炭疽病菌侵染過程的重要基因

曾敏南[1]、陳昱初[2]

摘要

炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) 為多種作物的重要病原真菌，例如胡瓜炭疽病菌 *C. lagenarium*。炭疽病菌在侵染植物之過程中，首先需要突破植物最外層之障礙，才能進入寄主組織內殖據。這個過程主要可分為三個階段，包含分生孢子發芽、分化出特化的侵染構造稱為附著胞 (appressorium) 以及產生侵染釘 (infection peg)侵入寄主體表。於上述幾個主要階段中，首先為分生孢子受到寄主表面物質的誘導進而發芽並產生附著胞。目前已在苜蓿炭疽病菌 (*C. trifolii*) 上發現可受脂質誘導的 protein kinase，稱為 LIPK (lipid-induced protein kinase)。經由基因破壞之實驗結果，已了解 *LIPK* 與炭疽病菌附著胞的分化有關 (7)。此外，在炭疽病菌侵染的過程中 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) 具有調控發芽與附著胞分化之功能。在胡瓜炭疽病原 (*C. lagenarium*) 中已有兩個 MAP kinase 被確認與真菌之致病能力有關，分別為 *Maf1* 及 *Cmk1* (12,19)。缺乏 *Maf1* 的突變株對胡瓜致病力大幅降低，該突變株的分生孢子雖可有效的發芽，但是無法形成附著胞。而 *Cmk1* 的突變株則顯示出 *Cmk1* 與調控炭疽病的發芽、附著胞分化及侵染植物後的生長有關。*Cmk1* 突變株的分生孢子無法發芽，但經由添加酵母抽出物後可回復其發芽能力，該結果意謂著除了由 *Cmk1* 調控之路徑外，可能還有其它未知的途徑調控炭疽病菌的發芽過程。在 Yamauchi 等人在 2004 年的研究中證實了經由 adenylate cyclase gene (*Cac1*) 與 cyclic AMP (cAMP) 調控 protein kinase A (PKA) 之訊息傳導，而影響炭疽病分生孢子之發芽(25)。當炭疽病菌的附著胞形成之後，接著趨近成熟的附著胞尚需產生黑色素並形成侵染釘。胡瓜炭疽病菌的 *Cst1* 基因及菜豆炭疽病菌(*C. lindemuthianum*)的 *ClPLS1* 基因可調控炭疽病菌侵染釘的形成 (20,21)。*Cst1* 及 *ClPLS1* 受破壞的突變菌可產生具有黑色素的附著胞，但無法正常侵入寄主表皮。透過這些觀察可了解到炭疽病菌要產生侵染釘侵染寄主，除了附著胞要能產生黑色素藉以累積附著胞內部膨壓之外，可能還需要調控細胞骨骼的相關因子，藉以精確的產生侵染釘進而達成侵染之目的。

關鍵語：炭疽病菌、 MAP kinase、附著胞、侵染釘

[1,2] 高雄區農業改良場助理研究員及副研究員兼作物環境課長(通訊作者
E-mail: yuchu@mail.kdais.gov.tw)

前言

病原真菌經由分生孢子(conidia)接觸寄主植物，一直到成功侵染寄主需要一連串的步驟，例如附著、發芽、附著胞分化(appressorium formation)、侵入釘到成功侵染寄主需要一連串的步驟，例如附著、發芽、附著胞分化侵入釘(infection peg)的形成、酵素外泌甚至突破寄主防禦系統等[1,5]。而這些過程可謂是環環相扣，如果其中一個部分無法順利執行，則病原真菌可能就無法侵染寄主植物。在防治真菌性病害的工作上，吾人除了可透過種種途徑直接殺害感染源之外，如果能夠針對病原真菌侵染過程之環節加以破壞或使其無法正常執行，則亦可達到防治目的。因此，找出與病原性有關的功能性基因為設計新的殺菌劑時所需要的前提之一。真菌病原菌在侵染植物時具有許多複雜及多樣的策略，某些病原性基因的參與位置是位於在訊號傳遞的途徑中，有些則是位在與侵染有關的代謝途徑中，例如黑色素的生合成、glyoxylate循環以及 non-ribosomal peptide synthesis [5,15]。如果得以清楚了解這些訊息傳導的路徑以及各個生化反應步驟，那麼便可以為殺真菌劑設計的過程提供相當有用的訊息。以稻熱病菌(*Magnaporthe grisea*) 為例，由於目前已了解稻熱病菌在侵染過程除了要產生各個侵染構造外，亦必需在附著胞之細胞壁中形成並累積足夠的黑色素，否則無法順利獲得足夠產生侵染釘的膨壓。目前已經對稻熱病菌中黑色素形成過程中所需的相關酵素了解透澈，也因而發展出多種以中斷黑色素生合成步驟來達到防治目的化學藥劑。

炭疽病菌之侵染過程

炭疽病菌(*Colletotrichum* spp.)可造成許多重要作物的病害，引起植物組織之壞疽。炭疽病菌在侵染植物的過程具有三大部分，分別為分生孢子發芽、附著胞形成，並形成黑色素 (melanin)，以及由附著胞產生侵染釘 (infection peg) 進而突破寄主表皮進入細胞。我們可經由顯微觀察而發現感染源具有上述形態上的變化，然而隱藏在這些表相的背後是環環相扣的訊息傳導過程進而引發一連串的生化反應所造成的結果。

依據黑色素之前趨物或生合成途徑之中間產物，可將黑色素分為四類，包括：β-(3,4,dihydroxyphenyl) alanine (DOPA) melanin (衍生自 tyrosine) ；γ-glutaminyl-4-hydroxybenzene (GHB)；衍生自 catechol 的 catechol melanin 及經由 pentaketide 路徑產生的 dihydroxynaphthalene (DHN) melanin [2]。其中，經由 DHN 為前趨物而生合成黑色素的途徑為真菌生合成黑色素之主要途徑，也是在真菌上研究較透澈的黑色素生合成途徑。DHN melanin 起始於 polyketide pathway，該路徑為植物體中三大重要生合成路徑之一，此路徑始

