

萵苣萎凋病菌*fmk1*基因突變菌株之篩選¹

洪爭坊²

摘 要

利用紫外燈照射法誘變萵苣萎凋病菌*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* LFO 32-14菌株，並以培養皿接種法測試誘變菌株在接種後第六天對萵苣幼苗的纏據率，初步獲得*F. oxysporum* f.sp. *lactucae* UV02-0090、UV02-0110及 UV02-0130三菌株纏據萵苣幼苗根部的百分率明顯下降，惟它們的形態與野生型菌株並無顯著差異。利用Di Pietro (2001)報導的*F. oxysporum*致病性相關*fmk1*基因的oliFmk1與oliFmk2引子對，針對萵苣萎凋病菌野生型菌株與誘變菌株進行聚合酶連鎖反應，結果發現野生型菌株與突變菌株均可被增幅出大小約1.2 kb的基因片段。其中，UV02-0090菌株的*fmk1*部份基因片段序列與其他菌株的序列差異較大，而經由轉譯後發現其Fmk1的胺基酸序列在第167至第237個胺基酸區間具有較大的變異。

關鍵字：萵苣，萎凋病，病原性基因。

前 言

許多尖鏟孢菌(*Fusarium oxysporum*)的分化種可引起植物萎凋、死亡等病徵，為重要的土壤傳播性植物病原真菌。西元1998年，萵苣萎凋病首次於臺灣發現，病原菌侵染萵苣後引起下位葉黃化、植株矮化、半側萎凋等病徵，已成為夏季萵苣栽培產業的限制因子之一^(5,13)。由於萵苣萎凋病菌且有寄主專一性，是研究病原菌與寄主植物間交互作用的好材料^(2,3,5,6,7,10)。往昔探討*F. oxysporum*侵入感染寄主植物過程的研究，多著重於探討病原性相關基因的表現與寄主反應之間的關係。其中與*F. oxysporum*病原性相關的基因，如*fmk1*、*fow1*、*fga1*、*pacC*^(2,3,6,7)等，大多被證實是參與調控病原菌侵染植物之訊息傳遞有關。其中，*fmk1*基因所調控的MAP kinase 是否與*F. oxysporum* f.sp. *lactucae*侵入萵苣根部的過程有密切關係，確實值得進一步探討。本研究以萵苣萎凋病菌*F. oxysporum* f.sp. *lactucae* LFO 32-14野生型菌株作為研究對象，嘗試利用紫外光誘變法篩選該病原菌對於萵苣根部纏據能力降低或致病力喪失的突變菌株，同時運用聚合酶連鎖反應增幅其*fmk1*基因片段並加以定序，以確認該基因突變後是否會導致萵苣萎凋病菌之病原性下降。

¹臺中區農業改良場研究彙報第 0631 號。

²臺中區農業改良場助理研究員。

材料與方法

一、供試萵苣植株與萵苣萎凋病菌株

本試驗所使用的萵苣品種為black seeded simpson leaf lettuce (由艾特克公司購得)，種子先以1%次氯酸鈉(Santoku chemical co. Ltd., Osaka, Japan)表面消毒40秒，經無菌水漂洗三次後，用濾紙吸乾多餘水分，移置直徑9公分的塑膠培養皿中，於室溫下催芽一天後，放入4℃定溫箱中兩天後備用。供試的萵苣萎凋病菌*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* LFO 32-14菌株係由中興大學植病系黃振文教授提供。病原菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(potato dextrose agar; PDA)斜面上於室溫中培養7~21天後，取其分生孢子以無菌水製成孢子懸浮液，依試驗設計所需調整濃度後，作為本試驗之接種源。每四週以單孢法進行野生型菌株的更新培養，以維持其野生型。

