

植物 *Phoma* 病原之分子檢測

曾顯雄 教授

國立台灣大學植物病理與微生物學系

電子郵件：sst@ntu.edu.tw；傳真：02-3366-4595

摘 要

藉由探討 *Phoma* 屬內黑色素生合成相關基因 polyketide synthase(PKS)和 scytalone dehydratase(SD)之有無或種間序列之差異性，當為設計鑑別用基因探針之依據。由 PKS 之 ketoacyl synthase domain 及 SD 的基因序列，設計、獲得六組專一性引子對，可應用於檢測防檢疫菌株 *P. adianticola*、*P. bismarckii*、*P. clematidina*、*P. fallens*、*P. exigua* 及 *P. sorghina*。本研究首次證明，可成功應用黑色素生合成相關基因鑑別植物病原真菌，期冀此結果可應用於重要植物防檢疫真菌生物晶片之研發，及農作物進出口之檢測，以有效防杜類似病原菌之意外入侵。

關鍵詞：*Phoma*、polyketide synthase、scytalone dehydratase、ketoacyl synthase、植物病原真菌

Molecular diagnosis of plant *Phoma* pathogens

S. S. Tzean, PhD, Professor

Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

E-Mail: sst@ntu.edu.tw; Fax: 02-3366-4595

Abstract

Six sets of degenerate specific primers derived from the scytalone dehydratase and ketoacyl synthase domain of polyketide synthase genes were demonstrated to be able to distinguish six species of important quarantine plant fungal pathogens in *Phoma* genus including *P. adianticola*, *P. bismarckii*, *P. clematidina*, *P. fallens*, *P. exigua* and *P. sorghina*. To the best of our knowledge, this is the first time proved that the genes responsible for melanin biosynthesis can be successfully applied to the identification of crucial plant pathogenic fungi. The outcome possibly could found a basis for microarray design for simultaneous inspection and quarantine purpose for the imported or exported agricultural commodities.

Key words: *Phoma*, polyketide synthase, scytalone dehydratase, ketoacyl synthase, plant fungal pathogens

緒 言

Phoma 屬內包含多種重要性之植物病原菌，*Phoma adianticola* 可為害水龍骨科 (Polypodiaceae) 植物，此菌最早在波多黎各的脆鐵線蕨 (*Adiantum tenerum*) 上被分離出。而 *P. bismarckii* 則普遍存在於蘋果 (*Malus pumila*) 枯枝上，但此菌可為害蘋果的根皮層，並與 *P. pomorum* 產生相似之病徵，但經培養後 *P. bismarckii* 無法在培養基上產生厚膜孢子，亦有報告指出曾在紐西蘭的美洲胡桃 (*Carya pecan*) 上也分離出此病原菌，此病原菌可引起美洲胡桃葉部葉斑。*P. clematidina* 主要為害 *Clematis* spp. (Ranunculaceae)，引起之主要病徵為葉斑及莖枯，此病原菌之孢子形態變化大。*P. exigua* 為土壤性病原菌，具廣泛性的寄主範圍，在歐洲超過 200 種寄主植物曾分離出此病原菌。該菌可引起菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 之 speckle disease、胡蘿蔔 (*Daucus carota*) 根腐、菊苣 (*Cichorium intybus*) 之根黑腐及馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 壞疽等病徵。*P. fallens* 可引起油橄欖 (*Olea europaea*) 葉片及果實上之斑點，廣泛存於油橄欖生長之區域。*P. sorghina* 為世界性的土媒及種媒真菌，此病原菌主要危害禾本科作物，可引起高粱、水稻、甘蔗等作物葉片、穎果及種子上的病斑，並會造成根腐及植株猝倒。

