

國立臺灣大學生物資源暨農學院植物病理與微生物學系

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

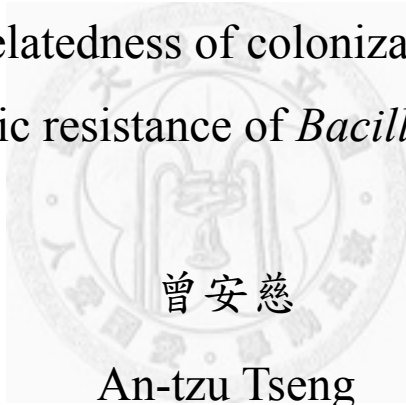
College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

臘狀芽孢桿菌於玉米根圈群聚與誘導抗病能力相關性探討

Study of the relatedness of colonization and induced
systemic resistance of *Bacillus cereus*



曾安慈

An-tzu Tseng

指導教授：陳昭瑩 博士

Advisor: Chao-Ying Chen, Ph.D.

中華民國 99 年 8 月

August, 2010

誌 謝

終於寫到這一頁，終於要畢業了，那種如釋重負的感覺，難以言喻！本論文得以完成，要感謝的人實在太多，首先感謝恩師陳昭瑩老師，自我大學以來的諸多栽培與關懷，在我碩士求學生涯中的種種支持與幫忙，每遇阻礙與挫折時，老師總是耐心給我鼓勵與協助，論文寫作的過程中，也總細心斧正，多次閱改，師恩銘心，難以忘懷。

感謝口試委員賴爾珉老師對我論文的寶貴建議與提點，永遠不會忘記對實驗最初的印象來自於大二升大三那年暑假；我也要感謝論文撰寫的過程中，黃秀珍老師及黃姿碧老師給我的建議與肯定，讓我把論文寫的更臻完善。

在碩士班的日子裡，研究室就像第二個家，有笑有淚，在這裡所結識的夥伴都是幫助我成長的重要人物。感謝健瑞學長、益宏學長及家華學姊對我的鞭策與指導，晚上加班開夜車時，有家華學姐和玉儒儒的輪流陪伴與支持，總是讓我備生勇氣；感謝所有在實驗室伴我走過春夏秋冬的夥伴們：耿豪、先玟、儒音、琇萍、顛婷、小佑、佳芳、介豪及彥佑，雖然時光不長，但是我很珍惜這段值得紀念的回憶。我的同學們：凱婷，你總是耐心的聽我發牢騷；筑蘋、則言、國馨、怡君，感謝你們平日的協助與加油，還有所有不及寫出的朋友們，謝謝你們！

由衷感謝高管處給予我進修機會，我的好同事梅月、翠娟、明勳及鈺琇，在工作不吝給我協助，在求學生活中，你們的出現總是讓我覺得很窩心。給我親愛的好朋友秋如、恩如、佳文及思羽，相識十年，一路給我的關心和回憶點點滴滴在心頭。

最後，感謝爸媽撫養我長大，謝謝你們的包容，讓我可以專心向學，順利完成我的就學生涯！

在完成這份論文的過程中，我一直是患得患失的，而今能走到最後，再次感謝所有這一路上曾幫助過我的師長、朋友與家人，感謝你們，願把這份榮耀與你們分享！

安慈 2010.8

目 錄

壹、	中文摘要	1
貳、	英文摘要	2
參、	前 言	3
肆、	前人研究	5
一、	植物促生根圈細菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)	5
二、	誘導系統性抗病(Induced systemic resistance)	7
三、	內生細菌(Bacterial endophytes)	8
四、	植物根部泌出物(Root exudates)	9
五、	糖類磷酸根傳遞運輸系統(Phosphotransferase system, PTS)	10
伍、	材料與方法	12
一、	供試菌株之培養與保存	12
二、	基因比對	12
三、	M71 突變株特性分析	13
1.	生長曲線	13
2.	內孢子染色(Endospore staining)	13
3.	葡萄糖利用試驗(Glucose utilization test)	13
4.	趨向性試驗(Capillary chemotaxis assay)	14
四、	玉米根部泌出物收取	14
1.	玉米無菌培養方式	14
2.	收取玉米根部泌出物	14
五、	觀察 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚情形	15
1.	玉米根內群聚觀察	15
2.	冷凍切片前處理及切片	15

3.	染色	15
六、	觀察 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚數量	16
七、	互補試驗	16
1.	穿梭質體之構築	16
2.	確認互補株之南方雜合分析	21
3.	臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、M71 及 M71C 菌株之 ISR 作用	22
陸、	結 果	24
一、	M71 突變株跳躍子插入分析	24
二、	M71 突變株生理特性分析	25
1.	M71 突變株於 LB 液態培養基中生長速率較 C1L 菌株慢	25
2.	於 LB 液態培養基中 M71 突變株不產生內孢子	25
3.	M71 突變株較 C1L 菌株利用葡萄糖能力較差	25
4.	M71 突變株失去對葡萄糖之化學趨向性	26
三、	玉米根部泌出物收取	26
四、	觀察 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚情形	27
五、	互補試驗	27
柒、	討 論	29
捌、	參考文獻	34
玖、	圖 表 集	43
表一、	供試菌株及載體	44
表二、	供試載體	45
表三、	引子	46
圖一、	臘狀芽孢桿菌糖類磷酸根傳遞運輸系統基因組成圖	47
圖二、	臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 <i>ptsG</i> 及下游 <i>ptsH</i> 、 <i>ptsI</i> 之基因序列	49
圖三、	臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、M71 突變株及 M71C 互補株之生長曲線	50

圖四、內孢子染色	51
圖五、葡萄糖利用能力測試	52
圖六、葡萄糖趨向性測試	54
圖七、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株與互補株 M71C 群聚於玉米根部	56
圖八、pLKptsG 圖譜	57
圖九、pLKptsG 序列	59
圖十、南方雜合分析	60
圖十一、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、突變株 M71 及互補株 M71C 內生於玉米根部數量	61
圖十二、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、M71 及互補株 M71C 誘導玉米產生系統性抗病測試	62
圖十三、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株內生於玉米根部預測圖	63
壹拾、 附錄	64
附錄一：臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 ptsG 與 ATCC 14579 菌株胺基酸序列比對	66
附錄二：臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 ptsH 與 ATCC 14579 菌株胺基酸序列比對	67
附錄三：臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 ptsI 與 ATCC 14579 菌株胺基酸序列比對	68
附錄四：臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 <i>ptsGHI</i> 基因與 ATCC 14579 菌株核酸序列比對	76

壹、 中文摘要

臘狀芽孢桿菌C1L菌株為本實驗室自花蓮太魯閣國家公園布洛灣遊憩區臺灣百合根圈分離之細菌菌株，將C1L菌株澆灌於土壤中有助於臺灣百合、葵百合對抗灰黴病及玉米對抗葉枯病，顯示C1L菌株具有生物防治應用潛能。林(2008)利用轉位子Tn917*acI*於C1L菌株中進行轉位誘變，並針對突變株於玉米根內的群聚能力、泳動性以及誘導植物產生系統性抗病等特性進行篩選，序列比對分析結果指出突變株M71之誘變基因與臘狀芽孢桿菌ATCC 14579菌株之糖類磷酸根傳遞運輸系統(phosphotransferase system, PTS)中的glucose-specific II ABC component (*ptsG*)相似度達90%以上。本研究將C1L菌株及M71突變株培養於含有1%葡萄糖之LB液態培養基中，發現M71突變株對葡萄糖的利用能力低於C1L菌株，顯示M71突變株中與葡萄糖利用相關的基因可能已遭破壞。由過去研究指出，葡萄糖為植物根部主要泌出物之一，可作為根圈環境中微生物的碳源，故本研究進一步以組織培養系統，收集株齡14天之玉米根部泌出物，經分析後發現玉米根部泌出物含有葡萄糖。而經試驗發現，C1L菌株及互補株M71C對葡萄糖具趨向性、而M71突變株則失去對葡萄糖之化學趨向性。另一方面，透過切片及染色觀察C1L菌株、M71突變株及M71C互補株於玉米根內部的群聚情形，發現C1L菌株及M71C互補株可進入玉米根部表皮細胞及皮層間隙。本研究構築之互補株M71C，可恢復誘導玉米產生抗病性、根部內生及少許葡萄糖趨向性等特性，但其他變異現象則無法恢復。

關鍵詞：

臘狀芽孢桿菌、誘導性抗病、糖類磷酸根傳遞運輸系統、植物根部泌出物、趨向性、内生細菌

貳、 英文摘要

A biocontrol strain C1L of *Bacillus cereus* screened from the rhizosphere of *Lilium formosanum* is able to reduce severe incidence of leaf blight in lily and maize. A previous study demonstrated that *B. cereus* C1L is an epiphyte and endophyte of plant roots. Tn917-insertion mutants screened by a trait of losing colonization ability in the roots of maize seedlings showed a decreased activity to induce systemic resistance (ISR) in maize. One of these mutants, M71, was predicted to encode glucose-specific IIABC component (*ptsG*). Mutant M71 showed a decrease in glucose utilization ability. Glucose is one of the main compounds of root exudates as we know. In order to prepare sterile exudates from roots, maize seeds were cultivated under sterile conditions in glass tubes containing glass beads. One of the compounds in the exudates is glucose. Strain C1L and a complementary strain M71C showed chemotactic response toward glucose. We used toluidine blue O staining method to stain the cross section of maize roots inoculated with C1L, M71 and complementary strain M71C. It was clearly demonstrated that strain C1L and complementary strain M71C could colonize in the maize roots. The complementary strain M71C also recovered the ISR ability in maize and the partial chemotactic response toward glucose. However, abilities of glucose utilization and endospore formation ability of M71C were not recovered at the same time. We presume that the colonization ability and chemotaxis toward glucose are related to ISR ability, but spore formation and glucose metabolism are not related to ISR ability.

Keywords: *Bacillus cereus*, induced systemic resistance, phosphotransferase system, plant exudates, chemotaxis, endophytic bacteria

參、前 言

地球人口逐年增加，如何使糧食作物免受病原微生物之攻擊並增加糧食作物之產量，已成為學者重要研究之課題。過去數十年來，主要仰賴化學合成藥物及肥料來達成此目標，但是過度使用化學合成物之危機則已浮現，首先病原微生物開始對化學藥劑急速產生抗性，防治效果降低，另外由於化學性藥劑多為廣效性，所以其它非目標生物也會受到影響(Compant *et al.*, 2005a)。而且大量使用化學合成物會造成土壤性質改變，過度使用化學合成物對自然生態環境影響甚鉅。此外，土壤性病害也難以透過化學藥劑防除，而近年基於社會大眾對健康的追求，人們對於作物上化學農藥的殘毒日益重視(Gerhardson, 2002)，故嘗試利用生物防治以彌補化學藥劑之不足，配合化學藥劑施用並可達藥劑減量之效。而某些生物防治菌株同時具有促進植物生長的能力，可加以利用此特性增加植物產量。

本研究室自花蓮縣太魯閣國家公園布洛灣遊憩區之臺灣百合根圈土壤中，分離得到臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株。藉由溫室及田間試驗發現將 C1L 菌株澆灌於土壤中有助於臺灣百合、葵百合對抗灰黴病及玉米對抗葉枯病，並可抑制病原真菌之生長，顯示 C1L 菌株具有生物防治應用潛能(林，2008；楊，2007；劉，2004)。此外也發現 C1L 菌株可促進玉米、阿拉伯芥及菸草生長(楊，2007；楊，2008)，顯示 C1L 菌株也屬於植物促生性細菌(plant-growth promoting bacteria, PGPR)。已知植物促生細菌如 *Pseudomonas fluorescens* 可誘導植物產生抗性，並屬於植物內生細菌(Bakker *et al.*, 2007)，林(2008)也發現 C1L 菌株可在台灣百合根圈群聚(colonization)，並可進入百合根部成為植物內生細菌(endophyte)。細菌內生特性可以減少細菌受環境的影響，故林(2008)進一步利用轉位子 Tn917ac1 建立 C1L 菌株的突變庫，藉由篩選根內生長能力缺失的菌株，分析細菌全基因體中被 Tn917ac1 插入破壞的基因序列，發掘與 C1L 菌株於植物根部內生群聚能力相關的因子。

本文承上述研究，將失去內生能力及誘導植物產生系統性抗病能力之臘狀芽

孢桿菌突變株 M71 進行比對分析，發現突變株 M71 與臘狀芽孢桿菌 ATCC 14579 菌株之糖類磷酸根傳遞運輸系統 (phosphotransferase system, PTS) 中的 glucose-specific II ABC component (*ptsG*) 相似度達 90% 以上，進一步觀察突變株的葡萄糖利用效率、對葡萄糖的趨向性及分析玉米根部泌出物之組成，並建構互補株，觀察其在玉米根部群聚及誘導玉米產生系統性抗病的能力，以驗證 C1L 菌株誘導系統性抗病的作用與其在植物根部內生群聚能力的相關性。



肆、 前人研究

一、 植物促生根圈細菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)

植物根圈環境(rhizosphere)定義最早由德國學者 Hiltner 提出(Hiltner, 1904):指受植物根影響之土壤環境,由於植物根部產生泌出物(root exudates),會吸引許多有益或是病原微生物聚集,進而影響植物養份吸收及健康。近年研究則更進一步認為根圈環境具有高度複雜性,根與根部組織、周圍土壤、昆蟲及許多微生物在根圈環境不停地進行交互作用。微生物包括細菌、真菌、原生動物與線蟲等,大部分微生物屬腐生性,少部分會引起植物病害。在根圈環境中生存的細菌稱為根圈細菌(rhizobacteria),其中某一些根圈細菌可以促進植物生長,稱為植物促生菌,植物促生菌被定義為在自然環境中,能於植物根部生長、繁殖及拓展至新生根的根圈細菌,並可促進植物生長者稱之(Choudhary and Johri, 2009)。目前已知的植物促生菌包括有 *Acinetobacter*、*Agrobacterium*、*Arthrobacter*、*Azospirillum*、*Bacillus*、*Bradyrhizobium*、*Frankia*、*Pseudomonas*、*Rhizobium*、*Serratia* 及 *Thiobacillus* 等各屬細菌,影響作物包括有鳳梨、香蕉、稻米、柑橘、玉米等。植物促生細菌可直接影響植物,包括 (1) 作為生物肥料(biofertilizer),例如:*Rhizobium* 及 *Bradyrhizobium* 可在豆科植物根部形成根瘤,固定環境中的氮氣,成為植物可使用的氮源;*Azospirillum* 除了在大麥、玉米及高粱等作物具有固氮的功能,同時也會影響根部發育,增進植物吸收水分及礦物質之能力;根圈菌可從有機化合物中溶解無機磷或微量元素,以供植物吸收利用,此等菌稱為溶磷菌(phosphate-solubilizing bacteria, PSB),例如桿菌屬中 *Bacillus megaterium*、*B. polymyxa*、*B. thuringiensis* 等具有此種能力(Barea et al., 2005)。(2) 產生植物生長刺激物(phytostimulators):如生長激素(auxin)、揮發氣體(volatiles)等,2006年 Kamilova 等人研究指出 *P. fluorescens* WCS365 可將蘿蔔中大量的色胺酸(tryptophan)轉變成吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA);固氮菌 *Azotobacter paspalis* 可透過增加吲哚乙

酸、吉貝素(gibberellin)及細胞分裂素(cytokinin)顯著增加多種單子葉及雙子葉植物的重量；而 *B. subtilis* 及 *B. amyloliquefaciens* 可產生揮發物質 2,3-butanediol 及 acetoin 促進阿拉伯芥生長 (Ryu *et al.*, 2003)。(3) 分解土壤有害物質 (rhizoremediation)：如 *P. putida* PCL1444 可有效利用根部泌出物做為自身生存之養分，同時可分解在植物根部的萘(naphthalene)污染物。

另外，某些植物促生細菌也具有生物防治(biocontrol)之功能，生物防治作用之機制可分為：(1) 拮抗作用(antagonism)：產生抑制其他微生物生長之物質，包括(a) 鐵離子嵌合物(siderophores)：鐵離子乃是生物生長的必需元素之一，某些植物促生細菌如 *Enterobacter cloacae* CAL2 及 *P. putida* WCS358 會產生低分子量的鐵離子嵌合物，對鐵有極高的親合力，可限制病原菌吸收土壤中游離三價鐵離子，減少環境中鐵離子濃度，進而抑制病原微生物生長；(b) 抗生素作用(antibiosis)：可直接抑制病原菌生長及真菌孢子的發芽，減少病原菌族群密度及對植物的危害。例如 *B. cereus* UW85 可產生 Zwittermycin A (Silo-Suh *et al.*, 1994)及 kanosamine (Milner *et al.*, 1996)，而其他已發現之抗生物質尚包括 amphisin、2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) (Defago, 1993)、phenazine、pyoluteorin、oomycin、pencin、tropolone 等多種；(c) 分解酵素(lytic enzymes)：透過產生分解酵素分解病原真菌的菌絲細胞壁或孢子發芽管，抑制真菌生長，如 *S. plymuthica* C48 可產生幾丁質分解酵素(chitinase)抑制 *Botrytis cinerea* 之孢子萌發及發芽管延長 (Frankowski *et al.*, 2001)，而 *Paenibacillus* sp. 3000 及 *Streptomyces* sp. 385 可產生 β -1,3-glucanase 分解 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 之細胞壁 (Singh *et al.*, 1999)；(d) 直接分解病原微生物的致病因子(virulence factors)以減少土壤中病原微生物數量，並抑制植物病原菌生長 (Toyoda *et al.*, 1988; Zhang and Birch, 1996; Zhang and Birch, 1997)。(2) 競爭(competition)：早在數十年前，植物促生細菌透過在植物根部纏聚，競爭養分及生存空間以保護植物即被認為是生物防治的重要機制之一，但卻一直缺乏證據，直到 2005 年 Kamilova 等人利用 gnotobiotic system

(Simons *et al.*, 1996)篩選能在根部進行纏聚的優勢菌種，反覆篩選 3 次，得到 *P. fluorescens* PCL1751 及 *P. fluorescens* PCL1760 均可抑制番茄根腐病的發生，顯示可有效纏聚於植物根部的根圈細菌，具成為生物防治菌株之潛力。(3) 誘導植物系統性抗病(induced-systemic resistance, ISR):植物促生細菌可誘導植物產生系統性抗病反應首見於康乃馨及胡瓜上的研究，van Peer 等人(1991)發現可促進康乃馨生長的菌株 *Pseudomonas* sp. WCS417r 可抑制由 *Fusarium* 所造成的萎凋病；而由 Gang 等人的研究則得知某些 PGPR 菌株可抑制 *Colletotrichum orbiculare* 對胡瓜的感染 (Gang *et al.*, 1991)。

但這些植物促生細菌卻無法促使所有植物產生相同之反應，如 Bensalim 等 (1998)將 18 種不同品系之馬鈴薯接種來自於洋蔥的內生細菌 *Pseudomonas* sp. strain PsJN，並於白天 33°C 夜間 25°C 之情形下栽培，發現並不能有效使所有品種的馬鈴薯塊莖重量及數量增加，顯示植物促生細菌促使植物生長的作用具有品種專一性 (cultivar specific)。

二、誘導系統性抗病(Induced systemic resistance)

誘導系統性抗病指植物受到非病原微生物或非生物因子刺激所產生之廣效且可持續一段時間之抗性，可抵抗病原微生物或環境逆境(Bakker *et al.*, 2007; van Loon *et al.*, 1998)。過去研究指出，某些植物促生菌株可在田間及溫室誘導植物產生系統性抗病，減少植物病害發生並可協助植物對抗乾旱、鹽害、重金屬及養分過量或不足等逆境(van Loon *et al.*, 1998)。目前已知之可誘導植物產生系統性抗病的植物促生菌株多屬於 *Pseudomonas* 及 *Bacillus* 屬細菌，例如 *P. fluorescens* WCS374r 預拌於蘿蔔種子可有效減少由 *Fusarium* 所造成的萎凋，並提升蘿蔔產量高達 40% (Leeman *et al.*, 1995); *B. amyloliquefaciens* IN937a 及 *B. subtilis* IN937b 不論在溫室或田間試驗均可抑制胡瓜嵌紋病毒(cucumber mosaic cucumovirus, CMV)感染番茄並

顯著提高番茄產量(Zehnder *et al.*, 2000)。至目前之研究，能誘導植物產生抗病的 *Bacillus* 包括：*B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis*、*B. pasteurii*、*B. cereus*、*B. pumilus*、*B. mycoides* 及 *B. sphaericus* 等(Kloepper *et al.*, 2004)。而植物促生菌是透過何種方式誘導植物產生系統性抗病的呢？以 *Pseudomonas* 為例，誘導植物產生抗性之因子目前已知有鞭毛蛋白(flagellins) (Zipfel *et al.*, 2004)、細菌表面之多醣體(lipopolysaccharides) (Graham *et al.*, 1977; van Peer and Schippers, 1992)、調控環境中鐵離子的代謝物(iron-regulated metabolites)，如 pseudobactin siderophore、pyochelin (Audenaert *et al.*, 2002) 等及產生抗生物質 DAPG (Iavicoli *et al.*, 2003)。有趣的是，來自於馬鈴薯的植物促生細菌 *P. putida* WCS358 之鞭毛蛋白可誘使阿拉伯芥抵抗 *P. syringae* pv. *tomato*，但卻無法減低 *P. syringae* pv. *tomato* 在番茄及菜豆的發病情形，若使用鞭毛蛋白遭破壞之 WCS358 突變株處理番茄及菜豆，則發現仍可誘導其產生抗病性反應(Meziane *et al.*, 2005)，顯示植物促生細菌誘導植物產生抗性非由單一因子造成，可能為多重因子綜合產生。而在 *Bacillus* 針對此方面的研究目前已知在阿拉伯芥上 *B. amyloliquefaciens* IN937a 及 *B. subtilis* GB03 產生之揮發物質 2,3-butanediol 可抑制 *Erwinia caratovora* 的生長(Ryu *et al.*, 2004)。另外，Schuhegger 等人(2006)發現革蘭氏陰性菌 *Serratia liquefaciens* MG1 在番茄根部纏聚時，會產生與監測環境中族群數量進而調節基因表現之與 quorum sensing 有關的 N-acyl-L-homoserine lactone (AHL)，增加番茄植株對 *Alternaria alternata* 之抗性，減少葉斑病之發生。

三、內生細菌(Bacterial endophytes)

內生細菌最早被定義為將植物組織表面消毒之後，仍可由組織內部分離而得的細菌，而近年則將其更完整的定義為在細菌全部或部分生活史當中，可在活體植物組織內部生存，但不於植物外表產生病徵者稱之(Hardoim *et al.*, 2008; Wilson,