於二氧化碳(CO_2)進入植物體，與水(H_2O)進行光合成作用產生 monosaccharides，並經一連串反應形成polyketide，此路徑之概略過程如下 (圖1)：monosaccharides ⇨ pyruvic acid ⇨acetic acid (acetyl CoA) ⇨經 acetyl CoA carboxylase 催化 ⇨malonic acid (malonyl CoA)⇨經 polyketide synthase (PKSs) 催化形成 polyketides [9]。除植物體之外，polyketide 亦為真菌及細菌之二次代謝物中一個很大的群組，並具有化學結構之多樣性及廣泛的生物活性，例如 antibiotic 及 toxin 等，主要由乙醯基團(reactive acetyl groups)所建構而成[18]。Melanin 生合成路徑之開端乃是由 PKSs 將 malonyl-CoA 聚合為 1,3,6,8- trihydroxynaphthalene (1,3,6,8-THN)[9]，再經 reductase 催化產生 scytalone，scytalone 經 dehydratase 行去水反應 (dehydration) 後，產生 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-DHN)，1,3,8-DHN 再經由 reductase 行還原反應產生 vermelone，vermelone 又經去水反應後成為 melanin 的前趨物 1,8-dihydroxynaphthalene (1,8-DHN)，最後 1,8-DHN 可能由 laccase 氧化後再經聚合(polymerization) 而形成 melanin [14]。

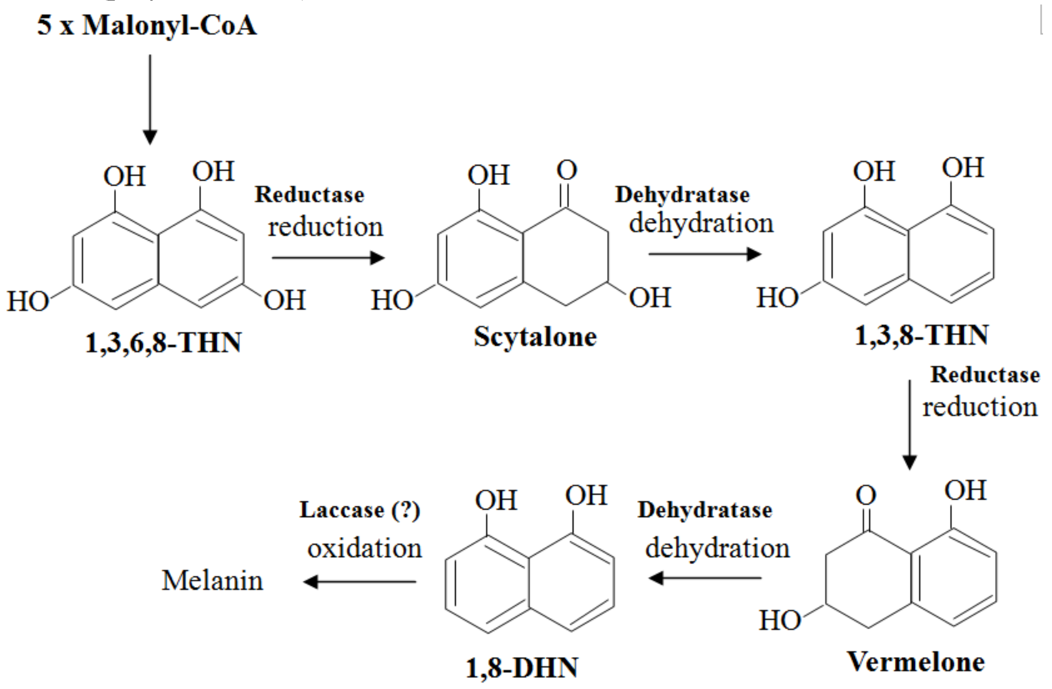

圖 1. dihydroxynaphthalene (DHN)黑色素(DHN melanin)之生合成路徑
Fig. 1. The synthesis pathway of dihydroxynaphthalene melanin (DHN melanin)

基於對 *Colletotrichum* 及 *M. grisea* 在細胞學上的研究，可以將附著胞的發展過程再細分為三個部份，分化、成熟及產生功能。在分化的階段，附著

胞可感受多種細胞外的訊號，包括物理上的或生物學上的訊號。例如忌水性，堅硬的表面以及某些特定的化學物質。目前已證實的 cyclic AMP、mitogen-activated protein kinases (MAP kinase)及 Ca^{2+}/calmodulin 媒介的訊號傳遞路徑，為可直接誘發型態上分化為附著胞的過程。一旦附著胞分化的階段發生，附著胞的成熟便緊接著到來。這些包含著生物化學及生物物理上的修飾及變化，例如附著胞的細胞壁及細胞骨骼(cytoskeleton) 的變化。透明的附著胞由於在細胞壁中產生一層黑色素層而快速的變為深褐色。這個現象在 *M. grisea* 及 *Colletotrichum* 為侵染寄主植物前的必要現象，如果無法產生黑色素層則無法侵入植物組織。除了提供更穩固的細胞結構之外，黑色素層的累積還是內部膨壓發展過程所必需。在 *M. grisea* 的研究資料中我們可得知，當黑色素層累積之後，形成一個不透水層，接著附著胞內生合成並累積甘油及脂質造成滲透勢提高，使得水分不斷的進入而提高細胞內的膨壓(4)。最後得以穿透植物細胞壁而可以進一步的在組織內發展。在植物與病原菌的相互作用的過程中，一些複雜的分子作用就在真菌的孢子與其寄主接觸時快速的啟動。植物藉由其先天的結構與化學防禦來抵抗真菌病原的威脅，包括植物的臘質、細胞壁及抗生物質(例如 phytoanticipins 及 saponins)。偵測到真菌的訊息可以快速誘導防禦反應，包括產生氧化酵素、細胞壁結構的增強、植物素(phytoalexin)的生合成、pathogenesisrelated proteins (PR proteins)的累積及改變蛋白質磷酸化的狀態(1,8)。

