

# 以逢機定序方式選殖花生簇葉病菌質體之質體及插入序列

魏慧珍<sup>1</sup> 林長平<sup>1,2</sup>

1 臺北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

2 聯絡作者：電子郵件cplin@ccms.ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23661980

接受日期：中華民國 93 年 5 月 23 日

## 摘要

魏慧珍、林長平. 2004. 以逢機定序方式選殖花生簇葉病菌質體之質體及插入序列. 植病會刊13: 143-154.

以逢機定序的策略對花生簇葉病菌質體的全 DNA (total DNA) 進行分析，以罹病日日春植株之全 DNA 及健康植株之全 DNA 為核酸探針，配合差異性雜配反應 (differential hybridization) 對花生簇葉病菌質體構築在 lambda Zap<sup>®</sup> II 及 pBluescript II SK (-) phagemid 上之基因庫進行篩選，共選殖了 108 個選殖株，逐一共完成了其中八個選殖株之核苷酸定序及分析比對，經由比對結果顯示，其中，選殖株 C2 及選殖株 H13 中所具有的 putative ORFs，與 NCBI 基因庫中之已有的資料具較高之相似性。選殖株 C2 中之一個 open reading frame (ORF) 與病毒的 replication protein (Rep) gene 具有相似性。因植物菌質體之質體 (extrachromosomal DNA) 曾被報導與病毒的 Rep gene 具有相似性，因此以選殖株 C2 已知序列設計反向引子對，對罹病日日春全 DNA 進行反向聚合酶連鎖反應 (inverse polymerase chain reaction, IPCR) 實驗，經電泳分析結果只出現單一條帶，顯示選殖株 C2 之嵌入 DNA 為一環狀 (circular) 質體。以嵌入片段中之 Rep 基因部分序列為探針進行南方氏雜配反應，結果顯示在花生簇葉病菌質體中可能有多於一套之 Rep 基因。另外，選殖株 H13 中之一個 ORF 經 NCBI 資料庫比對分析後，發現其與多種微生物的轉位酶 (transposase) 具有相似性，且具有插入序列 (insertion sequence) 中 IS3 family 之 *orfB* 所特有的 DDE motif 之保守區域，並在此 ORF 兩側也發現反向重複序列 (inverted repeat sequence)，因此推斷此選殖株 H13 所嵌入之 DNA 片段中具有花生簇葉病菌質體基因體中之插入序列。本研究中不論以該插入序列或以其間之序列為核酸探針進行南方氏雜配反應，結果皆為單一訊號，顯示此花生簇葉病菌質體中所發現之插入序列只具有單一套組 (single copy) 或者是低套組 (low copy)。

關鍵詞：質體、插入序列、花生簇葉病、植物菌質體

## 緒言

植物菌質體 (phytoplasma)，原名似菌質體 (mycoplasma-like organism, MLO)，是一種重要的植物病原細菌，可造成罹病植株出現枝條增生、花器葉化、萎凋、黃化及簇葉等病徵。目前已知全球有超過兩百種的植物病害是由植物菌質體所引起<sup>(2)</sup>。此病原菌最早是在 1967 年被發現，但由於迄今仍無法以人工方式對此病原菌作純培養，故人們對其生理生化及生物特性的瞭解仍屬有限<sup>(12, 22, 23)</sup>。花生簇葉病 (peanut witches' broom, PNWB) 在台灣首先於澎湖及苗栗兩地被發現，其病原經鑑定後，確定是由植物菌質體所引起之病害<sup>(25)</sup>。花生簇葉病屬豆類簇葉

病 (legume witches' broom) 之一，長期以來，台灣地區的花生栽培常受到此病害之危害，對本省花生產業的發展影響很大。

質體 (extrachromosomal DNA) 為染色體以外的 DNA 片段，在 spiroplasmas、mycoplasmas 及 achleplasmas 中都曾被報導過<sup>(14, 18, 20)</sup>。學者經由觀察感染植物菌質體之植物全 DNA 的電泳結果及超高速密度梯度離心結果，發現除了植物菌質體之基因體 DNA (genomic DNA) 外，在低分子量處有數條大小不等的 DNA 分子條帶，推測其為植物菌質體之質體，依上述模式亦陸續在受到植物菌質體感染之植物全 DNA 中發現質體的存在<sup>(3, 6, 9, 21)</sup>。學者由 onion yellow (OY) phytoplasma 中所分離出的一個 7 kbp

環狀質體<sup>(11, 15)</sup>，其核苷酸序列經分析比對後發現其內具有一 open reading frame (ORF) 與 Geminivirus 之 replication protein (Rep) gene 具有相似性。另外，*Vaccinium witches' broom* 植物菌質體中亦分離出質體，在其發表之部份序列中亦找到一 ORF，其與 Geminivirus 的 replication protein gene 也具有相似性<sup>(19)</sup>。

可轉移因子 (transposable element) 為 1940 年代末，1950 年代初，由 Barbara McClintock 在冷泉港實驗室 (Cold Spring Harbor Lab, NY) 於玉米中首次發現，其普遍存在於原核與真核生物細胞中，例如在細菌、酵母菌、線蟲、及果蠅等生物之染色體上均被發現過。目前在原核生物中已發現超過 500 個以上的可轉移因子，其大小範圍約 0.8~2 kbp。此等可轉移因子主要依據其轉位酶 (transposase) 的 ORF 結構及序列的相似程度、反向重複序列 (inverted repeat, IR) 的特徵及在插入點引起的重複序列 (direct repeat, DR) 長度等特性而將之分類，目前已將 443 個可轉移因子分屬於 17 個 families，其中 IS3 family 為目前在細菌所找到的轉移因子中種類最龐大的一族<sup>(13)</sup>。在 IS3 family 中可轉移因子間的結構都頗類似，其全長約 1,200~1,550 bp，包含兩端約 20~40 bp 的反向重複序列 (IR)；其轉位酶由二個連續且部分重疊 (partially overlapping) 的 ORFs (*orfA* 及 *orfB*) 組成，其中 *orfA* 功能為 DNA 特定序列之辨認 (sequence-specific DNA recognition)，而 *orfB* 的功能則與 DNA 的切割能力 (DNA-cleavage activities) 有關<sup>(7)</sup>。

1993 年，學者由鼠科的病原菌 *Mycoplasma pulmonis* 中發現一個與細菌的插入序列 (insertion sequence, IS) 具相似性之 IS1138<sup>(5)</sup>，此 IS1138 為菌質體中第一個被證實具有轉移活性 (transposase activity) 的插入序列。隨後，許多學者相繼由其它菌質體中發現到插入序列的存在<sup>(8, 24)</sup>。爾後，在植物病原螺旋菌質體 (*Spiroplasma citri* strain BR3) 中亦發現插入序列之存在<sup>(26)</sup>，但在不可純培養的植物菌質體中，則尚未有插入序列之相關研究報告被發表。

本研究以隨機定序 (random sequencing, shotgun) 之策略對花生簇葉病菌質體之全 DNA (total DNA) 進行解序之工作，並針對其中具有質體之選殖株 C2 及具有插入序列特性之選殖株 H13 進行探討。

## 材料與方法

### 試驗植物來源及繁殖與植物全 DNA (total DNA) 之純化

本實驗以日日春 (periwinkle, *Catharanthus roseus*) 作為試驗植物來繁殖植物菌質體。利用菟絲子 (dodder, *Cuscuta australis*) 作為媒介，將花生病株上之植物菌質體傳入日日春健株上<sup>(25)</sup>。溫室中乃利用旁嫁接法 (side graft)

繁殖。而植物全 DNA 抽取之方法主要乃參考 Ko 等人的方法<sup>(10)</sup>稍作修改後進行。

### 花生簇葉病菌質體篩選用核酸探針之製備

將罹病日日春全 DNA 及健康日日春全 DNA 以 Roche Molecular Biochemicals (Roche Molecular Biochemicals, Germany) 公司所開發之 DIG DNA labeling and detection kit 進行標識 (labeling)，核酸探針標識反應之步驟乃依廠商建議進行。

