

小麥赤黴病菌與番茄萎凋病菌之 $PSD2$ 基因影響磷脂質組成、生長與產孢

賴于歆¹、徐立航¹、陳穎練^{1*}

¹ 國立臺灣大學 植物病理與微生物學系

* 聯絡作者, E_mail: ychen28@ntu.edu.tw

摘 要

賴于歆、徐立航、陳穎練^{*}。2019。小麥赤黴病菌與番茄萎凋病菌之 $PSD2$ 基因影響磷脂質組成、生長與產孢。植物醫學 61(1): 1-18。

許多種類之鐮孢菌具危害植物之能力，其中*Fusarium graminearum* (Fg) species complex之鐮孢菌可造成小麥赤黴病，其孢子可利用風傳播感染地上部之穗，並作為二次感染源在當季循環感染。Fg有性世代產生之子囊孢子與無性世代之分生孢子皆可做為感染源。番茄萎凋病菌*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)曾於高雄的番茄田區造成三分之一以上之番茄受害。臺灣育成之番茄品種至今仍強調耐萎凋病之性狀，足見其重要性，然而臺灣目前針對鐮孢菌防治之推薦化學或生物農藥較少。磷脂質為構成生物個體細胞膜的主要成分，包含phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS)或phosphatidylcholine (PC)等不同種類。PE與其他磷脂質相比，較易增加膜的非雙層形成 (nonbilayer-forming)特性，此特性在生物膜的分裂、融合、內嵌蛋白質的移動等時機扮演重要角色。酵素PS decarboxylase (Psd)參與真菌中，以PS為基質，經脫羧作用合成PE之過程。Psd2為酵素Psd的其中一種，本研究探討 $PSD2$ 基因對Fg與Fol PE合成、菌絲生長、孢子產生與毒力等功能之影響。在薄層層析試驗中可見Fg與Fol *psd2*突變株之PE生成量較野生株少。比較添加ethanolamine前後，突變株在微量元素培養基 (minimal medium, MM)之生長情形，發現ethanolamine可恢復Fg與Fol *psd2*突變株之營養缺陷。Fg與Fol之*psd2*突變株在MM和PDA培養基之生長較野生株緩慢，而於大麥麥麩培養基則呈現相似之生長速率。在產孢方面， $PSD2$ 基因影響Fg分生孢子的型態，也影響Fol之分生孢子發芽率、厚膜孢子之產孢與其在菌絲上的著生形式。 $PSD2$ 基因影響Fg胞外酵素分泌，但不影響Fg與Fol對小麥或番茄寄主之毒力。

關鍵詞：鐮孢菌、小麥赤黴病、番茄萎凋病、 $PSD2$ 、磷脂質

緒 言

小麥赤黴病由*F. graminearum* (Fg) species complex (FGSC)造成，FGSC目前已知包含至少15個種^(62, 63)，雖不易從病徵分辨，但仍可從其他細節作區分，如孢子的寬度、長度、種類與著生方式、產生的二次代謝物種類等⁽⁵³⁾。目前在亞洲之臺灣、日本、韓國及中國部分地區造成小麥赤黴病之病原，以*Fusarium asiaticum*為最大宗；在美國則以Fg為主。在臺灣，小麥並非大規模種植的糧食作物，但近年因糧食安全愈受重視，糧食自給的呼聲漸高，小麥也有推廣種植的趨勢⁽³²⁾；另有新品種小麥「台中35號」育成 (<https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2506655&print=Y>)。當寄主種植範圍漸廣，此病害在臺灣的危害潛力即不可忽視，臺灣自1919年即有此病害發生紀錄⁽⁵⁴⁾，Wang與Cheng (2017)曾在臺灣多處採集並進行系統性的鑑定⁽⁶²⁾。Fg之相關研究與其它FGSC成員相比之下較完整，加上已經過全基因體定序，適宜作為基因研究之材料，因而選用之。

Fg之有性世代為*Gibberella zeae*，此時期可生成子囊殼 (perithecium)，內含大量子囊孢子。Fg初次感染源為土壤中帶菌之植株殘體，當溫濕度適宜且接觸到次季種植之小麥後即進行感染，感染源可為無性之分生孢子或有性之子囊孢子，兩種孢子皆可利用水流噴濺或風傳播。菌體感染後再次產生分生孢子作為二次感染源感染穗部，並在當季循環感染。Fg主要侵染的時期為小麥開花期，此時期花藥突出麥穗，花的內部腔室打開以供花粉進入的同時，也提供病原菌孢子入侵的管道^(5, 51)。

番茄萎凋病菌*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)在臺灣於1982年首次被記錄，曾在高雄彌陀鄉之番茄田區造成三分之一以上之番茄受害⁽²⁴⁾。除了臺灣，番茄萎凋病也曾於2012年造成印度45%的番茄產量損失⁽⁵⁰⁾。根據行政院農委會農業統計年報，全臺番茄於2016年的種植面積已達5,000公頃以上，產量近120,000公噸 (<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>)。其中，小果番茄產業成長迅速，尤其夏季生產者可售

得較高價，然臺灣高溫多濕的夏季氣候使該季病蟲害肆虐，小果番茄品種花蓮亞蔬21號⁽⁶⁶⁾、台南亞蔬11號⁽⁶⁴⁾與台南亞蔬19號⁽³³⁾等皆馴育耐萎凋病之性狀，足見其重要性。Fol造成之番茄萎凋病主要危害莖及幼苗，使植株由下位葉開始向上變黃且萎凋、葉柄下垂，最後整株枯萎。病株莖部之橫切面可見維管束褐化，為重要的鑑定特徵⁽⁴⁾。此外，Fol會以耐逆境之厚膜孢子(chlamydospore)於田間殘存，為此病害難以根絕的原因之一。

根據殺真菌劑抗藥性行動委員會(Fungicide Resistance Action Committee)之殺菌劑分類，有數類以細胞膜為標的，如G類中的三唑類(triazole)藥劑可干擾細胞膜上的ergosterol生合成，而F類藥劑則能干擾細胞膜生合成。其中F2類藥劑影響參與磷脂質(phospholipid)生合成之酵素「甲基轉移酶(methyltransferase)」，例如系統性藥劑亞賜圃，可阻礙侵染寄主後之菌絲無法繼續侵入與生長，兼具保護與治療效果。磷脂質為構成胞膜的主要成分，根據結構不同，可再細分為PE、PS、PC或phosphatidylinositol (PI) 等種類，而PE與其他磷脂質相比，結構上具有較大的疏水性區域且頭基(head group)較小，因此易形成非層狀結構(nonlamellar structures)，增加膜的非雙層形成(nonbilayer-forming)特性，此特性於生物膜的分裂、融合、內嵌蛋白質的移動等時機扮演重要角色；膜的非雙層與雙層特性藉由比例上的轉換，可讓某些細菌適應環境溫度的變化^(2, 60)。由於PE在粒線體之膜中佔有較大比例，因此其缺陷會對粒線體造成較大影響，例如當哺乳類細胞粒線體的PE含量減少，會導致粒線體功能異常進而使胚胎死亡⁽⁶⁰⁾。

參與真菌PE生合成之酵素Psd有Psd1與Psd2兩種，在酵母菌中，Psd1與Psd2兩者共同作用以將PS代謝為PE，而在不同菌種中Psd1與Psd2的貢獻度不一。啤酒酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*與嗜甲醇酵母菌*Pichia pastoris*之PE皆主要由Psd1作用產生⁽¹¹⁾。Psd也參與其他功能，例如霍亂弧菌*Vibrio cholera*(革蘭氏陽性細菌)之Psd與其生存直接相關、*S. cerevisiae*之Psd1影響菌體在以特定非發酵性碳源(nonfermentable carbon source)作為營養源時的粒線體功能、同菌種之Psd2則誘導自噬作用以舒緩重金屬鎘(Cadmium)對細胞造成的毒害壓力⁽⁴³⁾，而*Toxoplasma gondii*(弓漿蟲)會分泌一種可溶性Psd酵素(TgPsd1)，幫助其侵染哺乳類細胞⁽¹¹⁾。

真菌以啤酒酵母菌為例，已知磷脂質生合成路徑有4條：(1)經由粒線體之Psd1將PS轉化為PE，屬於*de novo* pathway；(2)藉由高基氏體(Golgi body)之Psd1將PS轉化為PE，屬於*de novo* pathway；(3)藉由微粒體(microsome)中酵素Eki1將ethanolamine或 ethanolamine phosphate納入磷脂質代謝路徑中作為基質，最後藉由酵素Ept1將CDP ethanolamine轉化為PE，屬於Kennedy pathway；(4)藉由粒線體內質網組合膜(Mitochondria-associated ER membranes, MAMs)上之Ale1酵素將lyso-PE轉化為PE，屬於lysophospholipid acylation pathway^(11, 43)(圖一)。啤酒酵母菌及哺乳類動物皆具有Kennedy pathway以及*de novo* pathway

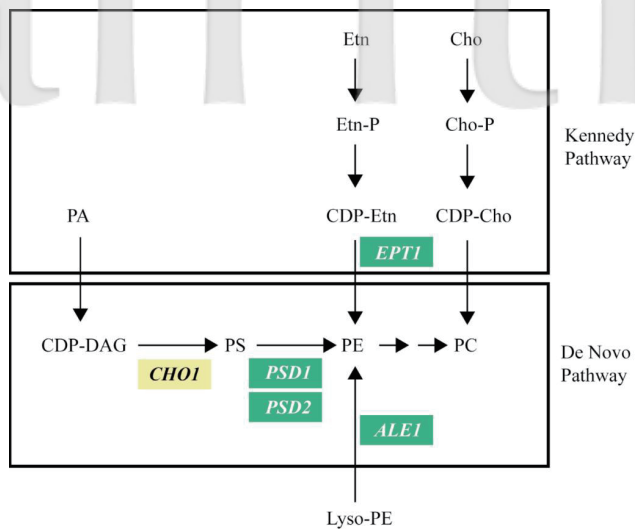
兩條磷脂質生合成路徑，Psd酵素參與在後者，酵母菌之PE大部分由*de novo* pathway中之Psd1酵素作用產生⁽¹¹⁾，但是當*de novo* pathway受到阻礙，有時突變株也可以藉由添加外源ethanolamine或choline，以Kennedy pathway作為替代路徑生產PE，讓原本在微量培養基上生長能力受阻的菌株恢復生長。根據廣義之營養缺陷型菌株(auxotrophic mutant)定義，此特性可稱為「ethanolamine/choline auxotrophic」。營養缺陷的定義，廣義上指「一突變株相比於可正常生長的野生株而言，需要添加外源營養方可恢復生長能力」的特性⁽³⁵⁾，狹義上則特指突變株之生長缺陷源於其「缺乏合成某營養源之能力」⁽²⁵⁾，因此需要外部添加此特定營養源。雖然酵母菌利用ethanolamine或choline生合成磷脂質的方式為將其從外部納入菌體，而非自行合成之，但由於1980年之早期文獻中，即有外源添加ethanolamine或choline方可生長之酵母菌突變株使用「ethanolamine/choline auxotrophic」之形容詞，且直至最近(2018年)之文獻也沿用此字詞⁽¹⁰⁾，因此本研究也以「ethanolamine auxotrophic」形容添加外源ethanolamine後方可恢復在培養基上生長能力的突變株。

目前針對絲狀真菌磷脂質生合成基因之相關研究較少，而以研究較多的酵母菌而言，PE主要經由*de novo* pathway產生，因此本實驗室選用*de novo* pathway中之*PSD1*與*PSD2*基因針對絲狀真菌進行研究。另外，酵母菌及哺乳類的Psd具有差別，哺乳類的Psd由單一結構執行功能，而酵母菌的Psd則分為Psd1及Psd2，兩者共同執行作用⁽⁷⁾，因此Psd或許能作為一具有高度選擇性之藥劑標的⁽⁵²⁾，具有藥物開發方面的研究價值。本研究以*PSD2*基因作為研究對象，發現*PSD2*基因缺失會導致Fg與Fol之PE生成量減少，*psd2*突變株可藉由添加ethanolamine (Etn)恢復營養缺陷。另外，*PSD2*基因也影響Fg或Fol生長、產孢能力，但不影響對小麥或番茄寄主之毒力。

材料與方法

小麥赤黴病菌培養條件之優化

真菌在繼代培養的過程中，繼代次數過多時偶有產生「degenerate cultural variant」的突變型情形，在植物病原中又以*Fusarium*屬之真菌特別容易產生⁽³¹⁾。本研究中使用之*F. graminearum*菌株即有此情形發生，文獻中所述兩種突變型一氣生菌絲漸少且菌落扁平化之種類，與菌絲由橘黃轉變為白色之型態都曾發生。本研究將Hassan等人之培養方法改良，以固態大麥麥麩培養基(barley bran medium, BM; barley bran 20 g, agar 15 g, dH₂O 1 L)與液態大麥麥麩培養基(barley bran 20 g, dH₂O 1 L，滅菌後以兩層紗布過濾，濾液以3,500 rpm、25℃離心後取上清液)分別取代真菌培養常用之potato dextrose agar (PDA)培養基與potato dextrose broth (PDB)培養液培養Fg⁽¹⁷⁾，以降低突變型之發生，並使*F. graminearum*穩定生長與產孢。



圖一、真菌之磷脂質代謝路徑。酵母菌可利用兩種磷脂質代謝路徑 Kennedy pathway與*de novo* pathway。在Kennedy pathway中，外源Etn與Cho可從外部環境中納入細胞內利用。本研究主要研究對象PE可以由4種方式產生，分別由Psd1、Psd2、Ept1、Ale1催化產生(綠色標示)，而PS可由Cho1酵素催化產生。本圖參考Chen等(2010)與Di Bartolomeo等(2017)之研究繪製^(7, 11)。PA: phosphatidic acid; CDP-DAG: cytidine diphosphate diacylglycerol; PS: phosphatidylserine; PE: phosphatidylethanolamine; PC: phosphatidylcholine; Lyso-PE: lyso-phosphatidylethanolamine; Etn: ethanolamine; Cho: choline; Etn-P: phosphoethanolamine; Cho-P: phosphocholine; CDP-Etn: cytidyldiphosphate-ethanolamine; CDP-Cho: cytidyldiphosphatecholine.