訊息傳遞途徑之研究

生命具有能力因應環境的改變而調整細胞內的諸多反應與活性，真菌亦是如此。在真核細胞中，serine/threonine 這類的蛋白質磷酸化酵素 (protein kinase) 家族被稱為 mitogen activated protein kinase (簡稱為 MAP kinase)參與了許多胞外訊息傳導、生長調節與分化過程 (6)。MAP kinase 的作用途徑是經由 MAP kinase kinase kinase (簡稱為 MAPKKK) 活化 MAP kinase kinase (MAPKK) 最後再經由 MAPKK 活化 MAP kinase。而上述這個 MAP kinase 的途徑是普遍存在各種真核生物當中的。目前對於此途徑之研究應以酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 最為透澈。在酵母菌當中已知有 5 條 MAP kinase 訊息傳導的途徑(24)。這些在酵母菌中的研究資料亦有助於吾人用來研究真菌病原的 MAP kinase 訊息傳導的相關因子。近年來在許多重要病原真菌上亦有關 MAP kinase 的研究，例如 *Botrytis cinerea*、*Colletotrichum lagenarium* 及 *Magnaporthe grisea* 等 (19,22,26)，而這些訊息傳導的相關基因，有許多皆與病原菌的致病能力有關。

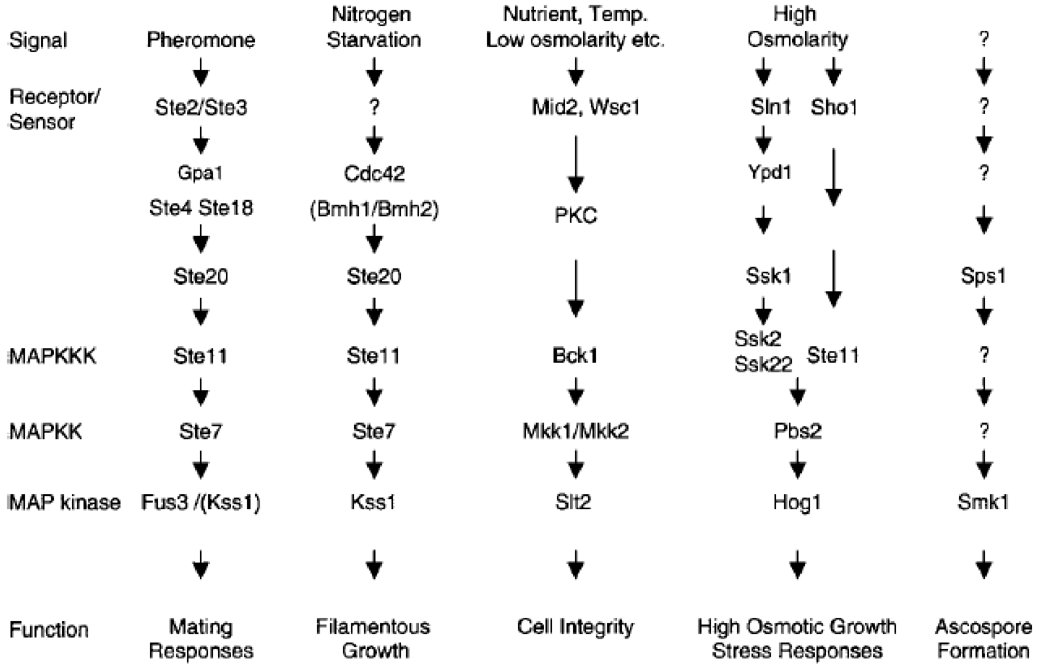

圖 2. 五條酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) MAP kinase 途徑
Fig. 2. Five MAP kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*

目前已知的 5 條 MAP kinase 途徑[24] 所調控的的生理現象包括有費洛蒙訊息的接受反應 (pheromone response)、菌絲狀態的生長 (filamentous growth)、細胞之完整性 (cell integrity)、高滲透壓之逆境反應與子囊孢子形成 (圖 2)。酵母菌對於費洛蒙的反應途徑啟始於細胞表面的接受體 (surface receptor) 偵測到 mating pheromone。該費洛蒙接受體為 Ste2 及 Ste3，而接受體與 mating pheromone 結合後，可使得 stimulatory Gβγ (Ste4, Ste18) 次單元上的 inhibitory Gα 次單元脫離。接著 Gβ 可直接與 protein kinase A (PKA) (Ste20) 作用進而啟動 MAP kinase pathway。此路徑中的相關基因分別為 MAPKKK (*Ste11*) → MAPKK (*Ste7*) →MAPK (*Fus3*/*Kss1*)。有關於細胞完整性的訊息傳導路徑則可受到外在諸多環境條件所誘發，例如營養條件、溫度或是過低的滲透壓等。與細胞完整性有關的 MAP kinase 路徑受到 protein kinase C 的調控，其 MAP kinase 為 *Slt2* 基因所編碼。現今許多植物病原真菌中所發現的 MAP kinase 亦與酵母菌之 MAP kinase 具有同源性，例如在稻熱病菌 (*Magnaporthe gresia*) 中所發現的 *PMK1* 在序列比對上發現與酵母菌之 *Fus3* 與 *Kss1* 應為同源性基因。