### 花生簇葉病菌質體基因庫之篩選及定序分析

花生簇葉病菌質體基因庫為本研究室先前採用 Strategene 公司 (Strategene, LA Jolla, CA) 開發之 Predigested lambda Zap<sup>®</sup> II/ *EcoRI*/ CIAP cloning kit 及 Gigapack II packaging extract 所構築。另外，本研究選用 pBluescriptII SK (-) phagemid (Stratagene) 為載體並配合 T4 DNA ligase (Promega Corporation, Madison, WI) 進行 DNA 黏結反應，以構築花生簇葉病菌質體全 DNA 之重組質體，構築步驟依廠商建議進行。以前述方法製備之二種核酸探針於上述之基因庫中進行差異性雜配反應 (differential hybridization)，以篩選出只與病植株全 DNA 核酸探針有雜配訊號之選殖株，此即攜帶有花生簇葉病菌質體 DNA 之選殖株。雜配反應乃參考陳氏的方法<sup>(1)</sup>進行，雜配反應溫度為 68°C。由基因庫篩選獲得之選殖株重組質體 DNA 則利用載體上兩端所攜帶之通用引子對進行嵌入片段 DNA 之核苷酸定序。核酸序列定序工作委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行。定序的結果在 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中以核酸序列 (DNA sequence) 及胺基酸序列 (amino acid sequence) 加以比對，並在 NCBI 的 ORF finder 中以親源關係較相近的 *Mycoplasma* code 為依據，進一步尋找可能的 open reading frame (ORF)。本文中後續所述有關序列之鹼基編號皆為該選殖株嵌入片段 DNA 序列之鹼基編號。

### 花生簇葉病菌質體之質體 (extrachromosomal DNA) 選殖株之分析

選殖株 C2 的嵌入片段 DNA 經 NCBI 基因庫比對之後，發現其在 5' 端具有一不完整的 ORF，其一部份序列與 beet curly top virus, abutilon mosaic、bean dwarf mosaic virus 及一些植物菌質體之 replication protein (Rep) 具有相似性；此外先前亦有研究報告指出在植物菌質體發現之質體 (plasmid) 其上之 ORF 的序列與 Geminivirus 之 replication protein 具有相似性<sup>(11, 15, 19)</sup>，因此初步推測選殖株 C2 之嵌入 DNA 可能為花生簇葉病菌質體中之質體，為了證明此一推測，因此利用選殖株 C2 之嵌入 DNA 中已知

序列設計往外的引子對 (outwarding primer)，用反向聚合酶連鎖反應 (inverse polymerase chain reaction, IPCR)<sup>(17)</sup> 方式，試圖增幅出其周圍的核苷酸序列。如果選殖株 C2 之嵌入 DNA 為質體，則其應為環狀 (circular) DNA，因此利用此往外的引子對與花生簇葉病菌質體罹病日日春之全 DNA (total DNA) 進行反向聚合酶連鎖反應時，實驗結果應僅會增幅出單一 DNA 條帶。

執行反向聚合酶連鎖反應測定時，首先依選殖株 C2 之嵌入 DNA 的解序結果，設計二組往外 (outwarding) 引子對 C2F1/ C2R1 及 C2R2/ Rep1 以進行反向聚合酶連鎖反應，其核苷酸序列分別為 C2F1: 5'-GGCTTTTTTCAAGCGCT- 3' (nt 4075- 4092), C2R1: 5'-GCTCATCAGTAGGGCTTT- 3' (nt 149- 132), C2R2: 5'-GCACATCGTTTTTGACTC- 3' (nt 764- 747) 及 Rep1: 5'-CATCATCTTCAAGTAACTC- 3' (nt 3128- 3146)。反向聚合酶連鎖反應中兩引子各 0.5  $\mu$ M，反應中以 50 ng 前述罹病或健康日日春全 DNA 為模板進行 30 個循環，反應條件如下：94 $^{\circ}$ C 30 秒；51 $^{\circ}$ C 30 秒；72 $^{\circ}$ C 7 分鐘，反應產物以 0.8 % 瓊脂凝膠進行水平電泳分析。PCR 產物先以 QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 進行純化，再以 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 進行選殖。所獲得之選殖株重組質體嵌入片段之核苷酸序列定序分析工作委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech) 進行。

### 花生簇葉病菌質體之質體套組數 (copy number) 之分析

為了解質體在花生簇葉病菌質體中之套組數，因此進行南方氏轉漬及雜配反應之測定。核酸探針之標識反應及試劑係採用 Roche Molecular Biochemicals 公司所開發之 PCR DIG Probe Synthesis Kit 進行。核酸探針標識反應過程係依廠商建議進行，係以聚合酶連鎖反應進行標識，所採用之引子對為選殖株 C2 嵌入 DNA 中之一個 ORF (nt 1- 84 及 nt 4226- 3117) 之序列所設計：Rep1: 5'-CATCATCTTCAAGTAACTC- 3' (nt 3128- 3146) 及 Rep2: 5'-CGATCAAGAATTACCATT- 3' (nt 4- 4213)，聚合酶連鎖反應中兩引子各 0.5  $\mu$ M，反應中以 50 ng 前述罹病或健康植物全 DNA 為模板進行 35 個循環，反應溫度如下：95 $^{\circ}$ C 30 秒；52 $^{\circ}$ C 30 秒；72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，即完成反應。此標識完成之核酸探針可直接用於雜配反應。進行南方氏轉漬及雜配反應時，取 5  $\mu$ g 健康及感染花生簇葉病之植物全 DNA，分別以 10 單位之 *Bam*HI、*Cla*I、*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I 及 *Xba*I 核酸內鑿識酵素 (Roche Molecular Biochemicals) 進行醇解 6 小時，再於 0.8 % 瓊脂凝膠中進行水平式電泳，並將 DNA 轉漬至 Nylon 濾膜，隨後即以核酸探針進行雜配及呈色反應<sup>(1, 10)</sup>，雜配反應溫度為 68

$^{\circ}$ C。

### 花生簇葉病菌質體基因體插入序列 (insertion sequence) 選殖株之分析

選殖株 H13 的嵌入片段 DNA 序列經 NCBI 資料庫初步比對之後發現其內具有一 ORF (nt 1746- nt 2684)，其轉譯之胺基酸序列與 *Lactococcus lactis* subsp. *lacyis* 等多種微生物的轉位酶基因 (transposase gene) 所轉譯之胺基酸序列具有相似性，推測選殖株 H13 之嵌入 DNA 應為插入序列，故針對選殖株 H13 進行後續之研究工作。

為了解此插入序列在花生簇葉病菌質體基因體中之套組數，因此進行南方氏轉漬及雜配反應之測定。在插入序列之反向重複序列 (inverted repeat sequence) 上設計引子對 IST3: 5'-TTTAAAAATAATTGATA- 3' (nt 1711- 1727), IST7: 5'-TTTAAAAAAAAGCGCAC- 3' (nt 2742- 2726) 及轉位酶之序列中設計引子對 Tr3: 5'-GGTTAACCAATTCCAACA- 3' (nt 1832- 1849), Tr7: 5'-GCGCATATTGGATTGGCG- 3' (nt 2670- 2653)，並利用前述之 PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Molecular Biochemicals) 製作探針。聚合酶連鎖反應中兩引子各 0.5  $\mu$ M，反應中以 50 ng 前述罹病或健康植物全 DNA 為模板進行 35 個循環，反應溫度如下：94 $^{\circ}$ C 30 秒；26.5 $^{\circ}$ C 30 秒 (for IST3/ IST7) 或 51 $^{\circ}$ C 30 秒 (for Tr3/ Tr7)；72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，即完成反應。此標識完成之核酸探針可直接用於雜配反應。進行南方氏轉漬及雜配反應時，取 5  $\mu$ g 健康及感染花生簇葉病之日日春全 DNA，分別以 10 單位之 *Bam*HI、*Cla*I、*Eco*RI、*Hind*III、*Xba*I 及 *Xho*I 核酸內鑿識酵素 (Roche Molecular Biochemicals) 進行醇解 6 小時，再於 0.8 % 瓊脂凝膠中進行水平式電泳，並將 DNA 轉漬至 Nylon 濾膜，隨後即以核酸探針進行雜配及呈色反應<sup>(1, 10)</sup>，雜配反應溫度為 68 $^{\circ}$ C。

## 結 果

### 花生簇葉病菌質體基因庫篩選

在本研究中共篩選出 108 個選殖株，進行序列分析比對後，除去具有相同嵌入片段 (insert DNA) 的選殖株後，共完成了八個選殖株嵌入 DNA 之全部序列之解序。經由比對結果顯示，選殖株 C2 及選殖株 H13 中所具有 putative ORFs 與 NCBI 基因庫中已有的胺基酸資料具較高之相似度，其中選殖株 C2 中之 ORF (nt 1- nt 84 及 nt 3117- nt 4226) 所轉譯之蛋白與病毒的 replication protein (Rep) 具有相似性；選殖株 H13 之 ORF (nt 1746- 2684) 所轉譯之蛋白與多種微生物之轉位酶 (transposase) 具有相似性，故在本研究報告中即針對此二選殖株作進一步之試驗分析。

