

番椒疫病菌 *Phytophthora capsici* 之有性與無性後代 遺傳之比較

王志耕¹ 梁啟源¹ 朱秋欣¹ 林玫珠^{2,3}

¹ 臺中市 市立臺中第一高級中學

² 臺中市 國立中興大學植物病理學系

³ 連絡作者，電子郵件：jiayi@dragon.nchu.edu.tw；傳真號碼：+886-4-22850773

接受日期：中華民國 101 年 8 月 20 日

摘要

王志耕、梁啟源、朱秋欣、林玫珠. 2011. 番椒疫病菌 *Phytophthora capsici* 之有性與無性後代遺傳之比較. 植病會刊 20: 98-107.

番椒疫病菌是番椒及其它農作物的一種重要病原菌。在遺傳學方面，對這種病原菌在有性及無性生殖上的瞭解卻非常有限。本研究將對番椒疫病菌 A1 和 A2 分離株的游走子後代，與 A1 和 A2 分離株配對後的卵孢子後代，在菌落形態及生長速度上加以比較。我們觀察到 A1 和 A2 分離株的游走子後代在菌落形態及生長速度上相當一致，而且每個分離株的無性生殖後代之間，也看不出有何變異。然而，從 A1 和 A2 分離株配對後的卵孢子後代間，卻可觀察到相當大的菌落形態及生長速度上的變異。實驗中，兩個卵孢子分離株的無性生殖後代，在菌落形態及生長速度上持續顯現出變異。結果證實，番椒疫病菌是二倍體的假說，並指出有性生殖後的無性生殖後代的持續變異，於卵菌綱是一種普遍的現象。

關鍵詞：番椒疫病菌、有性後代、無性後代、菌落形態、生長速度

緒言

番椒疫病菌 *Phytophthora capsici* Leonian 在世界各地引起非常嚴重的番椒疫病，它會造成番椒根部與地上莖部腐爛，也會由空中傳播感染果實與葉部，每年造成農民很大的損失^(6,7,10)。台灣處於熱帶與亞熱帶地區，高溫多雨，所以番椒疫病菌特別嚴重⁽⁸⁾。植物病原菌的有性世代繁殖，易使之對殺菌劑產生抗藥性，並且易產生病原性強的菌株^(3,9)。所以對有性繁殖所產生變異的了解，有助於病害防治策略的制定。

由於異宗交配型 (heterothallic) 的疫病菌，如 *P. capsici* 的卵孢子不容易發芽，不易得到有性後代來分析，所以遺傳的研究比較，一直到 Ann and Ko⁽¹⁾發現高錳酸

鉀可以促進雌雄異株病菌的卵孢子萌發，才有幾篇報告出來。其中包括 Ann and Ko⁽²⁾發現 *Phytophthora nicotianae* van Breda de Haan (= *Phytophthora parasitica* Dastur) 游走子所產生的無性後代的生長速度及菌落形態均很一致，沒有什麼差異，但卵孢子所產生的有性後代的生長速度及菌落形態則有很大的差異。雖然 Sator and Butler⁽¹²⁾也發現 *P. capsici* 的卵孢子有性後代的生長速度與菌落形態有差異，但卻沒有與游走子所產生的無性後代相比較。Zheng and Ko⁽¹³⁾發現 *Phytophthora cinnamomi* Rando 的卵孢子所產生的後代，在往後的無性繁殖後代還保持連續的變異性。此種不尋常的遺傳現象，在 *Pythium splendens* Braun⁽⁵⁾也被發現過，其它生物就沒有類似現象的報告。

本研究的目的是為 (一) 比較 *P. capsici* 游走子無性後代與卵孢子有性後代之生長速與菌落形態之差異；(二)

測試 *P. capsici* 卵孢子後代，其生長速度與菌落形態是否在之後的游走子無性後代會繼續變異。

材料與方法

菌株來源

Phytophthora capsici 分離株 Pca170 A1，是由南投縣草屯的甜椒上分離到，而 Pca173 A2 則由雲林縣的甜椒上分離到。這兩株菌均由農業試驗所安寶貞博士所提供。菌株都培養在 V8 培養基 (10% V8 juice, 0.02% CaCO₃ and 2% agar)。