Fig. 1. Biosynthesis pathway of phospholipid in fungi. Yeasts can synthesize phospholipid from Kennedy pathway and *de novo* pathway. PE formation can be catalyzed through four enzymes including Psd1, Psd2, Ept1 and Ale1 (green blocks), while PS can be catalyzed by Cho1. PA: phosphatidic acid; CDP-DAG: cytidine diphosphate diacylglycerol; PS: phosphatidylserine; PE: phosphatidylethanolamine; PC: phosphatidylcholine; Lyso-PE: lyso-phosphatidylethanolamine; Etn: ethanolamine; Cho: choline; Etn-P: phosphoethanolamine; Cho-P: phosphocholine; CDP-Etn: cytidyldiphosphate-ethanolamine; CDP-Cho: cytidyldiphosphatecholine. This figure modified from Chen *et al.* (2010) and Di Bartolomeo *et al.* (2017)^(7, 11).

菌株來源、培養與保存

本研究使用兩種镰孢菌，分別為小麥赤黴病菌 *F. graminearum* PH-1(以下簡稱Fg)與番茄萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287(以下簡稱Fol)。Fg以BM培養基、Fol則以PDA (Difco™, USA)培養基，黑暗中培養於25℃，每3至5天繼代一次，培養8天後切取已產孢之菌絲塊，置入含25%甘油之冷凍保存管，長期保存於-80℃。

孢子懸浮液製備

Fol以100 mL PDB培養液於25℃、150 rpm，黑暗中培養3天，Fg則以大麥麩培養液於25℃、150 rpm，黑暗中培養8天

表一、使用於本研究之镰孢菌菌株

TABLE 1. *Fusarium* strains used in this study.

Strains	Genotype	Parent	Reference
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	Wild type	Wheat isolate	⁽⁹⁾
GS8	<i>psd2Δ::hph</i>	PH-1	This study
GS10	<i>psd2Δ::hph</i>	PH-1	This study
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287	Wild type	Tomato isolate	⁽³⁷⁾
LHS4	<i>psd2Δ::hph</i>	4287	This study
LHS6	<i>psd2Δ::hph</i>	4287	This study

後以微過濾膜(miracloth, Calbiochem®, USA)過濾，濾液於3,500 rpm、4℃離心10分鐘，去除上清液後再加dH₂O，以此方法水洗兩次，最後以血球計數器定量。另外，為使孢子發芽時間統一，孢子發芽率測試所需孢子為甫從菌絲或產孢梗脫落之孢子，因此除了孢子發芽率測試以固態培養方法蒐集孢子之外，其餘試驗所使用孢子懸浮液皆以此液態培養方法所產生之孢子製備。

*psd2*突變株之建立

比對Fg與Fol之*PSD2*之基因序列

本研究選用已完成全基因序列定序之菌株進行試驗，分別為Fg PH-1以及Fol 4287。因*PSD2*功能為首次在絲狀真菌中被研究，因此以酵母菌資料庫*Saccharomyces* Genome Database (SGD)之*PSD2*序列 (YGR170W, SGD ID: S000003402) 比對兩菌株序列，發現確實具有高度相似性的片段。

含抗藥性基因之質體純化

從*Escherichia coli* DH5 α 中抽取含有針對kanamycin與hygromycin抗藥性基因質體pPK2hphgfp⁽⁴²⁾。在5 mL LB broth中添加kanamycin使其最終濃度為50 μ g/mL，另外沾取些許保存於養菌管中之*E. coli* DH5 α ，於培養液中稍微攪拌，於37℃以150 rpm、黑暗中震盪培養隔夜後，以Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (Viogene®, Taiwan)抽取質體，最後以25 μ L ddH₂O回溶。以表二之引子對JC766、JC767進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)。PCR反應溶液總體積為20 μ L，其中有template 1 μ L、10X buffer 2 μ L、10X dNTP 2 μ L、0.25 μ M之forward 與reverse primer各0.5 μ L、ddH₂O 13.9 μ L 與Ex Taq polymerase 0.1 μ L，後續之PCR反應溶液配方皆同。反應條件如下：95℃反應5分鐘後，以95℃反應30秒、48℃反應45秒、72℃反應3分31秒為1 cycle共循環加熱35 cycle後，以72℃反應7分鐘，最後降溫至12℃恆溫。將PCR產物經膠體電泳後切下於約4,667 bp處之條帶，以Gel/PCR DNA Isolation System (Viogene®, Taiwan)純化反應產物，本研究切膠純化皆

4 J. Plant Med.

使用此方法。產物為含hygromycin磷酸轉移酶之抗藥性基因(hygromycinphosphotransferase, *hph*)、promoter *PgpdA*、eGFP基因與 terminator *TtrpC*之gene cassette，以下簡稱*hph* cassette。

真菌之DNA純化

切下分別於PDA與BM培養3天之Fol和Fg菌絲塊放入100 mL PDB，在25℃、150 rpm、黑暗中震盪培養3天。將培養液以微過濾膜過濾，再以dH₂O沖洗，移除剩餘PDB。將微過濾膜上之菌絲刮下，以擦手紙吸乾菌絲上的液體直到完全乾燥後，置於-20℃預冷過之研鉢，加入液態氮研磨成粉末。取2 mL離心管加入500 μL extraction buffer (200 mM Tris 500 mL, 250 mM NaCl 125 mL, 25 mM EDTA 25 mL, 0.5% SDS, ddH₂O 225 mL)，將菌絲粉末倒入後震盪，再加入體積比1:1之phenol與chloroform共500 μL後震盪10秒，之後以13,000 rpm離心15分鐘。將上清液移至新的1.5 mL離心管，加入800 μL chloroform後再離心15分鐘。將上清液移至新的1.5 mL離心管後加入500 μL isopropanol，輕微搖晃均勻，之後以13,000 rpm離心5分鐘，去除上清液。沉澱物以70%乙醇清洗，以14,000 rpm離心2分鐘

表二、本研究使用之引子

TABLE 2. Primers used in this study

Primer	Use	Sequence (5' to 3')
JC766	<i>hph</i> gene cassette	GAGCTCGGTACCCGGGGATCT
JC767	<i>hph</i> gene cassette	AAGAAGGATTACCTCTAAACA
JC992	5' NCR of <i>FgPSD2</i>	TCGTCTCGTCTCGCTATAA
JC993	5' NCR of <i>FgPSD2</i>	AGATCCCCGGGTACCGAGCTCG CAGAAAAGGCCTTGGCTA
JC994	3' NCR of <i>FgPSD2</i>	TGTTTAGAGGTAATCCTTCTTA GATGCCGACCCAGCAA
JC995	3' NCR of <i>FgPSD2</i>	TCGTGAGTCCTTTAACTCAG
JC932	5' NCR of <i>FolPSD2</i>	TACGCTCGACCATCAACAA
JC933	5' NCR of <i>FolPSD2</i>	AGATCCCCGGGTACCGAGCTCA AGAAAGGCCTTGGCTT
JC934	3' NCR of <i>FolPSD2</i>	TGTTTAGAGGTAATCCTTCTTG ATGCATGAGAAACGAAACGA
JC935	3' NCR of <i>FolPSD2</i>	CCACGTCCGCATGAGAAAA
JC996	Part of <i>FgPSD2</i>	CAAAAAGAATCGCAGCAACAG
JC1261	Part of <i>FgPSD2</i>	TTTGGACGGAAGTGAGAGGG
JC1227	5' integration of <i>Δpsd2</i> of Fg	AATCGGCACGGGAAGATACG
JC1228	5' integration of <i>Δpsd2</i> of Fg	GAGTCTCAGCCTGGAAGCAA
JC1072	3' integration of <i>Δpsd2</i> of Fg and Fol	AGGACACACATTCATCGTAGG
JC1260	3' integration of <i>Δpsd2</i> of Fg	ATTGTACCTTCGGTTTGCC
JC1014	Part of <i>FolPSD2</i>	TGACCTCAACCTGTTTATAA
JC1015	Part of <i>FolPSD2</i>	TGGAGGAGGTTCTTCATCTCG
JC1070	5' integration of <i>Δpsd2</i> of Fol	TGCGAGACACAAGACGAGAT
JC1071	5' integration of <i>Δpsd2</i> of Fol	AGATTGGAAGCGCCTTCA
JC1073	3' integration of <i>Δpsd2</i> of Fol	TCGCTAAACTTCCTCTTCCA

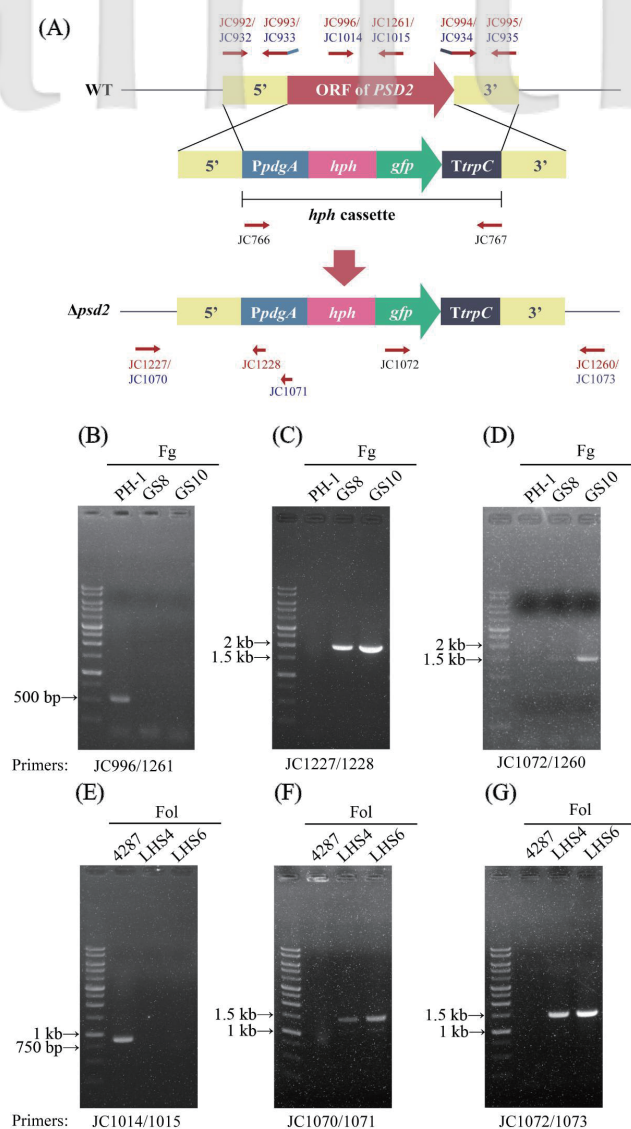
後，移除乙醇並置於65℃、40分鐘，直到殘留乙醇完全揮發，再加入100 μL ddH₂O回溶之。加入2 μL RNase A，在37℃放置40分鐘待RNase A反應完全後，將DNA以超微量分光光度計(NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA)定量，並以ddH₂O調整至20-30 ng/mL，置於4℃保存。

原生質體(protoplast)製備

參考Hou等人(2002)之研究，進行原生質體製備與突變菌株篩選⁽²²⁾。將在BM培養3天之Fg菌絲塊、在PDA培養3天之Fol菌絲塊置於100 mL CMC培養基(carbomethylcellulose 16 g, NH₄NO₃ 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, yeast extract 1 g, dH₂O 1L)，於25℃、150 rpm、黑暗中震盪培養5天後，以微過濾膜過濾，將濾液裝在50 mL離心管以3,500 rpm、4℃離心10分鐘，去除上清液後加入dH₂O以同樣條件離心，以此方式水洗2次，最後以血球計數器將孢子懸浮液定量至10⁸ conidia/mL。將1 mL孢子懸浮液加入100 mL YEPD (yeast extract 3 g, peptone 10 g, glucose 20 g, dH₂O 1L)於25℃、黑暗中培養隔夜，以兩層微過濾膜過濾，以50 mL dH₂O清洗一次後，再以30 mL 1.2M KCl清洗1次。將菌絲刮下，置於20 mL protoplast solution (driselase 0.5 g, lysing enzyme 0.1 g，於30℃、90 rpm震盪30分鐘後以0.45 μm微孔膜過濾)，於30℃、90 rpm、黑暗中震盪培養4小時後每小時觀察細胞壁分解狀況，待大部分菌絲已分解並產生足量原生質體後，以兩層微過濾膜過濾，將濾液回收，膜上之原生質體以1.2 M KCl沖下置於50 mL離心管，以3,500 rpm、4℃離心10分鐘，去除上清液後再加入1.2 M KCl 以相同條件離心一次。最後將原生質體置於STC solution (sorbitol 1.2 M, pH 8 Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM)，以血球計數器定量使最終濃度為10⁷至10⁸ protoplasts/mL，並加入占總體積7%之DMSO，取1.5 mL離心管將原生質體分裝為每管200 μL，保存於-80℃。

Fusion PCR

本試驗所使用之引子列於表二，突變株轉型示意圖如圖二A所示。以fusion PCR的方式得到帶有hygromycin抗藥基因與野生株ORF上下游基因片段之*hph* gene cassette，將*PSD2*基因置換為*hph* gene cassette後得*psd2*突變株。Fg方面，使用JC992和JC993引子對以Fg全基因體組為模板，增幅出*PSD2*之5'端non-coding region (NCR)，另以JC994和JC995引子對以相同方法增幅出*PSD2*之3'端NCR，反應條件如下：95℃反應5分鐘後，以95℃反應30秒、48℃反應30秒、72℃反應45秒為1 cycle共循環加熱35 cycle後，以72℃反應7分鐘，最後降溫至12℃恆溫。接著進行fusion PCR，以JC992、JC995引子對，以5' NCR、*hph* cassette、3' NCR鹼基個數比例為1:3:1之混合液為模板，以下列條件進行PCR：95℃反應5分鐘後，以95℃反應30秒、58℃反應30秒、72℃反應6分為1 cycle共循環加熱35 cycle後，以72℃反應7分鐘，最後降溫至12℃恆溫。PCR產物經電泳後將約6,425 bp處之條帶切膠純化。