*Cla*I

...  
 ATCGATAATATCATAAGTTAATAAAGGTTTTTATATGAATTTTTTTCATGTAACATC 60  
 D T I D Y T L L L N K Y Q I K K M Y V D  
 CTTTAAATGACCTAAATATAACATATAATATTTAGGTTTTTTTTTCGTTTATATACCATTA 120  
 K L H G L Y L M  
 replication protein gene  
 .....C2R1.....  
 AAAAAAAGTTAAAGCCCTACTGATGAGCTTGTGCGAACATCAATAGGCGCTTTTTTAT 180  
 ATAGTATAGAATTCGTGACAAGCTCTTAATTTAATTTTATCACTTTTTATCAAAAAC 240  
 \* K K D F V  
 GTAATGATCTAAAAAATGGTTTTTACATAATTTTTAAAAATAAATTTTATTAATA 300  
 P L Q D L F I T K V Y N K L F Y I K N F  
 ATGTGTTTTTATTAAATACTAAATTTAAAGATATTATCGACTAATTTTCAATTAAT 360  
 L T N E N N L I S F K F I N D V L K M L  
 CAGGTCTACTTTAAATTTCACTAAATTTTATCAATATTTTAAATAAATTTCCACA 420  
 E P D S K F K V L N K D I N N L Y N N W  
 AAGATTTTACTCGGAAAAATCCATAAACGACAATAAACGCTCCCAATTTAACATGAC 480  
 L S K V E S F D M F R C Y F T W L K V H  
 TTAAGTTTTTAACTTGTGTTGAAAGTATTAAATTTAAATTTAGCAATTTGTTTACTAT 540  
 S L T K V Q Q Q F T N F N L N A I Q K S  
 TATTTTGAATAAATCTACCGTTTTTATCATGTAATATTAACCTTCTAATAATTTATTT 600  
 N N Q F L D V T K N M  
 unknown function ORF  
 TTGAATTTAATTTTTGAAAAATTTAAATTCATTTTATTTTATCTCGATTTAAAAATG 660  
 TATCCAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA 720  
 .....C2R2.....  
 AAAAAATGTTAAATATCAATCATGAGTCAAAAACGATGCGAAAAATAAAGGTTTT 780  
 ATGGGATCAAAATGATGATTTTTTAAAAAATTTTTCAGTGAATTTAATCAAAAATTT 840  
 TCAAAATATCAGTCATGGAGTCAAAAATAATATACAAAAATAAAGGTTAATGGGATAA 900  
 AAATGATGATTTTTTAAAAAATAAATTTAATTTGATATAAAAAACAAGATCAAAAAGAA 960  
 ACATATTTATATATAGCATGGAGTCAAGGATCAATATGCAAAAAAATAAAGTTAAAGGT 1020  
 ATAAAAATAGATGTTTTTTTGTGGAGTCAAGTGGAGGCAAAATGGAGTCAAAATGGAGT 1080  
 ACAAAAAATGAGTGAAGGCAAAATGGAGTCAAAATGGAGTCAAAATGAAGTGAAGTGG 1140  
 AGTCAAAAAAAGTGAAGAAACATATGGTTTAAATGGTATGAAAGTGGAAATGGATAAAA 1200  
 AAAAAGTACTCCAAGTACTCCATGAAACAAAGTATGATTTTTGTATGGTTTATGGTAA 1260  
 TATAAAATTTTTGACTCCAATCCGTATATATATCTAAAAGTTTTGTGAAGAGAGAT 1320  
 TTTTTGTAGACCATTTTTTAAAAATTTAATCAAAAAGTTTTACGCTTCGCGCGTTT 1380  
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAATTAGAGATTTTGAAGATTTGATAAATATAGAAAAGAA 1440  
 AAATATTAGGAGTTAACAATAAATGGTAAAGATATTGCTTTCGCTAGAGCTTATCCGTTAG 1500  
 M V K D I A F A R A Y P L E  
 hypothetical threonine synthase  
 AAACTTTTAAGGATAGCAAAATCAAAATCGGAAATCATAAAATTTTTGAAAAAGAAATG 1560  
 T F K D S K I K S E I I K F F E K R N D  
 ATTTGACATATATAAAAAATTTAGTTATCGAACACAGTTTAAATCGGATTTGAAATTAGAT 1620  
 L T Y Y K N L V I E Q F N R I G I R S  
 CATTATATATAGCGTAATTAAGCATTTAATTTGGCGTTTAAATTTACGCGGGTATTT 1680  
 L L Y S V I K H F N W R F N Y S A G I F  
 TTTCCAGCTGAATTTACTGTAAAAATACAGCAATGAGGCTCATTTAAATATCTTTT 1740  
 S R L N F T C K N Y S N E A H L N I F F  
 TTCACCCCGGATTCGCTTTATAAATAAATACTAGAGGAAATTTAAATTTGTGAGG 1800  
 Q P A I A L Y K L K L L E E I L N C E D  
 ATTTTCGTATTAACCGTTGTATGAACCCATGAGAATGATTAATGCTTAACCAATAA 1860  
 F L I K P L Y E P M R M I K M S K Q I N  
 ATGTTTTATGTGCGGTTTTAAGCCTTTTTTACATAACTTTACTAATAAGAAATGATTA 1920  
 V F M C G F K P F L H N F T N K E M I K  
 AATTGATCAAGAAAAATGCCACTTTAATAAGTGGACGATCAAAATGGCAAAATGTATT 1980  
 L I K E K C H F I K V D D Q I G K L Y L  
 TAGAGTAAATTTTTTATTACTTTCTAATAAATTTTTTGATAAGTTTTTAAACCATATT 2040  
 E \*  
 \* K S E L Y I K Q Y T K L G Y  
 TCGTAATAATTCATCAGCATCTTTGCAATCATAATGAGGAATCGTTTTAATGTAATTTT 2100  
 K R L L E D A D K C D Y H P I T K I Y N  
 CAATATTAAACGTTTTAATTTGACTTAATCGGAAGCGGTTTTAATCCGTTTCAT 2160  
 E I N L R K L Q Q S L R F A T K L G T E  
 CATTATCTAATCCGAGAATGACTTTTTATTGATATTTTTTAAAAAATCGAGGATAAATG 2220  
 D N D L G L I V K I Q Y K K F F D L I F  
 GCGAAAAATATTGCTAACGGTAATCAAACCGATGACATTTTCAATTTGATTTTGATAAC 2280