二、萵苣萎凋病菌之誘變

F. oxysporum f.sp. *lactucae* LFO 32-14菌株在PDA斜面上培養7-14天後，取分生孢子以無菌水製成濃度為 10^4 spores/ml的分生孢子懸浮液。取上述分生孢子懸浮液0.1 ml，塗抹在水瓊脂(water agar; WA)平板上，以紫外光(Sankyo Denki GL15, Japan)分別照射0、0.5、1、2及5分鐘後，置於室溫下培養24小時，並記錄照射紫外光時間長短對分生孢子發芽率的影響。48小時後，隨機挑取30個照射紫外光2分鐘後長出的菌落，於室溫下培養在PDA斜面上兩週後，測試各菌株對萵苣幼苗根部的纏據能力。

三、萵苣萎凋病菌突變菌株之篩選

將十粒催芽後的萵苣種子置於鋪有一層濾紙的塑膠培養皿(直徑9 cm)內，分別加入野生型菌株與誘變後菌株的孢子懸浮液(10^5 spores/ml)各5 ml，使每粒種子均勻浸潤過孢子懸浮液後，將滅菌過的泥炭土(Lung Sheng Horticulture Inc., Taiwan; 30-40 ml)覆蓋於種子上，並加入10 ml的無菌水保持濕潤。六天後將萵苣幼苗拔起，以自來水清洗附著於根部的泥炭土後，將萵苣根部以1%次氯酸鈉表面消毒40秒，並以無菌水漂洗三次後，吸乾多餘水分，隨即切下根部組織，移於Nash-PCNB (pentachloronitrobenzene medium)選擇性培養基⁽¹²⁾平板上，3天後觀察各菌株於PCNB培養基平板上長出的百分率，每一處理有四重複。

