to investigate the role of MAP kinase pathway in the pathogenesis of *P. parasitica*, full-length cDNA encoding MAP kinase was obtained by reverse transcription-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). A total of 4 genes were identified, designated as ppmk1.1, ppmk1.2, ppmk2, and ppmk3, respectively. Analysis by genomic Southern hybridization revealed the existence of a single copy of ppmk1.1, ppmk1.2, and ppmk3, respectively, in the genome of *P. parasitica*. However, more than one band were detected with ppmk2, suggesting the presence of other ppmk2-like sequence. Analysis of the deduced amino acid sequences indicated that the MAP kinases of *P. parasitica* were highly conserved with those of fungal pathogens. Possible roles of each MAP kinase in the physiology, life cycle, and pathogenesis of *P. parasitica* await further investigation.

Key words: *Phytophthora parasitica*, pathogenesis, MAP kinase

前言

Phytophthora 屬於卵菌綱(Oomycetes)，露菌目(Peronosporales)，霉腐菌科(Pythiaceae)，包含將近 60 種疫病菌，其中多種為世界性重要病原菌，包括 *P. parasitica*, *P. cinnamomi* 與 *P. cactorum* 等寄主範圍廣泛，可以危害多種作物的疫病菌，及寄主範圍較窄，但所造成之經濟損失一樣不容忽視的 *P. infestans* 與 *P. sojae* 等(Erwin and Ribeiro, 1996)。長期以來卵菌一直被歸屬為“真菌”，但近年來針對 18S rRNA、actin 及 tubulin 等基因之核酸序列、細胞壁組成與賴胺酸生合成途徑所進行的分析顯示，卵菌與矽藻、褐藻之類緣關係較近，與一般真菌(true fungi)的類緣關係反而比較遠，因此目前已被歸類至 Stramenopila (Sogin and Silberman, 1998)。也因為疫病菌與其他真菌在類緣及生理特性上的差異，適用於防治一般真菌病害的殺菌劑並不見得可以有效防治 *Phytophthora* spp. 所引起的病害，而針對卵菌綱病原菌所特別開發的殺菌劑如滅達樂，又常很快就有抗藥性問題，因此由疫病菌所造成之植物病害一直是相當棘手的問題。

病原菌在侵染植物時，與寄主植物之“接觸”會引發病原菌致病相關基因的表現，而因應病原菌的入侵，寄主植物也會表現防禦反應(defense response)。因此，不論是自病原菌或植物的觀點，訊息傳導途徑勢必在兩者之交互作用扮演相當重要的角色。近年來疫病菌誘導性物質及其在植物可能引發之抗病反應的相關研究頗多，但對於疫病菌因應植物訊息的傳入會啟動哪一類訊息傳導途徑，並引發哪些致病相關基因的表現目前仍不清楚(Huitema et al., 2004)。MAP kinase pathway 是真核生物各種訊息傳導途徑中研究最為廣泛、且最為重要的途徑，其主要由 MAPK kinase kinase (M3K), MAPK kinase (M2K) 及 MAP kinase 串聯組成。M3K 為一 serine/threonine kinase，當有訊息自胞外傳遞至胞內時，M3K 之激酶活性被活化，並磷酸化下游之 M2K，被活化之 M2K 旋即對 MAP kinase 之 Thr-X-Tyr motif 進行磷酸化反應，並活化其激酶活性。MAP kinase 之作用基質可能是 transcription factors，但也可能是其他 protein kinases, phospholipase 或 cytoskeleton-associated proteins，當作用在 transcription factors 時，即可因而啟動特定基因之表現，是以 MAP kinase 可視為 MAP kinase pathway 之核心分子(Widmann et al. 1999; Xu, 2000)。酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 含有 5 個 MAP kinase，分別參與不同訊息傳導途徑：Fus3 (費洛蒙反應)、Kss1 (菌絲型生長)、Slf2 (細胞壁增厚)、Hog1 (高滲透壓逆境)，與 Smk1 (ascospore 之形成) (Gustin et al., 1998)。此外，在裂殖酵母菌 *Schizosaccharomyces pombe* 及人體重要病原真菌 *Candida albicans* 的研究也指出，MAP kinase 在這些真菌的生理和致病過程都扮演十分重要的角色(Navarro-Garcia et al. 1995; Csank et al. 1998; Alonso-Monge et al. 1999)。