P S F N N S V T I L G I V N E I Q N Q Y  
 TTTGTAACATCAAAAAGCCTTCATGTAATGCGCGTTTGGGTATCCAAAATGGCTT 2340  
 S Q L V D F F Q E H L I A T Q T D L I A  
 TTTTAGCATAGTAAATCCATAAGGAATACTAAAGATTGTCTGATTGGTTAAATTCGCGTA 2400  
 K K A Y H F G Y P I S F I T Q N T L N R  
 ATGCTTGATATTTGGGCGATAAGGTAATTCGCGGATAATGAAACCGATAATAATGAA 2460  
 L A Q Y K P R Y P L E A P Y H F R Y Y H  
 TAATTTGCGATTTTTCATCAAAAACGGAATTAACCAACAATAAGGCAACCATCATAGC 2520  
 I I K G N E D F V P I L W C N L C G D Y  
 TAAATTTAGGATTTTACGTAATAAATCTACCGCATAATACGGCTTAAATCGGCTGTGT 2580  
 S F K P N K R L L D V A Y Y P T L D A Q  
 GGTTTTCTAAATAATTTAATAAATTTGATTATTTTTTATTAGCGAATCCAATTTGAAAT 2640  
 Q N E L Y N L L N Q N N K N A F G I Q F  
 TTTTAAATAAAGCGGATTAAGCTGACGTTTCTTTAAACAATAATCGAGAGCTCCGCGTG 2700  
 K K I L L P N L Q R K K L L Y D L A A P  
 TGGCCATAATGTTTTTGATAAAAATGACTAATTTATCCCAATCGCTAAAATTTGAT 2760  
 T A W L Q K Q Y F H S I E D W I A L I T  
 CCAGGTGTAATTAATTAAGTAAATTTAAGTGCITTTATTTTCGTTATTGATAGCT 2820  
 D L H L N S N A F N N L A K N E N N S L  
 TAAATGACTCATTACCGTGAATGCTGACGCGTTAGCTCTTGATATTCGCTGCTTTGAT 2880  
 K F S E N G T F A S A T L E Q Y E T S Q  
 AAAAGTTGGTTAAATCGGTTAAACTTTGGGCAAAATCTTTCCGTAATTTTTTGATAAAA 2940  
 Y F N T L D T L S Q A F D K G T I K Q Y  
 CCGTCATCGTATCAAAAGCTTTCCGCAACTCCAACACCAATCTTATTTGGCGATTAA 3000  
 V T M T D F A K G C S W C W I K N Q R N  
 TATCCCGGATAAACCACTTTTACTATCATGAAAAGGACATTTAAACGAATGGGTAAG 3060  
 I D A S L G S K S D H F P C K F R I P L  
 TCGCGTACGGGGATTAATTTAAATGTTTTAAACAAAATCAACATGGAATATCTTTAA 3120  
 T A H V P I L K L H K L L V L M S I D K  
 .....Repl.....  
 ATATCATCATCTTCAAGTAACTCCGATTTTCTTCTGCTGGGGCGTAAAAATAGT 3180  
 I D D D E L L E R N E E A P P A L F L  
 F I M M M  
 DNA primase  
 TTTTATCCGGATCTAAAGTAAAAAATAACATTCGAGCGAATAATAATCAAGCAGATAT 3240  
 K K D P D L T L F I V N S R I Y D L L Y  
 TTTATCCCGAAGATGAAAAAATGCTTAAAAGAACGATGGGGATTACAAATAAAAAATA 3300  
 K N G P L H F L K M K I N I F I C N P H  
 TTTATTTTCACTTTAAATTTCCGATCCGGTTCAATGTTAGCGGTTCCACCGAATGA 3360  
 R S F K Q F I E R D P E H K A T E V S H  
 CCAAGTTGACTGGTAAAAATGGTTTCTACTAGATCTCTTCCACTAATAAGATCGCTGA 3420  
 G L Q S T F I T E V L D R E V L Y S A Q  
 AAATCATATAAATCAACTTCGCGATTTTCATCATATAACGTTTACGGCTATAATTT 3480  
 F D D Y I D V E A N E D D Y R K R S Y N  
 AAGCGTCTTTTCAATAAATAAATAAATGTTTAAATTTAATAAATCCACATAAAT 3540  
 L R R K M Y N F I I N L N L L S W M F  
 TGGGTTTTTCTAACCCTTACCCTTCAATTAACCGGACTACGATGACCACGA 3600  
 Q T K G L G T V G E I V L A P S R H G R  
 CGCAAAATTTAACCCCTTTAAAAATAAATCTTTAATAAATGCAATTTGGGGATTGGCT 3660  
 R V F K L G K L I F D K I E F V F W F N A  
 AAATCAAAAGTATCTAACGTTTAAATTCGACATAATCTTTTAAATTCGAAATCCGGGTA 3720  
 L D F T D L P K I D V Y D K L N R I R T  
 AAATGTGTTTAAATTTTGTGTAATAATCGAAGTTTTTCCACAACCAAAATTTATTG 3780  
 F H Q K I N Q Q I I S T K I E F V F W F N N  
 GTTTCATTTAAATATTGATAACAATAACGGTTGCTTCTCGTAGTCATTTCTAAATCT 3840  
 T E N L Y Q Y L L R T A E E T T M E L D  
 TGGTCAATTCGCTTTAATTTTTTAAATAAATAAAGACATCTTCGCTTTGTTCTTTG 3900  
 Q D F E A K L K K I Y N F V D E S Q E K  
 CGAAATTTGGCGAACTTCTCGACTAATCGTTAAACGCCCATGATTATAAGAAACTCA 3960  
 R F K P S V E R S I T L R G H N Y S V E  
 CTACGCCCAATATAAATAGCGATATCAGCTGGAGAAACCGCATTTTGAATCTAATA 4020  
 S R A V I Y N A I D A P S V A N Q V R I  
 ATTTTAAATCTTTTCTAATGTTAATTTAAAAATACTTAAATTCAGAAAACAAGGCTTT 4080  
 I K F N K E L P L K F I S L N R F C P K  
 ..C2F1.....



```

TTTCAAGCGCTATTAGCACTTTTAATCTTTTGTGTTGGCCAAATAAAAAATTTT 4140
K E L A I L V K L R Q K Q Q A L L L F K
ACTTGATTTTGATATTTTGTGTAATAATGAAAACAATGATAAATCTTTAAGA 4200
V Q N Q Y K Q Q L I N I F V F S L D K L
.....Rep2.
AAGTTAACTTTCATGGTAATCTTG 4226
F N V K L P L E Q

```

圖一、選殖株C2之4226 bp嵌入片段DNA核酸序列及其相對應之胺基酸序列

Fig. 1. Nucleotide sequence of the 4226 bp insert DNA of recombinant clone C2 and the predicted amino acid sequences of the open reading frames. The sites of start codons and the directions of the open reading frames (replication protein gene, unknown function ORF, hypothetical threonine synthase, DNA primase) are indicated. The stop codons are indicated by asterisks. The DNA sequences of the primers C2R1, C2R2, Rep1, C2F1 and Rep2 are indicated.

### 花生簇葉病菌質體之質體分析

選殖株C2為以*ClaI* 酵解罹病日日春全DNA再與相同內鑑識酵素酵解之載體pBluescriptII SK (-) 進行黏結反應後所得到的菌質體DNA轉形株。選殖株C2嵌入片段全長為4226 bp (圖一)。經由核苷酸序列比對後發現其具有三個putative ORFs及一個不完整的putative ORF，第一個putative ORF在nt 3133有轉譯起始密碼ATG，nt 1994有終止密碼TAA，長度為1140 bp，轉譯成胺基酸序列後共具有379胺基酸，基因蛋白質產物大小估計約44314.05 Daltons，經NCBI資料庫比對後發現其與*Synechococcus* sp.及*Bacillus halodurans*之DNA primase基因所轉譯之胺基酸序列皆具有40%之相似度(similarity)；第二個putative ORF在nt 1461有轉譯起始密碼ATG，nt 1988有終止密碼TAA，長度為528 bp，轉譯成胺基酸序列後共具有175胺基酸，基因蛋白質產物大小估計約21065.94 Daltons，經NCBI資料庫比對後發現其與*Sulfolobus tokodaii*之hypothetical threonine synthase基因所轉譯之胺基酸序列具有58%之相似度；第三個putative ORF在nt 571有轉譯起始密碼ATG，nt 221有終止密碼TGA，長度為351 bp，轉譯成胺基酸序列後共具有116胺基酸，基因蛋白質產物大小估計約14020.25 Daltons，並未發現與其他微生物之基因或其轉譯產物具有相似性；而另一不完整的ORF(nt 3117- nt 4226)，以DNASTAR將此核苷酸序列轉譯成胺基酸序列後，於NCBI資料庫比對後發現其與beet curly top virus, abutilon mosaic及bean dwarf mosaic virus及phytoplasma之replication protein(Rep)具相似性。

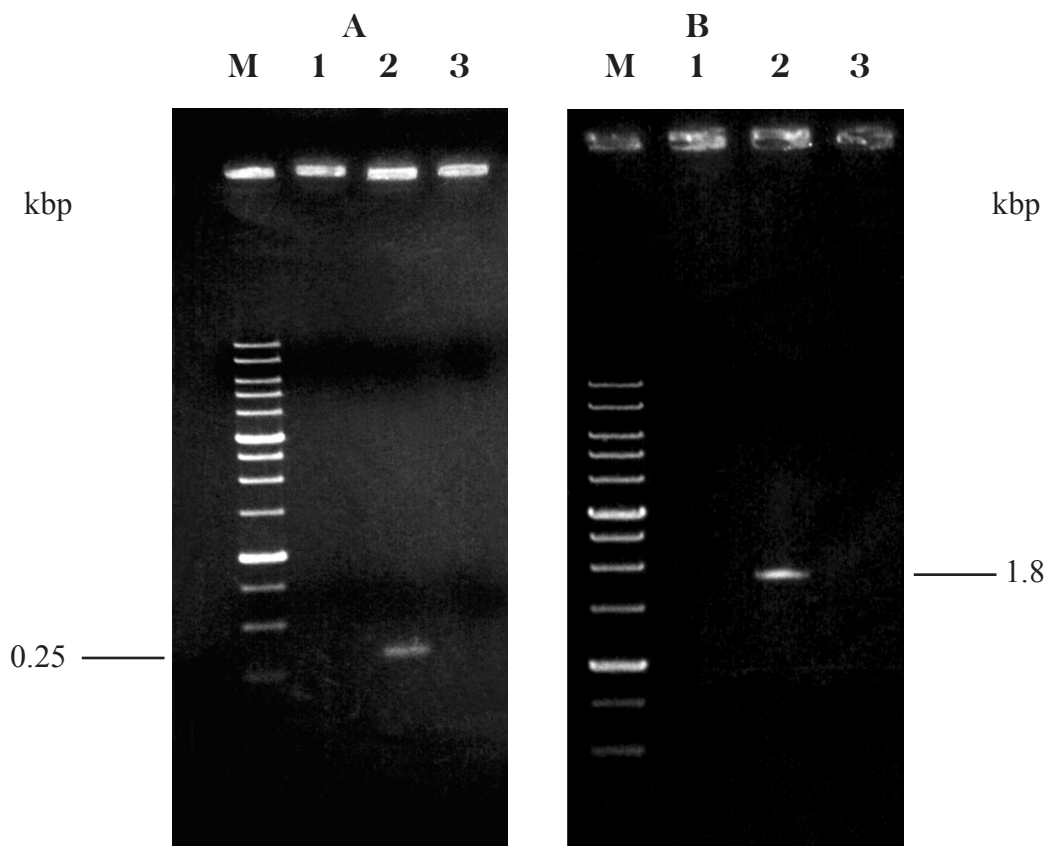
### 花生簇葉病菌質體之質體反向聚合酵素連鎖反應(IPCR)測定

根據Kuboyama<sup>(11)</sup>及Rekab<sup>(19)</sup>等學者的研究，其分別在OY-W phytoplasma與X-clade phytoplasma的質體上發

