

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所

碩士論文

Institute of Plant Biology College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

番茄青枯病菌毒力相關因子之研究

Study of *Ralstonia solanacearum* virulence



指導教授：鄭秋萍 博士

Advisor : Dr. Chiu-Ping Cheng

中華民國九十八年七月

July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

番茄青枯病菌毒力相關因子之研究

Study of *Ralstonia solanacearum* virulence determinants

本論文係李千惠君 (R96B42002) 在國立臺灣大學植物科學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十八年七月十六日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

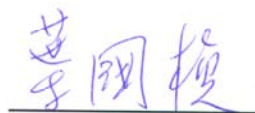
口試委員： 亞洲蔬菜研究發展中心

王肇芬 博士



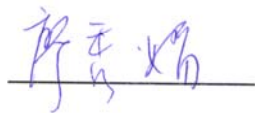
中央研究院農業生物科技研究中心

葉國楨 博士



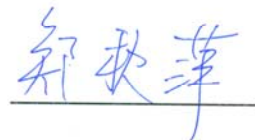
台灣大學生物環境系統工程學系

廖秀娟 博士



台灣大學植物科學研究所

鄭秋萍 博士 (指導教授)



誌謝

時光飛逝，兩年的時光中經歷了許多歡笑與淚水，謝謝曾經經歷的許多挫折讓我學會如何面對與成長。謝謝秋萍老師讓我有機會進入這個大家庭中，給予我在實驗上很多的指導，並且願意像朋友般關心、傾聽我，給我最大的信任及包容，此外也教導我許多待人處事的方法，讓我在這兩年中得到了滿滿的收穫，謝謝您。

論文初成時，承蒙口試委員王肇芬老師、葉國楨老師及廖秀娟老師悉心的審閱我的論文並提供了寶貴的建議及指正，使論文內容更加詳實嚴謹，在此獻上最真誠的感謝。

特別謝謝亞蔬中心的王肇芬老師和芳儀提供了很多實驗上的建議及協助，並且不厭其煩的幫我解決許多難題，沒有你們不會有這本論文，感恩!

謝謝我實驗室的好夥伴小天，你的陪伴讓我在實驗室永遠都有個支持的後盾，在實驗及生活上你也給我很多的協助，和你一起看電影、吃美食、分享的點點滴滴都是珍貴的回憶，我也不會忘記你爸媽的美味愛心便當，在未來的路上我們要繼續延續這緣分；謝謝隔壁的趙丁丁，雖然你說的話常常很白癡，但是卻意外的讓我能夠有放鬆的感覺，能夠認識你並且一起並肩作戰很開心；謝謝另一位戰友冠中不論多晚多累都竭盡所能的幫忙，提供了我強大的支援，感謝!。

謝謝玉梅在我實驗或是生活上遇到困難時，總是想盡辦法的幫忙我，和你一起尋找美食真的很開心；謝謝安琪和巧燕像姐姐般，給我很多很多的照顧及溫暖，也讓我有表演的成就感；謝謝淑蓮和怡君讓我永遠都不用擔心沒有需要的東西可用，你們淡淡的鼓勵，給了我大大的溫暖；謝謝阿朱老大、培城和永義，從你們身上我學到了很多，尤其是老大的關心總讓我覺得很窩心，謝謝你們的照顧；謝謝學弟妹們，宗霖的搞笑、芸璐的貼心、季穎的可愛和雅婷的犀利，提供了許多的歡樂回憶。

謝謝我的朋友們給我滿滿的支持，謝謝酷兒總是當我的垃圾桶，謝謝老張、艾珍、阿蔡、阿玫、廖 Honey 讓我隨時都有人支援，謝謝小紅、佩瑩、娜娜適時的關心，謝謝阿恬跟太太給我的鼓勵，有你們的陪伴讓我不孤單。

最後，最最感謝的是我的家人，謝謝阿公阿嬤每次回家都幫我加菜，謝謝媽媽全力的支持和包容，謝謝碧霞阿姨適時的關心，謝謝阿姐的傾聽及鼓勵，謝謝弟弟的激勵，你們給我的滿滿的愛，是支持我在挫折時最溫暖的力量。

僅將此論文送給所有我愛的人，願大家都能跨越自己的障礙，豁達開朗的邁開步伐向前走。

千惠於 2009 · 台北 · 夏

中文摘要

由青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)所造成的細菌性萎凋病(又稱為青枯病)是全球許多作物重要且極為複雜的病害。青枯病菌具有相當廣泛的寄主範圍且具不同程度的毒力表現,高毒力的菌株甚至可造成番茄抗病品系 Hawaii 7996 (H7996)的完全萎凋,因此研究青枯病菌毒力表現關鍵因子對於研擬此病害之有效防治管理策略是非常重要的。本研究之目標為探討各種致病相關因子的表現與毒力之相關性,並進一步研究高或低毒力菌株特有的基因在毒力所扮演的角色。首先,針對不同毒力的青枯病菌野生型菌株進行特性分析,結果顯示生物膜形成能力(biofilm formation)可能與毒力表現具有正相關性;然而,各菌株毒力的表現與生長速度、泳動力(swimming motility)、及對氧化逆境(oxidative stress)的敏感性並無明顯的相關性,因此推測毒力的表現是由許多基因構成之複雜網絡所調控,是許多生理生化特性的微小差異累加而成之結果。其次,先前利用生物微陣列晶片(microarray)已找到一群青枯病菌高毒力或低毒力菌株特有的基因,但這些基因是否確實與毒力表現相關及其具體功能則尚未知。本研究將高毒力菌株特有的 *RSc2322-RSc2325* 基因群(gene cluster)在高毒力菌株 Pss1308 及 Pss749 中依其操縱子(operon)之排列組成分成三個轉錄單位,以質體插入破壞個別基因,並分析其各項特性,結果顯示突變株的泳動能力下降,對於氧化逆境也較為敏感,且在 Pss1308 背景中的 *RSc2325* 突變株及在 Pss749 背景中的 *RSc2324* 突變株在抗病品系番茄 H7996 的毒力表現下降。同時,將 *RSc2322-RSc2325* 全長基因群轉移到低毒力菌株 Pss216 後,基因轉移表現株相較於載體轉型株有較高的根部附著能力及較低的泳動力,且在感病品系 L390 番茄也有較高的毒力表現。綜合突變株及基因轉移表現株的特性及毒力表現的結果可推測 *RSc2322-RSc2325* 基因群確實與青枯病菌高毒力的表現有關,且具有加成效果。此外,本研究亦針對低毒力特有之第三型分泌蛋白(type III effectors, T3Es)基因 *RSp0213* 和 *RSc3174* 進行相關研究;首先利用啟動子活性分析驗證此兩基因確實受第三型分泌系統的轉錄調控因子 HrpG 調控;將 *RSp0213* 和 *RSc3174* 送入高毒力菌 Pss190 和 Pss1308 表現後,所得基因轉移表現株在本研究檢測生理特性的表現皆未受影響,但高毒力菌株 Pss190 在抗病品系 H7996 的毒力表現則明顯降低,因此這兩個低毒力特有之 T3Es 的存在確實與青枯

病菌低毒力表現有關聯。透過這些分子層面的研究使得我們對青枯病菌毒力相關機制有初步的了解，且預期對研擬青枯病之有效防治管理策略將有所啟發。

關鍵字：青枯病菌、毒力、第三型分泌蛋白



Abstract

Ralstonia solanacearum is a soil-borne pathogen which causes the devastating bacterial wilt disease (BW) worldwide. *R. solanacearum* race 1 strains have an unusual wide host range. Moreover, they are highly diverse both in their genotypes and virulence on tomato. Tomato cv. Hawaii 7996 (H7996), known to be the most stable resistance source, can be totally broken down by a group of *R. solanacearum* strains with high virulence. Therefore, gaining insight of virulence determinants of *R. solanacearum* and elucidation of their functions are expected to provide important information leading to new strategies for effective disease management of BW. The aims of this study were to characterize *R. solanacearum* strains with various levels of virulence and to study the function of *R. solanacearum* candidate virulence determinants. Characterization of wild-type strains of various virulence levels suggests that the differential capability of biofilm formation may be related to the virulence levels. However, the variable growth rate, capability of swimming motility, and sensitivity of oxidative stress implies that virulence is complex and may require the coordination of multiple facets. Furthermore, previous microarray analysis had identified groups of genes unique to either high- or low-virulent strains. Single-gene knock-out mutants in the background of high-virulence strains Pss1308 or Pss749 of *RSc2322-RSc2325* gene cluster, which is unique to high-virulent strains, displayed decreased motility, increased sensitivity to oxidative stress, and decreased virulence in H7996. Consistently, a low virulent-strain expressing the *RSc2322-RSc2325* gene cluster displayed decreased motility, increased capability of root attachment, and increased virulence in a susceptible tomato cultivar L390. These findings together indicate the *RSc2322-RSc2325* gene cluster additively contributes to high virulence. Moreover,

promoter activity assays also confirmed the type III effectors RSp0213 and RSc3174, which are unique to low virulent strains, are regulated by HrpG. Most importantly, a high-virulent strain carrying *RSp0213* or *RSc3174* conferred decreased virulence in H7996, revealing these effectors do play roles in the low virulence level of *R. solanacearum* strains. These studies together are expected to pave the way not only for elucidating mechanisms and determinants involved in *R. solanacearum* virulence but also potentially establishing useful disease control means.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, virulence, type III effectors



縮寫與全名對照表

縮寫	全名
Amp	Ampicillin
BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pair
CFU	Colony formation unit
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DPI	Days post inoculation
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
EPS	Exopolysaccharide
Gm	Gentamycin
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamycin
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotation per minutes
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SM1	Semi-selective medium
TBOOH	Tert-butylhydroperoxide
Tet	Tetracycline
TTC	2,3,5-triphenyl- tetrazolium chloride
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

目次

口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	v
常用名詞之縮寫與全名對照表	vii
目次	viii
表目次	xiv
圖目次	xv
附錄目次	xvii
第一章 前言	1
1. 青枯病(Bacteril wilt)	1
2. 番茄青枯病菌(<i>Ralstonia solanacearum</i>)	1
3. 番茄青枯病菌生活史及發生生態	2
4. 青枯病菌的分子致病機制	3
(1) 胞外多醣體(exopolysaccharides, EPS)	3
(2) 鞭毛和纖毛(flagella and pili)	4
(3) 細胞壁分解酵素(cell wall drgradation enzyme, CWDE)	4
(4) 第三型蛋白分泌系統(Type III secretion system, T3SS)	4
5. 台灣本土自番茄分離之毒力相關青枯病菌株	7
6. 青枯病菌之生物微陣列晶片(Microarray)研究目標	8

7. 植物病原細菌毒力相關研究	8
8. 研究動機與目標	9
第二章 材料與方法	10
供試菌株、質體及菌體培養條件	10
I. 青枯病菌生長及致病相關特性分析	10
1. 不同培養基上生長之測試.....	10
2. 泳動能力測定(Swimming motility).....	10
3. 生物膜形成之測定(Biofilm formation).....	10
4. 番茄根部附著能力(Root attachment).....	10
5. 胞外酵素之分泌(Exoenzyme Secretion).....	11
6. 菸草過敏性反應(Hypersensitive response, HR).....	11
7. 植物體內增生能力分析(Multiplication in planta)	11
8. 逆境測試.....	11
(1) 最小抑制濃度測定(Minimum inhibitory concentration, MIC).....	11
(2) 菌落形成測試	12
II. 基因功能性研究.....	12
1. 南方轉漬雜合反應(Southern blotting)	12
(1) 青枯病菌染色體 DNA(genomic DNA)的萃取.....	12
(2) 探針(probe)的製備.....	12
(3) DNA 轉印.....	13
(4)雜合反應 (Hybridization).....	13
(5)免疫探知作用 (Immunological detection).....	14
2. Alkaline lysis 萃取質體.....	14

3. 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)	14
4. 限制酶消化水解及膠體純化	15
5. 載體與目標片段接合	15
6. 大腸桿菌勝任細胞的轉型作用	15
7. 青枯病菌的自然轉型作用	16
8. 青枯病菌勝任細胞製備	16
9. 青枯病菌的電穿孔轉型作用	16
10. Promoter activity assay	16
III. 番茄之毒力測試(Virulence assay)	17
IV. 生物統計分析(Statistic analysis)	17
1. 生長與致病相關特性分析	17
2. 番茄之毒力測試	17
第三章 結果	18
I. 不同毒力表現之青枯病菌特性分析	18
1. 不同培養基上生長之測試	18
2. 泳動能力測定	18
3. 生物膜形成之測試	18
4. 番茄根部附著能力	18
5. 胞外酵素之分泌	18
6. 菸草過敏性反應	19
7. 氧化逆境測試	19
II. 高毒力菌株特有之 <i>RSc2322-RSc2325</i> 基因研究	19
1. 利用南方轉漬雜合分析法及聚合酶連鎖反應驗證微陣列晶片分析結果	19

2. 蛋白質序列分析	20
3. Operon 組成及其調控	20
(1) operon 組成	20
(2) operon 之調控	20
4. 高毒力菌株 <i>RSc2322-RSc2325</i> 單一基因破壞之突變株特性分析	21
(1) 不同培養基生長測試	21
(2) 泳動能力	21
(3) 生物膜形成能力	21
(4) 根部附著能力	21
(5) 胞外酵素分泌	21
(6) 菸草過敏性反應	22
(7) 植物體內增生能力	22
(8) 逆境測試	22
(9) 番茄毒力測試	22
5. 低毒力菌株表現 <i>RSc2322-RSc2325</i> 之特性分析	23
(1) 植物體內增生情形	23
(2) 泳動能力分析	23
(3) 生物膜形成	23
(4) 番茄根部附著能力	24
(5) 菸草過敏性反應	24
(6) 番茄毒力測試	24
III. 低毒力菌株特有之第三型分泌蛋白 <i>RSp0213</i> 及 <i>RSc3174</i> 基因研究	24
1. 利用南方轉漬雜合分析法及聚合酶連鎖反應分析基因的存在	24

2. 核酸及蛋白質序列分析	25
3. 利用 β -galactosidase activity 分析基因是否受到 <i>hrpG</i> 基因的調控	25
4. 基因轉移表現株之特性分析	25
(1) 不同培養基生長測試	25
(2) 泳動能力	25
(3) 生物膜形成能力	26
(4) 根部附著能力	26
(5) 植物體內增生能力	26
(6) 菸草過敏性反應	26
(7) 番茄毒力測試	26
第四章 討論	28
1. 野生型菌株生長及致病特性比較	28
(1) 生長分析：毒力表現與生長速度無關	28
(2) 致病因子分析：生物膜的形成能力可能與毒力之程度相關	28
(3) 逆境分析：氧化逆境之敏感性與毒力無正相關	30
(4) 毒力由一複雜之網絡調控	30
2. 本研究測試之高毒力菌株依據致病相關特性可分為兩大群	31
3. <i>RSc2322-RSc2325</i> 基因群獨特存在高毒力菌株且可分為三個轉錄單位	31
4. <i>RSc2322-RSc2325</i> 可能為演化的證據並且調控氧化逆境及重金屬之抗性	31
5. 高毒力菌株特有之 <i>RSc2322-RSc2325</i> 基因群影響毒力表現	33
6. <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 為低毒力菌株特有基因並位於 <i>HrpG</i> 下游	36
7. 低毒力菌株特有之第三型分泌蛋白 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 影響毒力表現	36
8. 總結	37

第五章 未來展望 38

參考文獻 39



表目次

表一、本研究所使用之菌株及質體.....	48
表二、不同毒力的本土青枯病菌野生型菌株之生長與致病相關特性比較.....	50
表三、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下， <i>RSc2322-RSc2325</i> 單一基因突變株之氧化逆境藥劑最小抑制濃度測定.....	51
表四、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下， <i>RSc2322-RSc2325</i> 單一基因突變株與野生型菌株於生長及致病相關特性比較.....	52
表五、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下， <i>RSc2322-RSc2325</i> 單一基因突變株與野生型菌株接種於抗病品系 Hawaii 7996 番茄後 21 天之毒力表現.....	53
表六、低毒力菌株 Pss216 表現 <i>RSc2322-RSc2325</i> 菌株與載體轉型株(empty vector) 生長及致病相關特性比較.....	54
表七、高毒力 Pss190 及 Pss1308 表現 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 菌株與載體轉型株的生長及致病相關特性比較.....	55
表八、高毒力 Pss190 表現 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 菌株與載體轉型株於抗病品系 Hawaii 7996 番茄上之毒力表現.....	56

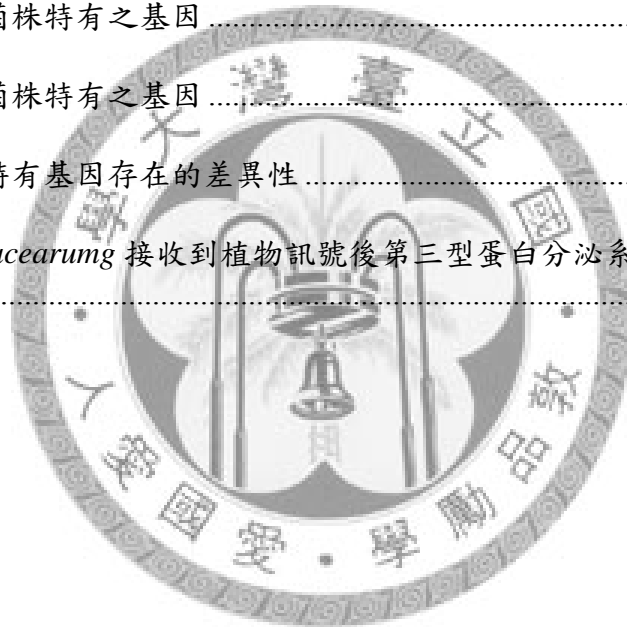
圖目次

圖一、不同毒力青枯病菌株在 CPG、CPG+SDS、M9 固體培養基生長情形	57
圖二、不同毒力青枯病菌株形成生物膜能力	58
圖三、不同毒力青枯病菌株的泳動能力	59
圖四、不同毒力青枯病菌株胞外酵素活性的表現	60
圖五、不同毒力青枯病菌株在感病品系 L390 番茄根部附著能力	61
圖六、不同毒力青枯病菌株在菸草 <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Wisconsin 38 (W38)引起之過敏性反應	62
圖七、不同毒力青枯病菌株在 0.5 mM H ₂ O ₂ 氧化逆境處理下生長情形	63
圖八、RSc2322-RSc2325 基因群存在之驗證	64
圖九、RSc2322-RSc2325 基因群之蛋白質序列分析	65
圖十、在高毒力 Pss1308 背景下 RSc2322-RSc2325 之操縱子(operon)結構	66
圖十一、在氧化逆境及重金屬逆境處理下 RSc2322-RSc2325 的啟動子活性	67
圖十二、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下的 RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株 <i>in vitro</i> 和 <i>in planta</i> 的生長情形	68
圖十三、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 遺傳背景下，RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株在生物膜形成、泳動能力和根部附著能力之測試	69
圖十四、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 背景下 RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株之胞外酵素活性測試	70
圖十五、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 背景下 RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株在菸草 W38 和 <i>N. benthamiana</i> 上誘導過敏性反應	71
圖十六、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 背景下 RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株對於逆境之反應測試	72
圖十七、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 背景下 RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株於抗病品系番茄 Hawaii 7996 之毒力測試	73

圖十八、表現 <i>RSc2322-RSc2325</i> 基因群之低毒力菌株 Pss216 與空載體(empty vector) 轉型株於 <i>N. benthamiana</i> 之生長情形.....	74
圖十九、表現 <i>RSc2322-RSc2325</i> 之低毒力 Pss216 菌株與空載體(empty vector) 轉型株在生物膜形成、番茄根部附著能力和泳動能力測定	75
圖二十、表現 <i>RSc2322-RSc2325</i> 之低毒力 Pss216 菌株與空載體(empty vector) 轉型株在菸草 W38 和 <i>N. benthamiana</i> 上誘導之過敏性反應.....	76
圖二十一、表現 <i>RSc2322-RSc2325</i> 之低毒力 Pss216 菌株與空載體(empty vector) 轉型株在於感病品系番茄 L390 之毒力測試.....	77
圖二十二、 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 基因存在之驗證	78
圖二十三、低毒力菌株與代表性菌株 GMI1000 之第三型分泌蛋白 <i>RSp0213</i> 及 <i>RSc3174</i> 胺基酸序列比對	79
圖二十四、 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 啟動子之調控分析	80
圖二十五、在高毒力 Pss190 和 Pss1308 遺傳背景下表現 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 菌株與空載體(empty vector) 轉型菌株 <i>in vitro</i> 和 <i>in planta</i> 的生長情形.....	81
圖二十六、在高毒力 Pss190 和 Pss1308 遺傳背景下表現 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 菌株與空載體(empty vector) 轉型菌株在生物膜形成能力、附著於番茄根部能力及泳動能力之分析	82
圖二十七、在高毒力 Pss190 和 Pss1308 遺傳背景下表現 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 菌株與空載體(empty vector) 轉型菌株誘導過敏性反應測試	83
圖二十八、在高毒力 Pss190 遺傳背景下表現 <i>RSp0213</i> 和 <i>RSc3174</i> 菌株與空載體(empty vector) 轉型菌株於抗病品系番茄 Hawaii 7996 之毒力測試.....	84

附錄目次

附錄一、本研究所使用培養基及藥劑配方	85
附錄二、本研究中所使用之引子	90
附錄三、 <i>RSc2322-RSc2325</i> cluster、 <i>RSp0213</i> 及 <i>RSc3174</i> 於 GMI1000 的基因體中之相對位置及轉錄方向	92
附錄四、台灣本土 <i>R. solanacearum</i> 分離株的毒力分群	93
附錄五、Phylotype I 菌株分群	94
附錄六、高毒力菌株特有之基因	95
附錄七、低毒力菌株特有之基因	96
附錄八、高毒力特有基因存在的差異性	97
附錄九、 <i>R. solanacearum</i> 接收到植物訊號後第三型蛋白分泌系統 <i>hrp</i> 基因之調控	98



第一章 前言

1. 青枯病(Bacterial wilt)

青枯病，又稱細菌性萎凋病(Bacterial wilt)，是由 *Ralstonia solanacearum* 所引起，為土壤傳播性的維管束病害(Jaunet and Wang, 1999; Danesh *et al.*, 1994; Mangin *et al.*, 1999)，屬系統性病害，本病危害許多重要經濟作物，如番茄、香蕉、馬鈴薯等(Hayward, 1991; Denny, 2006)，並可能造成百分之百的作物損失，在台灣是夏季番茄生產的重要病害之一。本病主要發生於根、莖、葉，很少發生於果實，常由根部發病，細根褐化且腐爛，影響根部水分的吸收，植株地上部下位葉的葉柄首先呈現下垂，而後葉片漸次萎凋，因而綠色的植株急速萎凋而枯死褐變，故稱為「青枯病」。橫切被害莖部，可見維管束木質部褐變，以手擠壓有乳白色黏性菌液溢出。

本病害最初發生於熱帶及亞熱帶地區，然而目前已擴大成為一世界性的重要病害，包含兩百種以上植物受到危害(Hayward, 1991; Denny, 2006)。由於 *R. solanacearum* 可於土壤中殘存很久的時間，因此目前尚無有效的化學防治藥劑可防治本病害。進一步探討 *R. solanacearum* 與寄主之間的交互關係可以幫助了解並防治本病害，因此關於 *R. solanacearum* 的基因功能性研究也是目前重要研究課題之一。

2. 番茄青枯病菌(*R. solanacearum*)

R. solanacearum 為革蘭氏陰性菌、好氣、桿菌，具有極生的長鞭毛，屬於 β -proteobacteria (Denny, 2006)。具有氧化酵素(oxidase)、不具有精胺酸二水解酵素(arginine dihydrolase)，會在細胞外累積 poly- β -hydroxybutyrate，具有可去除氮化合物的能力，在高營養的固體培養基中會產生可擴散的咖啡色色素，無法生長在 4 °C 或 40 °C，亦無法生長於 2 % NaCl 中。

由於地理分佈及病原性上的多樣性，依其不同的特性可利用三種不同的系統區分，包括 race、biovar 及 phylotype (Denny, 2006)。根據寄主範圍可將其分為不同的 race；依據是否具有酸化含有不同雙糖(disaccharides)、糖醇(sugar alcohols)之培養基的能力，可分為六個 biovar；利用分子生物學的檢測，如 restriction fragment length polymorphism (RFLP)、repetitive element -polymerase chain reaction (rep-PCR)，可將細菌分為不同的演化群，而經由 DNA 序列演化

樹的分析後得到的單一演化群，稱為 phylotype，目前 *R. solanacearum* 可分為四個 phylotype。

目前，一個自番茄分離之廣寄主性菌株 GMI1000 (phylotype I, biovar 3, race1)的基因組已在 2002 年完成定序(Salanoubat *et al.*, 2002)，而另外寄主範圍僅限於香蕉之菌株 Molk2(phylotype II, biovar 1, race 2)、寄主範圍僅限於番茄及馬鈴薯之菌株 IPO1609 (phylotype II, biovar 2, race3)及自天竺葵分離之菌株 UW551 亦有基因組序列初稿(genome draft) (Boucher, NCBI website；Gabriel *et al.*, 2006)。*R. solanacearum* 的基因體含大量的 GC 鹼基對(約 69%)，由一個 3.7 Mb 的染色體(Chromosome)和一個 2.1 Mb 的大質體(megaplasmid)所組成。其基因體中存在許多 mobile element 及 mosaic structure，而在某些基因體區域中使用的轉錄/轉譯密碼子不同，稱為 ACUR(alternative codon-usage region)，推測 *R. solanacearum* 會藉由水平基因轉移(horizontal gene transfer)獲得基因，因而演化成具有不同性狀表現及不同 phylotype 的菌株，造成此菌可廣泛地分佈及具有相當廣的寄主範圍。

3. 番茄青枯病菌生活史及發生生態

自然環境下，*R. solanacearum* 經由天然的開口(如側根生長處)或傷口侵入寄主植物根部(Yao and Allen, 2007)，群聚於維管束中的木質部，在植物體內大量增殖並向上感染至莖部及葉部(Vasse *et al.*, 1995)。存在木質部中的細菌會分泌大量的胞外多醣體(exopolysaccharides, EPS)而阻塞維管束水分運輸(Denny, 1995)，造成植株萎凋、倒伏，進而死亡的病徵。當植物死亡後，病菌首先必須再設法存活直到感染下一個寄主。*R. solanacearum* 自感染植株被釋出後，一般在自然情況下會殘存於土壤或水中。*R. solanacearum* 在水中的存活時間視其環境的生物及非生物因子可由數週至數年，在 20~25 °C 下保存於純水中本菌可存活 40 年以上(Denny, 2006)。在土壤中，本病原細菌可殘存 14 個月以上，最長可達 25 年之久，主要殘存於根部附近較營養的土壤中或潛伏感染植株的根部(Elphinstone, 1996)。殘存於土壤的病原菌經由植株移植或昆蟲在根部造成的傷口以及側根生長時所產生的天然開口侵入感染，開始下一次的生活史。有時附著土壤的鞋子及農具也可傳播病原(Hayward, 1991)。高溫多濕季節最適宜發病，溫度低於 20 °C 則不易發病。氮肥施用過多時，可助長病害嚴重程度。

4. 青枯病菌(*R. solanacearum*)的分子致病機制

R. solanacearum 成功的感染寄主植物是一相當複雜的過程，其需要泳動能力(motility) (Trans-Kersten *et al.*, 2001 ; Trans-Kersten *et al.*, 2004 ; Kang *et al.*, 2002)及化學趨化性(Chemotaxis) (Yao and Allen, 2006)游動到寄主根部附近，接著在根部形成生物膜(biofilm) (Yao and Allen, 2007)，進而附著、纏據於根部(root attachment and colonization) (Yao and Allen, 2006 ; Schell, 2000)，侵入植物根部並獲得養分，在木質部大量地增殖、向上感染整個植株，並且也需要抑制寄主的防禦反應，而在此過程中有許多重要之基因參與調控(Schell, 2000)。在 *R. solanacearum* 的複雜致病網絡中，一個重要的核心轉錄因子 PhcA 可調控下游基因的表現而控制病原性的表現(Brumbley *et al.*, 1993 ; Clough *et al.*, 1997 ; Genin *et al.*, 2005 ; Poussier *et al.*, 2003 ; Yoshimochi *et al.*, 2009)。目前已知的致病性相關因子包含胞外多醣體(EPS) (Saile *et al.*, 1997)、第二型蛋白分泌系統(Type II secretion system)分泌之細胞壁分解酵素(Cell wall degrading enzymes, CWDE) (Denny *et al.*, 1990 ; Gonzalez and Allen, 2003 ; Huang and Allen, 2000 ; Trans-kersten *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 2005)、第三型蛋白分泌系統(Type III secretion system)及其分泌之蛋白(effectors) (Poueymiro and Genin, 2008)。這些致病相關因子之重要性及研究敘述於下：

(1) 胞外多醣體

胞外多醣體是一個由 N-acetylated monosaccharides 組成的大分子聚合物 (Schell *et al.*, 1993)，將 *R. solanacearum* 培養在實驗用培養基上或是植物體內會大量產生胞外多醣體，且絕大部分以黏液(slime)的形式存在(McGarvey *et al.*, 1999)。在之前的研究中，學者發現當突變胞外多醣體生合成相關基因後，細菌會失去致病性，無法使植物萎凋(Kao *et al.*, 1992)。同時，胞外多醣體也與根部固著及細菌進入木質部相關(Saile *et al.*, 1997)。

胞外多醣體生合成途徑中所需蛋白由一個 16-kb 的 *eps* operon 所編譯，此 operon 含有 12 個以上的基因組成，由一個啟動子(promoter)轉錄，並且受到一個複雜的網絡所調控(Huang and Schell, 1995)，包含一個 LysR-type 轉錄因子 PhcA，two-component system VsrB/VsrC 及 VsrA/VsrD，以及 XpsR。

(2) 鞭毛和纖毛(Flagella and pili)

R. solanacearum 可以產生叢生鞭毛，但在高營養的液體培養基中只有在細胞密度到 $10^7 \sim 10^9$ cell/mL 才具泳動能力。將鞭毛生合成基因 *FliC* 突變後，以澆灌方式感染番茄，會降低毒力，然而若直接將菌注入葉柄中則與野生型無差異(Trans-Kersten *et al.*, 2001)。另外，若 *R. solanacearum* 喪失化學趨化性也會使其毒力降低(Yao and Allen, 2006)。由此可知，鞭毛與 *R. solanacearum* 侵入寄主有關。

除了鞭毛外，*R. solanacearum* 亦具有極生、可伸縮的第四型纖毛(Type IV pili)，使它們可在固體的表面具有移動的能力，稱為 twitching motility。*R. solanacearum* 的第四型纖毛由 Pila 蛋白組成，其對於 twitching motility 及在番茄上毒力都是必須的(Kang *et al.*, 2002)，喪失第四型纖毛的突變株也會降低其生物膜的形成，並且無法附著在番茄根部。

(3) 細胞壁分解酵素

細胞壁分解酵素在病原菌侵入寄主的過程中扮演一個重要的角色，*R. solanacearum* 透過第二型蛋白分泌系統輸送，共產生六種胞外酵素，包含一種 β -1, 4-endoglucanase (Egl)，一種 exoglucanase (ChbA)，一種 endo-polygalacturonase (PehA)，二種 exo-polygalacturonase (PehB 和 PehC)，及一種 pectin methylesterase (Pme)。若突變第二型蛋白分泌系統會使細菌在番茄的喪失致病性(Kang *et al.*, 1994)。在 K60 中，PehA 和 PehB 與其毒力相關(Huang and Allen, 2000)；而在 GMI1000 中，Egl 和 ChbA 突變後會使病菌延遲發病，與其致病性有關(Liu *et al.*, 2005)。此外，其他透過第二型蛋白分泌系統分泌之蛋白與 *R. solanacearum* 系統性感染番茄亦具有關連性(Liu *et al.*, 2005)。