植物病原真菌 MAP kinase 之相關研究目前以稻熱病菌(*Magnaporthe grisea*)較多，稻熱病菌致病過程中各式侵染構造之分化皆是透過 MAP kinase pathway 進行訊息傳導，目前在稻熱病菌已被發現的 MAP kinase 基因包括 Pmk1、Mps1 及 Osm1：Pmk1 屬於 FUS3/KSS1 family，主要控制稻熱病菌附著器的形成及其在寄主植物之 colonization，但是與菌絲生長及產孢沒有關係；Mps1 屬於 SLT2 family，與稻熱病菌貫穿植物表皮細胞、產孢及細胞壁的完整性有關；Osm1 屬於 HOG1 family，功能缺失時會造成稻熱病菌在高滲透壓環境之菌絲生長受阻，但與附著器內甘油濃度之累積及致病性無關(Xu et al., 1996; Xu, 2000)。此外，研究也發現 MAF1 在 *Colletotrichum lagenarium* 壓器分化早期扮演重要角色(Kojima et al., 2002)，Smk1 為 *Sclerotinia sclerotiorum* 菌核形成過程之重要調控因子(Chen et al., 2004)，而 tvk1 則參與 *Trichoderma virens* 與超寄生有關之分泌性酵素的基因表現調控(Mendoza-Mendoza et al., 2003)，其他研究也顯示 MAP kinase 在 *Cochliobolus heterostrophus*,

Pyrenophora teres 及 *Ustilago maydis* 等多種病原真菌之生活史及致病過程扮演重要角色(Lev *et al.* 1999; Ruiz-Roldan *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1999, 2003)。為了探討 MAP kinase pathway 在疫病菌致病過程之重要性，本研究首先進行 MAP kinase 基因之分子選殖與序列特性分析，以便了解 MAP kinase 在疫病菌之存在情形。

材料與方法

菌株來源與保存

本研究所分析之疫病菌菌株由台灣農試所安寶貞博士所提供。要進行長期保存時，先將疫病菌接種在 5 % V8 培養基(5% Campbell's V-8 juice, 0.02% CaCO₃ and 2% Bacto agar)，放置於 25°C 培養一週後，切成 0.5 cm 見方之菌絲塊放入無菌水中保存。

疫病菌 DNA 之純化

要進行疫病菌 DNA 純化時，將疫病菌接種於 5% V-8 培養基(5% Campbell's V-8 juice, 0.02% CaCO₃)，放置於 25°C 下培養 7~10 天後，收集菌絲，並以 ddH₂O 沖洗，置於-80°C 冷凍櫃保存備用。疫病菌 DNA 以 DNeasyTM Plant mini Kit (Qiagen) 進行純化，所有步驟均參照廠商所提供之建議進行。

疫病菌 RNA 之純化

依前述方式所獲得之疫病菌菌絲，自-80°C 取出後，加入液態氮研磨至成細微粉末後，以 Plant Total RNA extraction kit (Viogene)純化 RNA；Poly(A)⁺ RNA 的製備採用 Dynabeads mRNA purification kit (DYNAL)，所有步驟均參照廠商所提供之方法進行。

Touch down PCR

以 degenerated primers 進行 MAP kinase 基因之選殖時，採用 touch down PCR，反應開始時以較高的 annealing temperature 進行 PCR，之後，每一個循環逐步降低 annealing temperature，以便以適當溫度增幅 DNA。

5'-與 3'-RACE

以疫病菌 Poly(A)⁺ RNA 進行第一股 cDNA 之合成。進行 RACE 時採用 SMARTTM RACE cDNA amplification kit (Clontech)，實驗過程參照廠商所提供之方法。進行 5'-與 3'-RACE 所需要之核酸引子為根據序列資料庫所提供之資訊進行設計。5'-與 3'-RACE 擴增產物以 GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) 回收後，先選殖至 T-vector (pGEM-Teasy, Promega)，再進行核酸定序。定序反應採用 ABI PRISM[®] BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit，依 dideoxy termination method 進行，並以 ABI310 自動化核酸序列分析儀進行序列解讀。核酸序列分析採用 GCG 序列分析軟體 (Genetics Computer Group, Wisconsin Package Version 10.0)。