1995)。全世界近30萬種的植物皆具有一至多種的內生細菌，但卻未被詳細研究 (Strobel *et al.*, 2004)。Nehl (1997)將根圈細菌生存空間分為根外(exoroot)及根內(endoroot)，前者意指在植物根表及周圍土壤，後者則指根圈細菌進入植物根部細胞間隙或細胞內。植物促生細菌如*P. fluorescens*、*A. brasilense*及*Bacillus*同屬於內生細菌(Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006)，可以前文所述之機制促進植物生長或誘導植物產生抗性。由於細菌不具有主動侵入的構造，所以內生細菌進入植物根部主要經由根部發育時與土壤摩擦產生的傷口，或是透過側根與表皮細胞間的交接處進入，目前後者被認為是內生細菌進入根部最重要的一個管道(Hardoim *et al.*, 2008)。Dong等人(2003)利用螢光標定之*Klebsiella pneumoniae* 342接種於阿拉伯芥、小麥及稻米根部，發現*K. pneumoniae* 342主要聚集於側根與表皮細胞交接處；而Roncato-Maccari 等人(2003)利用染色法也同樣發現*Herbaspirillum seropedicae* LR15會聚集在側根與表皮細胞交接處及皮層細胞的細胞間隙。另外也有研究指出，內生細菌會產生酵素分解細胞壁(Mateos *et al.*, 1992)，以利其進入植物的根部組織並可成功群聚於植物根內。

四、植物根部泌出物(Root exudates)

前文提到內生細菌會聚集在側根與表皮細胞交接處及皮層細胞的細胞間隙，而該部位則是植物根部泌出物最豐富的地方之一。植物根部泌出物是土壤環境中碳素的主要來源之一，其組成多樣性極高，一般可分為兩大類：一為低分子量物質，其中包括胺基酸、脂肪酸、核苷酸、有機酸、酚類化合物、植物生長調節劑、糖類及其他二次代謝物等；另一為大分子量物質如多醣類及蛋白質(Badri and Vivanco, 2009; Bais *et al.*, 2006; Narasimhan *et al.*, 2003)。植物根部泌出物自根尖、根毛及側根等處泌出(Rovira, 1969)，可作為土壤微生物的養分來源，而微生物則在根圈環境或根表進行生長繁殖，泌出物中的某些物質可促使根圈環境中根瘤菌、

菌根真菌、植物促生細菌等與植物共生，或是影響病原微生物之生長(Bais *et al.*, 2005; Kamilova *et al.*, 2006a)，故植物根部泌出物之成分會影響根圈環境中生物的組成(Aiken and Smucker, 1996; Kuiper *et al.*, 2002; Lugtenberg *et al.*, 1999)。而植物根部泌出物之組成及比例也會受植物種類、齡期、種植密度、土壤微量元素、環境壓力及土壤環境中微生物種類及微生物的二次代謝物如DAPG之影響而有所差異(Bais *et al.*, 2006; Maloney *et al.*, 1997; Pineros *et al.*, 2002)。以目前植物根部泌出物研究較為透徹的番茄為例：番茄根部泌出物主要組成包括有機酸、胺基酸及糖類(Kamilova *et al.*, 2006a)，其中檸檬酸及葡萄糖會增加根部病原真菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*之孢子發芽能力，若是透過生物防治菌株*Pseudomonas fluorescens* WCS365則可抑制病原微生物生長(Kamilova *et al.*, 2008)，顯示植物根部泌出物影響根圈環境甚鉅。

五、糖類磷酸根傳遞運輸系統(Phosphotransferase system, PTS)

細菌為提高其競爭優勢，發展出各種不同的能力以適應多變的環境：如具有代謝不同碳素的能力，以適應營養缺乏的環境、感知養份較高的場所、適應滲透壓或氧氣含量改變等逆境，這些能力大多依靠位於細胞表面上的訊息傳導來調控酵素的活性或改變細菌的行為。而這眾多位於細胞上的感知系統，其中有一個為糖類磷酸根傳遞運輸系統(Postma *et al.*, 1993)。糖類磷酸根傳遞運輸系統又被稱為phosphoenolpyruvate (PEP):sugar phosphotransferase system，最早見於1964年Kundig等人在大腸桿菌的研究，此系統廣泛存在於細菌當中，主要負責糖類的運輸。該系統將PEP所攜帶的磷酸根轉移到來自於胞外的糖類，此時PEP會轉變為pyruvate，而糖類經磷酸化後會留在細菌體內，供後續利用。糖類磷酸根傳遞運輸系統可分為三個部份：分別為enzyme I (EI, *ptsI*)、enzymeII (EII)及HPr (histidine-containing phosphocarrier protein, *ptsH*)。來自於PEP上的磷酸根將EI磷酸

化成為EI~P，EI~P又將其上的磷酸根傳給HPr，使HPr變成HPr~P，最後此磷酸根會傳遞至位於細胞膜上的EII，EII~P將磷酸根加到糖類上。由於EI及HPr功能主要為傳遞磷酸根，故其保守性較高，而EII除了作為傳遞磷酸根的一員，同時與糖類運輸進入細菌體內有關，其針對單一或幾種糖類具有專一性(EII^{carbohydrate})，所以EII在細菌當中的序列保守性較低(Kotrba *et al.*, 2001)。除此之外，糖類磷酸根傳遞運輸系統廣泛影響細菌體內的各種代謝反應：如在*B. subtilis*的研究發現當環境中具有可快速優先利用的糖類，如葡萄糖、果糖、蔗糖等，由於需將糖類磷酸化，細菌體內的HPr會大量上升，並與調控因子CcpA形成複合物後，自動抑制合成代謝其他糖類的酵素或關閉運送通道，優先利用可快速代謝之糖類，此現象被稱為carbon catabolite repression (CCR) (Saier *et al.*, 1996)；另外，當EI~P濃度極高時，會抑制與化學趨向性有關的CheA (chemotactic sensor kinase)活性，進一步影響與鞭毛運動相關之基因表現(Parkinson and Kofoid, 1992)；而Abranches等人(2006)則發現*Streptococcus mutans*當中EIIAB^{Man}會影響生物膜的形成。

伍、材料與方法

一、供試菌株之培養與保存

本研究所使用之菌株及載體列於表一、表二。臘狀芽孢桿菌及大腸桿菌培養於 LB 瓊脂培養基(Luria-Bertani agar, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar, pH 7.0)。培養基中按需要添加 50 µg/ml 安比西林(ampicillin, Ap)、5 µg/ml 四環黴素(tetracycline, Tc)、50 µg/ml 立復黴素(rifampicin, Rf)或 5 µg/ml 氯黴素(chloramphenicol, Cm)。

菌株利用四象限畫法純化，並挑選單一菌落培養於 3 ml 之 LB 液態培養基中，於 28°C 或 37°C 培養箱中培養 12 至 16 小時(200 rev/min)，取 800 µl 菌液與已滅菌之 50 %甘油(glycerol) 400 µl 於滅菌之凍菌管內混合均勻，置於-80°C 中保存。

玉米葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus* Drechsler) 接種於玉米後進行組織分離，利用單孢或單菌尖分離純化菌株，培養於馬鈴薯瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA, Difco)，於室溫培養二星期後，以 0.05% Tween 20 溶液洗下孢子，並以血球計數器將孢子濃度調整為每毫升 5×10^4 的孢子數，以供溫室接種試驗使用。

另外取 800 µl 已滅菌的 10%乳糖(lactose)溶液與 200 µl 之 50 %甘油置入已滅菌的凍菌管內混合均勻，並將已培養至產生孢子之真菌，切取菌絲塊至裝有上述混合液的凍菌管中震盪混合，置於-80°C 冰箱保存。重新培養時，將凍菌管置於 37°C 水浴鍋中回溫，取懸浮液平塗於馬鈴薯瓊脂培養基上培養。

二、基因比對

依據美國國家生物資訊中心(National center for biotechnology information, NCBI) 資料庫中臘狀芽孢桿菌 ATCC 14579 菌株之葡萄糖運輸系統基因(phosphotransferase system, *ptsG*)設計引子對 ptsGHI-f/390 (表三)，並以 C1L 菌株染色體 DNA 為模板進行 PCR 反應，所得約 2.63 片段；續依據 ATCC 14579 菌株葡

葡萄糖運輸系統基因設計引子 ptsGHI-r，以 C1L 菌株染色體 DNA 為模板與引子 ptsGHI-f 進行 PCR 反應增幅出包含 HPr (*ptsH*)及 EI (*ptsI*)約 4.8 kb 之片段，委託源資國際生物科技公司(Tri-I Biotech)進行解序，定序引子列於表三。序列以 NCBI 資料庫中的 blast 及 ORF finder 軟體、Softberry 資料庫中 BPROM 軟體及 Prokaryotic promoter analysis using SAK 軟體預測啟動子位置。

三、M71 突變株特性分析

1. 生長曲線

將 C1L 菌株及 M71 突變株培養於 3 ml LB 液態培養基中，於 28°C 震盪培養 12-16 小時，取 100 μ l 菌液繼代培養於 100 毫升之 LB 液態培養基，28°C 震盪培養，從 0 小時開始，每隔 1 小時取 1 毫升菌液以 OD₆₀₀ 測量其吸光值直至穩定生長期 (stationary phase)。

2. 內孢子染色(Endospore staining)

將細菌於 3 毫升 LB 液態培養基在 28°C 培養兩天後，取 2 μ l 菌液滴在已用拭鏡紙擦拭清潔的玻片之上，並將玻片背面以酒精燈來回烤數次，進行熱固定。滴 5%孔雀綠(malachite green)覆蓋樣本，並將玻片置於蒸氣上加熱 5 分鐘，同時注意勿使染液蒸乾。將玻片置於室溫冷卻後，以二次水輕沖洗，再滴 0.25%番紅(safranin O)至樣本之上，45 秒後以二次水輕沖洗，並以吸水紙吸乾水分後鏡檢。

3. 葡萄糖利用試驗(Glucose utilization test)

葡萄糖與 ATP 會受 Hexokinase 催化成為 Glucose-6-Phosphate (G6P)及 ADP，而 G6P 及 NAD 則會受 G6P dehydrogenase (G6PDH)催化成為 6-Phosphogluconate 及 NADH。NADH 在 340 nm 具吸收峰，故可通過 340 nm 之波長變化，測定葡萄糖濃度。

參考 2008 年 Houot 及 Watnick 之方法，將細菌於 3 毫升 LB 液態培養基在 28°C

培養隔夜，取 100 μ l 至 100 毫升 LB 液態培養基繼代培養，每間隔一小時以葡萄糖試劑(Glucose (HK) Assay Kit, Sigma)處理 15 分鐘，此試劑含有 ATP、Hexokinase、NAD 及 G6PDH，隨後偵測在 A_{340} 吸光值，葡萄糖濃度(mg/ml)可用下列公式計算： $(A_{340} \times \text{進行定量之總體積} \times \text{稀釋倍數} \times 0.029) / \text{樣品體積}$ 。

4. 趨向性試驗(Capillary chemotaxis assay)

參考 1999 年 Mazumder 等人的研究方法，將細菌接種在 3 毫升 LB 液態培養基並於 28°C 震盪培養隔夜，取 3 μ l 繼代培養至另一 3 毫升 LB 液態培養基於 28°C 培養 8 小時後，取菌液(10^8 cfu/ml) 200 μ l 裝入微量吸管尖(200 μ l tip)。另外將 1 毫升之拋棄式注射針筒(26G \times 1/2", Terumo)吸取欲進行趨向性試驗的液體至針筒刻度 0.1 毫升處，將針頭插入帶有菌液的微量吸管尖，平放 45 分鐘後，將注射針筒中的液體序列稀釋，並進行塗盤計數，計算其相對趨向反應指數(relative chemotaxis response, RCR)，計算方式如下： $RCR = \text{實驗組針筒內菌量} / \text{對照組針筒內菌量}$ 。當相對趨向反應指數大於 2 時，認為對該物質具有顯著之趨向反應。本試驗以無菌水做為負對照組。

四、玉米根部泌出物收取

1. 玉米無菌培養方式

以 1% 次氯酸鈉(sodium chloride, NaOCl)及 0.01% Tween 20 混合後將自農友公司購買之玉米種子(蜜珍 3 號)進行表面消毒並以超音波震盪 15-20 分鐘後，取無菌水清洗玉米種子數次，並將玉米種子放置於 0.8% 水瓊脂培養基(water agar, WA)之上，避光培養至種子發芽。

2. 收取玉米根部泌出物

參考 Kamilova 等人(2006a)之研究方法，將玻璃試管(25 mm x 120 mm)當中放置 20 ± 0.1 克的玻璃珠，並加入 6 毫升的 MS 液態培養基(pH 6.8, PhytoTechnology

Laboratories), 於高溫高壓滅菌釜滅菌之後, 將無菌培養發芽的玉米種子置於其上, 並置放於 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相對溼度 50-60%、光週期為光照 16 小時/黑暗 8 小時之組織培養室中, 待 14 天之後, 回收根部液體, 並以減壓抽氣機在 45°C 情況下抽乾, 以無菌水回溶及測定植株根部泌出物之葡萄糖含量; 並以該葡萄糖濃度進行趨向性試驗。

五、觀察 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚情形

1. 玉米根內群聚觀察

參考 Roncato-Maccari 等人(2003)所使用之方法。將玻璃試管(25 mm x 120 mm)當中放置 3 克蛭石, 以高溫高壓滅菌釜滅菌之後備用。另將臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株及突變株 M71 培養於 LB 液態培養基中震盪 12-16 小時再繼代培養 8 小時後, 以轉速 5,000 rpm 離心 6 分鐘沉降菌體, 將已滅菌之蛭石每一克混合以定量無菌水懸浮之 10^7 個細菌(10^7 cfu/g vermiculite), 取無菌培養發芽之玉米種子放置其上, 並置放於 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相對溼度 50-60%、光週期為光照 16 小時/黑暗 8 小時之組織培養室中, 五天後切片觀察。

2. 冷凍切片前處理及切片

取欲進行觀察的玉米組織培養根, 將其浸泡於濃度為 15% 甘油中 3 日後, 以冷凍包埋劑(OCT embedding matrix, CellPath)包埋, 使用冷凍切片機(Leica CM3050S)進行切片。

3. 染色

標本先置於室溫一天, 待冷凍包埋劑乾燥後再進行染色。參考前人方法(O'Brien *et al.*, 1964; Roncato-Maccari *et al.*, 2003), 將 1% toluidin blue O (in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8), 滴於標本 1 分鐘後, 以清水小心沖去染劑後, 用拭鏡紙將水分吸乾並以顯微鏡觀察。

六、觀察 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚數量

將玉米種子種植於六吋圓直徑 12 公分深、11 公分含根基旺、泥炭土及珍珠石(2:1:1)的塑膠盆中。生長條件為 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相對溼度 50-60%；光週期為光照 16 小時/黑暗 8 小時，生長 28 天後，供後續試驗所用。

參考林(2008)之方式，將 C1L 菌株與 M71 突變株 LB 液態培養基中震盪 12-16 小時，再繼代培養 8 小時後，將菌液以轉速 5,000 rpm (Tomy, MRX - 152)離心 6 分鐘沉降菌體，並用無菌水重新懸浮調整菌液濃度至每毫升 10^9 菌數(10^9 cfu/ml)，取 50 毫升細菌懸浮液澆灌於溫室之玉米根圈土壤，於 5 日後將玉米根部組織輕柔漂洗至無土壤殘留，秤取 0.1 克玉米主根基部組織，並置入 1.5 ml 無菌微量離心管中，加入 1%次氯酸鈉浸泡根部組織進行表面消毒 30 秒，接著以無菌水浸洗兩次，最後加入 1 ml 無菌水並將根部組織完全磨碎，以微量吸管吸取 100 μl 組織懸浮液平塗於含有立復黴素之 LB 培養基，於 28°C 培養 12-16 小時後計數。每次處理三重覆，並進行兩次獨立試驗。

七、互補試驗

下述生物技術參考 current protocol (Ausubel et al., 2010)：

1. 穿梭質體之構築

(1) 臘狀芽孢桿菌染色體 DNA 之抽取

將臘狀芽孢桿菌挑取單一菌落於 3 毫升 LB 液體培養基中，於 28°C 震盪培養 12 至 16 小時，取 1.5 ml 之菌液至於微量離心管中，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後加入 567 μl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)懸浮細菌，再加入 30 μl 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 及 3 μl 的 proteinase K (20 mg/ml)混合均勻後，置於 37°C 水浴鍋反應 1-2 小時。加入 100 μl 之 5 M 氯化鈉 (sodium chloride, NaCl)混勻後，再加入 80 μl 的 10% CTAB/0.7 M NaCl (cetyl triethyl

ammonium bromide/sodium chloride)混合後置於 65°C 水浴中反應 10 分鐘。加入 780 μ l 的 CI (chloroform/isoamylalcohol, 24:1) 混合，輕輕地搖晃微量離心管使其呈白色混濁狀，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取出上清液並加入等體積的 PCI (phenol/chloroform/isoamylalcohol, 25:24:1)，緩慢混合並重複上述步驟。取出上清液至新的微量離心管中，加入 0.6 倍體積的異丙醇(isopropanol)沉澱染色體 DNA，於 4°C 下 12,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液後，再以 80%酒精洗淨，於 4°C 下 12,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後風乾沉澱物並以無菌水溶解，保存於-20°C。

(2) *ptsG* 引子設計

依據美國國家生物資訊中心(National center for biotechnology information, NCBI) 資料庫中臘狀芽孢桿菌 ATCC 14579 菌株之葡萄糖運輸系統基因 (phosphotransferase system, *ptsG*)設計引子對，並以 C1L 菌株染色體 DNA 為模板進行 PCR 反應(95°C、5 分鐘；95°C、1 分鐘，55°C、1 分鐘，72°C、2.5 分鐘，共 40 次溫度循環；72°C、10 分鐘)。

(3) 回收及黏合反應

將長度為 2.623 kb 的 PCR 產物進行切膠純化回收(GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences)，以 *Bam*HI 及 *Hind*III 切割，回收備用。另將載體 pHY300PLK 以 *Bam*HI 及 *Hind*III 切割後回收，與切割後的 PCR 產物進行黏合反應(ligation)，於 4°C 水浴反應 12 小時以上；並將此質體命名為 pLK*ptsG*。

(4) 大腸桿菌勝任細胞製備及轉形

將大腸桿菌 DH5 α 菌株(*E. coli* DH5 α)培養於 LB 液態培養基，於 37°C 震盪培

養 12-16 小時，取 500 μ l 培養菌液繼代培養於新鮮之 50 ml LB 液態培養基，37°C 震盪培養至吸光值(A_{600})為 0.4-0.6 (約 2.5-3 小時)，分裝兩管各 20-25 ml，置於冰中 10 分鐘，於 4°C 下以轉速 4,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，加入 10 ml 預冷之 0.1 M 氯化鎂($MgCl_2$)懸浮菌體，置於冰中 20 分鐘，於 4°C 下以轉速 4,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，加入 10 ml 預冷之 0.1 M 氯化鈣($CaCl_2$)懸浮菌體，置於冰中 1 小時，再於 4°C 下以轉速 4,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，每管加入 0.4 ml 之 0.1 M 氯化鈣及 0.2 ml 50% 甘油，懸浮菌體後分裝於 1.5 ml 無菌微量離心管中，每管 100 μ l，保存於 -80°C。

取 10 μ l 黏接液加入 100 μ l 大腸桿菌勝任細胞懸浮液中，置於冰中 20 分鐘，以 42°C 水浴 90 秒進行熱休克(heat-shock)處理，立刻冰浴 2 分鐘後加入 900 μ l LB 液態培養基，於 37°C 震盪培養 30 分鐘，平塗於含 50 μ g/ml 安比西林及 5 μ g/ml 四環黴素之 LB 培養基，37°C 培養隔夜，挑取菌落，抽取載體，以限制酶酵素切割分析確認其方向，並以 PCR 進行檢測確認轉形株。

(5) 菌落聚合酶連鎖反應(colony PCR)

將轉形株培養於含 50 μ g/ml 安比西林及 5 μ g/ml 四環黴素之 LB 培養基，在 37°C 培養 12-16 小時。並在 0.2 ml PCR 管中加入下列反應試劑：2 μ l 10x Taq buffer、0.3 μ l 10 μ M primer *ptsG-f*、0.3 μ l 10 μ M primer *ptsG-r*、0.3 μ l Taq polymerase 並加無菌水使總體積為 20 μ l，使用無菌牙籤尖端沾取少量菌體至 0.2 ml PCR 管中進行 PCR 反應(95°C、10 分鐘；95°C、1 分鐘，55°C、1 分鐘，72°C、2.5 分鐘，共 35 次溫度循環；72°C、10 分鐘結束反應)。PCR 產物以 1% 瓊脂精膠體檢查。

(6) 大腸桿菌質體抽取

沾取大腸桿菌單一菌落培養於加有抗生素之 LB 液態培養基中，37°C 震盪培養

12-16 小時，取 1.5 ml 菌液於微量離心管中，於室溫下轉速 8,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液加入 100 μ l GTE 緩衝液(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)均勻懸浮菌體，室溫靜置 5 分鐘後加入 200 μ l 0.1 N NaOH-1% SDS (sodium dodecyl sulfate)溶液，均勻混合至液體呈現黏稠狀後置於冰中 5 分鐘，再加入 150 μ l 預冷之 5 M 醋酸鉀溶液(potassium acetate, pH 4.8)，均勻混合置於冰中 5 分鐘，室溫下轉速 12,000 rpm 離心 3 分鐘，取上清液加入 2 倍體積之 95 %酒精沉澱 DNA，均勻混合靜置於室溫 2 分鐘後，室溫下以轉速 12,000 rpm 離心 3 分鐘後去除上清液，加入 70 %酒精潤洗沉澱物，室溫下 12,000 rpm 離心 1 分鐘後去除上清液，風乾沉澱物回溶於 20 μ l 無菌水，分裝保存於-20 $^{\circ}$ C，以 1%瓊脂精膠體檢查質體片段大小。

