

# 利用綠螢光標定 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 偵測水稻感病過程

林大鈞<sup>1,\*</sup> 林玉鈴<sup>2</sup> 陳純葳<sup>3</sup> 賴慧真<sup>2</sup> 王怡雯<sup>4</sup> 周思儀<sup>5</sup> 王強生<sup>6,\*</sup>

## 摘要

林大鈞、林玉鈴、陳純葳、賴慧真、王怡雯、周思儀、王強生。2015。利用綠螢光標定 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 偵測水稻感病過程。台灣農業研究 64(1):10–20。

為能即時觀察白葉枯病菌於剪葉接種後感染水稻的完整過程，本研究利用新型強效的 *ZsGFP* 基因及 pBBR1MCS 載體，構築可於白葉枯病原菌 *Xanthomonas* 中表現綠色螢光之重組質體 pBRRZsGFP。接著，轉型至 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  及 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b。經基因型確認之轉型菌株 (DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> 及 XF89b<sub>ZsGFP</sub>) 菌落，皆可持續地表現綠螢光蛋白質。進一步於最高分蘗期接種水稻「台農 67 號」(感病品種) 植株，結果發現因葉綠素螢光的干擾，在接種 3 d 後 (3 DAI)，勉強可在切口處觀察到 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的增殖；直至 7 DAI，方能觀察 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 自葉尖沿著葉脈向葉基入侵。為了降低葉綠素螢光的干擾，本研究改用「台農 67 號」暗培養之白化苗作為接種宿主，結果發現在感染 0.5 h，即可發現 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的增殖與入侵。在接種後 1 h，接種葉的螢光達到最大的表現。但可能隨水稻宿主啟動免疫系統，壓制入侵 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的繁殖，使接種葉的螢光表現轉弱。然而，至 7 DAI 接種葉的螢光表現轉強，並持續向病葉基部發展，顯示 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 可能突破水稻的免疫系統，沿著維管束繼續侵入、繁殖，向葉片基部蔓延感染。這是目前已知最早觀測到白葉枯病菌感染水稻植株的研究報告。同時，此系統為非破壞性取樣，可連續在同一病葉觀察病原菌於接種後之侵入、增生及病勢的發展。因此，本研究所建構之 XF89b<sub>ZsGFP</sub>，確實可作為即時檢測接種後病菌感染能力及感染過程的平台，亦能作為未來白葉枯病菌與水稻宿主間交互作用的檢測平台。

**關鍵詞：**白葉枯病菌、兔海葵綠螢光基因、*Xanthomonas* 螢光表現系統、病勢調查、病原菌-宿主間交互作用。

## 前言

水稻白葉枯病 (rice bacterial blight disease; RBBD) 是水稻的嚴重病害之一，主要是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 所引起，嚴重時可造成水稻的減產達 50% (Gnanamanickam *et al.* 1999)。此病害是一種系統性的疾病，主要危害水稻的葉片及葉鞘，甚至感染水稻的穗部，造成罹病株不充實粒的增加而減

產。*X. oryzae* pv. *oryzae* 為桿狀黃色的革蘭氏陰性菌，長約 0.7–2.0  $\mu\text{m}$ ，寬約 0.4–0.7  $\mu\text{m}$ 。菌體可藉單一極性鞭毛，而具游走能力 (Yoshimura & Tahara 1961)。其主要是透過植株的傷口或自然開口 (如水口；hydathodes) 感染水稻植株，病原菌在木質部增殖後進而盤據在維管束，隨著菌體的增生胞外多醣體的分泌亦隨之增加，最後造成維管束系統的阻塞，使植

投稿日期：2014 年 8 月 4 日；接受日期：2014 年 10 月 14 日。

\* 通訊作者：dagin@tari.gov.tw 及 wangchansen@nchu.edu.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>5</sup> 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。

<sup>6</sup> 國立中興大學農藝系副教授兼系主任。台灣 台中市。

株葉片白化乾枯 (Niño-Liu *et al.* 2006)。在感病初期，葉片的感染處會出現萎凋，且枯萎的區域亦會開始擴大；隨著病程的進展，在葉脈間區域會發生嚴重的壞疽 (necrosis)，接著整個罹病葉片轉成白灰色，最終死亡 (Mizukami & Wakimoto 1969; Niño-Liu *et al.* 2006)。

過去數十年，由於胞內細胞動力學 (*in vivo* cellular dynamics) 相關技術的發展，使學者對於特定生理現象探討更容易。綠螢光蛋白質 (green fluorescent protein; GFP) 自 1962 年於水母 (*Aequorea victoria*) 細胞中被發現 (Shimomura *et al.* 1962) 發展至今，已發展出許多不同形式的螢光蛋白質，如紅螢光蛋白質、黃螢光蛋白質及藍螢光蛋白質等。而以螢光蛋白質作為標誌系統 (marker system)，具有對細胞不易產生毒害及物理性破壞，且無需添加基質即可直接於活細胞 (*in vivo*) 中觀察等優點 (Tsien 1998; Errampalli *et al.* 1999)。因此，逐漸取代傳統的標誌基因  $\beta$ -葡糖苷酸酶 ( $\beta$ -glucuronidase; *GUS*) 或螢光素酶 (luciferase) 基因，已被廣泛應用在生物物理學、生物化學、植物生理學及植物病理學等方面 (Mizuno *et al.* 2001; Stewart 2001; Hillesheim & Müller 2005; Caplan *et al.* 2008)。例如，利用螢光蛋白質標定待測定的蛋白質，即可在活細胞中以目視、追蹤，甚至量化此待測定的蛋白質，並進一步探討其在細胞的生理功能 (Caplan *et al.* 2008)。另外，雙分子螢光互補分析 (bimolecular fluorescence complementation; BiFC) 分析技術，是利用不同螢光系統，標定不同的待測蛋白質，藉此在植物或動物細胞中分析標的蛋白質間的交互作用 (Bracha-Drori *et al.* 2004; Chun *et al.* 2007)。近來，螢光蛋白質已被利用在微生物的標定，藉此分析它們在宿主的感染過程，如 *Lactobacillus sakei*、*Pseudomonas syringae*、*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 及 *Xylella fastidiosa* 等 (Newman *et al.* 2003; Elibox & Umaharan 2007; Yu *et al.* 2007; Fan *et al.* 2008)。