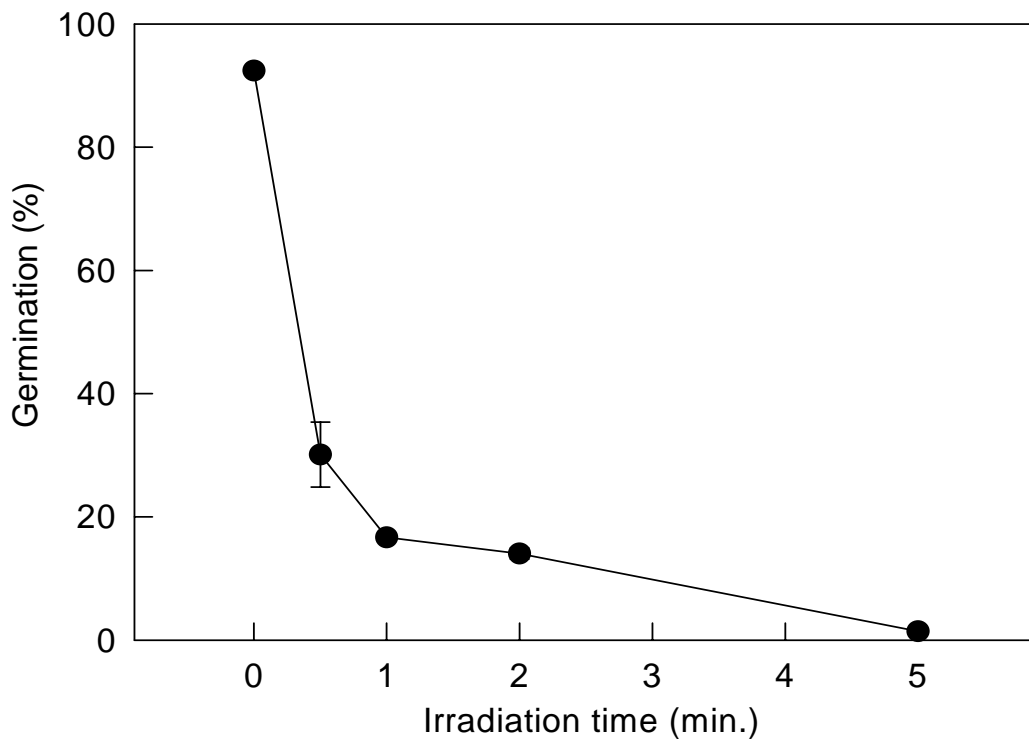
四、萵苣萎凋病菌野生型與變異型菌株之*fmk*基因片段增幅與定序

取紫外光誘變後的*F. oxysporum* f.sp. *lactucae* UV02-0045、UV02-0090、UV02-0103、UV02-0108、UV02-0110-1、UV02-0110-2、UV02-0110、UV02-0115、UV02-0116、UV02-0117、UV02-0119及UV02-0130等菌株，更新培養於PDA斜面上一週後，刮取菌體以Genemark DP022-150試劑組(Genemark plant genomic DNA purification kit, tainan, Taiwan)抽取總體DNA，並以Di Pietro氏等(2001)發表的oliFmk1與oliFmk2引子及PCR條件，針對LFO 32-14菌株與篩選出的變異型菌株進行PCR，以1.4%膠體電泳進行分析後，將電泳分析後的DNA片段回收，委請明欣生技公司解序。

結 果

一、利用紫外燈照射誘變高苣萎凋病菌

利用紫外燈照射處理不同時間後，高苣萎凋病菌分生孢子發芽率隨照射UV時間增加而降低(圖一)。不照射紫外光的野生型菌株，在24小時後分生孢子的發芽率可達92%以上；照射紫外光30秒後，孢子發芽率即降至30%。當持續照射紫外光5分鐘以上時，分生孢子的發芽率趨近於零。



圖一、紫外光照射處理不同時間後對 *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* LFO 32-14 菌株分生孢子發芽率之影響。

Fig. 1. Effect of UV irradiation time on conidial germination of *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* isolate LFO 32-14 on water agar for 24 hours at room temperature.

二、對高苣幼苗根部感染力降低的突變菌株篩選

將誘變後的菌株培養在PDA斜面上14~21天後，取各菌株的分生孢子以無菌水製成懸浮液後接種於高苣幼苗上，六天後利用PCNB選擇性培養基偵測高苣幼苗受感染的情形，結果多數誘變後的菌株仍保有感染高苣幼苗根部的能力。而誘變後的菌株中，僅UV02-0090、UV02-0110及UV02-0130菌株感染高苣幼苗根部的百分率顯著低於野生型的LFO 32-14菌株(表一)。

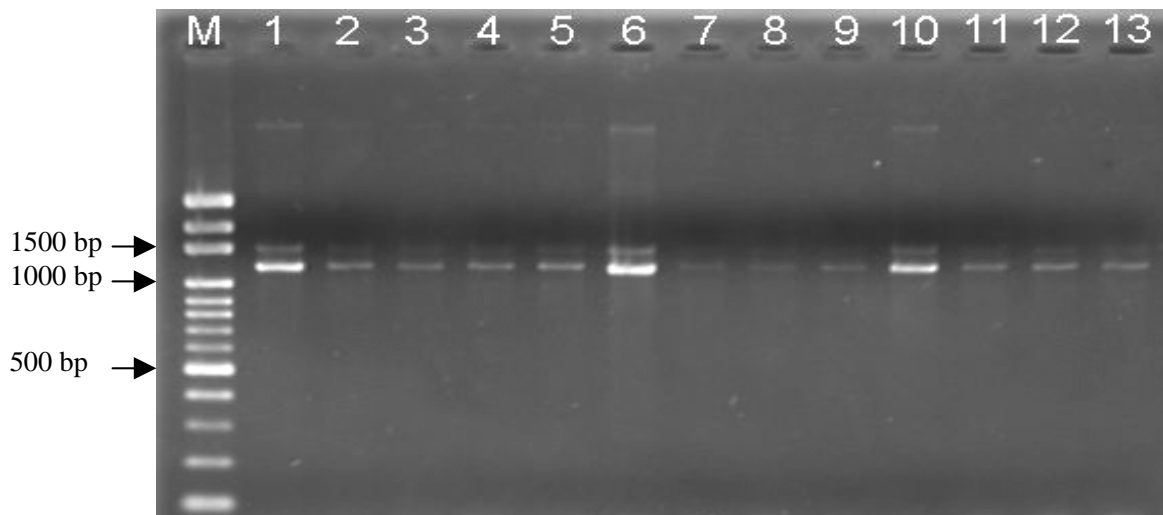
表一、利用紫外光誘變 *F. oxysporum* f.sp. *lactucaae* LFO 32-14 獲得對萵苣幼苗根部感染率降低之變異菌株

Table.1. Mutants with lower infection ability to black seeded simpson leaf lettuce were obtained from UV irradiated *F. oxysporum* f.sp. *lactucaae* isolate LFO 32-14.