(7) 大腸桿菌電勝任細胞製備及電穿孔轉形

抽取大腸桿菌 DH5 α 轉形株的載體 pLKptsG，電穿孔轉形至大腸桿菌 GM2163 (New England Biolabs)。製作大腸桿菌電勝任細胞，首先將大腸桿菌 GM2163 培養於含 5 μ g/ml 氯黴素之 3 ml LB 液態培養基，置於 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養 12 小時，取 500 μ l 培養菌液繼代培養於新鮮之 50 ml LB 液態培養基，37 $^{\circ}$ C 培養至 A₆₀₀ 為 0.5-0.7，將菌液冷卻 10 分鐘分裝成兩管各 20-25 ml，於 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 4000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，加入預冷之 10%甘油 10 ml 懸浮菌體，於 4 $^{\circ}$ C 下 4,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，加入預冷之 10%甘油 5 ml 懸浮，於 4 $^{\circ}$ C 下 4000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，加入預冷之 10 % 甘油 120 μ l 懸浮。每管 40 μ l 分裝於 1.5 ml 微量離心管，保存於-80 $^{\circ}$ C。

大腸桿菌電穿孔實驗步驟，首先將 1-10 μ l DNA (0.1-1.0 μ g)溶液加入製備好之 40 μ l 電勝任細胞，置於冰中 5 分鐘後，將懸浮液置入預冷之 0.2 cm interelectrode gap cuvette (Bio-Rad)，以電穿孔裝置於 25 μ F、200 Ω 及 2.5 kV 下電擊細胞，立即加入 950 μ l 的 LB 液態培養基，於 37 $^{\circ}$ C 震盪培養 1 小時，平塗於含 5 μ g/ml 四環黴素之

LB 培養基，於 37°C 培養隔夜後，挑取菌落抽取載體，以限制酶酵素切割分析確認其方向，並以 PCR 進行檢測確認轉形株。

(8) 臘狀芽孢桿菌電穿孔勝任細胞製備及電穿孔轉形

依據 Dunn 等人(2003)的方式製作臘狀芽孢桿菌電穿孔勝任細胞。抽取大腸桿菌 GM2163 電穿孔轉形株的載體 pLKptsG，電穿孔轉形至臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株。將臘狀芽孢桿菌 M71 突變株培養於含 50 µg/ml 立復黴素的 5 ml 0.5× TSB 液態培養基中，於 28°C 震盪培養 12-16 小時，取 1 ml 培養菌液加入 200 ml 新鮮之 brain heart infusion broth (Difco)液態培養基中，於 37°C 震盪培養至 OD₆₀₀ 約 0.3，分裝 2 管置於冰中 10 分鐘，以 4°C 轉速 9,400 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，每管加入 8 ml 經 4°C 預冷之 electroporation buffer (0.5 mM MgCl₂, 272 mM sucrose, 0.2 mM K₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄，以 0.45 µm 濾膜過濾)懸浮菌體。以 4°C 轉速 8,000 rpm 離心 6 分鐘，去除上清液，每管加入 100 µl 預冷之 electroporation buffer 以懸浮菌體，置於冰中備用。

將 1-20 µl 載體 DNA (0.1-1.0 µg)溶液加入製備好之 100 µl 電穿孔勝任細胞，置於冰中 5 分鐘，將懸浮液置入預冷之 0.2 cm interelectrode gap cuvette，以電穿孔裝置於 25 µF、200 Ω 及 1.2 kV 下電擊細胞，以 2 ml 的 LB 液態培養基懸浮，置入 50 ml 離心管，於 37°C 震盪培養 1 小時，平塗於含 5 µg/ml 四環黴素之 0.5× TSA 培養基上，於 28°C 培養隔夜。

(9) 臘狀芽孢桿菌質體抽取

將已進行電穿孔轉形之臘狀芽孢桿菌轉形株，挑取單一菌落培養於含 5 µg/ml 四環黴素的 3 ml LB 液態培養基中，於 28°C 震盪培養 12-16 小時，取 3 ml 菌液置於微量離心管，室溫下轉速 8,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液加入 100 µl 內含

lysozyme (2.5 mg/ml)的 GTE 緩衝液將菌體懸浮，於 37°C 水浴反應 1 小時。加入 400 μ l 0.2 N NaOH – 2% SDS 溶液混合均勻，置於冰中 10 分鐘，再加入 300 μ l 預冷之 5 M 醋酸鉀溶液(potassium acetate, pH 4.8)，均勻混合置於冰中 45 分鐘，室溫下轉速 13,200 rpm 離心 15 分鐘，取上清液加入等體積之 PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol, 25 : 24 : 1)，室溫下 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取出上清液置入新的 1.5 ml 微量離心管，加入 0.7 倍體積 isopropanol 混合後於室溫靜置 5 分鐘，室溫下 12,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，以 70%酒精潤洗沉澱物，室溫下 12,000 rpm 離心 1 分鐘後去除上清液，風乾沉澱物回溶於 20 μ l 無菌水，分裝保存於-20°C，以 1%瓊脂精膠體電泳檢查。

將已進行電穿孔轉形之臘狀芽孢桿菌電穿孔轉形株，培養於加入 5 μ g/ml 四環黴素之 3 ml LB 液態培養基，於 28°C 震盪培養 12-16 小時後，抽取建構之穿梭載體進行 PCR 及限制酶切割分析，並以 1%瓊脂精膠體電泳檢查，將建構好之 M71 電穿孔轉形互補株命名為臘狀芽孢桿菌 M71C。

2. 確認互補株之南方雜合分析

(1) 置備探針

以 pHYptsG 做為模板，引子對 ptsGHI/390 進行 PCR-DIG-labeling (PCR DIG probe synthesis kit, Roche Applied Science)反應。將 0.2 ml PCR 管中加入下列反應試劑：5 μ l 10x Taq buffer、3 μ l 10x PCR DIG probe synthesis mixture、1 μ l 1mM dNTP solution、1 μ l 10 μ M primer 390、1 μ l 10 μ M primer ptsGHI、0.25 μ l Taq polymerase 及 0.1 μ l 模版，加水至總體積 50 μ l 後，進行 PCR 反應(95°C、5 分鐘；95°C、1 分鐘，55°C、2 分 30 秒，72°C、1 分鐘，共 35 次溫度循環；72°C、10 分鐘)，所得 DIG 標定之 PCR 增幅產物約 2.6 kb，以 1%瓊脂精膠體電泳檢查。

(2) 南方雜合分析

抽取 C1L 菌株、M71 及 M71C 之質體 DNA，以 *Bam*HI 及 *Hind*III 酵素切割隔夜，以 0.7%瓊脂精膠體，1×TAE 電泳緩衝液，於 50 伏特下進行電泳。將完成電泳的膠體置於變性溶液(1.5 M NaCl / 0.5 M NaOH) 中，於室溫下輕微震盪 15 分鐘二次，移至中和溶液(1.5 M NaCl / 0.5 M Tris-HCl, pH 7.0)，於室溫下震盪 15 分鐘二次。以 10×SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0)做為緩衝液，將 DNA 轉移至尼龍膜上(6 小時以上)。

從膠體上取下膜，在室溫下於 2×SSC 浸泡 5 分鐘，置於濾紙上，將溶液吸乾，進行 UV crosslink，使 DNA 確實與膜結合。將膜置於雜合管中，加入 20 ml 雜合溶液(5×SSC, 10% formamide, 1% blocking reagent, 0.1% N-lauroyl sarcosine Na-salt, 0.02% SDS)，於 42°C 反應 1 小時。將探針加熱至 95°C 反應 10 分鐘後，快速移至冰中 5 分鐘並加入雜合溶液中，於 42°C 反應 12-18 小時以上。以 2×SSC, 0.1% SDS 於室溫中清洗膜二次，每次 5 分鐘，然後以 0.1×SSC 於 65°C 下清洗膜二次，每次 15 分鐘。以 buffer 1 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5)於室溫下清洗膜 5 分鐘後，於 buffer 2 (1% blocking reagent/buffer 1)，室溫下震盪 30 分鐘，以 buffer 2 稀釋 Anti-Digoxigenin-Alkaline Phosphatase (anti-DIG-AP)至 75 mU/ml，將膜置於此含有抗體的溶液中，震盪 30 分鐘，以 buffer 1 沖洗膜二次，每次 15 分鐘，以除去多餘的抗體。將膜置於含有 CDP-Star 的溶液中，反應 10 分鐘，將多餘的溶液吸去。將膜封於塑膠袋中，於 37°C 下反應 10 分鐘，以增強螢光反應。最後，以 X 光片曝光，於顯影液及定影液反應後，以水清洗，風乾。

3. 臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、M71 及 M71C 菌株之 ISR 作用

依本實驗室(楊，2007)所處理之方法誘導溫室玉米植栽試驗 ISR 反應。將 C1L 菌株、M71 及 M71C 菌株培養於 3 ml LB 液態培養基中，於 28°C 震盪培養 16 小時，調整菌液濃度為 10^8 cfu/ml 處理於玉米栽培盆根圈土壤，另以液態 LB 取代菌液作為負對照組，1 天後於玉米葉片接種孢子濃度為 5×10^4 cfu/ml 之玉米葉枯病菌(*C.*

heterostrophus)，將孢子均勻噴灑於葉片，並套袋一天維持相對濕度 94-100%，隔天觀察接種葉之罹病度，每處理三重複，計算接種葉片罹病面積換算為罹病嚴重度計量(分為 5 級：0 級=健康葉片；1 級=0-25%葉片罹病面積；2 級=26-50%葉片罹病面積；3 級=51-75%葉片罹病面積；4 級=75%以上葉片罹病面積)，罹病嚴重度(Disease severity%) = Σ (罹病級數 × 該級病葉數) ÷ (總調查葉數 × 4) × 100%，所得數據以變異數分析(analysis of variance, ANOVA)進行統計分析比較處理間差異，信賴區間(confidence interval)為 95%。



陸、結 果

一、M71 突變株跳躍子插入分析

林(2008)為了解影響臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株在根部內生之因子，故利用紅黴素誘導轉位子 Tn917ac1 跳躍轉位，建立 C1L 菌株突變庫，以泳動能力及自玉米根部回收菌數之有無等特性進行篩選，其中一突變株 M71，具有泳動能力，但無法自玉米根部回收，另發現其失去誘導玉米產生系統性抗病之能力。分析該菌株遭 Tn917ac1 插入之序列位置，與 NCBI 之核酸資料庫比對，發現與 *B. cereus* ATCC 14579 當中之 PTS system, glucose-specific IIBC component (GeneID: 1206395) 具有 90% 以上之相似性。*B. cereus* ATCC 14579 當中糖類磷酸根傳遞運輸系統組成可分兩部分：分別是位於細胞膜上的 glucose-specific IIBC component 及位在細胞質的 HPr 及 phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase，前者負責將葡萄糖運入細菌體內，而後兩者則負責磷酸根之傳遞，如圖一(A)。而 M71 遭 Tn917ac1 插入破壞之位置則如圖一(B)所示。Glucose-specific IIBC component 之基因 *ptsG* 經全定序可得到含上游共 2,623 bp 之序列(圖二)，經轉譯為胺基酸序列其全長為 687 個胺基酸，並發現與 *B. thuringiensis* serovar pakistani str. T13001 之 Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component (accession no. ZP_04121970) 達 100% 相似度，而與 *B. cereus* ATCC 14579 之 PTS system, glucose-specific IIBC component 之相似度亦達 100% (accession no. NP_833768) (附錄一)。下游 HPr 之基因 *ptsH* 長度為 264 bp 經轉譯為胺基酸序列其全長為 87 個胺基酸，而 phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase 之基因 *ptsI* 長度為 1,713 bp，胺基酸序列其長度為 570 個胺基酸(附錄二、三)，經全長定序可得序列如圖二示：序列 557-2,621 為 *ptsG* 基因序列、序列 2,755-3,020 為 *ptsH* 基因，而序列 3,020-4,722 則為 *ptsI* 基因序列，*ptsH* 之終止起始碼 TAA 位於 3,018-3,020 bp 處，*ptsI* 起始碼 ATG 則位於

3,020-3,022 bp 處。

二、M71 突變株生理特性分析

1. M71 突變株於 LB 液態培養基中生長速率較 C1L 菌株慢

以液態培養基 LB 培養細菌，將培養不同時間點之 C1L 菌株、突變株 M71，以 OD₆₀₀ 測量其吸光值，結果顯示 C1L 菌株於培養第 3 小時後已進入指數生長期(log phase)，至第 5 小時進入停滯期(stationary phase)，直至第 12 小時仍維持在停滯期的狀態。而突變株 M71 較野生株生長速度較緩慢，培養 4 小時後才進入指數生長期，至第 9 小時進入停滯期(圖三)。

2. 於 LB 液態培養基中 M71 突變株不產生內孢子

將於 LB 液態培養基培養 48 小時之 C1L 菌株及突變株 M71，進行革蘭氏染色，發現 C1L 菌株有產孢現象，但突變株 M71 無法產孢，持續培養至 96 小時，突變株 M71 仍不具產孢現象(圖四)。

3. M71 突變株較 C1L 菌株利用葡萄糖能力較差

由資料庫比對得知突變株 M71 遭轉位子破壞之基因可能與細菌葡萄糖利用相關，為證明此假設，故參考 Houot 及 Watnick 之方法(2008)，將 C1L 菌株、突變株 M71 培養於含有 10 mg/ml 葡萄糖之 LB 液態培養基中，並在不同時間點取培養液以葡萄糖試劑處理 15 分鐘後偵測 A₃₄₀ 吸光值，並換算培養液中葡萄糖濃度(mg/ml)。發現 12 小時之後，C1L 菌株利用了 6 mg/ml 之葡萄糖，而 M71 則用了 3 mg/ml 的葡萄糖(圖五 B)。進一步考量是否因同一時間點 C1L 菌株生長速度較快造成葡萄糖利用速率不同，可由圖五 A 說明之：在 C1L 菌株及突變株 M71 之 OD₆₀₀ 皆為 1.5 時，可偵測到前者之培養液葡萄糖濃度為 8.5 mg/ml，而後者則為 9.2 mg/ml，顯示 C1L 菌株利用葡萄糖的效率的確較高。另外當 C1L 菌株與 M71 突變株培養 34 小時之後，C1L 菌株已將培養基內葡萄糖全數(10

mg/ml)消耗完畢，而 M71 突變株則只消耗了 8 mg/ml (圖五 B)，也可證明 C1L 菌株利用葡萄糖的效率較高，突變株遭破壞的基因確與葡萄糖利用相關。

4. M71 突變株失去對葡萄糖之化學趨向性

由於 M71 突變株與葡萄糖利用的基因有所缺失，欲了解該基因之缺失是否會影響臘狀芽孢桿菌趨向葡萄糖的能力。故參考 Mazumder 等人(1999)的研究方法，將自微量吸管尖經由針頭進入含有 0.1%葡萄糖注射針筒中的細菌數量進行塗盤計數(圖六 A)，並計算相對趨向反應指數，當相對趨向反應指數大於 2 時，表示有顯著性差異。試驗結果發現，C1L 菌株對 0.1%葡萄糖的趨向性為 6.7，而 M71 突變株的相對趨向反應指數則小於 2 (圖六 B)，顯示破壞 *ptsG* 會影響臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株對葡萄糖之趨向性。

三、玉米根部泌出物收取

已知 M71 突變株失去根部內生及誘導抗病的能力(林, 2008)，另外在上述試驗中得知 M71 突變株除對葡萄糖的利用能力下降，另外也喪失對葡萄糖的趨向性，推測是否因為此項因子影響 C1L 菌株前往根部進行內生，進一步影響對植物系統性抗病的誘導。首先須了解玉米根部泌出物是否含有葡萄糖，故將玉米種子以組織培養方式種植，於 14 日後收取玉米根部液體，經過分析後，每棵玉米植株至少可以偵測到 $11.58 \pm 0.2 \mu\text{g}$ 葡萄糖，自培養環境中回收得液體為 5 毫升，經換算後濃度約為 $12.86 \mu\text{M}$ (0.00023%)。

以該濃度($12.86 \mu\text{M}$)進行化學趨向性試驗，並計算相對趨向反應指數。試驗結果發現，C1L 菌株及突變株 M71 對 $12.86 \mu\text{M}$ 葡萄糖的相對趨向反應指數均小於 2 (圖六 B)，；以 10 倍之玉米根部泌出液葡萄糖濃度 $126.8 \mu\text{M}$ 進行趨向性試驗並計算相對趨向反應，此時臘狀芽孢桿菌 C1L 及互補株 M71C 對 $126.8 \mu\text{M}$ 葡萄糖具趨向性，而 M71 不具趨向性。

四、觀察 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚情形

為了解臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚情形，將蛭石混拌 C1L 菌株或突變株 M71 (10^7 cfu/g vermiculite)，並取無菌培養之玉米種子置於其上，五日之後進行切片觀察。發現可在玉米主根基部組織細胞間隙觀察到 C1L 菌株(圖七 A)，而主根末端及側根則無法在切片觀察過程中找到 C1L 菌株之存在，推測 C1L 菌株存在位置主要分布於主根之表皮細胞及皮層細胞的細胞間隙，另外在周鞘(pericle)之篩管附近也發現有 C1L 菌株的存在(圖七 B)。另外經過 M71 處理之後的玉米根部組織並沒有發現細菌的存在，推測 M71 突變株可能無法進入玉米根部組織或進入的數量極低(數據未表示)。而以水處理之玉米作為負處理組，其根部經切片染色後並未發現有細菌之存在，顯示玉米種子內原來不具內生性細菌。

另為了解臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株與 M71 突變株在玉米根內群聚數量，在玉米根圍土壤澆灌 50 毫升，濃度為 10^9 cfu/ml 之細菌懸浮液，玉米於溫室持續生長五日，取其根部組織並以次氯酸鈉進行表面消毒後，將根部組織磨碎取液體塗盤計數。試驗結果發現，於玉米根圍土壤澆灌 C1L 菌株及 M71 突變株後，自玉米根部回收到的細菌數量平均值分別為 2.15×10^5 cfu/g root 及 9.73×10^2 cfu/g root (圖十一)，M71 突變株自根部回收得到的數量遠低於 C1L 菌株，顯示 M71 突變株進入玉米根內的數量較低。

五、互補試驗

為進一步證實 ptsG 影響臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株的生理特性、內生及誘導植物產生抗病性的能力，以引子對 ptsGHI/390 及臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株染色體 DNA 做模版進行 PCR，得到 ptsG 及其上游 557 bp 序列產物，全長為 2,623 bp，並以酵素 HindIII 及 BamHI 切割後，黏接至可在大腸桿菌 DH5 α 菌株及桿菌屬細菌複製的穿梭載體 pPHY300PLK，將其命名為 pPHYptsG (圖八)，其序列如圖九，

轉型入大腸桿菌 DH5 α 後，再抽取質體 pHYptsG 並利用電穿孔技術送入大腸桿菌菌株 GM2163 以去除甲基化。自大腸桿菌菌株 GM2163 抽取 pHYptsG，以電穿孔轉形技術送入 M71 突變株內，產生一互補株 M71C。

為確定 M71C 互補株帶有質體 pHYptsG，故利用 *ptsG* 為探針，抽取 C1L 菌株、M71 突變株及 M71C 互補株之質體 DNA，並將質體以酵素 *HindIII* 及 *BamHI* 切割後，進行南方雜合分析。發現只有 M71C 的質體 DNA 可偵測到訊號(圖十)，顯示建構之 pHYptsG 已送入 M71C 互補株體內。

將 C1L 菌株、突變株 M71 及互補株 M71C 進行上述內生孢子染色、葡萄糖利用試驗、趨向性試驗、玉米根內群聚情形及數量及誘導玉米產生抗病性等試驗。其中 M71C 互補株恢復部分對葡萄糖之趨向性 (圖六 B)；互補株 M71C 之誘導植物產生抗病性之能力與 C1L 菌株相近，玉米的發病情形較輕微，而 M71 突變株則與過去研究一致，誘導玉米產生系統性抗病之能力與負對照組相似的發病情形相近(圖十二)，顯示 M71C 已恢復誘導植物產生抗病能力。另外在切片觀察內生情形也在玉米根部表皮及皮層細胞間隙發現 M71C 存在(圖七 C)，而自玉米根部回收 M71C 互補株，其平均數量約為 8.3×10^3 cfu/g root，約高於自玉米根部回收的 M71 突變株 10 倍(圖十一)。然而其他試驗包括內生孢子、葡萄糖利用等能力則並未恢復(數據未表示)。

柒、討 論

植物根圈有許多微生物，其中有許多細菌能促進植物生長，增加農作物的產量，這些微生物被稱為植物促生細菌(Choudhary and Johri, 2009)，植物促生細菌除可促進植物生長，某些尚具有生物防治功效，可使植物病害嚴重度降低，而最為著名的則是 *Pseudomonas* 與 *Bacillus* 屬之細菌(Kloepper *et al.*, 2004)，由於植物促生細菌有上述功效，故近年有許多學者致力於研究植物促生細菌之特性。而學者發現某些植物促生細菌同時具有植物內生之特性，如可促進葡萄生長的 *Burkholderia* sp. strain PsJN 即被發現可於葡萄根表及根內分離而得(Compant *et al.*, 2005b)。利用植物內生性細菌抑制植物病害之發生也已有前例：如來自於萬壽菊的內生性細菌可使馬鈴薯田內的根腐線蟲數量下降(Sturz and Kimpinski, 2004)；來自於柑橘植株的內生細菌 *Curtobacterium flaccumfaciens* 可抑制由 *Xylella fastidiosa* 所造成之柑桔色斑萎黃病 (Citrus variegated chlorosis, CVC)的發生(Araujo *et al.*, 2002)。本實驗室於臺灣百合根圈篩選出之臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株，已知其具有促進植物生長、誘導植物產生抗性及內生之特性(林，2008；楊，2007；楊，2008；劉，2004)。本研究進一步欲了解影響臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株內生特性之因子，經比對發現失去內生能力的突變株 M71 之 *ptsG* 基因遭破壞，而此基因產物為糖類磷酸根傳遞運輸系統當中，位於細胞膜上的 glucose-specific II ABC component (EII^{glc})。糖類磷酸根傳遞運輸系統與細菌糖類之運輸及代謝相關，此外尚影響細菌之化學趨向性及其他生理特性(Postma *et al.*, 1993)，在大腸桿菌的研究中得知，當環境具有高濃度的糖時，由於糖需經磷酸化才能停留在細菌體內，此時 EI 之濃度會上升，而高量之 EI 則會抑制 CheA，CheA 為激酶，可磷酸化 CheY，而磷酸化之 CheY 則調節鞭毛系統(Grebe and Stock, 1998)。Lengeler 等人(1981)即發現大腸桿菌菌株 K12 之 EII 遭破壞後，會影響細菌對該 EII 專一之糖類的趨向性，此點與本研究當中，發現突變株 M71 對葡萄糖的趨向性降低不謀而合，故推斷在臘狀芽

