

萵苣萎凋病菌病原性基因之標定與分析

洪爭坊、陳裕星

目 的

本研究以萵苣萎凋病菌*F. oxysporum* f.sp. *lactucae* LFO 32-14野生型菌株作為研究對象，嘗試利用紫外光誘變的方式篩選喪失或降低侵染萵苣根部能力的突變菌株，已初步篩選出三個對萵苣根部感染力低於野生型菌株的突變菌株，而其在形態上與野生型菌株並無太大差異。未來除了以盆鉢接種試驗進一步確認變異菌株對萵苣的致病毒力是否降低外，更將比較突變菌株與野生型菌株核酸增幅片段長度多形性之間的差異，期篩選出與萵苣萎凋病菌病原性基因相關的分子標誌。

材料與方法

本試驗所使用的萵苣品種為black seeded simpson leaf lettuce，種子先表面消毒，於室溫下催芽備用。供試的萵苣萎凋病菌*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* LFO 32-14菌株係由中興大學植病系黃振文教授提供。病原菌在PDA培養基斜面培養7-21天後，取其分生孢子以無菌水製成孢子懸浮液，調整不同濃度作為本試驗之接種源。

LFO 32-14菌株在PDA斜面上培養7-14天後，取分生孢子以無菌水製成孢子懸浮液並調整濃度為104 spores/ml後，取0.1 ml孢子懸浮液，塗抹在水瓊脂(water agar; WA)平板上，以紫外光分別照射0、0.5、1、2及5 min，停止照射紫外光後於室溫下培養24 hr，記錄照射紫外光時間長短對分生孢子發芽率的影響。兩天後，隨機挑取30個照射紫外光2 min後長出的菌落，測試感染萵苣根部的能力與病原性。

結果與討論

田間罹患萵苣萎凋病之病株分離獲得的病原菌，以紫外燈照射不同時間後，病原菌分生孢子在第24 hr的發芽率隨照射UV時間增加而降低。不照射紫外光的野生型菌株，在24 hr後分生孢子的發芽率可達92%以上；照射紫外光30 sec後，24 hr後孢子發芽率即降至30%。當持續照射紫外光5 min以上時，第24 hr分生孢子的發芽率趨近於零。因此選擇照射紫外光2分鐘作為誘變萵苣萎凋病菌的時間。經紫外光誘變後的菌株形態，包括與野生型菌株形態相似的菌絲型，以及菌絲較少，菌落呈紫色的黏膜型等。誘變後的菌株培養在PDA斜面上培養14~21天後，取各菌株的分生孢子以無菌水製成懸浮液後接種於萵苣幼苗上，六天後以選擇性培養基偵測萵苣幼苗受感染的情形，結果多數誘變後的菌株仍保有感染萵苣幼苗根部的能力。未來將進一步接種證實篩選出的變異菌株的病原性確實降低後，再利用AFLP及差異性選別法等技術，進行分子層次上的分析，期能找出與萵苣萎凋病菌致病基因相關的分子標記。

萵苣萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*)

病原性基因之標定與分析

洪爭坊、陳裕星

台中區農業改良場 生物技術研究室

前言

Fusarium oxysporum 會引起植物萎凋、死亡等病徵，為重要的土壤傳播性植物病原真菌。其寄主範圍廣泛且具多食性，成為近年來研究植物病原真菌寄主植物間交互作用的對象之一。目前已有許多報告探討 *F. oxysporum* 侵入蔬菜等植物的過程，病原性相關基因的不同與寄主反應之間的關係。已知與 *F. oxysporum* 病原性相關的基因，如 *fmk1* (Di Pietro et al., 2001)、*fowl1* (Houe, Namiki, and Tsuge, 2002)、*fga1* (Jain et al., 2002)、*pacC* (Caracul et al., 2003) 等，多在初期病原菌侵染植物過程中起傳遞的導引。萵苣萎凋病在臺灣首次於1998年被報導，病原菌經萵苣根引起下位葉黃化、植株矮化、半凋萎等病徵，已成為萵苣栽培產業的限制因子之一 (Huang and Lo, 1998; Peng and Huang, 1998)。本研究以萵苣萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* LFO 32-14 野生型菌株作為研究對象，嘗試利用紫外光誘變的方式篩選喪失或降低侵染萵苣根能力的突變菌株。已初步篩選出三個對萵苣根組織侵染力低於野生型菌株的突變菌株，而其在形態上與野生型菌株無太大差異。未來除了以噬菌體隨機篩選一步確認變異菌株對萵苣的致病力是否降低外，更將利用前人發表的病原性相關基因引子進行聚合酶鏈式反應 (polymerase chain reaction; PCR)，及比較突變菌株與野生型菌株被擴增片段長度多態性 (amplified fragment length polymorphism; AFLP) 之間的差異，期望藉由萵苣萎凋病菌病原性基因相關的分子標定。