由於 *Phoma* 屬內之成員皆會產生黑色或近黑色之菌絲、柄子殼，推測此等特徵應和黑色素 (melanin) 之累積有所關聯。許多研究報告指出真菌黑色素的生合成，通常與真菌的存活或與侵染植物之病原性有關，以稻熱病菌 (*Magnaporthe grisea*) 和炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 為例，在壓器 (appressorium) 沒有黑色素累積的情況下，病原菌皆無法成功侵染寄主植物。不同種類之真菌，其黑色素生合成途徑亦有所不同，依據 Bell 和 Wheeler (1986) 之描述，子囊菌門及不完全菌門之黑色素存在於細胞壁，其暗褐色到黑色的黑色素一般是生合成自 pentaketide pathway，並經由一連串之下游生合成途徑合成最終產物，而此途徑亦稱為 DHN melanin pathway。以 *Colletotrichum lagenarium* 為例，黑色素之生合成是聚合自 1,8-dihydroxynaphthalene (1,8-DHN)；而 1,8-DHN 之生合成是始自於 pentaketide pathway，並經由一連串之生合成途徑，酵素催化作用使之生成，其生合成之中間代謝產物分別為 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (1,3,6,8-THN) → scytalone → 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-THN)，最終形成 vermeline，vermeline 為 melanin 前趨物，vermeline 可能再經由 laccase 氧化形成 melanin。而 polyketide synthase，1,3,8-THN reductase，和 scytalone dehydratase 即為黑色素生合成時之主要酵素。另一方面，有研究指出 polyketide synthase 生合成基因內包含多種組合之功能區，視菌種之不同而有所差異，故台大植微系應用真菌研究室首先確認 *Phoma* 屬內各菌株是否具有黑色素生合成相關基因 polyketide synthase (PKS) 和 scytalone dehydratase (SD)，經由 PCR 增幅其片段，經並比分析基因序列之差異性後，進一步研發可應用於偵測 *Phoma* 屬內不同物種之重要病原專一性核酸探針。

Phoma 病原菌之分子檢測

供試菌株

Phoma 屬之供試菌株共 37 株，分別來自於國內食品工業發展研究所，美國 ATCC 或荷蘭 CBS 菌種中心，另外亦包含自行收集分離之菌株。各菌株其編號、菌名、來源及病原性如表一所示。

真菌之分離

自採集之罹病株病徵處，以無菌鋒利之刀片切取數個不同部位之組織，平貼於 3% 的水瓊脂培養皿。每皿約 3 片組織，於室溫中培養，通常經 2-7 天後即有菌絲或產孢構造或孢子長出。切取單一菌絲尖端或單孢分離，再移植於馬鈴薯-葡萄糖培養基之斜面試管 (potato dextrose agar slant, PDA) 於室溫中培養保存。鑑定時直接由試管挑取適量之菌絲及產孢構造置於玻片，以光學顯微鏡觀察。參酌相關之論文、專誌或檢索表以進行 *Phoma* 屬內物種之鑑定。

菌絲增殖培養

將 100 ml 馬鈴薯葡萄糖培養液 (potato dextrose broth, PDB, Difco) 分裝於 500 ml 之平底錐形瓶內，經高溫高壓 (121°C, 1.1 kg/cm², 20 min) 滅菌後，接種直徑 0.5 cm 菌絲塊於 28°C、175 rpm 下，振盪培養 7 天。隨後以紗布過濾培養液，將菌體產物置入離心管中，於液態氮下冷凍 5 分鐘後，再經低溫減壓乾燥，去除水分，獲得脫水菌絲體。

菌體 DNA 之萃取

依據 Al-Samarrai 及 Schmid (2000) 所實驗之方法，略加修飾部份流程後，萃取菌體之 DNA。

黑色素合成基因 polyketide synthase 序列之增幅及定序

1. 經由 NCBI 尋找絲狀真菌，尤其是子囊菌、不完全菌 (擔子菌亦可) polyketide synthase 基因之 KS domain 之序列並比、分析，找出 conservative region，設計引子對
2. PCR 之條件如下：將 50 μ l 反應體積，置於 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Applied Biosystem) 進行反應。50 μ l 反應體積內含：30.9 μ l ddH₂O、10X buffer 5 μ l (最終反應濃度 1X)、10 mM dNTP 1 μ l (最終反應濃度 200 μ M)、25 mM MgCl₂ 3 μ l (最終反應濃度 1.5 mM)、20 μ M sense 引子 2.5 μ l (最終反應濃度 1 μ M)、20 μ M antisense 引子 2.5 μ l (最終反應濃度 1 μ M)、20 ng/ μ l template DNA 5 μ l (最終反應濃度 100 ng) 及 1 units *Taq* polymerase。而反應溫度條件為：94°C, 5 分鐘後，94°C, 1 分鐘; 52°C, 1 分鐘; 72°C, 2 分鐘，此三種溫度進行 30 次循環，爾後 72°C, 7 分鐘。
3. PCR 反應完成後，取 5 μ l 之反應產物，於 1.5% 洋菜膠，100V，進行電泳分析，以確定有無 PCR 產物，若有則將 PCR 產物於 4°C 保存，作為定序之用。PCR 反應所得之產物，以 ABI prism 3370 進行核酸定序。