為了研究白葉枯病菌與宿主水稻的交互關係，以了解病原菌的致病性或是水稻宿主的抗性。現行的做法是利用剪葉接種法，對分蘖盛

期的水稻，接種白葉枯病菌。並於判別品系「台中在來 1 號」(‘Taichung Native 1’; ‘TN1’) 的病斑發展至全葉面積 3/4 (或約 20 cm 長) 時，針對供試水稻品種 (系) 進行病斑的量測 (Kauffman *et al.* 1973)。然而，由於 *X. oryzae* pv. *oryzae* 之繁殖較為緩慢，通常需要接種 7 d 以上，方能觀察到病斑表現。而田間接種又經常受到當時田間的環境因素所影響，接種成功與否的判定，常需要觀察到宿主葉片出現病斑或是測定菌流方能確定。所以，一旦接種失敗，常導致錯失當期作的最佳接種時機。因此，如何能盡早確定病原菌接種成功與否，係水稻病害檢定非常重要的關鍵技術。

近年來，Matz *et al.* (1999) 自兔海葵 (*Zoanthus* sp.) 選殖出一強效的綠螢光基因 *ZsGFP*，可表現較前述的 EGFP 高 2.5 倍的螢光強度，適用在細胞標定、啟動子表現強度研究、蛋白質體研究或轉染的控制等相關試驗 (Clontech Co., USA)。因此，本研究利用 *ZsGFP* 基因，構築成 *Xanthomonas* 之綠螢光基因連續表現系統，並轉型至台灣水稻白葉枯病抗性檢定圃專用菌株 XF89b，使其能持續地表現 *ZsGFP* 綠螢光蛋白質。繼而利用此一重組 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 菌株感染「台農 67 號」水稻植株，發現於接種後即可即時觀察病原菌的感染過程。因此，本研究建立一個可於病原菌接種後立即檢測白葉枯病菌感染過程之可信且快速的方法，除了可即時提供接種成功與否的訊息外，亦可作為日後探討白葉枯病菌-水稻宿主間交互作用的分析平台。

## 材料與方法

### 試驗材料

本研究使用對白葉枯病原菌呈感病反應的水稻品種「台農 67 號」(‘TNG 67’) 為試驗材料，分別依慣行農法種植於溫室之正常植株，以及種子播種於培養基進行暗處理所得之白化苗做為接種材料。白葉枯病菌則以行政院農委會農業試驗所植病組稻作病害實驗室所保存的白葉枯病菌株 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b (採集地：台中) 作為供試菌株。而 *Escherichia*

*coli* DH5 $\alpha$  則為 DNA 重組試驗用之宿主。表現系統構築所用之載體為 pBBR1MCS，其是一種可存於大多數革蘭氏陰性菌宿主 (gentamycin 敏感菌株) 的選殖載體，如 *E. coli*、*Xanthomonas* 屬、*Acetobacter xylinum*、*Bartonella bacilliformis*、*Paracoccus denitrificans*、*Pseudomonas fluorescens*、*P. putida*、*Rhizobium meliloti*、*Salmonella typhimurium* 及 *Vibrio cholerae* 等菌株 (Kovach *et al.* 1995)。報導基因 *ZsGFP* 綠螢光基因則購自 Clontech 公司之商品 pZsGreen1 (Clontech Co.)。

### *Xanthomonas* 綠螢光表現系統之構築

依據已發表之 *ZsGFP* 基因序列 (Matz *et al.* 1999)，設計引子：GFP-F 5'-TATAGGGC-GAATTGGTGGCAGACAGGTTTCCCGA-3' 及 GFP-R 5'-GAACAAAAGCTGGTCCCGGC ATCCGCTTACAGA-3'。以 pZsGreen 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95°C 2 min 30 s 1 循環，94°C 30 s、60°C 30 s、72°C 3 min 循環 30 次，72°C 10 min 1 循環，擴殖出含啟動子及 *ZsGFP* 綠螢光基因片段，再以 In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit (Clontech Co.)，次選殖於 pBBR1MCS 的 *SacI* 及 *KpnI* 切位。根據 Cohen *et al.* (1972) 發表的方法，將反應產物轉型至 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體，即命名為 pBBRZsGFP。本研究將所獲得之重組菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBRZsGFP)，簡稱為 DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub>。接著，利用 Mini Plus<sup>™</sup> Plasmid DNA Extraction System (Viogene, Taiwan) 抽取 pBBRZsGFP 質體，供後續白葉枯病菌轉型用。

### 白葉枯病菌之轉型 (Transformation)

利用電穿孔方法進行 *X. oryzae* 轉型 (Keen *et al.* 1992)。首先，自活化的 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b，挑選單一菌落培養於 50 mL PSG 培養基 [500 g L<sup>-1</sup> 馬鈴薯、200 g L<sup>-1</sup> 蔗糖、15 g L<sup>-1</sup> peptone、5 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 及 2 g L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]，於 30°C、150 rpm 下，震盪培養至 A<sub>600</sub> 讀值達 0.6–0.8，隨即冰浴 30 min 後以 5,000 ×g、4°C、離心 5 min 收集菌體。接著，將菌體輕輕懸浮於 50 mL 預冷的 10%

甘油，再以上述離心條件沉降菌體。重複此步驟 2 次後，所得菌體即輕輕懸浮於 1 mL 預冷的 10% 甘油，並以 100  $\mu$ L 分裝於 1.5 mL 微量離心管，即為勝任細胞 (competent cell)。經液態氮急速冷凍後，保存於 -80°C 備用。