稻熱病菌 (*M. gresia*) 為異宗交配的單倍體子囊菌 (heterothallic haploid

ascomycete) 為許多經濟作物的重要病原，在感染水稻時最典型的是在葉片上造成病斑及乾枯。其分生孢子在植物葉片上或人工的疏水性表面上可發芽並分化附著胞。接著在附著胞的細胞壁及細胞膜間累積黑色素，並藉由細胞中高濃度的甘油 (glycerol) 所造成的滲透勢使得水分進入附著胞中，而累積附著胞內的膨壓。這樣的膨壓有助於侵染釘(infection peg)侵入寄主表皮。在這個過程中已知的 MAPkinase 有 *PMK1* (pathogenicity MAP kinase)、*MPS1* (MAP kinase for penetration and sporulation)及 *OSM1* (Osmoregulaton MAP kinase)，這些基因分別與酵母菌中的 *FUS3*/*KSS1*、*SLT2* 及 *HOG1* 具有同源性 (homologous)。*PMK1* 不只在序列上與酵母菌之 *Fus3*/*Kss1* 相近，且可回復 *Fus3*/*Kss*1 缺失菌株的配對 (mating) 功能 [22]，經由同源性置換(homologous recombination)而破壞 *PMK1* 之 *M. gresia* 的突變株，在營養生長上並無變異，其菌絲及產孢皆正常，也和其有性生殖無關，但是突變株對水稻失去致病力。*PMK1* 基因被破壞的突變株分生孢子可以像野生株一樣附著在寄主或疏水性的人工表面上，並正常發芽。而且此突變株的分生孢子仍具有偵測疏水性表面的能力，但無法在發芽管尖端形成附著胞。*PMK1* 突變株亦無法在具有傷口的葉片上侵染。

MPS1 與 *S. cerevisiae* 中的 MAP kinase *SLT2* 具有高度同源性，並可恢復 *SLT2*$^-$ 的 *S. cerevisiae* 突變株所缺失的功能。在 *M. grisea* 中置換 *MPS1* 同樣使得突變株對水稻失去致病力。若與 *PMK1*$^-$突變株相比，*MPS1*$^-$突變株可在具有傷口的水稻葉片上殖據。另外，*MPS1* 突變株除了發芽正常外亦可形成附著胞。該突變株所產生的附著胞具有正常的黑色素累積之情況，但此具有黑色素的附著胞卻失去其固有功能而無法侵入寄主植物的葉表。因此 *MPS1* 可能調控附著胞形成之後的其它代謝反應或是與侵染釘之形成有關。*MPS1* 的突變株在產孢能力上明顯降低，而且氣生菌株的生長亦受抑制，但在菌落生長的直徑上則無明顯區別。

M. grisea 中的 *PMK1* 亦發現與數種植物病原真菌中的 MAP kinase 具有同源性，包括有 *C. lagenarium* 及 *C. heterostrophus* 等。在 *C. lagenarium* 中所發現的 *CMK1* MAP kinase gene 可回復 *M. grisea* 中 *PMK1* 突變株的功能[19]。而此 *CMK1* 的置換突變株在菌絲生長上並無變異，但產孢的情況受影響。*C. lagernarium* 的 *CMK1* 突變株無法形成附著胞，且不具有病原性[19]。若與 *M. grisea* 的 *PMK1* 突變株相比較，*CMK1* 突變株的分生孢子在玻片上或寄主上皆無法發芽，然而加入 1%酵母抽出物 (yeast extract) 後可恢復發芽能力，但仍無法分化出附著胞。發芽的孢子並無法在有傷口的葉片上殖據[19]。此外在 Takano 2000 年的實驗數據中亦可發現 *CMK1* 亦可影響附著胞中黑色素的形

成。另外，在玉米葉部炭疽病原 *C. heterostrophus* 中的 *CHK1* 亦為 *PMK1* 的同源性基因，同樣是 *C. hererostrophus* 侵染過程中附著胞分化所必需的基因。置換 CHK1 後同樣使得突變株失去致病能力 (13)。

在 *S. cerevisisae* 中與訊息傳遞相關基因已有許多研究，尤其是經由 mitogen-activated protein (MAP) kinase 調控的 *FUS3*/*KSS1* 基因家族。這個途徑為許多植物病原真菌在侵染途徑中所必需，例如稻熱病與炭疽病菌中 *FUS3*/*KSS1* 基因家族。此類基因為 cyclic AMP (cAMP)及 Ca^{2+}/calmodulin 的訊息傳遞途徑所需要，該途徑在不同的植物病原真菌各個侵染階段中扮演著重要的角色 (11)。這些階段包含著附著胞的分化及藉由附著胞侵入的階段。在細胞及分子的研究結果中顯示 *Colletotrichum* spp.及 *M. grisea* 之間具有相似的感染過程。兩者皆需形成具有 melanin 的 appressoria 才可侵入寄主植物的組織。而超微細構造的研究則證實在 *M. grisea* 或 *C. lindemuthianum* 的成熟 appressoria 構造中，與寄主植物接觸的表面的中心處為一處壁薄且不具黑色素的細胞壁，這個區域稱為 appressorium pore 並由這個位置形成 penetration peg。在 *M. grisea* 中，成熟 appressoria 形成 penetration peg 的位置可見 actin 及其 microtubule 重新組合。這意謂著 cytoskeleton 的極化可能存在 penetration peg 形成的過程中(16)。

在 *M. grisea* 及 *Colletotrichum* spp.的細胞及分子研究過程中亦顯示著數個基因與附著胞的功能或者侵染菌絲的發展有關，例如存在於 *C. lindemuthianum* 中被推論為 serine/threonine kinase 的 *CLK1* 基因、存在於 *M. grisea* 中被推論為 P-Type ATPase aminophospholipids 的 *PDE1* 基因，以及存在於 *C. gloeosporioides* 中可編碼一個 sterol glycosyl transferase 的 *CHIP6* 基因。在 *M. grisea* 中附著胞的功能受到 cAMP-dependent protein kinase CpkA 及 MAP kinase MPS1 的調控 (22,23)。破壞 *M. grisea* 中的 *MST12* 及 *C. lagenarium* 中的 *CST1* 基因則病原菌無法經由附著胞的方式侵染 (17,20)。近年來更進一步的研究發現 MST12 與 penetration peg 的形成有關 (16)。這些基因似乎都與調控 penetration peg 形成時的膨壓產生有關 (16)。