圖二、小麥赤黴病菌與番茄萎凋病菌之 $psd2$ 突變株轉形與確認。(A)以 fusion PCR 的方式得到帶有 hygromycin 抗藥基因與野生株 *PSD2* ORF 上下游基因片段之 *hph* gene cassette，將 *PSD2* 基因置換為 *hph* gene cassette 後得 $psd2$ 突變株，接著以 PCR 的方式確認突變菌株是否轉型成功。圖中引子文字顏色，紅字表 Fg 使用之引子，藍字表 Fol 之引子，而黑色表兩菌種皆有使用之引子。(B)以 *PSD2* ORF 確認 Fg 之兩獨立 $psd2$ 突變株 GS8 與 GS10，可見野生株 PH-1 在 512 bp 處具有條帶而突變株則無；(C)以 5' 與 (D) 3' recombination site 確認 Fg 之兩獨立 $psd2$ 突變株，可見兩菌株皆分別於 1,990 bp、1,499 bp 具有條帶；(E)以 *PSD2* ORF 確認 Fol 之 $psd2$ 突變株 LHS4 與 LHS6，可見野生株 4287 在 867 bp 處具有條帶而突變株則無；(F)以 5' 與 (G) 3' recombination site 確認 Fol 之 $psd2$ 突變株，可見兩菌株皆分別於 1,460 bp、1,413 bp 具有條帶。

Fig. 2. Transformation and confirmation of $\Delta psd2$ mutants from *F. graminearum* PH-1 and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. (A) *PSD2* gene was replaced with *hph* gene cassette containing hygromycin resistance gene that was generated by fusion PCR in order to obtain two independent $\Delta psd2$ mutants. $\Delta psd2$ mutants were confirmed by PCR. As for different color of word on primers, red words represent primers for Fg, blue words represent primers for

Fol, black words represent primers for both Fg and Fol. (B) There was a 512 bp band from wild type representing *PSD2* ORF of Fg while neither of two independent $\Delta psd2$ mutants GS8 and GS10 had this band. $\Delta psd2$ mutants of Fg were also confirmed by (C) 5' and (D) 3' recombination sites according to a band of 1,990 bp and 1,499 bp respectively. (E) There was a 867 bp band from wild type representing *PSD2* ORF of Fol while neither of two $\Delta psd2$ mutants LHS4 and LHS6 had this band. $\Delta psd2$ mutants of Fg were also confirmed by (F) 5' and (G) 3' recombination sites according to a band of 1,460 bp and a band of 1,413 bp respectively.

Fol 方面，使用 JC932 和 JC933 引子對以 Fol 全基因體組為模板，增幅出 *PSD2* 之 5' 端 NCR，另以 JC934 和 JC935 引子對以相同方法增幅出 *PSD2* 之 3' 端 NCR，反應條件同 Fg 之 NCR 反應條件。接著進行 fusion PCR，以 JC932、JC935 引子對，以 5' NCR、*hph* cassette、3' NCR 鹼基個數比例為 1:3:1 為模板，以下列條件進行 PCR：95°C 反應 5 分鐘後，以 95°C 反應 30 秒、48°C 反應 30 秒、72°C 反應 5 分為 1 cycle 共循環加熱 35 cycle 後，以 72°C 反應 7 分鐘，最後降溫至 12°C 恆溫。PCR 產物經電泳後將約 6,616 bp 處之條帶切膠純化。

以 PEG 菌株轉型法製作突變株

此試驗為期三天，第一天，將原生質體置於冰上，每管加入 14-18 μ L 之 fusion PCR 產物後手搖混勻，靜置冰上 20 分鐘。加入 1 mL PTC (PEG 8000, 20 g, STC 50 mL) 後手搖混勻，再靜置於室溫 20 分鐘。接著移至 15 mL 離心管，加入 5 mL TB3 液態培養基 (yeast extract 3 g, casamino acid 3 g, sucrose 200 g, adjust dH₂O to 1L) 混勻，於 25°C、150 rpm、黑暗中培養 12-16 小時，另外將含有 0.7% agarose 之 TB3 半固態培養基滅菌後於 65°C 烘箱保溫，並準備含有 150 μ g/mL hygromycin B 之 TB3 固態培養基 (TB3 7.5 mL, 0.7% agarose/皿)。第二天，將細胞壁恢復之原生質體懸浮液以 3,500 rpm、4°C 離心 10 分鐘後，去除上清液並加入 1 mL STC，混勻後加入 15 mL 之 TB3 半固態培養基，每管分為三等份分別鋪在含有 150 μ g/mL hygromycin B 之 TB3 固態培養基上，於 25°C 避光培養隔夜。第三天，鋪上 7.5 mL、含有 250 μ g/mL hygromycin B 之 TB3 半固態培養基，避光培養 4 至 5 天，挑選單一菌落培養於含有 250 μ g/mL hygromycin B 之 V8 培養基 (V8 juice 200 mL, CaCO₃ 2 g, dH₂O 1 L)，培養 7 至 10 天後以 CTAB 抽取法抽取 DNA，方法如下：將菌絲以滅菌牙籤刮下置入 800 μ L DEB (nuclei lysis buffer: DNA isolation buffer: 5% sarkosyl=1:1:0.4; nuclei lysis buffer: pH=7.5 之 1 M Tris 100 mL、pH=8 之 0.5 M EDTA 50 mL、CTAB 10 g，加入 dH₂O 至 500 mL；DNA isolation buffer: sorbitol 31.89 g、Tris base/THAM 6.05 g、EDTA 0.84 g，使 pH=7.5 再加入 dH₂O 至 500 mL；5% sarkosyl: N-laurylsarkosine 12.5 g，加入 dH₂O 至 250 mL) 後震盪，於 65°C 水浴 1 小時，每 15 分鐘以手搖勻。加入 750 μ L chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 後以手搖勻，以 11,500 rpm 離心 15 分鐘，再加入

750 μL isopropanol: 7.5 M ammonium acetate (4:1), 以手搖勻後以最高轉速離心10分鐘, 去除上清液後加入100 μL 之70%乙醇, 再以最高轉速離心5分鐘, 置於65°C、40分鐘使乙醇完全揮發, 以20-50 μL 之ddH₂O回溶, 於4°C保存, 隔夜後使用。

以PCR方式確認 $psd2$ 突變株

本試驗所使用之引子列於表二, 引子位置示意圖如圖二A所示。分別針對 $PSD2$ 之open reading frame (ORF)、5'與3'端 recombination site進行確認。Fg方面, 抽取野生株與突變株之DNA後以JC996、JC1261為引子對針對部分ORF進行增幅, 反應條件如下: 95°C反應5分鐘後, 以95°C反應30秒、49°C反應30秒、72°C反應30秒為1 cycle共循環加熱35 cycle後, 以72°C反應7分鐘, 最後降溫至12°C恆溫, 預期產物大小為512 bp。另外, 抽取突變株DNA後分別以JC1227與JC1228、JC1072與JC1260為引子對, 對5'與3' recombination site進行增幅。針對5'反應條件如下: 95°C反應5分鐘後, 以95°C反應1分鐘、59°C反應30秒、72°C反應2分鐘為1 cycle共循環加熱35 cycle後, 以72°C反應7分鐘, 最後降溫至12°C恆溫, 針對3'反應則將引子黏合溫度從59°C改為57°C, 其餘相同。兩者預期產物大小分別為1,990 bp與1,499 bp。

Fol方面, 抽取野生株與突變株之DNA後以JC1014、JC1015為引子對針對部分ORF進行增幅, 反應條件如下: 95°C反應5分鐘後, 以95°C反應30秒、46°C反應30秒、72°C反應40秒為1 cycle共循環加熱35 cycle後, 以72°C反應7分鐘, 最後降溫至12°C恆溫, 預期產物大小為867 bp。另外, 抽取突變株DNA後分別以JC1070與JC1071、JC1072與JC1073為引子對, 對5'與3' recombination site進行增幅。反應條件如下: 95°C反應5分鐘後, 以95°C反應30秒、48°C反應30秒、72°C反應1分6秒為1 cycle共循環加熱35 cycle後, 以72°C反應7分鐘, 最後降溫至12°C恆溫, 兩者預期片段大小分別為1,460 bp與1,413 bp。後續試驗所使用之Fg兩獨立 $psd2$ 突變株分別以代號GS8與GS10表示, 而Fol兩獨立 $psd2$ 突變株則以LHS4與LHS6表示, 所有菌株皆經過確認。

$PSD2$ 基因功能研究

磷脂質萃取與成分分析

分別取Fg與Fol之2菌絲塊加入100 mL Chand與Sprinivasan (1979)所研發用於抽取鰵孢菌脂質之培養基 (KH₂PO₄ 0.3 g, NH₄NO₃ 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, glucose 50 g, malt extract 2g, dH₂O 1L)⁽⁶⁾, 之後於25°C、150 rpm、黑暗中培養5天, 另外以培養基中加入1 mM ethanolamine者作為正對照組。參考蔡 (2012)所改編自Folch (1957)之抽取脂質方法, 此法較可確保低極性脂質被成功抽取。首先, 將培養液以微過濾膜過濾後將膜上菌絲取下, 以擦手紙擦乾, 秤取0.4 g置入2 mL離心管, 加入chloroform:methanol (2:1) 800 μL , 再加入兩顆鋼珠後使

用均質機以最高轉速震盪15秒, 共震盪3次。將均質後產物移入玻璃試管, 加入2.6 mL methanol, 震盪10秒後於冰上靜置10分鐘, 接著加入5.2 mL chloroform, 震盪10秒後於冰上靜置20分鐘, 再加1.6 mL之0.9% NaCl, 以2500 rpm、4°C低速離心10分鐘。將下層有機層吸至新玻璃試管, 上層溶液則加入4 mL chloroform:methanol:dH₂O (86:14:1), 震盪後靜置5分鐘, 再以2,500 rpm、4°C離心5分鐘, 抽取將兩管有機層產物合併至一管, 再次以相同條件離心並吸除殘餘水層, 將試管以石蠟膜封起並置於4°C保存, 之後使用吹氮濃縮裝置EYELA MG-2200 (東京理化株式會社, 日本)將抽取脂質之溶劑揮發, 將產物置於-20°C保存, 分析前再將已乾燥之脂質以100 μL chloroform:methanol (2:1)回溶^(12, 59)。在本研究中, 不同菌株以相同乾重之菌絲萃取脂質後以薄層層析試驗分析脂質組成, 由於萃取後之脂質無論定量與否, 在薄層分析片上皆呈現相同結果(數據未顯示), 顯示 $PSD2$ 基因對總脂質含量幾乎無影響, 因此為求試驗簡便, 本試驗中不同菌株萃取之脂質皆以相同體積溶劑溶解後進行薄層層析試驗。

使用薄層層析法(thin layer chromatography, TLC)偵測細胞中PS及PE等不同種類的磷脂質含量, 觀察 $psd2$ 突變株與野生株產生不同種類磷脂質的效率高低以及兩者之差異。首先將薄層分析片進行前處理: 於頭尾各距0.5公分處用鉛筆畫一線作為反應起始與終點, 以70°C處理5分鐘, 再使用chloroform:methanol (1:1)為展開液於展開槽中進行展開, 接著以70°C處理5分鐘, 至此前處理完畢。待薄層分析片冷卻後於起始線滴上2 μL 樣品, 並以純度95%以上、濃度為0.375 g/mL之PS、PE與PC作為對照組, 使用chloroform: ethanol: ddH₂O: trimethylamine (30:35:7:35)為展開液於展開槽中展開⁽⁷⁾。待薄層分析片上的展開液完全揮發後, 均勻噴灑溶於50%乙醇之10%硫酸溶液, 再將其置於150°C加熱30分鐘⁽⁴¹⁾。

以Kennedy pathway代替 $de novo$ pathway合成PE之能力測試

Ethanolamine (Etn)是合成磷脂質的材料之一, 以Etn為基質生產PE之代謝路徑Kennedy pathway, 與Psd參與之PE合成路徑 $de novo$ pathway不同。本試驗以添加與未添加Etn之MM培養基(salt mix lacking MgSO₄ 50 mL, MgSO₄ solution 5 mL, glucose 10 g, trace element stock solution 200 μL , dH₂O 1L, agar 15 g; [salt mix lacking MgSO₄: NaNO₃ 120 g, KCl 10.4 g, KH₂PO₄ 16.3 g, K₂HPO₄ 20.9 g, dH₂O 1L; MgSO₄ solution: MgSO₄ · 7H₂O 10.4 g, dH₂O 100 mL; trace element stock solution: citric acid 5 g, ZnSO₄ · 6H₂O 5 g, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O 1g, CuSO₄ · 5H₂O 250 mg, MnSO₄ 50 mg, boric acid 50 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 50 mg, dH₂O 100 mL])^(21, 31)分別培養Fg、Fol之野生株與 $psd2$ 突變株, 觀察生長情形, 若突變株於MM培養基上無法生長而在添加Etn後恢復生長, 則突變株為「Etn auxotrophic」。

生長速率測試與菌落型態比較

Fol於PDA、Fg於BM培養5天之後，以圓形打洞器取菌落邊緣直徑4 mm菌絲塊，將之置於PDA、MM與BM共3種固態培養基培養於25℃黑暗中，連續4天測量菌落直徑，在培養第3天拍照觀察，試驗進行3重複。以培養第4天之菌落直徑進行顯著性檢定，以Dunnett's multiple comparisons test檢定顯著性，顯著水平設為0.05，統計軟體為Prism 7.0 software。