Mutant isolates	Infection (%)
UV02-0090	66.7
UV02-0110	66.7
UV02-0130	75.0
LFO 32-14	81.1
CK	0

三、萵苣萎凋病菌野生型與誘變菌株之 *fmk1* 基因片段增幅與定序

以 oliFmk1 與 oliFmk2 引子針對 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucaae* LFO 32-14 與 *F. oxysporum* f.sp. *lactucaae* UV02-0045、UV02-0090、UV02-0103、UV02-0108、UV02-0110-1、UV02-0110-2、UV02-0110、UV02-0115、UV02-0116、UV02-0117、UV02-0119 及 UV02-0130 等菌株進行聚合酶連鎖反應，結果各菌株均可增幅出大小約 1.2 kb 的 *fmk* 基因片段(圖二)。其中，*F. oxysporum* f.sp. *lactucaae* LFO 32-14、UV02-0090、UV02-0110 及 UV02-0130 等菌株的 *fmk1* 基因部分序列與 Di Pietro 氏等(2001)所發表的 *fmk1* 基因序列比較如圖三。



圖二、*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucaae* LFO 32-14 菌株與誘變菌株以 oliFmk 引子對進行聚合酶連鎖反應均可增幅出 *fmk1* 基因片段。1. UV-02-0045 ; 2. UV-02-0090 ; 3. UV-02-0103 ; 4. UV-02-0108 ; 5. UV-02-0110-1 ; 6. UV-02-0110-2 ; 7. UV-02-0110 ; 8. UV-02-0115 ; 9. UV-02-0116 ; 10. UV-02-0117 ; 11. UV-02-0119 ; 12. UV-02-0130 ; 13. LFO 32-14 。

Fig. 2. Polymerase chain reaction results showed *fmk1* gene fragments were amplified from *F. oxysporum* f.sp. *lactucaae* isolate LFO 32-14 and its UV light-induced mutants. 1. UV-02-0045 ; 2. UV-02-0090 ; 3. UV-02-0103 ; 4. UV-02-0108 ; 5. UV-02-0110-1 ; 6. UV-02-0110-2 ; 7. UV-02-0110 ; 8. UV-02-0115 ; 9. UV-02-0116 ; 10. UV-02-0117 ; 11. UV-02-0119 ; 12. UV-02-0130 ; 13. LFO 32-14.