現與Geminivirus的replication protein(Rep)具相似性的ORF，因此初步推測選殖株C2嵌入之DNA片段可能為花生簇葉菌質體中的質體。為了探討選殖株C2嵌入的DNA片段是否為環狀之質體序列，且欲尋找出此完整的ORF，因此在嵌入片段的兩端設計反向引子對(primers)，以距離嵌入片段兩端*ClaI*內鑑識酵素作用位各131 bp及134 bp處所設計的引子對C2R1/C2F1及距離嵌入片段兩端*ClaI*內鑑識酵素作用位約1080 bp及746 bp處設計的引子對Rep1/C2R2，利用此二組反向引子對針對罹病日日春全DNA進行反向聚合酵素連鎖反應，結果分別增幅出約250 bp的單一條帶(圖二A)及1.8 kbp的單一條帶(圖二B)，而對健康日日春全DNA以二引子對進行反向聚合酵素連鎖反應時都沒有任何訊號出現，因此可以得知，本研究選殖出之選殖株C2所嵌入之DNA片段為存在於花生簇葉病菌質體中之環狀質體。將C2R1/C2F1之反向聚合酵素連鎖反應產物純化後，進行核苷酸序列分析，結果C2R1/C2F1之反向聚合酵素連鎖反應產物其核苷酸序列長度為265 bp，將此265 bp之核苷酸序列與選殖株C2所嵌入之核苷酸序列進行排列比對(alignment)，發現此265 bp核苷酸序列在引子C2R1方向(131 bp長)與載體選殖位(multiple cloning site, MCS)一側之T3序列方向核苷酸序列(nt 1- nt 131)相同，而引子C2F1方向(134 bp長)與載體選殖位另一側之T7序列方向之核苷酸序列(nt 4093- nt 4226)相同，且在此265 bp IPCR產物之核苷酸序列中發現到一*ClaI*內鑑識酵素所辨識的切位，因此可以得知本實驗所選殖出之選殖株C2所嵌入之片段為一質體，且具有一*ClaI*內鑑識酵素所辨識的切位。將選殖株C2在載體之T3及T7兩端的核酸序列相連接之後，在NCBI資料庫中進行分析，結果發現在選殖株C2核苷酸序列之nt 84(轉譯方向為nt 84至nt 1)具有轉譯起始密碼ATG，在nt 3117(轉譯方向為nt 4226至nt 3117)具有終止密碼為TAA，此一完整ORF之整個核苷酸序列長度為1194 bp，轉譯成胺基酸序列後共具有397胺基酸，經NCBI資料庫比對後發現其與beet curly top virus, abutilon mosaic及bean dwarf mosaic virus及phytoplasma之replication protein(Rep)都具有41%的相似度。

### 花生簇葉病菌質體中質體套組數之分析

依據選殖株C2嵌入DNA中ORF(putative Rep gene)(nt 1- 84及nt 4226- 3117)之序列設計引子對Rep 1/Rep2以PCR方式所製備出之核酸探針，進行南方氏轉漬及雜配反應。結果在健康日日春之全DNA沒有任何雜配訊號，而以*Bam*HI、*Eco*RI、*Pst*I、*Xba*I及*Xho*II酵解罹病日日春全DNA之雜配結果，分別在4.2、4.1、3.5、2.5及2 kbp之位置出現雜配訊號；以*Hind*III及*Cla*I酵解者具有4.1 kbp大小之訊號，而在4.2、2.5及2 kbp的位置則沒有訊號出



圖二、利用 primer C2F1及 primer C2R1 (A) 與 primer C2R2及 primer Rep1 (B) 之引子組合對健康日日春及受花生簇葉病菌質體感染之日日春全DNA 進行反向聚合酵素連鎖反應之產物分析

Fig. 2. Inverse polymerase chain reaction (IPCR)- product amplified by primer C2F1 and C2R1 (A), C2R2 and Rep1 (B) using the total DNA of healthy periwinkle and periwinkle infected with PNWB-phytoplasma as templates. Thirty PCR cycles were conducted with the following parameters: denaturation for 30 sec at 94 °C, annealing for 30 sec at 51 °C, and extension for 7 min at 72 °C. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 0.8% agarose gel. The DNA templates were extracted from: lane 1, healthy periwinkle; lane 2, periwinkle infected with PNWB-phytoplasma; lane 3, water as negative control. M, 1 kbp DNA ladder as molecular weight standards. Sizes (in kbp) of the PCR products are shown on the margins.

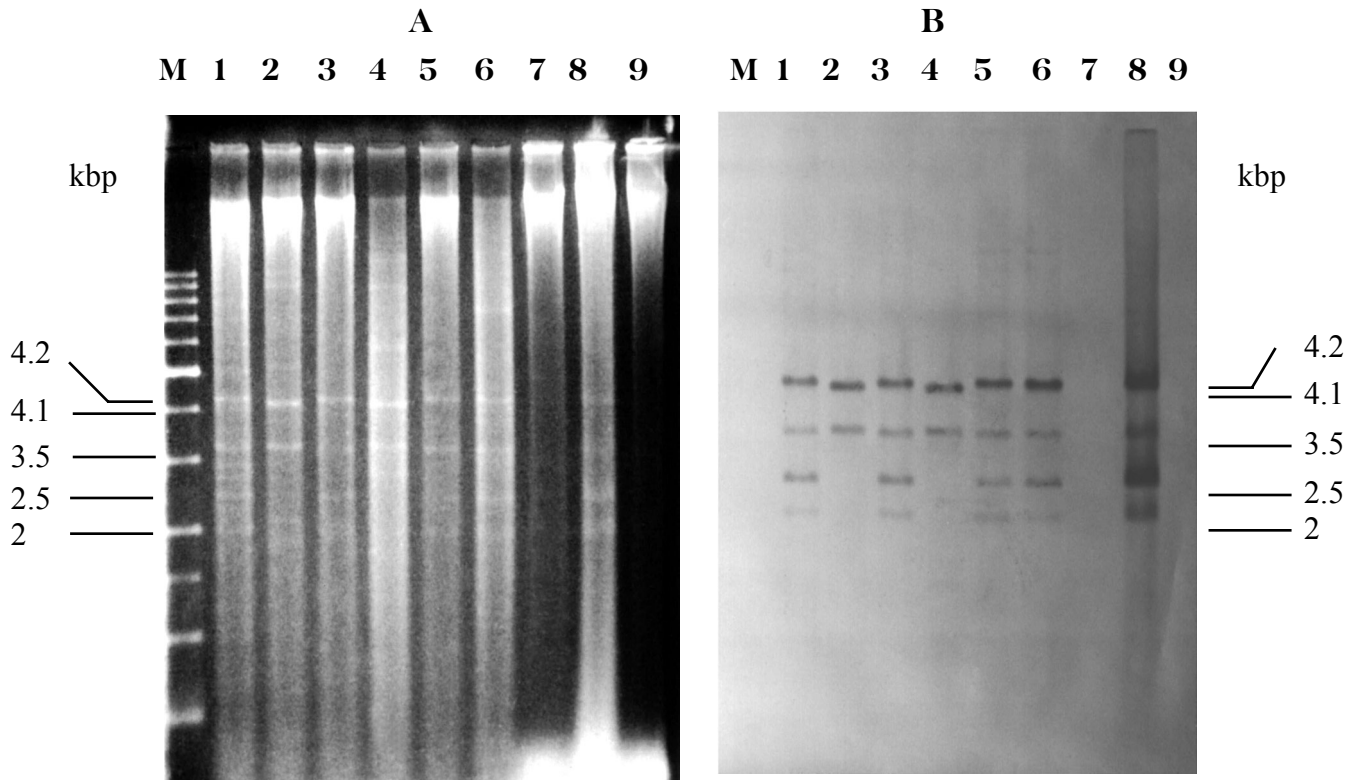
現，相同大小之條帶在以上述內 鑑識酵素酵解罹病植物全 DNA 之電泳圖上亦明顯可見(圖三A、圖三B)。經由上述實驗結果推測 4.2 kbp 大小的條帶為環狀 DNA，4.1 kbp 的條帶為經內 鑑識酵素完全酵解後成直線形的 DNA，另外，2.5 及 2 kbp 大小之條帶則應為超螺旋狀 (supercoil) 之不同構形之質體 DNA，而 3.5 kbp 大小的條帶不被上述七種內 鑑識酵素酵解，因此推測其可能為花生簇葉病菌質體中其他的質體。