PSD2基因對分生孢子形態之影響

本試驗以分生孢子的長度、形態及隔膜作為孢子形態之指標。在孢子長度方面，取 10^7 conidia/mL孢子懸浮液10 μ L置於玻片上以光學顯微鏡鏡檢並拍照，再從照片上隨機取10孢子以Image J軟體測量孢子長度後，以Dunnett's multiple comparisons test檢定顯著性，統計軟體為Prism 7.0。隔膜觀察方面，取 10^7 conidia/mL孢子懸浮液400 μ L置於1 mL離心管，以14000 rpm、2分鐘離心後去除上清液並添加800 μ L dH₂O，以此方式水洗兩次，再加800 μ L、3.5 mg/mL之calcofluor white (Fluorescent Brightener 28, Sigma, USA)染劑以針對隔膜染色，震盪後避光靜置4分鐘，以相同方式水洗兩次，最後加入200 μ L之2% Tween 20並震盪，再以螢光顯微鏡鏡檢，螢光顯微鏡之濾鏡為U-FYW filter (Olympus, excitation filter 545-585 nm, barrier filter > 600 nm)。

PSD2基因對分生孢子發芽率之影響

Fol以PDA於25℃黑暗中培養5天，加入些許無菌水，以細胞刮勺刮除菌絲後，以微過濾膜過濾並蒐集下層溶液，接著以3,500 rpm、10分鐘離心，去除上清液後再加dH₂O，以此方式水洗2次。Fg則以BM於25℃、12 hr/12 hr光暗調節培養14天後，以相同方式收取孢子。孢子懸浮液以血球計數器定量。3 mL PDB加入孢子懸浮液，使最終濃度為 10^6 conidia/mL，以25℃、150 rpm、黑暗中震盪培養，Fol培養10小時，而Fg則培養17小時後觀察，隨機取50顆孢子計算發芽率，各處理皆三重複，以Dunnett's multiple comparisons test檢定顯著性，顯著水平設為0.05，統計軟體為Prism 7.0。

PSD2基因對Fol厚膜孢子之影響

將泥炭土KEKKILÄ Professional Substrat (Foreport Enterprises Co., Finland)於65℃放置隔夜，取120 g加入700 mL dH₂O、0.2 g CaCO₃後高溫高壓滅菌。接著以兩層紗布過濾泥炭土萃取液，與6% glucose分開滅菌後混合成含0.5% glucose之泥炭土萃取液，分裝於250 mL錐形瓶，每瓶10 mL，分別加入500 μ L、 10^5 conidia/mL之Fol野生株與兩psd2突變株孢子懸浮液⁽⁸⁾，於25℃、150 rpm避光培養7天，進行3重複。接著將菌液以兩層微過濾膜過濾，去除培養液與大、小孢子後以光學顯微鏡觀察。

胞外酵素活性測試

本試驗以澱粉、carboxymethylcellulose (CMC)、Tween 20、明膠、酪蛋白、大豆卵磷脂為基質，測試突變株之澱粉分解酵素(amylase)、纖維分解酵素(cellulase)、脂質分解酵素(lipase)、針對明膠之蛋白分解酵素(proteinase)、針對酪蛋白之蛋白分解酵素與磷脂分解酵素(phosphatidase)等6種胞外酵素活性。在澱粉培養基(soluble starch 0.4 g, nutrient broth 2.6 g, agar 3 g, dH₂O 200 mL, pH=6)、CMC培養基(yeast extract 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.4 g, KH₂PO₄ 0.8 g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 2.27 g, CaCl₂ 0.2 g, trace element stock solution 40 μ L, CMC 1 g, agar 3 g, dH₂O 200 mL)、脂質培養基(peptone 2 g、NaCl 1 g、CaCl₂ 0.015 g、agar 3 g、dH₂O 200 mL，滅菌後加入Tween 20使最終濃度為1%)、明膠培養基(nutrient broth 2.6 g, gelatin 0.8 g, agar 3 g, dH₂O 200 mL)、酪蛋白培養基(將脫脂奶粉5.6 g與casein acid hydrolysate 2 g溶於100 mL dH₂O，與pH 6之yeast extract 0.5 g, glucose 0.2 g, agar 3 g, dH₂O 100 mL分開滅菌後混合)與磷脂培養基(先將1 g大豆卵磷脂溶於100 mL dH₂O，於4℃靜置隔夜，將其分別與pH 5.7之KH₂PO₄ 2.54 g、K₂HPO₄ 0.23 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.08 g與dH₂O 100 mL分開滅菌後混合)上放置邊長4 mm之正方形GE Osmonics membranes (Lennetech, Netherlands)，再分別放上Fg與Fol之菌絲塊置於25℃黑暗中培養，待野生株菌落直徑超過65 mm (Fg培養3-5天、Fol培養4-6天)後，將GE Osmonics membranes取下，以下列方式觀察Fg與Fol對各種基質的分解情形，並測量具酵素活性之區域直徑：在澱粉培養基上加入20 mL 1%碘液後，觀察變為藍紫色之培養基中央之透明區域；在CMC培養基上加入20 mL 4% congo red後靜置10秒後倒掉染劑再靜置15分鐘，水洗去除染劑後，觀察淡黃色透明區域；在明膠培養基上加入20 mL ammonium sulfate飽和水溶液，觀察透明澄清區域；觀察脂質與磷脂培養基上之白色沉澱區域；觀察酪蛋白培養基上之透明區域^(28, 34, 58)。將具酵素活性之區域直徑除以菌落直徑，代表單位菌絲所具有之酵素活性。各處理皆三重複，以Dunnett's multiple comparisons test檢定顯著性，顯著水平設為0.05，統計軟體為Prism 7.0。

對植物寄主之毒力測試

Fg方面，選用小麥「台中選2號(*Triticum aestivum* L.)」麥穗進行接種。首先將麥粒以1%漂白水浸泡1分鐘後以無菌水浸泡1分鐘的方式清洗2次，放入4℃冰箱1周後，培養於泥炭土KEKKILÄ Professional Substrat與根基旺(南海®)比例為1:1之栽培介質，直至麥穗長成後剪下，再次以消毒麥粒之方式消毒後使用。在從基部算起第5粒麥穗上滴加10 μ L、 2×10^5 conidia/mL孢子懸浮液後，於25℃溼室放置48小時，再解除溼室並放置於室溫中待麥穗發病⁽⁶⁷⁾，麥穗莖部使用沾水之脫脂棉保濕。Fol方面，將番茄品種「農友301 (*Solanum lycopersicum* cv. Known-you 301)」培養於泥炭土與根基旺比例為1:1之栽培介

質，待從發芽算起5周大後連根拔起、清洗根部後剪除從根尖算起2公分，再將根部浸泡於 10^6 conidia/mL孢子懸浮液30分鐘後將根埋回土壤中，於 25°C 、12 h/12 h之光暗調節下培養3週後計算番茄罹病度(disease severity)，培養3周後計算番茄罹病度，以2盆為一組，以一組為一重複，共計三重複，以Dunnett's multiple comparisons test檢定顯著性，顯著水平設為0.05，統計軟體為Prism 7.0。罹病度計算公式為： $\Sigma(\text{罹病指數} \times \text{株數}) / (4 \times 2) \times 100\%$ ，其中罹病指數共分0-4級：0=健康植株；1=病徵不明顯，只有從莖基部算起第一片真葉有病徵；2=病徵明顯，有3片真葉有病徵；3=發病嚴重，葉壞疽、捲曲、落葉或萎凋；4=植株嚴重萎凋，已接近枯死⁽⁴⁸⁾。Fg與Fol之病原性測試均以接種 dH_2O 作為負對照組。

結果

*psd2*突變株確認轉型成功

分別針對ORF、5'與3'端recombination site以PCR方式進行確認，可以確定本試驗成功以*hph* cassette將Fg與Fol野生株之*PSD2*基因置換。Fg方面，可見野生株具有大小512 bp之部分ORF電泳條帶，而兩*psd2*突變株均無(圖二B)，且兩*psd2*突變株分別在1,990 bp與1,499 bp具有條帶，表示5'與3'端recombination site均位於預期位點(圖二C、D)。Fol方面，野生株具有大小867 bp之部分ORF電泳條帶，而兩*psd2*突變株均無(圖二E)，且兩*psd2*突變株分別在1,460 bp與1,413 bp具有條帶，表示5'與3'端recombination site均位於預期位點(圖二F、G)。

*PSD2*基因缺陷導致Fg與Fol之PE生成量減少

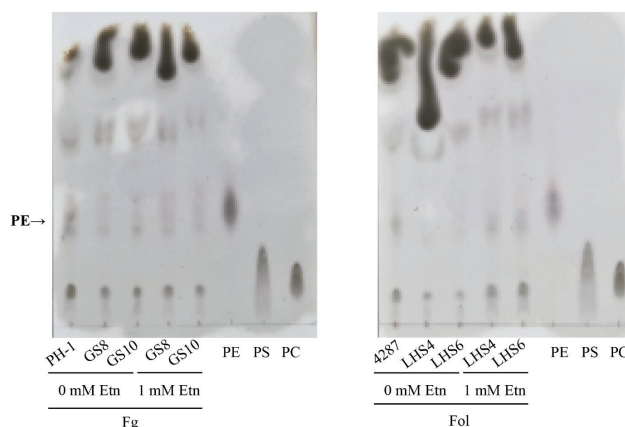
由薄層層析試驗結果可看出在缺乏ethanolamine (Etn)的情況下，Fg與Fol *psd2*突變株之PE生成量皆減少，且Fol之*psd2*突變株減少幅度較明顯；添加Etn後，Fol之*psd2*突變株之PE生成量恢復近於野生株，而Fg之*psd2*突變株之PE生成量則沒有明顯恢復，即添加Etn前後之PE生成量相似(圖三)。

外源ethanolamine可使*psd2*突變株恢復於MM培養基生長之能力

在MM培養基，Fg與Fol之*psd2*突變株幾乎無法生長，只能產生直徑不足1 mm之菌落，而在加入Etn後，Fg與Fol之*psd2*突變株可在MM培養基上恢復生長，其中Fol *psd2*突變株之生長能力可恢復近似野生株，而Fg之*psd2*突變株則只能恢復部分生長能力(圖四)。

*PSD2*基因影響菌株於特定培養基上之生長能力

Fg與Fol之*psd2*突變株之生長速率與野生株相比，皆於PDA培養基上稍低，而於MM培養基上明顯較低，然於BM培養基



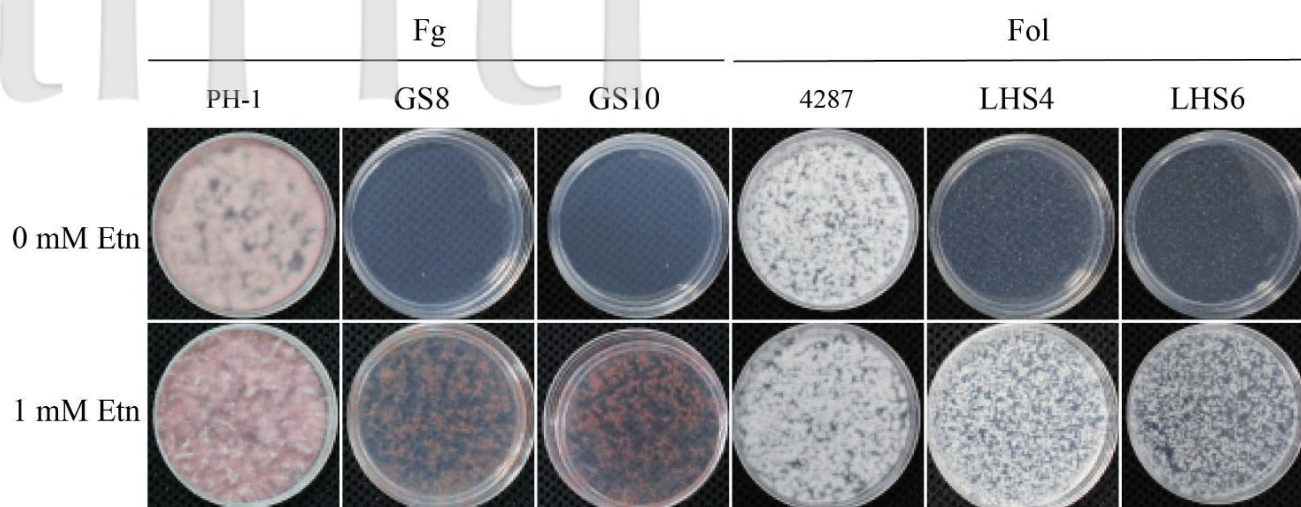
圖三、*PSD2*基因缺陷導致小麥赤黴病菌與番茄萎凋病菌之PE生成量減少。使用薄層層析法偵測細胞中PE、PS與PC等不同種類的磷脂質含量，在薄層分析片上可看出在缺乏ethanolamine (Etn)的情況下，Fg與Fol *psd2*突變株之PE生成量皆減少，且Fol之*psd2*突變株之減少量較多。添加1 mM Etn後，Fol *psd2*突變株之PE生成量恢復近於野生株，而Fg *psd2*突變株之PE生成量則沒有明顯恢復，即添加Etn前後之PE生成量相似。

Fig. 3. Deletion of *PSD2* gene leads to the decrease of PE in Fg and Fol. After detecting phospholipid composition by thin layer chromatography to determine content of PE, PS and PC, $\Delta psd2$ mutants of Fg and Fol showed fewer PE than wild type in the absence of ethanolamine (Etn). Deletion of *PSD2* gene of Fol affected more strikingly on PE production than Fg. PE production of $\Delta psd2$ mutants of Fol but not Fg recovered in the presence of Etn.