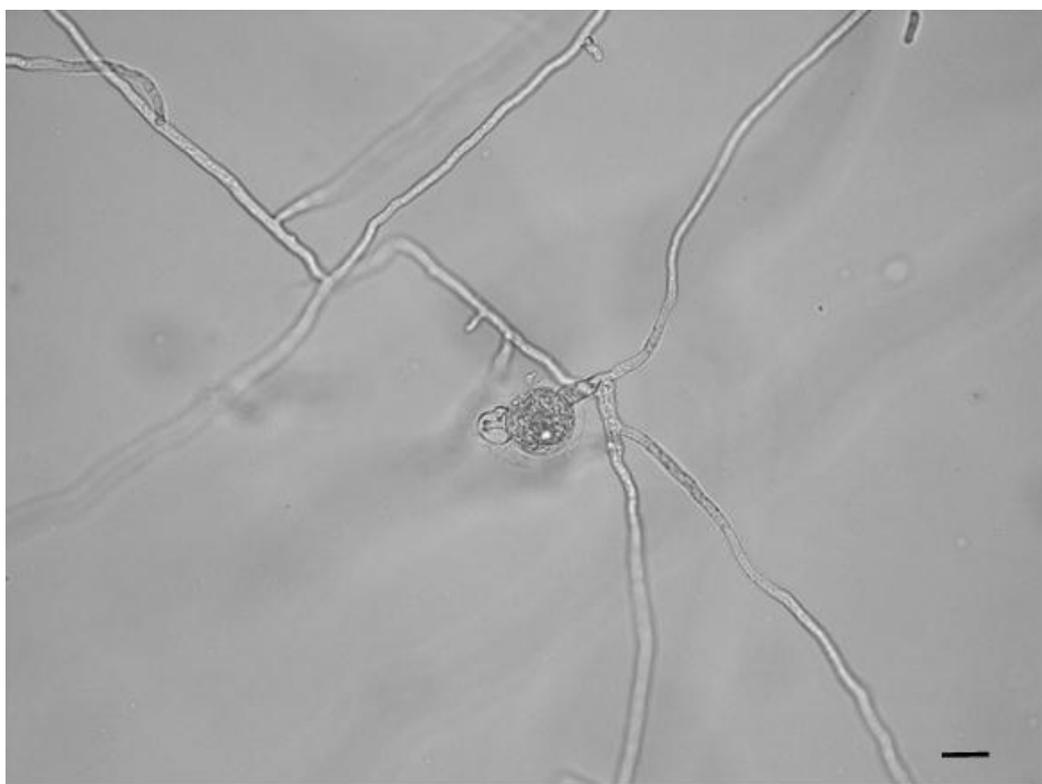
無性後代的分離

將一培養六天的菌絲塊 (15 × 30 × 5 mm) 放在 6 公分的培養皿內，並倒入無菌水，使其完全淹沒，再將培養皿放入 24°C 的生長箱中照光生長，一天後產生孢囊。將帶有孢囊的培養皿移到 4°C 的冰箱內，30 分鐘後取出觀察，可看到游走孢子由孢囊釋出，在無菌水中游動。取 200 μl 的懸浮液，塗抹在水瓊脂培養基 (Water agar, WA) 上，在 24°C 生長箱照光下生長。待其萌發後，取下已萌發的游走孢子分別移到 V8 培養基上，放入 24°C 生長箱中

生長，若其順利生長，則成為無性後代的菌株。

有性後代的分離

從 Pca170 A1 與 Pca173 A2 生長的菌落當中，分別取一小菌塊培養基，放到一塊 (15 × 20 × 3 mm) V8 培養基的兩端，於 24°C 不照光生長一個月，將會有卵孢子產生。將一塊佈滿卵孢子的培養基放進 50 ml 的無菌水內，並用果汁機 (Oster 8-speed blender) 於低轉速 (WHIP speed) 一分鐘，將菌絲打碎，再讓懸浮液通過 250 μm 與 90 μm 的網篩，最後使濾液通過 20 μm 網篩，用噴瓶以噴霧方式洗下停留在網篩上的卵孢子，將洗下的卵孢子稀釋於血清瓶，內含 20 ml 的無菌水，按照 Ann and Ko⁽¹⁾ 的方法加 0.5% 的過錳酸鉀 (KMnO₄)，再將血清瓶放在震盪器上搖晃。20 分鐘後，將卵孢子懸浮液通過 20 μm 的網篩，再用噴瓶以噴霧方式洗下停留在網篩上的卵孢子，取 1 ml 卵孢子懸浮液，並將其稀釋成約每 1 μl 有 2 到 3 個卵孢子的懸浮液，在每個 S+L 培養基⁽¹⁾ 滴入 200 μl 懸浮液，並用三角玻棒塗抹均勻，把培養皿置於 24°C 照光的生長箱生長。一週後，在顯微鏡下觀察是否有卵孢子萌發，取下已萌發的卵孢子 (圖一) 移至 V8 培養基上，若其順利生長，將成為有性後代的菌株。



圖一、番椒疫病菌卵孢子發芽的情形。Bar = 20 μm。

Fig. 1. A germinating oospore of *Phytophthora capsici*. Bar = 20 μm.

比較無性與有性後代之差異

Pca170 A1, Pca173 A2 之游走子與配對後卵孢子的分離株，各隨機取十株編號為 A 到 J。每菌株在 V8 培養基培養成菌落後，由菌落邊緣取三個直徑 4 mm 之菌塊，各放在一 V8 培養基中間，在 24°C 下培養三天後，觀察其菌落形態，並測量菌落半徑。每一菌株三重複，結果以 Duncan's LSD test 進行分析。

有性後代之無性後代間的差異

由 Pca170 A1 與 Pca173 A2 配對所產生的卵孢子的後代，選出分離株 D 與 J (圖四) 進行試驗，因為此二株菌產生較多孢囊，且分離株 D 的配對型是 A1，而分離株 J 的配對型是 A2。如前試驗，使之產生游走子，並且形成菌落，然後再各隨機取十株游走子分離株編號為 a 到 j。按照上面的方法，各以三重複培養於 V8 培養基上，在 24°C 下培養，三天後觀察菌落形態並測量菌落半徑。每一菌株三重複，結果以 Duncan's LSD test 進行分析。