孢桿菌 C1L 菌株當中，其 EII^{glc} 與對葡萄糖的趨向性相關。在 Lengeler 等人(1981) 的研究同時也發現若破壞糖類磷酸根傳遞運輸系統當中的 HPr 或 EI 會使大腸桿菌 菌株 K12 失去對多種糖類的趨向性，臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株是否如此?此兩基因 突變後所得到之突變株是否如 M71 一般失去誘導抗病性或內生能力，這一點也值 得進行後續研究。

植物根部泌出物可作為土壤微生物的養分來源，而微生物則在根圈環境或根 內進行生長繁殖，故植物根部泌出物之成分會影響根圈環境中生物的組成。本研 究收集玉米根部泌出物，期望了解玉米根部泌出物是否具有葡萄糖，可吸引臘狀 芽孢桿菌 C1L 菌株前來聚集並進行內生。由於自溫室栽培玉米之土壤中收集其根 部泌出物具有困難性，另外擔心根部泌出物已先遭土壤微生物利用，難以偵測， 故改採用玻璃珠為介質，無菌栽培玉米於其上，以方便收取根部泌出物，本研究 在此無菌栽培環境收集之玉米根部泌出物葡萄糖含量甚低($11.58 \pm 0.2 \mu\text{g/plant}$)， 培養環境中濃度為 $12.86 \mu\text{M}$ ，以該濃度對 C1L 菌株及突變株進行化學趨向性試 驗，發現並無顯著性，推測於此種培養環境下葡萄糖濃度可能太低，無法吸引臘 狀芽孢桿菌，當葡萄糖濃度提升 10 倍，成為 $128.6 \mu\text{M}$ 時，此時卻可發現 C1L 菌 株及 M71C 對該濃度葡萄糖具趨向性，推測造成此種結果可能有兩種原因：(1) 此 栽培系統的植物根部泌出物濃度過低，如在 Kamilovora 等人(2006a)的研究當中， 發現無菌栽培於玻璃珠上的植物根部泌出物遠低於栽培於岩棉(stone wool)之上， 但是其主要組成成分仍和岩棉相近。植物根部泌出物之組成可能會受植物種類、 齡期、種植密度、土壤微量元素、環境壓力及土壤環境中微生物種類及微生物的 二次代謝物等種種因素影響而有所不同，推測在土壤環境當中的葡萄糖含量應較 組織培養方式收集為高；(2) 植物根部泌出物自根尖、根毛及側根等處泌出，局部 葡萄糖濃度較高，本次實驗計算方式所得之葡萄糖濃度為均質，可能低估葡萄糖 在根部的濃度。後續可改善培養系統，收集並測定玉米根部泌出物葡萄糖濃度， 了解 C1L 菌株是否受該濃度之葡萄糖影響，另可進一步分析根部泌出物之組成，

期望由組成份了解根部泌出物如何影響根圈微生物。

另外本研究也進一步了解 C1L 菌株在玉米根內群聚之區域，透過切片染色，發現 C1L 菌株所聚集的部位主要位在根部表皮細胞及皮層間隙，此與過去研究內生性細菌出現的位置大致相近(Dong *et al.*, 2003; Roncato-Maccari *et al.*, 2003)，除此之外尚發現來自於根毛及主根根尖的標本皆無法觀察到 C1L 菌株的存在，只有在主根與莖相接之根基部切得的標本可觀察到 C1L 菌株，本研究尚發現 C1L 菌株出現於玉米根部的周鞘(pericycle)近篩管細胞之處。前人之研究發現 *B. subtilis* RRC101 可抑制病原真菌 *Fusarium moniliforme* 生長，此外觀察接種於玉米根部 7-10 天後 *B. subtilis* RRC101 在根部內生情形，切片後發現位於玉米根部的表皮及皮層細胞間隙，另也出現在靠近篩管細胞的周鞘處，其中玉米根部表皮細胞間隙細菌量最高，皮層細胞次之，而周鞘細胞附近則只有少量細菌，此外無法在內皮細胞間隙發現任何細菌(Bacon *et al.*, 2001; Hinton and Bacon, 1995)。由於植物側根是由周鞘細胞向外延伸突破表皮及皮層細胞而成，推測 C1L 菌株受主根與側根交接處所產生泌出物吸引，往該處聚集，並自側根與表皮細胞交接處進入根部，內生於根表及皮層處，並透過向外延伸的周鞘細胞穿越內皮層，並出現在含養分豐富的篩管附近(圖七)；另外也推測 C1L 菌株可能具有產生分解少量細胞壁酵素之能力，可分解細胞壁進入內皮層內。後續針對 C1L 菌株在根部的分布可利用電子顯微鏡做進一步觀察，另外 C1L 菌株產生分解酵素的能力也可做進一步的試驗觀察。

本研究也透過建構互補株 M71C 期望恢復突變株 M71 所失去的種種特性，但卻只能回復內生性、趨向性及誘導玉米產生系統性抗病等特性，推測可能因 *ptsG*、*ptsH* 及 *ptsI* 三者轉譯出的產物彼此具有互相調節之功效，產物的濃度影響其他性狀之表現，或可能後兩基因為一操縱組，*ptsG* 之破壞影響後兩基因之表現等，另外也不排除互補株無法表現出蛋白之正確構型。

在 *B. subtilis* 168 之研究發現，*ptsG* 與下游可轉錄出 HPr 蛋白之 *ptsH* 基因及可轉錄出 EI 蛋白之 *ptsI* 基因，在環境具有葡萄糖時，會以一操作組(operon)形式 *ptsGHI*

進行轉錄，*ptsG*之產物EII^{glc}會抑制上游一antiterminator之表現。(Stulke *et al.*, 1997)，臘狀芽孢桿菌C1L菌株的基因經比對與*B. subtilis* 168的*ptsG*約有75%之相似性，而*B. subtilis* 168下游也同樣具有與*ptsH*及*ptsI*相似度極高的兩個基因，推測C1L菌株可能也同樣以操作組形式表現，故嘗試以C1L菌株基因體DNA為模板，並設計引子將包含3個基因及預測之上游啟動子序列共計4,832 bp以PCR方式增幅，發現可順利得到此片段及質體，但無法進入M71，推測可能因為完整之糖類磷酸根傳遞運輸系統會影響細胞生理甚鉅所造成，而後續該如何建立一全新互補株，回復M71之能力，有待進一步研究。此外尚可透過抽取C1L菌株全mRNA進行北方雜合分析或與或將各片段與*lacZ*重組，以釐清在臘狀芽孢桿菌C1L菌株當中此三基因的表現形式。

由於互補株M71C並無恢復產孢特性，但是卻恢復了誘導玉米產生抗病之能力，推測內孢子可能不是臘狀芽孢桿菌C1L菌株誘導玉米產生抗病性的因子。而經由切片觀察，發現可在玉米根內部發現M71C之存在，推測臘狀芽孢桿菌C1L菌株誘導植物產生抗病性能力可能與其是否在植物根部內生具有相關性，但在切片過程中M71C互補株可在玉米根部觀察到數量低於C1L菌株，推測可能只要最低基礎數量(minimal concentration)細菌在植物根部內生，即可達到刺激玉米產生系統性抗病之能力，透過根部回收試驗得知M71C互補株在玉米根部內生數量高於M71突變株近10倍，且可誘導玉米產生系統性抗病，推測進入玉米根內之C1L菌株至少需 10^4 cfu/g root可誘導植物產生系統性抗病能力。在溫室試驗當中，每次需澆灌濃度為 10^8 cfu/ml之C1L菌株方可達誘導植物產生系統性抗病之能力，可能由於土壤介質具有吸附能力，減少C1L菌株可接觸玉米根部的數量，唯有提高C1L菌株濃度至 10^8 cfu/ml，才可以達到最低基礎數量。

林(2008)為了解影響臘狀芽孢桿菌C1L菌株在根部內生之因子，建立C1L菌株突變庫，以泳動能力及自玉米根部回收菌數之有無等特性進行篩選，突變株M71具有泳動能力，但無法自玉米根部回收，且澆灌後五天，可自玉米根部回收到的

C1L菌株約為 10^4 cfu/g root，但本研究則發現C1L菌株及M71突變株皆可自玉米根部回收，數量分別為 2.15×10^5 cfu/g root及 9.73×10^2 cfu/g root，與林(2008)之研究所得數量不同，推測可能是因漂洗根部土壤程度不同之個人操作因素所造成，但是此結果並不影響M71突變株內生能力低落之事實。

綜上，C1L菌株誘導玉米產生系統系抗病之能力，推測不與內孢子與葡萄糖利用能力相關，但與C1L菌株於玉米根部的內生數量、能力及對葡萄糖之趨向性具關聯。



捌、 參考文獻

- 林玉儒。2008。臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株在臺灣百合根部群聚能力之探討。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。臺北。臺灣。85 頁。
- 楊耿豪。2007。臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株誘導玉米系統性抗玉米葉枯病之應用研究。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。臺北。臺灣。78 頁。
- 楊琇萍。2008。臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株揮發氣體促進植物生長之探討。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。臺北。臺灣。60 頁。
- 劉益宏。2004。臺灣百合根圈細菌之篩選及灰黴病防治應用研究。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。臺北。臺灣。64 頁。
- 劉益宏。2008。臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株誘導百合系統性抗灰黴病菌之研究。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所博士論文。臺北。臺灣。151 頁。
- Abranches, J., Candella, M. M., Wen, Z. Z. T., Baker, H. V., and Burne, R. A. 2006. Different roles of EIIAB^{Man} and EII^{Glc} in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 188:3748-3756.
- Aiken, R. M., and Smucker, A. J. M. 1996. Root system regulation of whole plant growth. Annu. Rev. Phytopathol. 34:325-346.
- Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., van Elsas, J. D., van Vuurde, J. W. L., and Azevedo, J. L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Appl. Environ. Microbiol. 68:4906-4914.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Hofte, M. 2002. Induction of systemic

- resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:1147-1156.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J. A., and Struhl, K. 2010. *Current protocols in molecular biology* [electronic resource]. New York: John Wiley & Sons.
- Bacon, C. W., Yates, I. E., Hinton, D. M., and Meredith, F. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ. Health Persp.* 109:325-332.
- Badri, D. V., and Vivanco, J. M. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32:666-681.
- Bais, H. P., Prithviraj, B., Jha, A. K., Ausubel, F. M., and Vivanco, J. M. 2005. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434:217-221.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-266.
- Bakker, P. A., Pieterse, C. M., and van Loon, L. C. 2007. Induced systemic resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97:239-243.
- Bensalim, S., Nowak, J., and Asiedu, S. K. 1998. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Am. J. Potato Res.* 75:200-200.
- Choudhary, D. K., and Johri, B. N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* 164:493-513.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E. A. 2005a. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles,

- mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4951-4959.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C., and Ait Barka, E. 2005b. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1685-1693.
- Defago, G. 1993. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42:311-312.
- Dong, Y. M., Iniguez, A. L., and Triplett, E. W. 2003. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 257:49-59.
- Dunn, A. K., Klimowicz, A. K., and Handelsman, J. 2003. Use of a promoter trap to identify *Bacillus cereus* genes regulated by tomato seed exudate and a rhizosphere resident, *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microb.* 69:1197-1205.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., and Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch. Microbiol.* 176:421-426.
- Gang, W., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81:1508-1512.
- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20:338-343.
- Graham, T. L., Sequeira, L., and Huang, T. S. R. 1977. Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:424-432.
- Grebe, T. W., and Stock, J. 1998. Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium.

- Curr. Biol. 8:154-157.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., and van Elsas, J. D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16:463-471.
- Hiltner, L. 1904. U̇ber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Beru̇cksichtigung der Gru̇ndu̇ng und Brache. *Arb. Dtsch. Landwirtsch. Ges. Berl.* 98:59-78.
- Hinton, D. M., and Bacon, C. W. 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia* 129:117-125.
- Houot, L., and Watnick, P. I. 2008. A novel role for enzyme I of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm. *J. Bacteriol.* 190:311-320.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., and Metraux, J. P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:851-858.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., and Lugtenberg, B. 2006a. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:250-256.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N., and Lugtenberg, B. 2006b. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1121-1126.
- Kamilova, F., Lamers, G., and Lugtenberg, B. 2008. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in

- tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environ. Microbiol.* 10:2455-2461.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., and Lugtenberg, B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7:1809-1817.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and Zhang, S. A. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.
- Kotrba, P., Inui, M., and Yukawa, H. 2001. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* 92:502-517.
- Kuiper, I., Kravchenko, L. V., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. 2002. *Pseudomonas putida* strain PCL1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:734-741.
- Kundig, W., Roseman, S., and Ghosh, S. 1964. Phosphate bound to histidine in protein as intermediate in novel phospho-transferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 52:1067-1074.
- Leeman, M., Vanpelt, J. A., Hendrickx, M. J., Scheffer, R. J., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1995. Biocontrol of *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85:1301-1305.
- Lengeler, J., Auburger, A. M., Mayer, R., and Pecher, A. 1981. The phosphoenolpyruvate-dependent carbohydrate - phosphotransferase system enzymes II as chemoreceptors in chemotaxis of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 183:163-170.
- Lugtenberg, B. J., Kravchenko, L. V., and Simons, M. 1999. Tomato seed and root

- exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* 1:439-446.
- Maloney, P. E., van Bruggen, A. H. C., and Hu, S. 1997. Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizospheres and in bulk soil. *Microb. Ecol.* 34:109-117.
- Mateos, P. F., Jimenezzurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martinezmolina, E., Hubbell, D. H., and Dazzo, F. B. 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1816-1822.
- Mazumder, R., Phelps, T. J., Krieg, N. R., and Benoit, R. E. 1999. Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. *J. Microbiol. Methods* 37:255-263.
- Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L. C., Hofte, M., and Bakker, P. A. H. M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* 6:177-185.
- Milner, J. L., Silo-Suh, L., Lee, J. C., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3061-3065.
- Narasimhan, K., Basheer, C., Bajic, V. B., and Swarup, S. 2003. Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiol.* 132:146-153.
- Nehl, D. B., Allen, S. J., and Brown, J. F. 1997. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl. Soil Ecol.* 5:1-20.
- Obrien, T. P., Feder, N., and Mccully, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.

- Parkinson, J. S., and Kofoid, E. C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26:71-112.
- Pineros, M. A., Magalhaes, J. V., Carvalho Alves, V. M., and Kochian, L. V. 2002. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol.* 129:1194-1206.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., and Jacobson, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate - carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:543-594.
- Roncato-Maccari, L. D., Ramos, H. J., Pedrosa, F. O., Alquini, Y., Chubatsu, L. S., Yates, M. G., Rigo, L. U., Steffens, M. B., and Souza, E. M. 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:39-47.
- Rosenblueth, M., and Martinez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:827-837.
- Rovira, A. D. 1969. Plant Root Exudates. *Bot. Rev.* 35:35-57.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., and Pare, P. W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134:1017-1026.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., and Kloepper, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4927-4932.
- Saier, M. H., Chauvaux, S., Cook, G. M., Deutscher, J., Paulsen, I. T., Reizer, J., and Ye, J. J. 1996. Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 142:217-230.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., Hartmann, A., and Langebartels, C.

2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29:909-918.
- Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2023-2030.
- Simons, M., van der Bij, A. J., Brand, I., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., and Lugtenberg, B. J. 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:600-607.
- Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S., and Chung, Y. R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89:92-99.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67:257-268.
- Stulke, J., MartinVerstraete, I., Zagorec, M., Rose, M., Klier, A., and Rapoport, G. 1997. Induction of the *Bacillus subtilis* ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol. Microbiol.* 25:65-78.
- Sturz, A. V., and Kimpinski, J. 2004. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant Soil* 262:241-249.
- Toyoda, H., Hashimoto, H., Utsumi, R., Kobayashi, H., and Ouchi, S. 1988. Detoxification of Fusaric Acid by a Fusaric Acid-Resistant Mutant of *Pseudomonas-Solanacearum* and Its Application to Biological-Control of *Fusarium*-Wilt of Tomato. *Phytopathol.* 78:1307-1311.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A., and Pieterse, C. M. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- van Peer, R., Niemann, G. J., and Schippers, B. 1991. Induced resistance and

- phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology* 81:728-734.
- van Peer, R., and Schippers, B. 1992. Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Neth. J. Plant Pathol.* 98:129-139.
- Wilson, D. 1995. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73:274-276.
- Zehnder, G. W., Yao, C. B., Murphy, J. F., Sikora, E. R., and Kloepper, J. W. 2000. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol* 45:127-137.
- Zhang, L., and Birch, R. G. 1996. Biocontrol of sugar cane leaf scald disease by an isolate of *Pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:132-136.
- Zhang, L. H., and Birch, R. G. 1997. The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9984-9989.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764-767.

玖、圖表集



表一、供試菌株及載體

Table 1. Organisms and plasmids used in this study

Organism	Charasteristics or Source
Bacterium	
<i>Bacillus cereus</i> C1L	A natural isolate from <i>Lilium formosanum</i> rhizosphere (a lab strain)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
<i>Escherichia coli</i> GM 2163	F ⁻ <i>dam-13::Tn 9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsx-78 supE44 McrA⁻ McrB⁻</i>
Fungus	
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> Drechsler	A natural isolate from maize (lab strain)

表二、供試載體

Table 2. Plasmids used in this study

Plasmid	Characteristics	Source
pHY300PLK	Shuttle vector, <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> , Ap ^r , Tc ^r	Takara, Japan
pLKptsG	<i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI-digested pHY300PLK ligated with <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI-digested <i>ptsG</i> PCR product, Ap ^r , Tc ^r	This study

表三、引子

Table 3. Primers used in this study

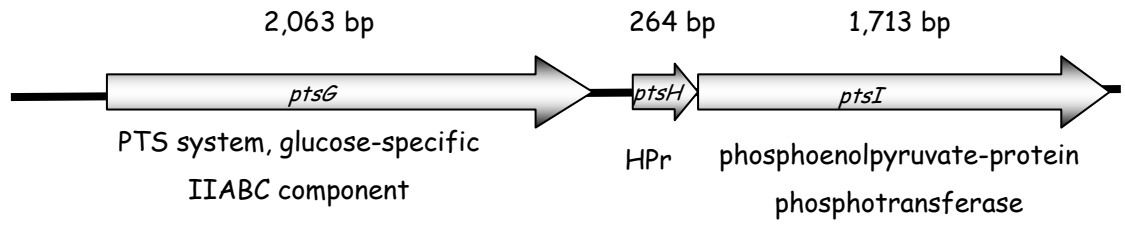
Primer	Sequence (5'→3')	Description	RE site
ptsGHI-F	CCGGA <u>AAGCTT</u> ATCTTCAATATGCTATTGAGAGGG	<i>ptsG</i> -F (upstream 500 bp)	<i>Hind</i> III
390	CCGGG <u>GATCCT</u> CCTACTGAATGTCAATAATAGCGG	<i>ptsG</i> -R	<i>Bam</i> HI
3 genes-f	CCGGA <u>AAGCTT</u> GCAACGCTTAGTAAAGGCAGAG	<i>ptsG</i> -F (upstream 200 bp)	<i>Hind</i> III
3 genes-r	CCGGG <u>GATCCT</u> CAATTCTGTCTCTTATCCTCGATAG	<i>ptsGHI</i> -R	<i>Bam</i> HI
383-fw1	TCGTCGGCTACTTAATTATG	sequence primer	-
383-fw2	CTGTATTTGCTGGTCTATC	sequence primer	-
383-fw3	CAATCTGAAGGCGGAAAAG	sequence primer	-
383-fw4	GAAATTGCACGCTTAGACG	sequence primer	-
384-fw1	TGCTTCTGCTTTTCCTG	sequence primer	-
384-fw2	AAAGAGAATGTTGCAGTTGC	sequence primer	-
384-fw3	CCCTTTCTCTAGCTTACATTCC	sequence primer	-
384-fw4	CTAGTTCAACAACCTTCTTCAGC	sequence primer	-
383-fw5	CGGAACACCAAATGATGTAC	sequence primer	-
383-fw6	GCGATTCACTTGCTATCCCA	sequence primer	-

以底線表示限制酶切位

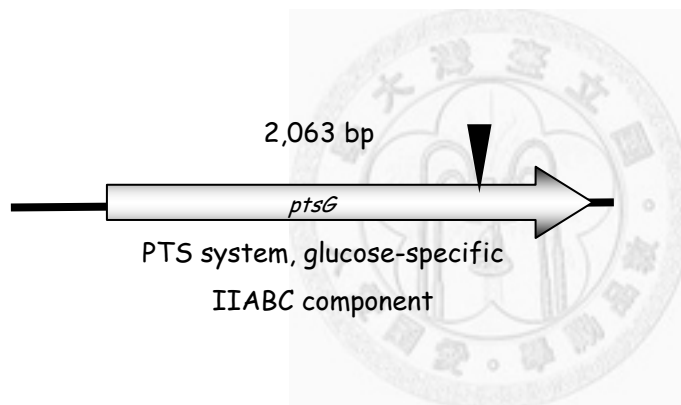
Underlined letters show restriction sites.

RE: restriction enzyme

(A)



(B)



圖一、臘狀芽孢桿菌糖類磷酸根傳遞運輸系統基因組成圖

Figure 1. Genetic organization of the PTS system genes in *B. cereus*

(A) *B. cereus* ATCC 14579.

(B) M71.