轉型時，將勝任細胞自 -80°C 中取出，加入適量的質體 DNA，置於冰上緩慢回溫後，移至預冷之電極管中 (Bio-Rad<sup>®</sup>, USA, 0.2 cm)。同時，將 Gene Pulser<sup>®</sup> II (BIO-RAD<sup>®</sup>) 的反應條件設定在 25  $\mu$ F、2.4 kV 與 200 $\Omega$ ，進行電穿孔後，將菌液轉移到 0.45 mL 的 PSG 培養基，於 30°C 下培養 1.5–2.0 h。最後把菌液均勻塗佈於含 10 mg L<sup>-1</sup> gentamycin 的 523 固態培養基 [1% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) casein hydrolysate、0.4% (w/v) yeast extract、0.2% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.03% (w/v) MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 及 1.5% (w/v) agar] (Kado & Heskett 1970)，進行篩選。經基因型分析及螢光觀察所確認的重組菌株，即為 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b (pBBRZsGFP)，以下簡稱為 XF89b<sub>ZsGFP</sub>。

### 轉型株之基因型分析

以牙籤自選擇性固態培養基上，挑取單一菌落之 *E. coli* 與 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 之轉型株，一方面接種至新鮮含 10 mg L<sup>-1</sup> gentamycin 的 LB 固態培養基 [1% (w/v) bacto trytone、0.5% (w/v) yeast extract、1% (w/v) sodium chloride 及 1.5% agar]，作為平板菌保；另一方面，將菌體置於 PCR 反應液，進行 colony PCR，確認轉型株帶有 pBBRZsGFP。PCR 所用引子為：GFP-F1 5'-GACTACGCGTATGACCATGATTACGCCAAGCT-3' 及 GFP-R1 5'-GACTGAGCTCGACTAGTAGCC TATTATTTTGT-3'。

PCR 程式設定為 95°C 4 min 30 s 1 循環，94°C 30 s、55°C 30 s、72°C 3 min 循環 30 次，72°C 10 min 1 循環，擴增出 0.8 kb *ZsGFP* 綠螢光基因片段。

### 白葉枯病菌之接種源製備、接種與病勢調查

在接種源製備方面，將 *X. oryzae* pv. *ory-*

*zae* XF89b、XF89b<sub>ZsGFP</sub> 於室溫下、523 固態培養基上活化培養 72 h 後，再挑選單一菌落畫線接種於新鮮培養基，於室溫下進行馴化培養 72 h。接著，轉移至 523 液體培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及 0.03% MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O)。於室溫下、150 rpm 震盪培養 72 h。此時菌液濃度約 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>，即可作為白葉枯病菌之接種源。另一方面，DH5 $\alpha$ <sub>GFP</sub> 則於 37°C 下，於 LB 固態培養基培養 2 d，即將菌體刮下並懸浮於滅菌去離子水，調整菌液 A<sub>600</sub> 讀值至 0.6–1.0，即為大腸桿菌之接種源。

供試水稻植株於溫室種植至最高分蘗期 (maximum tillering stage, 約 60–80 d)，即依據 (Kauffman *et al.* 1973) 所發表的剪葉接種法 (leaf clipping method)，將白葉枯病原菌接種至水稻植株。接種前，先將消毒的剪刀刀刃沾滿接種源菌液，接著進行人工剪葉接種，每個分蘗僅接種最上位之完全展開葉 (距葉尖 1–2 cm 處)。所有剪葉接種均在 1 h 內完成。

本研究之傳統病勢觀察，分為病斑發展及菌流生成兩部分。前者於接種後 0 h、0.5 h、1 h、2 h、6 h、1 DAI (day after inoculation)、2 DAI、3 DAI、5 DAI、7 DAI、14 DAI 及 21 DAI 等時間點，量測並記錄病斑發展的長度。同時，利用消毒刀片自與切口垂直方向，切出 0.1 cm<sup>2</sup> 的葉片組織，放置於光學顯微鏡下，以 100× 放大倍率觀察菌流的形成與否，以判定病原菌在維管束之繁殖與盤據的情形。

### 白葉枯病菌感染水稻過程的螢光觀察

供試「台農 67 號」水稻植株，以剪葉法 (Kauffman *et al.* 1973)，分別接種 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b、XF89b<sub>ZsGFP</sub> 及 DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> 後，即於 0 h、0.5 h、1 h、2 h、6 h、1 DAI 及 7 DAI 等時間點，利用螢光解剖顯微鏡 (Zeiss Stemi SV6, Carl Zeiss)，觀察接種葉片的螢光表現。螢光部分的照射光源為 470–490 nm 的藍光，激發的螢光則經由 505–530 nm 濾鏡過濾後，進入接目鏡呈像，觀測影像再利用 Nikon 995 數位相機拍攝記錄結果。

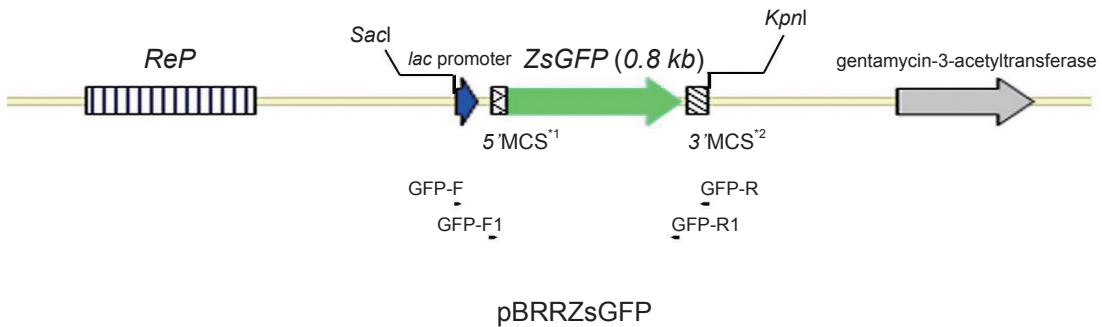
## 結果與討論

### *Xanthomonas* 綠螢光表現系統之構築與表現

Soby & Daniels (1996) 指出大腸桿菌的乳糖操作子 (*lac* operon)，在同為 *Xanthomonas* 屬的 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 菌株中，可正常大量表現，但不受葡萄糖的抑制或 isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導。為構築可在 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 中可大量且連續表現的螢光表現系統，本研究先自 pZsGreen 質體，分別以 PCR 方法，擴增 1,146 bp 包含完整 *lac* 啟動子、CAP 結合部位及 *ZsGFP* 閱讀框架 (open reading frame) 的 DNA 片段，以 in-fusion cloning 的方式次選殖於 pBBR1MCS (Kovach *et al.* 1995)，得到重組表現質體 pBBRZsGFP (圖 1)。