結果與討論

目前篩選萵苣萎凋病菌之菌株(圖一)分離過程的病原菌，以紫外光照射處理不同時間後，病原菌分生孢子在24小時的發芽率隨照射UV時間增加而降低(圖二)。不限照射外光的野生型菌株，在24小時後分生孢子的發芽率可達92%以上；照射紫外光30秒後，24小時後分生孢子發芽率即降至30%。若持續照射紫外光5分鐘以上時，第24小時分生孢子的發芽率趨於零，因此選擇照射紫外光2分鐘作為篩選萵苣萎凋病菌的時間。紫外光誘變後的菌株形態，包括野生型菌株形態相似的菌株型，以及菌落較少、菌落呈紫色、菌落型等(圖三)。誘變後的菌株培養在PDA斜面上培養14~21天後，觀察菌株的分生孢子及菌絲體生長的情況，結果多數誘變後的菌株仍具有侵染萵苣的侵染能力，以 *oilFmk1* 引子對萵苣萎凋病菌野生型與初步篩選出菌落型變異的菌株的侵染能力降低的變異菌株進行聚合酶鏈式反應(PCR)後，結果各菌株仍可增擴出大小約1.2 kb的片段(圖四)，顯示變異菌株完整的 *oilFmk1* 基因在未來將進一步以噬菌體隨機篩選篩選出的變異菌株的病原性確實降低後，再藉由AFLP、RAPD及差異性PCR等技術，進行分子層次的分析，期望找出萵苣萎凋病菌病原性基因相關的分子標定。

材料與方法

新萵苣菌株與萵苣萎凋病菌株

本試驗所使用的萵苣品種為 black seeded simpson leaf lettuce (由寶特公司購得)，避光以1%次氯酸鈉溶液消毒40秒，經自來水清洗三次後，用消毒紙吸乾水分，於直徑9公分的塑膠培養皿中墊一層濾紙並以萵苣水浸濕，將種子置於其中，於室溫下發芽一天後，移置4°C冷藏箱中兩天後備用。欲採的萵苣萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* LFO 32-14 菌株係由中興大學植物系黃文斌教授提供。病原菌以馬鈴薯葡萄糖瓏培養基 (potato dextrose agar; PDA) 斜面上於室溫中培養7-14天後，取分生孢子以自來水製成孢子懸液，欲檢驗發芽所需到室溫環境，作為本試驗之標準菌。每四週以單孢子進行野生型菌株的重新培養，維持其野生型。

萵苣萎凋病菌之誘變與篩選

Fusarium oxysporum f. sp. *lactucae* LFO 32-14 菌株在PDA斜面上培養7-14天後，取分生孢子以自來水製成孢子懸液，調整濃度為 10^8 spores/ml 後，取0.1 ml 懸液於懸液，塗抹於水瓏瓏 (water agar; W/A) 平板上，以紫外光分別照射0、0.5、1、2及5分鐘，停止照射紫外光後於室溫下培養24小時。之後將照射紫外光時間與發芽率對分生孢子發芽的影響。兩天後，連續換取30個照射紫外光2分鐘後長出的菌落，測試其侵染萵苣根的能力與病原性。

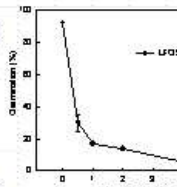
萵苣萎凋病菌突變菌株之初步篩選

將十個發芽後的萵苣種子置於鋪有一層濾紙的塑膠培養皿(直徑9公分)內，分別加入野生型菌株與誘變菌株的孢子懸液 (10^8 spores/ml) 各5 ml，使菌液均勻接觸過飽和孢子懸液。將菌液從培養皿上覆蓋於種子，並加入10 ml 的自來水將培養皿潤濕。六天後將萵苣的莖部取出，以自來水清洗於於根部的泥炭土後，將萵苣根以1%次氯酸鈉溶液消毒40秒後以自來水清洗三次後吸乾水分，切下根頭部置於選擇性瓏瓏培養基上，3天後觀察根頭部不同菌株侵染的情況。

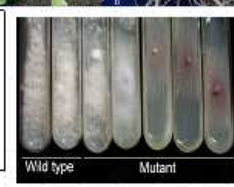
利用 *oilFmk1* 引子對萵苣萎凋病菌野生型與變異菌株之 *fmk* 基因標定

取誘變後對萵苣的侵染力降低的變異菌株，重新培養於PDA斜面上一天後，刮取菌體提取總DNA，並以 Di Pietro 等 (2001) 發表的 *oilFmk1* 引子及PCR條件，對LFO 32-14 菌株篩選出的變異菌株進行PCR，並以1.5%膠體電泳進行分析。

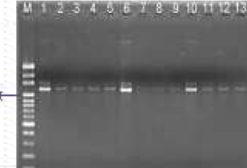
圖一、萵苣萎凋病菌之菌株。(A) 目前篩選萵苣萎凋病菌之菌株，(B) 初期發芽率，觀察未明顯萎凋現象。



圖二、紫外光照射處理不同時間後對 *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* LFO 32-14 菌株分生孢子發芽率之影響。



圖三、*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* LFO 32-14 野生型菌株與紫外光誘變菌株之形態差異。



圖四、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* LFO 32-14 菌株與誘變菌株 *oilFmk1* 引子進行聚合酶鏈式反應 (PCR) 後，以 1.5% 膠體電泳進行分析。1. UM-02-0045; 2. UM-02-0090; 3. UM-02-0103; 4. UM-02-0108; 5. UM-02-0110-1; 6. UM-02-0110-2; 7. UM-02-0110-3; 8. UM-02-0115; 9. UM-02-0116; 10. UM-02-0117; 11. UM-02-0119; 12. UM-02-0130; 13. LFO 32-14。