本研究將此一質體命名為 pPNWB 並將其序列登錄至 NCBI，登錄號碼為 GenBank AY270152。

### 花生簇葉病菌質體插入序列之分析

選殖株 H13 為以 *Hind*III 酵解罹病日日春全 DNA 再與經相同內 鑑識酵素酵解之載體 pBluescriptII SK (-) 進行黏結反應後所得到的菌質體 DNA 轉形株。選殖株 H13 嵌入片段全長為 3880 bp (圖四)。經由核苷酸序列比對後發現其具有兩個 putative ORFs，及一不完整 ORF；不完整

ORF 位於 nt 1- nt 506，其在 nt 506 有轉譯終止密碼 TAA，長度為 506 bp，轉譯後共具有 168 個胺基酸，基因蛋白質產物大小估計約 18499.93 Daltons，經 NCBI 資料庫比對後發現其與 *Bacillus anthracis* A2012 及 *Streptococcus pyogenes* M1 GAS 之 putative DNA primase 基因分別有 47% 及 44% 之相似性。第一個 putative ORF 在 nt 628 有轉譯起始密碼 ATG，nt 1089 有終止密碼 TAA，長度為 462 bp，轉譯後共具有 153 個胺基酸，基因蛋白質產物大小估計約 17640.41 Daltons，經 NCBI 資料庫比對後發現其與 *Bacillus subtilis* 及 *Bacillus halodurans* 之 hypothetical proteins 基因所轉譯之胺基酸序列分別有 57% 及 58% 之相似度；第二個 putative ORF 位在 nt 1746 有轉譯起始密碼 ATG，nt 2684 有終止密碼 TAA，長度為 939 bp，轉譯後共具有 312 個胺基酸，基因蛋白質產物大小估計約 37708.74 Daltons，經 NCBI 資料庫比對後發現其與 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Bacillus licheniformis*、*Marinococcus halophilus*、*Enterococcus faecium*、*Bacillus*



圖三、對健康及受花生簇葉病菌質體感染之日日春全DNA，利用不同內鑑識酵素酵解後之電泳分析 (A) 及以Rep基因核酸探針進行南方氏雜配分析(B)之結果

Fig. 3. Electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of total DNA ( $5 \mu\text{g}$  per lane) prepared from healthy periwinkle undigested (lane 9), and digested with restriction enzyme EcoRI (lane 7) and from diseased periwinkle infected with PNWB-phytoplasma undigested (lane 8), and digested with restriction enzymes BamHI (lane 1), ClaI (lane 2), EcoRI (lane 3), HindIII (lane 4), PstI (lane 5), and XbaI (lane 6). Hybridizations were conducted at  $68^\circ\text{C}$  using the PCR DIG-labeled Rep gene probe. Sizes (in kbp) of the electrophoresis and hybridization signals are shown on the margins.

*thuringiensis* 及 *Mycoplasma hyorhina* insertion sequence IS1221 的轉位酶基因 (transposase gene) 所轉譯之胺基酸序列分別具有 51%、49%、49%、53%、48% 及 49% 的相似度，經分析結果顯示在此 ORF 轉譯之第 161 及第 218 個胺基酸具有 D (aspartic acid)，在第 254 個胺基酸具有 E (glutamic acid)，為 IS3 family 之 *orfB* 特有之 DDE motif。另外，在此 ORF 之兩側也發現其具有反向重複序列 (inverted repeat sequence)，序列為：TTTAAAAA (nt 1711-1718 與 nt 2735-2742)，因此推斷選殖株 H13 所具有之嵌入片段含有花生簇葉病菌質體基因體之插入序列 (insertion sequence)。

#### 花生簇葉病菌質體基因體中插入序列套組數之分析

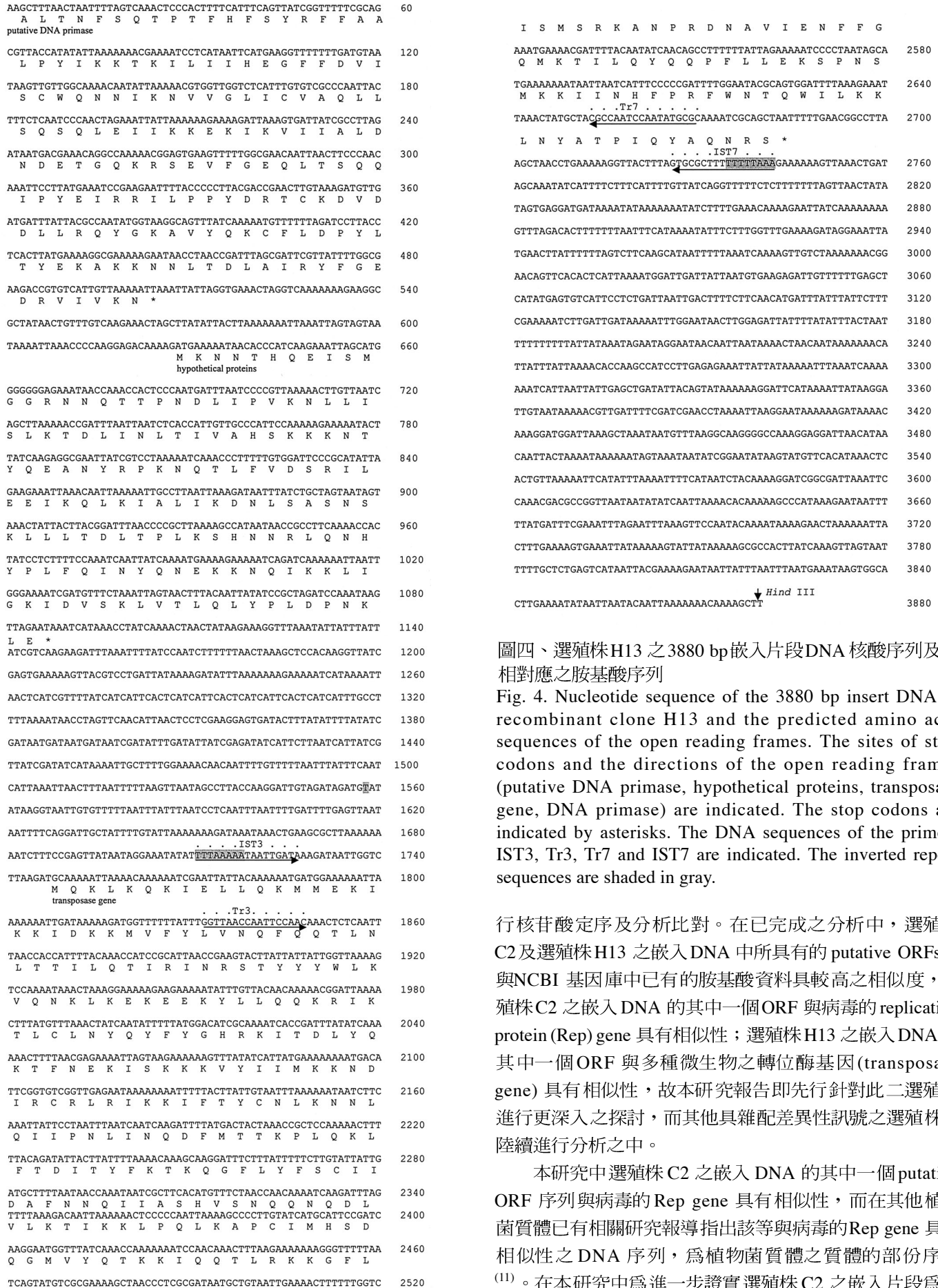
以六種內鑑識酵素酵解罹病日日春之全 DNA 後，不論以 IST3/IST7 或 Tr3/Tr7 為引子對所製成的核酸探針進行南方氏轉漬及雜配反應，得到之雜配訊號皆為單一訊號 (圖五A、圖五B)，因此可以得知花生簇葉病菌質體基因體