(4) 第三型蛋白分泌系統

第三型蛋白分泌系統廣泛存在於許多革蘭氏陰性菌中，為致病性上不可缺少的分泌系統(Hueck, 1998)。在動物病原細菌 *Yersinia* spp.、*Shigella flexneri*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa* 等及植物病原細菌 *P. syringae*、*Xanthomonas* spp.、*Pectobacteria* spp.(原 *Erwinia* spp.) 等都有深入之研究(Troisfontaines and Cornelis, 2005)，病原菌經由此系統可將一些毒力蛋白以類似針筒狀的構造直接送入寄主體內，促使一些養分的獲得或是抑制寄主的防禦

反應。第三型蛋白分泌系統具有四個特徵：一、特定之蛋白質(Type III effectors, T3Es)會透過此系統被送入寄主細胞中，進而影響寄主細胞內之正常生理功能，以利細菌之增殖；二、所分泌之蛋白質沒有可切割之訊號傳導序列(signal peptide)；三、在分泌的過程中，許多被分泌的蛋白質須有一個對應的 chaperone 協助其分泌；四、大多數病原菌都需與寄主接觸後才會大量活化第三型蛋白分泌系統(Galan and Collmer, 1999)。

植物病原細菌的第三型蛋白分泌系統由 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) / *hrc* (hypersensitive response and conserved)的基因組所組成，其對於感病植物上產生之致病性(pathogenicity)及抗病植物上誘導之過敏性反應(hypersensitive response, HR)相當重要(Boucher *et al.*, 1992)。當抗病植物受到病原菌感染時，病菌產生之第三型分泌蛋白或是 avirulence protein (Avr)會被植物的抗性蛋白(resistance protein, R protein)所辨認，進而使植物啟動防禦反應，產生 callose 將細胞壁增厚，並且在細胞內累積大量過氧化物而讓細胞快速凋亡(program cell death)，將病原菌侷限在侵入位置，稱為過敏性反應(Hypersensitive response, HR) (Jones and Dangl, 2006)。而若病菌分泌的蛋白不被植物所辨認，則可成功感染植物而產生病徵。在 *R. solanacearum* 中也有研究指出將任一 *hrp* 基因突變後，會使病菌在感病植物失去致病力並且無法大量增殖，在抗病植物也失去誘導過敏性反應的能力(Van Gijsegem *et al.*, 1995)。依照 *hrp/hrc* 基因組的功能特性可區分成三種蛋白，分別為調控蛋白(如 HrpS、HrpR、HrpL、HrpV)、將特定蛋白送入寄主體內的胞器蛋白及被分泌至胞外的蛋白(pilus 和 effectors)。

目前的植物病原細菌依照其基因的相似性、operon 組成及調控可分為兩個群組，第一群為包含 *P. syringae* 和 *Pectobacteria amylovora* (原 *Erwinia amylovora*)，第二群則包含 *R. solanacearum* 及 *X. campestris*(Alfano and collmer, 1996)。在第一群中，其 *hrp* operon 受 HrpL 的調控，係藉由 HrpS、HrpR 交互作用後與 sigma δ^{54} 結合並活化 HrpL，活化後的 HrpL 再調控其他下游基因表現(Xao *et al.*, 1994；Wei *et al.*, 1995)。第二群的細菌 *hrp* operon 則是受到 AraC family 的活化，在 *X. campestris* 中稱為 HrpX，會受 HrpG 活化後再活化下游 *hrp* 基因之轉錄(Oku *et al.*, 1995；Wengelnik and Bonas, 1996)。在 *R.*

solanacearum 中，在其 1.9-Mb 的大質體中具有 23-kb 的 *hrp* 基因群，共分成五個轉錄單位，編譯出超過 20 個聚胜肽鏈，組成橫跨內外膜的蛋白分泌系統(Arlat *et al.*, 1992)。病菌首先透過外膜上的 PrhA 感受到植物訊號後，將訊號傳給內膜上的 PrhR，當 PrhR 接受到訊號後，PrhI 會離開 PrhR 被釋放到細胞質中，PrhI 為 sigma factor，會促使 RNA 聚合酶轉錄 *prhJ*，PrhJ 會進一步活化 *hrpG* 轉錄，HrpG 再誘導 HrpB 表現，由 HrpB 調控下游基因之轉錄(Marrenda *et al.*, 1998； Brito *et al.*, 2002； Brito *et al.*, 1999； Yoshimochi *et al.*, 2009)。

可被第三型蛋白分泌系統所分泌、輸送脂蛋白通稱為 effector，主要分為兩類，一類是會被送入植物細胞內的蛋白，包含 *avr* (avirulence)和 *hop* (hrp-dependent outer protein)基因所編譯的蛋白(Alfano *et al.*, 2000)，因其可能具有相似的傳送訊號，因此 *P. amylovora* 與 *P. syringae* 可分泌彼此的 DspE 和 AvrE 蛋白；*Y. enterocolitica* 可分泌 *P. syringae* 的 AvrB 和 AvrPto 蛋白，*X. campestris pv. vesicatoria* 可分泌 *Y. enterocolitica* 的 YopE 蛋白(Collmer *et al.*, 2000)。另一類的 effector 蛋白作用於植物細胞間隙，不會進入細胞內，如 harpin 蛋白，最早發現者有 *P. syringae* 的 HrpZ (He *et al.*, 1993)及 *R. solanacearum* 的 PopA (Arlat *et al.*, 1994)。

在 *R. solanacearum* 中，*hrp* 基因的啟動子片段具有一個保守性的 (conserved)植物誘導性啟動子片段(plant-inducible promoter, PIP) *hrpII* box motif，序列為 TTCG-N₁₆-TTCG，此序列可能與 HrpB 的調控有關，改變保守性的序列後會影響有此 motif 的 *popABC*、*hrpY* 基因之表現(Cunnac *et al.*, 2004a)。透過生物資訊及至轉錄體學的分析，*R. solanacearum* 代表性菌株 GMI1000 被推測具有 70~80 個 effectors 會經由此系統被送入植物體(Cunnac *et al.*, 2004b)，但僅有少數 effectors 的功能被分析並確認。先前研究中，經由分析不同代表性菌株發現，青枯病菌各菌株中擁有的 effectors 具有很高的差異性(McCann and Guttman, 2008)，在 GMI1000 有半數的 effectors 是保守地存在各菌株中，推測應在很早期的時候隨著基因體遺傳而來；而各菌株擁有不同的 effectors 之差異性則可能是垂直遺傳時偶發性的喪失，或是透過水平基因轉移而獲得所造成。

在目前的關於 effectors 的功能性研究中，廣泛的可將其功能分為兩類，

第一類為做為致病蛋白(pathogenicity factors)，可抑制植物的防禦反應。除了 AWR2 和 AvrPphD 的同源蛋白外，將單一的第 effectors 不活化不會影響其在感病番茄上的致病性(Cunnac *et al.*, 2004b)。這樣的現象被推測應是第三型分泌蛋白在功能上為協同作用(synergistic)或是部分重疊(overlapping)，在 GMI1000 中，七個 GALA 蛋白同時缺失才會嚴重影響期在阿拉伯芥和番茄上的致病性(Angot *et al.*, 2006)。然而，單一的 effector 則可能與特定的寄主範圍有關，GALA7 缺失後會使 GMI1000 無法感染 *Medicago truncatula*，但在其他寄主上不受影響(Angot *et al.*, 2006)。此外，此病原菌也可透過模仿寄主的蛋白質，進而干擾寄主的細胞功能，如 GALA 蛋白具有 F-box domain，被推測其可能會影響寄主體內蛋白質降解(degradation)途徑(Angot *et al.*, 2006)。

第二類則是誘導植物產生抗性的蛋白，為了對抗病原菌的攻擊，植物也演化出抗性的 R 蛋白可專一性的辨認病原菌的 effectors (avirulence factors)的存在或作用，進而誘導過敏性反應。目前為止，四個 *R. solanacearum* 中會受到辨認 avirulence factor 已有深入研究：AvaA 和 PopP1 與病原菌在菸草上產生之過敏性有關(Poueymiro *et al.*, 2009)，GMI1000 在特定生態型(ecotype)的矮牽牛及阿拉伯芥的抗性則是因為 PopP1(Lavie *et al.*, 2002)或 PopP2(Deslandes *et al.*, 2002)受到辨認所致。在阿拉伯芥中，PopP2 受到 RRS1-R 辨認後會進入核中，誘導抗性基因表現。最近研究顯示一個 cysteine protease RD19 亦會與 PopP2 有交互作用，然而其在抗性扮演之角色仍未知，僅知會 RD19 也會受到 PopP2 誘導而進入細胞核(Bernoux *et al.*, 2008)。

5. 台灣本土自番茄分離之毒力相關青枯病菌株

在台灣及法屬西印度群島的 Race 1 青枯病菌株在毒力表現上有很高的差異性存在(Hsu *et al.*, 1979；Prior *et al.*, 1990)。Jaunet 和 Wang (1999)收集 46 個在台灣不同地區的番茄植株分離而來的 race 1 青枯病菌株，利用 rep-PCR 及 random amplified polymorphic DNA (RAPD)分析後發現不同的分離株在基因型(genotype)上差異性高，另以感病、中等抗病及感病品系之番茄分析其毒力，也發現在分離株中具有不同程度的毒力表現，並可分為六個群組；然而，在基因型及毒力兩種特性中，尚未發現其關聯性。

Wang 等人(2005)進一步分析自番茄分離之不同毒力的菌株在根部纏據

(root colonization)能力之差異，結果顯示在較高接種濃度(10^7 cells/g)下，自番茄分離之菌株的低毒力表現，與入侵根部之能力和在莖部向上移動之能力沒有關聯，但與其在植物體內增生和及木質部中水平的移動有關。而低毒力的菌株在較低接種濃度($10^4\sim 10^5$ cell)下，纏繞根部能力較高毒力菌株為差。

6. 青枯病菌之生物微陣列晶片 (Microarray)

自番茄分離之 *R. solanacearum* race 1 菌株 GMI1000 於 2002 年由法國 Boucher 博士研究團隊完成解序(Salanoubat *et al.*, 2002)，而為了找出致病性調控因子 *hrpB* 所調控之相關基因，該團隊製作出一個含有 GMI1000 所有基因片段的 DNA 微陣列晶片(Occhialini *et al.*, 2005)。近年自馬鈴薯分離之 IPO1609 菌株及自香蕉分離之 Molk2 菌株亦有序列初稿，因而此二菌株特有的 1100 個基因亦被加入，製備成第二代 DNA 微陣列晶片。

此外，亞蔬中心王肇芬博士實驗室利用 suppression subtractive hybridization (SSH)的方式，以台灣之高毒力菌株做為 tester，低毒力菌株做為 driver，分離出 145 個可能與毒力具有相關性並且是台灣高毒力菌株特有的 sequence fragment (SF)，這些片段亦被加入，製備成第三代 DNA 微陣列晶片中(尚未發表)。

7. 植物病原細菌毒力相關研究

目前關於影響植物病原細菌毒力程度的基因之研究相當少，只有少數研究 *Xanthomonas* spp. 的文章曾被發表，且多著重於第三型分泌蛋白(effectors)之研究。Bai 等人(2000)將 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 中 *avrBs3/pthA* (avirulence and pathogenicity) family 的 *avr* 基因及其同源基因(homologous gene)突變後，會使病菌在感染不表現任何抗性基因(resistance gene)的水稻品系後產生較短的病斑，且不同 *avr* 基因突變菌感染後造成病斑縮短的現象也程度上也有所不同，他們接著利用質體將具有功能的 *avr* 基因互補回突變株中，也發現不同的 *avr* 基因對於毒力表現的影響也有所不同，且彼此之間在調控毒力表現的功能是不可互相取代的。Fujikawa 等人(2006)進一步發現這些 *avrBs3* family 的 *avr* 基因會抑制植物的過敏性反應(Hypersensitive response, HR)及相關防禦基因的表現，且不同的 *avr* 基因抑制程度也不相同。Shiotani 等人(2007)則在 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 中利用跳躍子(Transposon)插入的方式突變一個 *pthA* 的同源

基因(homolog) *hssB3.0* 基因後，發現原本在柑橘 *Citrus grandis* 品系呈現較弱毒力的病菌會回到正常的毒力表現，顯示 *hssB3.0* 基因抑制了此病菌在 *C. grandis* 品系的毒力，他們更進一步驗證此基因是廣泛存在於低毒力表現的菌株而不存在於正常毒力的菌株。

此外，在 *Pectobacteria chrysanthemi* (原 *Erwinia chrysanthemi*) 中也發現一個編譯 osmoprotectant uptake system 的 *ousA* 基因突變後，會使得病菌果膠分解酵素(pectate lyase, Pel)大量增加，而加速在馬鈴薯塊莖上的浸軟作用(maceration)，呈現較高毒力表現，然而 *ousA* 基因突變所造成滲透壓調節之改變如何影響細菌果膠分解酵素的產量仍尚待釐清(Gloux *et al.*, 2005)。在 *Pectobacteria amylovora* (原 *Erwinia amylovora*) 的研究則指出 multidrug resistance efflux pump (MDRs) *ActAB* 會影響病菌對毒性藥劑的抗性進而影響對植物的毒力(Burse *et al.*, 2004)。

本研究中所探討的 *R. solanacearum*，多數研究著重於其致病相關的因子，如胞外多醣體、泳動性與第三型分泌系統及其分泌蛋白等，僅有少數研究提及毒力程度之調控。Lavie 等人(2002)曾發表一個 Yop/AvrRxv family 的一個 *avr* 基因 *PopPI* 突變後會影響病菌在番茄及阿拉伯芥(*Arabidopsis*)上的毒力。Brown 等人(2007)則發現兩個 MDR 基因 *acrA* 和 *dinF* 突變後，會使 *R. solanacearum* 對於抗生素(antibiotics)、植物抗菌素(phytoalexins)等毒性物質較為敏感並且在感病的 Bonny Best 品系番茄上毒力下降。

青枯病是全球性的重要病害，然而對於本病菌是如何調控相關基因而表現不同毒力程度之研究仍相當少，因此也是目前尚待釐清的課題之一。

8. 研究動機與目標

由於台灣本土的 race 1 青枯病菌株在基因型及毒力表現上具有很高的差異性(Jaunet and Wang, 1999；Wang and Lin, 2005；Lin *et al.*, 2008)，因此本研究目的有二：首先，探討在番茄上表現不同毒力的台灣本土 *R. solanacearum* 菌株在感染過程中各項致病相關因子的表現上是否有差異；其次，自生物微陣列晶片分析中選取可能與毒力相關的基因(附錄六、七)，利用各種研究策略進行功能性研究，進一步驗證其中一些不同毒力菌株分別特有之基因是否確實在青枯病菌毒力上具關聯性及其可能扮演之角色。

第二章 材料與方法

供試菌株、質體及菌體培養條件

本研究所使用之菌株與質體特性及來源皆列於表一，培養基及藥劑配方列於附錄一。

青枯病菌(*R. solanacearum*)以 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride medium (TTC) 或 CPG 固體培養基於 28°C 培養，大腸桿菌(*E. coli*)以 Luria Bertani agar (LB) 固體培養基於 37°C 培養。依所需添加抗生素：ampicillin (Amp, 50 µg/mL)；kanamycin (Kan, 50 µg/mL)；tetracyclin (Tet, 10 µg/mL)；gentamycin (Gm, 10 µg/mL)。

I. 青枯病菌生長及致病相關特性分析

1. 不同培養基上生長之測試

將青枯病菌以 523 液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養 16 小時，將菌液以無菌水調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.3，約 10⁸ CFU/mL，再以 10 倍系列稀釋至 10⁵、10⁴、10³ CFU/mL，取 10 µL 不同濃度之菌液滴於 TTC(或 CPG)、TTC(或 CPG)+SDS (0.01%)、M9 及 SM1 固體培養基，28 °C 黑暗培養 2 至 4 天。

2. 泳動能力測定(Swimming motility)

將青枯病菌劃於 TTC 固體培養基於 28°C 隔夜培養 16 小時，將菌以 tip 刮下並回溶於無菌水，調整 OD₆₀₀ 吸光值為 1，取 1 µL 菌液滴於 0.3% 洋菜膠培養基(含 1% Tryptone)，28°C 黑暗培養 24 小時後測量直徑。

3. 生物膜形成之測定(Biofilm formation)

將青枯病菌以 523 液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養 16 小時，以 BG 液體培養基將菌液調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.1。於 96 孔無菌微量孔盤中，每一孔加入 180 µL BG 液體培養基，再加入 20 µL 菌液，於 28 °C 靜置培養 24 小時。以微量吸管抽吸將沉澱物重新懸浮後，以 ELISA reader (Beckman Culter AD340) OD₅₇₀ 測量菌液濃度。去除細菌懸浮液後，加入 200 µL 1% 結晶紫染劑染色 15 分鐘。吸除結晶紫後，以 200 µL 無菌水清洗 3 次，最後加入 200 µL 1% SDS 溶解生物膜，利用微量吸管充分混勻後，以 ELISA reader OD₅₇₀ 測量結晶紫染色之生物膜。

4. 番茄根部附著能力(Root attachment)

將 L390 番茄種子浸泡發芽 2 天，再將種子放置於沾濕的 3M 濾紙上，黑暗生長 2 天。青枯病菌以 523 液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養 16 小時，將菌液以無菌

水調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.3，約 10⁸ CFU/mL，再以 10 倍系列稀釋至 10⁶ CFU/mL，共 30 mL。將菌液及 5 顆帶有根的種子放入 15 公分的培養皿中，28°C 下以 50 rpm 震盪培養 4 小時，之後切下 2 公分的根，放入 30 mL 的 0.88 % NaCl 以 200 rpm 清洗 30 秒，再將根放入 1 mL 的 0.88% NaCl 中，震盪 20 秒，再以 10 倍系列稀釋至 100 倍，取 50 μL 100 倍稀釋液塗佈於 SM1 固體培養基，28°C 黑暗培養 2~3 天後計算菌落數。

5. 胞外酵素之分泌(Exoenzyme secretion)

將青枯病菌劃於 TTC 固體培養基於 28°C 隔夜培養 16 小時，將菌以 tip 刮下並回溶於無菌水，調整 OD₆₀₀ 吸光值為 1，取 2 μL 菌液滴於含不同基質之固體培養基(附錄一)，28°C 黑暗培養 2 天。Pectin methylesterase (Pme)及 Polygalactouronase (Peh)培養基以 2 M HCl 呈色 15 分鐘，endoglucanase (Egl) 培養基則以 1%剛果紅染色 15 分鐘後，再以 1 M NaCl 溶液退染，測量產生的暈環直徑。

6. 菸草過敏性反應(Hypersensitive response)

青枯病菌以 523 液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養 16 小時，將菌液以無菌水調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.3，約 10⁸ CFU/mL，分別取 50 μL 和 20 μL 菌液以針筒注射至 *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 (W38) 和 *N. benthamiana* 菸草葉片，分別於 24 小時和 72 小時後觀察記錄之。

7. 植物體內增生能力分析(Multiplication in planta)

將青枯病菌以 523 液體培養基於 28 °C 隔夜震盪培養 16 小時後，將菌液以無菌水調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.3，約 10⁸ CFU/mL，直接以針筒注入 4 週大 *N. benthamiana* 菸草葉片，分別在注入 0 小時及 24 小時後以直徑約 1 公分的打洞器取下 leaf discs，稱重後以 1 mL 無菌水磨碎，並以 10 倍系列稀釋至 10⁶ 倍，取各稀釋倍數懸浮液 10 μL 滴於 SM1 固體培養基，28°C 黑暗培養 2 至 3 天後，計算菌落數。

8. 逆境測試(Stress response)

(1) 最小抑制濃度測定(Minimum inhibitory concentration, MIC)

在 minimal 培養基中測試時，首先將青枯病菌以 523 液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養 16 小時後，以無菌水清洗兩次去除 523 培養基。再改以 MP 液體培養基調整 OD₆₀₀ 至 0.1 共 2 mL，28°C 下 200 rpm 震盪培養 6 小時。之後測量 OD₆₀₀，以

無菌水調整至 OD₆₀₀ 為 0.3 (約 10⁸ CFU/mL)，取 50 μL 菌液加入 2 mL 含測試藥劑之 MP 液體培養基，28°C 下 200 rpm 震盪培養 24 小時。測量 OD₆₀₀，菌不再生長的最低的濃度為其最小抑制濃度。

若在 rich 培養基中測試時，則是以 CPG 液體培養基震盪培養，並省略無菌水清洗的步驟，直接以相同培養基進行次培養六小時，以相同方式進行測試。

(2) 菌落形成測試

將青枯病菌以 523 液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養 16 小時後，以無菌水調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.3，約 10⁸ CFU/mL，再以 10 倍系列稀釋至 10⁵、10⁴、10³ CFU/mL，取 10 μL 不同濃度之菌液滴於含欲測試藥劑之 TTC (rich) 或 MP (minimal) 固體培養基，28°C 黑暗培養 2 至 4 天。

II. 基因功能性研究

1. 南方轉漬雜合反應(Southern blotting)

(1) 青枯病菌染色體 DNA(genomic DNA)的萃取

挑取青枯病菌單一菌落至 523 液體培養基，於 28°C 震盪培養箱中黑暗隔夜培養 12~16 小時，取 1 mL 的菌液以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液後，加入 300 μL lysis buffer (40 mM Tris-acetate pH7.8, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 1% SDS)，以微量吸管抽吸以懸浮沉澱物，再加入 100 μL 5 M NaCl 並以微量吸管抽吸數次混合均勻，以 13000 rpm 4°C 離心 15 分鐘。取上清液至新的微量離心管，加入等體積之 Chloroform，上下反轉離心管以混勻，13000 rpm 4°C 離心 15 分鐘。取上層溶液至新的微量離心管，加入等體積的 isopropanol 及 1/10 體積的 3M NaOAc 反轉離心管數次混勻，13000 rpm 4°C 離心 10 分鐘。去除上清液後，加入 500 μL 75% 酒精以沖洗沉澱物，上下反轉數次混合均勻，13000 rpm 4°C 離心 10 分鐘。去除上清液，重複步驟沖洗一次後，自然烘乾沉澱物，加入 30 μL 無菌去離子水回溶 DNA，並加入 2 μL RNaseA (20 μg/mL)，置於 37°C 30 分鐘，將萃取的 DNA 保存於 -20 °C 備用。

(2) 探針(probe)的製備

利用 Boehringer Mannheim 的 PCR DIG labeling mix 的方式，將探針標記上 DIG。以染色體 DNA 作為模板取 1 ng，加入 5 μL 的 10x PCR reaction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂)，5 μL 的 PCR DIG labeling mix

(dATP、dCTP、dGTP 各 2 mM，1.9 mM dTTP，0.1 mM digoxigenin-11-dUTP/DIG-11-dUTP，pH 7.0)，1 μ L 的基因 forward 引子(10 μ M)，1 μ L 的基因 reverse 引子(10 μ M)，5 μ L DMSO，0.2 μ L 的 DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 的 PCR 反應液中。混合均勻後放入聚合酶連鎖反應器中進行反應。PCR 反應溫度與時間如下所示：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	94°C/5 分鐘		
30	94°C/30 秒	T°C/30 秒	72°C/t 分鐘
1			72°C/5 分鐘

T：溫度依據引子 Tm 值，t：時間依據增幅長度，1 kb/min。

經 PCR 擴增之產物，取 2 μ L 進行 0.8% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100 V/30 分鐘)，以確定基因之長度。

(3) DNA 轉印

將染色體 DNA 經適當限制酵素切割後，以 0.7% 瓊脂糖凝膠電泳，之後將膠體置於 0.2 N HCl 溶液中輕搖 10 分鐘，倒去 HCl 後，以去離子水沖洗 2 分鐘；再浸泡於鹼溶液(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)中輕搖 30 分鐘，再以去離子水沖洗 2 分鐘後，加入轉漬溶液(1 M NH₄OAc, 2 mM NaOH)，輕搖 10 分鐘。依據膠體大小剪裁適當的尼龍膜，以轉漬溶液浸泡至少 10 分鐘。架設轉印架橋，以轉漬溶液做為緩衝液，利用向上虹吸轉印，依序由下往上放置膠體、尼龍膜、濾紙緊密重疊，四邊再以保鮮膜封住後，疊上吸水紙，最後以適當大小的玻璃板及 300~500 g 左右的重物，平衡靜壓至隔天。轉印完成後，取出尼龍膜，以 5X SSPE 輕搖 2 分鐘後，利用紫外線交聯器中，以儀器自動設定時間的功能，照射能量為 120,000 μ J/cm²，使 DNA 與尼龍膜產生共價鍵結(cross-linking)。

(4) 雜合反應(Hybridization)

將尼龍膜移至雜合管中，加入雜合反應溶液 (5x SSC，50% formamide，0.1% sodium-lauroylsarcosine，0.02% SDS，2% blocking reagent)，總體積為尼龍膜面積 100 cm²，加入 20 mL 雜合反應溶液，置於 42°C 下進行預雜合反應 (pre-hybridization) 2 小時，完成後倒除雜合反應溶液，重新加入雜合反應溶液及加熱變性 (denature) 完成的 DIG 標記探針 (5~25 ng/mL)，總體積為尼龍膜面積 100 cm²，加入 3.5 mL

雜合反應溶液，置於 42°C 下進行雜合反應 16~24 小時。

(5) 免疫探知作用 (Immunological detection)

取出尼龍膜至塑膠盒中，加入約 20 mL 的 2x wash solution (2x SSC, 0.1% SDS)，在室溫下於平台振盪清洗 5 分鐘，倒掉 2x wash solution，重複兩次；去除 2x wash solution 後，以少許 wash buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl pH7.5, 0.3% v/v Tween 20)，在室溫下於平台振盪浸洗 1 分鐘，倒掉溶液，加入 1% (w/v) blocking reagent (溶於 1x maleic acid buffer, Roche)，在室溫下於平台振盪浸洗 30~60 分鐘，倒掉溶液，加入 antibody solution (anti-DIG AP, Roche, 1:15,000 稀釋於 blocking reagent)，在室溫下於平台振盪浸洗 30 分鐘，倒掉溶液，加入 wash buffer，在室溫下於平台振盪清洗 15 分鐘，重複一次，倒掉溶液，加入 detection buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH9.5)，在室溫下於平台振盪清洗 2 分鐘，取出尼龍膜至透明塑膠片上，在膜上均勻加入適量之 CDP-Star (Roche)，將氣泡及多餘 CDP-Star 刮除，於 LAS3000 進行冷光顯影反應。

2. Alkaline lysis 萃取質體

取 1.5 mL 菌液至微量離心管，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液。加入 150 μ L Solution I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH8.0) 並震盪重新懸浮菌塊，再加入 300 μ L 新鮮配製的 Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)，輕柔地上下反轉 5 次，靜置於室溫 5 分鐘；最後加入 225 μ L Solution III (3 M Potassium acetate, 3 M acetic acid)，上下反轉 6 至 10 次後，以 13000 rpm 4°C 下離心 10 分鐘。取上清液至新的微量離心管，加入等體積 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1)，上下反轉數次，以 13000 rpm 4°C 下離心 10 分鐘。取上清液至新的微量離心管，加入等體積的 isopropanol 及 1/10 體積的 3 M NaOAc，放置於 -20°C。30 分鐘後 4°C 13000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 500 μ L 75% 酒精沖洗沉澱物，再離心 10 分鐘。去除上清液後，自然烘乾沉澱物，加入 30 μ L 無菌去離子水回溶質體 DNA，並加入 2 μ L RNaseA (20 μ g/mL)，置於 37°C 10 分鐘，將萃取的質體 DNA 保存於 -20°C 備用 (Sambrook *et al.*, 1989)。

3. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

利用特定引子(附錄二)以聚合酶連鎖反應增幅目標基因 promoter 至 5' 端部分片段，反應液中以 1 ng 染色體 DNA 作為模板，加入 2 μ L 的 10x High Fidelity PCR

buffer, 10 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTP, 1 μL 的 forward 引子(10 μM) , 1 μL 的 reverse 引子(10 μM), 10% DMSO, 0.2 μL 的 High Fidelity DNA 聚合酶 (5 U/μL)。混合均勻後放入聚合酶連鎖反應器中進行反應。PCR 反應溫度與時間如下所示：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	94°C/5 分鐘		
30	94°C/30 秒	T°C/30 秒	72°C/t 分鐘
1			72°C/5 分鐘

T：溫度依據引子 T_m 值，t：時間依據增幅長度，1 kb/min。

經 PCR 擴增之產物，取 2 μL 進行 0.8% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100 V/30 分鐘)，以確定基因之長度。

4. 限制酶消化水解及膠體純化

將載體與目標片段的 DNA 利用限制酶消化水解。其做法如下：取 5 μL 的 DNA，加入 0.5 μL 的 (20 U/μL) 限制酵素、2 μL 10x NEBuffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT pH7.9)、0.2 μL BSA (10 mg/mL) 與去離子滅菌水，加至最後體積 20 μL，混合均勻後加入管內，置於 37°C 3 小時，進行消化水解之 DNA 後，再以 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100 V/30 分鐘)，以確定基因之長度。

利用 Micro-Elute DNA clean/Extraction Kit (GeneMark) 進行膠體純化，再以 0.8% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100 V/30 分鐘) 確定 DNA 濃度。

5. 載體與目標片段接合

將載體與目標 DNA 片段利用接合酶 (T4 DNA ligase) (New England Biolabs, U.S.A.) 接合。載體與目標 DNA 片段比例調為 3:1，加入 2 μL 的 10X T4 ligation buffer 及 0.5 μL 的 T4 DNA ligase (400 U/μL) (New England Biolabs, U.S.A.)，最後以去離子無菌水補至最終體積 20 μL，均勻混合後於 16°C 下進行接合反應 16 小時。

6. 大腸桿菌勝任細胞的轉型作用

將接合產物取 10 μL 加入 100 μL 大腸桿菌勝任細胞，置於冰上 30 分鐘，放至 42°C 熱刺激 45 秒，使細菌攝入 DNA，再置於冰上 2 分鐘，加入 1 mL SOC 培養液，置於 37°C，以 200 rpm 震盪培養 1 小時後，將菌液塗抹在含有 Gentamycin、IPTG (20 mg/ mL) 及 X-Gal (20 mg/ mL) 的 LB 固體培養基，於 37°C 下隔夜培養 16

小時，挑取單一菌落。

7. 青枯病菌的自然轉型作用

青枯病菌以添加 2% 甘油做為碳源之 MP 液體培養基於 28°C 震盪培養 2 天後，取 50 μ L 菌液與 10 μ L 質體 (3~5 μ g) 混合均勻，將混合之菌液滴於添加 2% 甘油之 MP 固體培養基，待乾後培養於 28°C 培養 2 天。以 1 mL 無菌水將菌洗下並收集於微量離心管，將菌液塗抹於含適當抗生素之 TTC 固體培養基於 28°C 培養 3 至 4 天，待菌落長出後挑取單一菌落，抽取染色體 DNA 以 PCR 確認。

8. 青枯病菌勝任細胞製備

將青枯病菌以 523 液體培養基於 28°C 震盪培養至 OD₆₀₀ 為 0.3~0.5，於 4°C 下以 6000 rpm 離心 10 分鐘。去除上清液後，以 10 mL 冰的無菌去離子水重新懸浮細菌，4°C 下以 6000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，再重複以無菌水清洗及離心一次。去除上清液，加入 5 mL 冰的 10% 甘油重新懸浮細菌，4°C 下以 6000 rpm 離心 20 分鐘。去除上清液，加入 1.5 mL 冰的 10% 甘油重新懸浮細菌，取 100 μ L 懸浮液分裝至微量離心管，並以液態氮急速冷凍，保存於 -80°C 冰箱備用。