PLS1 基因編碼 tetraspanin superfamily 中的一個蛋白質，在動物中 tetraspanin 在細胞樣態(cell shape)的重組 (remodeling) 中扮演著重要的角色，包括 migration、cell-to-cell contact 及 motility/invasion。而這些角色存在於許多不同的生命過程，例如寄生侵入、精蟲與卵的融合、B-cell/T-cell 的接觸及神經分枝等。藉由類比在動物上的這些功能，推測 *M. grisea* 中的 tetraspanin *MgPls1* 可能與 actin cytoskeleton 的重組有關 (3)。Veneault-Fourrey 等人 (2005) 報告了 *ClPLS1* 基因的特性並研究該基因在 *C. lindemuthianum* 中

對病原性的功能為何。利用 *Clpls1::hph* 置換盒破壞 *ClPLS1* 基因所獲得的炭疽病突變株，無法侵染已有傷口處理的大豆葉片。其缺失病原性的原因主要是因為突變株無法產生 penetration-pore 更無法進一步的產生 infection peg。而野生株的 *ClPLS1* 基因可以回復因缺失 *PLS1* 基因而無病原性的 *M. grisea* 菌株的致病性，因而可知 *ClPLS1* 在功能性方面與 *MgPLS1* 為同源性基因。

MAP kinase 與炭疽病菌病原性的研究

MAP kinase 生物功能的研究方法及流程通常需選殖出標的基因以及建構基因置換載體 (gene replacement vector)，最後進行基因轉殖，透過同源性互換 (homologous recombination) 的方式將標的基因進行置換。Takano 等人 (2000) 及 Kojima 等人 (2002) 利用上述方法分別了解 *Colletotrichum lagenarium* 中的 *CMK1* 基因及 *MAF1* 在炭疽病菌侵染過程中所扮演的角色。

由於 *CMK1* 與 *PMK1* 具有同源性之關係，故作者為了解兩者同在功能上是否有所差異，因而將 *C. lagenarium* 之 *CMK1* 轉殖到 *M. grisea PMK1* 突變的菌株。*PMK1* 突變的 *M. grisea* 菌株在玻片上只能發芽而無法分化出附著胞，以 *CMK1* 轉殖後，*M. grisea* 的 *PMK1* 突變菌株可回復其附著胞分化之能力 (圖 3) [19]。Takano 等人(2000)分別將 *CMK1* 突變株及以 *CMK1* 重新轉殖到突變株之轉形株進行對胡瓜葉片的致病力試驗。可發現破壞 *CMK1* 基因的突變菌株無法對胡瓜侵染，但經重新導入 *CMK1* 的轉殖株則可回復對胡瓜的致病力 (圖 4)。由此可證實 *CMK1* 確為 *C. lagenarium* 致病力所需。另外，由該篇研究中亦發現 *CMK1* 突變株若接種在原先已具有傷口之胡瓜葉片亦無造成病斑。此外，*CMK1* 突變株相對於野生株，在玻片上不具有發芽及附著胞分化之能力。但若在孢子懸浮液加入 0.1%酵母抽出物 (yeast extract) 則可回復其發芽能力。綜觀上述結果，可發現 CMK1 除了對發芽有所影響外，亦為附著胞分化與侵染後在寄主細胞中生長的相關調控因子。

由炭疽病菌(*C. lagenarium*)中所選殖之 MAF1 ，經蛋白質序列比對與 *S. cerevisiae* 之 MPK1 及 *M. grisea* 的 mps1 具有同源性 (圖 5)。經由 *MAF1* 之置換性破壞後，比較 *C. lagenarium* 的野生株及 *MAF1* 突變株，可發現兩者於菌落外觀上並無明顯差異，但突變株之產孢能力明顯下降 (圖 6)。在發芽試驗的外觀形態觀察上，可發現 *maf1* 之突變株培養在玻片及寄主葉表上只能產生發芽管。但將 *maf1* 重新導入該 *maf1* 缺失菌株後，可恢復 *C. lagenarium* 在玻片及葉表上發芽並產生具黑色素的附著胞的能力，由此可知 *maf1* 亦為 *C. lagenarium* 分化附著胞過程所需的必需基因。Kim (2000) 由其它物之 *MEK* 的序列著手而取得 *Colletotrichum* 的 *MEK* gene[10]。為了解該基因與附著

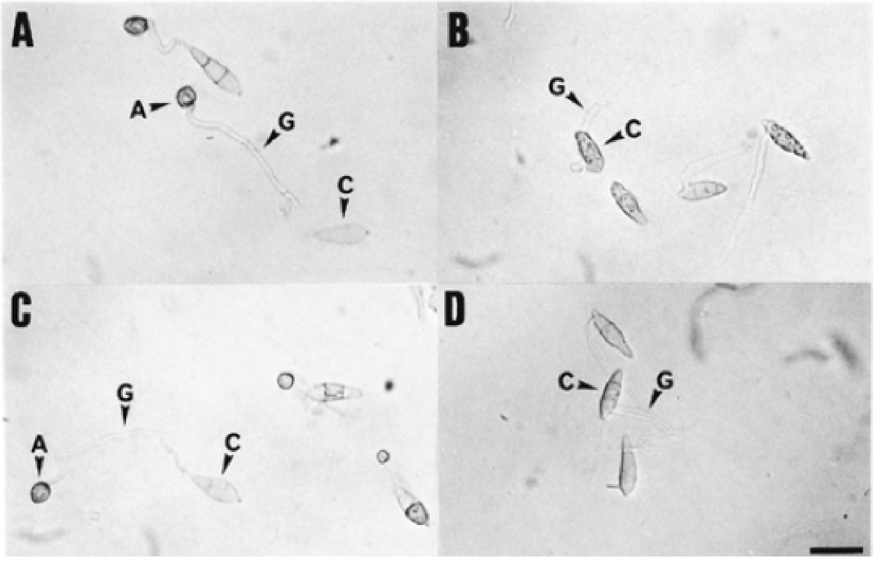

圖 3. 導入 CMK1 基因回復 M. grisea pmk1 缺失突變株的附著胞 (appressorium) 分化功能。分生孢子懸浮液接種於 GelBond 膜的忌水性表面，並培養於 24 °C，12 小時。A) M. grisea 野生株; B)pmk1 突變株; C)CMK1 導入 pmk1 突變株; D)轉殖載體 pCB1531 導入 pmk1 突變株。A, 附著孢; C, 分生孢子; G, 發芽管 Bar = 20 μm.