Phoma 病原：以 *Phoma adianticola* 為例，說明分子檢測實務

將增幅之 polyketide synthase 基因產物定序後，以電腦軟體 Vector NTI 8.0 (Infor Max Inc., USA) 進行核酸序列之排序比對。經並比分析後，由 polyketide synthase 基因之 KS domain 差異區，設計專一性引子對。

將萃取自 *P. adianticola* 之 20 ng/μl 染色體核酸，依系列稀釋的方法，由 10⁻¹ 到 10⁻⁵，以每十倍為一稀釋之單位，系列稀釋核酸溶液。與上述專一性反應測試之條件相同下進行 PCR 反應，偵測引子對之靈敏度。

結 果

黑色素生合成基因 polyketide synthase KS domain 序列之增幅及定序結果

1. 利用 KS1 及 KS2 增幅 *Phoma* 屬內供試菌株之黑色素生合成基因的部份 KS domain 序列，所測試之 37 株 *Phoma* 菌株，顯示皆有 PCR 產物，經電泳分析其 PCR 產物，序列長度約為 700~750 bp (圖一)。
2. 利用 KS2-1 和 KS2-2 引子對，增幅黑色素生合成基因之 KS domain 序列，預估長度約為 1100 bp，經電泳分析其 PCR 產物，顯示供試菌 *P. asparagi* (35043、35174)、*P. betae* (111.85、264.55)、*P. clematidina* (911.87)、*P. complanata*(620.68)、*P. exigua* var *exigua*(489.94)、*P. exigua* var. *sambuci-nigrae* (104.68)、*P. fallens* (161.78)、*P. glaucispora* (284.70)、*P. herbarum*(30571、367.61、503.91)、*P. tracheiphil*(26007) 產生預期片段，而其他菌株則無法產生預估片段大小之產物 (圖二)。
3. 進行核酸序列之排序比對，經並比排序後，顯示 *Phoma* 屬內物種間 polyketide synthase KS domain 之序列有不同的演化速率，可供進一步之物種間專一性探針之設計。

***Phoma adianticola* 專一性引子對之檢測及靈敏度測試結果**

經由增幅之 polyketide synthase 基因片段，所設計專一性之探針引子對 187.83 KS1-1 和 187.83 KS1-2，進行 PCR 增幅。以循環溫度 94°C, 64°C, 72°C; 94°C, 66°C, 72°C 測試引子對 187.83 KS1-1 和 187.83 KS1-2 之專一性反應，結果顯示可產生種專一性之偵測效應，形成一條約 480 bp 之 PCR 之產物 (圖三)。

將萃取自 *P. adianticola* 之 20 ng/μl 染色體核酸，系列稀釋核酸溶液 10⁻¹ 到 10⁻⁵，靈敏度測試結果顯示探測極限為 10 pg (圖四)。

討 論

將增幅之 polyketide synthase 基因片段，與 NCBI 網站上的資料庫比對，顯示與 *Cochliobolus heterostrophus* 之 polyketide synthase 基因序列較為相似，而與

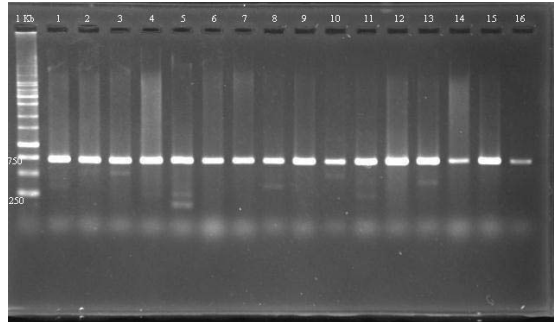
其他真菌物種之序列差異較大，故除可應用於分子探針之研發及應用於 *Phoma* 病原之檢測外，亦可應用於 *Phoma* 相關物種之類緣學之探討。本實驗除探討 polyketide synthase KS domain 區之外，亦曾設計其他引子對增幅 polyketide synthase ketoreductase(KR) domain、acyltransferase(AT) domain 之區域序列，但經進一步分析比對後，並不是所預估之基因片段，因而著重於 KS domain 區域之探討、應用。