1 ATCTTCAATA TGCTATTGAG AGGGTAAAA AAGGAGAAAA AGTAGAGGAA TCGCAAAGTT TTGCTGATT ATTAAGGGCG GAGTATCCAG CTTGCTATAA
101 CTTGCGTTGG AAGCTAGTTA AGGTCATGCA AAAAGAGTTG CAACTACCTG TATATGAAGC TGAAGTATT TATTTAACGA TGCACCTGCA ACGCTTAGTA
201 AAGGCAGAGC ATGTGTAATA AGCCATATAT TTTTGTCTAA AATGAA⁻³⁵ACGTTAAAAAAA TGATGTAATC GCTTACAATA GTTAT⁻¹⁰GTATA ATAACACTATG
301 CAAAGTTATA CAAATTTGCA CAAACACATT AAGGTGAGTA ACGAAAAAGT TTGCCTTAAT TATAGTGAAC TTATACGTAAC ACCTATTTTT GACACGTGTT
401 ACTGATTGCA TCAGGCATGA GTGGAGAAAA GTAA^{GAATG TAAGCTAGAG AAAGGC}ATAT ACTACCTTT GTATAGCTAT CGTTCATCT TTTTTTCCTC
← 384-fw3

501 ATGTCTTTTT GCGTTTGTG GGAAGGTATC AATATAGATA AGAG^{AGGAAG G}GTTTCC^{ATG}TTAAGAAGA TCTTTGGTGT TCTTCAAAA GTCGAAAAAG
601 CGTTAATGCT TCCAGTAGCG ATTTTACCGG CGGCAGGTAT TTTACTTGA TTTGGTAATG CATTTCAAA TCCACAGTTA ACAAATGTTA TTCTGCTTT
701 AAAAGCAGAT TGGTTCGTAA TGGTTGCAAA AATTATGGAA CAATCTGGTG ATATTATTTT CGTAACTCT GCATTATTAT TCGCAGTTGG GGTAGCAATT

383-fw1 →

801 GTTTACGCTG GTGAGACGG AGTAGCTGGT TTAGCAGCAT ^{TCGTCGGCTA CTTAATTATG}AAAAACGA TGAGTGTGTT CTTAGAAGTA GATAAGCTAG
901 TGAAAGTAAC AAGTTCTGGA GCAGACCCAG TAAAAATTGG ATTTGCAGAT CCAGCGTATG CAAACGTATT AGGTATTCCA ACGCTACAAA CAGGGGTATT
1001 TGGTGGTATT ATCGTCGGTA TAGTAGCGGC ATATTGCTAT AATAAATACT TCAATATTGA ATTACCATCA TACTTAGGTT TCTTTGCAAG TAAGCGTTTC
1101 GTACCGATT ^{G CAACTGCAAC ATTCTCTT}A ATAGTAGTA TTATCATGTG CTTCTGTTGG CCATACATTC AAGGTGGCTT AAACACGTTT TCACATCAAA

← 384-fw2

1201 TGATTGATGC AAATAGAACA ATTGCAGCAT TTATATTGCG TTTAATTGAA CGTTCATTAA TTCCATTTGG ATTACATCAC ATTTTCTATT CACCGTTCTG
1301 GTTCGAATTC GGTGAGTATA CAAATGCAAG TGGCGAATTA ATCCGTGGTG ACCAAAAAAT CTTTATGGCA CAGTTAAAAG ACGGTGTAGA ATTAACAGCA
1401 GGGACATTTA CAACTGGTAA GTATCCGTTT ATGATGTTTC GTCTTCCAGC AGCAGCTTTA GCAATGTACC ATGAAGCAGC TCCAGAAAAA AAAAAATTAG
1501 CAGCAGGTAT TTTAGGTTCT GCAGCATTAA CATCTTCTT AACAGGTATT ACAGAGCCAC TTGAATTTTC ATTCTTATTC GTAGCGCCAG TATTATTGCG

383-fw2 →

1601 AATTACAG^{CT GTATTGCTG GTCTATC}ATT TATGACAATG CAAATTTTGA GTGTAAAAAT TGATATGACA TTCTCTGGTG GTTAAATGTA CTTCTTATTA
1701 TTCGGTGTAC TACCAGGCCG TACAGCATGG TGGTGGGTAA TTATTGTTGG TCTTGTACTA GCAGTTATTT ACTACTTCCG ATTCCGCTTT GCAATTCGTA
1801 AATGGAATCT AAAAACACCTT GGTGCTGAAG TGGCAATGC AAATGACGGC G^{CAGGAAAAG CAGAAGCA}CG CGAACTCCCT CGTGAAGTAT TAGTAGCACT

← 384-fw1

1901 TGGTGGTAAA GAAAAATG CTTCTTTAGA TGCTTGTATT ACTCGTTTAC GTGTTCAGT TAACGAACAA AAGAATGTAA ACAAAGACCG CTTAAAAAGAA
2001 CTTGGAGCAG CTGGTGTACT TGAAGTTGGA AATAACATTC AAGCTATTTT CGGACCGAAA TCTGACACAT TAAATACAA AATTATGAT ATTTATGTCAG
2101 GTCGTACACC TCATGTTGAA AAAGAAGAAC CTGTAAGAGT GGAAGAACT CCTCAAAAAG TTGATGAAA TGAAACAATT GTATCACCAA TCGAAGGAAA
2201 AATCTTACCA ATTACAGAAG TACCTGACCA AGTATTCTCA GAAAAAATGA TGGGAGACGG ATTTGCAATT GAGCCAAGT AAGGAACAGT AGTTTCTCCA

383-fw3 →

2301 GTGAACGGT AGATTGTCAA TGTATTCCCT ACAAACATG CGATTGGTAT T^{CAATCTGAA GCGGAAAAG}AAATTTAAT TCACTTCGGT ATTGATACTG
2401 TAAAAATAA TGGTGAAGT TTTGAAGCGC TTGTAGCACA AGGCGACAAG GTGAAACAAG GCCAACCAT ATTAAGAATA GATCTTGCAT TTGTAAGAAG
2501 AAATGACCA TCTATCATT CACCAATTGT CTTTACAAC TTACAACAAG GCAACAAGT CGAATTGAAA AAAGATGGAA ATGTTAAGAA GGGCGAAACC
2601 GCTATTATTG ACATTCAGTA ^{GGAATTTGAC}GCAAATGTT TATAATTATA ATAGCGGATG TGTTGACCG AACATCGCTT ATTATATACA ATAGATGATG
2701 TAGTACTCAC GTCTATACAA CTAATAATA CTGTAATTTA AAGGAGATAA ATTATC^{ATGG AAAAAATCTT TAAAGTAACT AGCGACTCAG GAATTCATGC}
2801 ^{TCGTCCAGCA ACTCTACTTG TAAACTGTC AAGCAATTC GGTCTGATA TTAACCTAGA GTATAACGGA AAGAACGTTA ACTTAAAAATC AATCATGGGC}
2901 ^{GTATGTCTTT TAGGCATTTA ACAAACGCA GAAATTAATA TCACTGCAAA TGGTGTGAT GCAGCTCAAG CACTAGCAGC TATCGAAGAA ACTATGAAAA}
3001 ^{ACGAAGGATT AGGAGAAATA} TGACTCTTAA CATTCAAGGG ATCGCTGCAT CAAGTGGGAT TGCTATTGCA AAGGCTTCA GACTTAAAA TCCTGAATTT

383-fw4 →

3101 AACATCGAAA AGAAATCAAT TACAACGAA GCTGCA^{GAATG TGCACGCTT AGACC}CTGCG CTTGAGAAA CAAAACTGA ATTAGAAGCT ATTAAGGACC
3201 ACGCATTTGC TGAGCTAGT GCTGACAAAG CTGCAATCTT TGAAGCACAT TTATTAGTGT TAAATGATCC AGAACTAGTA AACCCAGTAA AAGATAAAGT
3301 AAATAGCGAA AAGTAAATG CTGAATTTGC AATGATGAA GTTGATCATA TGTTTTATTC TATGTTTGA AACTAGGATA ACGAATATAT GAAAGAACGT
3401 GCTGCGGACA TTCGTGACGT ACAAACGCG GTTCTTGAC ATTTACTAGG AATTAACCTC TCAAACTCCT GTACAATTT TGAAGAGTA ATCATCATTT
3501 CTGAAGATTT AACACCATCT GATACAGCTC AGTTAAACCG TAAGTATGCA AAAGTTTTCA CTACTGATAT CGGTGGACGT ACATCTCACT CAGCAATTAT
3601 GGCTCGTTCT ATGAAATTC CAGCTGTTGT TGGTACAAA GTTGTATG AGAAAAATCCA AAACGGCGAT ATCGTTATCA TTGACGGTTT AGATGGAGAA
3701 GTAATTTGAA ACCCATCAGA AGAACTCTT CGTTCGTTG AAGAAAAAGAA AGCGAAATTT GAAGAGCAA AAGCTGAATG GGCTAATTA AAGAACCAAG

383-fw5 →

3801 CTACTGTAAC AAGTGACGGA CATCACGTTG AGCTTGTGTC AAATAT^{GGA ACACCAAATG ATGTAC}AAGG TATTATCGAT AATGGCGGAG AAGCGTTGG
3901 CTTATACCGT ACAGAATTTT TATACATGGG CCGTGACAAAT CTTCCAACAG AAGAAGAGCA GTTCGAAGCG TATAAAGCAG TTCTTGAAGG TGTAAGAAGAA
4001 GGTCAACCCAG TCGTTGTTG TACACTTTGAT ATCGGTGGAG AATAAGAGCT TCCATACTTA CATTTCACAA AAGAAATGAA CCCATCTTCA GGATATCGTG
4101 CAATTCGCTT ATGCTTTGAT GAGCAAGATG TGTCCGTAC ACAACTTCGT GCATTACTTC GTGCTAGCGT ATACGGTAAC TTAATAATTA TGTTCCTCAAT
4201 GATTGCAACT CTTGATGAGT TCCGTCAAGC GAAAGCAATT TTATTAGAAG AGAAAGCGAA ACTTGTAGAA GCGGGTACAA CTGTTTCTGA TTCTATTGAA
4301 GTTGTATGTA TGGTTGAAAT CCCAGCTTCA GCAGTATTAG CAGATCAATT CGCGAAAGAA GTTGACTTCT TCTCTATCGC AACAAATGAT TTAATCCAAT
4401 ACACAATGGC TGCAGACCGT ATGAACGAAC AAGTATCATA CTTATACCAA CCATATAACC CATCTATTTT ACGTCTTGA AGAATGGTTA TCGATGCTGC

383-fw6 →

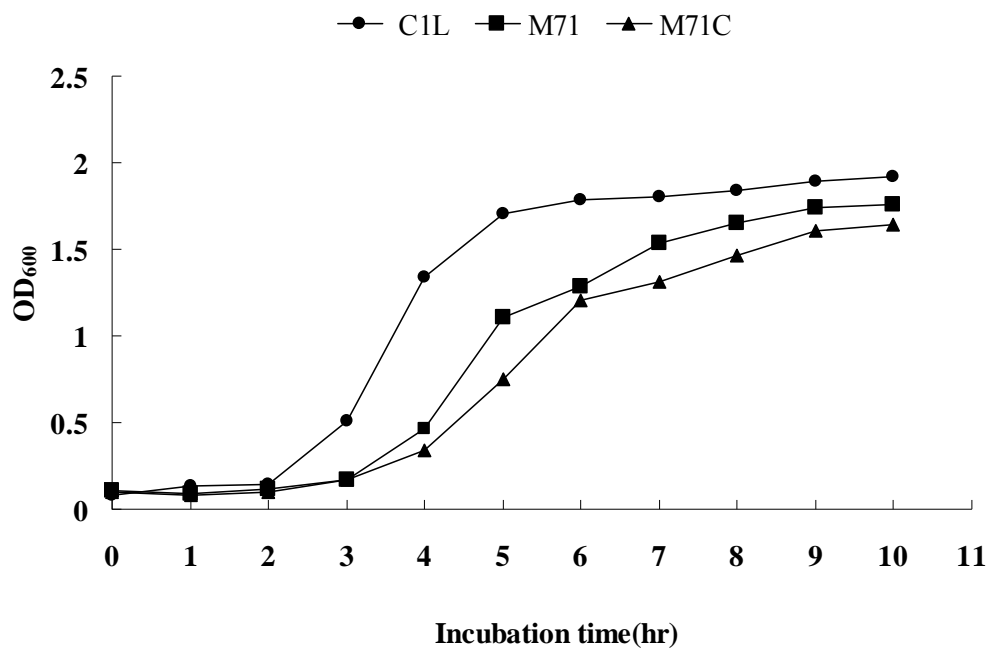
4501 TCATAAGAA GAAAAATGG CTGGTATGTG TGGTGAATG GCG^{GCGATT CACTTGCTAT CCCA}TTACTA TTAGGATTAG GGTTAGATGA GTTCAGTATG
4601 AGTGCAACAT CTATTTCTCC TGCAAGAACA CAGCTAAGCA AGTTGTCAA AGCAGAAATG GGAACATTAG CAGAAAAAGC ATTAATGATG TCAACTGCTG
4701 AAGAAGTTGT TGAACATGTT ^{AA}AAGCATCT AATTAATAAA AAAACCTGAG TCGATTTGAA ATCGGTTCTA GGTTTTTTCT ATGAGAAAAG TAAATCTTAT

圖二、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 *ptsG* 及下游 *ptsH*、*ptsI* 之基因序列

Figure 2. *ptsGHI* sequences of *B. cereus* C1L

箭頭為 383-fw1、383-fw2、383-fw3、383-fw4、384-fw1、384-fw2、384-fw3、384-fw4、384-fw5 及 384-fw6 等定序引子起始方向處，框線為其序列。雙底線為預測之-35 及-10 區域，黑底白字為 RBS 預測區域。起始碼 ATG 與終止碼 TAG 分別以粗底線標示。序列 557-2,621 為 *ptsG* 基因序列、序列 2,755-3,020 為 *ptsH* 基因，而序列 3,020-4,722 則為 *ptsI*，皆以灰底標示，*ptsH* 之終止起始碼 TAA 位於 3,018-3,020 bp 處，*ptsI* 起始碼 ATG 則位於 3,020-3,022 bp 處，與終止碼 TAG 分別以粗底線標示，*ptsH* 與 *ptsI* 之起始碼與終止碼在 3,020 bp 處重疊，推測有 frameshift 之可能性。





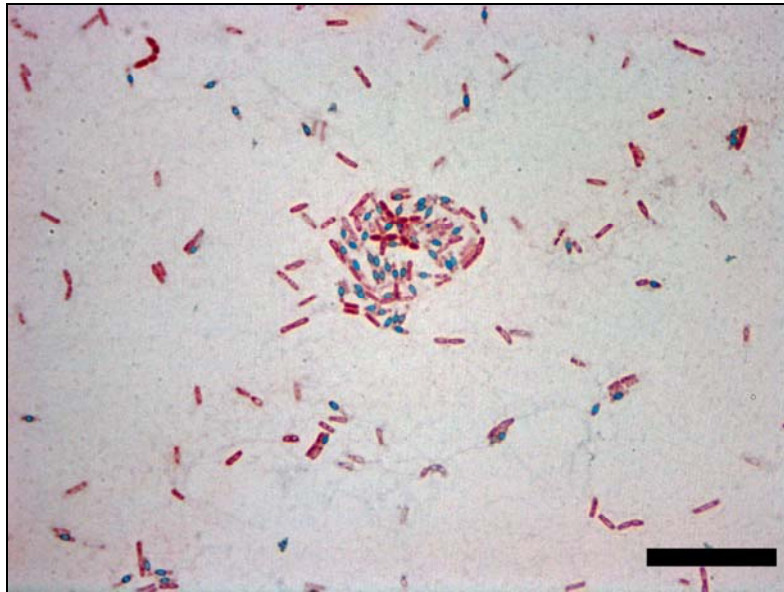
圖三、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、M71 突變株及 M71C 互補株之生長曲線

Figure 3. Growth curve of *B. cereus* C1L, M71 and M71C

C1L 菌株培養於液態培養基 LB，以 OD₆₀₀ 測量其吸光值，第 3 小時後已進入指數生長期(log phase)，至第 5 小時進入停滯期(stationary phase)，直至第 12 小時仍維持在停滯期的狀態；而突變株 M71 較野生株生長速度緩慢，培養 4 小時後才進入指數生長期，至第 9 小時進入停滯期；互補株 M71C 約於培養 4 小時後進入指數生長期，至第 9 小時進入停滯期。

^a 3 次獨立實驗。

(A)



(B)

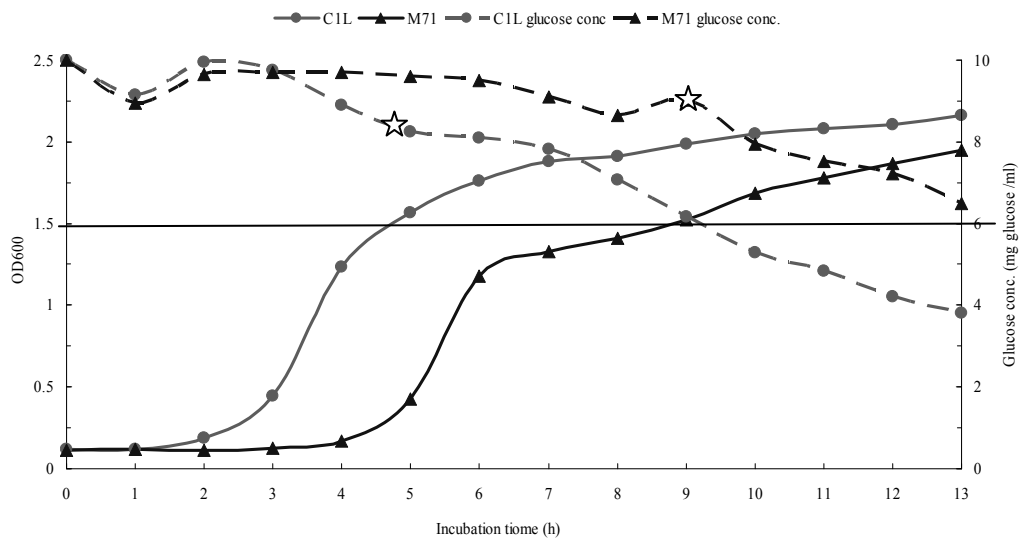


圖四、內孢子染色

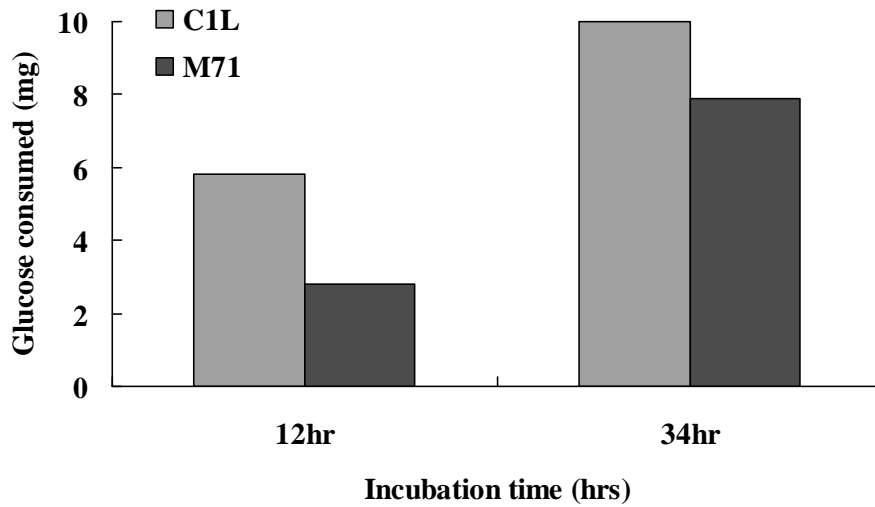
Figure 4. Endospore staining

臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株與突變株 M71 培養於 3 毫升液態 LB 培養基 96 小時之後，進行內孢子染色，紅色為 vegetative cells，藍綠色為內孢子。C1L 菌株產孢數量較高，而突變株 M71 不產孢。(A) C1L；(B) M71。比例尺：20 μm 。

(A)



(B)



圖五、葡萄糖利用能力測試

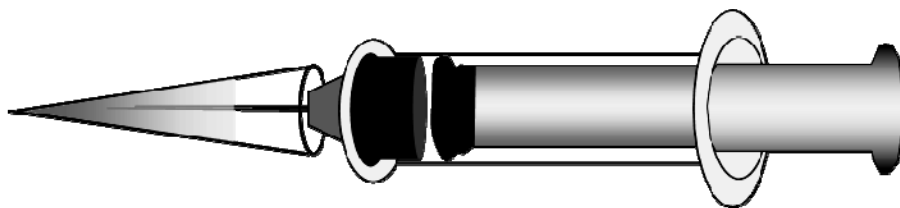
Figure 5. Ability of glucose utilization

臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株與突變株 M71 繼代培養於 100 毫升含有 1% 葡萄糖之液態 LB 培養基後，每隔 1 小時偵測其 OD₆₀₀ 及培養基內葡萄糖濃度，突變株 M71 利用葡萄糖之能力低於 C1L 菌株。(A) 生長曲線及培養基內葡萄糖含量，☆表示 C1L 菌

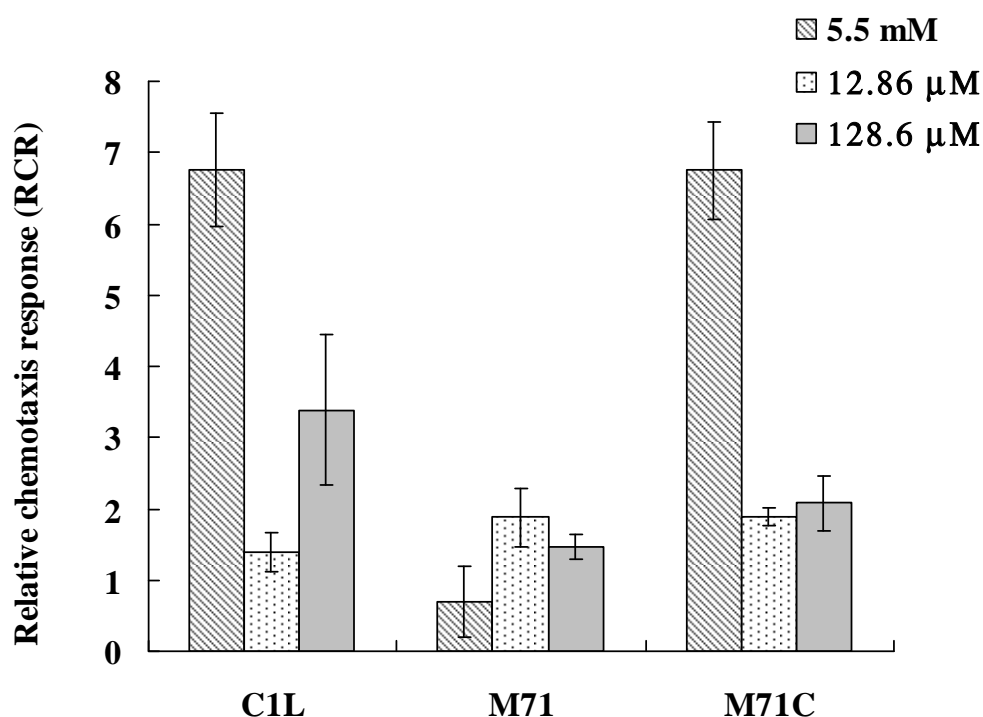
株及 M71 在 OD_{600} 為 1.5 情形之下，培養液中葡萄糖的濃度；(B) 固定時間內 C1L 菌株與 M71 消耗葡萄糖。



(A)



(B)