中之插入序列應為單一套組 (single copy) 或者是低套組 (low copy)，而探針對健康日日春之全 DNA 則沒有任何雜配訊號。

本研究將此一 ORF 及其上下游之反向重複序列 (inverted repeat sequence) 之序列 (nt 1711-2742) 於 NCBI 登錄為花生簇葉病菌質體之插入序列，並將其命名為 ISPNWB，而選殖株 H13 之嵌入片段 DNA 之序列 3880 bp 序列則取得登錄號碼為 GenBank AY270153。

## 討 論

本研究以逢機定序之策略對花生簇葉病菌質體基因體之全 DNA 進行研究，以期得到更多花生簇葉病菌質體之分子資訊，提供對此微生物作更深入的探討。本研究將構築在 lambda Zap<sup>®</sup> II 及 pBluescript II SK (-) phagemid 上之花生簇葉病菌質體基因庫，利用差異性雜配反應進行篩選，共選殖了 108 個選殖株，這些選殖株逐一在本研究室中進



圖四、選殖株 H13 之 3880 bp 嵌入片段 DNA 核酸序列及其相對應之胺基酸序列

Fig. 4. Nucleotide sequence of the 3880 bp insert DNA of recombinant clone H13 and the predicted amino acid sequences of the open reading frames. The sites of start codons and the directions of the open reading frames (putative DNA primase, hypothetical proteins, transposase gene, DNA primase) are indicated. The stop codons are indicated by asterisks. The DNA sequences of the primers IST3, Tr3, Tr7 and IST7 are indicated. The inverted repeat sequences are shaded in gray.

行核苷酸定序及分析比對。在已完成之分析中，選殖株 C2 及選殖株 H13 之嵌入 DNA 中所具有的 putative ORFs，與 NCBI 基因庫中已有的胺基酸資料具較高之相似度，選殖株 C2 之嵌入 DNA 的其中一個 ORF 與病毒的 replication protein (Rep) gene 具有相似性；選殖株 H13 之嵌入 DNA 的其中一個 ORF 與多種微生物之轉位酶基因 (transposase gene) 具有相似性，故本研究報告即先行針對此二選殖株進行更深入之探討，而其他具雜配差異性訊號之選殖株亦陸續進行分析之中。

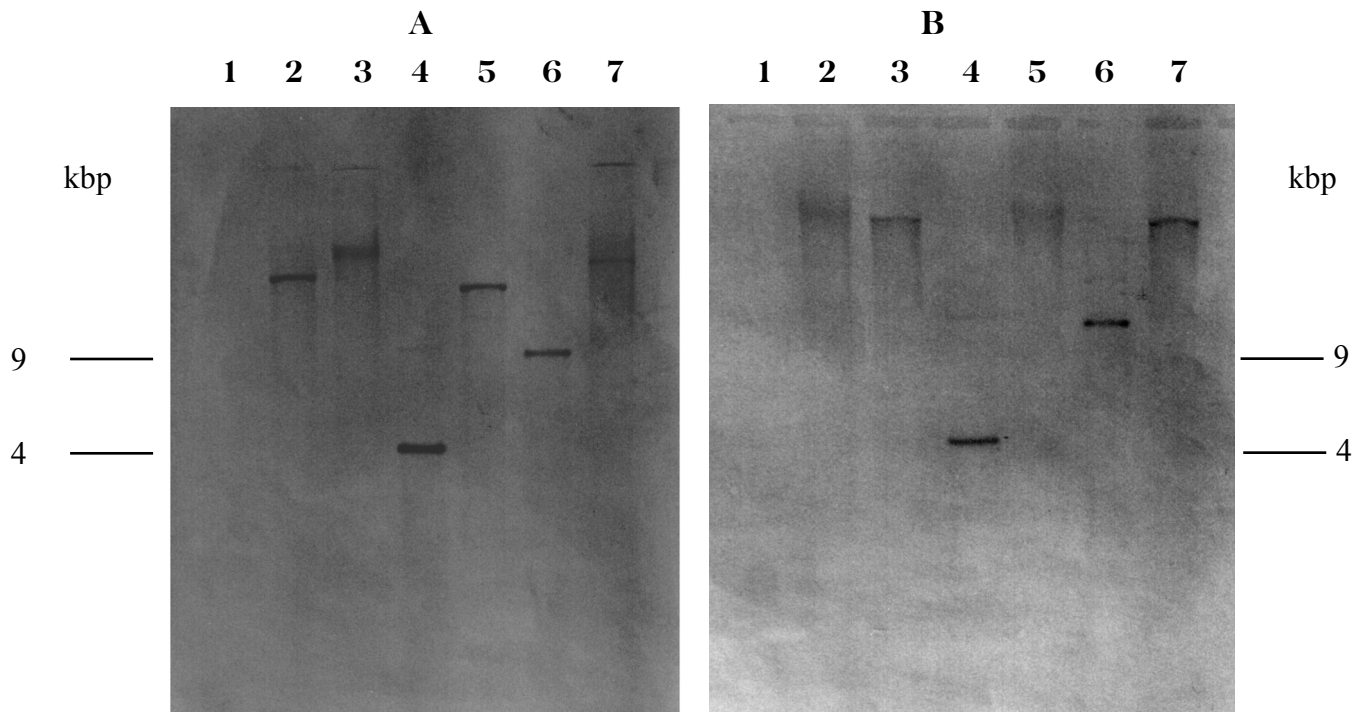
本研究中選殖株 C2 之嵌入 DNA 的其中一個 putative ORF 序列與病毒的 Rep gene 具有相似性，而在其他植物菌質體已有相關研究報導指出該等與病毒的 Rep gene 具有相似性之 DNA 序列，為植物菌質體之質體的部份序列 (11)。在本研究中為進一步證實選殖株 C2 之嵌入片段為一



含有 *ClaI* 切位之質體，故設計反向引子對進行反向聚合酵素連鎖反應 (inverse polymerase chain reaction, IPCR)，結果證實選殖株 C2 所嵌入的 DNA 片段於花生簇葉病菌質體中為一環狀 (circular) DNA，並將之命名為 pPNWB。此外，以選殖株 C2 之嵌入 DNA 中的 Rep 基因序列設計引子對所製備出之核酸探針進行南方氏轉漬及雜配反應實驗時，發現在以不同內鑑識酵素酵解的罹病日日春全 DNA 中都具有多條訊號出現，但其中以 *HindIII* 及 *ClaI* 酵解者與其他內鑑識酵素酵解者，出現之訊號大小差異性最大 (圖三B)，以 DNASTAR 軟體分析此質體之核苷酸序列，在 nt 2 及 nt 2956 分別具有 *ClaI* 及 *HindIII* 內鑑識酵素所辨識的切位，因此推測雜配反應訊號具差異性的原因可能為：以 *HindIII* 及 *ClaI* 酵解使得 plasmid 變為線狀 (linear)，較其他在 plasmid 上無辨識切位的酵素酵解者訊號出現在較小處；或者因 plasmid 為環狀所以會形成超螺旋狀 (supercoil) 以致於進行電泳後，在瓊脂凝膠上出現較小之條帶訊號，並可能具 dimer、trimer、tetramer 等不同構

形。此外也可能因在花生簇葉病菌質體中仍有其他質體之存在而致。前二項原因是一般 plasmid DNA 在進行電泳或南方氏轉漬及雜配反應時皆可能發生<sup>(16)</sup>，而欲證實最後一項有關是否具有其他種質體之推測則尚須更進一步的分析研究。

本研究在另一選殖株 H13 之嵌入 DNA 中發現其中一個 ORF 當以 DNASTAR 將核酸序列轉譯成胺基酸序列後，以 NCBI 資料庫分析比對，發現其與 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Bacillus licheniformis* 等微生物的轉位酶基因 (transposase gene) 具有相似性，並具有 DDE motif 之保守區域，而在此 ORF 兩側也發現其具有反向重複序列 (inverted repeat sequence)，因此推斷本研究中所篩選出之選殖株 H13 之嵌入 DNA 中含有花生簇葉病菌質體之插入序列，並將之命名為 ISPNWB。目前在其他細菌中所發現的插入序列，其套組數往往多達數十個以上<sup>(4)</sup>，而在感染動物的病原菌質體 (mycoplasmas) 插入序列的研究中，則顯示其具有較少之套組數，但仍具有 7~8 個套組<sup>(5)</sup>。但



圖五、對健康及受花生簇葉病菌質體感染之日日春全DNA，利用不同內鑑識酵素酵解後，以引子對IS3/ IS7 (A)及引子對Tr3/ Tr7 (B)進行PCR DIG核酸探針之製備，再以其進行南方氏轉漬雜配分析之結果

Fig. 5. Southern blot analysis of total DNA (5  $\mu$ g per lane) prepared from healthy periwinkle digested with restriction enzyme *EcoRI* (lane 1) and diseased periwinkle infected with PNWB-phytoplasma digested with restriction enzymes *XhoI* (lane 2), *XbaI* (lane 3), *HindIII* (lane 4), *EcoRI* (lane 5), *ClaI* (lane 6), and *BamHI* (lane 7). Hybridizations were conducted at 68 °C using the PCR DIG-labeled probe amplified with primers IS3/ IS7 (A) and primers Tr3/ Tr7 (B). Sizes (in kbp) of the electrophoresis hybridization signals are shown on the margins.