將 pBBRZsGFP 重組質體轉型至 *E. coli* DH5 $\alpha$  後，以含 10 mg L<sup>-1</sup> gentamycin 的 LB 固態培養基篩選培養後，挑取單一菌落，經 colony PCR 之 *GFP* 基因分析發現，大部分轉型株均能擴增出符合預期的 0.8 kb PCR 產物 (圖 2A)。經確認為 DH5 $\alpha$ <sub>GFP</sub> 之重組菌株，再直接利用螢光解剖顯微鏡觀測，結果發現 pBBRZsGFP 無須乳糖或 IPTG 的誘導，即可在大腸桿菌中表現具有功能的 *ZsGFP* 蛋白質，使其菌落發出綠螢光 (圖 2C)。此結果可能肇因於選殖時，插入片段 DNA 並未包含抑制子結合部位 (repressor binding site, *lacI*)。因此，pBBRZsGFP 在大腸桿菌宿主中，是一種持續表現 (constitutive expression) 的重組質體。

同樣的步驟，將 pBBRZsGFP 表現重組質體轉型至 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 後，經由含 10 mg L<sup>-1</sup> gentamycin 的 523 固態培養基篩選，並挑取單一菌落，以 colony PCR 進行 *GFP* 基因檢測亦發現，大部分轉型株均能擴增出預期的 PCR 產物 (圖 2B)。利用螢光解剖顯微鏡，觀測確認之 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 重組菌株的螢光反應，發現 pBBRZsGFP 在白葉枯病菌的細胞中，亦可持續表現具有功能的 *ZsGFP* 蛋白質，使菌落發出綠螢光 (圖 2D)，與 Soby & Daniels (1996) 所發表的結果類似，即 *lac* 啟



\*1 5'MCS

$\xrightarrow{\text{ZsGFP Start codon}}$   
ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG GCT  
 HindIII SphI PstI SalI BamHI XmaI SmaI KpnI AgeI NcoI

\*2 3'MCS

ZsGFP  
stop codon  
TGA GCGGCCGCGACTCTAGAAATCCAACTGAGCGCCGGTCTGCTACCATTACCAACTTGTCTGGTGTCAAATAATAGGCCCT  
 NotI EcoRI StuI

ACTAGTCGGCCGTACGGGCC  
 SpeI BstXI ApaI

圖 1. *Xanthomonas* 綠螢光基因表現系統 pBRRZsGFP 之構築。Rep 為複製起始點；GFP-F、GFP-R、GFP-F1 及 GFP-R1 為本篇報告所用引子；gentamycin-3-acetyltransferase 則為篩選標誌基因。GFP 為水母綠螢光蛋白質。

Fig. 1. The construction of *Xanthomonas* expression system of the green fluorescent protein gene, pBRRZsGFP. Rep was indicated the replication origin. GFP-F, GFP-R, GFP-F1 and GFP-R1 were indicated the primers used in this work. The gentamycin-3-acetyltransferase is the selective marker gene. GFP: jellyfish green fluorescent protein.

動子亦可在 *Xanthomonas* 屬的宿主細胞持續性的大量表現。因此，本研究所得的重組菌株 DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> 及 XF89b<sub>ZsGFP</sub>，確實可以持續地在所屬菌株內大量表現綠螢光蛋白質，並極容易觀察。因此，本試驗應用這兩株菌株，建立白葉枯病菌感染水稻植株之高效視覺化的觀察系統，做為解決傳統病斑觀察或菌流觀察耗時與不確定等問題。

### 白葉枯病菌之接種與感染過程的觀察

現行白葉枯病的接種，大多利用剪葉法來進行 (Kauffman *et al.* 1973)。接著，觀察病葉之病斑進程與菌流發展，進而分析白葉枯病菌的感染過程 (圖 3)。結果發現，「台農 67 號」在接種 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 120 h 後，才能在病葉上觀察到病斑的形成。而菌流的觀

察，則可在接種 48 h 後，可在接種葉上觀察到菌流。但菌流的觀察為破壞性取樣，因此無法於後續時間點，繼續觀察同一病葉的病徵變化。另一方面，目前探討水稻與白葉枯病菌間交互作用的功能性基因體學研究，多聚焦在接種 12、24 及 72 h (Mahmood *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007)。在其他植物，如阿拉伯芥，被發現在更早的時間點，宿主即能啟動免疫反應，因應病原菌的入侵 (Zipfel *et al.* 2004)。但現行的觀察方法，卻無法在感染初期，觀察到任何可配合功能性基因體學分析的外表型 (phenotype) 改變。

因此，本研究利用上述螢光標定的 XF-89b<sub>ZsGFP</sub>，接種最高分藥期的「台農 67 號」水稻植株，再利用 Zeiss Stemi SV6 螢光解剖顯微鏡，觀察 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 入侵水稻宿主的進程。