上則相似(圖五A、B)。以固態培養第4天之菌落直徑以Dunnett's multiple comparisons test進行生長速率之顯著性差異測試，Fg之野生株與兩*psd2*突變株(GS8、GS10)於PDA之菌落直徑分別為 46.0 ± 2.6 mm、 24.3 ± 0.3 mm與 24.0 ± 1.5 mm；於MM培養基之菌落直徑分別為 78.2 ± 1.8 mm、 13.0 ± 0.0 mm與 10.2 ± 0.3 mm；於BM培養基之野生株及兩*psd2*突變株菌落直徑皆為 85.0 ± 0.0 mm(圖五)。Fol之野生株與兩*psd2*突變株(LHS4、LHS6)於PDA之菌落直徑分別為 40.7 ± 0.8 mm、 35.7 ± 0.6 mm與 36.5 ± 1.3 mm；於MM培養基之菌落直徑分別為 44.7 ± 0.8 mm、 5.0 ± 0.0 mm與 5.8 ± 0.3 mm；於BM之菌落直徑分別為 54.8 ± 0.3 mm、 51.7 ± 0.6 mm與 52.2 ± 2.0 mm經由顯著性測試，Fg與Fol之突變株與野生株在MM與PDA上之菌落大小皆具有顯著差異，*P*值小於0.01，在BM則無。Fg之*psd2*突變株在PDA上菌絲生長較為密集，菌落形態與野生株相比具有明顯差異；在BM培養基上則與野生株之生長速率、菌落形態皆相似。Fol之*psd2*突變株與野生株在PDA與BM上之菌落形態皆相似(圖五C)。

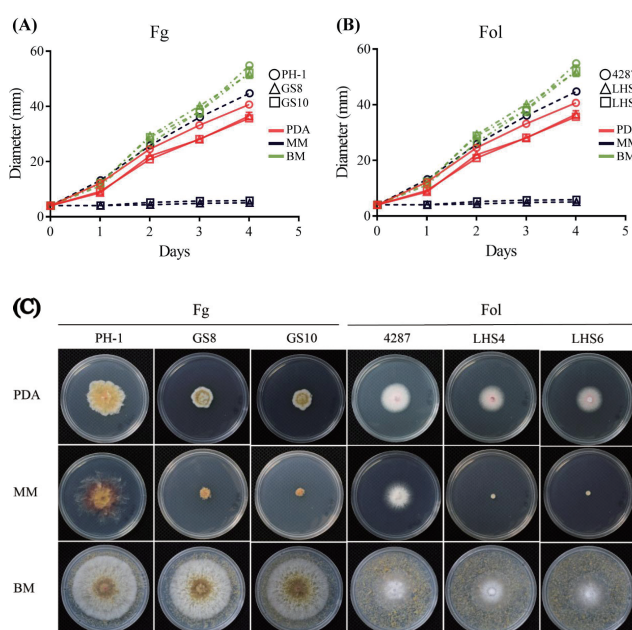
*PSD2*基因未顯著影響Fg與Fol之分生孢子長度

從形態與長度兩個方面觀察分生孢子。形態方面，Fg *psd2*突變株之大分生孢子與Fol *psd2*突變株之小分生孢子，在形態上與野生株相比均無顯著差異。Fg *psd2*突變株之大分生孢



圖四、Ethanalamine可恢復小麥赤黴病菌與番茄萎凋病菌 $\Delta psd2$ 突變株之營養缺陷。在微量元素培養基(minimal medium, MM)上，Fg與Fol之 $\Delta psd2$ 突變株均幾乎無法生長，只能產生直徑不足1 mm之菌落，而在加入1 mM Etn後，Fg與Fol $\Delta psd2$ 突變株可在MM上恢復生長，其中Fol之 $\Delta psd2$ 突變株生長能力可恢復近似野生株，而Fg之 $\Delta psd2$ 突變株則只能恢復部分生長能力。

Fig. 4. $\Delta psd2$ mutants of Fg and Fol are ethanolamine (Etn) auxotroph. $\Delta psd2$ mutants of Fg and Fol almost could not grow on minimal medium (MM) but they could recover the growth ability after the addition of 1 mM Etn supplement in MM and $\Delta psd2$ mutants of Fol recover more than $\Delta psd2$ mutants of Fg.

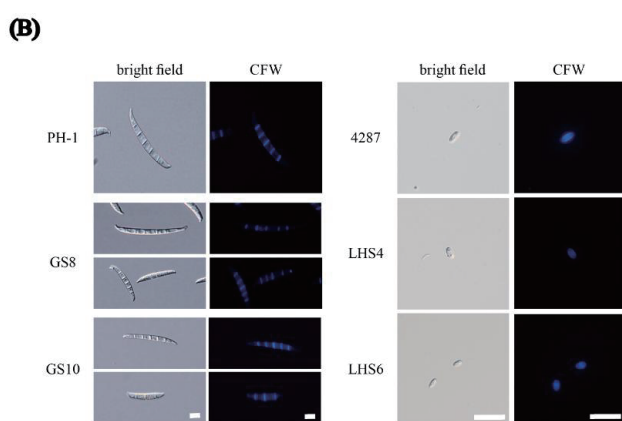
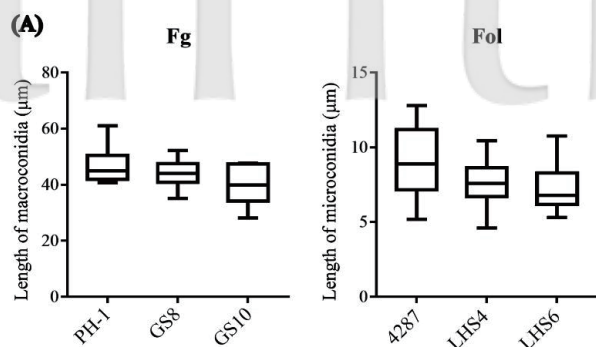


圖五、 $\Delta psd2$ 突變株於不同培養基上之生長速率不同。將Fg與Fol之直徑4 mm菌絲塊置於PDA、MM與BM共3種固態培養基，連續4天測量菌落直徑，在第3天拍照觀察，以培養第4天之菌落直徑以Dunnett's multiple comparisons test進行生長速率之顯著性差異測試，顯著水平設為0.05。(A) Fg於PDA、MM培養基上突變株與野生株相比生長速率較低且具有顯著差異，於BM培養基上生長快速且突變株與野生株無顯著差異。(B) Fol在PDA與MM培養基上突變株與野生株相比生長速率較低且具有顯著差異，在BM培養基則無顯著差異。(C) Fg之 $\Delta psd2$ 突變株在PDA培養基上菌絲生長較為密集，菌落形態與野生株相比具有明顯差異，在BM培養基上之生長速率與菌落形態皆與野生株相似。Fol之 $\Delta psd2$ 突變株

在PDA與BM培養基上之菌落形態皆與野生株相似。PDA: potato dextrose agar; MM: minimal medium; BM: barley bran medium。

Fig. 5. The $\Delta psd2$ mutants differ in growth rate on different media. To investigate the growth rate, 4 mm mycelial plugs were put on PDA, MM or BM media. Diameter of colony was measured for 4 days, pictures were taken on the 3rd day. Significant difference of growth rate between $\Delta psd2$ mutants and wild type was tested by diameter measurement of 4-day-old colonies with Dunnett's multiple comparisons test and significance level was set to 0.05. (A) Growth rate of $\Delta psd2$ mutants of Fg on both PDA and MM was significantly lower than wild type, while on BM was similar to wild type. (B) Growth rate of $\Delta psd2$ mutants of Fol on both PDA and MM was significantly lower than wild type, while on BM was similar to wild type. (C) Colony of $\Delta psd2$ mutants of Fg on PDA had condense hyphae, showed different morphology to the wild type, whereas colony morphology of mutants on BM was similar to wild type. PDA: potato dextrose agar; MM: minimal medium; BM: barley bran medium.

子長度雖然在統計上與野生株無顯著差異，卻出現長度極小者之極端值，與野生株長度相比，差異極大(圖六A)。長度方面，Fg野生株分生孢子長度最大與最小分別為61.02 μm 與40.71 μm ，兩 $\Delta psd2$ 突變株則分別為52.18 μm 、35.08 μm 以及47.61 μm 、28.07 μm 。兩 $\Delta psd2$ 突變株之長度較短之分生孢子隔膜數量也相對較少，為2至3個，野生株孢子則以含4至5個隔膜者居多，另外，長度較短之分生孢子隔膜間距並不因此縮小(圖六B)。然而，Fol $\Delta psd2$ 突變株之小分生孢子長度與野生株無顯著差異(圖六A)。

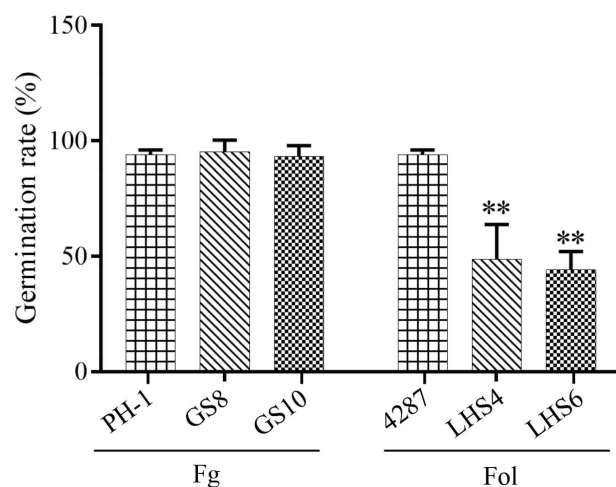


圖六、*PSD2*基因對小麥赤黴病菌與番茄萎凋病菌之分生孢子長度影響。(A)取 10^7 conidia/mL孢子懸浮液10 μ L置於玻片上以光學顯微鏡鏡檢並拍照，再從照片上隨機取10孢子以Image J軟體測量孢子長度後，以Dunnett's multiple comparisons test檢定顯著性。(B)孢子形態與隔膜觀察。將孢子以3.5 mg/mL之calcofluor white (CFW)染色，可見Fg之*psd2*突變株與Fol之*psd2*突變株之分生孢子形態與野生株無顯著差異，Fg之分生孢子有長度極小之極端值存在。比例尺：10 μ m。

Fig. 6. The effects of *PSD2* gene on length of conidia of *F. graminearum* PH-1 and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. (A) Length of conidia. 10 μ L of 10^7 conidia/mL suspension were put on glass slides and then observed by microscope. Average length of 10 conidia were measured with Image J, then statistically compared by Dunnett's multiple comparisons test. (B) Morphology and septa of $\Delta psd2$ mutants were similar to those of wild type based on calcofluor white (CFW) staining, but $\Delta psd2$ mutants of Fg had extremely short conidia. Scale bar = 10 μ m.

*PSD2*基因影響Fol之分生孢子發芽率

Fol兩*psd2*突變株LHS4與LHS6之分生孢子發芽率分別為 $48.7 \pm 15.1\%$ 、 $44.0 \pm 8.0\%$ ，經由Dunnett's multiple comparisons test測試顯著性，兩者皆與野生株之 $94.0 \pm 2.0\%$ 發芽率相比較低且具有顯著差異，*P*值皆小於0.01。而Fg之野生株與兩*psd2*突變株GS8、GS10之分生孢子發芽率分別為 $94.0 \pm 2.0\%$ 、 $95.3 \pm 5.0\%$ 與 $93.3 \pm 4.6\%$ ，無顯著差異(圖七)。



圖七、*PSD2*基因影響番茄萎凋病菌之分生孢子發芽率。Fg與Fol之孢子在PDB培養液於25°C、150 rpm震盪培養，Fg培養17小時而Fol則培養10小時後觀察，隨機取50顆分生孢子計算發芽率。顯著性測試由Dunnett's multiple comparisons test統計*P*值，「**」表示*P*值小於0.01。

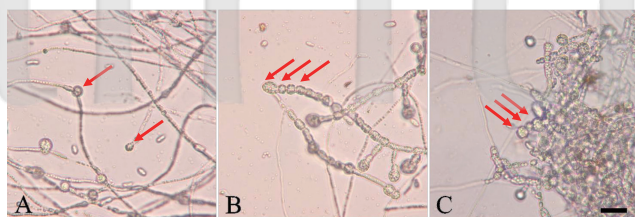
Fig. 7. *PSD2* gene affects germination rate of conidia of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. For calculating germination rate, conidia of Fg and Fol strains were cultured for 17 h and 10 h respectively in PDB at 25°C, 150 rpm, and 50 conidia were sampled randomly from each of three independent experiments. Significance was calculated by Dunnett's multiple comparisons test. '**' represents *P* < 0.01.

*PSD2*基因影響Fol厚膜孢子之著生形式

根據文獻，*F. oxysporum*之厚膜孢子通常以單顆或一對(兩顆相連)的形式存在，但也有以叢生或小段串生存在的機會，而在菌絲上的著生方式為頂生(terminal)或間生(intercalary)⁽³¹⁾。在本研究中，Fol野生株之厚膜孢子以單顆或一對的形式存在，以頂生或間生的方式著生在菌絲上，與文獻相符，而兩*psd2*突變株之厚膜孢子皆呈串生長鏈的形式(圖八之紅色箭頭所指處)，數量多而密集，同樣以頂生或間生的方式著生在菌絲上(圖八)。由於*psd2*突變株之菌絲幾乎完全轉變為厚膜孢子，有些厚膜孢子有融合情形，顆粒分界不明顯，因此無法量化統計厚膜孢子數目。

*PSD2*基因影響Fg胞外酵素的分泌

Fg *psd2*突變株之澱粉分解酵素與脂質分解酵素活性較野生株低；纖維分解酵素、針對明膠或酪蛋白之蛋白分解酵素則與野生株相比無顯著差異(圖九)。酵素活性區域與菌落直徑比率之數值方面，野生株與兩*psd2*突變株GS8、GS10之澱粉分解酵素分別為 1.000 ± 0 (各重複數值相同)、 0.870 ± 0.009 、 0.823 ± 0.026 ，脂質分解酵素為 0.942 ± 0.004 、 0.875 ± 0.025 、 0.901 ± 0.009 。Fol *psd2*突變株之澱粉分解酵素、纖維分解酵素、脂質分解酵素、針對明膠之蛋白分解酵素等4種酵素的活



圖八、*PSD2*基因影響番茄萎凋病菌厚膜孢子之形成方式。將Fol野生株與兩*psd2*突變株之分生孢子置於泥炭土萃取液中於25℃、150 rpm避光培養7天後，以光學顯微鏡觀察厚膜孢子，可見(A)野生株之厚膜孢子以單顆或兩顆一對的形式存在，以頂生或間生的方式著生在菌絲上(紅色箭頭所指處)。兩*psd2*突變株(B)LHS4與(C)LHS6之厚膜孢子皆以串生成長鏈的型式著生在菌絲上(紅色箭頭所指處)，數量多而密集。由於*psd2*突變株之菌絲大部分轉變為厚膜孢子，且有些厚膜孢子之間隔不明顯，有融合情形，因此無法量化以統計厚膜孢子數目。比例尺：100 μm。

Fig. 8. *PSD2* gene affects the formation of chlamydospores in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. After 7 days culture in peat extract at 25℃, 150 rpm in dark. (A) Chlamydospores of Fol wild type form singly or in pair, and either grown terminal or intercalary on hyphae (red arrows). However, chlamydospores of two independent $\Delta psd2$ mutants (B) LHS4 and (C) LHS6 grew abundantly and formed as long chain. Because that most hyphal cells turn into chlamydospores, boundary between chlamydospores were indistinct, and even some of chlamydospores were fused together, thus quantitative statistics for chlamydospores was not suitable. Scale bar = 100 μm.