本實驗中不論以插入序列或以轉位酶之序列為核酸探針，其南方氏雜配反應實驗結果皆為單一訊號，顯示此花生簇葉病菌質體中所發現之插入序列只具有單一套組 (single copy) 或者是低套組 (low copy)。推測其原因可能為：此插入序列在花生簇葉病菌質體之基因體中保持低套組數，以免因其移動而造成基因體上意義重大的改變，諸如插入點不活化 (insertional mutagenesis)、轉錄活性改變、基因重組等現象，此些重大變化可能使花生簇葉病菌質體無法存活於寄主植物細胞中，而導致遺傳特性無法於族群中傳遞至後代。另外，在螺旋菌質體亦中發現其具有之轉位酶基因 (transposase gene)，與廣泛存於螺旋菌質體中之病毒 *SpV1* 之轉位酶基因具有相似性，而原作者推測其原因為螺旋菌質體之 genomic DNA 與 *SpV1* 之 DNA 曾發生基因重組<sup>(26)</sup>，在本研究中所選殖出的花生簇葉病菌質體之插入序列是否亦經由類似之重組而造成，使得插入序列在花生簇葉病菌質體中為單一套組 (single copy) 或者是低套組 (low copy)，則尚須更進一步的分析研究予以證實。

## 引用文獻

1. 陳紹寬 1997. 花生簇葉病菌質體 RNA 聚合酶 Sigma Factor 基因之選殖及分析. 國立台灣大學植物病蟲害學研究所碩士論文.
2. Agrios, G. N. 1997. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 457- 470 in: Plant Pathology. 4th ed. Academic Press, San Diego, CA.
3. Bertaccini, A., Davis, R. E., Lee, I.-M., Conti, M., Dally, E. L., and Douglas, S. M. 1990. Detection of chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism by dot hybridization and Southern blot analysis. Plant Dis. 74: 40- 43.
4. Berthier, Y., Thierry, D., Lemattre, M., and Guesdon, J. L. 1994. Isolation of an insertion sequence (IS1084) from *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* with potential use for strain identification and characterization. Appl. Environ. Microbiol. 60: 377- 384.
5. Bhugra, B., and Dybvig, K. 1993. Identification and characterization of IS1138, a transposable element from *Mycoplasma pulmonis* that belongs to the IS3 family. Mol. Microbiol. 7: 577- 584.
6. Davis, M. J., Tsai, J. H., Cox, R. L., McDaniel, L. L., and Harrison, N. A. 1988. Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. Mol. Plant-Microbe Interact. 1: 295- 302.
7. Fayet, O., Ramond, P., Polard, P., Prere, M. F., and Chandler, M. 1990. Functional similarities between retroviruses and the IS3 family of bacterial insertion sequences. Mol. Microbiol. 4: 1771- 1777.
8. Frey, J., X. Cheng, P. Kuhnert, and J. Nicolet. 1995. Identification and characterization of IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and presence in related mycoplasmas. Gene 160: 95- 100.
9. Harrison, N. A., Tsai, J. H., Bourne, C. M., and Richardson, P. A. 1991. Molecular cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA of mycoplasma like organism associated with witches' broom disease of pigeon pea in Florida. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 300- 307.
10. Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and application of cloned DNA probe for a mycoplasma-like organism associate with sweet potato withes'-broom. Phytopathology 84: 468- 473.
11. Kuboyama, T., Huang, C. C., Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., and Namba, S. 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 1031- 1037.
12. Lim, P. O., Sears, B. B., and Klomparens, K. L. 1992. Membrane properties of a plant- pathogenic mycoplasma-like organism. J. Bacteriol. 174: 682- 686.
13. Mahillon, J., and Chandler, M. 1998. Insertion sequences. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 725- 774.
14. Maniloff, J. 1988. Mycoplasma viruses. CRC Crit. Rev. Microbiol. 15: 339- 389.
15. Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., Kuboyama, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., and Namba, S. 2001. *In planta* expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. Microbiology 147: 507- 843.
16. Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H- Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Masashi Ugaki and Namba, S. 2002. Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasmas: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? Microbiology 148: 1389- 1396.
17. Ochman, H., Gerber, A. S., and Hartl, D. L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. Genetics 120: 621- 623.
18. Razin, S. 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). Microbiol. Rev. 49: 419- 455.
19. Rekab, D., Carraro, L., Schneider, B., Seemuller, E.,

- Chen, J., Chang, C. J., Locci, R., and Firrao, G. 1999. Geminivirus- related extrachromosomal DNAs of the X-clade phytoplasmas share high sequence similarity. *Microbiology* 145: 1453- 1459.
20. Renaudin, J., and Bove, J. M. 1994. *SpV1* and *SpV4*, Spiroplasma viruses with circular, single- stranded DNA genomes, and their contribution to the molecular biology of Spiroplasma. *Adv. Virus Res.* 44: 429- 463.
21. Sears, S. E., Lim, P. O., Holland, N., Kirkpatrick, B. C., and Klomparens, K. L. 1989. Isolation and characterization of DNA from a mycoplasma-like organism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 175- 180.
22. Sinha, R. C. 1979. Lipid composition of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows- affected plants. *Phytopathol. Z.* 96: 132- 139.
23. Sinha, R. C., and Madhosingh, C. 1980. Proteins of mycoplasma- like organisms purified from clover phyllody and aster yellows- affected plants. *Phytopathol. Z.* 99: 294- 300.
24. Vilei, E. M., Nicolet, J., and Frey, J. 1999. IS1634, a novel insertion element creating long, variable- length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small- colony type. *J. Bacteriol.* 181: 1319- 1323.
25. Yang, I. L. 1988. Witches' broom diseases of sweet potato and peanut in Taiwan. Ph. D. Thesis. Hokkaido Univ., Japan.
26. Ye, F., Melcher, U., Rascoe, J. E., and Fletcher, J. 1996. Extensive chromosome aberrations in *Spiroplasma citri* strain BR3. *Biochem. Genet.* 34: 269- 286.

## ABSTRACT

Wei, H. C. <sup>1</sup>, and Lin, C. P.<sup>1,2</sup> 2004. Cloning and sequencing of extrachromosomal DNA and insertion sequence of phytoplasma associated with peanut witches' broom using random sequencing. *Plant Pathol. Bull.* 13: 143-154. (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan; <sup>2</sup>Corresponding author), E- mail: cplin@ccms.ntu.edu.tw, Fax No: 886- 2- 23661890

A random ("shotgun") sequencing strategy was conducted to investigate the genome of the phytoplasma associated with peanut witches' broom (PNWB) in this study. Total DNA of periwinkle infected with PNWB phytoplasma and that of healthy periwinkle were used as probes for differential screening of lambda Zap<sup>®</sup> II genomic library and pBluescriptII SK (-) recombinant plasmids of PNWB-Phytoplasma. Eight out of 108 random clones thus selected were completely sequenced and analyzed. The insert DNA of recombinant plasmid C2 consists of 4226 nucleotides and encompasses an ORF homologous to the Rep genes found in the extrachromosomal DNA of other organisms. A pair of oligo-nucleotide primers C2R1/ C2F1 for inverse polymerase chain reaction (IPCR) were designed according to the nucleic acid sequences of the recombinant plasmid C2, and a 265 bp fragment was amplified only with the total DNA prepared from diseased periwinkles infected with PNWB phytoplasma as the template for IPCR reaction. The result indicates that the 4.2 kbp insert DNA of the recombinant plasmid C2 is a circular form DNA (plasmid). The results of Southern hybridization analysis using Rep gene fragment of clone C2 as a probe suggested that multiple copies of Rep gene may exist in PNWB-Phytoplasma. Recombinant clone H13 encompasses a complete ORF of 3880 nucleotides homologous to the transposase gene of other organisms. An eight- nucleotide inverted repeats between nucleotides 1711- 1718 and 2735- 2742 near the ORF was found and a conserved DDE motif in this ORF was identified. According to the results of the Southern hybridization analysis by using the probe for transposase gene or partial fragment of the insertion sequence, it suggests that only one copy of transposase and insertion sequence may exist in PNWB-phytoplasma.

Key words : extrachromosomal DNA, insertion sequence, peanut witches' broom, phytoplasma