9. 青枯病菌的電穿孔轉型作用

將青枯病菌勝任細胞與 50 ng 質體 DNA 混合後，放入事先置於冰上預冷的 cuvette 中，以 2.5 kV 的電壓進行電穿孔作用，並立即加入 1 mL 的 523 液體培養基，28°C 下震盪培養 2 小時，將菌液塗抹在含有適當抗生素的 TTC 固體培養基，於 28°C 下黑暗培養 2~3 天，挑取單一菌落。

10. Promoter activity assay (β -galactosidase activity assay)

將青枯病菌以 523 含 tetracycline 之液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養 16 小時後，以無菌水清洗兩次去除 523 培養基。若為測試 operon 組成時將菌以 MP 液體培養基調整 OD₆₀₀ 至 0.1 共 2 mL，28°C 下 200 rpm 震盪培養 5 小時。測試表現之調控時則在培養前於 MP 培養基中添加適當濃度之測試藥劑。

取 1 mL 次培養後之菌液以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液後，加入 150 μ L Z buffer 震盪以重新懸浮菌，再加入另 150 μ L Z buffer 震盪混合均勻後，取出 150 μ L 懸浮液測量 OD₆₀₀。另 150 μ L 懸浮液加入 20 μ L Chloroform 及 10 μ L 0.1% SDS，震盪 10 秒以打破細胞，接著置於 28°C 下 5 分鐘。加入 30 μ L ONPG，反轉數次，此時為 t₀。待反應液呈黃色後，加入 75 μ L 1 M NaCO₃ 以停止反應，並將微

量離心管插於冰上，此時為 t_f 。以 13000 rpm 離心 10 分鐘後，取出上清液測量 OD_{420} 及 OD_{550} 。依照下列公式計算 Beta-galactosidase 活性。

$$U = \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}}{(t_f - t_0) \times OD_{600} \times V} \times 1000$$

III. 番茄之毒力測試 (Virulence assay)

以生長至第三對真葉(約 3 至 4 週大)之抗病品系 Hawaii 7996 (H7996)或感病品系 L390 番茄植株做為毒力測試之材料，每一植株澆灌 20 mL 濃度約為 10^8 CFU/mL 之菌液，放置於 25°C 人工光溫室，逐日觀察病徵之發展，並將不同程度的萎凋依照下列規則記錄萎凋指數(Wilting score, ws)，共記錄三週。

0 為無病徵；1 為一片葉片萎凋；2 為二至三片葉片萎凋；3 為除了頂部二至三片葉片未萎凋，其餘皆萎凋；4 為全部葉片萎凋；5 為植株死亡。

IV. 生物統計分析(Statistic analysis)

1. 生長及致病相關特性分析

野生型菌株間之比較，以不同批次實驗之平均值利用 SAS 統計分析軟體進行 ANOVA Fisher's LSD 單因子變方分析，若群組間顯著水準(α 值)小於 0.05，則具有顯著差異。

比較突變株與野生型菌株之特性時，則以不同批次實驗之平均值利用 SAS 統計軟體進行 student's *t*-test，若機率值(P 值)小於 0.05，表示突變株與野生型具有顯著差異，機率值小於 0.01 表示突變株與野生型有高度顯著差異，而若機率值大於 0.05 則表示沒有顯著差異。

2. 番茄之毒力測試

利用不同批次毒力測試接菌後 7、14、21 天的萎凋百分比(Wilting percentage, W%)，以 SAS 統計分析軟體進行 ANOVA Fisher's LSD 單因子變方分析，若突變株與野生型之顯著水準(α 值)小於 0.05，則具有顯著差異。

另以每顆植株接菌後 21 天內不同天數的萎凋指數計算相對發病曲線下面積(relative area under the disease progress curve, AUDPC)，再將所有植物之數值以 SAS 統計軟體進行 student's *t*-test 分析，比較突變株與野生型之差異，若機率值小於 0.05，表示兩者具有顯著差異，機率值小於 0.01 表示兩者有高度顯著差異，而若機率值大於 0.05 則表示兩者沒有顯著差異。

第三章 結果

I. 不同毒力表現之青枯病菌特性分析

1. 不同培養基上生長之測試

為了了解不同毒力菌株於生長情形上是否具有差異，將菌株培養於不同的固體培養基，在 CPG 及 M9 固體培養基上，高毒力 Pss1308 及 Pss749，中高毒力 Pss4，低毒力 Pss216、Pss79 及 Pss965 皆有較佳的生長，而在 CPG 添加 0.01% 的 SDS 培養基上則以高毒力的 Pss1308 及 Pss749 生長較佳(圖一)。所有的菌株於培養基上生長皆有產生 EPS。

2. 泳動能力測定

泳動能力(swimming motility)使得青枯病菌能夠成功的找到寄主並侵入感染(Trans-Kersten *et al.*, 2001; Trans-Kersten *et al.*, 2004)。利用 0.3% 的洋菜膠培養基培養菌株，測試其於培養基上游動的情形，發現中高毒力的 Pss4 具有最佳的泳動能力(直徑 5.87 公分)，高毒力的 Pss1308 及 Pss749 次之(直徑 3.47 和 4.30 公分)，而 Pss190 及 Pss365 不具有泳動能力，且累積許多 EPS。低毒力的菌株除了 Pss965 具有較佳的泳動力(直徑 4.48 公分)外，其餘皆較差(直徑 1.20~2.38 公分)(圖二)。

3. 生物膜形成之測試

生物膜的形成對於細菌附著於木質部導管、有效的過濾養分及抵抗環境逆境皆扮演重要角色(Yao and Allen, 2007)。利用 96 孔盤分析不同菌株生物膜之形成(圖三)，發現高毒力菌株普遍有較高的生物膜形成能力($OD_{570}=0.68\sim 1.03$)，由高至低為 Pss365、Pss1308、Pss190、Pss749，低毒力菌株生物膜形成能力相對較低($OD_{570}=0.18\sim 0.45$)，以 Pss991($OD_{570}=0.45$)最高。中高毒力菌株 Pss4 則生物膜形成能力較接近低毒力菌株($OD_{570}=0.34$)。

4. 番茄根部附著能力

附著於番茄根部的能力在青枯病菌入侵寄主的早期中扮演重要角色(Yao and Allen, 2006)。在將感病品系 L390 的番茄根部浸泡於菌液中四小時後，不同毒力的菌株附著於根部的能力沒有明顯的差異(圖四)。

5. 胞外酵素之分泌

透過第二型分泌系統運送的細胞壁分解酵素與青枯病菌的致病力有關(Liu *et al.*, 2005)。為了解不同毒力菌株在產生這些胞外酵素的能力上是否有差異，以培養

基添加基質測試其 Pectin methylesterase (Pme)、endoglucanase (Egl)及 polygalactouronase (Peh)活性(圖五)。

除了 Pss190 及 Pss365 不具有 Pme 酵素活性外，其餘菌株有相似的能力。

所有菌株皆具有 Egl 酵素活性，中高毒力菌株 Pss4 及低毒力菌株 Egl 活性相似(直徑約 0.7 公分)，高毒力菌株 Pss190 及 Pss365 具有較高的 Egl 活性(直徑約 0.8~0.9 公分)，而 Pss1308 及 Pss749 則 Egl 活性較低(直徑約 0.6 公分)。

不論是何種毒力菌株在 Peh 活性表現上大致上相同，沒有明顯的差異。

6. 菸草過敏性反應

病原微生物與寄主之間的交互作用包含許多過程，病菌透過第三型蛋白分泌系統可將一些毒力蛋白(Avr protein)送入寄主體內，然而寄主也會透過抗性蛋白(R protein)的辨認而啟動防禦反應，而最明顯的便是產生過敏性反應(hypersensitive response, HR)，透過局部的細胞凋亡將局限病原菌的生長 (Jones and Dangl, 2006)。為了解不同毒力菌株在第三型蛋白分泌系統的表現是否有差異，藉由將菌注入菸草 *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 (W38) 葉片內，觀察 24 小時後植物之反應，發現除了 Pss4 之外，所有菌株皆會在 24 小時內產生 HR 反應(圖六)。Pss4 則是在 48 小時後才會產生延遲的壞疽(delayed necrosis)現象。

7. 氧化逆境測試

青枯病菌在感染番茄的過程中會遭遇到氧化逆境(Flores-Cruz and Allen, 2009)，因此進一步也分析不同毒力菌株對於寄主可能產生之氧化環境是否有不同敏感性。在 0.5 mM 的 H₂O₂ 處理下，高毒力的 Pss1308 及低毒力的 Pss216 較不敏感，高毒力 Pss749 及低毒力 Pss965 次之，其他高毒力菌株 Pss190 和 Pss365、中高毒力 Pss4、低毒力的 Pss991 和 Pss79 皆較為敏感，其中又以 Pss79 生長最差(圖七)。

II. 高毒力菌株特有之 *RSc2322-RSc2325* 基因研究

1. 利用南方轉漬雜合分析法及聚合酶連鎖反應驗證微陣列晶片分析結果

亞蔬中心王肇芬博士實驗室利用 DNA 微陣列晶片分析不同毒力菌株獨有之基因，找到一群基因獨特存在於高毒力菌株(附錄六，尚未發表)，本研究以 *RSc2322-2325* 基因群(gene cluster)為目標，進行毒力相關研究。現有的 DNA 微陣列晶片每一測試點的 DNA 片段約為 70 個鹼基對(base pairs, bp)，為了證實 DNA

微陣列晶片結果正確，以基因全長片段做為探針，進行南方轉漬雜合分析，雖然 *RSc2324* 因為浸洗的嚴苛度較低而有許多非專一性片段，但由結果顯示，此基因群獨特存在於高毒力菌株(圖八，A)，另以染色體 DNA 聚合酶連鎖反應(genomic PCR) 增幅基因全長，也得到相同的結果(圖八，B)。

2. 蛋白質序列分析

為了研究基因參與毒力調控的可能機制，利用 GMI1000 的序列以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站之 Protein blast 功能分析基因。由結果(圖九，A)顯示 *RSc2322* 基因推測可能為一個 MerR family 的轉錄因子 (transcription regulator)，參與重金屬的抗性調控；*RSc2323* 及 *RSc2324* 皆為膜蛋白 (transmembrane protein)，分別可能參與多種藥劑及糖類的運送；*RSc2325* 則可能為一個 MarR family 的轉錄因子，參與多種抗生素的抗性調控。進一步利用分析 TMHMM 網站分析 *RSc2323* 及 *RSc2324* 的蛋白構造，結果顯示分別具有 14 及 13 個 transmembrane domain，證明二者均為膜上之蛋白(圖九，B)。

3. Operon 組成及其調控

(1) operon 組成

R. solanacearum 網站(<http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>) 將 *RSc2322-2325* 基因群分為三個轉錄方向(附錄三)，*RSc2322*、*RSc2325* 皆為正向轉錄，*RSc2323* 及 *RSc2324* 則可能利用同一啟動子反向轉錄。為了驗證基因群的 operon 之排列組成，以高毒力 Pss1308 菌株做為研究材料，構築四個基因起始密碼子之前約 300-500 bps 的啟動子片段至具有 promoterless *LacZ* 基因的載體 pCZ962，分析 β -galactosidase 活性，然而四個基因排列相當接近，因此 P₂₃ 包含部分 *RSc2324* 序列，P₂₄ 含部分 *RSc2325* 序列，P₂₅ 亦含部分 *RSc2324* 序列。

不論是生長於 minimal 或是 rich 的液體培養基中，在早對數期(early-log phase) P₂₂、P₂₄ 及 P₂₅ 都有較高的 β -galactosidase 活性表現(圖十)，因此可以初步判斷 *RSc2322-RSc2325* 基因群的可分為三個轉錄單位，包含 *RSc2322-RSc2324-RSc2323* 及 *RSc2325*。

(2) operon 之調控

為了進一步分析基因是否受到不同的逆境調控，針對氧化及重金屬逆境下基因之表現進行 β -galactosidase 活性的測試。在 0.25 mM 及 0.5 mM 的 H₂O₂、60 μ M

的 TBOOH 或 5 mM ZnSO₄ 處理之下，基因的表現沒有明顯的改變(圖十一)。

4. 高毒力菌株 RSc2322-RSc2325 單一基因破壞之突變株特性分析

為了解 RSc2322-RSc2322 基因群與較高的毒力表現是否相關，將此基因群在高毒力菌株 Pss1308 和 Pss749 的遺傳背景(genetic background)中分為三個轉錄單位進行質體插入的突變，並進一步分析其生理及毒力上的表現。

(1) 不同培養基生長測試

為了解突變株與野生型菌株生長上是否有差異，將單一基因突變株培養於 TTC、TTC+SDS、SM1 及 M9 固體培養基上，發現 Pss1308 和 Pss749 二遺傳背景的突變株與野生型菌株在菌落型態及生長速度上沒有明顯差異(圖十二，A)。

(2) 泳動能力

為了解突變株與野生型菌株在泳動性的表現上是否具有差異，分析突變株的泳動能力後，發現除 Pss749 背景下之 RSc2324_3 突變株能力降低程度較小，在 Pss1308 或 Pss749 二遺傳背景下的所有突變株與野生型菌株相較泳動能力都有明顯的下降，(圖十三，A)。

(3) 生物膜形成能力

為測試突變株與野生型菌株在形成生物膜之能力是否具有差異，利用 96 孔盤分析生物膜之形成，結果顯示在 Pss1308 的所有的突變株與野生型菌株相較皆有略微下降的情形，約為野生型菌株的 0.7~0.8 倍。然而，在 Pss749 的突變株與野生型菌株相較則略微上升，約 1.2~2.0 倍之間(圖十三，B)。

(4) 根部附著能力

為了解突變株與野生型菌株在番茄根部的附著能力上是否具有差異，利用感病品系番茄 L390 做為材料，分析菌株的根部附著能力，發現不論在 Pss1308 或 Pss749 遺傳背景的突變株與野生型菌株附著於根部之能力沒有明顯之差異(圖十三，C)。

(5) 胞外酵素分泌

分析突變株與野生型菌株之細胞壁分解酵素的活性，顯示在 Pss1308 和 Pss749 遺傳背景下之所有突變株與野生型菌株無論是在 Pme、Egl 或 Peh 的酵素分泌上均具有相似的能力(圖十四)。

(6) 菸草過敏性反應

為了解 *RSc2322-RSc2325* 基因群是否影響 *R. solanacearum* 的第三型分泌系統，測試突變株與野生型菌株在菸草葉片上產生之過敏性反應，由結果發現在 Pss1308 和 Pss749 二遺傳背景下的突變株與野生型在接種菸草 W38 品系後，24 小時內均誘導明顯的過敏性反應(圖十五，A)。接種於菸草 *N. benthamiana* 72 小時後，也同樣都有明顯的壞疽反應(圖十五，B)。

(7) 植物體內增生能力

為了解突變株與野生型菌株進入植物體內後生長的情形是否有差異，以 *N. benthamiana* 做為試驗植物，將菌株注入菸草葉片中，0 小時及 24 小時後取下葉片 (leaf disc) 並計算菌量，發現在 Pss1308 和 Pss749 二遺傳背景下突變株在植物體內的增生能力與野生型菌株相似(圖十二，B)。

(8) 逆境測試

由 Protein blast 的結果顯示 *RSc2322-RSc2325* 基因群可能參與多種逆境的調控，進一步分析單一基因突變株在逆境的反應上與野生型菌株是否有差異。利用菌落形成測試之方法，將菌培養於 TTC 分別添加 0.5 mM CuSO_4 或 4 mM ZnSO_4 之固體培養基，發現在 Pss1308 和 Pss749 二遺傳背景之突變株與野生型菌株之間生長沒有明顯差異(圖十六，A)。

利用測試最小抑制濃度(MIC)方法，在 minimal 液體培養基中以 H_2O_2 處理，突變株的最小抑制濃度為 0.5 mM，野生型菌株為 1 mM；在 TBOOH 處理下，突變株的最小抑制濃度為 62.5 μM ，野生型菌株為 125 μM 。Pss1308 和 Pss749 二遺傳背景之突變株對於氧化逆境都較為敏感(表三)。另外，在 rich 液體培養基中，添加 5 mM 之 ZnSO_4 ，在 Pss1308 背景下，突變株生長情形較野生型菌株差，而 Pss749 則無明顯差異(圖十六，B)。

(9) 番茄毒力測試

為了解高毒力特有之 *RSc2322-RSc2325* 基因群與其高毒力的表現是否具有關聯，以抗病品系 Hawaii 7996 番茄做為測試材料，接種突變株及野生型菌株，記錄發病之情形(圖十七)。經由萎凋百分比(Wilting percentage, W%)的結果，發現接種病菌 7 天後，Pss1308 和 Pss749 二遺傳背景之突變株造成植物的萎凋率皆較野生型略低，其中在 Pss1308 的遺傳背景中，以 *RSc2325* 突變株萎凋率下降約 20%，最

為明顯；在 Pss749 的背景下，則是 RSc2322 突變株(下降約 20%)與 RSc2324_3 突變株(下降約 25%)有明顯差異。接菌後 14 天，突變株所造成的萎凋率仍較野生型菌株略低，然而差異並不大，較明顯下降者包含 Pss1308 背景下的 RSc2324_3 突變株(下降約 20%)及 RSc2325 突變株(下降約 29%)和 Pss749 背景下 RSc2324_3 突變株(下降約 27%)。接菌 21 天後，僅剩 Pss1308 的 RSc2325 突變株和 Pss749 的 RSc2324_3 突變株(具有較明顯的萎凋率下降情形。利用統計分析(ANOVA Fisher's LSD)顯示在接菌後 21 天 Pss1308 的 RSc2325 突變株和 Pss749 的 RSc2324_3 突變株與野生型菌株具有顯著差異($P < 0.05$)。

利用萎凋指數(wilting score，參見材料與方法)記錄病害發展(pathogenesis)的情形，計算相對發病曲線下面積(relative area under the disease progress curve, RAUDPC)，並以 student's *t*-test 分析，顯示在接菌 21 天後，在 Pss1308 和 Pss749 二遺傳背景下之突變株，僅 Pss749 背景之 RSc2324_3 突變株與野生型菌株相較下有高度顯著差異(highly significant, $P < 0.01$)，其餘皆沒有顯著差異(not significant) (表五)。

5. 低毒力菌株表現 RSc2322-RSc2325 之特性分析

為驗證 RSc2322-RSc2325 基因群與較高的毒力表現是否相關，將此基因群自高毒力菌株 Pss190 選殖於 pUFR047 載體，轉移表現至低毒力菌株 Pss216，進一步分析其生理及毒力上的表現。

(1) 植物體內增生情形

為確定 RSc2322-RSc2325 基因轉移表現株與載體(empty vector)轉型菌株在植物體內生長情形沒有差異，分析菌株在 *N. benthamiana* 內增生情形，發現在 RSc2322-RSc2325 基因轉移表現株與載體轉型菌株在植物體內具有相似的生長情形(圖十八)。

(2) 泳動能力分析

為了解 RSc2322-RSc2325 基因轉移表現後是否影響菌株泳動性的表現，分析基因轉移表現株的泳動能力，發現 RSc2322-RSc2325 基因轉移表現株相較於載體(empty vector)轉型菌株泳動能力有明顯的下降(圖十九，A)。

(3) 生物膜形成

為測試 RSc2322-RSc2325 基因轉移表現株與僅載體(empty vector)轉型菌株在

形成生物膜之能力是否具有差異，利用 96 孔盤分析形成生物膜之能力，發現 *RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株與載體轉型菌株相較下生物膜形成能力沒有顯著差異(圖十九，B)。

(4) 番茄根部附著能力

為了解 *RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株與載體(empty vector)轉型菌株在番茄根部的附著能力上是否具有差異，以感病品系番茄 L390 做為材料，分析菌株的根部附著能力，發現 *RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株與載體轉型菌株相較之下番茄根部附著能力上升(圖十九，C)。

(5) 菸草過敏性反應

測試 *RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株與載體(empty vector)轉型菌株在菸草葉片上產生之過敏性反應，由結果發現 *RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株與載體轉型菌株在接種菸草 W38 品系後，24 小時內均誘導明顯的過敏性反應(圖二十，A)。接種於菸草 *N. benthamiana* 72 小時後，也同樣都有明顯的壞疽反應(圖二十，B)。

(6) 番茄毒力測試

為了解將高毒力特有之 *RSc2322-RSc2325* 基因群轉移表現至低毒力菌株是否影響其毒力的表現，以感病品系 L390 番茄做為測試材料，接種 *RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株及載體(empty vector)轉型菌株，觀察發病之情形(圖二十一)。在接種病菌後 7、14、21 天，*RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株相較於載體轉型菌株都有較高的萎凋率。利用統計分析(ANOVA Fisher's LSD)顯示在接菌後 14 及 21 天 *RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株與載體轉型菌株具有顯著差異($P < 0.05$)。

III. 低毒力菌株特有之第三型分泌蛋白 *RSp0213* 及 *RSc3174* 基因研究

1. 利用南方轉漬雜合分析法及聚合酶連鎖反應分析基因的存在

自微陣列晶片分析結果中挑選獨特存在於低毒力菌株的第三型分泌蛋白 (Type III effector) 基因 *RSp0213* 和 *RSc3174*(附錄七，尚未發表)為研究目標，經由南方轉漬雜合分析(圖二十二，A)及染色體 DNA 聚合酶連鎖反應(genomic PCR)(圖二十二，B)證實此兩個基因獨特存在於低毒力菌株。

進一步將此二基因選殖到基因轉移表現載體 pUFR047，經由定序分析後，發現在不同低毒力菌株 *RSp0213* 的蛋白質序列與 GMI1000 皆相同(圖二十三，A)，

而 RSc3174 的蛋白質序列則與 GMI1000 有 3 個胺基酸(amino acid, a.a.)不同(圖二十三, B)。大致上, 此二基因的蛋白質序列在不同低毒力菌株中大部分為保守的 (conserved)。

2. 核酸及蛋白質序列分析

利用 GMI1000 的序列進行分析, *RSp0213* 及 *RSc3174* 皆位於 ACUR 的片段中, 且在啟動子片段分別於起始密碼子(start codon)上游 64 bp 和 105 bp 的位置具有一個植物誘導性(plant-inducible)的 *hrpII* box (TTCG-N₁₆-TTCG), 會受到第三型蛋白分泌系統中 AraC family 轉錄因子 HrpB 的調控。

利用 Protein blast 分析, 此二 effector 不具有保守的 motif, 且功能未知。

3. 利用 β -galactosidase activity 分析基因是否受到 *hrpG* 基因的調控

選殖 effector 基因啟動子的片段至 pCZ962 載體, 利用 β -galactosidase 活性分析基因是否受到 HrpG 調控(附錄九)。將菌株培養於 minimal 液體培養基, 沒有受到誘導的情形下, 野生型菌株中基因有少量的表現, 然而在 *hrpG::Tn* 的突變株中, 基因的表現沒有任何表現(圖二十四), 證實此兩基因確實位於 HrpG 下游並受其調控。

4. 基因轉移表現株之特性分析

為了解第三型分泌蛋白基因 *RSp0213* 和 *RSc3174* 與較低的毒力表現是否相關, 將二基因自低毒力菌株 Pss991 選殖於 pUFR047 載體, 轉移表現在高毒力菌株 Pss190 和 Pss1308 的遺傳背景(genetic background)中, 進一步分析其生理及毒力上的表現。

(1) 不同培養基上之生長

為了解基因轉移表現後是否影響菌株之生長, 將 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與僅帶有載體(empty vector)菌株培養於 CPG、CPG+SDS、SM1 及 M9 固體培養基上, 發現在 Pss190 和 Pss1308 二遺傳背景的 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體(empty vector)轉型菌株在菌落型態及生長速度上沒有明顯差異(圖二十五, A)。

(2) 泳動性測試

為了解 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現後是否影響菌株泳動性的表現, 分析 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株的泳動能力, 發現在 Pss190 和 Pss1308 二

遺傳背景下之 *RSc0213* 和 *RSc3174* 轉移表現株與載體轉型菌株在泳動能力上沒有差異(圖二十六, A)。

(3) 生物膜形成

利用 96 孔盤分析 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體(empty vector) 轉型菌株形成生物膜之能力, 發現在 Pss190 背景下分別表現 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體轉型菌株沒有明顯差異(圖二十六, B)。而在 Pss1308 背景下, 由於帶有載體後若靜置培養菌株會產生團聚集(aggregation)的現象, 因此未分析其生物膜之形成。

(4) 根部附著能力

進一步分析 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體(empty vector) 轉型菌株在感病品系番茄 L390 根部的附著能力上是否具有差異, 在 Pss190 的遺傳背景下, *RSc0213* 和 *RSc3174* 轉移表現株與載體轉型菌株相較下根部附著能力皆有下降情形, 而在 Pss1308 背景下, 則皆無明顯差異(圖二十六, C)。

(5) 植物體內增生能力

以 *N. benthamiana* 做為試驗植物, 分析 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體(empty vector) 轉型菌株在植物體內生長的情形是否有差異, 結果顯示在不論在 Pss190 或 Pss1308 遺傳背景的 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體轉型菌株在植物體內皆具有相似的增生情形(圖二十五, B)

(6) 菸草過敏性反應

為檢測此二個第三型分泌蛋白基因是否會改變菌株在菸草上的過敏性反應, 將此 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體(empty vector) 轉型菌株接種菸草 W38 品系及 *N. benthamiana* 葉片, 發現在 Pss190 和 Pss1308 遺傳背景下的 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體轉型菌株在接種 W38 品系後 24 小時內均誘導明顯的過敏性反應(圖二十七, A)。接種於菸草 *N. benthamiana* 72 小時後, 也同樣都有明顯的壞疽反應(圖二十七, B)。

(7) 番茄毒力測試

為了解將低毒力特有之第三型分泌蛋白基因 *RSp0213* 和 *RSc3174* 轉移表現至高毒力菌株是否可降低其毒力的表現, 以抗病品系 Hawaii 7996 番茄做為測試材料, 接種 Pss190 遺傳背景之 *RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株, 並以載體(empty

vector)轉型菌株做為比較，觀察發病之情形(圖二十八)。結果顯示在接菌後 7、14 及 21 天後，*RSc0213* 和 *RSc3174* 基因轉移株在番茄 Hawaii 7996 上造成之萎凋百分比(W%)相較於載體轉型菌株低。利用統計分析(ANOVA Fisher's LSD)顯示在接菌後 14 及 21 天 *RSc3174* 基因轉移表現株與載體轉型菌株具有顯著差異($P < 0.05$)。

進一步，利用萎凋指數(wilting score，參見材料與方法)記錄病害發展，計算相對發病曲線下面積(RAUDPC)後以 student's *t*-test 統計分析，顯示在接菌 21 天後，Pss190 菌株表現 *RSp0213* 與載體轉型菌株沒有顯著差異(not significant difference)，而 Pss190 菌株表現 *RSc3174* 與載體轉型菌株則具有高度顯著差異(highly significant difference, $P < 0.01$) (表八)。



第四章 討論

1. 野生型菌株生長及致病特性比較

(1) 生長分析：毒力表現與生長速度無關

先前的研究中，Jaunet 等人(1999)利用不同台灣本土的青枯病菌分離株在抗病、中等抗病及感病品系番茄造成不同的萎凋率，將本土菌株分成不同毒力表現的群組(附錄四)。然而，目前對於這些本土分離株在病菌生長及致病相關因子上的了解仍相當有限，因此本研究進一步分析這些野生型分離株的生長及致病相關特性。在 CPG (rich)及 M9 (minimal)固體培養基上，高毒力菌株及低毒力菌株皆有生長較佳及生長較差者(圖一和表二)，推測毒力的表現與生長的速度應不具關聯性。

雖然利用固體培養基僅可初步檢視菌株生長情形，無法準確定量比較差異，但仍可發現在 CPG 培養基上，高毒力菌株 Pss1308、Pss749 及低毒力菌株 Pss216、Pss79、Pss965 皆有較佳生長，但在添加可破壞細胞結構穩定性的藥劑 SDS 之 CPG 固體培養基上，高毒力菌株 Pss1308、Pss749 仍有較佳生長，低毒力菌株 Pss216、Pss79、Pss965 相較前者則生長受到了較明顯的抑制(圖一)，推測低毒力菌株可能在細胞結構上較高毒力菌株不穩定，因此進入植物體內後較易受到寄主產生的一些物質影響其增生速度。

(2) 致病因子分析：生物膜的形成能力可能與毒力之程度相關

如先前所述，在青枯病菌成功感染植物的過程中需要許多致病因子的參與，包含泳動能力、化學趨化性、形成生物膜、根部附著能力、根部纏據能力、分泌細胞壁分解酵素、產生胞外多醣體等(Schell, 2000)。由於分析的本土毒力相關分離株皆是自罹病植物分離而來，因此理論上應皆具備有致病性相關因子的表現。檢視菌株在各項致病性因子的表現程度上是否與毒力相關時，發現所有菌株皆會產生 EPS，然而 EPS 的產生量與菌株的毒力表現是否具關聯性，尚須利用準確的 EPS 定量方法才能得知。

在生物膜形成的能力上高毒力菌株普遍相較於低毒力菌株為高(圖三)。在青枯病菌中，生物膜被預測可以幫助細菌附著於木質部導管，且有效率的過濾營養成分(Yao and Allen, 2007)，此外生物膜的形成也可以保護細菌抵抗外在的較差的環境(Morris and Monier, 2003)，因此高毒力菌株可能在進入植物體後有較佳的附著於導管之能力，對於植物中的所產生的逆境也較能躲避，而造成較高的植物萎凋率。

Yao 等人(2006)也曾報導青枯病菌可在番茄根部形成類似生物膜的聚集 (biofilm-like aggregations), 因此可推測生物膜形成與根部附著能力(attachment)應為正相關。然而在本研究中, 雖各菌株於 96 孔微量塑膠盤中之生物膜有不同的表現, 但各菌株在根部附著能力並沒有明顯差異(圖四), 推測此不一致的結果可能原因有二: 首先, 生物膜是測試附著於較光滑塑膠材質表面的能力, 而根部附著力則是檢測附著於較不光滑且可能具有分泌物質的植物根部菌的附著能力, 因此根部附著能力可能會受到趨化性及植物表面根毛之影響而與生物膜的表現程度有所不同; 其次, 本研究測試根部附著力時所使用的菌液濃度為 10^6 CFU/mL, 較自然環境中青枯病菌在土中的含量為高, 因此呈現之結果與自然情形下應會略有不同。Wang 等人(2005)曾報導低毒力菌株在較低的接種濃度($10^4 \sim 10^5$ cell/g soil)下, 纏據 (colonize)於番茄根部之能力較高毒力菌株為低, 因此推測根部附著能力或許在較低濃度的情形下可能會有不同的表現而使不同毒力菌株進一步纏據根部的情形產生差異。

高毒力菌株 Pss190 及 Pss365 在 0.3 % agar 上沒有泳動力, 而低毒力菌株除 Pss965 外, 普遍泳動力較低(圖二)。先前報導指出泳動力在青枯病早期入侵及纏據於植物扮演重要角色, 若青枯病菌喪失泳動力則造成植物萎凋的能力也會大幅下降(Trans-Kersten *et al.*, 2001), 因此高毒力菌株 Pss1308 及 Pss749 具有較高的泳動力似乎是合理的, 然而低毒力菌株亦有較高泳動力者, 故泳動能力應與毒力程度沒有絕對相關性。此外, 依據 Trans-Kersten 等人之研究(Trans-Kersten *et al.*, 2004), 青枯病菌在植物體內並不具有泳動力, 因此不具有泳動力的高毒力菌株 Pss190 及 Pss365 是否在演化上已轉變成為較適應在植物體內的狀態, 亦或是其泳動能力需要受到植物分泌物或其他物質誘導, 為一值得探討之課題。Yao 等人報導化學趨化性對於青枯病菌的感染亦扮演重要角色(Yao and Allen, 2006), 喪失化學趨化性的突變株即使具備泳動力仍會大幅降低其致病性, 因此未來進一步可分析不同毒力菌株在化學趨化性是否有差異, 以釐清泳動力、趨化性及毒力三者之關聯性。