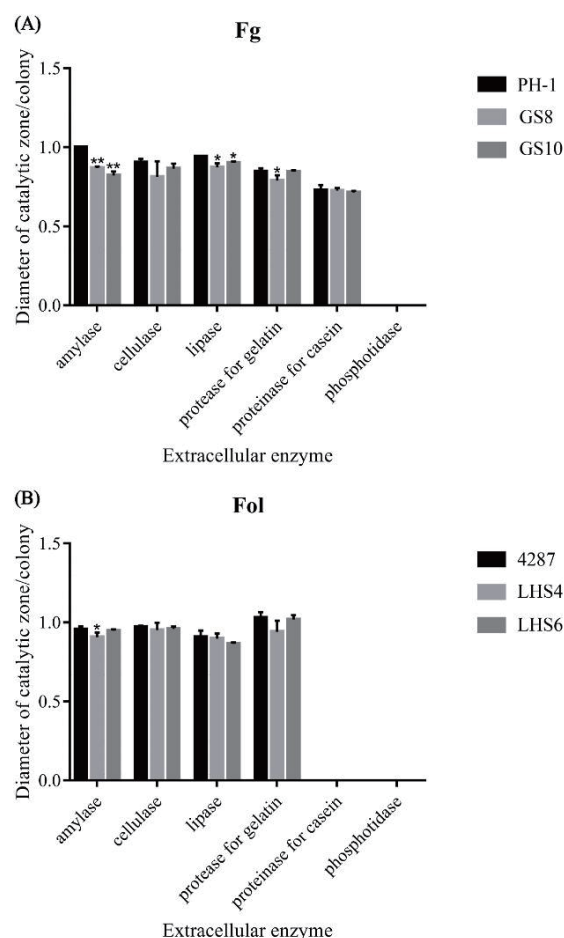
性與野生株相比皆無顯著差異(圖九)。Fg與Fol之野生株與突變株皆無磷脂分解酵素活性反應，Fol之野生株與突變株皆無針對酪蛋白之蛋白分解酵素活性反應(圖九)。

*PSD2*基因不影響Fg與Fol於小麥或番茄寄主之毒力

將Fg菌株接種於台灣產之小麥品種「台中選2號」，接種5天後可見野生株與兩*psd2*突變株對小麥之毒力無顯著差異(圖十)。另一方面，將Fol菌株接種於番茄品種「農友301」，野生株之罹病度(disease severity)為83.3±14.4%，而兩*psd2*突變株之罹病度各為70.8±26.0%與70.8±19.1%，以平均而言與野生株相比較低，但統計上無顯著差異(圖十一)。

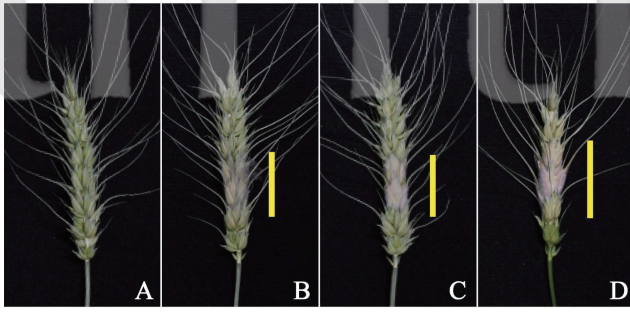
討 論

與蛋白質不同的是，以基因操縱方法研究脂質功能時，由於脂質並非直接被基因解碼(encode)的對象，因此所得到的「PE對細胞的影響」為間接資訊⁽⁶⁰⁾。*PSD2*基因與各種磷脂質的代謝關係在酵母菌*S. cerevisiae*研究較多。*S. cerevisiae*的Psd2與Psd1相比，對PE的生合成貢獻較小⁽⁴³⁾。與此酵母菌不同的是，本研究使用的兩株籾菌Fg與Fol之*PSD2*基因皆大幅影響PE生合成，Fol尤其明顯(圖三)。本試驗中無論Fg或Fol皆沒有PS之反應，但標準品有呈色；參考前人研究，本研究採用之



圖九、*PSD2*基因影響小麥赤黴病菌澱粉與脂質分解酵素之分泌。以澱粉、carboxymethylcellulose、Tween 20、明膠、酪蛋白、大豆卵磷脂為基質製作培養基，測試*psd2*突變株之澱粉分解酵素(amyase)、纖維分解酵素(cellulase)、脂質分解酵素(lipase)、針對明膠之蛋白分解酵素(proteinase)、針對酪蛋白之蛋白分解酵素與磷脂分解酵素(phosphatidase)等6種胞外酵素活性。待野生株菌落直徑超過65 mm (Fg培養3-5天、Fol培養4-6天)後測量酵素活性區域與菌落直徑，將前者除以後者，代表單位菌絲所具有之酵素活性。以Dunnett's multiple comparisons test檢定顯著性，結果顯示(A) Fg *psd2*突變株之澱粉與脂質分解酵素活性與野生株相比顯著降低，其餘酵素活性則與野生株相比無差異，而(B) Fol之*psd2*突變株之6種酵素活性與野生株相比皆無顯著差異。「*」表示P值小於0.05，「**」表示P值小於0.01。

Fig. 9. *PSD2* gene affects the secretion of amylase and lipase in *F. graminearum* PH-1. Starch, carboxymethylcellulose, Tween 20, gelatin, casein and soy lecithin were used as substrates to test extracellular enzyme activity of amylase, cellulase, lipase, proteinase for gelatin, proteinase for casein and phosphatidase respectively. After colony diameter was longer than 65 mm (Fg was cultured for 3-5 days, Fol for 4-6 days), ratio of diameter of active zone to colony was measured to represent enzyme activity. Results showed that (A) amylase and lipase activity of Fg $\Delta psd2$ mutants was lower than that of the wild type, while other enzymes' activities were similar to those of wild type. (B) Activities of all enzymes of Fol $\Delta psd2$ mutants were similar to those of wild type. P values were calculated by Dunnett's multiple comparisons test, '*' and '**' represent $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.



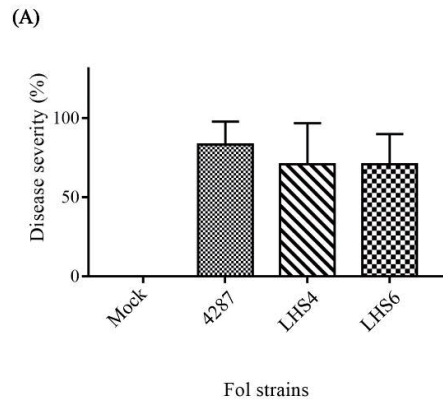
圖十、*PSD2*基因不影響小麥赤黴病菌之毒力。將小麥赤黴病菌接種於小麥「台中選2號」之麥穗，接種5天後可見(A)接種dH₂O者不發病，(B)野生株與(C)GS8與(D) GS10(兩獨立*psd2*突變株)對小麥之感染能力差異不明顯。黃色線條所示為受感染之區域。

Fig. 10. *PSD2* gene does not affect virulence of *F. graminearum* PH-1. After inoculation of Fg on wheat 'Taichung SEL.2' for 5 days, (A) wheat inoculated with dH₂O exhibited no symptom; (B) wheats inoculated with wild type, (C) GS8, or (D) GS10 (two independent $\Delta psd2$ mutants) were all adhered by hyphae but no difference between wild-type or mutant infected groups. The infection areas were pointed out by yellow lines.

硫酸染色法針對量少的脂質如PS具有較弱的染色反應^(47, 55)，在某些物種的脂質分析中，以硫酸染色法偵測甚至沒有PS的反應⁽⁶⁵⁾，與本試驗結果相似。若欲使PS的反應更加靈敏，可使用放射性元素標定法針對磷元素進行標定⁽⁷⁾。

Etn為Kennedy pathway的反應基質。本研究Fg與Fol之*psd2*突變株皆為營養缺陷型菌株，無法在MM培養基上生長，但皆具有Etn auxotrophy之特性(圖四)，表示此營養缺陷的表型與PE的缺失有關，且當*de novo* pathway因*Psd2*沒有發揮功能而失效時，Fg與Fol在有Etn的情況下亦可利用Kennedy pathway作為替代路徑重新合成PE，恢復菌株在MM培養基上的生長能力，其中Fol使用Etn重新合成PE的能力較佳，而Fg則較弱。試比較不同菌株在*de novo* pathway失效後Etn auxotrophy之特性：酵母菌*S. cerevisiae*以及*S. pombe*皆可在此路徑受阻時利用Etn恢復營養缺陷，而choline與Etn同為Kennedy pathway之基質，但此兩菌株利用choline恢復營養缺陷的能力卻不一，*S. cerevisiae*可，而*S. pombe*則否^(1, 40)。與本研究不同的是，白色念珠菌*Candida albicans*之*psd2*突變株即使在缺乏Etn情況下仍可正常生長，且表型似野生株，顯示酵母菌與絲狀真菌之*PSD2*基因在功能上具有差異^(1, 7, 40)。

如上所述，由於*PSD2*基因功能受損或PE合成受阻，Fg與Fol之*psd2*突變株在MM培養基上均無法正常生長，且在PDA培養基之生長速率均較野生株遲緩。Fg之*psd2*突變株在不同的複合培養基上生長速率與菌落形態差異甚大，當以馬鈴薯作為營養源時，其於PDA培養基上生長遲緩(圖五)，此現象或與*PSD2*在逆境條件所發揮的影響較大所致。前人曾以啤酒花(*Humulus lupulus* L.)細胞壁作為培養基質，得知比起單純以葡萄糖作為營養源，Fg所產生之蛋白質種類較多且數量差距甚



(B)



圖十一、*PSD2*基因不影響番茄萎凋病菌之毒力。以浸根接種5周大之番茄品種「農友301」，於25℃培養3周後計算番茄罹病度。(A)以dH₂O接種之負對照組罹病度為0.0±0.0%，(B)野生株之罹病度為83.3±14.4%，而兩*psd2*突變株(C)LHS4與(D)LHS6罹病度各為70.8±26.0%與70.8±19.1%。使用Dunnett's multiple comparisons test計算顯著性差異，結果與野生株相比無顯著差異。

Fig. 11. *PSD2* gene does not affect virulence of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. After inoculation of Fol on tomato 'Farmer 301' by root-dipping method, disease severity was calculated after 3 weeks. (A) Disease severity of mock inoculated with wrong form, dH₂O is 0.0±0.0%; (B) disease severity of tomato inoculated with wild type is 83.3±14.4%; disease severity of two independent $\Delta psd2$ mutants (C) LHS4 and (D) LHS6 is 70.8±26.0% and 70.8±19.1%, respectively. There is no significant difference between wild type and mutant infected group based on Dunnett's multiple comparisons test.