圖六、葡萄糖趨向性測試

Figure 6. Chemotactic response toward glucose

臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、突變株 M71 及互補株 M71C 繼代培養於 3 毫升之液態 LB 培養基 8 小時後，調整其濃度為 10^8 cfu/ml，取 200 μl 至 200 μl 體積之微量吸管尖。另以拋棄式注射針筒吸取欲進行趨向性試驗的液體至針筒刻度 0.1 毫升處，將針頭插入帶有菌液的微量吸管尖，平放 45 分鐘後，將注射針筒中的液體序列稀釋，並進行塗盤計數，最後計算相對趨向反應。

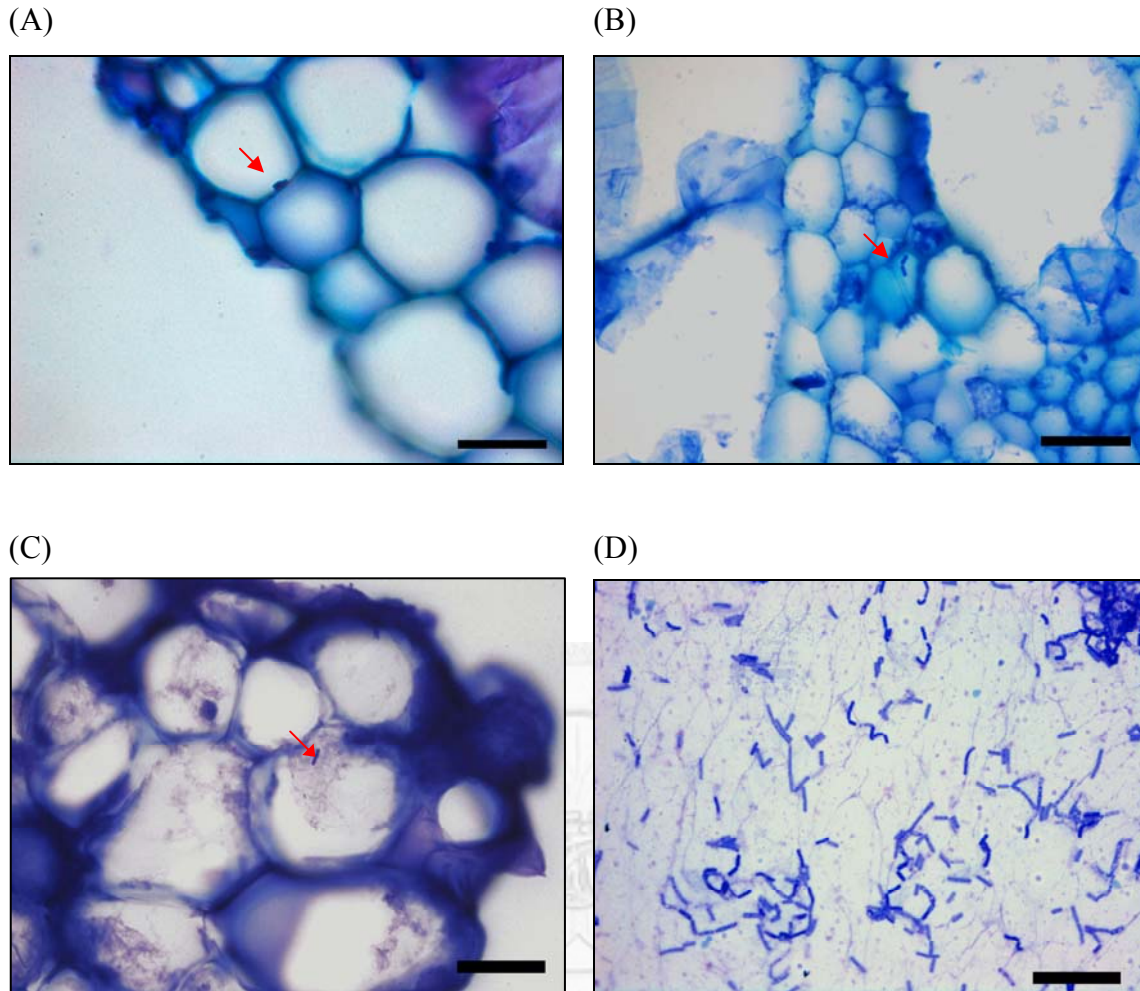
(A) 裝置圖；(B) 臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株與突變株 M71 對 0.1% (5.5 mM) 葡萄糖趨向性

以斜線表示，試驗結果發現，C1L 菌株及互補株 M71C 對 0.1% 葡萄糖的趨向性大於 2，而突變株 M71 的相對趨向反應指數則小於 2，顯示破壞 *ptsG* 會影響臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株對葡萄糖之趨向性；自玻璃珠培養系統回收之玉米根部泌出液，經換算後葡萄糖濃度約為 12.68 μM ，以 12.68 μM 葡萄糖進行趨向性試驗並計算相對趨向反應，試驗結果發現 C1L 菌株、突變株 M71 及 M71C 對 12.86 μM 葡萄糖的相對趨向反應指數均小於 2；以 10 倍之玉米根部泌出液葡萄糖濃度 126.8 μM 進行趨向性試驗並計算相對趨向反應，此時臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株及互補株 M71C 對 126.8 μM 葡萄糖具趨向性，而 M71 不具趨向性。

^a $\text{RCR} > 2$ 時，表示對該物質具有顯著之趨向性。

^b 每次實驗進行 3 重複，3 次獨立實驗。

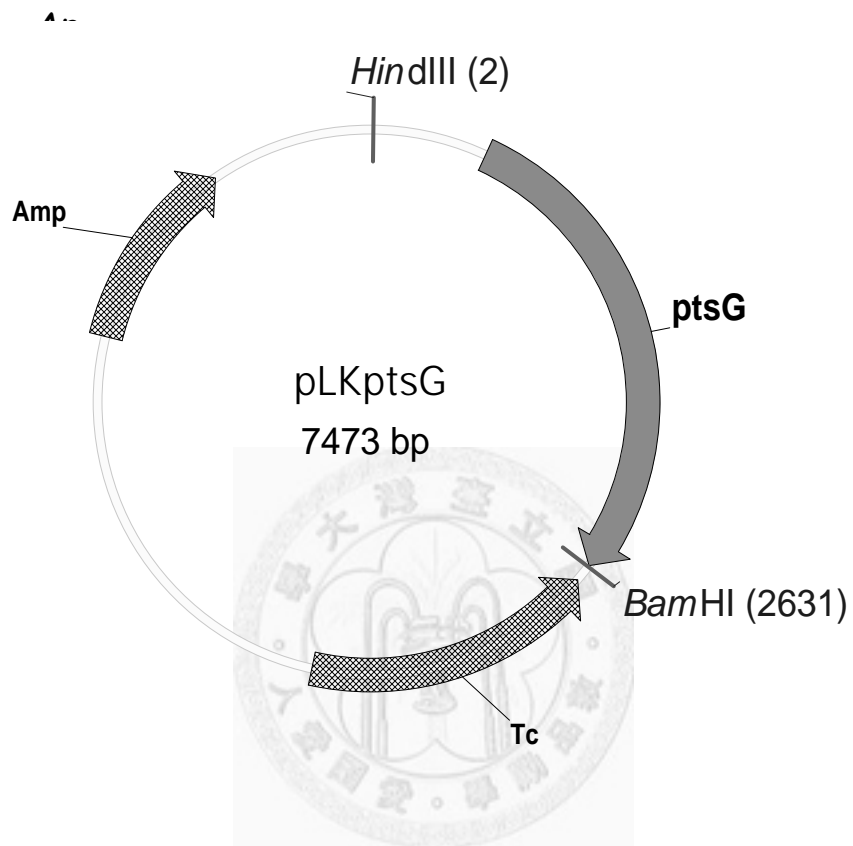




圖七、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株與互補株 M71C 群聚於玉米根部

Figure 7. Colonization of *B. cereus* C1L and M71C in the roots of maize seedlings

將玉米無菌培養於每一克混有無菌水懸浮之 10^7 個細菌之蛭石 (10^7 cfu/g vermiculite)，並於組織培養室中培養，於五天後冷凍切片，並以 toluidine blue O 染色觀察。(A) 玉米根部表皮細胞間隙切片圖(C1L 菌株)；(B) 玉米根部周鞘切片圖(C1L 菌株)；(C) 玉米根部表皮細胞間隙(M71C)；(D) 臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株培養於 LB 液態培養基 14-16 小時後，以 toluidine blue O 染色觀察情形。紅色箭號指細菌位置。比例尺：20 μm 。



圖八、pLKptsG 圖譜

Figure 8. The map of pLKptsG

ptsGHI-f

→

1 **AGCTTATCT TCAATATGCT ATTGAGAGG** TGAAAAAAGG AGAAAAAGTA GAGGAATCGC AAAGTTTTGC TGATTATTA AAGGCGGAGT ATCCAGCTTG
101 CTATAACTTG GCTTGAAGC TAGTTAAGGT CATGCAAAAA GAGTTGCAAC TACCTGTATA TGAAGCTGAA AGTATTATT TAACGATGCA CTGCAACGC
201 TTAGTAAAG CAGAGCATGT GTAAAAAGCC ATATATTTTT GTCTAAAAATG AAAACGTAA AAAAATGAT TGAATCGCTT ACAATAGTTA TGTATAATAA
301 CTATTGCAAA GTTATACAAA TTTCGACAAA CACATTAAGG TGAGTAACGA AAACGTTTGC CTTAATTATA GTGAACCTAT ACGTAAACCT ATTTTGGACA
401 CGTGTACTG ATTCTGATCAG GCATGAGTGG AGAAAAAGTAA GGAATGTAAG CTAGAGAAAG GGATATACTA CCCTTTGTAT AGCTATCGTT CTATCTTTTT
501 TTCCTCATGT CTTTTTGGCG TTTGTCGGAA GGTATCAATA TAGATAAGAG AGGAAGGGTT **TCCATGTTTA** AGAAGATCTT TGGTGTCTT CAAAAAGTCG
601 GAAAAGCGTT AATGCTTCCA GTAGCGATTI TACCGCGGC AGGTATTTTA CTGGATTGG GTAATGCATT TCAAAAATCCA CAGTTAACAA ATGTATTGCC
701 TGCTTTAAAA CGAGATTGGT TCGTAATGGT TGCAAAAATT ATGGAACAAT CTGGTGATAT TATTTTCGCT AACCTTGCAT TATTATTCGC AGTTGGGGTA
801 GCAATTGGTT TAGCTGGTGG AGACGGAGTA GCTGGTTTAG CAGCATTCTG CGGCTACTTA ATTATGAACA AAACGATGAG TGTGTTCTTA GAAGTAGATA
901 AGCTAGTGAA AGTAACAAGT TCTGGAGCAG ACCCAGTAAA AATTGGATTI GCAGATCCAG CGTATGCAAA CGTATTAGGT ATTCCAACGC TACAACACGG
1001 GGTATTGGT GGTATTATCG TCGGTATAGT AGCGGCATAT TGCTATAATA AATACTTCAA TATTGAATTA CCATCATACT TAGGTTCTT TGCAGTAAG
1101 CGTTTCGTAC CGATTGCAAC TGCAACATT CTTTAAATAG TAGTATTAT CATGTGCTTC GTTTGGCCAT ACATTCAAGG TGGCTTAAAC ACGTTCTCAC
1201 ATCAAAATGAT TGATGCAAA AGAACAATTG CAGCATTAT ATTCGGTTTA ATTGAACGTT CATTAAATCC ATTTGGATTA CATCACATTT TCTATTACC
1301 GTTCTGGTTC GAATTCGGTC AGTATACAAA TGCGCTGGC GAATTAATCC GTGGTGACCA AAAAATCTTT ATGCAACAGT TAAAAGACGG TGTAGAATTA
1401 ACAGCAGGGA CATTTACAAC TGGTAAGTAT CCGTTCATGA TGTTCGGTCT TCCAGCAGCA GCTTTAGCAA TGTACCATGA AGCAGCTCCA GAAAATAAAA
1501 AATTAGCAGC AGGTATTTTA GGTCTGCAG CATTAAACATC TTTCTTAACA GGTATTACAG AGCCACTTGA ATTTTCATTC TTATTCTGAG CGCCAGTATT
1601 ATTCGGAATT CACGCTGTAT TTGCTGTCT ATCATTTATG ACAATGCAAA TTTTAGGTGT TAAAATGGT ATGACATTC CTGGTGGTTT AATTGACTTC
1701 CTATTATTTCG GTGTACTACC AGGCCGTACA GCATGGTGGT GGGTAATTAT TGTGGTCTT GTACTAGCAG TTATTTACTA CTTCGGATTC CGCTTTGCAA
1801 TTCGTAATG GAATCTAAA ACACCTGGT GTGAAGTGGC AAATGCAAAAT GACGCGCAG GAAAAGCAGA AGCAGGCGAA CCCCCTCGT AAGTATTAGT
1901 AGCACTTGGT GGTAAAGAAA ACATTGCTTC TTTAGATGCT TGTATTACT GTTTACGTGT TCAAGTTAAC GAACAAAAGA ATGTAACAAA AGACCCTTAA
2001 AAAGAACTTG GAGCAGCTGG TGTACTTGAA GTTGAAAATA ACATTCAAGC TATTTTCGGA CCGAAATCTG ACACATTAATA ATCACAATTT CATGATATTA
2101 TGTCAAGTGC TACACCTCAT GTTAAAAAG AAGAACCTGT AAAAGTGGAA GAACTCTCT AAAAAGTTGA TGAAAAAGTA ACAATTGTAT CACCAATCGA
2201 AGGAAAAATC TTACCAATTA CAGAAGTACC TGACCAAGTA TTTCTAGGAA AAATGATGGG AGACGGATTI GCAATTGAGC CAACTGAAGG AACAGTAGTT
2301 TCTCCAGTGA ACGGTGAGAT TGTCAATGTA TTCCCTACAA AACATCGAT TGGTATTCAA TCTGAAGCG GAAAAGAAAT TTAATTCAC TTCGGTATTG
2401 ATACTGTAAA ATTAATAGTT GAAGTGGT AAGCGTGTG AGCACAGGC GACAAGTGA AACAGGCCA ACCATTATTA AAAGTAGATC TTGATTGTG
2501 AAAAGAAAAT GCACCATCTA TCATTACACC AATTGTCTTT ACAAACTTAC AACAGGGCA ACAAGTCGAA TTGAAAAAG ATGGAATAGT TAAGAAGGGC
2601 GAAA **CCGCTA TTATTGACAT TCAGTAGGAG GATCC** CCGGG AATTCCTGT ATAAAAAAG GATCAATTTT GAACCTCTC CCAAAGTTGA TCCCTTAAAG

← 390

2701 ATTTAGAAAT CCCTTGGAGA ATGTTTATAT ACATTCAAGG TAACCAGCCA ACTAATGACA ATGATTCTCG AAAAAGTAA TAACAATTA CTATACAGAT
2801 AAGTTGACTG ATCAACTTCC ATAGGTAACA ACCTTTGATC AAGTAAGGGT ATGGATAATA AACCACTAC AATTGCAATA CCTGTTCCCT CTGATAAAAA
2901 GCTGTTAAAG TTAAGCAAA TCATTCCAGC ACCAGCTTCC TGCTGTTTCA AGCTACTTGA AACAAATGTT GATATAACTG TTTTGGTGA CAAAGGCCCA
3001 CCTAAAACAA ATACGATTAT AATTGTATG AACCATGATG TTTTCTTAA AAGAAAGGAA GCAGTTAAAA AGCTAACAGA AAGAAATGTA ACTCCGATGT
3101 TTAACACGTA TAAAGGACCT CTTCTATCAA CAAGTATCCC ACCAATGTAG CCGAAAATAA TGCACTCAT TGTCCAGGG AAAATAATTA CACTTCCGAT
3201 TTCGGCAGTA CTTAGCTGTT GAACATCTTT CATCATATAA GGAACCATAG AGACAAACCC TGCTACTGTT CCAATATAA TTCCCCACAA AAGAATCCA
3301 ATCATAAAAG GTATATTTTT CCCTAATCCG GGATCAACAA AAGGATCTGT TACTTTCTCG ATATGTTTTA CAAATATCAG GAATGACAGC ACGCTAACGA
3401 TAAGAAAAGA AATGCTATAT GATGTTGTA ACAACATAAA AAATACAATG CCTACAGACA TTAGTATAAT TCCTTTGATA TCAAAATGAC CTTTTATCCT
3501 TACTTCTTC TTTAATAATT TCATAAGAAA CGGAACAGTG ATAATTGTTA TCATAGGAAT GAGTAGAAGA TAGGACCAAT GAATATAATG GGCTATCATT
3601 CCACCAATCG CTGGACCGAC TCCTTCTCCC ATGGCTACTA TCGATCCAAT AAGACCAAT GCTTTACCC TATTTCTCT TGAATATAG CGCGCAACTA
3701 CAACCATTC GAGTGTGGA AATGACGCTG CACCAGCCCC TTGAATAAAA CGAGCCATAA TAAGTAAGGA AAAGAAAGAA TGGCAACAA ACCCAATTAC
3801 CGACCCGAAA CAATTTATTA TAATTCAAA TAGGAGTAAC CTTTGTATGC CTAATTGATC AGATAGCTTT CCATATACAG CTGTTCCAAT GAAAAGGTT
3901 AACATAAAG CTGTGTTTAC CCAGTTTGTG CTGCGAGGTG GTTTATTAAA ATCATTGCA ATATCAGGTA ATGAGACGTT CAAAACCAT TCAATTAATA
4001 CGCTAAAAAA AGATAAAATG CAAAGCCAAA TAAAAATTTG GTTGTGCTG AAATTCGATT GTGAATAGGA TGTATTACA TTTCAACCTC CAATAATGAG
4101 GGCAGACGTA GTTTATAGGG TTAATGATAC GCTTCCCTCT TTTAATTGAA CCCTGTTACA TTCATTATTC ATTACACTC ATAATTAATT CCTCCTAAAC
4201 TTGATTAATA CATTTTACA CATATAAACT AAGTTTTAAA TTCAGTATT CATCACTTAT ACAACAATAT GGCCCGTTG TTGAACTACT CTTTAATAAA
4301 ATAATTTTT CGTTCCCAAT TCCACATTGC AATAATAGAA AATCCATCTT CATCGGCTTT TTCGTATCA TCTGTATGAA TCAAATCGCC TTCTTCTGTG
4401 TCATCAAGGT TTAATTTTT ATGTATTCT TTTAACAAC CACCATAGGA GATTAACCTT TTCGTTGTA AACCTTCTC CAAATCAGAC AAACGTTTCA
4501 AATTCTTTTC TTCATCATCG GTCATAAAAT CCGTATCCTT TACAGGATAT TTTGCGATTI CGTCAATTGC CGATTGTATA TCCGATTIAT ATTTATTTTT
4601 CGTTCGAATC ATTTGAACTT TTACATTTGG ATCATAGTCT AATTTCATTG CTTTTTCCA AAATGAAATC CATTGTTTTT GATTCAGTA GTTTCTGTGA
4701 TTCTTAAAA AAGTTGGTTC CACACATACC AATCATGCA TGTGCTGATT ATAAGAATTA TCTTTATTAT TTATTGTGAC TTCCGTTGCA CGCATAAAAC
4801 CAACAAGATT TTTATTAATT TTTTATATTT GCATCATTCG GCGAAATCTT TGAGCCATAT CTGACAACT CTTATTAAAT TCTTCGCCAT CATAAACATT
4901 TTTAACTGTT AATGTGAGAA ACAACCAACG AACTGTTGGC TTTTGTAAA TAACCTCAGC AACAACTTT TGTACTGAA TGCCATGTTT CATTGCTCTC
5001 CTCAGTTGC ACATTGGACA AAGCCTGGAT TTACAAAACC ACATCTGATA CAACCTTCTT TCGCCTGTTT CACGATTTT TTTATACTCT AATATTTTCAG
5101 CACAATCTTT TACTCTTTCA GCCTTTTAAA ATTCAGAAT ATGCAGAAGT TCAAAGTAAT CAACATTAGC GATTTCTTT TCTCTCCATG GTCTCACTTT
5201 TCCACTTTTT GTCTGTGCA CTAACACCTT TGATTTTTCA TCTGAATAAA TGCTACTATT AGGACACATA ATATTAAGAA AAACCCCAT CTATTTAGTT

```

5301  AATTGTTTGG TCACTTATAA CTTTAAACAGA TGGGGTTTTT CTGTGCAACC AATTTTAAAGG GTTTTCCAAT ACTTTAAAAC ACATACATAC CAACACTTCA
5401  ACGCACCTTT CAGCAACTAA AATAAAAAATG ACGTTATTTC TATATGTATC AAGATAAGAA AGAACAAAGT CAAAACCATC AAAAAAGAC ACCTTTTCAG
5501  GTGCTTTTTT TATTTTATAA ACTCATTCCC TGATCTCGAC TTCGTTCTTT TTTTACCTCT CGGTTATGAG TTAGTTCAAA TTCGTTCTTT TTAGGTTCTA
5601  AATCGTGTTC TTCTTGAAT TGTGCTGTTT TATCCTTTAC CTTGTCTACA AACCCCTTAA AACGTTTTT AAAGGCTTTT AAGCGTCTGT ACGTTCCTTA
5701  AGGAATTATT CCTTAGTGCT TTCTAGGTTA ATGTCATGAT AATAATGGTT TCTTAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTCGCGC GAACCCCTAT
5801  TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT AACCCGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
5901  CAACATTTCG GTGTCGCCCT TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
6001  AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAAGCT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
6101  TAAAGTCTCG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTGAC GCCGGGCAAG AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTGAGTAC
6201  TCACCACTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT ATGCAGTGTG GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
6301  TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC
6401  CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCAAGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA CGTTGCGCAA ACTATTAAC TGGCAACTAC TTACTIONAGC TTCCCGGCAA
6501  CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG CTCGCCCCTT CCGGCTGGCT GGTTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
6601  AGCGTGGTTC TCGCGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
6701  ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGTT AACTGTGAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTAGATTGA TTTAAAACCT
6801  CATTTTTAAT TAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT GACCAAAATC CCTTAACTG AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCT
6901  TAATAAGATG ATCTTCTTGA GATCGTTTTG GTCTGCGCGT AATCTCTTGC TCTGAAAACG AAAAAACCGC CTTGCAGGGA GTTTTTTCGA AGGTTCTCTG
7001  AGCTACCAAC TCTTTGAACC GAGGTAAGT GCTTGCAGGA GCGCAGTCAC CAAAACCTGT CCTTTCAGTT TAGCCTTAAC CGGCGCATGA CTTCAAGACT
7101  AACTCCTCTA AATCAATTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGT GCTTTTGATC GTCTTTCGCG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG
7201  TCGGACTGAA CGGGGGTTC GTGCATACAG TCCAGCTTGG AGCGAACTGC CTACCCGGAA CTGAGTGTC A GCGTGGAAAT GAGACAAACG CGGCCATAAC
7301  AGCGAAATGA CACCGTAAA CCGAAAGGCA GGAACAGGAG AGCGCACGAG GGAGCCGCCA GGGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCTC GTCGGGTTTT
7401  GCCACCACTG ATTTGAAGCT CAGATTCGT GATGCTTGC AGGGGGCGGA GCCTATGGAA AAACGCTTG CCC

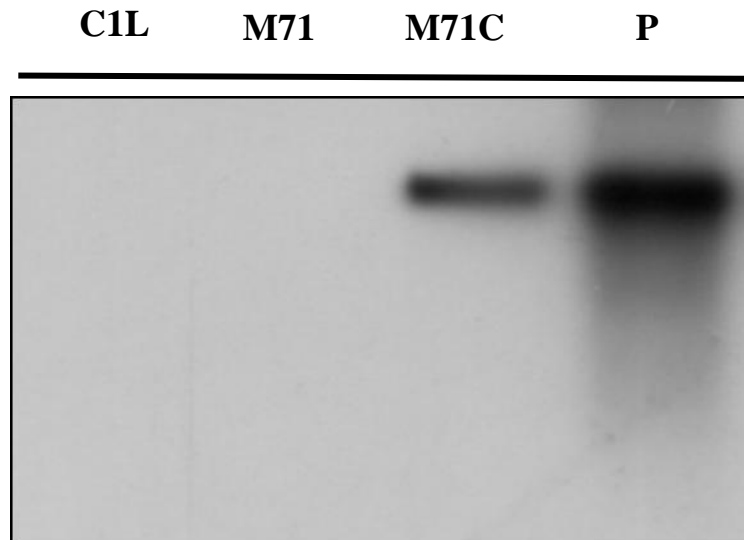
```