在胞外酵素的分泌活性分析(圖五)結果顯示 Pss190 與 Pss365 沒有 Pme 酵素活性, 但目前尚未有報導指出 Pme 與致病相關。而分析與致病相關的 Peh (Huang and Allen, 2000)及 Egl (Liu *et al.*, 2005)酵素活性之差異, 顯示各菌株於 Peh 活性上沒有明顯差異, 雖然在 Egl 活性上高毒力菌株 Pss190 及 Pss365 有較高活性, 但

Pss749 與 Pss365 卻是較低活性，因此推論測試的三種分泌酵素活性應與菌株毒力表現無關。先前的研究中，在青枯病菌株 GMI1000 及 K60 當中，不同的細胞壁分解酵素扮演之角色及重要性並不相同(Huang and Allen, 2000；Liu *et al.*, 2005)，因此是否在各野生型菌株中，細胞壁分解酵素重要性也有所不同，目前尚不明瞭。

Poueymiro 等人(2009)發現兩個第三型分泌蛋白 AvrA 和 PopP1 是決定青枯病菌 GMI1000 在菸草 *Nicotiana tabacum* 能否造成萎凋的決定因子，*avrA* 突變株會使病菌在 *N. tabacum* 上延遲產生過敏性反應，若同時突變 *avrA* 和 *popP1* 則會喪失誘導過敏性反應的能力。本研究測試野生型菌株在 *N. tabacum* W38 上的過敏性反應，發現除了中高毒力的 Pss4 在 48 小時後才會產生延遲的過敏性反應，不論高或低毒力菌株均有誘導過敏性反應之能力(圖六)，推測在測試的高、低毒力菌株中，其第三型分泌系統應皆具有可誘導過敏性之毒力蛋白(effector)。

(3) 逆境分析：氧化逆境之敏感性與毒力無正相關

Flores-Cruz 等人(2009)發現青枯病菌感染寄主過程中會遭遇氧化逆境，無法產生去除 ROS 的酵素的青枯病菌突變株感染番茄後會稍微延遲萎凋，而若感染大量產生 H₂O₂ 的轉基因菸草則顯著的降低毒力，因此青枯病菌要成功的感染寄主必須克服寄主內產生之氧化逆境。本研究分析野生型菌株對氧化逆境的敏感性(圖七)，發現本土青枯病菌毒力相關之分離株對於氧化逆境的敏感性雖大致可分為兩群，但菌株對於氧化逆境敏感性與毒力之程度並沒有正相關性。

(4) 毒力由一複雜之網絡調控

雖然在本研究中各菌株在分析的很多特性上沒有明顯差異，但青枯病菌在致病相關的網絡調控相當複雜，加上環境因子的調控，推測毒力程度的差異極有可能是許多特性上極小差異累加而得的表現(Lee *et al.*, 2006)。

此外，本研究中就先前報導與致病性關之因子進行分析，但發現在本土的毒力相關菌株中，Pss190 及 Pss365 野生型菌株即不具有泳動性，且多數菌株在 0.5 mM 的 H₂O₂ 氧化逆境處理下較敏感，皆與報導之青枯病菌野生型 K60 泳動力及對氧化逆境的耐受性有很大差異(Trans-kersten *et al.*, 2001；Brown *et al.*, 2007)；而利用 Microarray 分析基因體組成時，也發現不同毒力菌株基因體組成與 GMI1000 差異大(附錄五~附錄七)，因此推測台灣本土毒力相關分離株與目前較為人知的菌株 GMI1000 和 K60 可能因為地理區隔及環境氣候差異而產生演化上的歧異(Prior

et al., 1990)。

2. 本研究測試之高毒力菌株依據致病相關特性可分為兩大群

在本研究中檢測的高毒力菌株在遺傳及生理特性上其實有所不同。首先，利用南方轉漬反應分析顯示 Pss190 及 Pss365 的 *RSc2325* 基因片段在長度上與 Pss1308 和 Pss749 不同 (圖八, A)，以基因專一性引子增幅全長結果，也發現 Pss190/ Pss365 和 Pss1308/ Pss749 在序列上應不相同(圖八, B)。進一步分析菌株的生理特性，結果也顯示 Pss1308/ Pss749 在 CPG 培養基上的生長情形較 Pss190/Pss365 為佳(圖一)；在 0.3 % agar 上 Pss1308/ Pss749 有較佳的泳動力，Pss190/ Pss365 則不具泳動力(圖二)；Pss1308/Pss749 具有 Pectin methylesterase 的酵素活性，而 Pss190/ Pss365 則無(圖五)。綜合以上之結果可大致將高毒力菌株分為兩個群組：Pss190/ Pss365 和 Pss1308/ Pss749，此結果與高毒力菌株在 biovar 分群(表一)與利用微陣列晶片分析 phylotype I 菌株的分群結果一致(附錄五)，說明這些具高毒力之分離株於特性的演化上已產生分歧。

3. *RSc2322-RSc2325* 基因群獨特存在高毒力菌株且可分為三個轉錄單位

由於青枯病菌的基因體中有許多 mobile element 及 mosaic structure，推測 *R. solanacearum* 會藉由水平基因轉移(horizontal gene transfer)獲得基因，而在演化過程中產生不同的性狀表現(Salanoubat *et al.*, 2002)。利用微陣列晶片分析，也發現高毒力菌株具有許多獨特基因(附錄六)，而本研究將目標鎖定可能透過水平基因轉移(horizontal gene transfer)獲得的大片段基因群進行深入研究。利用南方雜合轉漬反應及染色體 DNA 聚合酶反應確定 *RSc2322-RSc2325* 基因群確實獨特存在於高毒力菌株(圖八)。在 Pss1308 遺傳背景下分析此基因群的啟動子活性，發現不論是在 rich 或 minimal 培養條件下 *RSc2322*、*RSc2324* 及 *RSc2325* 在早對數期皆有較高的轉錄活性(圖十)，推測此基因群大致可分為三個轉錄單位。然而，在實驗室先前的研究中(Chu, 2008)，曾發現在 *tol-pal* operon 中，*tolB* 及 *pal* 基因的表現在早對數期很低，但隨著生長的情形，到後期活性會增高，因此 *RSc2323* 的啟動子在早對數期活性雖低，但其表現是否會受到生長時期調控仍需進一步驗證。

4. *RSc2322-RSc2325* 可能為演化的證據並且調控氧化逆境及重金屬之抗性

青枯病菌為了適應環境中劇烈變化的金屬逆境會產生演化(Genin and Boucher, 2004)，Mergeay 等人(2003)曾依據青枯病菌與 *Ralstonia metallidurans* 序列的相似性

發現青枯病菌株具有一些與重金屬抗性相關的蛋白質基因，這些基因也被預測是青枯病菌為適應環境而產生演化的證據。透過蛋白質序列比對後，顯示本研究目標基因 *RSc2322-RSc2325* 基因群可能參與重金屬及多種藥劑的抗性，因此推測亦可能為青枯病菌為了適應環境而產生演化的證據。

經由蛋白質序列比對及文獻報導，顯示 *RSc2322* 產物為一 MerR (Mercury resistance Regulator) family 調控蛋白(Genin and Boucher, 2004)，此類蛋白與金屬的抗性相關，會與金屬陽離子結合而調控與重金屬抗性相關基因表現，進而調節細胞內的金屬陽離子濃度(Nies, 2003)。此外，大多數 MerR family 的轉錄因子會受環境刺激，可被氧化逆境、重金屬和一些抗生素處理誘導進而去調控下游相關基因表現(Brown *et al.*, 2003)。*RSc2323* 及 *RSc2324* 產物皆為通透膜蛋白(efflux protein)，其中 *RSc2323* 為多毒物通透膜蛋白(multidrug efflux)，此類蛋白除了與抗抗生素有關外，也與去除細胞內有毒的代謝物及在寄主上的毒力有關(Martinez *et al.*, 2009)。*RSc2325* 產物為一個 MarR (Multiple Antibiotics Resistance Regulator) family 的轉錄蛋白，能參與多種抗生素的抗性調控，在人類伺機性病原 *Pseudomonas aeruginosa* 中，一個 MarR family 的轉錄調控因子 MexR 能感知氧化逆境進而調控多毒物通透膜蛋白 *mexAB-oprM operon* 之表現，而提升抵抗抗生素的能力(Chen *et al.*, 2008)。此外，在動植物病原菌中，MarR family 的轉錄因子也可能參與毒力的調控(Ellison and Miller, 2006)。本研究欲驗證此基因群在青枯病菌中是否參與在氧化逆境及重金屬逆境的調控，發現以氧化逆境藥劑 H_2O_2 及作用在膜上進而影響細胞中 ROS 累積的藥劑 TBOOH 處理下，在 Pss1308 及 Pss749 兩個遺傳背景中突變株的確對氧化逆境較為敏感(表三)；在 Pss1308 的遺傳背景下，突變株對於 $ZnSO_4$ 所造成的重金屬逆境也較為敏感(圖十六，B)。由結果顯示在本土青枯病菌分離株 Pss1308 及 Pss749 中，*RSc2322-RSc2325* 基因群與氧化逆境及鋅金屬逆境可能具有相關性。此基因群是否參與其他的重金屬、抗生素及植物體內代謝物等逆境因子之調控，仍需更多試驗加以驗證。

此外，雖然突變株對於氧化及鋅離子逆境較為敏感，但在啟動子的活性表現上，並沒有劇烈的改變(圖十一)，推測原因可能有二：一，此基因群之轉錄在逆境下不受影響，但蛋白質的穩定度或活性可能受到影響，進而改變下游逆境相關基因之調控，因此造成在逆境下此基因群的轉錄不受影響但此基因缺失後卻對逆境

較為敏感的情形；二，此基因群的 RNA 及蛋白質為穩定的表現，與其他因子共同調控逆境反應，但在其缺失後其他因子缺乏其在逆境抗性之輔助，因而對逆境較為敏感。

Brown 等人(2007)報導在 Race 1、Biovar 1 的青枯病野生型菌株 K60 中，兩個與多種藥劑抗性相關膜蛋白(multidrug resistance efflux pump, MDR)基因 *acrA* 和 *dinF* 之轉錄除了受到毒物藥劑的誘導外，也會受到植物誘導、碳源缺乏(carbon limitation)影響而有較高表現；此外，在較高的族群密度下，*acrA* 的轉錄表現受 *rpoS* 正調控，*dinF* 則是受 HrpB 負調控。因此，本研究進一步也可以檢測 RSc2322-RSc2325 基因群是否受到植物、碳源及一些致病相關轉錄因子的調控，以釐清此基因群的可能扮演的角色及功能。

5. 高毒力菌株特有之 RSc2322-RSc2325 基因群影響毒力表現

在動物病原細菌的系統中，目前的研究認為 MDR 可能參與毒力調控，但毒力是一個複雜的調控網絡，需要許多不同的基因共同表現並交互調控(Lee *et al.*, 2006)，以大腸桿菌(*E. coli.*)之研究為例，其參與多種抗生素抗性的轉錄因子 MarA 會調控超過 60 個基因(Barbosa and Levy, 2000)，包含 MDR 基因如 *acrAB*，和一些與氧化逆境及鐵金屬代謝的相關基因，進而影響細菌在寄主的存活及造成的毒力表現。在目前植物病原細菌的研究中，對於參與重金屬及多種藥劑的抗性的基因與毒力之間的影響了解並不多，只有在 *Pectobacterium amylovora*(原 *Erwinia amylovora*)的研究曾指出 MDR 蛋白 AcrAB 會影響病菌對毒性藥劑的抗性進而影響對植物的毒力(Burse *et al.*, 2004)；在青枯病菌 Race 1、Biovar 1 的野生型菌株 K60 中，兩個 MDR 蛋白 *acrA* 和 *dinF* 也影響病菌對多種藥劑的抗性以及在番茄上的毒力(Brown *et al.*, 2007)。

本研究為了解可能參與重金屬及多種藥劑抗性的未知功能 RSc2322- RSc2325 基因群是否與毒力相關，在 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下，將 RSc2322 -RSc2325 基因群分成三個轉錄單位，分別進行質體插入的破壞，所得的突變株以抗病品系番茄 Hawaii7996 做為接種植物進行毒力測試(圖十七)。結果發現在接菌後 7 天，不論在何遺傳背景的突變株造成的萎凋率較野生型來的低，隨著病害的發展，差異日漸縮小，在接菌後 21 天僅剩 Pss1308 背景下的 RSc2325 突變株及 Pss749 背景下的 RSc2324 突變株有較低的萎凋率(圖十七)，推測此基因群可能參與毒力調控，

然而個別破壞單一個基因的情形下，由於其他基因仍具有功能，故僅能使植物延遲病害發展的時程，無法完全顯著地降低毒力表現。因此，單一基因突變株並非最佳之研究策略，本研究另嘗試以同源基因重組(homologous recombination)之方法建構多基因剔除之突變株以分析基因群在毒力的角色，但始終未能獲得多基因剔除之突變株。故為了進一步驗證此基因群在毒力扮演的角色，將 *RSc2322-RSc2325* 基因群全長片段轉移表現在低毒力菌株 Pss216，檢視其在感病品系番茄 L390 上造成的萎凋情形(圖二十一)，發現轉移表現此基因群的菌株在接菌後 7、14、21 天，造成植物的萎凋率皆明顯的高於載體轉型菌株，顯示 *RSc2322-RSc2325* 基因群可能與高毒力的表現相關。比較單一基因突變株及基因轉移表現株的在毒力表現的影響，顯示 *RSc2322-RSc2325* 基因群在毒力可能為加成性的影響。而此未知功能基因群是否與 *P. aeruginosa* 和大腸桿菌的例子(Chen *et al.*, 2008；Barbosa and Levy, 2000)類似，MarR (*RSs2325*)會受逆境之誘導進而調控 MDR (*RSc2323*)之轉錄，目前並不清楚。此外，就生物微陣列晶片分析結果(附錄六)而言，有近 20 個基因是獨特存在於高毒力菌株中，這些基因也推測可能共同調控毒力之表現。由於目前測試植物的數量仍不多，且植株個體及不同次試驗之間萎凋指數(wilting score, ws)變異性大，因此 *RSc2322-RSc2325* 基因群在毒力的影響，需增加植物數量進行毒力測試以證明之。

經分析單一基因突變株與基因轉移表現株生長及致病相關因子的特性表現後(表四、表六)，結果顯示單一基因突變株在培養基上生長、植物體內增生能力(圖十二)、根部附著能力(圖十三，C)及胞外酵素分泌活性(圖十四)及在菸草 W38 及 *N. bethamiana* 上所誘導之過敏性反應(圖十五)皆未受影響，推測此基因群非生長所必須，且可能與第二型、第三型蛋白分泌系統無明顯關聯。但在 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下，單一基因突變株的泳動力及氧化逆境的耐受性皆有下降的情形，推測單一基因突變株在土壤中可能因泳動力下降使得侵入寄主的能力下降，且在進入寄主後，細胞感受到氧化逆境也較為敏感(Trans-Kersten *et al.*, 2001；Flores-Cruz and Allen, 2009)，因而減緩早期病害發展程度。然而如同先前所述，病原菌毒力關係著複雜的調控網絡，需要許多不同的基因共同表現並交互調控(Lee *et al.*, 2006)，因此即使單一基因突變後影響其泳動性及氧化逆境的敏感性，其他基因可能具有部分或全部的功能互補性(functional redundancy)，而使單一基因突變的影響降至最

低，使最後毒力表現與野生型菌株無顯著差異。

較令人費解的是在 Pss1308 和 Pss749 兩遺傳背景的單一基因突變株在生物膜形成能力上表現相反(圖十三, B)，雖就親緣關係(附錄五)及特性表現(表一)上，Pss1308 及 Pss749 有相當接近的表現型，但兩菌株為不同時間分離自不同區域的農田(Pss1308 為 2006 年自信義鄉羅娜地區分離；Pss749 為 2005 年自信義鄉望美地區分離)，且自微陣列分析中，兩者有一些基因的存在並不相同(附錄八)，證實兩菌株非同一分離株，因此兩菌株中基因之調控及重要性可能有所不同，而產生此差異。

低毒力菌株表現 *RSc2322-RSc2325* 基因群後，在植物內增生能力未受影響(圖十八)，因此轉移表現此基因群未造成細菌生長的影響。轉移表現此基因群之低毒力菌株相較於載體轉型菌株有較高的根部附著能力(圖十九, C)，推測根部附著能力的提升可能會使低毒力菌株在根部固著能力上升，進而提高其致病和毒力表現，此推論呼應 Wang 等人(2005)關於低毒力菌株固著(colonize)於番茄根部能力較低之結果，應具有合理性。較為奇怪的是高毒力單一基因突變株及低毒力基因轉移表現株在泳動力上皆有下降的情形(圖十三, A; 圖十九, A)，使 *RSc2322-RSc2325* 基因群在泳動力上所扮演的角色似乎產生矛盾，推測造成此結果之原因可能有三：其一是菌株在土壤中的泳動可能與土壤的組成、含水量及植物分泌物誘導等相關，而本研究測試泳動力之方法是利用培養基的測試，僅能部份模擬菌株於土壤中之泳動情形；其二是突變株建構於高毒力 Pss1308 及 Pss749 菌株，而基因轉移表現株則建構於低毒力 Pss216 菌株，菌株遺傳背景不同，因此在基因的調控上可能也有所不同；其三是泳動能力在青枯病菌中致病機制的調控網絡中為一相當下游的表現型，其會受到許多上游基因的影響而改變其表現(Mole *et al.*, 2007)，故 *RSc2322-RSc2325* 基因缺失或是大量表現都會使基因調控失去平衡，而造成泳動力的改變。

經由以上的特性分析，我們認為 *RSc2322-RSc2325* 基因群在高毒力青枯病菌中的功能可能與其重金屬、氧化及毒性藥劑逆境上的耐受性相關，進而影響毒力，因此在低毒力菌株表現此基因群後，是否會使其在逆境耐受性有所提升，為未來可探討之課題。建構 *RSc2322-RSc2325* 基因群剔除的突變株亦對於研究此基因群在毒力調控之重要性相當重要。

6. *RSp0213* 和 *RSc3174* 為低毒力菌株特有基因並位於 *HrpG* 下游

本研究自微陣列晶片分析中，找到一些低毒力特有之基因(附錄七)，其中有些被預測為可被第三型蛋白分泌系統輸出之蛋白(Type III effectors, T3Es)，推測這些 T3Es 可能會被植物所辨認而誘導植物產生防禦反應，進而使病菌的致病能力受到抑制，而使植物有較低的萎凋率，呈現毒力較低的表現型。

本研究利用南方轉漬雜合分析及染色體 DNA 聚合酶反應(圖二十二)證實 T3E 基因 *RSp0213* 和 *RSc3174* 確實只存在於低毒力菌株基因體中，而且中高毒力的 *Pss4* 與 *GMI1000* 亦具有此二 T3E 基因。目前對於此兩基因之功能尚未有相關研究，先前文獻曾部分提及 *RSp0213* 與 *Pantoea agglomerans* 的可被第三型蛋白分泌系統輸出之蛋白 *PthG* 具有部分的同源性(partial homology)，且可透過第三型蛋白分泌系統被送出，而 *RSc3174* 則是與 *Chromobacterium violaceum* CV2593 蛋白具有部分同源性(Cunnac *et al.*, 2004b)。然而目前對 *PthG* 及 CV2593 的功能亦不清楚。

本研究比較低毒力菌株中此兩 T3Es 的序列(圖二十三)，發現在 *RSp0213* 的序列上，四個低毒力菌株與 *GMI1000* 完全相同，而 *RSc3174* 則只有三個胺基酸的改變，證實這兩個 T3Es 在序列上為高度保守性，且推測應在演化的早期即存在於低毒力的菌株(附錄五)。

分析此兩基因 *RSp0213* 及 *RSc3174* 啟動子片段，發現分別於起始密碼子(start codon)上游 64 bp 和 105 bp 的位置具有一個植物誘導性(plant-inducible)的 *hrpII* box (TTCG-N₁₆-TTCG)，推測應會受到第三型蛋白分泌系統中的轉錄因子 *HrpB* 的調控。本研究利用 *Pss4* 遺傳背景的野生型菌株和 *hrpG::Tn* 突變株分析此兩 T3Es 在啟動子活性表現上是否受到第三型蛋白分泌系統影響(圖二十四)，證實在 *HrpG* 缺失的情形下，此兩 T3Es 基因啟動子沒有表現，推測此兩 T3Es 蛋白受到第三型蛋白分泌系統調控並位於 *HrpG* 下游。然而，此兩 T3Es 是否會確實透過第三型蛋白分泌系統被送入植物體及其表現是否受到病原性相關的轉錄因子 *PhcA* (附錄九)調控則需進一步研究。

7. 低毒力菌株特有之第三型分泌蛋白 *RSp0213* 和 *RSc3174* 影響毒力表現

依目前研究報導顯示中，推估青枯病約具有 70~80 個 T3Es (Cunnac *et al.*, 2004b)，由於功能的重複性(redundancy)，使得若單一剔除某一 T3Es 後，病菌在番茄致病力上或菸草過敏性反應的誘導皆不受影響(Kanda *et al.*, 2003；Cunnac *et al.*,

2004b)。因此本研究採用基因轉移策略，將低毒力的獨有的 T3Es 轉移表現至高毒力 Pss190 及 Pss1308 的遺傳背景下表現，發現此兩基因之轉移表現並未影響菌株在培養基上生長及植物體內增生情形(圖二十五)，致病相關特性上僅 Pss190 背景下的基因轉移菌株在根部附著能力有下降的情形，在生物膜形成及泳動能力上不受影響(圖二十六)，由此推論表現外源 T3Es 並不影響菌株的生長及致病特性。

進一步檢測在 Pss190 背景下的 T3Es 基因轉移表現株在抗病品系 Hawaii 7996 番茄的毒力表現(圖二十八)，發現接種病菌後 7、14、21 天，基因轉移表現株皆有較低的萎凋率，其中以 *RSc3174* 轉移表現株較顯著。推測此兩 T3Es 與毒力表現具有關連性，其存在會使菌株的毒力下降，且 *RSc3174* 對菌株毒力影響較顯著。然而，目前對於野生型菌株存在此兩 T3Es 基因是如何使其毒力下降機制尚不清楚。

8. 總結

台灣本土的青枯病菌分離株在基因型及毒力上的表現有很高的差異性(Jaunet and Wang, 1999)，然而目前對於影響毒力表現的相關因子尚不清楚。本研究針對台灣本土不同毒力表現的青枯病菌株分析其特性，發現青枯病菌的生物膜形成能力可能與其毒力表現有關。而由生物微陣列晶片分析顯示高或低毒力菌株中有些獨特的基因存在，進一步從中選取某些基因做為研究對象，透過建構突變株或是基因轉移表現的策略，分析毒力的表現，顯示不同毒力的表現與其菌株中獨特存在之基因可能有所關聯。透過這些分子層面的研究可讓我們對青枯病菌毒力相關機制有初步的了解，預期對研擬青枯病之有效防治管理策略將有所啟發。

第五章 未來展望

針對不同毒力之野生型菌株之特性分析，(1)首先須比較不同毒力菌株於寄主植物體內增殖情形是否有所差異及其在植物體內 EPS 之產量，以分析菌株於植物體內生長與阻塞微管束木質部導管之能力差異與毒力之關聯；(2)藉由分析不同毒力菌株對番茄根部之趨化性，可釐清毒力與泳動力、趨化性之關聯；(3)植物根部附著能力與生物膜之形成分析結果不一致，應進一步分析菌株於抗病品系 Hawaii 7996 番茄根部之附著能力，以驗證菌株的植物根部附著力與生物膜形成和毒力之關係；(4)不同菌株對於氧化逆境之耐受性不同，但與毒力未有明顯相關，未來也可進一步分析菌株對於植物抗菌素、植物荷爾蒙、抗生素及金屬等耐受性，以期能釐清影響毒力表現之可能因子。

針對高毒力特有之 *RSc2322-RSc2325* 基因群之研究，(1) 此基因群的轉錄雖大致可分為三個轉錄方向，但 *RSc2323* 啟動子仍有微量表現，因此此基因群的啟動子活性是否會受到生長時期的調節仍須進一步驗證；(2)由於目前測試之逆境藥劑並不多，應大量測試單一基因突變株與基因轉移表現株對於植物抗菌素、植物荷爾蒙、抗生素及金屬等之耐受性及其啟動子是否受到逆境所調控，以了解此基因群於逆境扮演之角色；(3)本論文單一基因突變株與基因轉移表現株的毒力測試中植物數量仍不足，且植株個體及不同批次試驗之間的萎凋指數變異性大，故 *RSc2322-RSc2325* 基因群對於毒力的影響，尚須增加植物數量並且固定植株的生長狀況以進行毒力測試加以驗證，此外，檢測不同時間點及不同部位的菌株增生情形也可能可以提供更明顯之毒力差異；(4)以同源基因重組(homologous recombination)之方法建構多基因剔除之突變株，有助於釐清此基因群在毒力表現上所扮演的角色。

針對低毒力特有之第三型分泌蛋白基因 *RSp0213* 及 *RSc3174* 之研究，(1)亦需要增加毒力測試的植物數量及檢測不同時間點及不同部位的菌株增生情形以證明其在毒力扮演之角色；(2)此兩基因雖然確實受到 HrpG 之調控，但是否會透過第三型蛋白分泌系統被送入植物體及是否受到病原性相關的轉錄因子 PhcA 調控則需進一步驗證；(3)為了解此兩蛋白是否受植物辨認而誘導防禦反應而使菌株呈現較低的毒力表現，可檢測植株於接種後的防禦基因之表現。

參考文獻

- 朱昱如。2008。植物青枯病菌 *tol-pal* 基因群突變株的特性研究與噬菌體感受性相關的基因篩選。國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。
- Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., and Boucher, C.A.** (1992). Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact* **5**, 187–193.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Pernollet, J.C., Huet, J.C., and Boucher, C.A.** (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitive-like response on specific petunia genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBOJ* **13**, 543–553.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14620-14625.
- Bai, J., Choi, S.H., Ponciano, G., Leung, H., and Leach, J.E.** (2000). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1322-1329.
- Barbosa, T.M. and Levy, S.B.** (2000). Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* **182**, 3467–3474.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P.J., Marco, Y., and Deslandes, L.** (2008). RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* **20**, 2252-2264.
- Bhatt, G., and Denny, T.P.** (2004). *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by PhcA, the global virulence regulator. *J Bacteriol* **186**, 7896-7904.
- Boucher, C.A., Gough, C., and Arlat, M.F.** (1992). Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. *Annu. Rev. Phytopathol* **30**, 443-461

- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (1999).** *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **31**, 237-251.
- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (2002).** A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 109-119.
- Brown, D.G., Swanson, J.K., and Allen, C. (2007).** Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2777-2786.
- Brown, N. L., Stoyanov, J.V., Kidd S.P., and Hobman J.L. (2003).** The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 145~163.
- Brumbley, S.M., Carney, B.F., and Denny, T.P. (1993).** Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *J Bacteriol* **175**, 5477-5487.
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M.S. (2004).** The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 43-54.
- Chen, H., Hu, J., Chen, P.R., Lan, L., Li, Z., Hicks, L.M., Dinner, A.R., and He, C. (2008).** The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 13586-13591.
- Clough, S.J., Lee, K.E., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997).** A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* **179**, 3639-3648.
- Cunnac, S., Boucher, C., and Genin, S. (2004a).** Characterization of the *cis*-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **186**, 2309-2318.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (2004b).** Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**, 115-128.

- Danesh, D., Aarons, S., McGill, G.E., and Young, N.D.** (1994). Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 464-471.
- Denny, T.P., Carney, B.F., and Schell M.A.** (1990). Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 293-300.
- Denny, T.P.** (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**,173–97.
- Denny, T.P.** (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: *Plant-Associated Bacteria*. Gnanamanickam, S.S. ed. Springer, Dordrecht. pp. 573-644.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2404-2409.
- Elphinstone, J. G.** (1996). Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. *Potato Research* **39**, 403-410.
- Flores-Cruz, Z., and Allen, C.** (2009). *Ralstonia solanacearum* Encounters an Oxidative Environment During Tomato Infection. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 773-782.
- Fujikawa, T., Ishihara, H., Leach, J.E., and Tsuyumu, S.** (2006). Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 342-349.
- Gabriel, D.W., Allen, C., Schell, M., Denny, T.P., Greenberg, J.T., Duan, Y.P., Flores-Cruz, Z., Huang, Q., Clifford, J.M., Presting, G., Gonzalez, E.T., Reddy, J., Elphinstone, J., Swanson, J., Yao, J., Mulholland, V., Liu, L., Farmerie, W., Patnaikuni, M., Balogh, B., Norman, D., Alvarez, A., Castillo, J.A., Jones, J., Saddler, G., Walunas, T., Zhukov, A., and Mikhailova, N.** (2006). Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 69-79.
- Galan, J.E., and A. Collmer.** (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.
- Genin, S., and Boucher, C.** (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 107-134.

- Genin, S., Brito, B., Denny, T.P., and Boucher, C.** (2005). Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett* **579**, 2077-2081.
- Gloux, K., Touze, T., Pagot, Y., Jouan, B., and Blanco, C.** (2005). Mutations of *ousA* alter the virulence of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 150-157.
- Gonzalez, E.T., and Allen, C.** (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 536-544.
- Hayward, A.C.** (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**, 65-87.
- Hsu, S.T., Tsai, T.T., and Tzeng, K.C.** (1979). Pathovars of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan and their interaction in tobacco plants. *Natl. Sci. Council Mon. (Taipei)* **7**, 609-620. (In Chinese)
- Huang, Q., and Allen, C.** (1997). An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **179**, 7369-7378.
- Huang, J., and Schell, M.A.** (1995). Characterization of the *eps* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum* and its transcriptional regulation via a single promoter. *Mol Microbiol* **16**, 977-989.
- Hueck, C.J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Jaunet, T.X., and Wang, J.F.** (1999). Variation in Genotype and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 Isolated from Tomato in Taiwan. *Phytopathology* **89**, 320-327.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kanda, A., Yasukohchi, M., Ohnishi, K., Kiba, A., Okuno, T., and Hikichi, Y.** (2003). Ectopic expression of *Ralstonia solanacearum* effector protein PopA early in invasion results in loss of virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 447-455.
- Kang, Y., Huang, J., Mao, G., He, L., and Schell, M.A.** (1994). Mutants of *Pseudomonas solanacearum* that are defective in export of extracellular proteins across the outer membrane are dramatically reduced in virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 370-377.

- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol* **46**, 427-437.
- Kao, C.C., Barlow, E., and Sequeira, L.** (1992). Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* **174**, 1068–1071.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., and Boucher, C.** (2002). PopP1, a new member of the *YopJ/AvrRxv* family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1058-1068.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M.** (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* **7**, R90.
- Lin, C.H., Hsu, S.T., Tzeng, K.C., and Wang, J.F.** (2008). Application of a Preliminary Screen to Select Locally Adapted Resistant Rootstock and Soil Amendment for Integrated Management of Tomato Bacterial Wilt in Taiwan. *Plant dis.* **92**, 909-916.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (2005). Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1296-1305.
- Mangin, B., Thoquet, P., Olivier, J., and Grimsley, N.H.** (1999). Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* **151**, 1165-1172.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C., and Arlat, M.** (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol* **27**, 437-453.

- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C.** (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 430-449.
- McCann, H.C., and Guttman, D.S.** (2008). Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol* **177**, 33-47.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D., and Wattiez, R.** (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 385-410.
- McGarvey, J.A., Denny, T.P., and Schell, M.A.** (1999). Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology* **89**, 1233-1239.
- Mole, B.M., Baltrus, D.A., Dangi, J.L., and Grant, S.R.** (2007). Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends in Microbiol* **15**, 363-371.
- Morris, C.E. and Monier, J.M.** (2003). The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 429-453.
- Nies, D.H.** (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 313-339.
- Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S., and Boucher, C.** (2005). Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 938-949.
- Oku, T., Alvarez, A.M., and Kado, C.I.** (1995). Conservation of the hypersensitivity-pathogenicity regulatory gene *hrpX* of *Xanthomonas campestris* and *X. oryzae*. *DNA seq.* **5**, 245-249.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., and Genin, S.** (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 538-550.

- Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M., and Trigalet, A.** (2003). Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Mol Microbiol* **49**, 991-1003.
- Prior, P., Steva, H., and Cadet, P.** (1990). Aggressiveness of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadeloupe) on tomato. *Plant Dis.* **74**, 962-965.
- Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (1997). Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **87**, 1264-1271.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choise, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A.** (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502.
- Schell, M.A., Denny, T.P., Clough, S.J., Huang, J.** (1993). Further characterization of genes encoding extracellular polysaccharide of *Pseudomonas solanacearum* and their regulation. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, ed. EWNester, DPSVerma, pp. 231-39, Dordrecht: Kluwer
- Schell, M.A.** (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol* **38**, 263-292.
- Shiotani, H., Fujikawa, T., Ishihara, H., Tsuyumu, S., and Ozaki, K.** (2007). A *pthA* homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *J Bacteriol* **189**, 3271-3279.
- Tans-Kersten, J., Guan, Y., and Allen, C.** (1998). *Ralstonia solanacearum* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4918-4923.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., and Allen, C.** (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol* **183**, 3597-3605.

- Tans-Kersten, J., Brown, D., and Allen, C.** (2004). Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 686-695.
- Troisfontaines, P., and Cornelis, G.R.** (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* **20**, 326-339.
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P., and Boucher, C.** (1995). The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* **15**, 1095-1114.
- Vasse, J., Vasse, J., Frey, P., and Trigalet, A.** (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 241-251.
- Wang, J.F., and Lin, C.H.** (2005). Colonization capacity of *Ralstonia solanacearum* tomato strains differing in aggressiveness on tomatoes and weeds. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. pp. 73-79.
- Wei, Z.M. and Beer, S.V.** (1995). HrpL activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol* **177**, 6201-6210.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U.** (1996). HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 704-712.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y., and Hutcheson, S.W.** (1994). Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J Bacteriol.* **176**, 1025-1036.
- Yao, J., and Allen, C.** (2006). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **188**, 3697-3708.

Yao, J., and Allen, C. (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J Bacteriol* **189**, 6415-6424.

Yoshimochi, T., Hikichi, Y., Kiba, A., and Ohnishi, K. (2009). The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* *hrp* regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signaling proteins. *J Bacteriol* **191**, 3424-342



表一、本研究所使用之菌株及質體

Strains or plasmids	Description	Sources or references
Plasmids		
pCZ367	High copy number vector containing a translation terminator, Amp ^r , Gm ^r	Cunnac <i>et al.</i> , 2004
pUFR047	Low copy number and broad host range cloning vector for gene transfer, Amp ^r , Gm ^r	DeFeyter <i>et al.</i> , 1993
pCZ962	Middle copy number vsctor containing a promoterless LacZ reporter for promoter scivity assay, Tet ^r	Provided by C. Boucher
pCZ22	pCZ367 carrying upstream sequences of <i>RSc2322</i> ORF in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZ24	pCZ367 carrying upstream sequences of <i>RSc2324</i> ORF in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZ25	pCZ367 carrying upstream sequences of <i>RSc2325</i> ORF in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pUFR22_25	pUFR047 carrying <i>RSc2322-RSc2325</i> ORF in <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>	This study
pUFR0213	pUFR047 carrying <i>RSp0213</i> region in <i>PstI</i> , <i>Sall</i>	This study
pUFR3174	pUFR047 carrying <i>RSc3174</i> region in <i>Sall</i> , <i>BamHI</i>	This study
pCZP22	pCZ962 carrying putative promoter sequence upstream of <i>RSc2322</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZP23	pCZ962 carrying putative promoter sequence upstream of <i>RSc2323</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZP24	pCZ962 carrying putative promoter sequence upstream of <i>RSc2324</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZP25	pCZ962 carrying putative promoter sequence upstream of <i>RSc2325</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZP0213	pCZ962 carrying putative promoter sequence upstream of <i>RSp0213</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZP3174	pCZ962 carrying putative promoter sequence upstream of <i>RSc3174</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Transient host of different construt	Hanahan,1983
<i>R. solanacearum</i>		
Pss190	Wild-type, Phylotype I, Biovar 4, aggressiveness 1	Jaunet and Wang, 1999
Pss1308	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, aggressiveness 1	Jaunet and Wang, 1999
Pss749	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, aggressiveness 1	Jaunet and Wang, 1999
Pss365	Wild-type, Phylotype I, Biovar 4, aggressiveness 1	Jaunet and Wang, 1999
Pss4	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, aggressiveness 3	Jaunet and Wang, 1999
Pss991	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, aggressiveness 5	Jaunet and Wang, 1999
Pss216	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, aggressiveness 5	Jaunet and Wang, 1999
Pss79	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, aggressiveness 5	Jaunet and Wang, 1999
Pss965	Wild-type, Phylotype I, Biovar 3, aggressiveness 5	Jaunet and Wang, 1999

1308-22m	Pss1308 polar mutant, pCZ22 insertion in <i>RSc2322</i>	This study
1308-24m	Pss1308 polar mutant, pCZ24 insertion in <i>RSc2324</i>	This study
1308-25m	Pss1308 polar mutant, pCZ25 insertion in <i>RSc2325</i>	This study
749-22m	Pss749 polar mutant, pCZ22 insertion in <i>RSc2322</i>	This study
749-24m	Pss749 polar mutant, pCZ24 insertion in <i>RSc2324</i>	This study
749-25m	Pss749 polar mutant, pCZ25 insertion in <i>RSc2325</i>	This study
216-V	Pss216 harboring pUFR047 vector	This study
216-22_25	Pss216 harboring pUFR22_25	This study
P _{1308v}	Pss1308 harboring pCZ962 vector	This study
P ₂₂	Pss1308 harboring pCZP22	This study
P ₂₃	Pss1308 harboring pCZP23	This study
P ₂₄	Pss1308 harboring pCZP24	This study
P ₂₅	Pss1308 harboring pCZP25	This study
190-V	Pss190 harboring pUFR047 vector	This study
190-VP	Pss190 harboring pUFR0213	This study
190-VC	Pss190 harboring pUFR3174	This study
1308-V	Pss1308 harboring pUFR047 vector	This study
1308-VP	Pss1308 harboring pUFR0213	This study
1308-VC	Pss1308 harboring pUFR3174	This study
<i>hrpG::Tn</i>	Pss4 mutant possessing <i>Tn5</i> insertion in the <i>hrpG</i>	This study
P _{4v}	Pss4 harboring pCZ962 vector	This study
P _{4p}	Pss4 harboring pCZP0213	This study
P _{4c}	Pss4 harboring pCZP3174	This study
P _{hrpv}	<i>hrpG::Tn</i> harboring pCZ962 vector	This study
P _{hrpp}	<i>hrpG::Tn</i> harboring pCZP0213	This study
P _{hrpc}	<i>hrpG::Tn</i> harboring pCZP3174	This study

表二、不同毒力的本土青枯病菌野生型菌株之生長與致病相關特性比較

Characteristics	High-virulence				Medium-virulence		Low-virulence		
	Pss190	Pss365	Pss1308	Pss749	Pss4	Pss991	Pss216	Pss79	Pss965
Growth on media									
TTC	+	+	++	++	++	+	++	++	++
TTC+SDS	+	+	++	++	++	+	+	+	+
MM	+	+	+++	+++	++	+	++	++	++
EPS production	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Biofilm Formation	++++	++++	++++	+++	+	++	+	+	+
Swimming motility	-	-	++	+++	++++	+	++	++	+++
Exoenzyme secretion									
Egl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Peh	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pme	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Root attachment	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HR response	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Oxidative stress	+	+	+++	++	+	+	+++	+	++

*+, 表不同程度的表現型；-, 表不具能力。若為定量之試驗，依照統計(ANOVA Fisher's LSD) 加以分群後，能力最差者為+，次差者為++，以此類推。無法定量者則以肉眼觀察判斷。菌株在培養基上生長情形共觀察 4 天。

表三、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下，*RSc2322-RSc2325* 單一基因突變株之氧化逆境藥劑最小抑制濃度測定

Compounds	MIC ^a							
	Pss1308				Pss749			
	WT	22m	24m	25m	WT	22m	24m	25m
H ₂ O ₂ (mM)	1	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5
TBOOH (μM)	125	62.5	62.5	62.5	125	62.5	62.5	62.5

^a 最小抑制濃度(minimum inhibition concentration)。

本試驗在 MP 液體培養基進行測試，將菌量調到 OD₆₀₀=0.3 (約 10⁸ CFU/mL)，取 50 μL 菌液加入 2 mL 添加不同濃度的測試藥劑的液體培養基，28 °C 黑暗震盪培養 24 小時後，測量 OD₆₀₀，當菌不再生長的濃度即為該藥劑對細菌的最小抑制濃度 (MIC)。WT，野生型菌株；22m，*RSc2322* 突變株；24m，*RSc2324_3* 突變株；25m，*RSc2325* 突變株。



表四、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下，RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株於生長及致病相關特性比較

Characteristics (vs.WT)	Pss1308 / Pss749		
	pCZ367:: <i>RSc2322</i>	pCZ367:: <i>RSc2324_3</i>	pCZ367:: <i>RSc2325</i>
Growth on media			
TTC	=/=	=/=	=/=
TTC+SDS	=/=	=/=	=/=
MM	=/=	=/=	=/=
SM1	=/=	=/=	=/=
Biofilm formation	=/=	=/=	=/=
Swimming motility	↓↓	↓/=	↓↓
Exoenzyme secretion			
Egl	=/=	=/=	=/=
Peh	=/=	=/=	=/=
Pme	=/=	↓/=	=/=
Root attachment	=/=	=/=	=/=
HR response	=/=	=/=	=/=
Multiplication in planta	=/=	=/=	=/=
Heavy metal stress			
Rich plate			
CuSO ₄	=/=	=/=	=/=
ZnSO ₄	=/=	=/=	=/=
Rich broth			
ZnSO ₄	↓/=	↓/=	↓/=
Oxidative stress (Minimal broth)			
H ₂ O ₂	↓↓	↓↓	↓↓
TBOOH	↓↓	↓↓	↓↓



*↑，表突變株具有較佳的能力；↓，表突變株具有較差的能力；=，表突變株與野生型菌株沒有明顯差異。可定量之實驗以 student's *t*-test 分析是否有顯著差異，而無法定量者以肉眼觀察加以判斷。菌株於培養基上之生長共觀察 4 天。逆境反應以液體培養基測試時，取其最小抑制濃度加以比較。

表五、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下，RSc2322-RSc2325 單一基因突變株與野生型菌株接種於抗病品系 Hawaii 7996 番茄後 21 天之毒力表現

Strains	Plant no. ^a	21 DPI ^b		
		W % ^c	Ws ^d	Mean of RAUDPC ^e
Pss1308	24	66.7	3.1	2.34
Pss1308(pCZ367::RSc2322)	24	91.7	4.4	2.54 ns ^f
Pss1308(pCZ367::RSc2324_3)	24	62.5	2.8	2.11 ns
Pss1308(pCZ367::RSc2325)	24	41.7	1.9	1.64 ns
Pss749	24	75.0	3.8	2.41
Pss749(pCZ367::RSc2322)	24	70.9	3.5	2.17 ns
Pss749(pCZ367::RSc2324_3)	24	25.0	1.1	1.06 ** ^f
Pss749(pCZ367::RSc2325)	24	91.7	4.3	2.10 ns

^a 三批次毒力實驗中接種之番茄 H7996 植株總數。

^b 接種後天數(Day post inoculation)。

^c 三批次實驗於接種後 21 天平均之萎凋率。

^d 三批次實驗於接種後 21 天平均之萎凋指數(wilting score) (參見材料與方法)。

^e 相對發病曲線下面積(relative area under the disease progress curve)。

^f 以 student's *t*-test 比較單一基因突變株與野生型菌株，ns 為突變株與野生型無明顯差異(not significant, $P>0.05$)，**為突變株與野生型有高度顯著差異(highly significant, $P<0.01$)。

表六、低毒力菌株 Pss216 表現 RSc2322-RSc2325 菌株與載體轉型株(empty vector) 生長及致病相關特性比較

Characteristics (vs. empty vector)	Pss216 (pUFR047:: <i>RSc2322-25</i>)
Biofilm formation	=
Root attachment	↑
Swimming motility	↓↓
HR response	=
Multiplication <i>in planta</i>	=

*↑，表基因轉移株具有較佳的能力；↓，表基因轉移株具有較差的能力，且有顯著差異(significant difference) (student's *t*-test, $P < 0.05$)；↓↓，表基因轉移株具有較差的能力，且有高度顯著差異(Highly significant difference) (student's *t*-test, $P < 0.05$)；=，表基因轉移株與載體轉型株沒有明顯差異。



表七、高毒力 Pss190 及 Pss1308 表現 *RSp0213* 和 *RSc3174* 菌株與載體轉型株的生長及致病相關特性比較

Characteristics (vs. WT carrying empty vector)	Pss190 / Pss1308	
	pUFR047:: <i>RSp0213</i>	pUFR047:: <i>RSc3174</i>
Growth on media		
TTC	=/=	=/=
TTC+SDS	=/=	=/=
MM	=/=	=/=
SM1	=/=	=/=
Biofilm formation	=/n.d.	=/n.d.
Swimming Motility	=/=	=/=
Root attachment	↓/=	↓/=
HR response	=/=	=/=
Multiplication in planta	=/=	=/=

*↑，表基因轉移株具有較佳的能力；↓，表基因轉移株具有較差的能力；=，表基因轉移株與載體轉型株沒有明顯差異；n.d.，未測試。可定量之實驗以 student's *t*-test 分析是否有顯著差異，而無法定量者以肉眼觀察加以判斷。菌株於培養基上之生長共觀察 4 天。

表八、高毒力 Pss190 表現 *RSp0213* 和 *RSc3174* 菌株與載體轉型株於抗病品系 Hawaii 7996 番茄上之毒力表現

Strains	Plant no. ^a	21 DPI ^b		
		W % ^c	ws ^d	Means of RAUDPC ^e
Pss190(pUFR047)	24	77.8	3.9	1.83
Pss190(pUFR047:: <i>RSp0213</i>)	24	66.7	3.1	1.37 ns ^f
Pss190(pUFR047:: <i>RSc3174</i>)	24	47.2	2.2	0.74 ** ^f

^a 三批次毒力實驗中接種之番茄 H7996 植株總數。

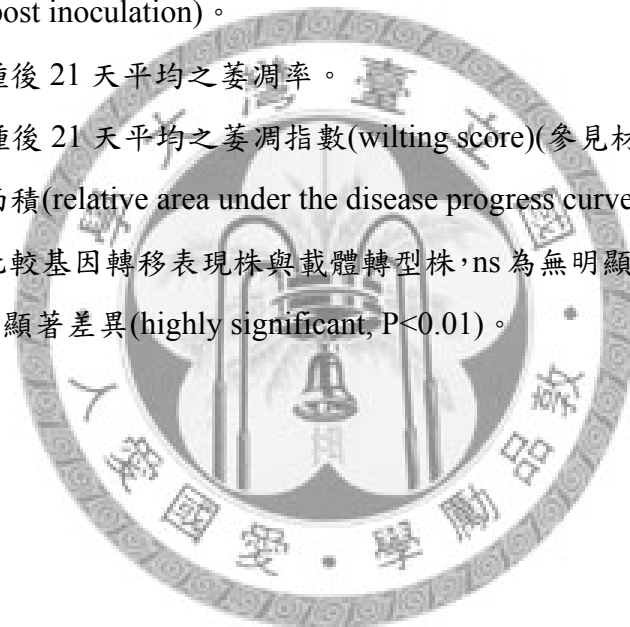
^b 接種後天數(Day post inoculation)。

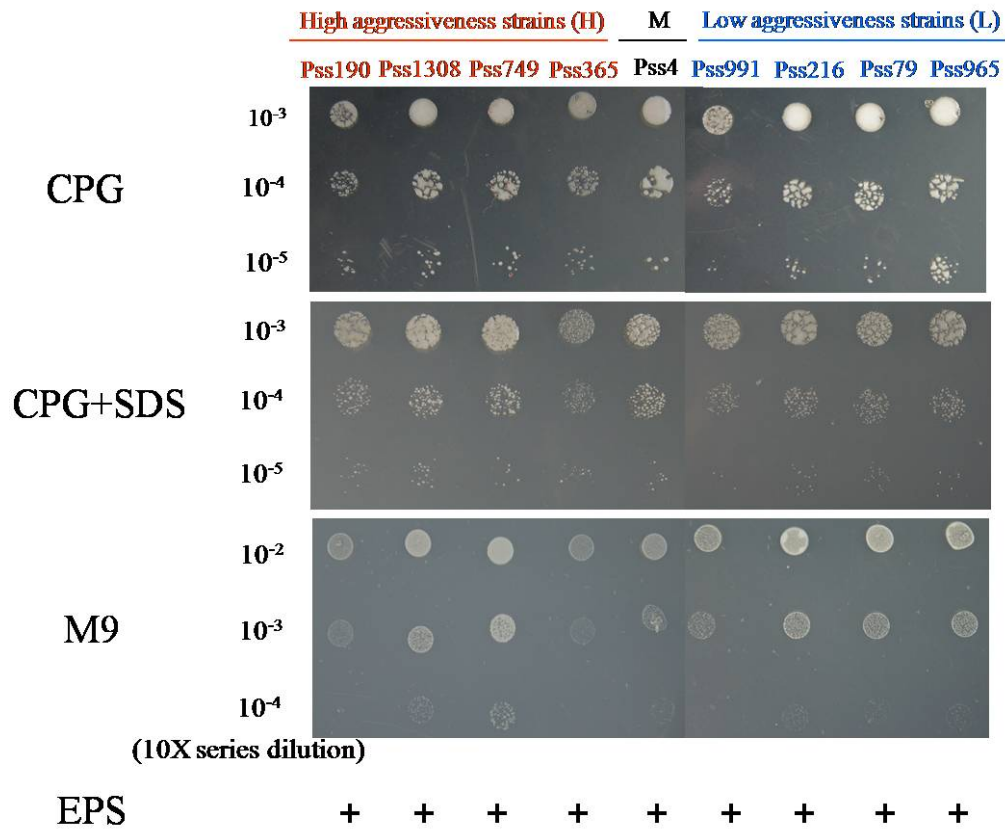
^c 三批次實驗於接種後 21 天平均之萎凋率。

^d 三批次實驗於接種後 21 天平均之萎凋指數(wilting score)(參見材料與方法)。

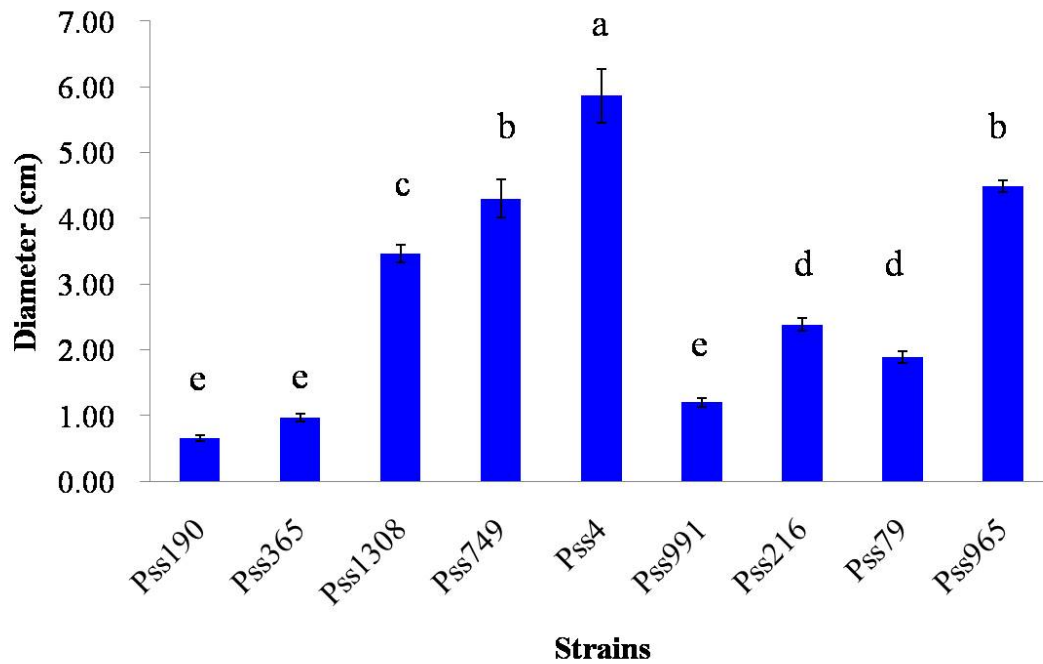
^e 相對發病曲線下面積(relative area under the disease progress curve)。

^f 以 student's *t*-test 比較基因轉移表現株與載體轉型株, ns 為無明顯差異(not significant, $P > 0.05$), ** 為高度顯著差異(highly significant, $P < 0.01$)。

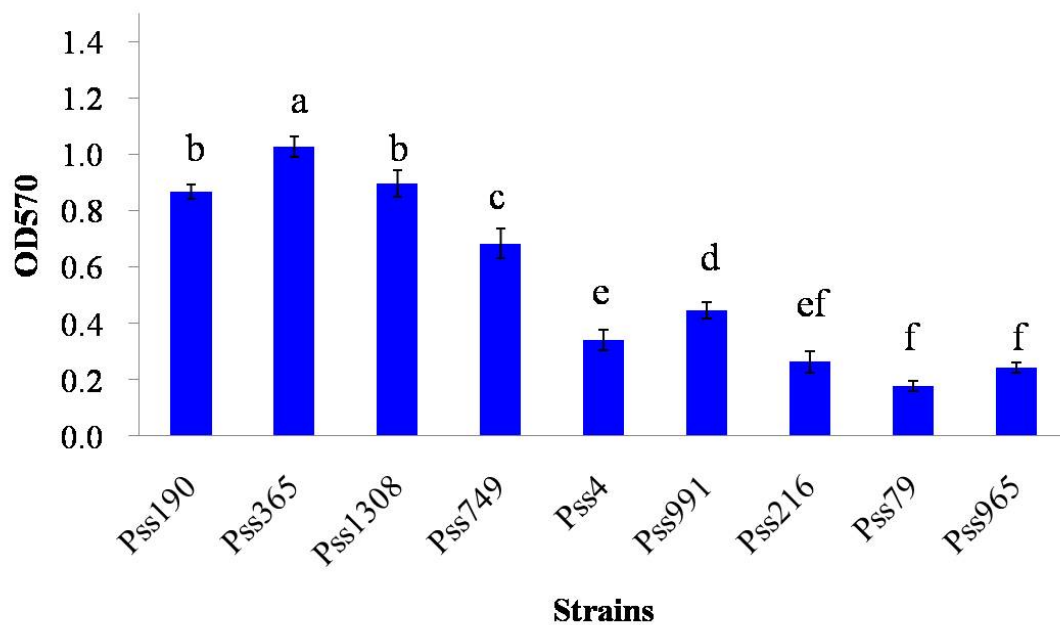




圖一、不同毒力青枯病菌株在 CPG、CPG+SDS、M9 固體培養基生長情形。將原本為 10⁸ CFU/mL 菌液十倍系列稀釋後，取 10 μL 稀釋 10²~10⁵ 倍之菌液滴於培養基上，28 °C 下黑暗培養 2~4 天。本實驗共三重複，各菌株在三次重複趨勢相同。+，表示菌株目測會產生 EPS，但未定量。

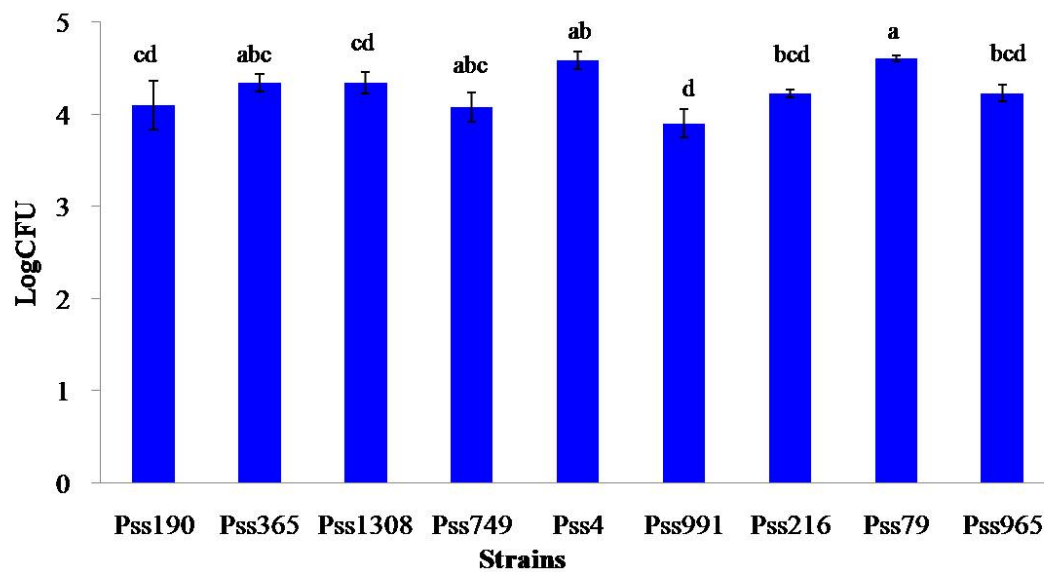


圖二、不同毒力青枯病菌株的泳動能力(swimming motility)。利用 0.3 % agar 培養基培養細菌 2 天，測量菌落直徑，共四重複。利用四次重複的數值計算其標準差，並利用 SAS 統計軟體以 ANOVA Fisher's LSD test 分析加以分群，共可分為五群(P<0.05)。

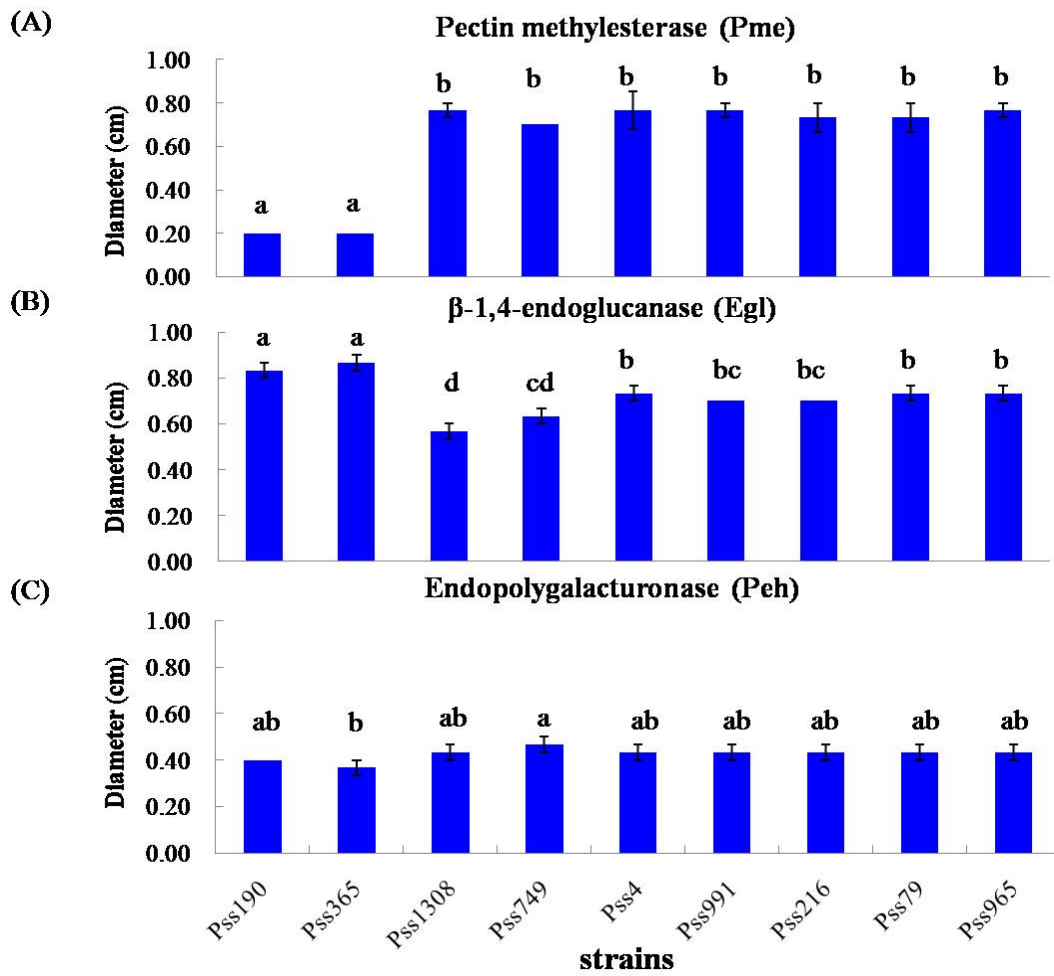


圖三、不同毒力青枯病菌株形成生物膜(Biofilm formation)能力。

利用 96 孔盤 28°C 黑暗中靜置培養細菌，起始濃度為 $OD_{600}=0.1$ ，由於靜置培養下各菌株生長大致相同，故以結晶紫染生物膜後，直接測定 OD_{570} 以定量比較，本實驗每次重複有四個數值，共三重複。以三重複數值計算其標準差，並以 SAS 統計軟體進行 ANOVA Fisher's LSD test 分析加以分成六個群組($P<0.05$)。



圖四、不同毒力青枯病菌株在感病品系 L390 番茄根部附著(root attachment)能力。將番茄幼根浸泡於 10^6 CFU/mL 青枯病菌液中 4 小時，洗下幼根表面附著的細菌，塗佈於 SM1 培養基，計算菌量，並以指數(Log_{10})表示。本實驗共重複五次，以五次的數值計算標準差，並利用 SAS 統計軟體以 ANOVA Fisher's LSD test 分析加以分群，共分為四群($P < 0.05$)。



圖五、不同毒力青枯病菌株胞外酵素活性的表現。

利用含不同基質的培養基培養各菌株 2 天，Pme 及 Peh 以 2 M HCl 呈色，Egl 則以 1% 剛果紅染色，再以 1 M NaCl 溶液退染，測量產生的暈環直徑。本實驗共三重複，以三次重複數值計算標準差，並以 SAS 統計軟體利用 ANOVA Fisher's LSD test 分析加以分群，Pme 可分為兩群 ($P < 0.05$)，Egl 可分為四群 ($P < 0.05$)，Peh 可分為兩群 ($P < 0.05$)。