配對型的測定

每一無性及有性後代，取一小菌塊，放在一塊 (15 × 20 × 5 mm) V8 培養基的一端，另一端則放 Pca170 A1 的小菌塊。用同樣的方法取另一小菌塊與 Pca173 A2 小菌塊配對。在黑暗 24°C 下培養一星期，然後在顯微鏡下觀察。如果與 Pca170 A1 配對才會產生卵孢子，表示其配對型為 A2，如果與 Pca173 A2 配對才會產生卵孢子，表示其配對型為 A1。

結 果

無性世代的菌落形態與生長速度

Pca170 A1 的菌落為白色不規則玫瑰花瓣狀，生長速度為 28.5 mm/ 3 days。所獲得的十株 Pca170 A1 游走子無性後代 (Pca170z-A~J)，其菌落形態除了 Pca170z-B 及 Pca170z-C 子代菌絲密度較稀疏，其餘子代均與親本相似，菌絲緊密，成白色不透明玫瑰花瓣狀菌落，菌落邊緣呈不規則 (圖二，A)。無性後代的生長速度相差較小，其中子代 Pca170z-A、D 及 E 的生長速度較親本為慢，Pca170 A1 游走子無性後代的生長速度為 28.3 ± 2.98 mm/ 3 days (圖二，B)。

Pca173 A2 為透明稀疏放射狀菌落，生長速度為 27.6 mm/ 3 days。共獲得十株 Pca173 A2 的游走子無性後代

(Pca173z-A~J)，其菌落形態與親本都很相似，菌絲稀疏透明，菌落邊緣平滑 (圖三，A)。Pca173 A2 游走子無性後代的生長速度也很一致，平均為 27.8 ± 0.92 mm/ 3 days (圖三，B)。

有性世代的菌落形態與生長速度

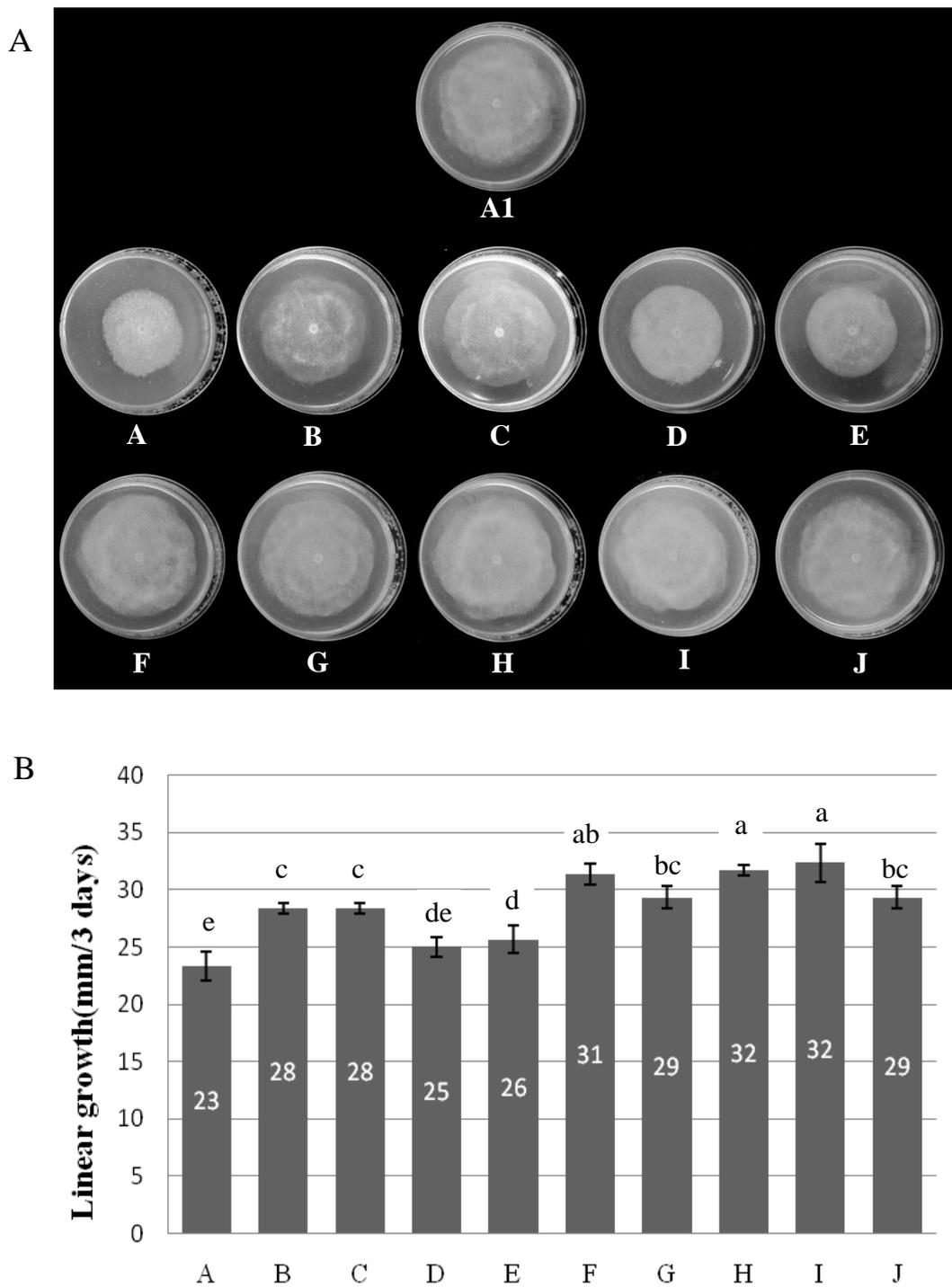
由 Pca170 A1 與 Pca173 A2 配對所產生的十株有性後代 (Pca170×173-A~J)，其菌落形態及生長速度差異都非常顯著 (圖四)。有性後代的菌落形態介於親本 Pca170 A1 與 Pca173 A2 之間，例如菌絲非常稀疏透明的子代 Pca170×173-E、I，到非常緊密呈白色的子代 Pca170×173-B、J (圖四，A)。這些有性後代的生長速度皆比親本慢，平均生長速度為 16.2 ± 3.61 mm/ 3 days，生長最慢的子代 Pca170×173-D，三天只生長 10 ± 1.7 mm，而生長較快的子代 Pca170×173-A，三天生長 23 ± 0.8 mm，較接近親本的生長速度 (圖四，B)。其中有性子代 Pca170×173-G、H、J 的交配型為 A1，而有性子代 Pca170×173-A~F 及 J 的交配型為 A2。