圖九、pLKptsG 序列

Figure 9. The sequences of pLKptsG

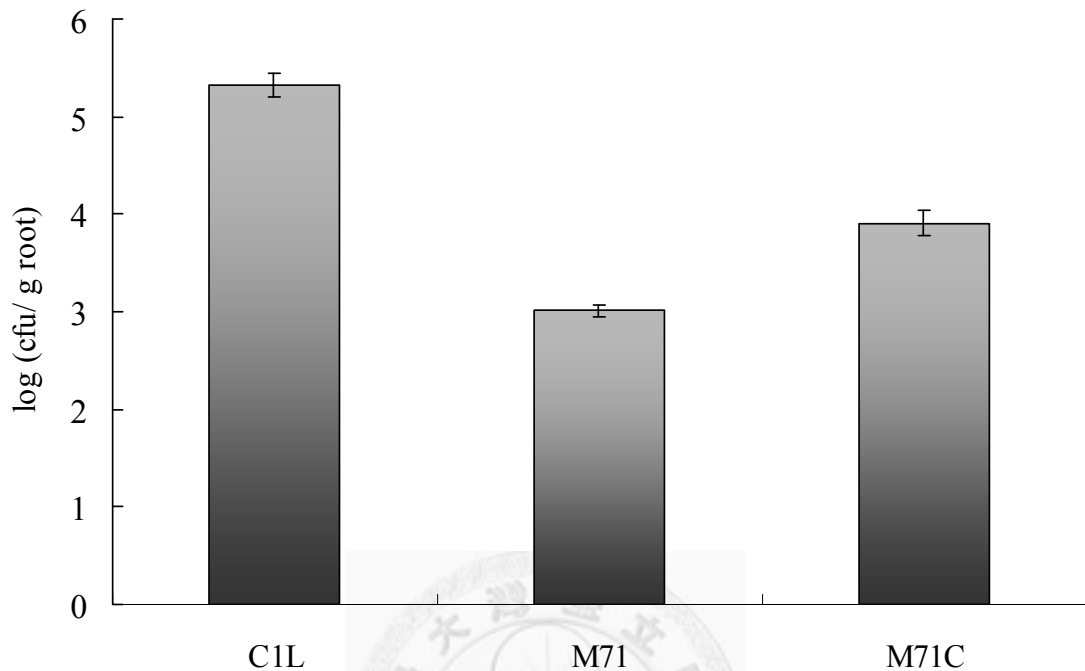
箭頭所指為引子之起始處，框線為引子序列，框線內灰底分別為酵素 *Hind*III 及 *Bam*HI 切位。灰底黑字為預測之-35 及-10 區域，其餘淺灰色網底序列為 pHY300pLK。



圖十、南方雜合分析

Figure 10. Southern hybridization of plasmids from C1L, M71 and M71C

抽取 C1L 菌株、M71 及 M71C 之質體 DNA，以 *Bam*HI 及 *Hind*III 酵素切割隔夜，並以 Dig-labeled pHYptsG 作為探針，進行南方雜合分析。P：pHYptsG 以酵素切割，作為正對照組。

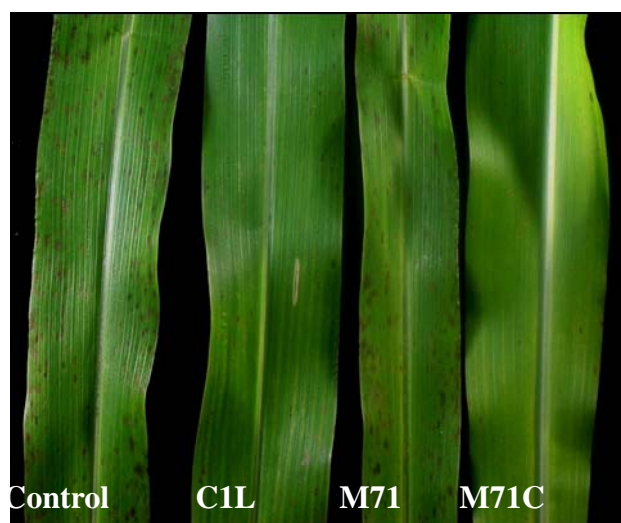


圖十一、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、突變株 M71 及互補株 M71C 內生於玉米根部數量

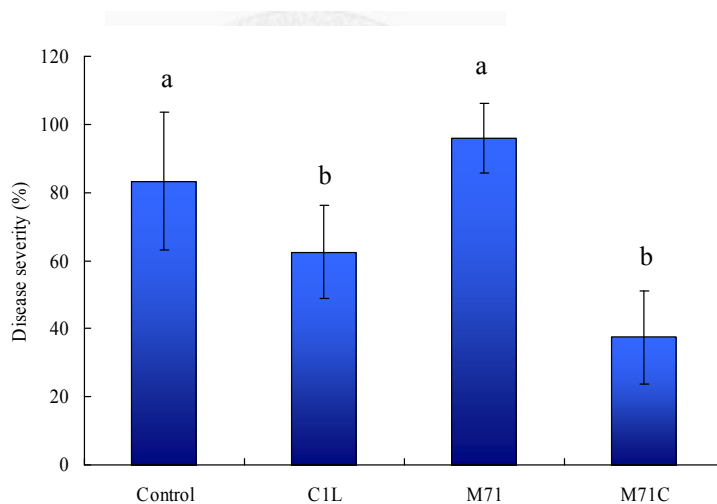
Figure 11. Population density of *B. cereus* C1L, M71 and M71C in the internal tissues of maize roots

將 C1L 菌株與 M71 突變株 LB 液態培養基中震盪 12-16 小時，再繼代培養 8 小時後，調整菌液濃度 10^9 cfu/ml，取 50 毫升細菌懸浮液澆灌於溫室之玉米根圈土壤，於 5 日後將玉米根部組織輕柔漂洗至無土壤殘留，秤取 0.1 克玉米主根基部組織，加入 1%次氯酸鈉浸泡根部組織進行表面消毒，並以無菌水浸洗兩次，最後加入 1 ml 無菌水並將根部組織完全磨碎，取 100 μ l 塗盤，培養於 28°C 於 14-16 小時後計數。每次處理三重覆，並進行兩次獨立試驗。

(A)



(B)



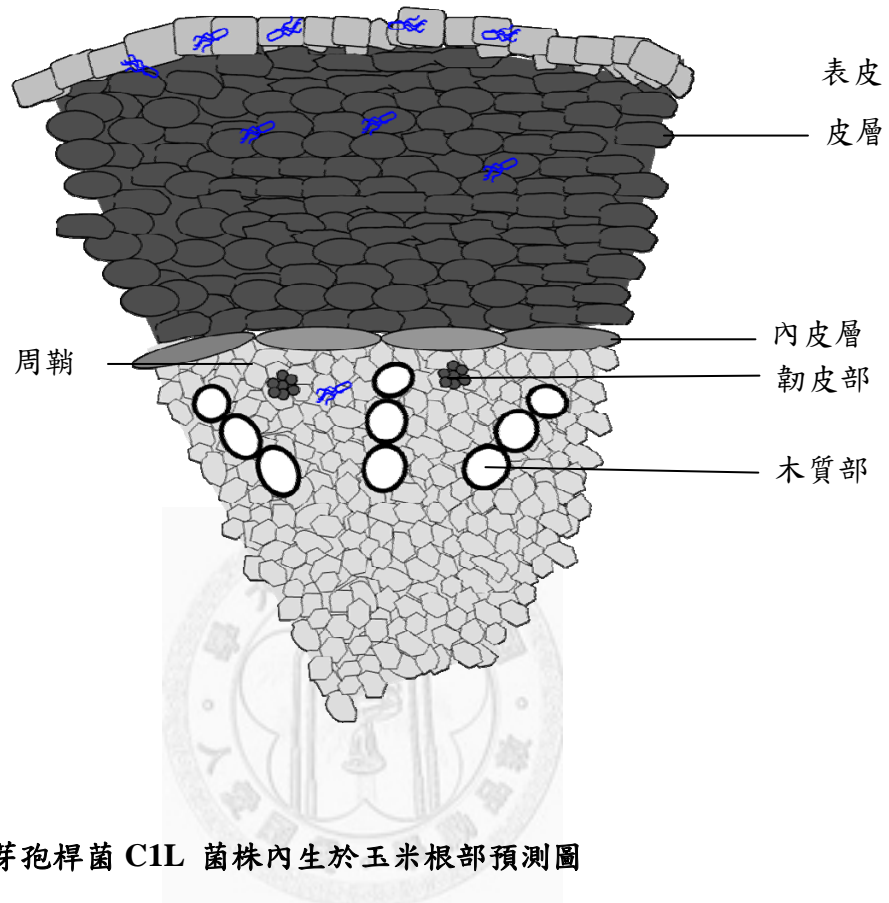
圖十二、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株、M71 及互補株 M1C 誘導玉米產生系統性抗病測試

Figure 12. ISR-eliciting ability of C1L, M71 and M71C on maize against *C. heterostrophus*.

將培養隔夜的細菌菌液稀釋後澆灌於玉米根部，24 小時後以濃度為 10^4 之玉米葉枯病孢子噴灑玉米葉片並維持高濕度，隔天觀察其發病情形。罹病嚴重度如材料方法所述，M71 突變株誘導玉米產生系統性抗病之能力低於 C1L 菌株及 M71C 互補株。

(A)玉米葉枯病發病情形。由左至右分別為 control、C1L 菌株、M71 及互補株 M71C；(B)罹病嚴重度。所得數據以變異數分析進行統計比較處理間差異($P=0.05$)。

^a每處理 3 重複，試驗重複 2 次。



圖十三、臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株內生於玉米根部預測圖

Figure 13. The proposed location of *B. cereus* C1L in maize roots

玉米根部橫切面示意圖，C1L 菌株可能出現的位置，以表皮最多、皮層次之，而周鞘之數量則最少。



```

*           20           *           40           *
ptsG       : MFKKIFGVLOKVGKALMLPVAILPAAGILLGFGNAFQNPQLTNVIPALKA : 50
ATCC14579 : MFKKIFGVLOKVGKALMLPVAILPAAGILLGFGNAFQNPQLTNVIPALKA : 50

           60           *           80           *           100
ptsG       : DWFVMVAKIMEQSGDIIFANLALLFAVGVAIGLAGGDGVAGLAAFVGYLI : 100
ATCC14579 : DWFVMVAKIMEQSGDIIFANLALLFAVGVAIGLAGGDGVAGLAAFVGYLI : 100

*           120          *           140          *
ptsG       : MNKTMSVFLVDKLVKVTSSGADPVKIGFADPAYANVLGIPTLQTCVFGG : 150
ATCC14579 : MNKTMSVFLVDKLVKVTSSGADPVKIGFADPAYANVLGIPTLQTCVFGG : 150

           160          *           180          *           200
ptsG       : IIVGIVAAAYCYNKYFNIELPSYLGFFAGKRFVPIATATFSLIVGIIMCFV : 200
ATCC14579 : IIVGIVAAAYCYNKYFNIELPSYLGFFAGKRFVPIATATFSLIVGIIMCFV : 200

*           220          *           240          *
ptsG       : WPYIQGGLNTFSHQMIDANRTIAAFIFGLIERSLIPFGLHHIFYSPPWFE : 250
ATCC14579 : WPYIQGGLNTFSHQMIDANRTIAAFIFGLIERSLIPFGLHHIFYSPPWFE : 250

           260          *           280          *           300
ptsG       : FCQYTNAAGELIRGDQKIFMAQLKDGVELTAGTFTTGKYPFMMFGLPAAA : 300
ATCC14579 : FCQYTNAAGELIRGDQKIFMAQLKDGVELTAGTFTTGKYPFMMFGLPAAA : 300

*           320          *           340          *
ptsG       : LAMYHEARPENKKLAGILGSAALTSFLTGITTEPLEFSFLFVAPVLFGIH : 350
ATCC14579 : LAMYHEARPENKKLAGILGSAALTSFLTGITTEPLEFSFLFVAPVLFGIH : 350

           360          *           380          *           400
ptsG       : AVFAGLSFMTMQILGVKIGMTFSGGLIDFLLFGVLPGR TAWWWV IIVGLV : 400
ATCC14579 : AVFAGLSFMTMQILGVKIGMTFSGGLIDFLLFGVLPGR TAWWWV IIVGLV : 400

*           420          *           440          *
ptsG       : LAVIYYFGFRFAIRKWNLKTGREVANANDGAGKAEAGELPREVLVALGG : 450
ATCC14579 : LAVIYYFGFRFAIRKWNLKTGREVANANDGAGKAEAGELPREVLVALGG : 450

           460          *           480          *           500
ptsG       : KENIASLDACITRLRVQVNEQKNVNDRLKELGAAGVLEVGNNIQAI FGP : 500
ATCC14579 : KENIASLDACITRLRVQVNEQKNVNDRLKELGAAGVLEVGNNIQAI FGP : 500

*           520          *           540          *
ptsG       : KSDTLKSQIHDIMSGRTPHVEKEDPVKVEETPQKVDENETIVSPIEGKIL : 550
ATCC14579 : KSDTLKSQIHDIMSGRTPHVEKEDPVKVEETPQKVDENETIVSPIEGKIL : 550

```

ptsG : PITEVPDQVFSGKMMGDGFAIEPTEGTVVSPVNGEIVNVFPTKHAIGIQS : 600
 ATCC14579 : PITEVPDQVFSGKMMGDGFAIEPTEGTVVSPVNGEIVNVFPTKHAIGIQS : 600

ptsG : EGGKEILIHFGIDTVKLNAGEGFEALVAQGDKVKQGQPLLKVDLAFVKENA : 650
 ATCC14579 : EGGKEILIHFGIDTVKLNAGEGFEALVAQGDKVKQGQPLLKVDLAFVKENA : 650

ptsG : PSIIITPIVFTNLQQGQQVELKKDGNVKKGETAIIIDIQ : 687
 ATCC14579 : PSIIITPIVFTNLQQGQQVELKKDGNVKKGETAIIIDIQ : 687

附錄一：臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 ptsG 與 ATCC 14579 菌株胺基酸序列比對



		*	20	*	40	*		
ptsH	:	MEKIFKVTSDSGIHARPATLLVNTASKFGSDINLEYNGKNVNLKSIMGVM					:	50
ATCC14579	:	MEKIFKVTSDSGIHARPATLLVNTASKFGSDINLEYNGKNVNLKSIMGVM					:	50
		60	*	80				
ptsH	:	SLGIQQNAEIKITANGDDAAQALAAIEETMKNEGLGE			*	:	87	
ATCC14579	:	SLGIQQNAEIKITANGDDAAQALAAIEETMKNEGLGE			*	:	87	

附錄二：臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 ptsH 與 ATCC 14579 菌株胺基酸序列比對




```

*           20           *           40           *
ptsI       : MTLNIQGIAASSGIAIAKAFRLNPEFNIIEKKSITNEAAE IARLDAALEK : 50
ATCC14579 : MTLNIQGIAASSGIAIAKAFRLNPEFNIIEKKSITNEAAE IARLDAALEK : 50

60           *           80           *           100
ptsI       : AKTELEAIKDHAFaelGADKAAIFEAHLLVLDPELVNPVKDKVNSEKVN : 100
ATCC14579 : AKTELEAIKDHAFaelGADKAAIFEAHLLVLDPELVNPVKDKVNSEKVN : 100

*           120           *           140           *
ptsI       : AEFAMDEVASMFISMfENMDNEYMkERAADIRdVTKRVLahLLGInFSNP : 150
ATCC14579 : AEFAMDEVASMFISMfENMDNEYMkERAADIRdVTKRVLahLLGInFSNP : 150

160          *           180          *           200
ptsI       : GTISEEVIIIAEDLTPSDTAQLNRKYAKGFTTDIGGRtSHSAImARSMEI : 200
ATCC14579 : GTISEEVIIIAEDLTPSDTAQLNRKYAKGFTTDIGGRtSHSAImARSMEI : 200

*           220           *           240           *
ptsI       : PAVVGTKVVMekIQNGDIVIIDGLDGEVIVNPSEETLRsFEeKkAKFEEQ : 250
ATCC14579 : PAVVGTKVVMekIQNGDIVIIDGLDGEVIVNPSEETLRsFEeKkAKFEEQ : 250

260          *           280          *           300
ptsI       : KAEWAKLKDQATVtSDGHHVlVANIGtPNdVQGIIDNGGEGVGLYRtEE : 300
ATCC14579 : KAEWAKLKDQATVtSDGHHVlVANIGtPNdVQGIIDNGGEGVGLYRtEE : 300

*           320           *           340           *
ptsI       : LYMGRDNLPTeeEQFEAYKAVlEGVKEGQPVVVRtLDIGGDkELPYLHLp : 350
ATCC14579 : LYMGRDNLPTeeEQFEAYKAVlEGVKEGQPVVVRtLDIGGDkELPYLHLp : 350

360          *           380          *           400
ptsI       : KEMNPFLGYRAIRLCLDEQDVfRTQLRALLRASVYGNLkIMfPMIAtLDE : 400
ATCC14579 : KEMNPFLGYRAIRLCLDEQDVfRTQLRALLRASVYGNLkIMfPMIAtLDE : 400

*           420           *           440           *
ptsI       : FRQAKAILLEEKAKlVEAGtTVSDSIEVGMMVeiPASAVLADQFAKEVDF : 450
ATCC14579 : FRQAKAILLEEKAKlVEAGtTVSDSIEVGMMVeiPASAVLADQFAKEVDF : 450

460          *           480          *           500
ptsI       : FSIgTNDLIQYtMAADRMNEQVSyLYQpYNPSILRLVrMVIDAAHKEGKW : 500
ATCC14579 : FSIgTNDLIQYtMAADRMNEQVSyLYQpYNPSILRLVrMVIDAAHKEGKW : 500

*           520           *           540           *
ptsI       : AGMCGEMAGDSLAIPLLLGLGLDEfSMSAtSILPARTQLSKLSKAEMtTL : 550
ATCC14579 : AGMCGEMAGDSLAIPLLLGLGLDEfSMSAtSILPARTQLSKLSKAEMtTL : 550

560          *
ptsI       : AEKALMMStAEeVVELVKSIm* : 570
ATCC14579 : AEKALMMStAEeVVELVKSIm* : 570

```

附錄三：臘狀芽孢桿菌 CIL 菌株 ptsI 與 ATCC 14579 菌株胺基酸序列比對

```

                *           20           *           40           *
ptsGHI      : ATCTTCAATATGCTATTGAGAGGGTGAAAAAAGGAGAAAAAGTAGAGGAA : 50
ATCC14579   : AtcttcAAAtAgctAttgAgAggggtgAAAAAaggAgAAAAAgtAgAggAA : 50

                60           *           80           *           100
ptsGHI      : TCGCAAAGTTTTGCTGATTTATTAAGGCGGAGTATCCAGCTTGCTATAA : 100
ATCC14579   : tcgcAAAgttttgctgAtttAttAAAggcggAgAtccAgcttgctAtAA : 100

                *           120          *           140          *
ptsGHI      : CTTGGCTTGAAGCTAGTTAAGGTCATGCAAAAAGAGTTGCAACTACCTG : 150
ATCC14579   : cttggcttggAAgctAgttAAggtcAtgcAAAAAgAgttgcAAActAcctg : 150

                160          *           180          *           200
ptsGHI      : TATATGAAGCTGAAAGTATTTATTTAACGATGCACCTTGCAACGCTTAGTA : 200
ATCC14579   : tAtAtgAAgctgAAAgtAtttAtttAAcgAtgcActtgcAAcgcttAgTA : 200

                *           220          *           240          *
ptsGHI      : AAGGCAGAGCATGTGTAAAAAGCCATATATTTTTGTCTAAAAATGAAAAACG : 250
ATCC14579   : AAggcAgAgcAtgtgtAAAAAgccAtAtAtttttgtctAAAAAtgAAAAcg : 250

                260          *           280          *           300
ptsGHI      : TTAAAAAAAATGATTGAATCGCTTACAATAGTTATGTATAATAACTATTG : 300
ATCC14579   : ttAAAAAAAAtgAttgAAtcgcttAcAAAtAgttAtgtAtAAAtAAActAttg : 300

                *           320          *           340          *
ptsGHI      : CAAAGTTATACAAATTTTCGACAAAACACATTAAGGTGAGTAACGAAAAACGT : 350
ATCC14579   : cAAAgttAtAcAAAttttcgAcAAAACAcAttAAggtgAgTAAcgAAAAcgt : 350

                360          *           380          *           400
ptsGHI      : TTGCCTTAATTATAGTGAACCTTATACGTAAACCTATTTTTTGACACGTGTT : 400
ATCC14579   : ttgccttAAttAtAgtgAAccttAtAcgtAAAacctAtttttgAcAcgtgtt : 400

                *           420          *           440          *
ptsGHI      : ACTGATTCGATCAGGCATGAGTGGAGAAAAGTAAGGAATGTAAGCTAGAG : 450
ATCC14579   : ActgAttcgAtcAggcAtgAgTggAgAAAAgtAAggAAAtgtAAgctAgAg : 450

                460          *           480          *           500
ptsGHI      : AAAGGGATATACTACCCTTTGTATAGCTATCGTTCTATCTTTTTTTCCTC : 500
ATCC14579   : AAAGggAtAtActAccctttgtAtAgctAtcgttctAtctttttttcctc : 500

                *           520          *           540          *
ptsGHI      : ATGTCTTTTTGGCGTTTTGTCCGGAAGGTATCAATATAGATAAGAGAGGAAG : 550
ATCC14579   : AtgtctttttggcgtttgtcggAAGgtAtcAAAtAtAgAtAAgAgAggAAg : 550