Pss190

Pss1308

Pss749

Pss365

Pss4



H₂O

Pss965

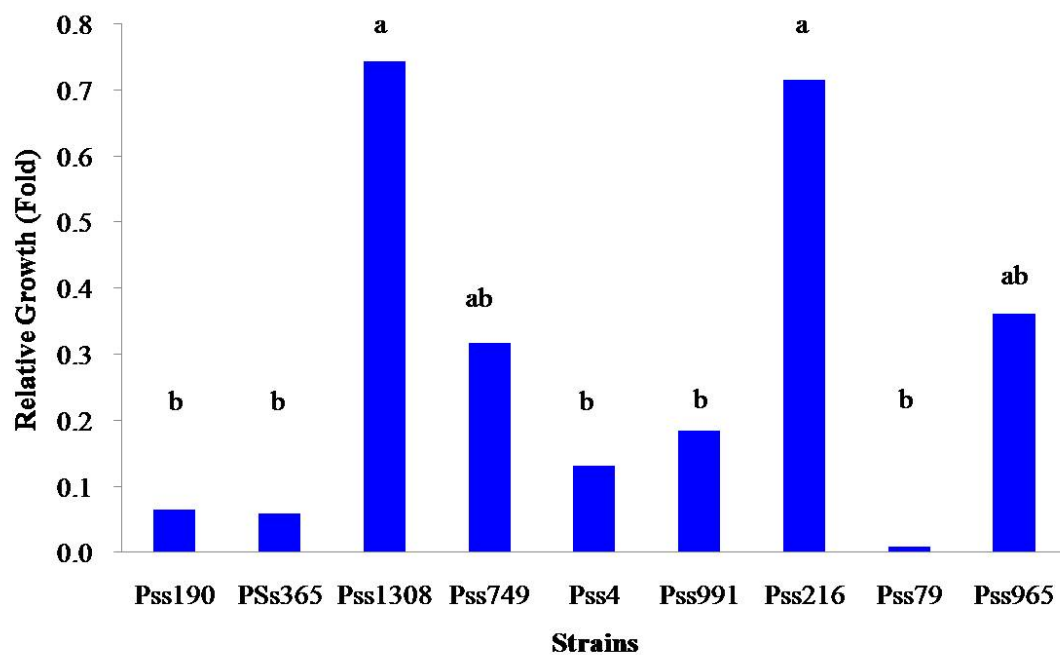
Pss79

Pss216

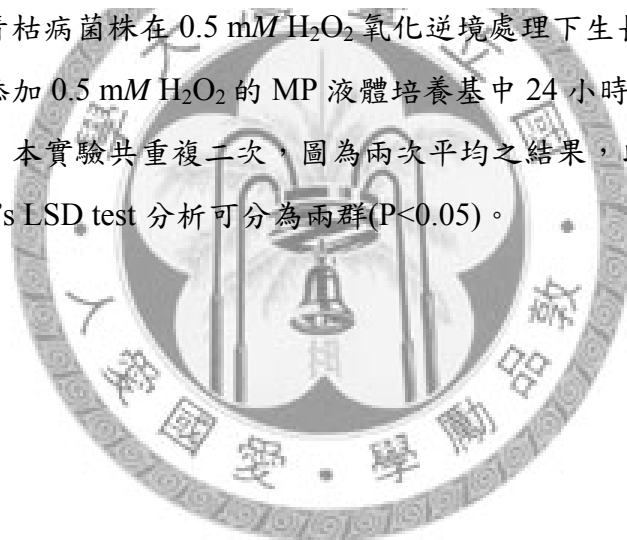
Pss991

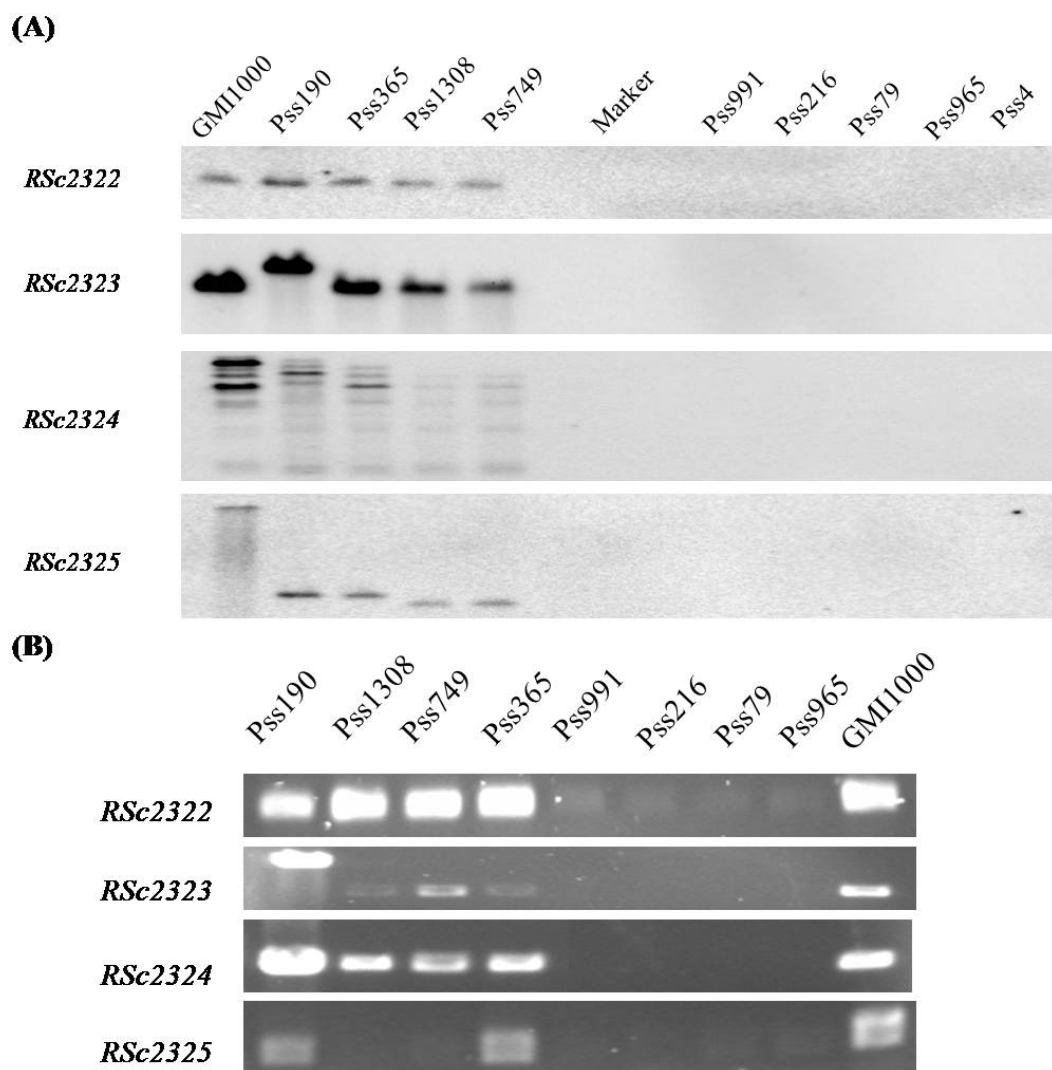
圖六、不同毒力青枯病菌株在菸草 *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 (W38)引起之過敏性反應(Hypersensitive response, HR)。

將 50 μ L 的菌液($OD_{600}=0.3$ ，約 10^8 CFU/mL)以針筒注入菸草葉片，24 小時後產生之過敏性反應。本實驗共重複三次，各菌株於三重複反應皆相同。



圖七、不同毒力青枯病菌株在 0.5 mM H₂O₂ 氧化逆境處理下生長情形。將各菌株培養於添加 0.5 mM H₂O₂ 的 MP 液體培養基中 24 小時，測量 OD₆₀₀ 以分析菌株生長情形。本實驗共重複二次，圖為兩次平均之結果，以 SAS 統計軟體利用 ANOVA Fisher's LSD test 分析可分為兩群(P<0.05)。



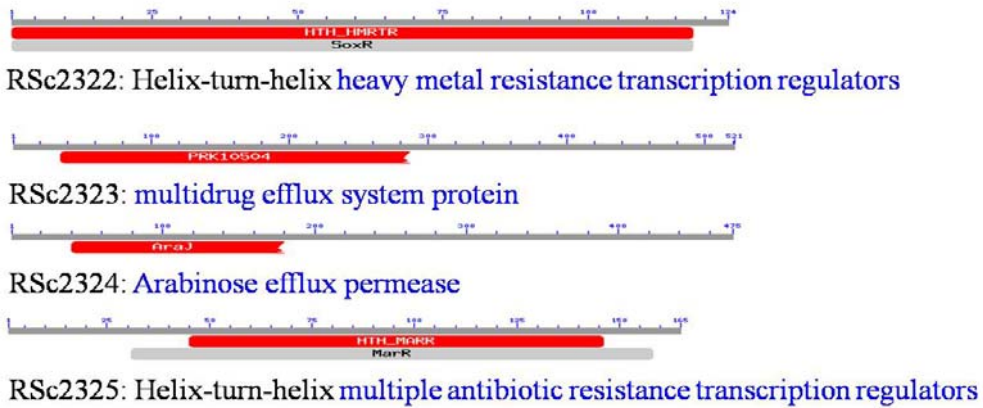


圖八、*RSc2322-RSc2325* 基因群存在之驗證。

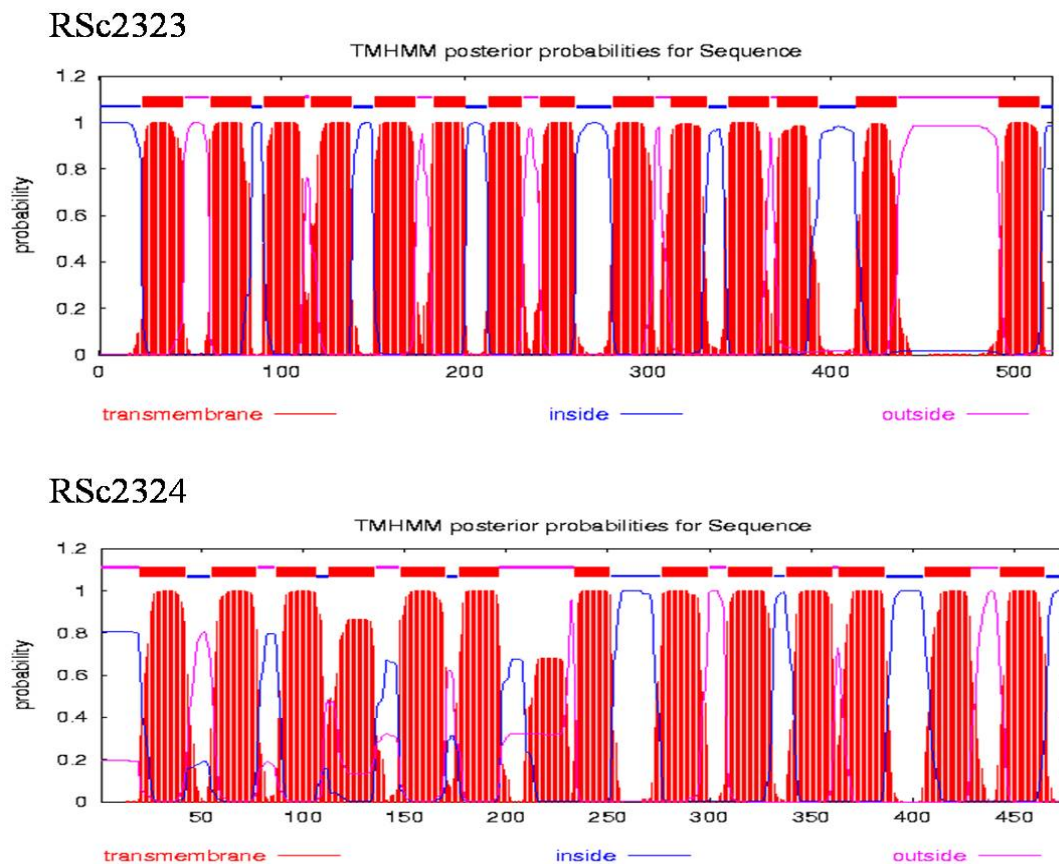
(A) 南方轉漬雜合反應(Southern blotting)：以 *SalI* 或 *PvuII* 限制酵素水解各菌株染色體 DNA，以 0.7% 瓊脂凝膠電泳(30 V/200 min)後轉至尼龍膜(nitrocellulose membrane)，利用基因全長之探針雜合後，再以 2X SSC 浸洗尼龍膜，最後以免疫探知作用顯影。

(B) 染色體 DNA 聚合酶連鎖反應(genomic PCR)：以各菌株染色體 DNA 做為模版，利用基因全長引子進行聚合酶連鎖反應增幅基因全長片段，共 30 循環(cycle)。

(A)



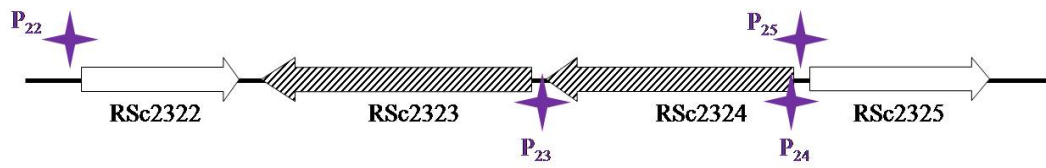
(B)



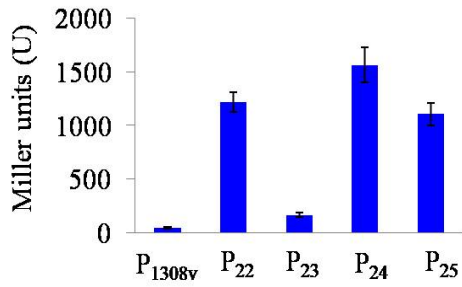
圖九、RSc2322-RSc2325 基因群之蛋白質序列分析。

(A) 以 NCBI 網站的 Protein blast 分析基因功能，RSc2322-RSc2325 基因群可能參與多種藥劑的抗性調控。

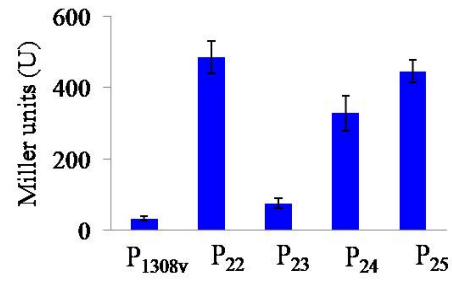
(B) 利用 TMHMM 網站分析膜蛋白，RSc2323 及 RSc2324 為分別具有 14 和 13 個 transmembrane domain 的膜蛋白。



(A) minimal broth

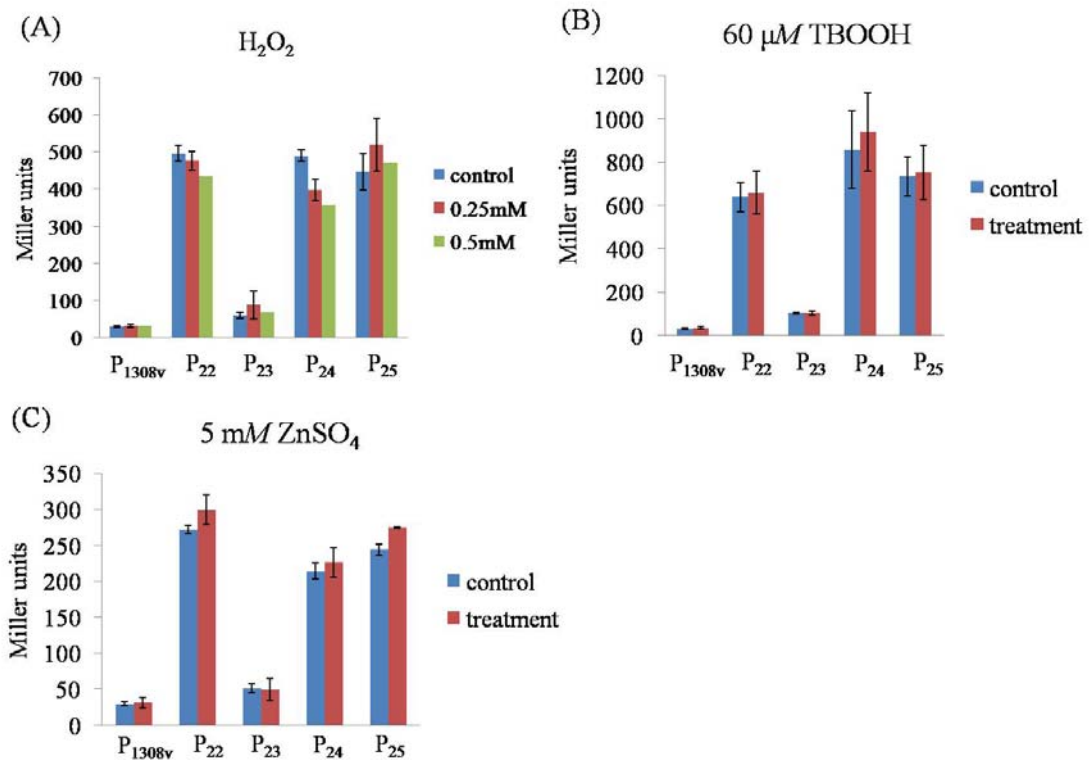


(B) rich broth

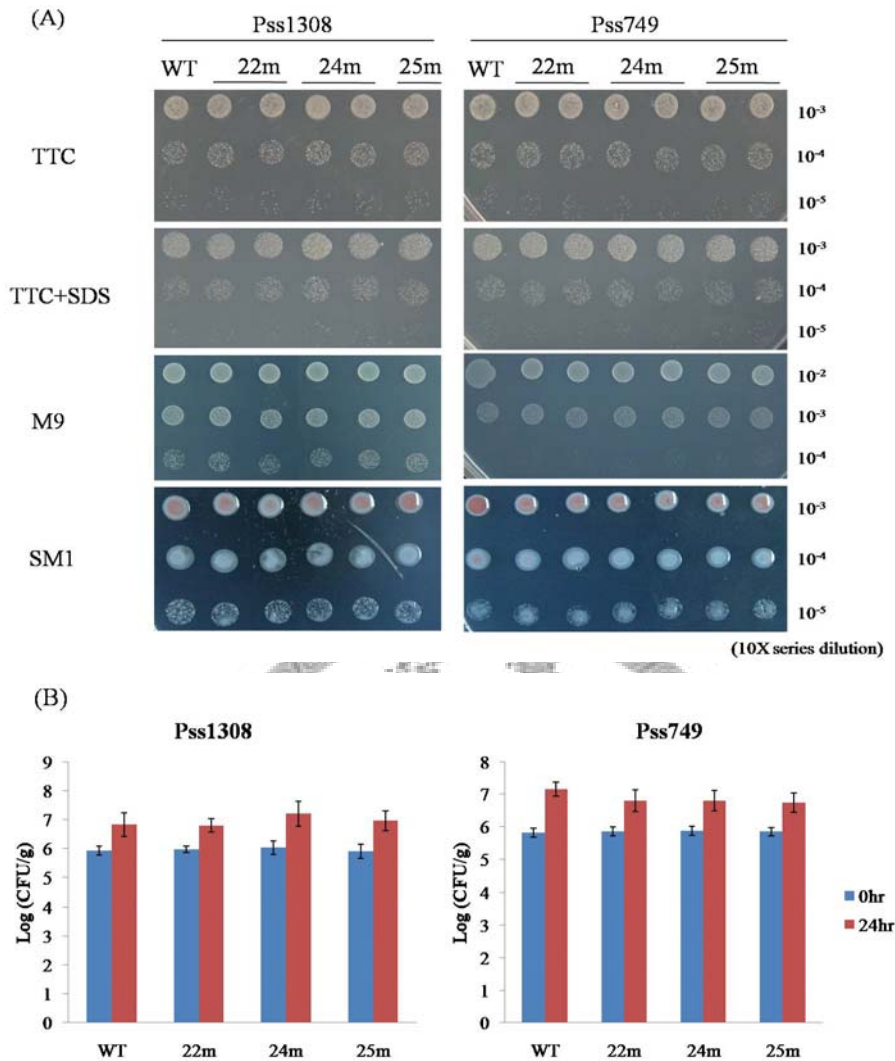


圖十、在高毒力 Pss1308 背景下 *RSc2322-RSc2325* 之操縱子(operon)結構。利用 β -galactosidase 分析法檢測在 minimal (A)及 rich (B)液體培養條件下 *RSc2322-RSc2325* 啟動子的活性。本實驗共重複三次，並利用三次數值取其標準差。





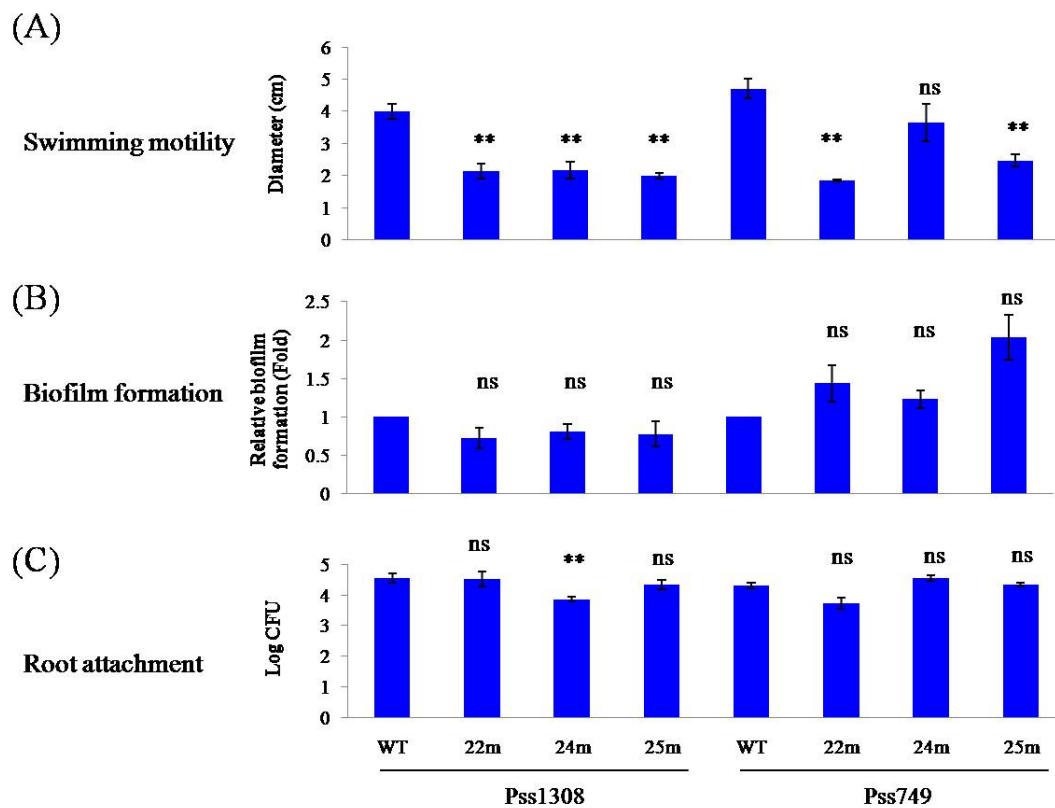
圖十一、在氧化逆境及重金屬逆境處理下 *RSc2322-RSc2325* 的啟動子活性。利用 β -galactosidase 分析啟動子在逆境下之調控，在氧化逆境 H₂O₂ (A) 和 TBOOH (B) 之測試於 MP 液體培養基進行，共三重複，並將三次數值平均後再取其標準差；重金屬逆境 ZnSO₄ (C) 於 CPG 液體培養基進行，共二重複，取兩重複之平均及標準差。



圖十二、在高毒力 Pss1308 及 Pss749 遺傳背景下的 *RSc2322-RSc2325* 單一基因突變株與野生型菌株 *in vitro* 和 *in planta* 的生長情形。

(A) 突變株與野生型菌株 *in vitro* 生長於不同培養基之情形。將原本為 10^8 CFU/mL 菌液十倍系列稀釋後，取 $10 \mu\text{L}$ 稀釋 $10^2 \sim 10^5$ 倍之菌液滴於 TTC、TTC+SDS、M9 和 SM1 固體培養基上， 28°C 下黑暗培養 2~4 天。本實驗共三重複，各菌株在三次重複趨勢相同。

(B) 將濃度為 10^8 CFU/mL 的青枯病菌突變株與野生型菌株注入 *Nicotiana benthamiana* 葉肉組織，0 和 24 小時後取其葉片 (leaf disc) 測植物體內青枯病菌含量。本實驗共三重複，將菌量以 Log (CFU/g) 表示，取三次平均值並計算標準差。22m, *RSc2322* 突變株；24m, *RSc2324_3* 突變株，25m, *RSc2325* 突變株。



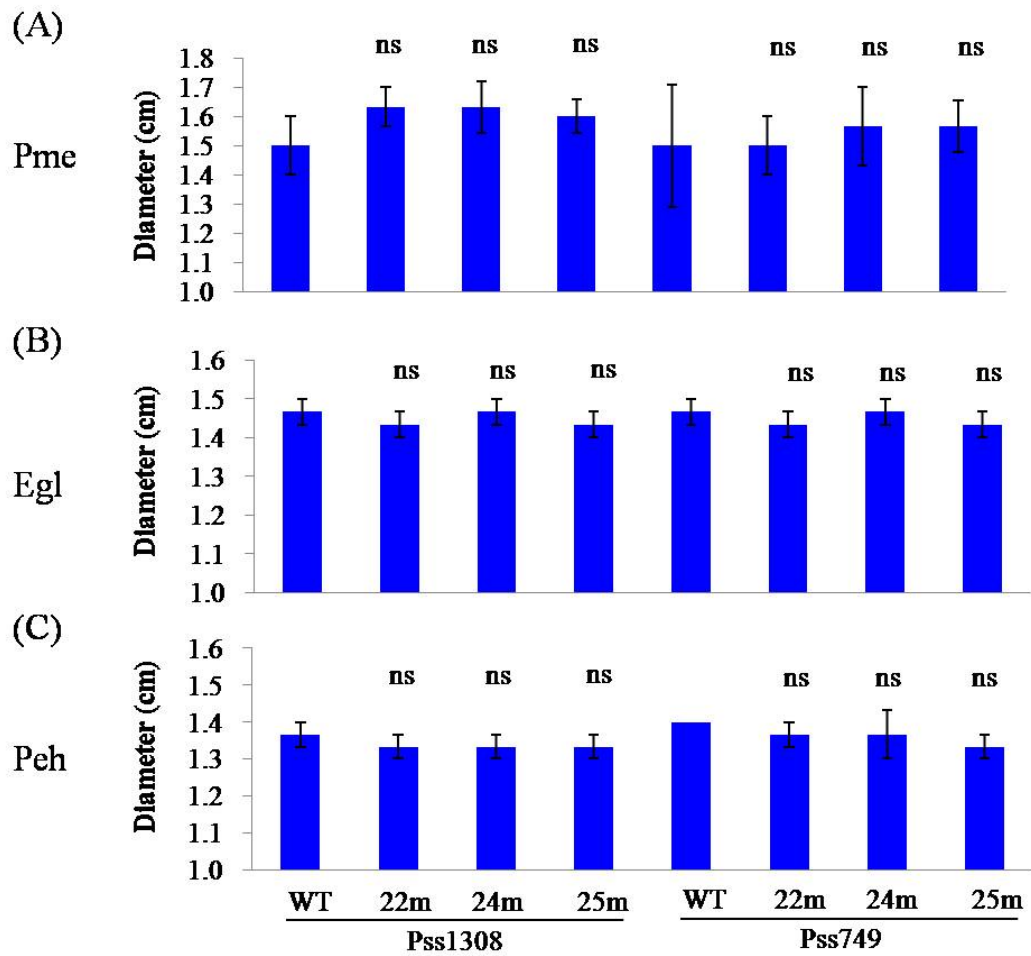
圖十三、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 遺傳背景下，*RSc2322-RSc2325* 單一基因突變株與野生型菌株在生物膜形成、泳動能力和根部附著能力之測試。

(A) 泳動力測定：利用 0.3 % agar 培養基培養野生型菌株和突變株 2 天，測量菌落直徑。

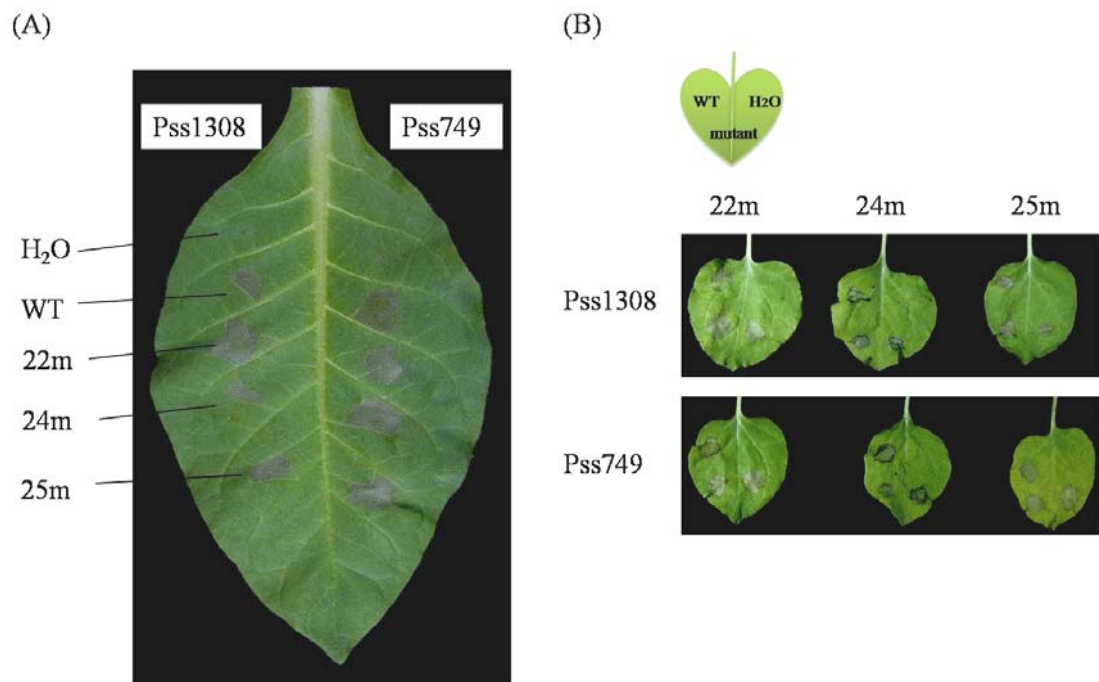
(B) 生物膜形成測試：利用 96 孔盤 28 °C 黑暗中靜置培養細菌，以結晶紫染生物膜後，測定 OD₅₇₀。縱軸數值以生物膜之 OD₅₇₀ 讀值除 OD₆₀₀ 扣除生長之差異，再與野生型菌株做比較，表示為 Relative biofilm formation。

(C) 番茄根部附著力分析：將 L390 番茄幼根浸泡於 10⁶ CFU/mL 青枯病菌液中 4 小時，測量幼根表面附著的菌量，並以指數(Log₁₀)表示。

以上實驗皆三次以上重複，平均後取其標準差，並以 Student's *t*-test 分析突變株與野生型菌株是否有顯著差異，**為高度顯著差異(P<0.01)，ns 為無顯著差異。22m，*RSc2322* 突變株；24m，*RSc2324_3* 突變株，25m，*RSc2325* 突變株。