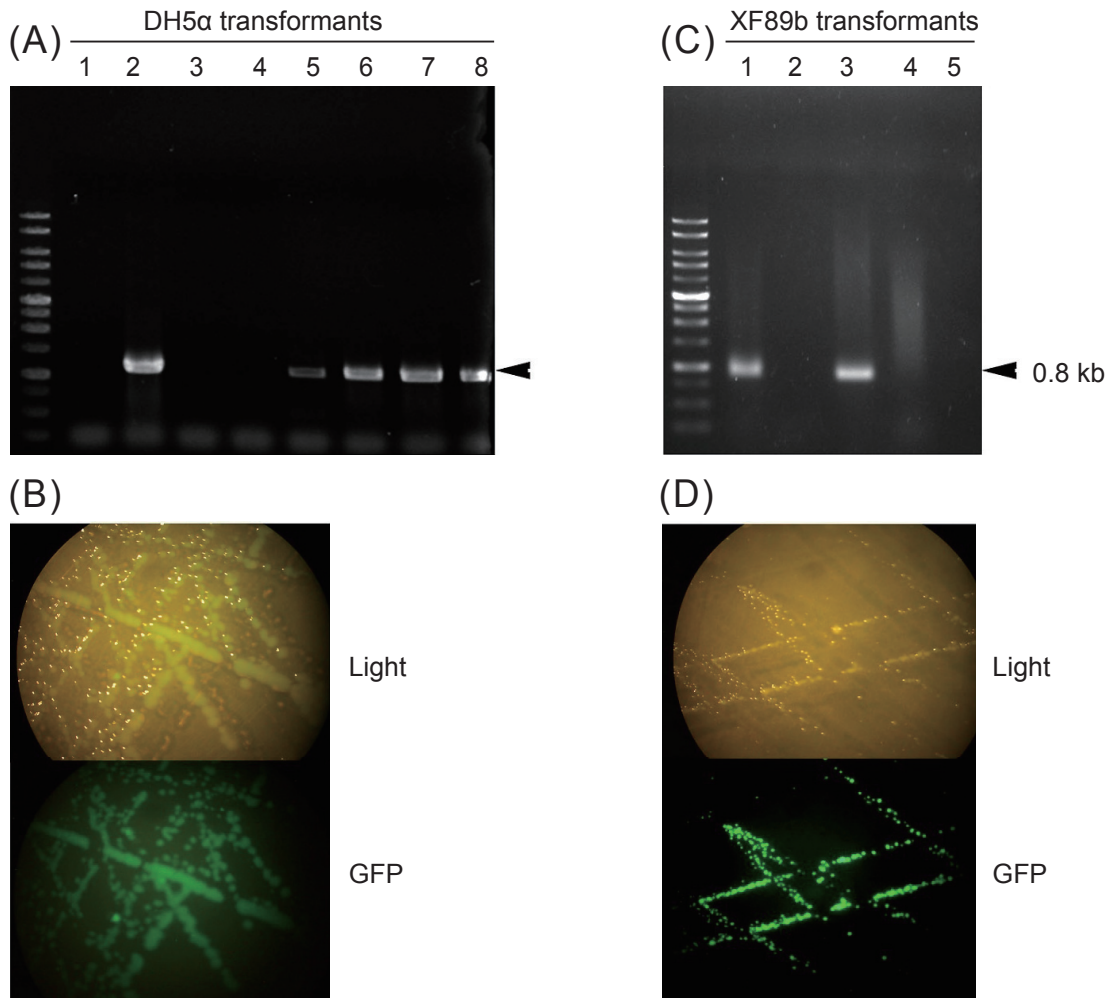


圖 2. *ZsGFP* 基因在 *Escherichia coli* 及 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 宿主中之表現。DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> 及 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 之 GFP 基因型分析 (A、C)；DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> 及 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 之螢光觀察 (B、D)。 (A) Lanes 1–8 為轉形大腸桿菌 DH5 $\alpha$  之菌落 PCR 分析結果； (C) Lanes 1–5 為轉形白葉枯病菌 XF89b 之菌落 PCR 分析結果； (B、D) Light：白光下之觀察，GFP：螢光下之觀察。

**Fig. 2.** The expression of *ZsGFP* gene in *E. coli* and *X. oryzae* pv. *oryzae*. Genotyping of DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> and XF89b<sub>ZsGFP</sub> (A, C); visualization of DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> and XF89b<sub>ZsGFP</sub> expressing GFP (B, D). (A) Lanes 1–8 displayed the colony PCR results of *E. coli* DH5 $\alpha$  transformants; (C) Lanes 1–5 displayed the colony PCR results of *X. oryzae* XF89b transformants; (B, D) Light: the observation under white light; GFP: the observation under fluorescence.

結果發現 3 DAI 時，在葉片切口即能觀測到螢光的表現。5 DAI 時，螢光部份已沿著葉脈向葉片基部移動 (圖 4)。然而，在此觀測條件下，葉綠素會受激發呈現紅色螢光，導致葉片在觀測時呈現紅色，嚴重干擾綠螢光的觀察。

為排除葉綠素螢光的干擾，改以暗培養所得的白化苗，進行 XF89b<sub>ZsGFP</sub>、DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> 及 XF89b 的接種，並於接種 0、0.5、1、2、6、

24 h 及 7 DAI 時，連續觀測 3 個病葉的螢光表現 (圖 5)。結果發現，在接種 0 h，即可觀測到 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 重組菌株在切口處有螢光表現；0.5 h，可觀測到 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 重組菌株，由切口處沿著葉脈向葉片基部移動；1 h，XF89b<sub>ZsGFP</sub> 可在病葉上大量繁殖，可觀測到極為明顯的螢光訊號。接著，在 2、6 及 24 h，仍可持續觀察到 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 向基部移動，但螢光訊號卻較