fmk1	-----GTTGTCCTTTGTGCTTGTCAAAGTCAAA-GAACTCCTCAGGGATCGGGGGCGC	51
LFO 32-14	TTAAAAAGTTGTCTTTGTGCTTGTCAAAGT-CAAA-GAACTCCTCAGGGATCGGGGGCGC	58
UV02-0090	TTGCTCAGGTTGTCTTTGTGCTTGTCAAAGTCAAA-GAACTCCTCAGGGATCGGGGGCGC	59
UV02-0110	-----GGTCAAAAAGTACAAA-GAACTCCTCAGGGATCGGGGGCGC	40
UV02-0130	-----TTGTACAAAAGTGCAAATGAACTCCTCAGGGATCGGGGGCGC	43
fmk1	TGTTGGCTCATCCTCGGGATCGTGGTAAGGCTCAAGGTATGGGTGCTTCAGAGCTTCCTC	111
LFO 32-14	TGTTGGCTCATCCTCGGGATCGTGGTAAGGCTCAAGGTATGGGTGCTTCAGAGCTTCCTC	118
UV02-0090	TGTTGGCTCATCCTCGGGATCGTGGTAAGGCTCAAGGTATGGGTGCTTCAGAGCTTCCTC	119
UV02-0110	TGTTGGCTCATCCTCGGGATCGTGGTAAGGCTCAAGGTATGGGTGCTTCAGAGCTTCCTC	100
UV02-0130	TGTTGGCTCATCCTCGGGATCGTGGTAAGGCTCAAGGTATGGGTGCTTCAGAGCTTCCTC	103
fmk1	CACGGTAATGCGCTTAACAGGGTTGAATGCGAGGAGCTTCTCGAGCAGGTGAGGGCCAG	171
LFO 32-14	CACGGTAATGCGCTTAACAGGGTTGAATGCGAGGAGCTTCTCGAGCAGGTGAGGGCCAG	178
UV02-0090	CACGGTAATGCGCTTAACAGGGTTGAATGCGAGGAGCTTCTCGAGCAGGTGAGGGCCAG	179
UV02-0110	CACGGTAATGCGCTTAACAGGGTTGAATGCGAGGAGCTTCTCGAGCAGGTGAGGGCCAG	160
UV02-0130	CACGGTAATGCGCTTAACAGGGTTGAATGCGAGGAGCTTCTCGAGCAGGTGAGGGCCAG	163
fmk1	ATCCGAGGTCTTGGGGAATAGAGTTCCGAAGGGAACCTTCTTCTTGAAGGGGAGCGATCG	231
LFO 32-14	ATCCGAGGTCTTGGGGAATAGAGTTCCGAAGGGAACCTTCTTCTTGAAGGGGAGCGATCG	238
UV02-0090	ATCCGAGGTCTTGGGGAATAGAGTTCCGAAGGGAACCTTCTTCTTGAAGGGGAGCGATCG	239
UV02-0110	ATCCGAGGTCTTGGGGAATAGAGTTCCGAAGGGAACCTTCTTCTTGAAGGGGAGCGATCG	220
UV02-0130	ATCCGAGGTCTTGGGGAATAGAGTTCCGAAGGGAACCTTCTTCTTGAAGGGGAGCGATCG	223
fmk1	AATGTAATCTCTAGCGCGGCGGACTTGATTCCAGTAAATCCTCCATAGTGGGCGTGCC	291
LFO 32-14	AATGTAATCTCTAGCGCGGCGGACTTGATTCCATAGTAAATCCTCCATAGTGGGCGTGCC	298
UV02-0090	AATGTAATCTCTAGCGCGGCGGACTTGATTCCATAGTAAATCCTCCATAGTGGGCGTGCC	299
UV02-0110	AATGTAATCTCTAGCGCGGCGGACTTGATTCCATAGTAAATCCTCCATAGTGGGCGTGCC	280
UV02-0130	AATGTAATCTCTAGCGCGGCGGACTTGATTCCATAGTAAATCCTCCATAGTGGGCGTGCC	283