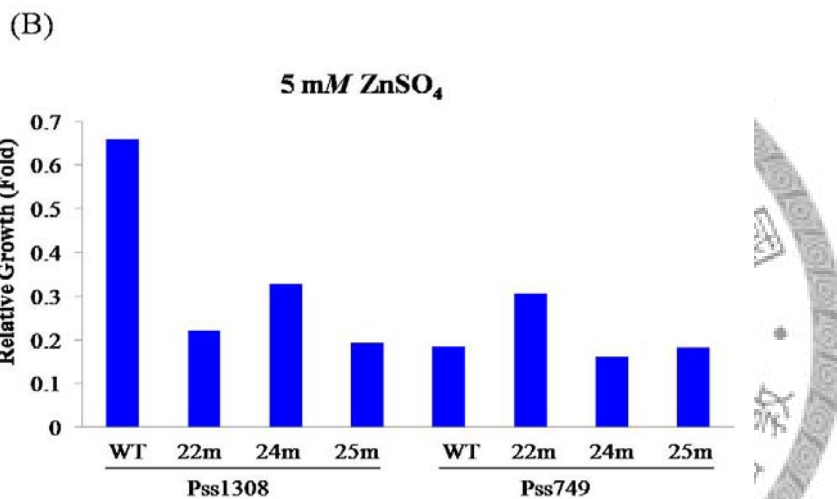
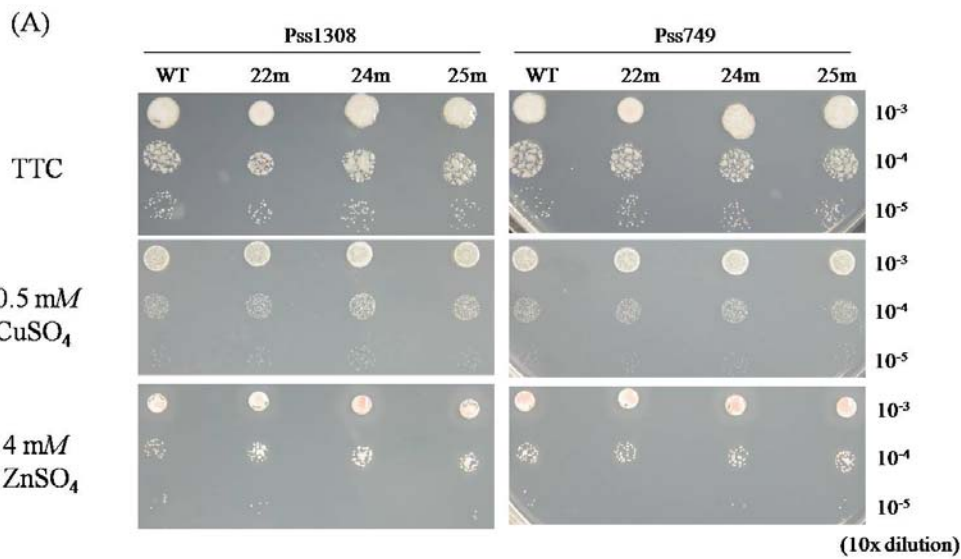


圖十四、在高毒力 *Pss1308* 和 *Pss749* 背景下 *RSc2322-RSc2325* 單一基因突變株與野生型菌株之胞外酵素活性測試。利用含不同基質的培養基培養各菌株 2 天，*Pme* (A) 及 *Peh* (C) 以 2 M HCl 呈色，*Egl* (B) 則以 1% 剛果紅染色，再以 1 M NaCl 溶液退染，測量產生的暈環直徑。本實驗共三重複，以三次重複數值計算標準差，並以 Student's *t*-test 分析突變株與野生型菌株是否有顯著差異。ns，突變株與野生型菌株沒有顯著差異。22m，*RSc2322* 突變株；24m，*RSc2324_3* 突變株，25m，*RSc2325* 突變株。



圖十五、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 背景下 *RSc2322-RSc2325* 單一基因突變株與野生型菌株在菸草 W38 (A) 和 *N. benthamiana* (B) 上誘導過敏性反應。

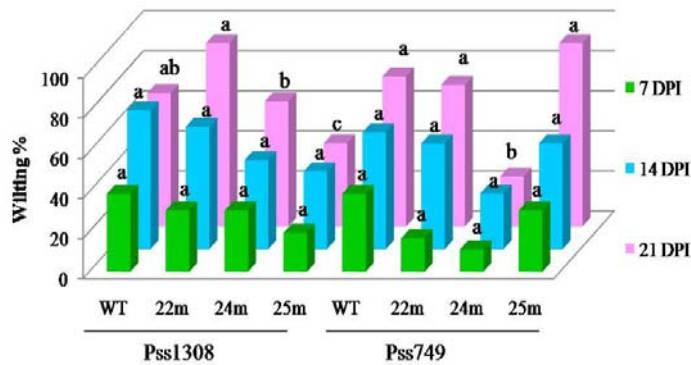
分別將 50 μL 和 20 μL 的各菌株菌液 ($\text{OD}_{600}=0.3$ ，約 10^8 CFU/mL) 以針筒注入菸草 W38 和 *N. benthamiana* 葉片，觀察 24 小時和 72 小時後產生之過敏性反應。本實驗共重複三次，各菌株於三重複反應皆相同。22m, *RSc2322* 突變株；24m, *RSc2324_3* 突變株，25m, *RSc2325* 突變株。



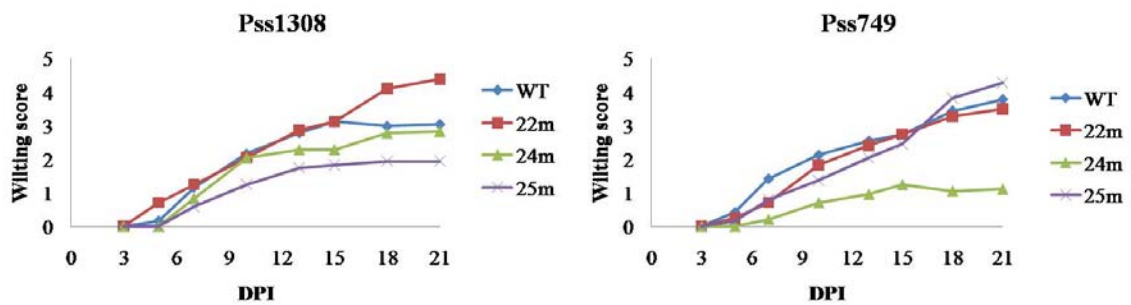
圖十六、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 背景下 *RSc2322-RSc2325* 單一基因突變株與野生型菌株對於逆境之反應測試。

(A) 將原本為 10^8 CFU/mL 菌液十倍系列稀釋後，取 $10 \mu\text{L}$ 稀釋 $10^3 \sim 10^5$ 倍之菌液滴於添加 0.5 mM CuSO_4 或 4 mM ZnSO_4 的 TTC 固體培養基中，並且以為添加藥劑之 TTC 固體培養基為對照組， 28°C 中黑暗培養 2~4 天。共二重複，菌株於二次重複有相同之趨勢。(B) 將 $\text{OD}_{600}=0.3$ 之各菌株菌液加入 2 mL 含 0.5 mM ZnSO_4 的 CPG 液體培養基培養 16 小時，以沒有添加藥劑做為對照組，細菌生長的抑制情形以 Relative growth 表示，以藥劑處理後之生長扣除對照組之生長。本實驗重複兩次，取平均值。22m, *RSc2322* 突變株；24m, *RSc2324_3* 突變株，25m, *RSc2325* 突變株。

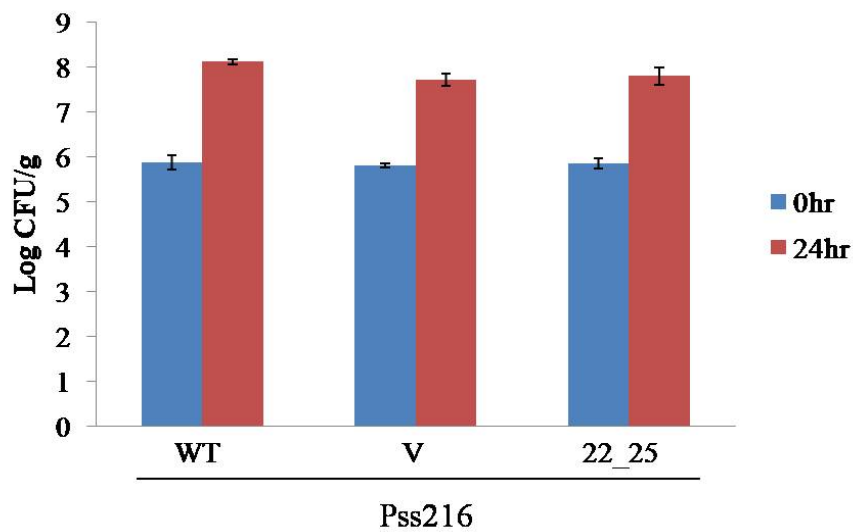
(A)



(B)

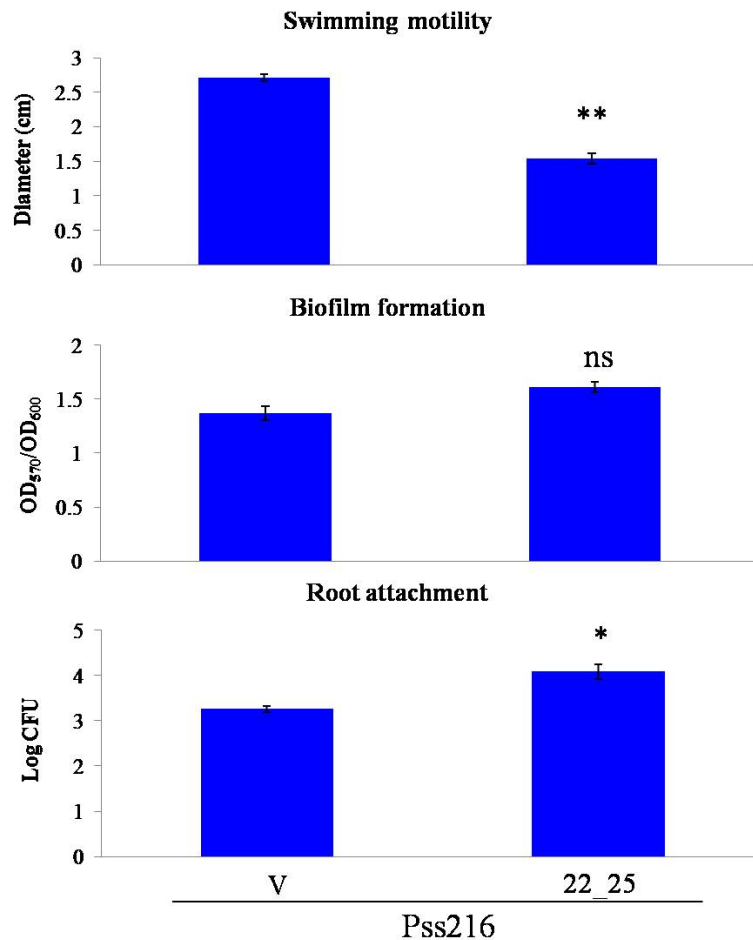


圖十七、在高毒力 Pss1308 和 Pss749 背景下 *RSc2322-RSc2325* 單一基因突變株與野生型菌株於抗病品系番茄 Hawaii 7996 之毒力測試。將 $OD_{600}=0.3$ (約 108 CFU/mL) 之各菌株菌液直接澆灌於種植番茄植株的土中，每顆植物澆灌 20 mL，分別紀錄植物於接種菌株 7、14、21 天後之萎凋率(A)及 21 天內萎凋指數變化(B)。本試驗共三重複，每重複 6~12 植物，植物總數共 24 株。DPI (Day post inoculation)，指接菌後天數；Wilting %，萎凋植物的百分比；Wilting score，萎凋指數(參見材料與方法)。以 ANOVA Fisher's LSD test 將各菌株接菌後 7、14、21 天之萎凋率以三次重複之數值分群($P < 0.5$)。22m，*RSc2322* 突變株；24m，*RSc2324_3* 突變株，25m，*RSc2325* 突變株。



圖十八、表現 *RSc2322-RSc2325* 基因群之低毒力菌株 Pss216 與空載體(empty vector) 轉型株於 *N. benthamiana* 之生長情形。

將濃度為 10^8 CFU/mL 的青枯病菌突變株與野生型菌株注入 *N. benthamiana* 葉肉組織，0 和 24 小時後取其葉片(leaf disc)測植物體內青枯病菌含量。本實驗共兩重複，將菌量以 Log (CFU/g)表示，取平均值並計算標準差。WT，野生型菌株；V，pUFR047 載體轉型菌株；22_25，*RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株。



圖十九、表現 *RSc2322-RSc2325* 之低毒力 Pss216 菌株與空載體(empty vector)轉型株在生物膜形成、番茄根部附著能力和泳動能力測定。

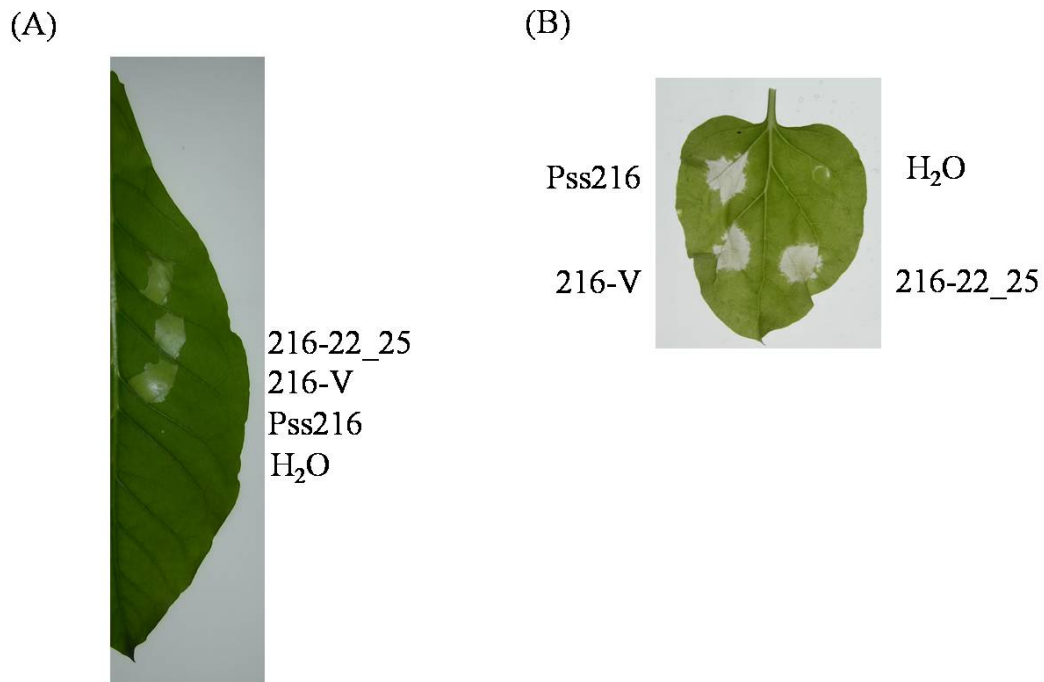
(A)泳動力測定：利用 0.3 % agar 培養基培養細菌 2 天，測量菌落直徑。

(B)生物膜形成測試：利用 96 孔盤 28°C 黑暗中靜置培養細菌，以結晶紫染生物膜後，測定 OD₅₇₀。縱軸數值以生物膜之 OD₅₇₀ 讀值除 OD₆₀₀ 扣除生長之差異

(C)番茄根部附著力分析：將 L390 番茄幼根浸泡於 10⁶ CFU/mL 青枯病菌液中 4 小時，測量幼根表面附著的菌量，並以指數(Log₁₀)表示。

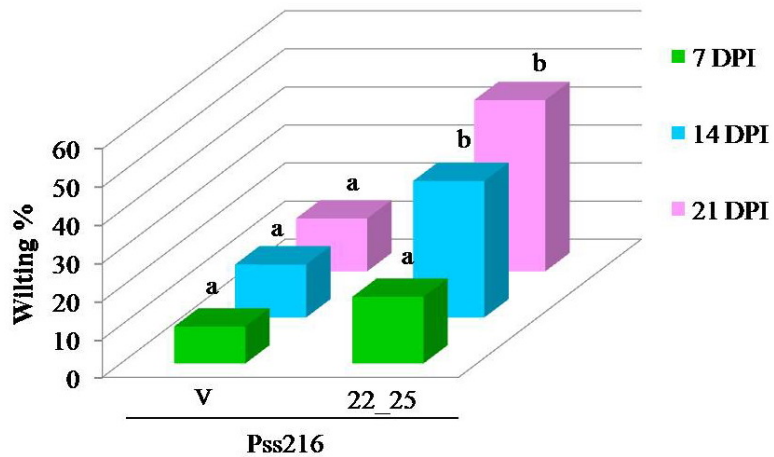
以上實驗皆三次以上重複，平均後取其標準差，並以 Student's *t*-test 分析表現

RSc2322-RSc2325 之低毒力 Pss216 菌株與空載體轉型株是否有顯著差異，*為顯著差異(P<0.05)，**為高度顯著差異(P<0.01)，ns 為沒有顯著差異。V，pUFR047 載體轉型菌株；22_25，*RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株。



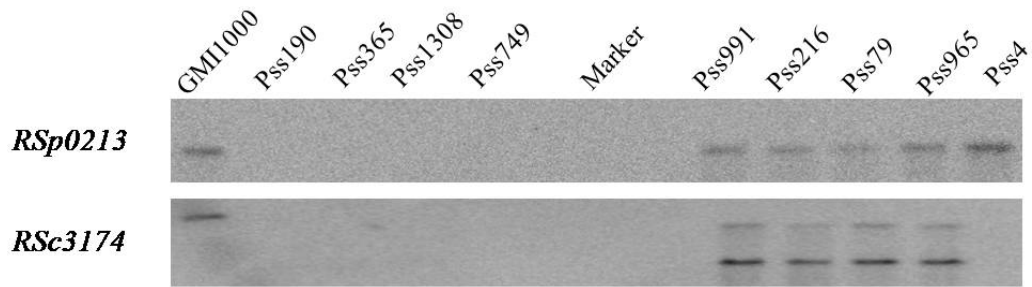
圖二十、表現 *RSc2322-RSc2325* 之低毒力 Pss216 菌株與空載體(empty vector)轉型株在菸草 W38 (A)和 *N. benthamiana* (B)上誘導之過敏性反應。

分別將 50 μL 和 20 μL 的各菌株菌液($\text{OD}_{600}=0.3$ ，約 10^8 CFU/mL)以針筒注入菸草 W38 和 *N. benthamiana* 葉片，觀察 24 小時和 72 小時後產生之過敏性反應。本實驗共重複三次，各菌株於三重複反應皆相同。V，pUFR047 載體轉型菌株；22_25，*RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株。

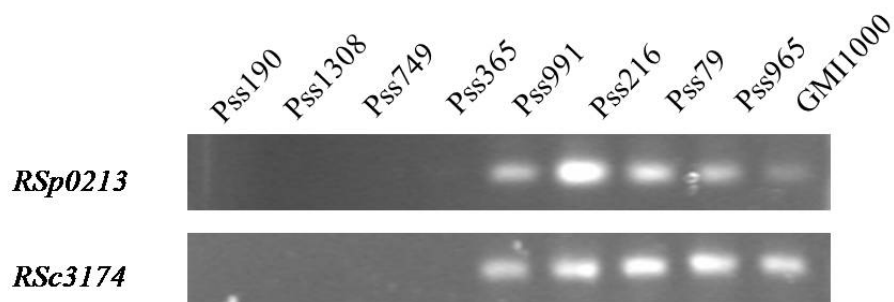


圖二十一、表現 *RSc2322-RSc2325* 之低毒力 Pss216 菌株與空載體(empty vector)轉型株在於感病品系番茄 L390 之毒力測試。將 $OD_{600}=0.3$ (約 108 CFU/mL) 之各菌株菌液直接澆灌於種植番茄植株的土中，每顆植物澆灌 20 mL，分別紀錄植物於接種菌株 7、14、21 天後之萎凋率。本試驗共兩重複，每重複 10~12 植物，植物總數共 22 株。DPI (Day post inoculation)，指接菌後天數；Wilting %，萎凋植物的百分比。以 ANOVA Fisher's LSD test 將兩次重複中各菌株接菌後 7、14、21 天之萎凋率數值加以分群($P<0.05$)。V，pUFR047 轉型菌株；22_25，*RSc2322-RSc2325* 基因轉移表現株。

(A)



(B)

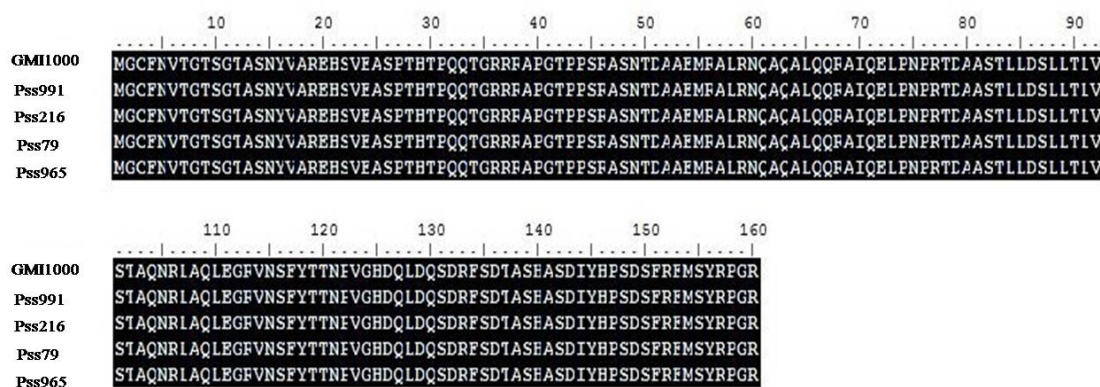


圖二十二、*RSp0213* 和 *RSc3174* 基因存在之驗證。

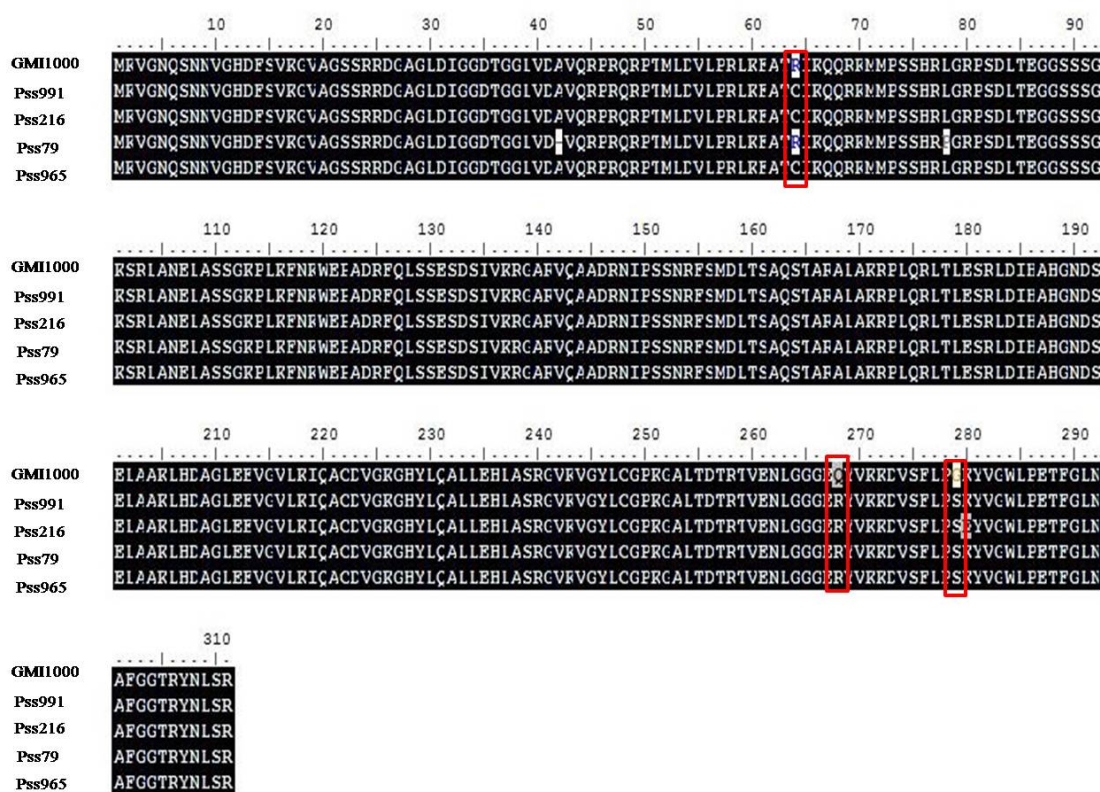
(A) 南方轉漬雜合反應(Southern blotting)：以 *SalI* 限制酵素水解各菌株染色體 DNA，以 0.7% 瓊脂凝膠電泳(30 V/200 min)後轉至尼龍膜(nitrocellulose membrane)，利用基因全長之探針雜合後，再以 2X SSC 浸洗尼龍膜，最後以免疫探知作用顯影。

(B) DNA 聚合酶連鎖反應(genomic PCR)：以各菌株染色體 DNA 做為模版，利用基因全長引子進行聚合酶連鎖反應增幅基因全長片段，共 30 循環(cycle)。

(A) RSp0213 a.a. alignment

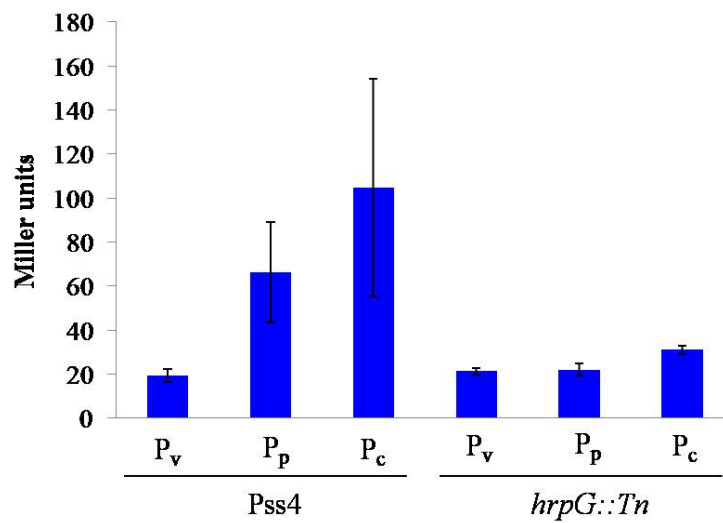


(B) RSc3174 a.a. alignment



圖二十三、低毒力菌株與代表性菌株 GMI1000 之第三型分泌蛋白 RSp0213(A)及 RSc3174(B)胺基酸序列比對。

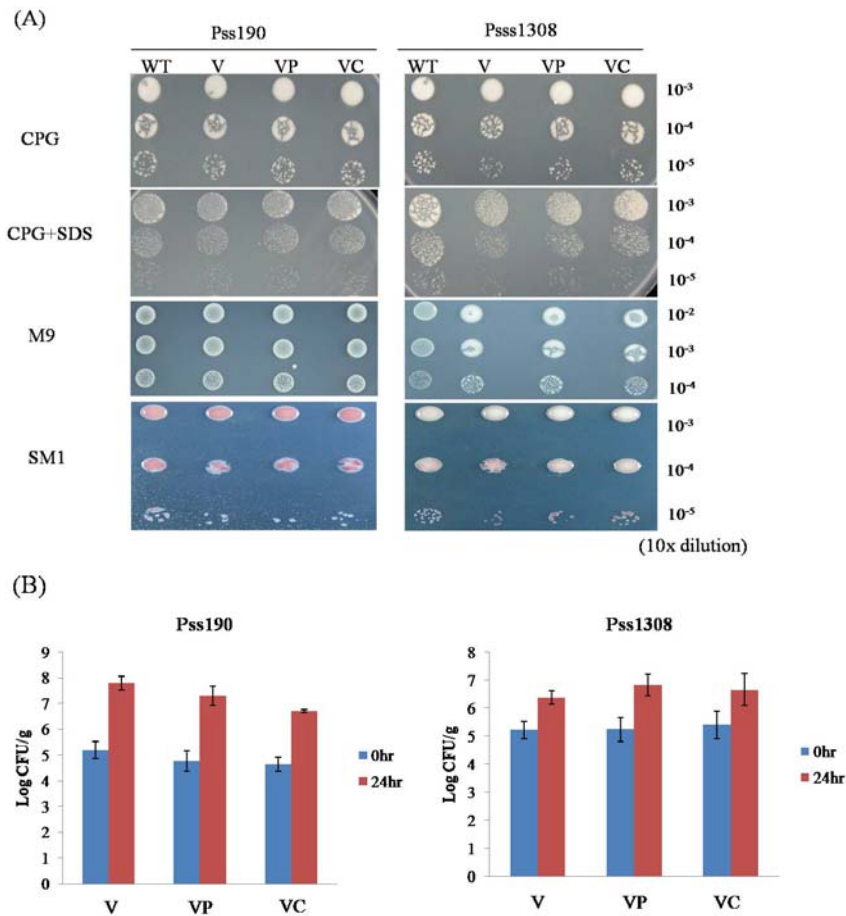
以低毒力菌株 Pss991、Pss216、Pss79、Pss965 之胺基酸序列與 GMI1000 比對，圖中黑色區域表示相同的胺基酸，灰色區域表示胺基酸型質相似，紅色框標示為與 GMI1000 不同的胺基酸。



圖二十四、*RSp0213* 和 *RSc3174* 啟動子之調控分析。

利用 β -galactosidase 分析法檢測在野生型菌株 Pss4 及第三型分泌系統缺失突變株 *hrpG::Tn* 中 *RSp0213* 與 *RSc3174* 啟動子活性。本實驗將菌培養於 MP 液體培養基，共重複三次，並利用三次數值平均並取其標準差。P_v 為 pCZ962 質體，P_p 為 *RSp0213* 啟動子，P_c 為 *RSc3174* 啟動子。

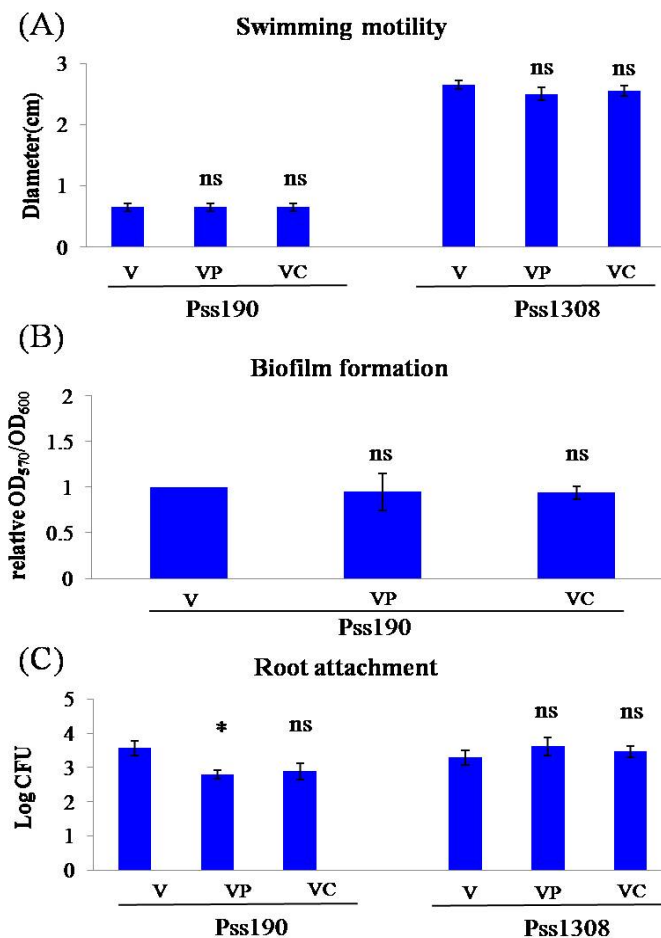




圖二十五、在高毒力 Pss190 和 Pss1308 遺傳背景下表現 *RSp0213* 和 *RSc3174* 菌株與空載體(empty vector)轉型菌株 *in vitro* 和 *in planta* 的生長情形。

(A)表現 *RSp0213* 與 *RSc3174* 之基因轉移株與空載體轉型菌株 *in vitro* 生長於不同培養基之情形。將原本為 10^8 CFU/mL 菌液十倍系列稀釋後，取 $10 \mu\text{L}$ 稀釋 $10^2 \sim 10^5$ 倍之菌液滴於 CPG、CPG+SDS、M9 和 SM1 固體培養基上， 28°C 下黑暗培養 2~4 天。本實驗共三重複，各菌株在三次重複趨勢相同。WT，野生型菌株；V，pUFR047 載體轉型株；VP，轉移表現 *RSp0213*；VC，轉移表現 *RSc3174*。