基因組南方雜合分析

疫病菌 DNA 以限制酶於 37 °C 酵解 16 小時後，以 0.8 % agarose gel / 1X TAE 進行電泳分析。核酸轉印反應採用毛細管轉移法；轉印隔夜後，取出尼龍膜，以 6X SSC 漂洗，並放置於 3MM 濾紙上風乾後，即可進行雜合反應。雜合反應所使用之核酸探針以 PCR probe synthesis kit (Roche) 進行標定，反應步驟主要參照產品說明書之建議，反應物包括 0.5 μM 引子對、1X PCR buffer，2 μl DIG-NTP mixture、0.1 μg DNA template、及 1U Taq DNA polymerase。雜合反應完成後，雜合訊息之偵測採用 anti-DIG antibody-alkaline phosphatase conjugate (Roche)，並以 CDP-star (BioLab) 為 alkaline phosphatase 之作用基質。

結果與討論

進行疫病菌 MAP kinase 基因之分子選殖時，我們先自 *Phytophthora* EST database 搜尋 MAP kinase 相關序列(Waugh *et al.*, 2000)，但一直無法找到 MAP kinase 序列，故只好轉而收集已發表之真菌 MAP kinase 序列，再根據保守性胺基酸序列設計 degenerate primers，並以 reverse-transcriptase PCR (RT-PCR)進行核酸序列選殖，後續再進一步應用 RACE 取得 MAP kinase 基因之全長度 cDNA 序列。序列分析結果顯示疫病菌至少含有 4 個 MAP kinase 基因，分別命名為 ppmk1.1, ppmk1.2, ppmk2 與 ppmk3。以疫病菌基因組 DNA 進行南方雜合分析時發現，經不同限制酶酶解，再以 ppmk1.1, ppmk1.2 或 ppmk3 為核酸探針進行雜合反應時，皆只出現一主要雜合條帶，顯示這三個基因應為單一 copy，但以 ppmk2 為核酸探針進行雜合反應時，除主要條帶外還可發現其他微弱的雜合訊號，這是否意味著疫病菌可能含有其他 ppmk2 同源性序列仍待進一步研究(圖一)。

將這些基因之 deduced amino acid sequences 與其他病原真菌的 MAP kinase 胺基酸序列進行多序列併列分析，包含 Bmp1 of *Botrytis cinerea* (Zheng *et al.*, 2000), Ptk1 of *Pyrenopeziza teres* (Ruiz-Roldan *et al.*, 2001), Chk1 of *Cochliobolus heterostrophus* (Lev *et al.*, 1999), Cmk1 of *Colletotrichum lagenarium* (Takano *et al.*, 2000), Pmk1 of *Magnaporthe grisea* (Xu and Hamer, 1996), Fsmapk of *Nectria haematococca* 及 Kpp2-Ubc3 of *Ustilago maydis* (Muller *et al.*, 1999)。分析結果顯示，疫病菌 MAP kinase 與其他病原真菌間具有相當顯著之保守性，也含有編號 I 至 XI 之 conserved domains of protein kinase (Hanks and Quinn, 1991)，及位於 conserved domain VIII 附近、具高度保守性之 TEY 序列(圖二)；TEY motif 之 threonine 與 tyrosine 為 M2K 對 MAP kinase 進行磷酸化反應時之作用點，藉以活化 MAP kinase 之激酶活性(Kültz, 1998)。

在酵母菌，Fus3 主要參與性費洛蒙反應之訊息傳遞，SLT2 則與感受營養、溫度、低滲透壓等環境因子之變化有關。植物病原真菌的相關研究顯示，與酵母菌 Fus3 較相似的 MAP kinase，包括 Bmp1, Chk1, Ptk1, Pmk1, Fsmapk, 及 Ubc3/Kpp2，皆與病原菌的致病力有關，其中 Kpp2 還參與 *U. maydis* mating 之訊息傳導及絲狀菌絲生長之調控(Muller *et al.*, 2003)，而 Chk1 與 Ptk1 則分別控制 *Cochliobolus heterostrophus* 與 *Pyrenopeziza teres* 之產孢與吸器分化(Lev *et al.*, 1999, Ruiz-Roldan *et al.*, 2001)。胺基酸序列分析結果顯示，ppmk1.1 及 ppmk2 與 Fus3 family 之 MAP kinase 相似度最高，而 ppmk1.2 及 ppmk3 則與 SLT2 family 之 MAP kinase 相似度較高，但序列特性是否真能反映其生理功能、不同 MAP kinase 在疫病菌生理、生活史及致病過程可能扮演之角色等問題都還待進一步探討。