大，這些蛋白質中包括多種酵素，有利於Fg於複雜的環境下利用植物(殘)體作為養分並生存^(18, 30)；而當以大麥作為營養源時，其於BM培養基上生長迅速且產生大量氣生菌絲，生長速率與菌落形態皆與野生株相近，可能與大麥中富含脂質成分有關，根據前人研究，大麥中所含磷脂質成分最高者即為PC與PE，因此Fg及Fol皆不會因為PE合成受阻而延緩生長⁽¹⁴⁾。另外，在本研究進行過程中，發現Fg比Fol更容易在PDA上產生degenerate cultural variant(數據未顯示)，表示PDA雖然普遍適

用於絲狀真菌的培養，卻不利Fg生長。相較而言，本研究所使用的大麥培養基含有麥麩成分，富含植物體細胞壁及(磷)脂質，再加上大麥本身為Fg寄主，即創造了利於Fg生長的條件。另外，曾有研究指出*S. cerevisiae*的*PSD2*基因突變後不影響PE在普通環境下的生合成，但在充滿重金屬鎘(cadmium)的逆境下，*psd2*突變株的PE產量顯著下降，受損的*PSD2*基因在有鎘的情況下才發揮影響，使自噬作用(autophagy)功能受損，而自噬作用啟發時機即為真菌遭遇飢餓等逆境時⁽⁴³⁾。綜合以上可知Fg比Fol對複合培養基之營養源要求更苛刻，偏好以含細胞壁之植物體作為營養源，未使用此材料的培養基對Fg而言是較不利的環境，此時其*psd2*突變株生長明顯受到抑制，因此推測Fg與*S. cerevisiae*相似，兩者之*PSD2*基因在逆境下更能發揮與PE生合成或生長相關之功能。

本研究中Fg之*psd2*突變株產生長度極小的分生孢子(GS8與GS10分別為35.08 μm 、28.07 μm)，且只有部分突變株孢子有形態上的改變(圖六)，而根據Jonkers等人(2012)的研究，Fg之*fgp1*突變株之孢子形態也差異甚大，其中有些形似野生株孢子，也有些具有明顯的形態改變，因此單一基因突變後只造成部分孢子形態改變，雖然例子較少但也屬於可能發生的情形⁽²⁷⁾。對於孢子大小與隔膜數量改變的原因，前人各有不同的假設，然而根據Song等人在2014年的研究，將不同菌種之同源基因功能相比較，會發現同源基因在不同菌種間之功能差異極大，很難將其他菌種的研究結果作為參考依據，因此進行DNA微陣列(microarray)測試以探討造成孢子形態改變的整體基因調控網絡有其必要⁽⁵⁶⁾。比較Fg*StuA*相關研究，本研究之*psd2*突變株所產生的長度極小的分生孢子與Fg*StuA*突變株之孢子形態相似，隔膜數量與野生株相比減少為1至3個，整體形狀則不受影響。同一研究中的DNA微陣列測試結果指出，導致孢子形態改變的可能原因很多，包括特定酵素、結構分子的基因表現或生合成受阻，很難辨別主要與次要因素，因此後續試驗應優先從眾多受Fg*StuA*影響的基因中篩選出Fg*StuA*直接調控的基因再循序漸進研究⁽³⁶⁾。

Fol之*psd2*突變株孢子發芽率較野生株低，而Fg之突變株則與野生株相比則無差異(圖七)。Gaspara等人(1994)曾經監測過真菌*Glomus versiforme*的孢子發芽過程中磷脂質組成的變化，發現PE含量會隨著發芽時期向後而增加⁽¹⁵⁾。另外，Nishi(1960)也曾指出真菌*Aspergillus niger*會在孢子發芽初期攝入環境中的氮營養，並積極利用其本身貯存狀態之氮源，如磷脂質⁽⁴⁴⁾。綜合以上兩研究可以得知磷脂質在真菌之孢子發芽時期扮演重要角色，且與Fg相比，*PSD2*基因對Fol之PE生合成影響較大，因此*PSD2*基因缺失導致PE生合成受阻，進一步阻礙孢子發芽的可能性增加。另外，前述提及養分種類容易影響Fg在生長時期的菌落形態，其*psd2*突變株雖於PDA培養基生長遲緩，但其孢子卻於PDB培養液正常發芽，除了Fg菌株中PE的減少較不影響其孢子發芽外，也有可能是在以PDB為營養源的培養條

件下，*PSD2*的功能或PE的減少對孢子發芽的影響較小，而Fol則相反。曾有研究指出Fol的*fgp1*基因突變株在不同培養基中的孢子發芽率差異甚大，例如其孢子在以葡萄糖為營養源時發芽率較高，與野生株相差無幾，而以檸檬酸為營養源時發芽率則明顯降低⁽²⁶⁾，可見若欲探討基因對孢子發芽率的影響，也需考慮試驗所使用營養源的種類，本研究之結果並不能完全推定*PSD2*基因對Fg之孢子發芽完全沒有影響。

本研究中Fol之*psd2*突變株厚膜孢子形成方式與野生株相比差異甚大(圖八)。曾有研究指出，「pseudochlamydospore」形似厚膜孢子，原本指常見於多種*Fusarium* species中，外觀形似未成熟的厚膜孢子，細胞壁較薄的構造⁽³⁾，與腫脹或細胞壁較厚的菌絲細胞不同，兩者可以從外觀分辨⁽²⁹⁾。在Marasas等人(2001)的研究中，pseudochlamydospore被特別定義為*Fusarium andiyazi*在特定的培養條件下，所產生形似厚膜孢子但細胞壁較薄且平滑、以單生或串生形式存在、沒有橫向隔膜(transverse septa)且不隨培養時間增長而變色的構造⁽³⁹⁾(目前只有*F. andiyazi*符合此定義)。對於pseudochlamydospore的定義以及其與厚膜孢子的差異尚無定論，pseudochlamydospore也尚未成為正式且可供鑑定的構造⁽⁵⁷⁾。Marasas等人指出應藉由穿透式電子顯微鏡的結果，根據細胞壁外壁的厚度以及油滴的有無來判定，而本研究中異常的厚膜孢子形態與Marasas等人描述的構造相比，更像是Hsu和Lockwood(1973)的研究中，受到 Na_2SO_4 所誘導而在*F. solani* f. sp. *phaseoli*菌絲上大量產生的長鏈狀厚膜孢子⁽²³⁾，至於更詳細的探討，可於後續試驗中以穿透式電子顯微鏡觀察並加以判定^(23, 39)。

關於厚膜孢子的基因調控相關研究不多，大部分文獻為針對整體孢子形成的基因研究，如*F. oxysporum* f. sp. *melonis*之*FoSTUA*與*REN1*基因，兩者分別與*Aspergillus nidulans*之*StuA*與*MedA*基因相似^(36, 45)。*A. nidulans*不會產生厚膜孢子而*F. oxysporum* f. sp. *melonis*則有此能力。*FoSTUA*突變株之厚膜孢子數量較野生株多，但與本研究中Fol之*psd2*突變株不同，其著生於菌絲的方式與形態仍與野生株相似；*REN1*突變株雖對大、小分生孢子產生影響，卻不影響厚膜孢子的形成。Ohara等人(2004)在*REN1*基因研究中表示，因*REN1*基因對大、小分生孢子與厚膜孢子的影響不一，可得知此兩類孢子的生長與發展是分別經由不同的基因路徑調控，而在*FoSTUA*基因研究中，研究表示*FoSTUA*分別針對這兩種基因表現路徑以不同的方式進行調控^(46, 45)。本研究中*PSD2*基因對Fol之小孢子的發芽與厚膜孢子的形成皆有影響，推測應分別針對不同基因表現路徑以不同的方式進行調控。

將真菌胞外酵素送出細胞的策略中，最典型的路徑是在經過合成、修飾後需經由高基氏體之囊泡(Golgi vesicle)送出細胞外⁽⁴⁹⁾。此路徑途經內質網，而無論內質網或高基氏體，磷脂質皆為重要的構成物質，*PSD2*基因對磷脂質的影響有可能使胞外酵素的分泌異常。本研究中Fg之澱粉分解酵素與脂質分解

酵素的分泌量皆因*PSD2*基因缺失而下降，且曾有研究指出脂質分解酵素為Fg之毒力因子⁽⁶¹⁾，然而本研究結果顯示*PSD2*基因缺失對寄主之毒力並沒有因此減弱，可能是脂質分解酵素的分泌量並沒有減少到足以影響毒力。澱粉分解酵素參與Fg侵染過程⁽²⁸⁾，但並無證據顯示其為毒力因子，因此即使其分泌量減少，不影響毒力的可能性仍較大。Fg與Fol之*PSD2*基因對寄主毒力之影響均不明顯，又兩者均作用於PE的生合成，顯示無論是*PSD2*基因本身或PE對Fg與Fol的毒力均沒有太大作用。根據Davis等人 (2018)的研究，*C. albicans*利用Etn恢復*cho1Δ/Δ*與*psd1Δ/Δ psd2Δ/Δ*突變株之生長能力的同時，對寄主之毒力沒有同時恢復，而同篇研究結果顯示在*de novo* pathway受阻的情況下，即使可以利用Kennedy pathway作為替代路徑生產PE，突變株仍無法從環境中獲取足量Etn合成PE⁽¹⁰⁾，與本研究結果相似。另外，本研究之Fg毒力測試，取用已過開花期、顏色呈現綠色之未成熟小麥麥穗作為寄主，然而根據緒言所述，在自然情況下，小麥赤黴病菌偏好在小麥開花期中，花藥突出麥穗時進行侵染，而花期過後之小麥較具有抗性^(5, 51)，因此研究材料的選擇或許也為影響菌株毒力發展的原因之一。在本研究中雖然*PSD2*基因缺失或PE量下降不影響菌株毒力，其他磷脂質生合成相關基因或其他種類磷脂質仍有可能影響菌株毒力，如Chen等人 (2010) 研究指出，*C. albicans*之*PSD2*基因雖不影響菌株毒力，但參與PS生合成之基因*CHO1*會影響其對小鼠之毒力⁽⁷⁾。

除了*psd2*突變株，本實驗室也試圖建立*cho1*、*psd1*突變株與*PSD2*互補株，且成功以fusion PCR的方式得到帶有抗藥基因(建立*PSD2*互補株時使用另一抗藥性基因Zeo^R)與野生株基因的嫁接(fusion)產物，但參考建立*psd2*突變株的方式，將之與原生質體混和、與原生質體內基因進行homologous recombination時，卻無法得到突變株與互補株。接著，另外以split marker的方式再次試圖建立菌株，雖然得到野生株基因與分段抗藥基因的嫁接產物，也在培養基上得到較多可供篩選的菌落，但經ORF確認皆非目標菌株。曾有前人研究指出*Aspergillus fumigatus*等絲狀真菌之homologous recombination效率較低，甚至有時只有小於5%的基因成功置換，以至突變株的獲得相當困難⁽¹³⁾，而Maier等人(2005)之研究則指出*Fusarium*屬的真菌或許皆有此現象⁽³⁸⁾，根據本研究結果，homologous recombination的效率不只與菌種相關，也與欲轉置的基因種類有關，以致Fg與Fol皆能成功得到*psd2*突變株而無法得到*cho1*、*psd1*突變株與*PSD2*互補株。原生質體轉殖法是常見的*Fusarium*屬菌株突變株轉殖方法，但素有homologous recombination效率低下的問題，因此研究者一直致力開發更具效率的基因轉殖法，split marker配合原生質體轉殖法即是其中之一，此法不只可以提高基因置換效率，也可以降低nonhomologous recombination的機率，但在本研究中仍無法利用此法得到*cho1*、*psd1*突變株與*PSD2*互補株。Fuller等人(2015)開發另一種針對絲狀真菌之

基因轉殖方法，即利用CRISPR/Cas9之轉殖法提高homologous recombination效率，或可提供未來試驗參考⁽¹³⁾。另外，若*CHO1*、*PSD1*基因與菌體存活直接相關，也可能導致突變株無法獲得，然而根據前人研究，酵母菌*C. albicans*與*S. cerevisiae*之*CHO1*、*PSD1*基因研究皆不直接影響存活^(7, 16, 20)，推測絲狀真菌*CHO1*、*PSD1*基因也應如此，若仍假設絲狀真菌*CHO1*、*PSD1*基因與存活相關，則可利用在野生株ORF上游置入可調控式啟動子(regulatable promoter)以調控基因表現量⁽¹⁹⁾代替基因缺失之突變株進行測試。

謝 辭

感謝美國農業部James Swezey博士、明尼蘇達大學Corby Kistler博士提供菌株或質體；國立臺灣大學郭錦樺教授借用吹氮設備；國立中興大學鍾文鑫教授與王智立副教授、國立臺灣大學林乃君副教授與鍾嘉綾副教授提供論文寫作之建議。另感謝農委會(106農科-9.5.3-檢-B3與107農科-1.2.7-科-aN)與科技部(104-2320-B-002-063-MY3與106-2923-B-002-001-MY3)提供研究經費。

引用文獻

1. Atkinson, K. D., Jensen, B., Kolat, A. I., Storm, E. M., Henry, S. A., and Fogel, S. 1980. Yeast mutants auxotrophic for choline or ethanolamine. *Journal of Bacteriology* 141:558-564.
2. Bakovic, Marica, Fullerton, Morgan D, and Michel, Vera. 2007. Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: the role of CTP: phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). *Biochemistry and Cell Biology* 85:283-300.
3. Bennett, FT. 1928. On two species of *Fusarium*, *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. and *F. avenaceum* (Fries.) Sacc., as parasites of cereals. *Annals of Applied Biology* 15:213-244.
4. Blancard, Dominique 2018. *Tomato Diseases: Identification, Biology and Control: A Colour Handbook*. 2 ed. CRC Press, USA. Pages 320-324.
5. Brown, Neil A, Urban, Martin, Van de Meene, Allison ML, and Hammond-Kosack, Kim E. 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biol.* 114:555-571.
6. Chand, Rattan, and Srinivasan, RA. 1979. Extraction & fractionation of lipids (polar & non-polar) from *Fusarium* sp. *Indian Journal of Experimental Biology* 17:66-68.
7. Chen, Y. L., Montedonico, A. E., Kauffman, S., Dunlap, J. R.,