Fig. 3. Conidial germination and appressorium formation of cmk1 mutants. Conidia of the wild-type 104-T and Dcmk1 strain DCM1 were incubated on host cucumber cotyledons and a glass surface at 24°C for 12 h. A, appressorium; C, conidium; G, germ tube

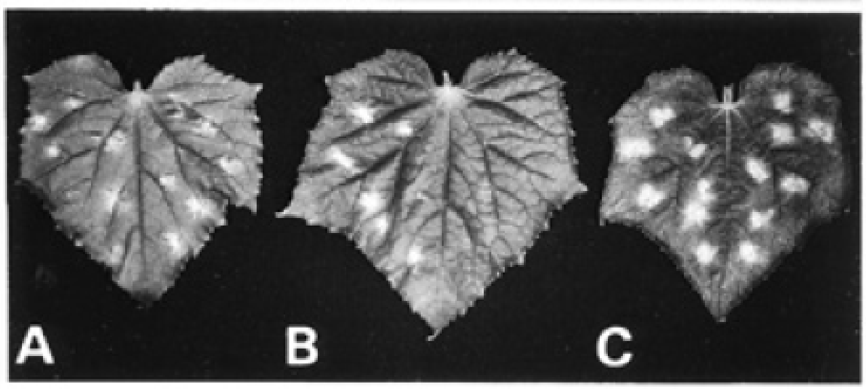

圖 4. *CMK1* 基因為炭疽病菌侵染胡瓜葉片之必要因子。分生孢子懸浮液滴於葉片右半邊，葉片左半邊則滴入炭疽病菌之野生株(104-T)做為正對照組。接種菌株如下：A, ectopic integration transformant DCM2; leaf B, *cmk1::Hph* transformant DCM1; leaf C, *CMK1*-introduced transformant of DCM1, RCM1

Fig. 4. *CMK1* is required for pathogenicity on cucumber leaves. Conidial suspensions of tested strains were spotted on right half of detached cucumber leaves. A, ectopic integration transformant DCM2; leaf B, *cmk1::Hph* transformant DCM1; leaf C, *CMK1*-introduced transformant of DCM1, RCM1

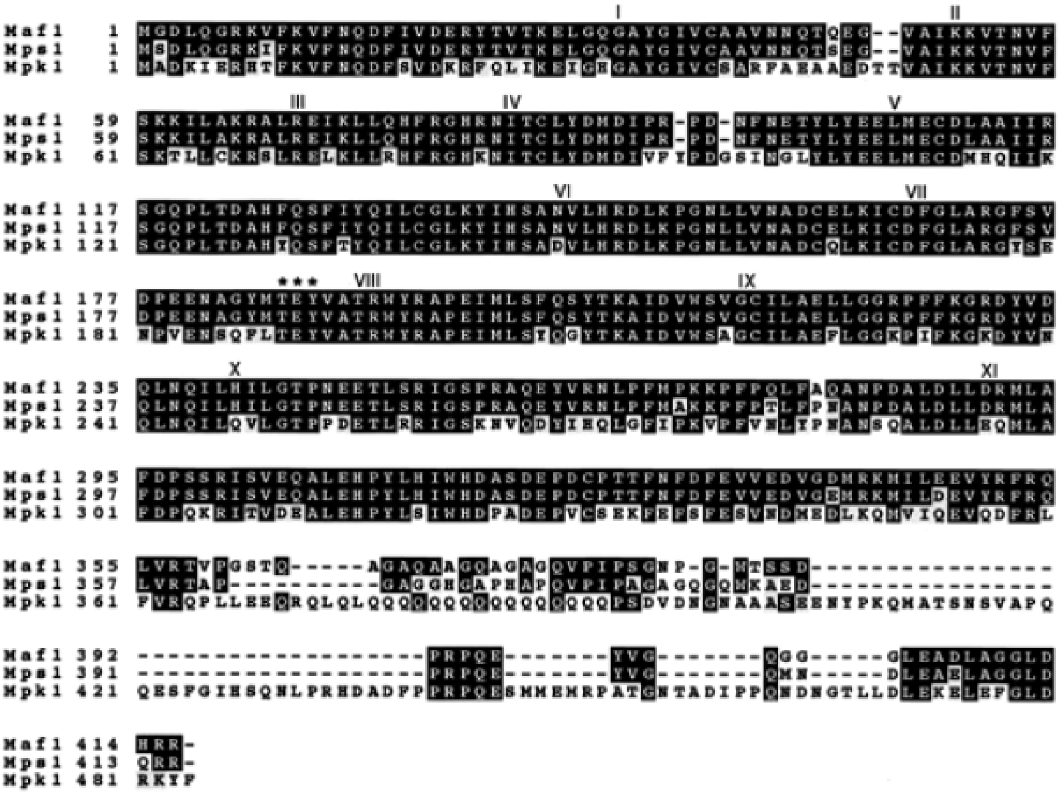

圖 5. 炭疽病菌之 MAPK 基因 *MAF1* 與酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)之 *MPK1* 有關。*Maf1*: 炭疽病菌、*Mpk1*: 酵母菌、*Mps1*: 稻熱病菌

