

# 水稻白葉枯病抗性突變體接種白葉枯病菌之轉錄體學研究

黃巧宜<sup>1</sup> 周思儀<sup>2</sup> 李雅琳<sup>3</sup> 曾文彬<sup>1</sup> 陳純葳<sup>4</sup> 王強生<sup>5,\*</sup> 林大鈞<sup>6,\*</sup>

## 摘要

黃巧宜、周思儀、李雅琳、曾文彬、陳純葳、王強生、林大鈞。2015。水稻白葉枯病抗性突變體接種白葉枯病菌之轉錄體學研究。台灣農業研究 64(2):145–158。

白葉枯病是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 所引起的水稻嚴重病害。本研究為了開發新的抗性基因，利用「台農 67 號」(‘TNG67’) 及具持久抗性之 SA0423 突變體為材料，接種台灣水稻白葉枯病抗性檢定團專用菌株 XF89b，並利用微陣列晶片分析接種後之轉錄體變化。所得結果經由 One-way ANOVA 及 Student-Newman-Keuls (SNK) 分析，發現在 SA0423 專一表現的轉錄子有 2,727 個，‘TNG67’ 則有 3,585 個，而兩者皆有表現之轉錄子則高達 18,432 個。利用「代謝路徑的註解」、「比對已發表的抗性基因座」、「比對植物-病原菌交互作用代謝路徑」及「BioLayout Express 3D 表現分群」等方法，進一步篩選出 59 個抗性相關基因，再經由 real-time RT-PCR 分析確認，結果發現 17 個基因的表現符合微晶片分析結果。最後利用文獻檢索，分析這 17 個基因與抗性的關聯性，結果發現它們可能參與「植物-病原菌交互作用」、「植物荷爾蒙生成」、「細胞自噬作用」及「免疫機制啟動的訊息傳遞」等與抗性相關的代謝路徑。這些結果除可作為探討 SA0423 的抗性機制外，亦可進一步選殖表現數量基因座 (expression quantitative trait loci; eQTL) 與分子標誌，應用於未來水稻白葉枯病抗性之分子育種。

**關鍵詞：**水稻、白葉枯病、抗性、突變體、轉錄體。

## 前言

水稻白葉枯病 (rice bacterial blight disease) 主要由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 引起，係水稻栽培的嚴重病害之一，可造成水稻減產達 50% (Gnanamanickam *et al.* 1999)。在台灣地區，白葉枯病經常發生於第 2 期稻作，尤其是颱風過後，經常造成產量的嚴重減損，乃目前國內主要的水稻病害 (Hsieh 2003)。

慣行農法常利用藥劑、栽培管理與栽培抗性品種等方法，防治白葉枯病。其中，抗性品種的種植，可減少農藥的使用，避免環境汙染

及節省成本，是公認為最有效且經濟的防治手段 (Yang *et al.* 2003)。因此，抗性品種的選育，在白葉枯病猖獗的今日，越顯重要。迄今已在水稻發現有 35 個以上的抗性基因座，分別命名為 *Xa1* 至 *Xa36* (Lin *et al.* 1996; Nino-Liu *et al.* 2006; Zhang 2007; Shanti *et al.* 2010)。其中，*Xa1*、*xa5*、*xal3*、*Xa21*、*Xa3/Xa26* 及 *Xa27* 等基因已被選殖 (Song *et al.* 1995; Yoshimura *et al.* 1998; Iyer & McCouch 2004; Sun *et al.* 2004; Gu *et al.* 2005; Chu *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2006; Xiang *et al.* 2006)。國際稻米研究所 (International Rice

投稿日期：2014 年 8 月 6 日；接受日期：2015 年 1 月 17 日。

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

<sup>1</sup> 國立中興大學農藝學系研究助理。台灣 台中市。

<sup>2</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>3</sup> 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。

<sup>5</sup> 國立中興大學農藝學系教授。台灣 台中市。

<sup>6</sup> 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

Research Institute; IRRI) 利用極感病的 'IR24' 品系作為輪迴親，建立帶有不同 *Xa* 基因的 IRBB 系列近同源系 (near isogenic lines)，目前已被進一步發展為良好的 *Xa* 基因提供親，應用於抗性育種 (Huang *et al.* 1997)。亦有學者利用比較遺傳圖譜 (comparative genetic map) 方法，根據 IRRI 的研究結果，開發出許多可應用的分子標誌，進行優良品種的抗性改良 (Kottapalli *et al.* 2006; Sama *et al.* 2014)。