```

ptsGHI : GGTTCATGTTTAAAGAAGATCTTTGGTGTCTTCAAAAAAGTCGGAAAAAG : 600
ATCC14579 : ggtttccAtgtttAAgAAgAtccttgggtgttcttcAAAAAgtcggAAAAAg : 600

ptsGHI : CGTTAATGCTTCCAGTAGCGATTTTACCGCGGCAGGTATTTTACTTGGAA : 650
ATCC14579 : cgttAAatgcttccAgtAgcgAttttAccggcggcAggtAttttActtggAA : 650

ptsGHI : TTTGGTAATGCATTTCAAAATCCACAGTTAACAAATGTTATTCCTGCTTT : 700
ATCC14579 : tttggTAAatgcAtttcAAAAatccAcAgttAAcAAAtgttAttcctgcttt : 700

ptsGHI : AAAAGCAGATTGGTTCGTAATGGTTGCAAAAATTATGGAACAATCTGGTGA : 750
ATCC14579 : AAAAgcAgAttgggttcgtAatggttgcAAAAAttAtggAAcAAAtctggTg : 750

ptsGHI : ATATTATTTTCGCTAACCTTGCATTATTATTTCGAGTTGGGGTAGCAATT : 800
ATCC14579 : AtAttAttttctgctAAccttgcAttAttAttctgcAgttgggggTAgcAAtt : 800

ptsGHI : GGTTTAGCTGGTGGAGACGGAGTAGCTGGTTTACAGCATTCGTTCGGCTA : 850
ATCC14579 : ggtttAgctgggtggAgAcggAgTAgctgggtttAgcAgcAttcgtcggctAA : 850

ptsGHI : CTTAATTATGAACAAAACGATGAGTGTGTTCTTAGAAGTAGATAAGCTAG : 900
ATCC14579 : cttAAttAtgAAcAAAAcgtAtgAgTgtgttcttAgAAgtAgAtAAgctAg : 900

ptsGHI : TGAAAGTAACAAGTTCTGGAGCAGACCCAGTAAAAATTGGATTTCAGAT : 950
ATCC14579 : tgAAAgtAAcAAgttctggAgcAgAcccAgTAAAAAttggAttctgcAgAt : 950

ptsGHI : CCAGCGTATGCAAAACGTATTAGGTATTCCAACGCTACAAACAGGGGTATT : 1000
ATCC14579 : ccAgcgtAtgcAAAcgtAttAggtAttccAAcgtAcAAAcAggggtAtt : 1000

ptsGHI : TGGTGGTATTATCGTTCGGTATAGTAGCGGCATATTGCTATAATAAATACT : 1050
ATCC14579 : tggTggTAttAtcgtcggTAtAgTAgcggcAtAttgctAtAAAtAAAtAct : 1050

ptsGHI : TCAATATTGAATTACCATCATACTTAGGTTTCTTTGCAGGTAAGCGTTTC : 1100
ATCC14579 : tcAAcAttgAAttAccAtcAtActtAggtttctttgcAggtAAgctgttc : 1100

ptsGHI : **GTACCGATTGCAACTGCAACATTCTCTTTAATAGTAGGTATTATCATGTG** : 1150
ATCC14579 : **gtAccgAtcgcAAactgcAAcAttctctttAAtAgtAggtAttAtcAtgtg** : 1150

ptsGHI : **CTTCGTTTGGCCATACATTCAAGGTGGCTTAAACACGTTCTCACATCAAA** : 1200
ATCC14579 : **cttcgtttggccAtAcAttcAAGgtggcttAAAcAcgttctcAcAtcAAA** : 1200

ptsGHI : **TGATTGATGCAAATAGAACAAATTGCAGCATTTATATTCCGGTTTAATTGAA** : 1250
ATCC14579 : **tgAttgAtgcAAAtAgAAcAAtcgcAgcAtttAtAttcgggtttAAttgAA** : 1250

ptsGHI : **CGTTCATTAATTCCATTTGGATTACATCACATTTTCTATTACCGTTCTG** : 1300
ATCC14579 : **cgttcAttAAttccAtttggAttAcAtcAcAttttctAttcAccgttctg** : 1300

ptsGHI : **GTTCGAATTCGGTCAGTATACAAATGCAGCTGGCGAATTAATCCGTGGTG** : 1350
ATCC14579 : **gttcgAAttcggtcAgtAtAcAAAtgcAgtggcgAAttAAtccgtggtg** : 1350

ptsGHI : **ACCAAAAAATCTTTATGGCACAGTTAAAAGACGGTGTAGAATTAACAGCA** : 1400
ATCC14579 : **AccAAAAAAAtctttAtggcAcAggtAAAAgAcggtgtAgAAttAAcAgcA** : 1400

ptsGHI : **GGGACATTTACAACCTGGTAAGTATCCGTTTCATGATGTTCCGGTCTTCCAGC** : 1450
ATCC14579 : **gggAcAtttAcAAactggtAAgtAtccgttcAtgAtgttcgggtcttccAgc** : 1450

ptsGHI : **AGCAGCTTTAGCAATGTACCATGAAGCACGTCCAGAAAATAAAAAATTAG** : 1500
ATCC14579 : **AgcAgctttAgcAAtgtAccAtgAAgcAagtccAgAAAAtAAAAAAttAg** : 1500

ptsGHI : **CAGCAGGTATTTTAGGTTCTGCAGCATTAAACATCTTTCTTAACAGGTATT** : 1550
ATCC14579 : **cAgcAggtAttttAggttctgcAgcAttAAcAtctttcttAAcAggtAtt** : 1550

ptsGHI : **ACAGAGCCACTTGAATTTTCATTCTTATTTCGTAGCGCCAGTATTATTCGG** : 1600
ATCC14579 : **AcAgAgccActtgAAttttcttcttAttcgtAgcgccAgtAttAttcgg** : 1600

ptsGHI : **AATTCACGCTGTATTTGCTGGTCTATCATTATGACAATGCAAAATTTAG** : 1650
ATCC14579 : **AAttcAcgctgtAtttgctggtctAtcAtttAtgAcAAAtgcAAAAtttAg** : 1650

ptsGHI : 1660 * 1680 * 1700
 ATCC14579 : GTGTTAAAAATTGGTATGACATTCTCTGGTGGTTTAATTGACTTCCTATTA : 1700
 : gtggtAAAAAtgggAtgAcAttctctggggtttAAAtgActtcctAtTA : 1700

ptsGHI : * 1720 * 1740 *
 ATCC14579 : TTCGGTGTACTACCAGGCCGTACAGCATGGTGGTGGGTAATTATTGTTGG : 1750
 : ttcgggtgActAccAggccgtAcAgcAtgggtggggtAAAttAttggtgg : 1750

ptsGHI : 1760 * 1780 * 1800
 ATCC14579 : TCTTGTACTAGCAGTTATTTACTACTTCCGATTCCGCTTTGCAATTCGTA : 1800
 : tcttgtActAgcAgttAtttActActtcggAttccgctttgcAAAttcgTA : 1800

ptsGHI : * 1820 * 1840 *
 ATCC14579 : AATGGAATCTAAAAACACCTGGTTCGTGAAGTGGCAAATGCAAATGACGGC : 1850
 : AAtggAAAtctAAAAAcAcctggtcgtgAAgtggcAAAtgcAAAtgAcggc : 1850

ptsGHI : 1860 * 1880 * 1900
 ATCC14579 : GCAGGAAAAGCAGAAGCAGGCCGAACTCCCTCGTGAAGTATTAGTAGCACT : 1900
 : gcAggAAAAGcAgAAgcAgggcgAAActccctcgtgAAgtAttAgtAgcAct : 1900

ptsGHI : * 1920 * 1940 *
 ATCC14579 : TGGTGGTAAAGAAAACATTGCTTCTTTAGATGCTTGTATTACTCGTTTAC : 1950
 : tgggtggTAAAgAAAACAttgcttctttAgAtgcttgtAttActcgtttAc : 1950

ptsGHI : 1960 * 1980 * 2000
 ATCC14579 : GTGTTCAAGTTAACGAACAAAAGAATGTAAACAAAGACCGCTTAAAAGAA : 2000
 : gtgttcAAgttAAcgAAcAAAAGAAAtgtAAAcAAAgAccgcttAAAAGAA : 2000

ptsGHI : * 2020 * 2040 *
 ATCC14579 : CTTGGAGCAGCTGGTGTACTTGAAGTTGGAAATAACATTCAAGCTATTTT : 2050
 : cttggAgcAgctgggtgActtgAAgttggAAAtAAcAttcAAgctAtttt : 2050

ptsGHI : 2060 * 2080 * 2100
 ATCC14579 : CGGACCGAAATCTGACACATTTAAAATCACAATTCATGATATTATGTCAG : 2100
 : cggAccgAAAAtctgAcAcAttAAAAtcACAAttcAtgAtAttAtgtcAg : 2100

ptsGHI : * 2120 * 2140 *
 ATCC14579 : GTCGTACACCTCATGTTGAAAAAGAAGAACCTGTAAAAGTGGGAAGAACT : 2150
 : gtcgtAcAcctcAtgttgAAAAgAAgAtcctgtAAAAgtggAAgAAAAct : 2150

ptsGHI : 2160 * 2180 * 2200
 ATCC14579 : CCTCAAAAAGTTGATGAAAATGAAACAATTGTATCACCAATCGAAGGAAA : 2200
 : cctcAAAAAGttgAtgAAAAtgAAAcAAAtgtAtcAccAAAtcgAAggAAA : 2200

ptsGHI : **AATCTTACCAATTACAGAAGTACCTGACCAAGTATTCTCAGGAAAAATGA** : 2250
 ATCC14579 : **AAtcttAccAAttAcAgAAgtAcctgAccAAgtAttctcAggAAAAatgA** : 2250

ptsGHI : **TGGGAGACGGATTGCAATTGAGCCAACCTGAAGGAACAGTAGTTTCTCCA** : 2300
 ATCC14579 : **tgggAgAcggAtttgcAAttgAgccAActgAAggAAcAgtAgtttctccA** : 2300

ptsGHI : **GTGAACGGTGAGATTGTCAATGTATTCCCTACAAAACATGCGATTGGTAT** : 2350
 ATCC14579 : **gtgAAcgggtgAgAttgtcAAttgAttccctAcAAAAcAtgcgAttggtAt** : 2350

ptsGHI : **TCAATCTGAAGGCGGAAAAGAAATTTTAATTCACCTTCGGTATTGATACTG** : 2400
 ATCC14579 : **tCAAtctgAAggcggAAAAGAAAttttAAttcActtcggtAttgAtActg** : 2400

ptsGHI : **TAAAAATTAATGGTGAAGGTTTTGAAGCGCTTGTAGCACAAAGGCGACAAG** : 2450
 ATCC14579 : **tAAAAAttAAAtggtgAAggttttgAAgcgcttgtAgcAcAAggcgAcAAg** : 2450

ptsGHI : **GTGAAACAAGGCCAACCAATTATTAAGTAGATCTTGCATTTGTAAAAGA** : 2500
 ATCC14579 : **gtgAAAcAAggccAAccAttAttAAAAgtAgAtcttgcAtttgtAAAAGa** : 2500

ptsGHI : **AAATGCACCATCTATCATTACACCAATTGTCTTTACAAACTTACAACAAG** : 2550
 ATCC14579 : **AAAtgcAccAtctAtcAttAcAccAAttgtctttAcAAAActtAcAAcAAg** : 2550

ptsGHI : **GGCAACAAGTCGAATTGAAAAAAGATGGAAATGTTAAGAAGGGCGAAAACC** : 2600
 ATCC14579 : **ggcAAcAAgtcgAAAtgAAAAAGAtggAAAtgTtAAgAAgggcgAAAacc** : 2600

ptsGHI : **GCTATTATTGACATTCAGTAGGAATTTGACGCAAAATGTTTATAATTATA** : 2650
 ATCC14579 : **gctAttAttgAcAttcAgTAggAAtttgAcgcAAAAtgtttAtAAttAtA** : 2650

ptsGHI : **ATAGGCGATGTGGTTGACCGAACATCGCCTATTATATACAATAGATGATG** : 2700
 ATCC14579 : **AtAgggcgAtgtggttgAccgAAcAtcgcctAttAtAtAcAAAtAgAtgAtg** : 2700

ptsGHI : **TAGTACTCAGTCTATACAACCTAAAAAATACTGTAATTTAAAGGAGATAA** : 2750
 ATCC14579 : **tAgTActcAcgtctAtAcAAcTAAAAAAtActgtAAtttAAAaggAgAtAA** : 2750

ptsGHI : **ATTATCATGGAAAAATCTTTAAAGTAACTAGCGACTCAGGAATTCATGC** : 2800
 ATCC14579 : **AttAtcAtggAAAAAAtctttAAAgTAActAgcgActcAggAAAtcAtgc** : 2800

ptsGHI : **TCGTCCAGCAACTCTACTTGTAAACACTGCAAGCAAATTCGGTTCTGATA** : 2850
 ATCC14579 : **tcgtccAgcAAActctActtgtAAAActgcAAgcAAAttcggttctgAtA** : 2850

ptsGHI : **TTAACTTAGAGTATAACCGAAAGAACGTTAACTTAAAAATCAATCATGGGC** : 2900
 ATCC14579 : **ttAAActtAgAgTAtAAcggAAAgAAcgttAAActtAAAAAtcAAAtcAtgggc** : 2900

ptsGHI : **GTTATGTCTTTAGGCATTCAACAAAACGCAGAAATTAATACTACTGCAAA** : 2950
 ATCC14579 : **gttAtgtctttAggcAttcAAcAAAACgcAgAAAttAAAAAtcActgcAAA** : 2950

ptsGHI : **TGGTGATGATGCAGCTCAAGCACTAGCAGCTATCGAAGAAACTATGAAAA** : 3000
 ATCC14579 : **tggtgAtgAtgcAgctcAAgcActAgcAgctAtcgAAgAAActAtgAAAA** : 3000

ptsGHI : **ACGAAGGATTAGGAGAATAATGACTCTTAACATTCAAGGGATCGCTGCAT** : 3050
 ATCC14579 : **AcgAAggAttAggAgAAtAAtgActcttAAcAttcAAgggAtcgcctgcAt** : 3050

ptsGHI : **CAAGTGGGATTGCTATTGCAAAGGCTTTTCAGACTTGAAAAATCCTGAATTT** : 3100
 ATCC14579 : **cAAgtgggAttgctAttgcAAAggctttcAgActtgAAAAAtcctgAAttt** : 3100

ptsGHI : **AACATCGAAAAGAAATCAATTACAAACGAAGCTGCAGAAATTCACACGCTT** : 3150
 ATCC14579 : **AAcAtcgAAAAGAAAtcAAttAcAAAAGctgcAgAAAttgcAcgctt** : 3150

ptsGHI : **AGACGCTGCGCTTGAGAAAGCAAAAACCTGAATTAGAAGCTATTAAGGACC** : 3200
 ATCC14579 : **AgAcgctgcgcttgAgAAgcAAAAActgAAttAgAAgctAttAAggAcc** : 3200

ptsGHI : **ACGCATTTGCTGAGCTAGGTGCTGACAAAGCTGCAATCTTTGAAGCACAT** : 3250
 ATCC14579 : **AcgcAtttgctgAgctAggtgctgAcAAAgctgcgAtctttgAAgcAcAt** : 3250

ptsGHI : **TTATTAGTGTAAATGATCCAGAACTAGTAAACCCAGTAAAAAGATAAAGT** : 3300
 ATCC14579 : **ttAttAgtggttAAAtgAtccAgAActAgTAAccAgTAAAAgAtAAAgT** : 3300

ptsGHI : **AAATAGCGAAAAAGTAAATGCTGAATTTGCAATGGATGAAGTTGCATCAA** : 3350
 ATCC14579 : **AAAtAgcgAAAAAgtAAAtgctgAAAtttgcAAAtggAtgAAgttgcAtcAA** : 3350

ptsGHI : **TGTTTATTTCTATGTTTGAAAAATGATAACGAATATATGAAAGAACGT** : 3400
 ATCC14579 : **tgtttAtttctAtgtttgAAAAcAtggAtAAcgaAtAtAtgAAAgAAcgt** : 3400

ptsGHI : **GCTGCGGACATTCGTGACGTAACAAAACGCGTTCTTGCACATTTACTAGG** : 3450
 ATCC14579 : **gctgctggAcAttcgtgAcgtAAcAAAacgcgttcttgcAcAtttActAgg** : 3450

ptsGHI : **AATTAACCTTCTCAAAATCCTGGTACAATTTCTGAAGAGGTAATCATCATTTG** : 3500
 ATCC14579 : **AAAtAActtctcAAAacctggTAcAAAtttctgAAgAggtAAAtcAtcAttg** : 3500

ptsGHI : **CTGAAGATTTAACACCATCTGATACAGCTCAGTTAAACCGTAAGTATGCA** : 3550
 ATCC14579 : **ctgAAgAtttAAcAccAtctgAtAcAgctcAAAttAAAaccgtAAgtAtgcA** : 3550

ptsGHI : **AAAGGTTTCACTACTGATATCGGTGGACGTACATCTCACTCAGCAATTAT** : 3600
 ATCC14579 : **AAAaggtttcActActgAtAtcggTggAcgtAcAtctcActctgcAAAttAt** : 3600

ptsGHI : **GGCTCGTTCTATGGAATTTCCAGCTGTTGTTGGTACAAAAGTTGTTATGG** : 3650
 ATCC14579 : **ggctcgttctAtggAAAAtccAgctgTtTgtTggTAcgAAAgttgttAtgg** : 3650

ptsGHI : **AGAAAAATCCAAAACGGCGATATCGTTATCATTTGACGTTTTAGATGGAGAA** : 3700
 ATCC14579 : **AgAAAAAtccAAAacggcgAtAtcgttAtcAttgAcggtttAgAtggAgAA** : 3700

ptsGHI : **GTAATTGTAAACCCATCAGAAGAAACTCTTCGTTTCGTTTGAAGAAAAGAA** : 3750
 ATCC14579 : **gtAAAttgTAAAcccAtcAgAAgAAAActcttcgTtcgTttgAAgAAAAGAA** : 3750

ptsGHI : **AGCGAAATTTGAAGACAAAAGCTGAATGGGCTAAATTTAAAAGACCAAG** : 3800
 ATCC14579 : **AgcgAAAtttgAAgAgcAAAAgctgAAAtgggctAAAttAAAAGAccAAg** : 3800

ptsGHI : **CTACTGTAACAAGTGACGGACATCACGTTGAGCTTGTGCAAATATCGGA** : 3850
 ATCC14579 : **ctActgtAAcAAgtgAcggAcAtcAcgTtgAgcttgttgcAAAtAtcggA** : 3850

ptsGHI : ACACCAAATGATGTACAAGGTATTATCGATAATGGCGGAGAAGGCGTTGG : 3900
ATCC14579 : AcAccAAAtgAtgtAcAAggtAttAtcgAtAAAtggcggAgAAggcgttgg : 3900

ptsGHI : CTTATAACCGTACAGAATTCTTATACATGGGC CGTGACAATCTTCCAACAG : 3950
ATCC14579 : tttAtAccgtAcAgAAttcttAtAcAtgggt cgtgAcAAAtcttccAAcAg : 3950

ptsGHI : AAGAAGAGCAGTTCGAAGCGTATAAAGCAGTTCTTGAAGGTGTAAAAGAA : 4000
ATCC14579 : AAgAAgAgcAgttcgAAgCGTAtAAAAGcAgttcttgAAggtgtAAAAGAA : 4000

ptsGHI : GGTCAACCAGTCGTTGTTTCGTACACTTGATATCGGTGGAGATAAAGAGCT : 4050
ATCC14579 : ggtcAAccAgtcgTTgttcgtAcActtgAtAtcggtggAgAtAAAgAgct : 4050

ptsGHI : TCCATACTTACATTTACCAAAAGAAATGAACCCATTCTTAGGATATCGTG : 4100
ATCC14579 : tccAtActtAcAtttAccAAAAGAAAAtgAAcccAttcttAggAtAtcgtg : 4100

ptsGHI : CAATTCGCTTATGTCTTGATGAGCAAGATGTGTTCGGTACACAACCTTCGT : 4150
ATCC14579 : cAAttcgcttAtgtcttgAtgAgcAAgAtgtgttccgtAcAcAActtctg : 4150

ptsGHI : GCATTACTTCGTGCTAGCGTATACGGTAACCTTAAAAATTATGTTCCCAAT : 4200
ATCC14579 : gcAttActtctgtgctAgcgtAtAcgggtAActtAAAAAttAtgttcccAA : 4200

ptsGHI : GATTGCAACTCTTGATGAGTTCCGTCAAGCGAAAAGCAATTTTATTAGAAG : 4250
ATCC14579 : gAttgcAActcttgAtgAgttccgtcAAgCGAAAAGcAAttttAttAgAAg : 4250

ptsGHI : AGAAAGCGAAACTTGTAGAAGCGGGTACAACCTGTTTCTGATTCTATTGAA : 4300
ATCC14579 : AgAAAgCGAAAActtgtAgAAgCGGGTAcAActgttcttgAttctAttgAA : 4300

ptsGHI : GTTGGTATGATGGTTGAAAATCCCAGCTTCAGCAGTATTAGCAGATCAATT : 4350
ATCC14579 : gttggTAtgAtggttgAAAAtcccAgcttcAgcAgTAttAgcAgAtcAAtt : 4350

ptsGHI : CGCGAAAGAAGTTGACTTCTTCTCTATCGGAACAAATGATTTAATCCAAT : 4400
ATCC14579 : cgCGAAAAGAAgttgActtcttctctAtcggAAcAAAAtgAttAAAtccAA : 4400

附錄四：臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株 *ptsGHI* 基因與 ATCC 14579 菌株核酸序列比對