有性子代 Pca170×173-D 之無性後代

生長緩慢之有性子代 Pca170×173-D，取其無性後代共十株 (Pca170×173-D-a~j)，生長速度與親本 Pca170×173-D 相似，生長較慢，生長速度平均為 10.4 ± 1.4 mm/ 3 days (圖五，B)，但這些無性世代的菌落形態仍呈現差異 (圖五，A)。除了子代 Pca170×173-D-b 及 Pca170×173-D-g 與親本相似，菌絲呈現緊密狀，其餘子代之菌落形態皆呈放射狀。所有無性後代之交配型均與親本 Pca170×173-D 相同，為 A2 交配型。

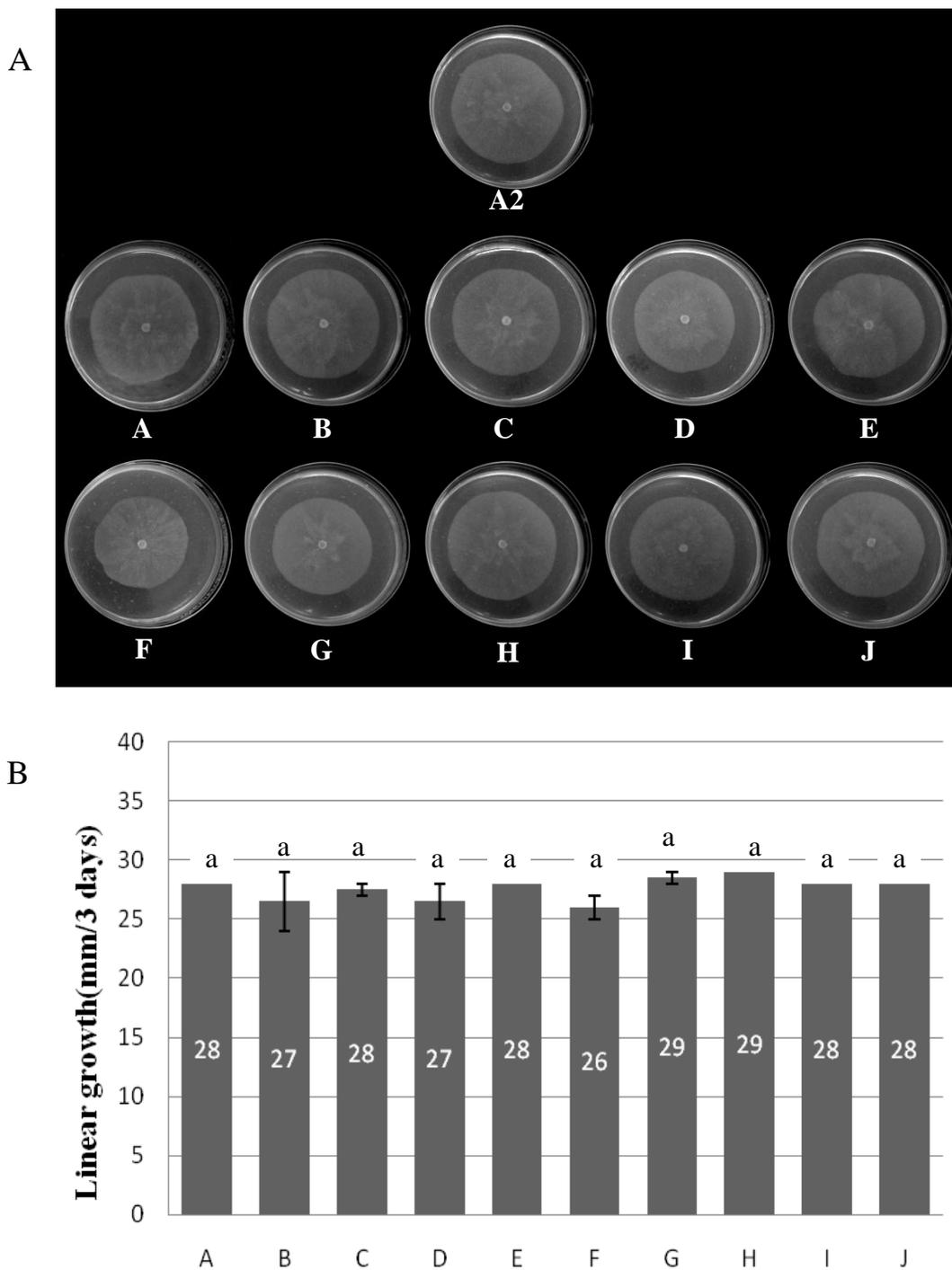
有性子代 Pca170×173-J 之無性後代

有性子代 Pca170×173-J 之生長速度為 12 mm/ 3 days，菌絲呈綿密狀，其無性後代 (Pca170×173-J-a~j) 的菌落形態及生長速度的均呈現差異 (圖六)。菌落形態由菌絲緊密呈白色的子代 Pca170×173-J-b，到菌絲稀疏較透明的子代 Pca170×173-J-h (圖六，A)。