(B)將濃度為 10^8 CFU/mL 的青枯病菌 *RSp0213* 和 *RSc3174* 基因轉移表現株與空載體轉型菌株注入 *N. benthamiana* 葉肉組織，0 和 24 小時後取其葉片(leaf disc)測植物體內青枯病菌含量。本實驗共三重複，將菌量以 Log (CFU/g)表示，取三次平均值並計算標準差。V，pUFR047 載體轉型株；VP，轉移表現 *RSp0213*；VC，轉移表現 *RSc3174*。



圖二十六、在高毒力 Pss190 和 Pss1308 遺傳背景下表現 *RSp0213* 和 *RSc3174* 菌株與空載體(empty vector)轉型菌株在生物膜形成能力、附著於番茄根部能力及泳動能力之分析。

(A)泳動力測定：利用 0.3 % agar 培養基培養細菌 2 天，測量菌落直徑。

(B)生物膜形成測試：利用 96 孔盤 28°C 黑暗中靜置培養細菌，以結晶紫染生物膜後，測定 OD₅₇₀。縱軸數值以生物膜之 OD₅₇₀ 讀值除 OD₆₀₀ 扣除生長之差異。

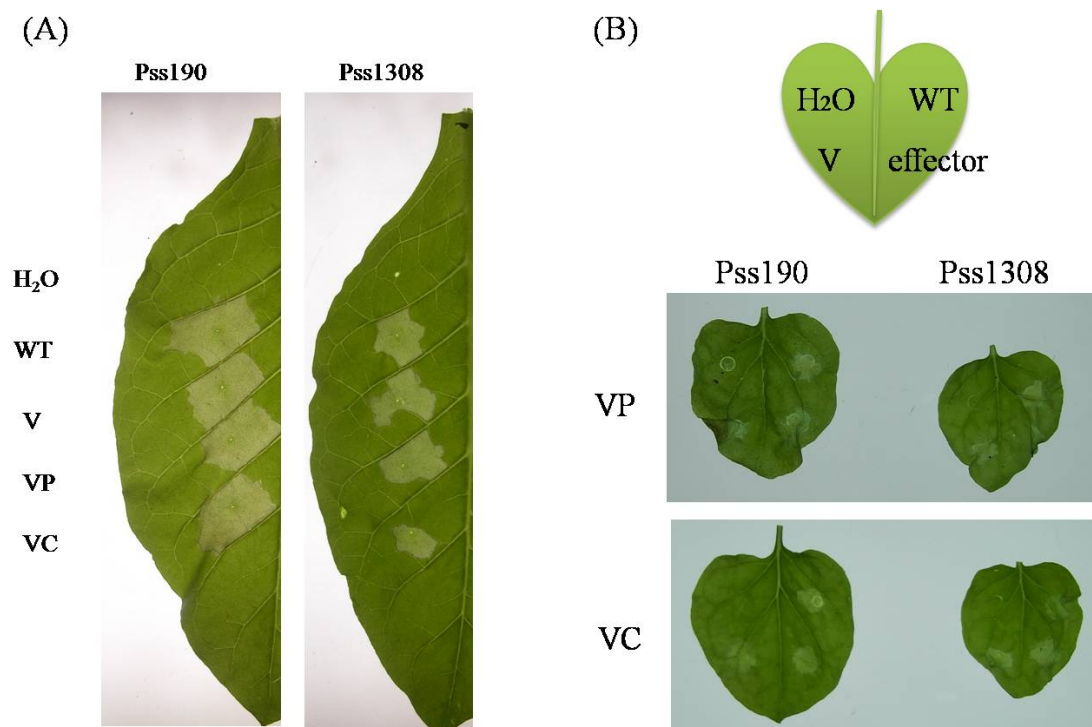
(C)番茄根部附著力分析：將 L390 番茄幼根浸泡於 10⁶ CFU/mL 青枯病菌液中 4 小時，測量幼根表面附著的菌量，並以指數(Log₁₀)表示。

以上實驗皆三次以上重複，平均後取其標準差，並以 Student's *t*-test 分析表現

RSp0213 和 *RSc3174* 之菌株與空載體轉型株是否有顯著差異，*為顯著差異

(*P*<0.05)，ns 為無顯著差異。V，pUFR047 載體轉型株；VP，轉移表現 *RSp0213*；

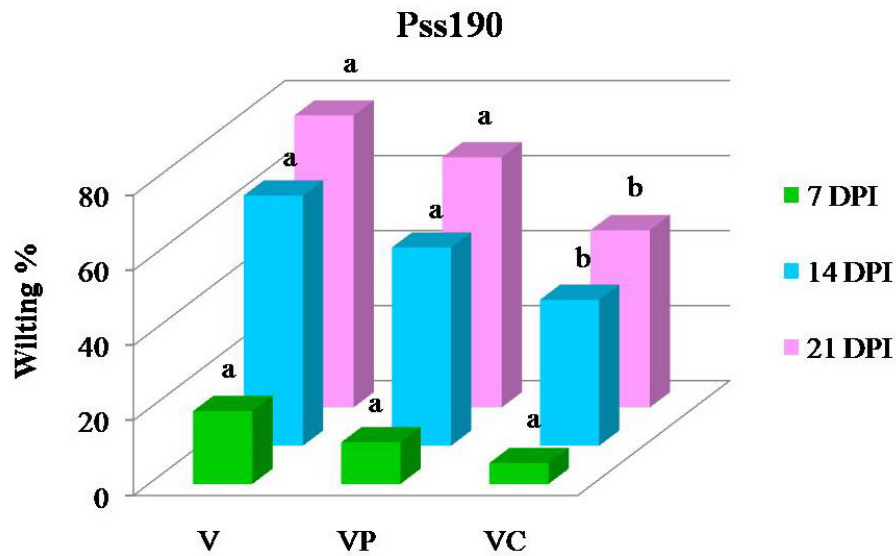
VC，轉移表現 *RSc3174*。



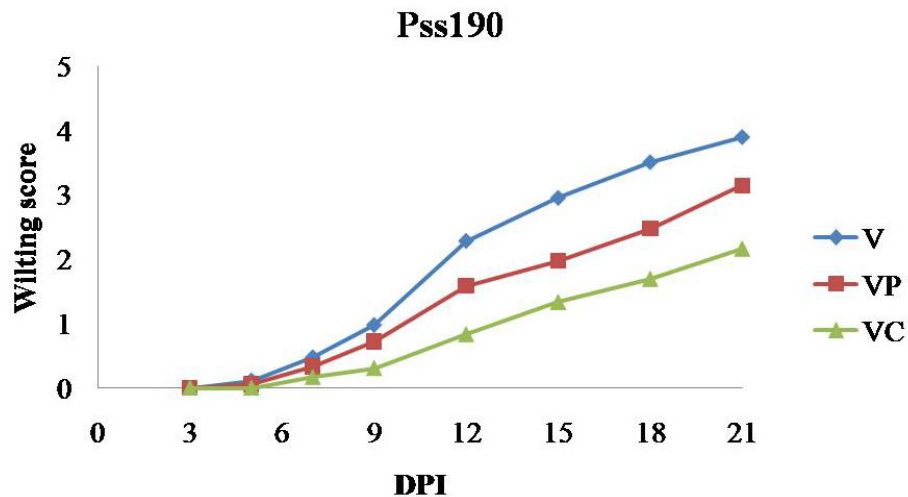
圖二十七、在高毒力 Pss190 和 Pss1308 遺傳背景下表現 *RSp0213* 和 *RSc3174* 菌株與空載體(empty vector)轉型菌株誘導過敏性反應測試。

分別將 50 μL 和 20 μL 的各菌株菌液($\text{OD}_{600}=0.3$, 約 10^8 CFU/mL)以針筒注入菸草 W38 和 *N. benthamiana* 葉片, 觀察 24 小時和 72 小時後產生之過敏性反應。本實驗共重複三次, 各菌株於三重複反應皆相同。WT, 野生型菌株; V, pUFR047 載體轉型株; VP, 轉移表現 *RSp0213*; VC, 轉移表現 *RSc3174*。

(A)



(B)



圖二十八、在高毒力 Pss190 遺傳背景下表現 *RSp0213* 和 *RSc3174* 菌株與空載體 (empty vector) 轉型菌株於抗病品系番茄 Hawaii 7996 之毒力測試。

將 $OD_{600}=0.3$ (約 108 CFU/mL) 之各菌株菌液直接澆灌於種植番茄植株的土中，每顆植物澆灌 20 mL，分別紀錄植物於接種菌株 7、14、21 天後之萎凋率(A)及 21 天內萎凋指數變化(B)。本試驗共三重複，每重複 6~12 植物，植物總數共 24 株。DPI (Day post inoculation)，指接菌後天數；Wilting %，萎凋植物的百分比；Wilting score，萎凋指數(參見材料與方法)。以 ANOVA Fisher's LSD test 將三次重複中各菌株接菌後 7、14、21 天之萎凋率數值加以分群($P<0.05$)。V，pUFR047 載體轉型株；VP，轉移表現 *RSp0213* 菌株；VC，轉移表現 *RSc3174* 菌株。

附錄一、本研究所使用培養基及藥劑配方

● 培養基

CPG medium (Denny and Hayward, 2001)

Component	per Liter
Peptone	10 g
Casein hydrolysate	1 g
Glucose	5 g
Agar	15 g

TTC medium (Denny and Hayward, 2001)

Component	per Liter
CPG medium	
5 % TTC	1 mL

523 medium (Kado and Heskett, 1970)

Component	per Liter
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Yeast extract	4 g
Casein hydrolysate	8 g
Sucrose	10 g
Additional 15g agar for agar medium	

SM1 medium (Tsai et al., 1985)

Component	per Liter
TTC medium	1 L
5 % Polymyxin B	2 mL
1 % Tyrothricin	2 mL
0.5 % Chloramphenicol	1 mL
1 % Cycloheximide	0.5 mL
1 % Crystal violet	0.5 mL
Agar	15 g

M9 medium (Sambrook et al., 1989)

5X M9 salt	
Component	per Liter
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	42.63 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5 g
→ Autoclave	
M9 medium	
Component	per Liter
5X M9 salt	200 mL
1 M MgSO ₄	2 mL
1 M CaCl ₂	0.1 mL
40 % Glucose	10 mL
H ₂ O	787.9 mL
Additional 15g agar for agar medium	

MP medium (Boucher *et al.*, 1985)

2X MP salt	
Component	per Liter
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	6.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 mg
→ Adjust pH to 7.0 with KOH	
→ Autoclave	
MP medium	
Component	per 100 mL
2X MP salt	50 mL
40 % Glucose	0.5 mL
H ₂ O	49.5 mL

BG medium (Boucher *et al.*, 1985)

Component	per Liter
Peptone	10 g
Yeast extract	1 g
Casein hydrolysate	1 g
Glucose	5 g

Motility agar medium (Liu et al., 2005)

Motility agar medium	
Component	per 100 mL
Tryptone	1 g
Agar	0.3 g

Exoenzyme assay medium (Liu et al., 2005)

Basal medium (BM) for exoenzyme assay (Clough et al., 1994)	
Component	per Liter
K ₂ HPO ₄	1.75 g
KH ₂ PO ₄	0.75 g
Sodium citrate	0.15 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.25 g
Yeast extract	1 g
50 % glycerol	10 mL

Egl medium	
Component	per 100 mL
BM	100 mL
1 M MgSO ₄	0.1 mL
1 M CaCl ₂	0.1 mL
Carboxymethylcellulose	0.5 g
Agar	1.6 g

Pme medium	
Component	per 100 mL
BM	100 mL
1 M MgSO ₄	0.1 mL
1 M CaCl ₂	0.1 mL
Pectin	0.48 g
Agar	1.6 g

Peh medium	
Component	per 100 mL
BM	100 mL
Sodium polygalacturonate	0.5 g
Agar	1.6 g
Adjust pH to 7.0	

LB Medium (Sambrook et al., 1989)

LB medium	
Component	per Liter
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
→ Adjust pH to 7.0	
Additional 15 g agar for agar medium	

SOC medium (Sambrook et al., 1989)

SOC Medium	
Component	per Liter
Tryptone	20 g
Yeast extract	5 g
NaCl	0.5 g
250 mM KCl	10 mL
→ Add H ₂ O to 900 mL, adjust pH to 7.0, and add water to 990 mL	
→ Autoclave	
1 M MgCl ₂	10 mL
1 M Glucose	20 mL

● 化學藥劑

β-galactosidase activity

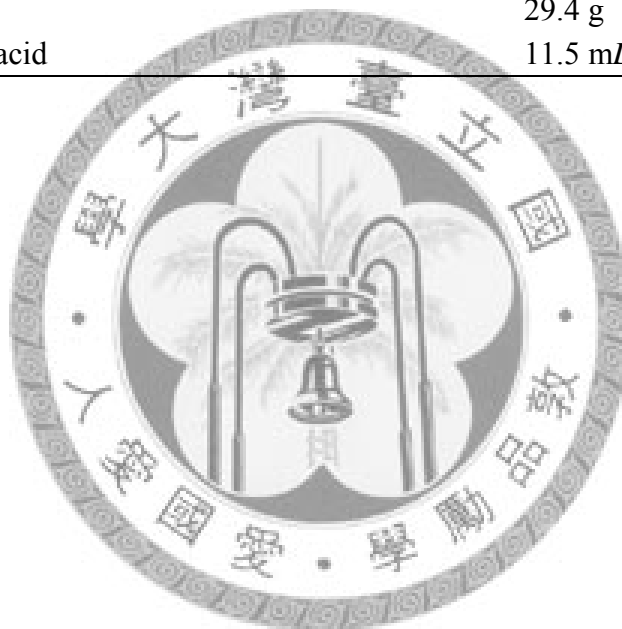
Z buffer (Miller, 1972)	
Components	per Liter
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	16.1 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5.5 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246 g
β-mercaptoethanol	2.7 mL

Genomic DNA extraction

Lysis buffer	
Components	per 100 mL
50 X TAE	2 mL
3 M NaOAc	0.67 mL
20 % SDS	5 mL

Alkaline lysis (Sambrook et al., 1989)

Solution I	
Components	per 100 mL
50 mM Glucose	2.27 mL
10 mM EDTA	2 mL
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 mL
Solution II	
Components	per 100 mL
10 N NaOH	2.0 mL
20 % SDS	5.0 mL
Freshly prepared	
Solution III	
Components	per 100 mL
KOAc	29.4 g
Glacial acetic acid	11.5 mL



附錄二、本研究中所使用之引子

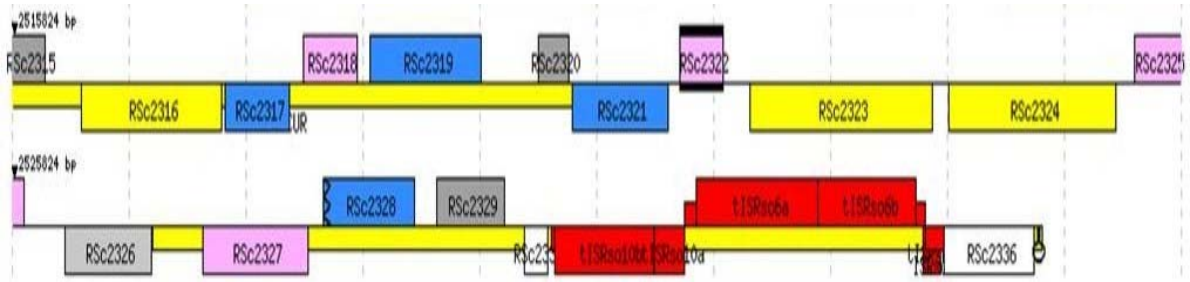
Primer	Sequence ^a (5'-3')
Check of construct	
M13-R (for pUFR047)	CAGGAAACAGCTATGAC
M13-F	GTAAAACGACGGCCA
M13-R	AACAGCTATGACCATG
22m_ck	CTTTGCGCCAACGACATCAA
24m_ck	GATCAACTTCGCCAGCAACT
25m_ck	AATGTCGCAATGCCCCACA
LacZ-R-PCR	AAGGGGGATGTGCTGCAAGG
Generation of plasmid insertional mutants	
PRSc2322-F	GGAAGCTTCAGCAGAAGATGCGTCAACT
PRSc2322-R	GGTCTAGACGTATTTGTGGCGTGAGGTT
PRSc2324-F	GGTCTAGAGAAACAGATCGAGCCAGGA
PRSc2324-R	GGAAGCTTGTCCATCTTCAGGATTGGG
PRSc2325-F	GGAAGCTTAGTACCTGCATGATCGGTG
PRSc2325-R	GGTCTAGAGCATTGAGCTGACATCGAG
Probe of Southern blotting and Generation of gene-transferred strains	
RSc2322-F	GGGGATCCGGCAACGGTCAAGCCCTAA
RSc2322-R	GGCTGCAGTTGTCGCGTGCACCAACAG
RSc2323-F	GGGGATCCACATCGCAGTCAGAGACGA
RSc2323-R	GGGAATTC ^c CAGACACCCTTCTCAACA
RSc2324-F	GGGGATCCTGCAGCGTTGTTCTCTGTG
RSc2324-R	GGGAATTC ^c CCCGCTCTATTGGGTAT
RSc2325-F	GGGGATCCTAACTGCTACTGGAGGAAGG
RSc2325-R	GGGTCGACCTTGAGCAATGCATTCTCGG
RSc2322_25-F	GGGAATTC ^c GGCAACGGTCAAGCCCTAA
RSc2322_25-R	GGGGATCCCTTGAGCAATGCATTCTCGG
RSp0213-F	GGCTGCAGTTTTGGGACTGACGCTCAGT

RSp0213-R	<u>GGGTCGACACTCCAATGCACGCAAGAGA</u>
RSc3174-F	<u>GGGTCGACCACATGGGATACGGAGACAT</u>
RSc3174-R	<u>GGGGATCCAAAAC TTTCGCCGTTGCCGA</u>
Construct for promoter activity assay	
RSc2322Pro-F	<u>GGAAGCTTCCATGCAGTTCACCAGCACT</u>
RSc2322Pro-R	<u>GGTCTAGAGATGCGCATGTTGCCTGTAC</u>
RSc2323Pro-F	<u>GGTCTAGATGCATGGTTGTTTCACTCGG</u>
RSc2323Pro-R	<u>GGAAGCTTTGGATGACCACGCTGATCAT</u>
RSc2324Pro-F	<u>GGTCTAGATGAACTCATCTTGGGCTCC</u>
RSc2324Pro-R	<u>GGAAGCTTGCGTCCATCTTCAGGATTG</u>
RSc2325Pro-F	<u>GGAAGCTTCAGCAGTACCTGCATGATC</u>
RSc2325Pro-R	<u>GGTCTAGATTCTCCCTTCCTCCAGTAG</u>
RSp0213Pro-F	<u>GGTCTAGACACTGGTGCCAGTGACATTA</u>
RSp0213Pro-R	<u>GGAAGCTTTGGTCTTGCTGTTCCACTTC</u>
RSc3174Pro-F	<u>GGTCTAGATTGGTTGCCGACTTTCATGG</u>
RSc3174Pro-R	<u>GGAAGCTTCTACCGCTACGTGTTATCAG</u>

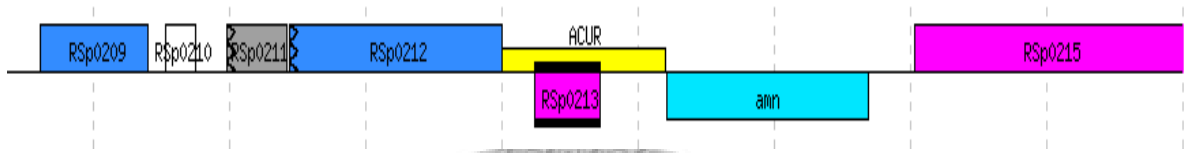
^a 下底線標示為限制酵素辨認序列



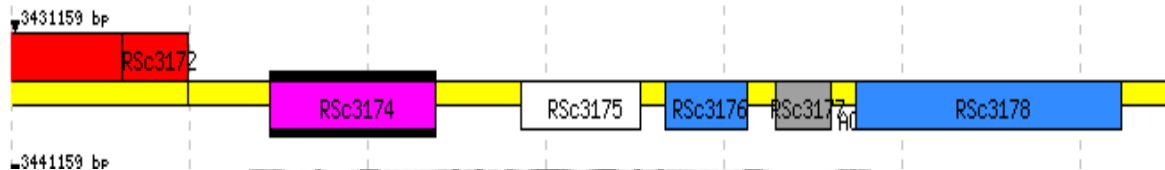
RSc2322-RSc2325 cluster



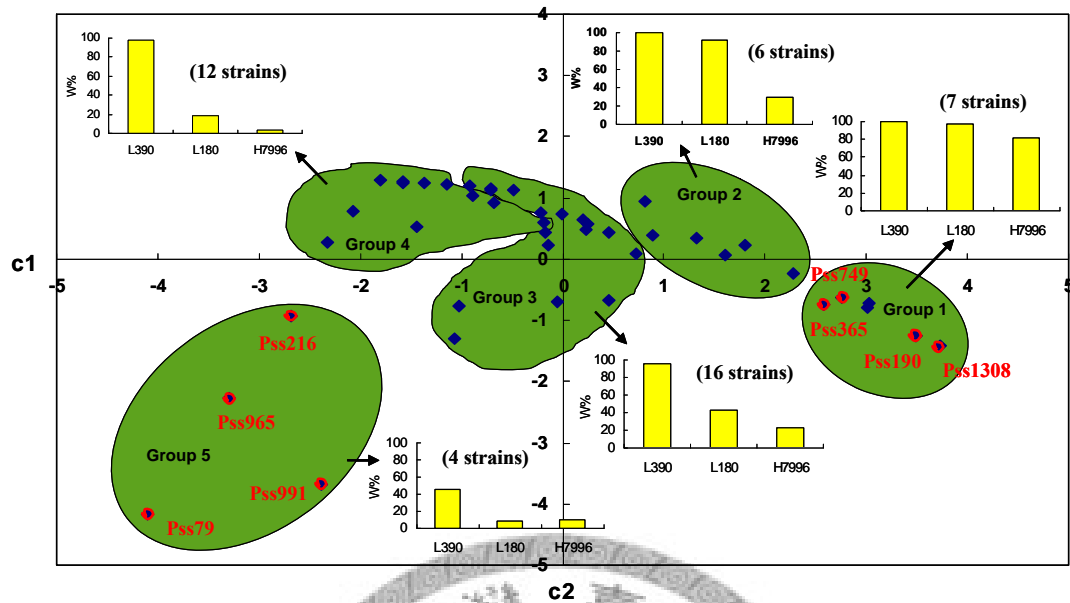
RSp0213



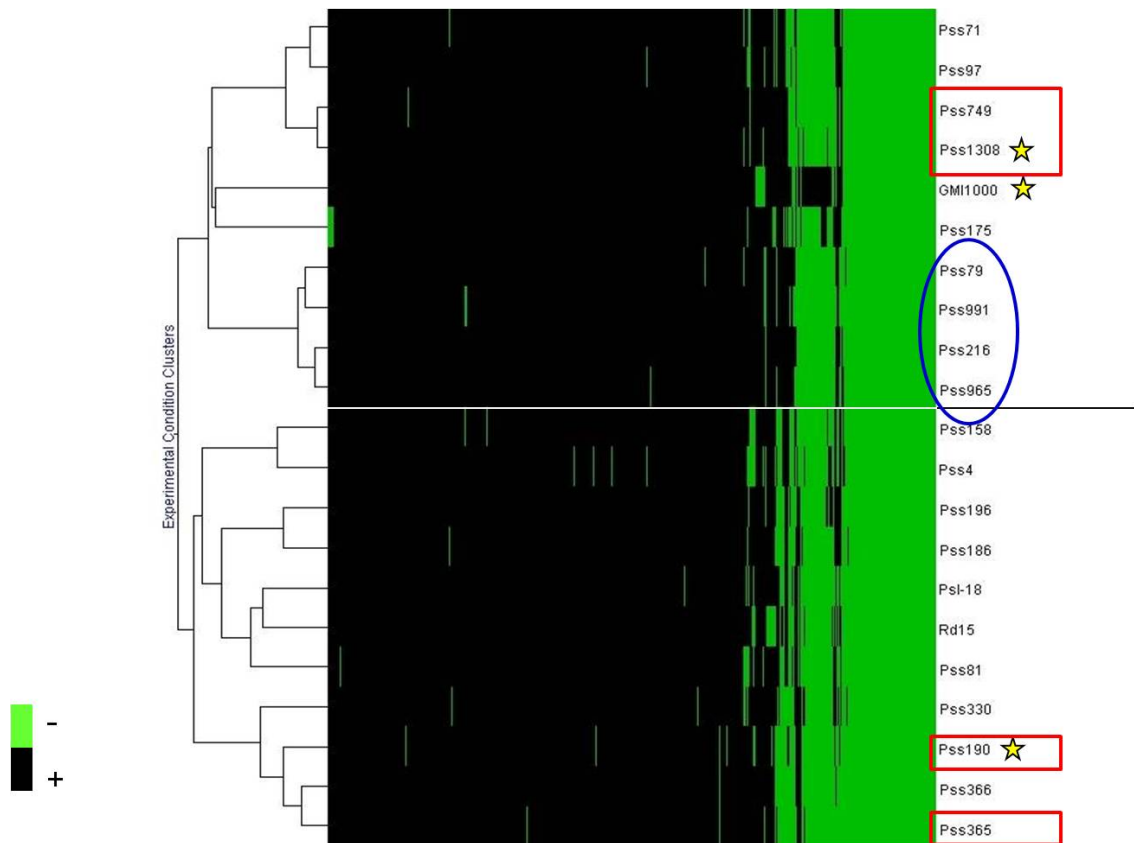
RSc3174



附錄三、*RSc2322-RSc2325* cluster、*RSp0213* 及 *RSc3174* 於 GMI1000 的基因體中之相對位置及轉錄方向。



附錄四、台灣本土 *R. solanacearum* 分離株的毒力分群(王肇芬博士實驗室提供，尚未發表)。利用菌株在抗病品系 Hawaii 7996、中等抗病品系 L180 和感病品系 L3900 番茄上造成之萎凋率做為依據將毒力分為不同群。本研究所使用之高毒力菌株為 Group 1 的 Pss190、Pss365、Pss1308 和 Pss749，低毒力菌株則是 Group 5 的 Pss991、Pss216、Pss79 和 Pss965。



附錄五、Phylotype I 菌株分群(王肇芬博士實驗室提供，尚未發表)。

利用微陣列晶片雜合分析結果 Phylotype I 菌株可分為不同的群組。本研究中所使用之菌株廣泛的可分為兩個群組，Pss190 和 Pss365 為一群組，其餘菌株為一群組。

Gene ID	High-virulence				Low-virulence			
	190	1308	749	365	991	965	216	79
100% present in high; 100% absent in low								
RSc0959	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc1356	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc1701	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc1707	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc2161	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc2322	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc2323	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc2324	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc2325	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc3419	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc3425	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc3427	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc3428	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc3429	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc3431	1	1	1	1	0	0	0	0
RSc3434	1	1	1	1	0	0	0	0
RSp1071	1	1	1	1	0	0	0	0
SF10	1	1	1	1	0	0	0	0
SF116	1	1	1	1	0	0	0	0
SF1430	1	1	1	1	0	0	0	0
SF1432	1	1	1	1	0	0	0	0
SF124	1	1	1	1	0	0	0	2
SF132	1	1	1	1	2	2	0	2

附錄六、高毒力菌株特有之基因(王肇芬博士實驗室提供，尚未發表)。
 微陣列晶片分析結果顯示許多基因獨特存在於高毒力菌株。1，存在；0，不存在；
 2，無法判讀。本研究目標基因 *RSc2322-RSc2325* 基因群獨特存在於高毒力菌株。

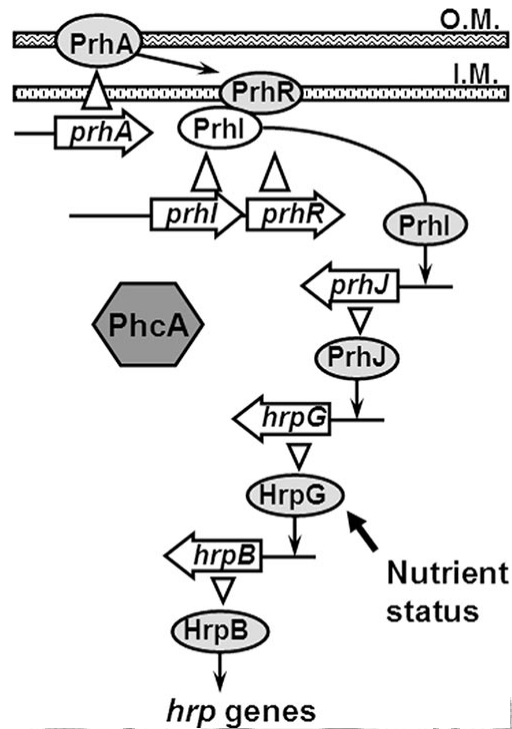
Gene ID	High-virulence				Low-virulence			
	199	1308	749	365	991	965	216	79
100% absent in high; 100% present in low								
IPO1609_0044	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0253	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0436	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0443	0	0	0	0	1	1	1	1
IPO1609_0518	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0166	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0199	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0200	0	0	0	0	1	1	1	1
Molk_0201	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc0840	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1841	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1902	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1912	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1913	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1928	0	0	0	0	1	1	2	1
RSc1932	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc1943	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc2706	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc2707	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc2708	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174A	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174B	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3174C	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3175	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3176	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3178	0	0	0	0	1	1	1	1
RSc3187	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0090	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0195	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0213A	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0213B	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0478	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp0877B	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1089	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1299	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1303	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1333	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1544	0	0	0	0	1	1	1	1
RSp1545	0	0	0	0	1	1	1	1
SF119	0	0	0	0	1	1	1	1
SF122	2	0	0	0	1	1	1	1
SF109	0	2	0	2	1	1	1	1

附錄七、低毒力菌株特有之基因(王肇芬博士實驗室提供，尚未發表)。
 微陣列晶片分析結果顯示許多基因獨特存在於低毒力菌株。1，存在；0，不存在；
 2，無法判讀。本研究目標基因 *RSp0213* 和 *RSc3174* 皆獨特存在於低毒力菌株。

	High-virulence				Low-virulence			
	Pss190	Pss1308	Pss749	Pss365	Pss991	Pss965	Pss216	Pss79
75% present in high; 100% absent in low								
RSc0106	1	0	1	1	0	0	0	0
RSc0640	1	0	1	1	0	0	0	0
RSc1419	0	1	1	1	0	0	0	0
RSc1706	1	1	0	1	0	0	0	0
RSc3426	0	1	1	1	0	0	0	0
RSp0040	0	1	1	1	0	0	0	0

附錄八、高毒力特有基因存在的差異性(王肇芬博士實驗室提供，尚未發表)。
 微陣列晶片分析結果顯示許多基因在高毒力菌株間的存在有差異性。1，存在；0，不存在。





附錄九、*R. solanacearum* 接收到植物訊號後第三型蛋白分泌系統 *hrp* 基因之調控 (Yoshimochi *et al.*, 2009)

R. solanacearum 透過外膜上的 PrhA 感受到植物訊號後，將訊號傳給內膜上的 PrhR，當 PrhR 接受到訊號後，PrhI 自 PrhR 被釋放到細胞質中，PrhI 為 sigma factor，會促使 RNA 聚合酶轉錄 *prhJ*，PrhI 會進一步活化 *hrpG* 轉錄，HrpG 再誘導 HrpB 表現，由 HrpB 調控下游基因之轉錄。致病網絡中重要的轉錄因子 PhcA 則會透過抑制 PrhIR 的訊息傳遞而抑制 *hrp* 基因的活化。