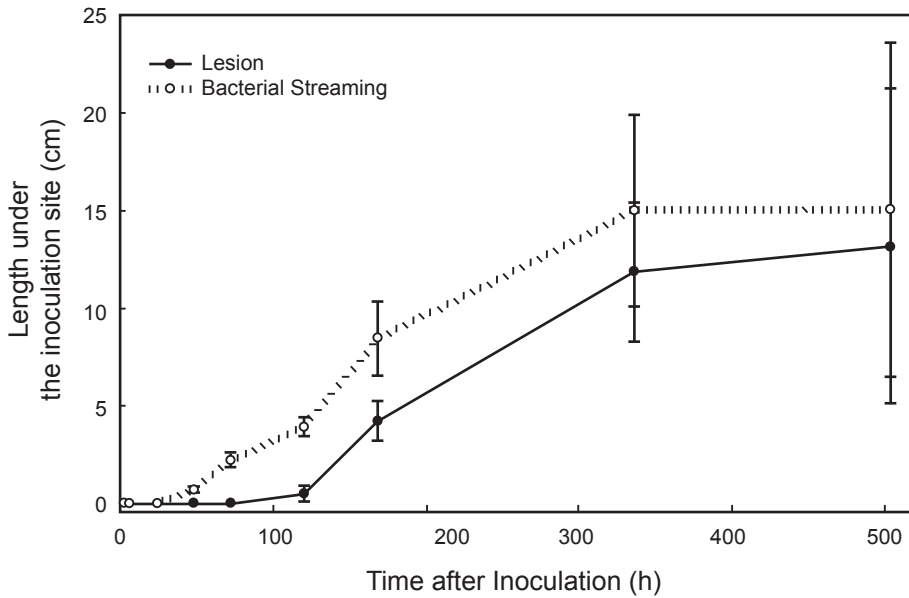


圖 3. 水稻植株接種 XF89b (0、0.5、1、2、6、24、48、72、120、168、336 及 504 h) 之病斑長度及菌流位置。  
**Fig. 3.** The lesion length (cm) and bacterial streaming sites of rice plants inoculated with XF89b and investigated at 0, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 72, 120, 168, 336 and 504 hours after inoculation.

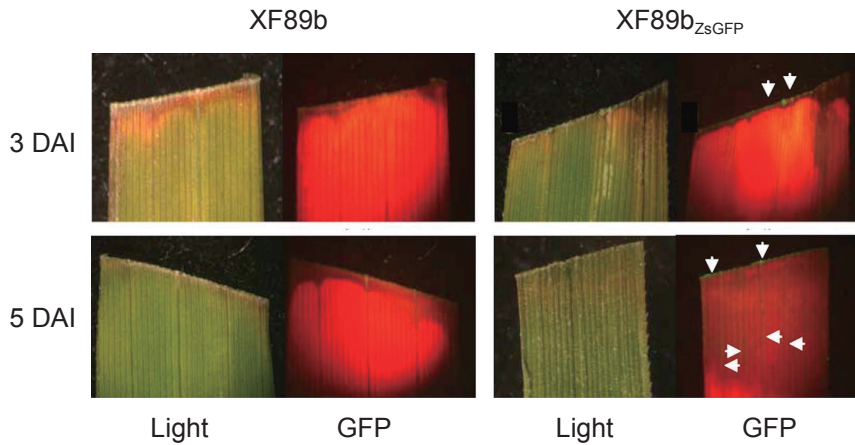


圖 4. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 在感染最高分蘗期水稻過程之表現螢光觀察。  
**Fig. 4.** Visualization of *X. oryzae* pv. *oryzae* expressing GFP at 3 DAI and 5 DAI after inoculation of rice at the maximum tillering stage. GFP: jellyfish green fluorescent protein; DAI: day after inoculation.

感染 1 h 弱。此現象可能是因為在這段時間，水稻啟動免疫防禦機制，抑制 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的繁殖，致使螢光訊號的減弱。但到了 7 DAI 時，XF89b<sub>ZsGFP</sub> 可能已壓抑了水稻的免疫系統，不僅沿著維管束大肆向病葉基部入侵，更在病葉上大量繁殖，因此可在病葉觀察到極強的螢

光訊號 (圖 5)。同時，在 7 DAI 時，亦可在同一接種葉上觀察到明顯病斑的形成。然而以 DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> 或 XF89b 接種，皆無法在病葉上觀察到螢光。推論大腸桿菌無法在病葉上繁殖與入侵，因此在所有觀測點皆無法觀察到螢光的表現；而後者則因不帶有螢光基因，所以也未

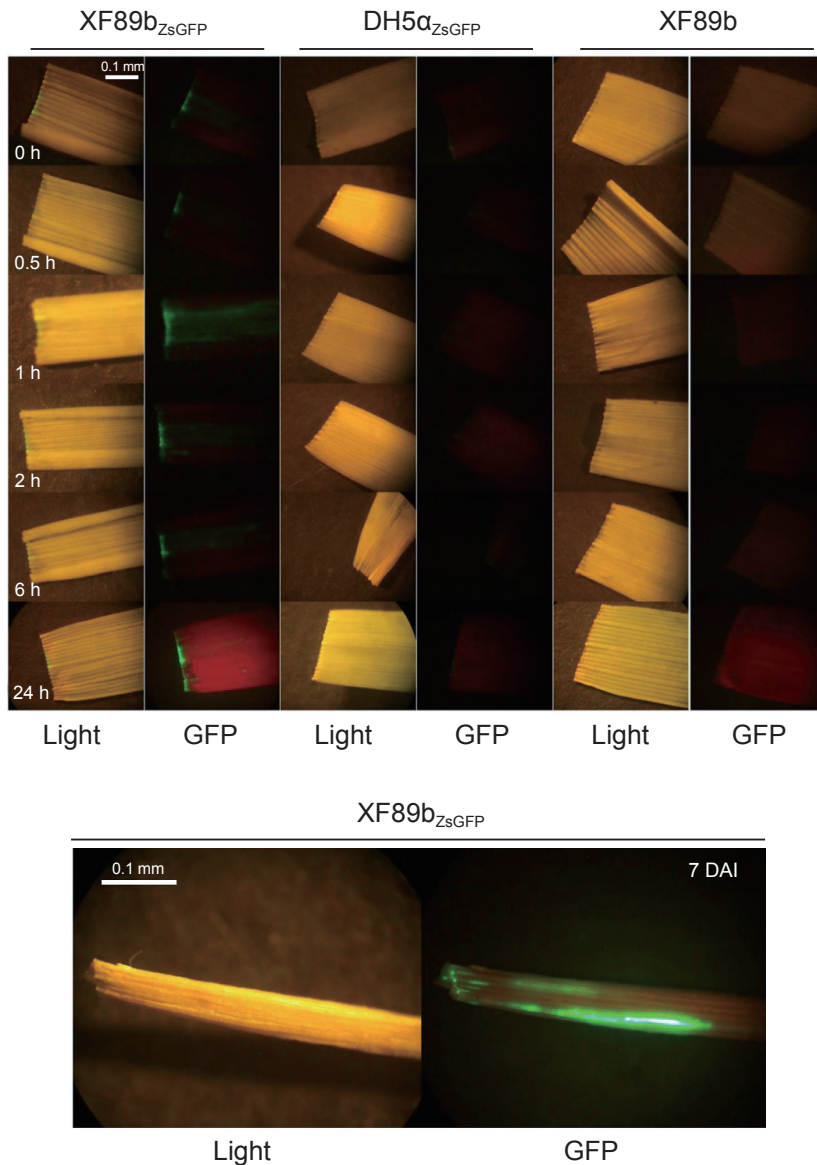


圖 5. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 及 *Escherichia coli* 在水稻白化苗中表現綠螢光蛋白質之觀察。