生長速度也由三天只長 13 ± 0.0 mm 的子代 Pca170×173-J-g 到三天生長 21 ± 0.5 mm 及 21 ± 0.0 mm 的子代 Pca170×173-J-h 及 j (圖六，B)。且所有無性子代之交配型皆為 A1，與親本 Pca170×173-J 之交配型相同。



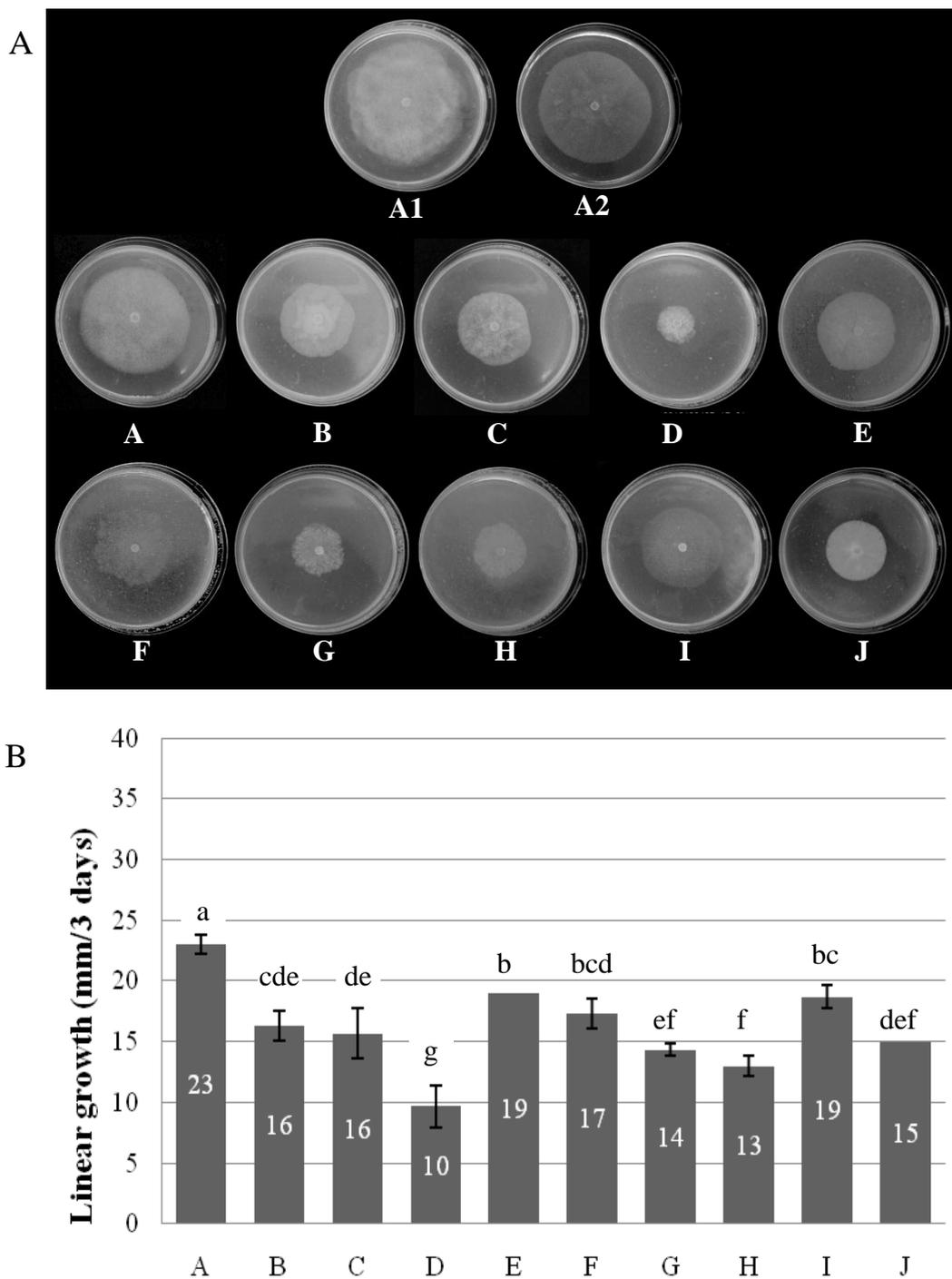
圖二、番椒疫病菌之 Pca170 A1 游走子無性後代的菌落形態 (A) 及生長速度 (B)。

Fig. 2. Colony morphology (A) and growth rate (B) of zoospore progenies of *Phytophthora capsici* isolate Pca170 A1. Data followed by the same letter are not significantly different ($P=0.01$) according to Duncan's LSD test.