- Menn, F. M., and Reynolds, T. B. 2010. Phosphatidylserine synthase and phosphatidylserine decarboxylase are essential for cell wall integrity and virulence in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 75:1112-1132.
8. Chen, Y. Y., Lin, T. C., Chung, W. H. , and Wang, C. L. 2015. Screening antagonistic microorganisms that inhibit chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathology Bulletin* 24:251-266.
 9. Cuomo, C. A., Guldener, U., Xu, J. R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A., Walton, J. D., Ma, L. J., Baker, S. E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y. L., Decaprio, D., Gale, L. R., Gnerre, S., Goswami, R. S., Hammond-Kosack, K., Harris, L. J., Hilburn, K., Kennell, J. C., Kroken, S., Magnuson, J. K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H. W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Munsterkotter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Ouellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M. I., Seong, K. Y., Tetko, I. V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T. J., Yao, J., Birren, B. W., and Kistler, H. C. 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317:1400-1402.
 10. Davis, Sarah E., Tams, Robert N., Solis, Norma V., Wagner, Andrew S., Chen, Tian, Jackson, Joseph W., Hasim, Sahar, Montedonico, Anthony E., Dinsmore, Justin, Sparer, Timothy E., Filler, Scott G., and Reynolds, Todd B. 2018. *Candida albicans* cannot acquire sufficient ethanolamine from the host to support virulence in the absence of de novo phosphatidylethanolamine synthesis. *Infection and Immunity* 86:IAI. 00815-00817.
 11. Di Bartolomeo, Francesca, Wagner, Ariane, and Daum, Günther. 2017. Cell biology, physiology and enzymology of phosphatidylserine decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids* 1862:25-38.
 12. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226:497-509.
 13. Fuller, Kevin K, Chen, Shan, Loros, Jennifer J, and Dunlap, Jay C. 2015. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 14:1073-1080.
 14. Gangopadhyay, Nirupama, Hossain, Mohammad, Rai, Dilip, and Brunton, Nigel. 2015. A Review of Extraction and Analysis of Bioactives in Oat and Barley and Scope for Use of Novel Food Processing Technologies. *Molecules* 20:10884.
 15. Gaspar, ML, Pollero, RJ, and Cabello, MN. 1994. Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71:449.
 16. Greenberg, Miriam L, and Lopes, John M. 1996. Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 60:1.
 17. Hassan, Yousef I, and Bullerman, Lloyd B. 2009. Wheat bran as an alternative substrate for macroconidia formation by some *Fusarium* species. *Journal of Microbiological Methods* 77:134-136.
 18. Hatsch, Didier, Phalip, Vincent, Petkovski, Elizabet, and Jeltsch, Jean-Marc. 2006. *Fusarium graminearum* on plant cell wall: no fewer than 30 xylanase genes transcribed. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345:959-966.
 19. Helmschrott, Christoph, Sasse, Anna, Samantaray, Sweta, Krappmann, Sven, and Wagener, Johannes. 2013. Upgrading fungal gene expression on demand: improved systems for doxycycline-dependent silencing in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:1751-1754.
 20. Hikiji, Takeshi, Miura, Keiji, Kiyono, Kazuhiro, Shibuya, Isao, and Ohta, Akinori. 1988. Disruption of the *CHO1* gene encoding phosphatidylserine synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 104:894-900.
 21. Hill, Terry W, and Kafer, Etta. 2001. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports* 48:20-21.
 22. Hou, Zhanming, Xue, Chaoyang, Peng, Youliang, Katan, Talma, Kistler, H Corby, and Xu, Jin-Rong. 2002. A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:1119-1127.
 23. Hsu, SC, and Lockwood, JL. 1973. Chlamydospore formation in *Fusarium* in sterile salt solutions. *Phytopathology* 63:597-602.
 24. Huang, J. W. , and Sun, S. K. . 1982. Tomato wilt of *Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansan, in Taiwan. *Plant Protection Bulletin* 24:265-270.
 25. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). 1997. Auxotrophy. *Compendium of Chemical Terminology*. 2 (the "Gold Book") ed. Pages 143.
 26. Jonkers, Wilfried, Rodrigues, Christopher D Andrade, and Rep, Martijn. 2009. Impaired colonization and infection of tomato roots by the $\Delta frp1$ mutant of *Fusarium oxysporum* correlates with reduced CWDE gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:507-518.
 27. Jonkers, Wilfried, Dong, Yanhong, Broz, Karen, and Kistler, H Corby. 2012. The Wor1-like protein Fgp1 regulates pathogenicity, toxin synthesis and reproduction in the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens* 8:e1002724.

28. Kikot, G. E., Hours, R. A., and Alconada, T. M. 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *Journal of Basic Microbiology* 49:231-241.
29. Klaasen, Jeremy A, and Nelson, Paul E. 1996. Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. *Mycologia*:965-969.
30. Leplat, Johann, Friberg, Hanna, Abid, Muhammad, and Steinberg, Christian. 2013. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33:97-111.
31. Leslie, John F., and Summerell, Brett A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Blackwell Pub., Ames, Iowa. Pages 176-250.
32. Lin, Hsun-Shih, Kuo, Chien-Chih, and Chen, Hwan-Bin. 2013. Activating fallow land—wheat. *Taichung Agriculture News Bulletin* 80:7-10. (In Chinese).
33. Liu, E.C., Han, C. S., Hseih, S.H., Wang, S. S., R. H. Wang, and Chen, N. C. 2009. Breeding of a new cherry tomato variety “Tainan ASVEG No. 19” . *Research Bulletin of Tainan District Agricultural Research and Extension Station* 53:12-23.
34. Lopenon, J., Sontag-Strohm, T., Venalainen, J., and Salovaara, H. 2007. Prolamin hydrolysis in wheat sourdoughs with differing proteolytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:978-984.
35. Low, B. K. . 2001. Auxotroph. *Encyclopedia of Genetics*. 1 ed. Academic Press, USA. Pages 133.
36. Lysøe, Erik, Pasquali, Matias, Breakspear, Andrew, and Kistler, H Corby. 2011. The transcription factor FgStuAp influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:54-67.
37. Ma, L. J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P. M., Kang, S., Shim, W. B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J. R., Antoniw, J., Baker, S. E., Bluhm, B. H., Breakspear, A., Brown, D. W., Butchko, R. A., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P. M., Danchin, E. G., Diener, A., Gale, L. R., Gardiner, D. M., Goff, S., Hammond-Kosack, K. E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C. D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y. H., Li, L., Manners, J. M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S. Y., Proctor, R. H., Regev, A., Ruiz-Roldan, M. C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D. C., Turgeon, B. G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C. A., Kistler, H. C., and Rep, M. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367-373.
38. Maier, Frank J, Malz, Sascha, Lösch, Anke P, Lacour, Thierry, and Schäfer, Wilhelm. 2005. Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium graminearum* using the disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker. *FEMS Yeast Res.* 5:653-662.
39. Marasas, Walter FO, Rheeder, John P, Lamprecht, Sandra C, Zeller, Kurt A, and Leslie, John F. 2001. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia*:1203-1210.
40. Matsuo, Y., Fisher, E., Patton-Vogt, J., and Marcus, S. 2007. Functional characterization of the fission yeast phosphatidylserine synthase gene, *pps1*, reveals novel cellular functions for phosphatidylserine. *Eukaryotic Cell* 6:2092-2101.
41. Medh, Jheem D, and Weigel, PH. 1989. Separation of phosphatidylinositols and other phospholipids by two-step one-dimensional thin-layer chromatography. *Journal of Lipid Research* 30:761-764.
42. Michielse, Caroline B, van Wijk, Ringo, Reijnen, Linda, Cornelissen, Ben JC, and Rep, Martijn. 2009. Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biology* 10:R4.
43. Muthukumar, K., and Nachiappan, V. 2013. Phosphatidylethanolamine from phosphatidylserine decarboxylase 2 is essential for autophagy under cadmium stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochemistry and Biophysics* 67:1353-1363.
44. Nishi, Arasuke. 1961. Role of polyphosphate and phospholipid in germinating spores of *Aspergillus niger*. *Journal of Bacteriology* 81:10.
45. Ohara, T., and Tsuge, T. 2004. *FoSTUA*, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 3:1412-1422.
46. Ohara, Toshiaki, Inoue, Iori, Namiki, Fumio, Kunoh, Hitoshi, and Tsuge, Takashi. 2004. REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* 166:113-124.
47. Palusinska-Szys, Marta, Kania, Magdalena, Turska-Szewczuk, Anna, Danikiewicz, Witold, Russa, Ryszard, and Fuchs, Beate. 2014. Identification of unusual phospholipid fatty acyl compositions of *Acanthamoeba castellanii*. *PloS One* 9:e101243.

48. Pareek, M., and Rajam, M. V. 2017. RNAi-mediated silencing of MAP kinase signalling genes (*Fmk1*, *Hog1*, and *Pbs2*) in *Fusarium oxysporum* reduces pathogenesis on tomato plants. *Fungal Biology* 121:775-784.
49. Pritsch, Karin, and Garbaye, Jean. 2011. Enzyme secretion by ECM fungi and exploitation of mineral nutrients from soil organic matter. *Annals of Forest Science* 68:25-32.
50. Ramyabharathi, SA, Meena, B, and Raguchander, T. 2012. Induction of chitinase and β -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *Journal of Today's Biological Sciences-Research & Review* 1:50-60.
51. Reis, Erlei Melo, Boareto, Cristina, Danelli, Anderson Luiz Durante, and Zoldan, Sandra Maria. 2016. Anthesis, the infectious process and disease progress curves for *Fusarium* head blight in wheat. *Summa Phytopathol.* 42:134-139.
52. Sant, D. G., Tupe, S. G., Ramana, C. V., and Deshpande, M. V. 2016. Fungal cell membrane - promising drug target for antifungal therapy. *Journal of Applied Microbiology* 121:1498-1510.
53. Sarver, Brice AJ, Ward, Todd J, Gale, Liane R, Broz, Karen, Kistler, H Corby, Aoki, Takayuki, Nicholson, Paul, Carter, Jon, and O'Donnell, Kerry. 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genet Biol.* 48:1096-1107.
54. Sawada, K. 1919. Descriptive Catalogue of the Formosan Fungi Part 1. Formosa Agricultural Experiment Station Special Bulletin 19.
55. Skipski, VP., Peterson, RF, and Barclay, Marion. 1964. Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochemical Journal* 90:374.
56. Song, Xiu-Shi, Li, He-Ping, Zhang, Jing-Bo, Song, Bo, Huang, Tao, Du, Xiao-Min, Gong, An-Dong, Liu, Yi-Ke, Feng, Yan-Ni, and Agboola, Rebecca S. 2014. Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for development, virulence and mycotoxin biosynthesis apart from trehalose biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 63:24-41.
57. Summerell, Brett A, Salleh, Baharuddin, and Leslie, John F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87:117-128.
58. Tsai, Jyh-Nong, Cheng, Shou-Fong, Huei-Lin, Tsai, Huang, Hung-Chang, Hsieh, Wen-Hsui, and Ann, Pao-Jen. 2013. Use of polycarbonate membrane for detection of extracellular enzymes of *Phellinus noxius* on solid media. *Journal of Taiwan Agricultural Research* 62:184-194.
59. Tsai, Sung-Jeng. 2012. Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for metabolic profiling of fatty acid in plasma. Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences College of Medicine, National Taiwan University Master Thesis.
60. Vance, Jean E, and Vance, Dennis E. 2008. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th Edition. Elsevier. Pages 59-244.
61. Voigt, Christian A, Schäfer, Wilhelm, and Salomon, Siegfried. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal* 42:364-375.
62. Wang, Chih-Li, and Cheng, Yi-Hong. 2017. Identification and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from wheat in Taiwan. *Botanical Studies* 58:4.
63. Wang, J. H., Ndoye, M., Zhang, J. B., Li, H. P., and Liao, Y. C. 2011. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins (Basel)* 3:1020-1037.
64. Wang, R. H., Wang, S. S., Lin, D. L., Hsieh, M. H., Lin, T. T., Chao, H. F., and Chen, N. C. 2003. Breeding of a new cherry tomato variety "Tainan ASVEG No. 11". *Research Bulletin of Tainan District Agricultural Research and Extension Station* 42:23-31.
65. Wang, Zhen, and Benning, Christoph. 2011. *Arabidopsis thaliana* polar glycerolipid profiling by thin layer chromatography (TLC) coupled with gas-liquid chromatography (GLC). *Journal of Visualized Experiments* 49:2518.
66. Yang, Su-Szu, Chen, Jen-Tzu, and Chyuan, Jong-Ho. 2008. Breeding of a new cherry tomato variety "Hualien ASVEG No. 21". *Research Bulletin of Hualien District Agricultural Research and Extension Station* 26:65-79.
67. Zhang, Chengkang, Lin, Yahong, Wang, Jianqiang, Wang, Yang, Chen, Miaoping, Norvienyeku, Justice, Li, Guangpu, Yu, Wenying, and Wang, Zonghua. 2015. *FgNoxR*, a regulatory subunit of NADPH oxidases, is required for female fertility and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters* 363:fnv223.

ABSTRACT

"Lai, Y.-H.¹, Hsu, L.-H.¹, Chen, Y.-L.^{1*}, 2019. *PSD2* gene affects phospholipid composition, growth and conidiation in *Fusarium graminearum* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Plant Med.* 61(1): 1-18.

*Corresponding author, Ying-Lien Chen, E-mail: ychen28@ntu.edu.tw

Many members of the genus *Fusarium* can infect plants. *Fusarium graminearum* (Fg) species complex such as *F. graminearum* that can cause *Fusarium* head blight. Fg conidia can serve as secondary inoculum, spread by wind and infect plant parts above ground (e.g. head of wheat) repeatedly. Ascospores or conidia produced from sexual or asexual reproduction in Fg can both serve as inoculum. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) used to cause damage up to one-third of tomato fields in 1982 in Kaohsiung, Taiwan. Many tomato cultivars bred in Taiwan emphasize the trait of resistance to *Fusarium* wilt. Currently, there are few recommended fungicides for controlling *Fusarium* infections in Taiwan. Phospholipids are main material of biological membranes, including phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC) and others. Compare to other kinds of phospholipids, PE can increase the nonbilayer-forming ability of membrane easily. This ability plays an important role in fusion and fission of membrane, and movement of embedded protein in membrane. Phosphatidylserine decarboxylase (Psd) including Psd2 takes part in PE formation of fungi. In this study, two independent $\Delta psd2$ mutants each from *F. graminearum* PH-1 or *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 were constructed. The function of *PSD2* on PE production, growth, production of conidia or chlamydospores, and virulence in the plant hosts were carefully examined. Comparing the strains grown in the absence or presence of ethanolamine (Etn) in minimal medium (MM), $\Delta psd2$ mutants from either Fg or Fol exhibited Etn auxotrophy. $\Delta psd2$ mutants of both Fg and Fol grew slower on MM and PDA media, while similar on barley bran media compared with their respective wild types. Meanwhile, *PSD2* gene affected conidiation of Fg in addition to regulating the germination rate of conidia and formation of chlamydospores of Fol. Although *PSD2* gene affected secretion of extracellular enzymes of Fg but not Fol, it is dispensable to virulence on wheat or tomato.

Keywords: *Fusarium*, *Fusarium* head blight, *Fusarium* wilt of tomato, *PSD2*, phospholipid