參考文獻

- Alonso-Monge, R., Navarro, G.F., Molero, G., Diez, O.R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M., and Nombela, C. 1999. Role of the mitogen activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 181: 3058–3068.
- Chen, C., Harel, A., Gorovoits, R., Yarden, O., and Dickman, M. B. 2004. MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing. MPMI 17: 404-413.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. 1998. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase

- homologue, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* 66: 2713–2721.
- Erwin, D. C., O. K. Ribeiro., 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, the American Phytopathological Society, Minnesota.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1264–1300.
- Hanks, S. K., and Quinn, A. M. 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family member. *Methods Enzymol.* 200: 38-62.
- Huitema, E., Bos, J. I. B., Tian, M., Waugh, M. E., and Kamoun, S. 2004. Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*-plant interactions. *Trends Microbiol.* 12: 193-200.
- Kojima, K., Kikuchi, T., Takano, Y., Oshiro, E., and Okuno, T. 2002. The mitogen-activated protein kinase gene MAF1 is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *MPMI* 15: 1268-1276.
- Kültz, D. 1998. Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinase. *J. Mol. Evol.* 46: 571-588.
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H., and Horwitz, B. A. 1999. A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13542-13547.
- Mendoza-Mendoza, A., Pozo, M. J., Grzegorski, D., Martinez, P., Garcia, J. M., Olmedo-Monfil, V., Cortes, C., Kenerley, C., and Herrera-Estrella, A., 2003. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15965-15970.
- Muller, P., Aichinger, C., Feldbrugge, M., and Kahmann, R. 1999. The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 34: 1007-1017.
- Muller, P., Weinzier, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M. and Kahmann, R. 2003. Mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Euk. Cell* 2: 1187-1199.
- Navarro-Garcia, F., Sanches, M., Pla, J., and Nombela, C. 1995. Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homologue related to cell integrity. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2197–2206.
- Ruiz-Roldan, M.C., Maier, F. J. and Schafer, W. 2001. PTK1, a mitogen-activated-protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *MPMI* 14: 116-125.
- Sogin, M.L., and Silberman, J.D. 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int. J. Parasitol.* 28:11-20.
- Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J. E., Mise, K., and Furusawa, I. 2000. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *MPMI* 13: 374-383.

- Waugh, M., Hraber, P., Weller, J., Wu, Y., Chen, G., Inman, J., Kiphart, D., and Sobral, B. 2000. The *Phytophthora* genome initiative database: informatics and analysis for distributed pathogenomic research. *Nucleic Acids Res.* 28:87-90.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79: 143-180.
- Xu, J. R. 2000. MAP kinases in fungal pathogens. *Fung. Genet. Biol.* 31: 137–152.
- Xu, J. R., and Hamer, J. E. 1996. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.* 10: 2696-2706.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S. and Xu, J. R. 2000. The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *MPMI* 13: 724-732.

病原菌致病機制所涉層面相當廣泛，先前之研究多半著重於探討病原菌分泌性酵素，包括各類果膠質分解酵素(pectinase)、幾丁質分解酵素(chitinase)及 β -1,3-葡聚醣酶(glucanase)等之重要性，但近年來隨著分子生物學的蓬勃發展，研究範疇也逐漸擴展至訊息傳導途徑。本研究根據計畫所規劃之內容，針對重要病原菌 *P. parasitica* 之 MAP kinase 基因進行分子選殖與核酸序列分析工作，為目前尚屬空白之疫病菌 MAP kinase pathway 相關研究領域提供重要訊息，不過更重要的是進一步探討這些基因在疫病菌生理、生活史及致病過程可能扮演之角色，這也是我們第二年度計畫正努力要解決的問題。這些研究不僅可讓我們瞭解疫病菌致病過程所牽涉之訊息傳導機制，也可望為疫病菌防治工作開拓新的途徑。