過去曾試圖由 KS1 和 KS2 引子對增幅之 polyketide synthase KS domain 差異區，設計多組專一性引子對。但實驗後，皆無法產生專一性之片段，初步推測之可能性有二：一、*Phoma* 中 polyketide synthase 具有 gene family 或修飾蛋白質的基因，二、primer 設計不良或 PCR 條件不適合。

重新設計增幅 polyketide synthase 基因片段之引子對。經序列比對後，進一步設計專一性引子對，在引子對設計時，特別增加 primer 長度，以增加其專一性。

引用文獻

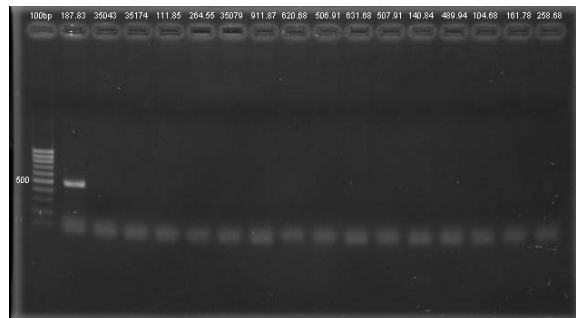
- 周廷光。1993。蔬菜主要病害。世維出版社。
- 孫守恭、黃振文。1998。植物病害彩色圖鑑第二輯蔬菜病害。世維出版社。
- Al-Samarrai, T. H., and Schmid, J. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. Lett. appl. Microbiol. 30 : 53-56.
- Bell, A. A., and Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annu. Rev. Phytopathol. 24 : 411-415.
- Boerema, G. H., Gruyter, J. de and Kesteren H. A, van. 1994. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)-III. I. Section Plenodomus: Taxa often with a Leptosphaeria teleomorph. Persoonia 15 : 431-487.
- Boerema, G. H., Gruyter, J. de and Noordeloos, M. E. 1997. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) -IV Section Heterospora: Taxa with large sized conidial dimorphs, *in vivo* sometimes as *Stagonosporopsis synanamorphs*. Persoonia 16 : 335-371
- Gruyter, J. de and Noordeloos, M. E., and Boerema, G. H. 1998. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)-I. 3. Section *Phoma*: Taxa with conidia longer than 7 μ m. Persoonia 16 : 471-490.
- Griffin, H. G., and Griffin, A. M. 1994. *PCR technology : current innovations*. CRC Press, Boca Raton.



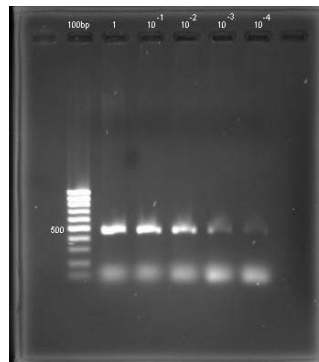
圖一、以引子對 KS1 及 KS2 增幅 *Phoma* 屬內 37 株菌株之黑色素生合成基因的部份 KS domain 序列，經電泳分析其 PCR 產物，序列長度約為 700~750 bp。



圖二、以引子對 KS2-1 及 KS2-2 增幅 *Phoma* 屬內 37 株菌株之黑色素生合成基因的部份 KS domain 序列，經電泳分析其 PCR 產物，序列長度約為 1100 bp。



圖三、利用 187.83 KS1-1 和 187.83 KS1-2，進行 PCR 增幅，證實獲得 *P. adianticola* 長約 480 bp 之專一性 polyketide synthase 基因產物，其它不同種之 *Phoma* 皆無產物，故得以鑑別。



圖四、將萃取自 *P. adianticola* 之 20 ng/μl 染色體核酸，系列稀釋核酸溶液 10^{-1} 到 10^{-5} ，以 187.83 KS1-1 和 187.83 KS1-2 引子進行 PCR 增幅，靈敏度測試結果顯示探測極限為 10 pg。