Fig. 5. The *Colletotrichum lagenarium* MAPK gene *MAF1* related to *Saccharomyces cerevisiae MPK1*. *Maf1*: *Colletotrichum lagenarium*、*Mpk1*: *Saccharomyces cerevisiae*、*Mps1*: *Magnaporthe grisea*

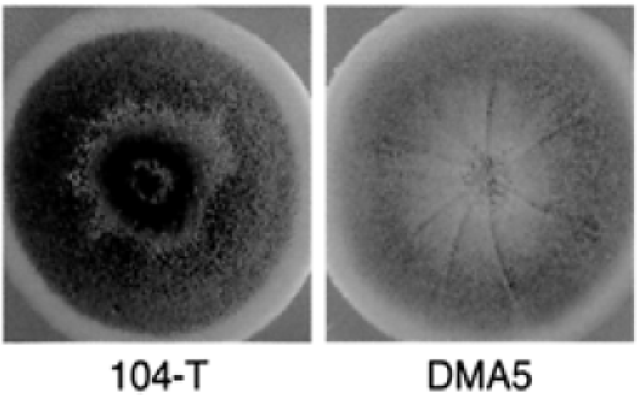

圖 6. 104-T 為 *Colletotrichum lagenarium* 野生株，DMA5 為 *MAF1* 突變株，24°C 中培養於 potato-dextrose agar 培養基 14 天

Fig. 6. Colony morphology of the wild-type strain 104-T and *maf1*△ strain DMA5 incubated on potato-dextrose agar plates at 24°C for 14 days

胞分化過程之關係，作者利用 confocal microscopic 來了解細胞中的 actin 的變化。作者利用 phaloidin-FITC 來染 actin 並產生綠色螢光，而 propidium iodide 則可以染 DNA 並產生紅色螢光。利用這個方法可以觀察在 wild type 的 conidia 中由發芽到產生附著胞的過程中，細胞內的 actin 及核是如何產生變化? 我們可看到一開始 actin 及 DNA 集中在細胞中心，隨著培養時間增加，actin 與 DNA 同時往細胞各處擴散，但在 1 小時後 actin 與 DNA 逐漸往兩極集中。接下來在 conidia 中間繼續形成明顯的隔膜，而且 actin 及 DNA 明顯集中在兩端。此時已完成細胞分裂，並由一端形成發芽管並進而產生附著胞，最後在附著胞中形成黑色素 。作者為了解 MEK 與發芽過程之關系，進而再以上述之方法觀察 *CgMEK1* gene disruption 的突變株中 actin 與核的變化(圖 7)。由結果可看到突變株儘管培養到第 12 小時或 24 小時，亦無法發芽也無附著胞形成。在這過程中只能看到分生孢子分裂成兩個細胞。

作者接著並將前述的觀察數據化。他分別觀察野生株及 *MEK1* 突變菌株的 actin 與核的變化。作者發現當孢子濃度較高 (50 conidia/uL) 大多數的孢子只會進入到 actin 集中於兩極的階段，而不會產生附著胞。然而孢子濃度較低時 (10 conidia/uL) 則可產生附著胞。這樣的結果意謂著 *Colletotrichum* 具有自我抑

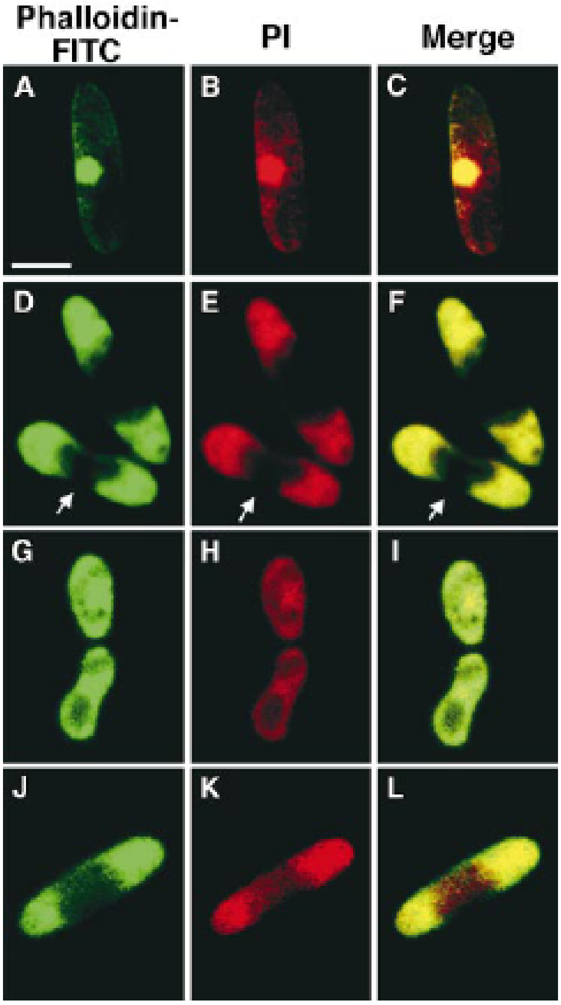

圖 7. 共軛焦顯微鏡觀察分生孢子發芽情形。A-I，*CgMEK1* 突變株分生孢子培養於玻片上 0 小時(A-C)、12 小時(D-F)或 24 小時(G-I)。野生株分生孢子(J-L)亦接種於玻片 12 小時。左邊螢光影像訊號為 phalloidin-FITC，中間為 PI 訊號，右邊為合併之影像。箭頭位置為孢子收縮處

Fig. 7. Confocal Microscopic Analysis of Germinating CgMEK1 Mutant Conidia and MEK Inhibitor-Treated Wild-Type Conidia