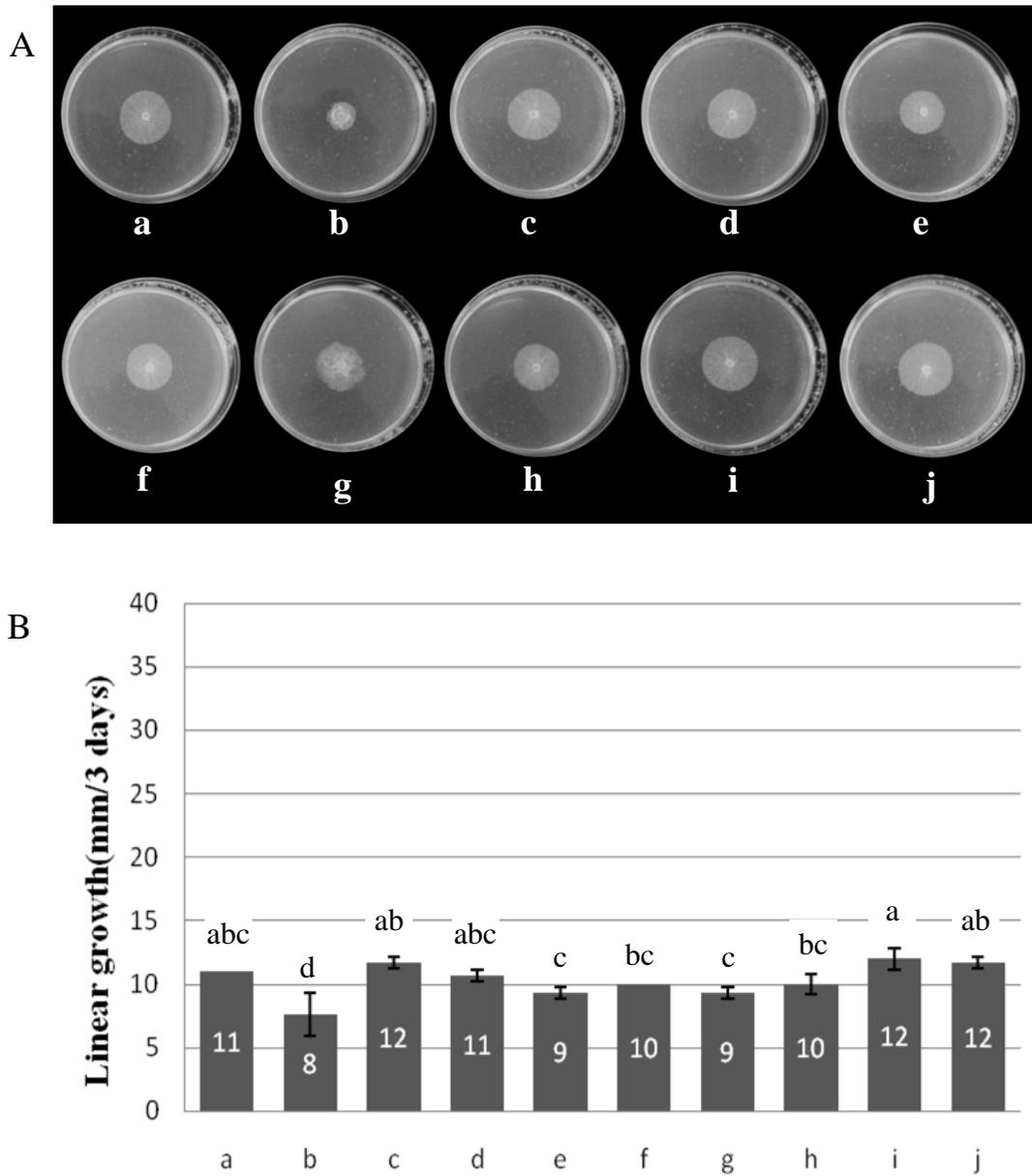
圖三、番椒疫病菌之 Pca173 A2 游走子無性後代的菌落形態 (A) 即生長速度 (B)。

Fig. 3. Colony morphology (A) and growth rate (B) of zoospore progenies *Phytophthora capsici* isolate Pca173 A2. Data followed by the same letter are not significantly different ($P=0.01$) according to Duncan's LSD test.