fmk1	CAGCACATCCAGAATGAGTGTCAACTGGTGGTGGTCTAGCGGTCAAATGGTCAGCAAAGA	351
LFO 32-14	CAGCACATCCAGAATGAGTGTCAACTGGTGGTGGTCTAGCGGTCAAATGGTCAGCAAAGA	358
UV02-0090	CAGCACATCCAGAATGAGTGTCAACTGGTGGTGGTCTAGCGGTCAAATGGTCAGCAAAGA	359
UV02-0110	CAGCACATCCAGAATGAGTGTCAACTGGTGGTGGTCTAGCGGTCAAATGGTCAGCAAAGA	340
UV02-0130	CAGCACATCCAGAATGAGTGTCAACTGGTGGTGGTCTAGCGGTCAAATGGTCAGCAAAGA	343
fmk1	GCTCTATCGTCTCACGCATTTCAACAATCACTTACAGTCCTTGCCAGGG-AAAAGAGGCT	410
LFO 32-14	GCTCTATCGTCTCACGCATTTCAACAATCACTTACAGTCCTTGCCAGGG-AAAAGAGGCT	417
UV02-0090	GCTCTATCGTCTCACGCATTTCAACAATCACTTACAGTCCTTGCCAGGG-AAAAGAGGCT	419
UV02-0110	GCTCTATCGTCTCACGCATTTCAACAATCACTTACAGTCCTTGCCAGGG-AAAAGAGGCT	399
UV02-0130	GCTCTATCGTCTCACGCATTTCAACAATCACTTACAGTCCTTGCCAGGG-AAAAGAGGCT	402
fmk1	TGCCGCTG-AGCATCT-CGGCGAGAAT-GCAGCCAACC-GACCACAC-ATCAATAGCCTT	465
LFO 32-14	TGCCGCTG-AGCATCT-CGGCGAGAAT-GCAGCCAACC-GACCACAC-ATCAATAGCCTT	472
UV02-0090	TGCCGCTTATCATCTTCGGCGAGAATTCAGCCAACCAGCAGCACTATTATTAGCCTT	479
UV02-0110	TGCCGCTG-AGCATCT-CGGCGAGAAT-GCAGCCAACC-GACCACAC-ATCAATAGCCTT	454
UV02-0130	TGCCGCTG-AGCATCT-CGGCGAGAAT-GCAGCCAACC-GACCACAC-ATCAATAGCCTT	457
fmk1	GG-TGTACTC-CTTGAAAAG-TCAACATGATC-TCGGGCGCAC-GGTACCA--TCGAG-TC	517
LFO 32-14	GG-TGTACTC-TTTGAAAAG-TCAACATGATC-TCGGGCGCAC-GGTACCA--TCGAG-TC	524
UV02-0090	GGGTGTACTCCTTTGAAAAGATCAACATGATCCTCGGGCGGACCGGTAGCAATCCGAGGTC	539
UV02-0110	GG-TGTACTC-TTTGAAAAG-TCAACATGATC-TCGGGCGCAC-GGTACCA--TCGAG-TC	506
UV02-0130	GG-TGTACTC-TTTGAAAAG-TCAACATGATC-TCGGGCGCAC-GGTACCA--TCGAG-TC	509
fmk1	GCGAC-GTATT-CAGTCATGAAACC--GGAGTTGTCTCCTGGGAAGCAGCGGATCGCGC	573
LFO 32-14	GCGAC-GTATT-CAGTCATGAAACC--GGAGTTGTCTCCTGGGAAGCAGCGGATCGCGC	580
UV02-0090	GCGACCGTATTTCTGTCTTGA AAAACCGGGATTTGTCTCTCTTGTGGAGGAAACCG---	596
UV02-0110	GCGAC-GTATT-CAGTCATGAAACC--GGAGTTGTCTCCTGGGAAGCAGCGGATCGCGC	562
UV02-0130	GCGAC-GTATT-CAGTCATGAAACC--GGAGTTGTCTCCTGGGAAGCAGCGGATCGCGC	565