制的調控因子。作者亦在該試驗中，於高濃度孢子懸浮液中加入來自寄主植物葉表的臘質，或加入乙烯，在這個試驗結果發現臘質及乙烯可以打破自我抑制之現象。使得在較高分生孢子濃度存在的情況下，分生孢子又可正常產生附著胞。另外 *CgMEK1* 突變株與處理 *MEK* 抑制劑的野生株，皆無法產生附著胞。但在結果中值得注意的是突變株只要加上酵母抽出物，則可使得孢子發芽近 90%但仍無附著胞產生。上述兩項結果指出兩個可能性：(1)分生孢子的發芽可能另有調控因子，以及(2)*MEK* 所調控的可能是附著胞產生的關鍵階段，因而即使加入這些誘導物皆無法產生附著胞。

MAP kinase *CMK1* 與酵母菌的 *Fus*/*Kss* 為同源性基因，而 *Ste12p* 為酵母菌中，位於 *Fus*/*Kss* 下游的調控基因，藉這樣的脈絡，作者找到了 *Colletotrichum* 中一個 Ste12-like 的 gene 稱為 *CST* gene。經由 *CST* gene knockout 的工作，作者證實該基因調控侵染釘 (infection peg) 的形成。*CST* gene 經破壞的菌株可產生具有黑色素之完整附著胞，但確無法侵入 cellulose membrane 及胡瓜之葉表，亦無法產生侵染菌絲(infection hypha)。

結論

綜合前述的相關研究，我們可知炭疽病菌的分生孢子在發芽前需受到某些物理或化學因素所刺激，經由這些因子的刺激而啟動一連串的訊息傳遞過程，這些外在的因子包含堅硬的附著表面、外界的營養物質及寄主的化學訊號。在 Kim (2000) 的研究觀察中可發現 *C. lagernarium* 在分生孢子濃度較高的環境下，具有自我抑制的現象，可經由添加營養物以及寄主化學訊號而解除自我抑制。而 MEK 可能可經由營養物質調控 cAMP 之途徑而調控，而 MEK 再往下調控 Maf。而 CgMEK1 則可能經由前述之物理因子(堅硬的附著表面)及寄主的化學訊號所控調，進一步調控 Maf1 或 CMK1。最後當附著胞形成後，則可能涉及 *Cst1* 及 *ClPLS1* 這兩個基因對侵染釘形成的調控。

參考文獻

1. Agrios, G. Plant pathology 5th edition. 2004. Elsevier Academic Press. USA.
2. Bell, A. A., and Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annu. Rev. Phytopathol. 24: 411-451.
3. Clergeot, P.-H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.-P., Pepin, R., *et al.* (2001) PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6963–6968.

4. de Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnoff, N., and Talbot, N. J. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. Nature 389: 24.
5. Deising, H. B., Werner, S., Wernitz, M. 2000. The role of fungal appressoriain plant infection. Microbes Infect. 13: 1631-1641.
6. Dickman, M. B., and Yarden, O. 1999. Serine/threonine protein kinaes and phosphatases in filamentous fungi. Fung. Genet. Biol. 26:99-117.
7. Dickman, M. D., Ha, Y.-S., Yang,Z., Adams, B., and Huang, C. 2003. A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. MPMI 16: 411-421.
8. Flaishman, M. A., Hwang, C.-S., and Kolattukudy, E. 1995. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene. MPMI 47: 103-117.
9. Fujii, I., Mori, Y., Watanabe, A., Kubo, Y., Tsuji, G., and Ebizuba, Y. 2000. Enzymatic synthesis of 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene solely from malonyl coenzyme A by a fungal iterative type I polyketide synthase PKS1. Biochemistry 39: 8853-8858.
10. Kim, Y.-K., Kawano, T., Li, D., and Kolattukudy, P. E. 2000. A mitogen-activated protein kinase kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Cell 12: 1331-1343.
11. Kim, Y.-K., Li, D., and Kolattukudy, P. E. 1998. Induction of Ca^{2+}-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. J. Bacteriol. 180: 5144-5150.
12. 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.
13. Lev. S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H., and Horwitz, B. A. 1999. Amitogen-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.
14. Litvintseva, A. P., and Henson, J. M. 2002. Characterization of two laccase

genes of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* and their differential transcription in melanin mutants and wild type. Mycol. Res. 106: 808-814.
15. Lorenz, M. C., and Fink, G. R. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. Nature 412: 83-86.
16. Park, G., Bruno, K. S., Staiger, C. J., Talbot, N. J., and Xu, J.-R. 2004. Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. Mol. Microbiol. 53: 1695-1707.
17. Park, G., Xue. C., Zheng, L., Lam, S., and Xu, J. R. 2002. *MST12* regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. MPMI 15: 183–192.
18. Riley, P. A. 1997. Melanin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29:1235-1239.
19. Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J. E., Mise, K., and Furusawa, I. 2000. The *Colletotrichum lagernarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. MPMI 13: 374-383.
20. Tsuji, G., Fujii, S., Tsuge, S., Shiraishi, T., and Kubo, Y. 2003. The *Colletotrichum lagenarium* Ste 12-like gene *CST1* is essential for appressorium penetration. MPMI 16: 315-325.
21. Veneault-Fourrey, C., Parisot, D.,Gourgues, M., Lauge, R., Lebrun, M.-H., and Langin, T. 2005. The tetraspanin gene *ClPLS1* is essential for appressorium-mediated penetration of the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Fungal Genet. Biol. 42: 306-318.
22. 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.
23. Xu, J. R., Urban, M., Sweigard, J. A., and Hamer, J. E. 1997. The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. MPMI 10, 187–194
24. Xu,J.-R. 2000. MAP kinase in fungal pathogens. Fungal Genet. Biol. 31: 137-152.
25. Yamauchi, J., Takayanagi, N., Komeda, K., Takano, Y., and Okuno, T. 2004. cAMP-PKA signaling regulates multiple steps of fungal infection cooperatively with *Cmk*1 MAP kinase in *Colletotrichum lagenarium*. MPMI 17: 1355-1365.

26. Zheng, L., Campbell, M., Murray,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.