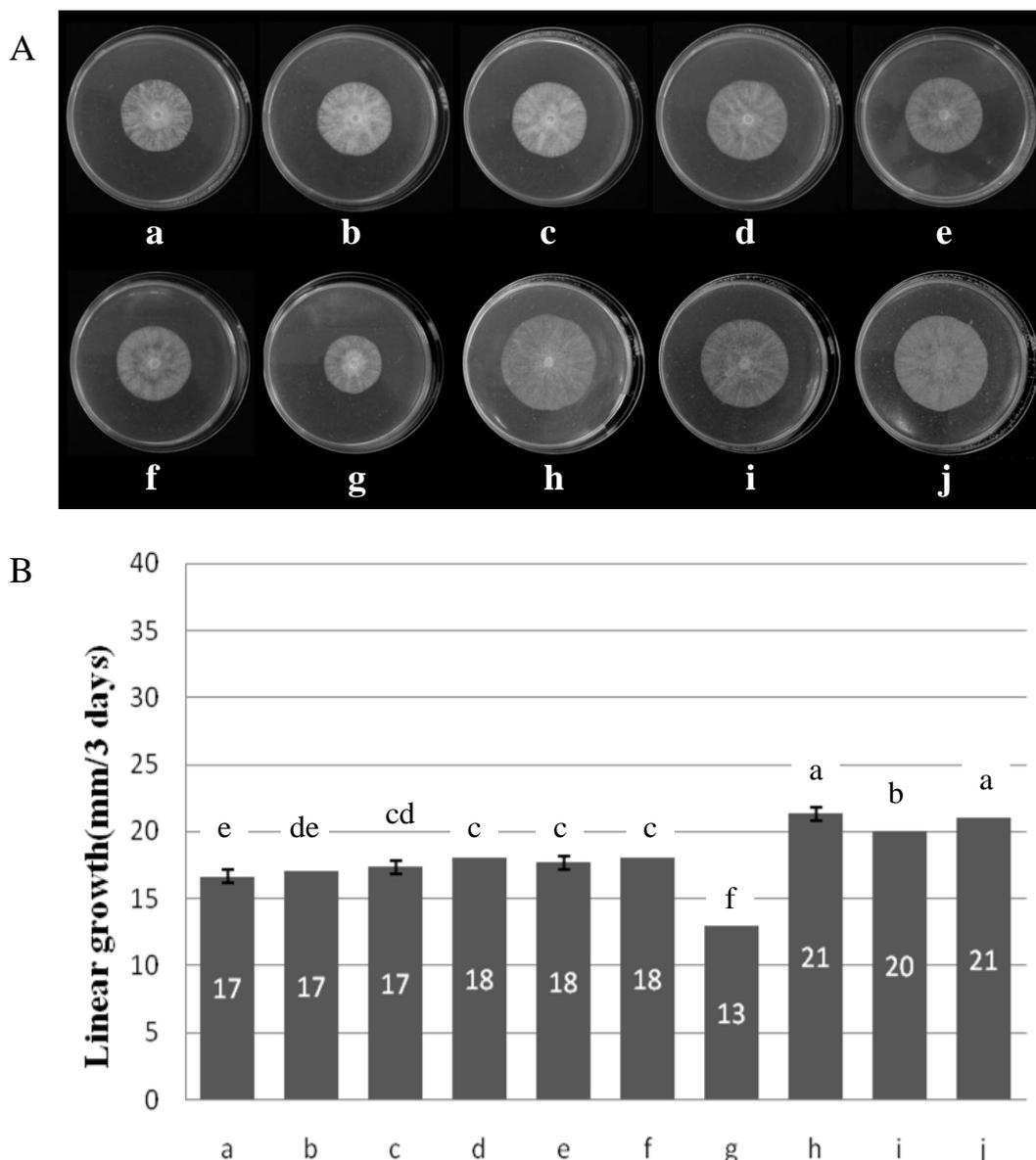
圖四、番椒疫病菌之 Pca170 A1 與 Pca173 A2 配對所產生卵孢子有性後代之菌落形態 (A) 與生長速度 (B)。

Fig. 4. Colony morphology (A) and growth rate (B) of oospore progenies between Pca170 A1 and Pca173 A2 of *Phytophthora capsici*. Data followed by the same letter are not significantly different ($P=0.01$) according to Duncan's LSD test.



圖五、番椒疫病菌之 Pca170 A1 與 Pca173 A2 配對所產生 A2 有性後代 D (圖四) 之游走子無性後代之菌落形態 (A) 與生長速度 (B)。

Fig. 5. Colony morphology (A) and growth rate (B) of zoospore progenies of A2 offspring D (Fig. 4) resulted from the pairing between Pca170 A1 and Pca173 A2 of *Phytophthora capsici*. Data followed by the same letter are not significantly different ($P=0.01$) according to Duncan's LSD test.



圖六、番椒疫病菌之 Pca170 A1 與 Pca173 A2 配對所產生 A1 有性後代 J (圖四) 之游走子無性後代之菌落形態 (A) 與生長速度 (B)。

Fig.6. Colony morphology (A) and growth rate (B) of zoospore progenies of A1 offspring J (Fig.4) resulted from the pairing between Pca170 A1 and Pca173 A2 of *Phytophthora capsici*. Data followed by the same letter are not significantly different ($P=0.01$) according to Duncan's LSD test.