**Fig. 5.** Visualization of *X. oryzae* pv. *oryzae* and *E. coli* expressing GFP in the dark-treated albino rice seedlings. GFP: jellyfish green fluorescent protein.

呈現螢光訊號，但在 7 DAI 時，則與 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的接種葉一樣，即可觀察到接種葉已形成病斑。

上述結果顯示，在沒有葉綠素螢光干擾的情況下，XF89b<sub>ZsGFP</sub> 接種在 0.5 h，即可觀察到螢光重組菌株的表現與入侵。因此，後續若

在利用此重組菌株，感染最高分蘗期的水稻植株時，螢光顯微鏡可能需要進行下列的改良：(1) 可增加螢光激發光源的強度，由現行 50 W 增加到 100 W；(2) 可選擇較窄波長範圍的濾鏡，建議由現行的 505–530 nm 改為 520 nm，並增加一 510 nm 的分色鏡。Han *et al.* (2008)

即應用具有上述改良條件的 Zeiss Axiophot 螢光顯微鏡 (Zeiss, Germany), 成功觀測到綠螢光基因標定 *X. oryzae* pv. *oryzae* POX099<sub>GFP</sub> 在水稻病葉上表現螢光, 但因所用綠螢光基因 (GFP) 較弱, 需在 12 DAI 方能觀察到水稻病葉的螢光表現。

雖然, 本研究最後改用白化苗, 作為接種宿主, 觀測 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的感染過程。其植株的生理應與現行慣用高分蘗期植株不同。因此, XF89b<sub>ZsGFP</sub> 在白化苗感染的過程, 可能與在最高分蘗期植株有所不同。然而, 此系統在接種初期, 即能觀察到 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 在病葉的繁殖與入侵, 是目前最早能觀測到白葉枯病菌感染水稻植株的報告。另一方面, 本研究標定 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 所用的螢光基因, 是兔海葵 *ZsGFP* 基因, 其螢光強度是 EGFP 的 2.5 倍, 而 EGFP 的亮度又是正常 GFP 的 35 倍 (Li *et al.* 1997; Matz *et al.* 1999)。因此, XF89b<sub>ZsGFP</sub> 應較上述 Han *et al.* (2008) 所建構的 POX099<sub>GFP</sub>, 具有更好的螢光表現, 使其在感染宿主時, 有更佳的偵測靈敏度。同時, 無須破壞性採樣, 即可連續在同一病葉觀察病勢的發展。

## 結論

兔海葵綠螢光蛋白質 (ZsGFP) 是一新型的報導標誌蛋白質, 且較原來的 GFP 有更強的綠螢光表現。因此, 本研究利用 *ZsGFP* 基因, 構築在 *Xanthomonas* 細胞中可持續表現的重組質體 pRBBZsGFP, 並轉型至台灣本土收集的白葉枯病菌株 (XF89b), 獲得可以持續表現綠螢光的重組菌株 XF89b<sub>ZsGFP</sub>。接種於「台農 67 號」白化苗, 在感染 0.5–1 h, 即可發現 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的繁殖與入侵。但隨後水稻宿主啟動免疫防禦系統, 壓抑入侵 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 的繁殖, 使螢光的表現轉弱。但在 7 DAI 時, 綠螢光的表現轉強並持續向病葉基部發展, 顯示 XF89b<sub>ZsGFP</sub> 可能突破水稻的防禦機制, 並繼續沿著維管束繁殖向葉片基部蔓延感染。這是目前最早能觀測到白葉枯病菌感染水稻植株的研究結果。同時, 此系統無須破壞性取樣, 即可持續且即時地觀察同一病葉的病勢發展。因

此, 本研究所建構之 XF89b<sub>ZsGFP</sub>, 確實可作為即時檢測方法, 觀察接種後的病菌感染能力及感染過程, 亦能作為未來探討白葉枯病菌與水稻宿主間交互作用的試驗平台。

## 引用文獻

- Bracha-Drori, K., K. Shichrur, A. Katz, M. Oliva, R. Angelovici, S. Yalovsky, and N. Ohad. 2004. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40:419–427.
- Caplan, J. L., P. Mamillapalli, T. M. Burch-Smith, K. Czymbek, and S. P. Dinesh-Kumar. 2008. Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* 132:449–462.
- Chen, F., Y. Yuan, Q. Li, and Z. He. 2007. Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defense response to bacterial blight. *Proteomics* 7:1529–1539.
- Chun, W., G. S. Waldo, and G. V. Johnson. 2007. Split GFP complementation assay: A novel approach to quantitatively measure aggregation of tau *in situ*: Effects of GSK3 $\beta$  activation and caspase 3 cleavage. *J. Neurochem.* 103:2529–2539.
- Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110–2114.
- Elibox, W. and P. Umaharan. 2007. A green fluorescent protein-based screening method for identification of resistance in anthurium to systemic infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. *Plant Pathol.* 56:819–827.
- Errampalli, D., K. Leung, M. B. Cassidy, M. Kostrzynska, M. Blears, H. Lee, and J. T. Trevors. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 35:187–199.
- Fan, J., C. Crooks, and C. Lamb. 2008. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photobacterium luminescens* luxCDABE. *Plant J.* 53:393–399.
- Gnanamanickam, S. S., V. B. Priyadarisini, N. N. Narayanan, P. Vasudevan, and S. Kavitha. 1999. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. *Curr. Sci.* 77:1435–1443.
- Han, S. W., C. J. Park, S. W. Lee, and P. C. Ronald. 2008. An efficient method for visualization and growth