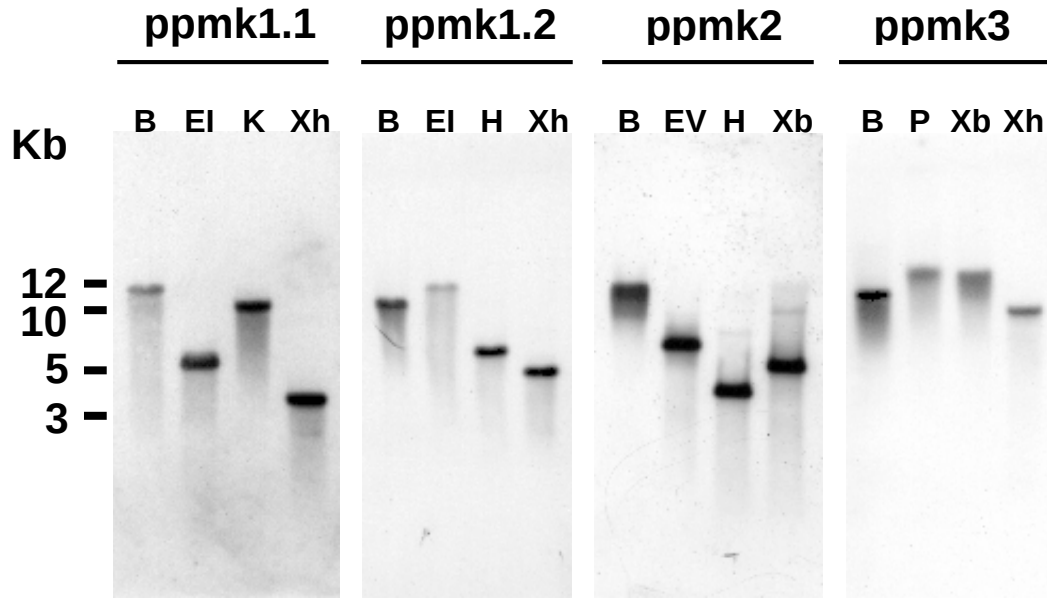


Fig. 1 Genomic Southern hybridization analysis of *Phytophthora parasitica*. Following digestion with indicated restriction enzymes, DNA was subjected to Southern hybridization analysis, using DIG-labeled ppmk1.1, ppmk1.2, ppmk2, or ppmk3 as the probe: *Bam*HI (B), *Eco*RI (EI), *Eco*RV (EV), *Hind*III (H), *Kpn*I (K), *Pst*I (P), *Xba*I (Xb), or *Xho*I (Xh).

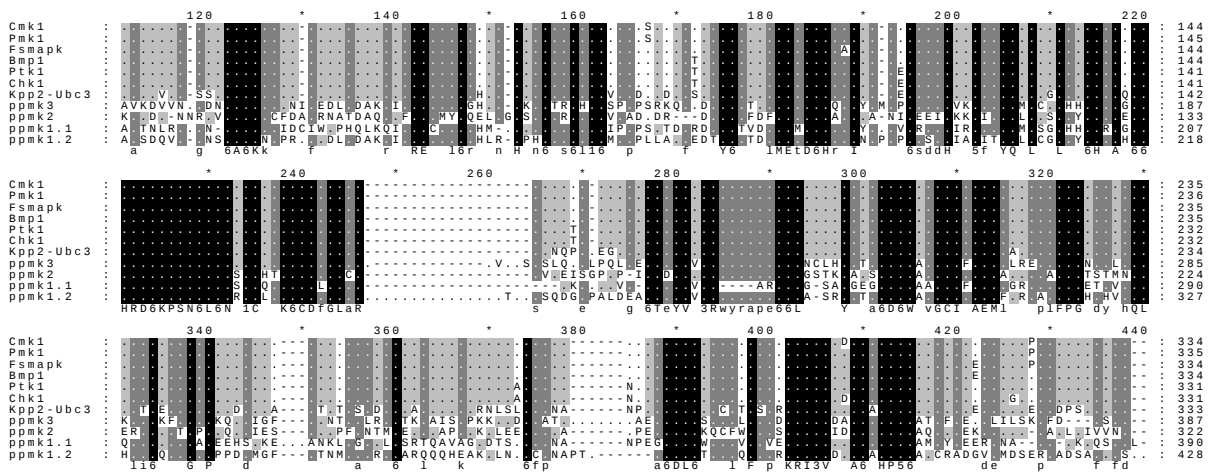


Fig. 2 Multiple sequence alignment of MAP kinases. The sequences analyzed included Bmp1 of *Botrytis cinerea*, Ptk1 of *Pyrenopeziza teres*, Chk1 of *Cochliobolus heterostrophus*, Cmk1 of *Colletotrichum lagenarium*, Pmk1 of *Magnaporthe grisea*, Fsmapk of *Nectria haematococca* and Kpp2-Ubc3 of *Ustilago maydis*, deduced amino acid sequences of ppmk1.2, ppmk1.2, ppmk2, and ppmk3 of *Phytophthora parasitica*. Only sequences highly conserved among these genes were shown in this figure.