討 論

根據本研究的結果，番椒疫病菌 *P. capsici*，雖然其游走子無性後代的菌落形態及生長速度差異較小，其卵孢子有性後代的菌落形態及生長速度差異卻很大。此結果與 *P. nicotianae* 之有性世代較無性後代之差異性為大之結果相同⁽²⁾，而且也都支持疫病菌是雙倍體 (diploid) 的理論⁽¹¹⁾，與單倍體 (haploid) 的一般真菌不同。

Sansome⁽¹¹⁾是在高倍顯微鏡下，觀察細胞核在有性繁殖過程中的變化，證明疫病菌是雙倍體，我們是用比較有

性與無性後代菌落與生長速度的變化，來證明疫病菌是雙倍體，因為如果疫病菌是單倍體的話，則有性與無性後代菌落與生長速都會一致。疫病菌有一百多個種⁽⁴⁾，在我們的報告之前，有證據證明是雙倍體的就只有 *P. nicotianae*，本報告以第二個疫病菌 *P. capsici* 來支持疫病菌是雙倍體的理論。

本研究發現 *P. capsici* 的有性世代，其游走子無性後代，菌落形態及生長速度均保留差異大的特性。這種經過有性繁殖後，其無性後代會繼續保持菌落形態及生長速度不斷變異的現象，在生物界是一種新發現。一般都相信有

性繁殖的後代，其無性繁殖的後代都會穩定一致，其型態上的特性不會再分離⁽¹³⁾。以前只有 *P. cinnamomi*⁽¹³⁾ 及 *Py. splendens*⁽⁵⁾ 有這種特殊現象的報告。本報告使 *P. capsici* 成為生物界第三個有此特殊新現象的種。是什麼原因造成這種特殊的現象尚不得而知，有待未來進一步的研究。

謝 辭

本研究之試驗菌株，由農業試驗所植物病理組安寶貞組長提供，研究之材料與設備，由中興大學柯文雄講座教授所提供，特此致謝。我們也感謝柯教授對研究及論文撰寫的指導與協助。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1988. Induction of oospore germination of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 78: 335-338.
2. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1990. Growth rate and colony morphology of progenies of zoospore and selfed oospore of *Phytophthora parasitica*. *Mycologia* 82: 693-697.
3. Burnett, J. H. 1975. *Mycogenetics: An Introduction to the General Genetics of Fungi*. John Wiley and Sons, New York, 375 pp.
4. Gallegly, M. E., and Hong, C. 2008. *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn, 158 pp.
5. Guo, L. Y., and Ko, W. H. 1995. Continuing variation in successive asexual generation of *Pythium splendens* following sexual reproduction. *Mycol. Res.* 99: 1339-1344.
6. Hausbeck, M. K., and Lamour, K. H. 2000. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Dis.* 88: 1292-1303.
7. Hwang, B. K., and Kim, C. H. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis.* 79: 221-228.
8. Lu, L. S., and Kao, C. W. 1981. Pepper blight induced by *Phytophthora capsici*. *Plant Prot. Bull.* 23:59-66. (in Chinses).
9. Oliven, B. G., Silven, P. M., and White, T. C. 2005. Evolution of drug resistance in pathogenic fungi. Pages 253-297 *in: Evolutionary Genetics of Fungi*, J. Xu. ed. Horizon Bioscience, Wymondham, Noryolk, U.K, 350pp.
10. Ristaino, J. B., and Johnston, S. A. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Dis.* 83: 1080-1089.
11. Sansome, E. R. 1996. Meiosis in the sex organs of the Oomycetes. *Chromosome Today* 1: 77-83.
12. Satour, M. M., and Butler, E. E. 1968. Comparative morphological and physiological studies of the progenies from intraspecific matings of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 58: 183-196.
13. Zheng, X. B., and Ko, W. H. 1996. Continuing variation in successive asexual generations of *Phytophthora cinnamomi* following sexual reproduction. *Can. J. Bot.* 74: 1181-1185.

ABSTRACT

Wang, C. K.¹, Liang, C. Y.¹, and Chu, C. H.¹, and Lin, M. J.^{2,3} 2011. Genetic comparison of sexual and asexual reproduction of *Phytophthora capsici*. Plant Pathol. Bull. 20: 98-107. (¹ Taichung First Senior High School, Taichung, Taiwan, 2 Yucai Street, North District, Taichung 404, Taiwan, R.O.C.; ²Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, 250 Kuo Kuang Rd., Taichung 402, Taiwan R.O.C.; ³ Corresponding author, E-mail: jiyai@dragon.nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22850773)

Phytophthora capsici is an important pathogen of pepper and numerous other agricultural crops. Very little is known about the genetics of sexual and asexual reproduction of this pathogen. In this study, colony morphology and growth rate of zoospore progenies of A1 and A2 isolates of *Phytophthora capsici* were compared with those of oospore progenies resulted from the pairing of A1 and A2 isolates. Colony morphology and growth rate of zoospore progeny of A1 and A2 isolates were relatively uniform and not much variation was observed among asexual progeny of each isolate. However, considerable variation was observed among oospore progenies, resulted from pairing between A1 and A2 isolates, in both colony morphology and growth rate. Asexual offspring of two oospore isolates tested continue to display variation in colony morphology and growth rate among zoospore isolates. Our results support the hypothesis that species of *Phytophthora* are diploid and suggest that continuous variation in asexual generation following sexual reproduction may be a general phenomenon in Oomycetes.

Keywords: *Phytophthora capsici*, sexual reproduction, asexual reproduction, colony morphology, growth rate.