- of fluorescent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in planta. BMC Microbiol. 8:164.
- Hillesheim, L. N. and J. D. Müller. 2005. The dual-color photon counting histogram with non-ideal photodetectors. Biophys. J. 89:3491–3507.
- Kado, C. I. and M. G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969–976.
- Kauffman, H. E., A. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, and S. D. Merca. 1973. An improved technique for evaluation resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. Rep. 57:537–541.
- Keen, N. T., H. Shen, and D. A. Cooksey. 1992. Introduction of cloned DNA into plant pathogenic bacteria. p.45–50. in: Molecular Plant Pathology: A Practical Approach. (Gurr, S. J., M. J. McPherson, and D. J. Bowles, eds.) IRL. Oxford. 328 pp.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166:175–176.
- Li, X., G. Zhang, N. Ngo, X. Zhao, S. R. Kain, and C. C. Huang. 1997. Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. J. Biol. Chem. 272:28545–28549.
- Mahmood, T., A. Jan, M. Kakishima, and S. Komatsu. 2006. Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. Proteomics 6:6053–6065.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nature Biotechnol. 17:969–973.
- Mizukami, T. and S. Wakimoto. 1969. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. Annu. Rev. Phytopathol. 7:51–72.
- Mizuno, H., A. Sawano, P. Eli, H. Hama, and A. Miyawaki. 2001. Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. Biochemistry 40:2502–2510.
- Newman, K. L., R. P. Almeida, A. H. Purcell, and S. E. Lindow. 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. Appl. Environ. Microbiol. 69:7319–7327.
- Niño-Liu, D. O., P. C. Ronald, and A. J. Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. 7:303–324.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, and Y. Saiga. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol. 59:223–239.
- Soby, S. D. and M. J. Daniels. 1996. Catabolite-repressor-like protein regulates the expression of a gene under the control of the *Escherichia coli lac* promoter in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:559–561.
- Stewart, C. N. 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. Plant Cell Rep. 20:376–382.
- Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. Ann. Rev. Biochem. 67:509–544.
- Yoshimura, S. and K. Tahara. 1961. Morphological studies on the *Xanthomonas oryzae* under electron microscopy. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 26:61.
- Yu, Q. H., S. M. Dong, W. Y. Zhu, and Q. Yang. 2007. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus* in the gastro-intestinal tract of chicken. FEMS Microbiol. Lett. 275:207–213.
- Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E. J. Oakeley, J. D. Jones, G. Felix, and T. Boller. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. Nature 428:764–767.

# Development of an Efficient Fluorescent Visualization Method for the Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Infection in Rice Plants

Da-Gin Lin<sup>1,\*</sup>, Yu-Ling Lin<sup>2</sup>, Chun-Wei Chen<sup>3</sup>, Hui-Chen Lai<sup>2</sup>, Yi-Wen Wang<sup>4</sup>, Szu-Yi Chou<sup>5</sup>, and Chang-Sheng Wang<sup>6,\*</sup>

## Abstract

Lin, D. G., Y. L. Lin, C. W. Chen, H. C. Lai, Y. W. Wang, S. Y. Chou, and C. S. Wang. 2015. Development of an efficient fluorescent visualization method for the detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection in rice plants. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(1):10–20.

Detection of pathogen infection is an important step in pathogen-host interaction study. A *Xanthomonas* fluorescent expression plasmid, pRBBZsGFP, was constructed with a strong fluorescent gene *ZsGFP* and the pBBR1MCS vector for immediate detection of bacterial blight pathogen infection. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b, respectively. The transformants, DH5 $\alpha$ <sub>ZsGFP</sub> and XF89b<sub>ZsGFP</sub>, were confirmed by PCR genotype analysis and the observation of continuously expression of green fluorescent proteins. After infection of ‘TNG67’ at the maximum tillering stage by XF89b<sub>ZsGFP</sub>, the observation of ZsGFP was interfered with the fluorescence of chlorophyll. The results showed that the bacterial multiplication of XF89b<sub>ZsGFP</sub> only could be observed at the incision site at 3 DAI (days after inoculation) and XF89b<sub>ZsGFP</sub> colonized from the cutting site to leaf base at 7 DAI. Using dark-treated albino rice seedlings, the interference of chlorophyll fluorescence could be reduced and the multiplication and colonization of XF89b<sub>ZsGFP</sub> could be detected in 0.5 h after inoculation and the maximum fluorescence was observed on the same leaf in 1 h after inoculation. However, the fluorescence was reduced in the following time course indicating that the multiplication and colonization of XF89b<sub>ZsGFP</sub> might be suppressed by the endogenous immune system of rice. At 7 DAI, the stronger fluorescence was observed again on the same leaf and extended continuously to the leaf base, suggesting that the rice immune system was broken down by the XF89b<sub>ZsGFP</sub>. To our knowledge, this is the first report on the observation of *X. oryzae* pv. *oryzae* in rice plants. Importantly, this is a non-destructive system for pathogen detection and the multiplication and colonization of pathogen can be directly observed on the inoculated leaf. Therefore, the XF89b<sub>ZsGFP</sub> and system established in this study can be served as a platform for real-time observation of virulence and pathogenicity of *X. oryzae*, and can also be applied to the study of the interaction between pathogen and host.

**Key words:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *ZsGFP* gene, *Xanthomonas* fluorescent expression system, Investigation of disease progress, Pathogen-host interaction.

---

Received: August 4, 2014; Accepted: October 14, 2014.

\* Corresponding authors, e-mail: dagin@tari.gov.tw and wangchansen@nchu.edu.tw

<sup>1</sup> Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>5</sup> Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

<sup>6</sup> Associate Professor and Head, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.