圖三、野生型菌株與誘變菌株 *fmk1* 基因部分序列之比較分析。

Fig. 3. Sequences alignment of partial *fmk1* gene of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* isolate LFO 32-14 and its ultra-violet light induced mutant isolates.

四、高苜蓿凋病菌野生型與誘變菌株Fmk1胺基酸序列之比對

利用Vector NTI序列分析軟體將UV02-0090菌株的*fmk1*基因序列轉譯後得到178個胺基酸序列，利用此一片段與NCBI資料庫中Fmk1胺基酸序列進行比對，結果顯示筆者所獲得的序列位於Fmk1C端167至341個胺基酸區域，其中兩者在第167個至第237個胺基酸間的序列具有相當明顯的差異(圖四)。

		Section 1									
	(1)	1	10	20	30	40	50				
Fmk1	(1)	MSRSNPPNAAGSRKISFNVSEQYDIQDVVGEAYGVVCSAIHKPSGQKVA									
UV02-0090-1	(1)	-----									
Consensus	(1)	-----									
		Section 2									
	(51)	51	60	70	80	90	100				
Fmk1	(51)	IKKITPFDHSMFCLRTLREMKLLRYFNHENIISILDIQKPRNYESFNEVY									
UV02-0090-1	(1)	-----									
Consensus	(51)	-----									
		Section 3									
	(101)	101	110	120	130	140	150				
Fmk1	(101)	LIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHCQYFIYQTLRALKAMHSANVLHRDLKP									
UV02-0090-1	(1)	-----									
Consensus	(101)	-----									
		Section 4									
	(151)	151	160	170	180	190	200				
Fmk1	(151)	SNLLLNANCDLKVCDFGLARSAASQEDNSGFMTEYVATRWRAPPEIMLTF									
UV02-0090-1	(1)	-----RFPSTREDKSRFSRQKYGRDLGLLPVRRPIMLIF									
Consensus	(151)	S S P IML F									
		Section 5									
	(201)	201	210	220	230	240	250				
Fmk1	(201)	KEYTKAIDVWSVGCILAEMLSGKPLFPFGKDYHHQLTLILDVLGTPTMEDY									
UV02-0090-1	(35)	QRS T PKANNSV V GLAAAILAEDDK --- AASLFS P DKDILDVLGTPTMEDY									
Consensus	(201)	T VG K A ILDVLGTPTMEDY									
		Section 6									
	(251)	251	260	270	280	290	300				
Fmk1	(251)	YGIKSRRAREYIRSLPFPKKKVPFRTLFPKTSDLALDLDLLEKLLAFNPVKRI									
UV02-0090-1	(81)	YGIKSRRAREYIRSLPFPKKKVPFRTLFPKTSDLALDLDLLEKLLAFNPVKRI									
Consensus	(251)	YGIKSRRAREYIRSLPFPKKKVPFRTLFPKTSDLALDLDLLEKLLAFNPVKRI									
		Section 7									
	(301)	301	310	320	330	340	350				
Fmk1	(301)	TVEEALKHPYLEPYHDPEDPTAPPPIPEE F DFDKHKDNL S KEQLKQLIY									
UV02-0090-1	(131)	TVEEALKHPYLEPYHDPEDPTAPPPIPEE F DFDKHKDNL S -----									
Consensus	(301)	TVEEALKHPYLEPYHDPEDPTAPPPIPEE F DFDKHKDNL S									
		Section 8									
	(351)	351	356								
Fmk1	(351)	QEIMR-									
UV02-0090-1	(172)	-----									
Consensus	(351)	-----									

圖四、*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* 與 *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi* 之 Fmk1 胺基酸序列比對。

Fig. 4. Alignment of Fmk1 amino acid sequences obtained from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* isolate UV02-0090 and *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

討 論

筆者以紫外光誘變的方法，初步獲得對高苣幼苗根部纏據率降低的高苣萎凋病菌突變菌株，利用Di Pietro氏等(2001)已發表與致病性相關基因的oliFmk1與oliFmk2引子對進行聚合酶連鎖反應後，發現*F. oxysporum* f.sp. *lactucae*野生型菌株與突變菌株都可被增幅出大小約1.2 kb的*fmk1*基因片段，此外，亦可增幅出1.5 kb大小的基因片段，惟在Di Pietro氏等的研究中並未提及1.5 kb基因片段有關的資訊，值得吾輩進一步的探討。進一步，筆者將高苣萎凋病菌野生型菌株及初步獲得的三個突變菌株的*fmk1*部分基因片段解序後，與NCBI資料庫登錄的*fmk1*基因片段進行比對，結果發現UV02-0090菌株的*fmk1*部分基因片段與其他菌株差異較大。而利用Vector NTI序列分析軟體推斷UV02-0090菌株的Fmk1胺基酸序列，並與Di Pietro氏等所發表的Fmk1胺基酸序列比對後，發現UV02-0090菌株的Fmk1序列在第167個至第237個胺基酸間的序列與Di Pietro氏等所發表的序列有相當明顯的差異，而且在第208個位置上的天門冬胺酸也突變為天門冬醯胺。由於MAP kinase為蛋白激酶的一種，依據Pfam蛋白質家族資料庫得知該酵素之活性位置上的天門冬胺酸具有相當高度的保留性，且該胺基酸對此種酵素活性影響極大。Knighton氏等(1991)曾指出超過一百種激酶的胺基酸序列中的第40個至第280個胺基酸的區間具有高度保留性，大部份在此區間的保留性胺基酸常與具催化或核苷酸連結活性的位置相串聯⁽⁸⁾，因此推論UV02-0090菌株對高苣根部纏據百分率降低可能與該蛋白質的活性受到影響有關。然而，是否僅有該胺基酸區間突變即可導致高苣萎凋病菌對高苣根部纏據力降低，或是仍有其他胺基酸序列同時受到突變而造成這樣的結果，則需進一步研究證實。本研究顯示利用紫外光照射法誘變病原菌，確能獲得*fmk1*基因突變之菌株，惟其他與致病性相關基因是否因此同時突變而導致病原菌致病能力降低，仍需深入的探討。

參考文獻

1. Bisgrove, S. R., M. T. Simonich, N. M. Smith, A. Sattler and R. W. Innes. 1994. A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell* 6:927-933.
2. Caracuel, Z., M. I. Roncero, E. A. Espeso, C. I. Gonzalez-Verdejo, F. I. Garcia-Mercia and A. Di Pietro. 2003. The pH signaling transduction factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 48(3):765-779.
3. Di Pietro, A., F. I. García-Maceira, E. Męglecz, and M. I. G. Roncero. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39(5):1140-1152.
4. Gabriel, D. W. 1999. Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:205-214.

5. Huang, J. H. and C. T. Lo. 1998. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 7:150-153.
6. Inoue, I., F. Namiki and T. Tsuge. 2002. Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. *Plant Cell* 14(8):1869-1883.
7. Jain, S., K. Akiyama, K. Mae, T. Ohguchi and R. Takata. 2002. Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* 41(6):407-413.
8. Knighton, D. R., J. H. Zheng, E. L. F. Ten, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski. 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 253(5018):407-14.
9. Matuo, T. and S. Motohashi. 1967. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n. f. causing root rot of lettuce. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 8: 13-15.
10. Mes, J. J., E. A. Weststeijn, F. Herlaar, J. J. M. Lambalk, J. Wijbrandi, M. A. Haring and B. J. C. Cornelissen. 1998. Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology* 89:156-160.
11. Mes, J. J., R. Wit, C. S. Testerink, F. de Groot, M. A. Haring and B. J. C. Cornelissen. 1999. Loss of avirulence and reduced pathogenicity of a gamma-irradiated mutant of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 89:1131-1137.
12. Nash, S. M. and W. C. Snyder. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology* 52:567-572.
13. Peng, Y. H. and J. W. Huang. 1998. Pathogenicity tests of lettuce *Fusarium* wilt fungus. *Plant Pathol. Bull.* 7:121-127.
14. Sweigard, J. A., A. M. Carrol, S. Kang, L. Farrall, F. G. Chumley and B. Valent. 1995. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell* 7:1221-1233.

Screening for *fmk1* Gene Mutants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*¹

Cheng-Fang Hong²

ABSTRACT

Lettuce Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* was a serious disease in summer production of lettuce. In order to characterize the pathogenic genes of the pathogen, ultra-violet light was applied for inducing mutation of the pathogen. Di Pietro et al.(2001) suggested that the *fmk1* gene was related with the pathogenesis of *Fusarium oxysporum*. Three ultra-violet irradiation induced mutant isolates, UV02-0090, UV02-0110, and UV02-0130, with lower infection rate were obtained by inoculation test. Two primers, oliFmk1 and oliFmk2, were used to amplify *fmk1* gene fragment from wild type and the three mutant isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. The results showed that a 1.2 kb gene fragment was amplified from both wild-type and mutant isolates. Sequences alignment of partial *fmk1* gene showed many differences between UV02-0090 and the other isolates, and the amino acid sequences alignment showed a highly mutated region from the 167 to the 237 residues of UV02-0090 Fmk1 sequence.

Key words: lettuce, Fusarium wilt, pathogenic gene.

¹Contribution No. 0631 from Taichung DARES.

²Assistant Researcher of Taichung DARES.