*Xa21* 抗病基因產物，可啟動 *Xa21* 媒介的免疫作用 (*Xa21*-mediated immunity)，而帶有 *Xa21* 的水稻植株，通常對許多白葉枯病菌生理小種具有廣幅抗性 (Bai *et al.* 2006; Lee *et al.* 2009; Lee *et al.* 2011)。然而，IRBB21 (*Xa21*) 卻對台灣本土 XF89b、XM1 及 XM42 等分離菌株，不具明顯的抗性 (Wang *et al.* 2013)，其可能是台灣本土菌株的致病機制與國外流行菌株不同所致，導致這些品系的抗性不佳。此外，由於長期栽培單一抗性水稻品種，可能會改變栽種區域的病原菌的生理小種或菌相改變，而導致抗性崩解，如帶有 *Xa4* 的改良品種在釋出後，很快就發生「抗性崩解」(Khush *et al.* 1989; Mew *et al.* 1992)。因此，育種家認為堆疊多個不同抗性基因，可以減緩抗性的崩解，為重要的育種策略。所以，進行抗病種原與新型抗性基因的開發，以因應菌相的演化，是抗病育種之首要工作 (Wang *et al.* 2013)。

行政院農委會農業試驗所已累積多年白葉枯病的研究經驗，早於 1996 年的年報即指出，在水稻供試品種 (系) 接種 151 株的本土菌株上，發現 XF89b 可使 26 個具有 *Xa* 抗性基因的水稻品系 (IRBB 近同源系) 感病。至今的接種試驗顯示，XF89b 仍是一極強的致病菌株。另一方面，本所利用疊氮化鈉 (sodium azide) 誘變，建立一套 'TNG67' 誘變庫，現存約有 3,000 個突變體純系，分別帶有分蘖數、株高、香氣、澱粉生合成、抗病蟲害及早熟等不同性狀 (Wang *et al.* 2002)。經過多年多期作之台灣本土菌株 (XF89b、XM1 及 XM42) 的抗性檢定，目前已篩選出 7 個抗病突變體 (SA0405、SA0408、SA0421、SA0423、SA0424、

SA0912、SA1613.1)，以及另一較 'TNG67' 更感病的 SA0422 突變體。其中，SA0423 突變體的株型與 'TNG67' 較類似，且多年抗性檢定表現穩定。因此，本研究以 SA0423 突變體 (R) 與感病的 'TNG67' (S) 為材料，接種台灣水稻白葉枯病抗性檢定圃專用菌株 (XF89b) 後，利用微陣列晶片分析其轉錄體的表現，探討可能參與 SA0423 抗病機制的基因。所得結果將可做為日後開發表現數量基因座 (expression quantitative trait loci; eQTL) 的分子標誌，應用於未來抗性之分子育種。

## 材料與方法

### 試驗材料

本研究選用對白葉枯病菌極為敏感的「台中在來一號」('TN1', highly susceptible, HS; 感性對照品系)、感性的 'TNG67' (susceptible, S) 及具廣幅抗性的 SA0423 突變體 (resistant, R)，分別依慣行農法種植於溫室，作為轉錄體分析材料。白葉枯病菌則以農試所植病組稻作病害實驗室所保存的白葉枯病 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b (採集地：台中) 作為供試菌株。

### 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. *oryzae* XF89b 於室溫下，畫線培養於 523 固態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2%  $K_2HPO_4$ 、0.03%  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  及 1.5% agar)，進行活化 72 h 後，再挑選單一菌落接種於新鮮培養基，並於室溫下進行馴化培養 72 h 後，轉移至 523 液態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2%  $K_2HPO_4$  及 0.03%  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ )。於室溫下、150 rpm 震盪培養 72 h。接著，調整菌液濃度為  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>，作為白葉枯病菌之接種源。

供試水稻植株於溫室種植至最高分蘖期 (maximum tillering stage, 約 60–80 d)，依據剪葉接種法 (Kauffman *et al.* 1973)，進行病原

菌的接種。接種前，先將消毒的剪刀刀刃處完全沾滿菌液，接著於每個分蘗的最上位完全展開葉，距葉尖 1–2 cm 之處，進行剪葉接種。所有接種均在 1 h 內完成。接種後，於 0、0.5、1、2 及 6 h 等時間點，採取自接菌切口以下 2 cm 葉片，作為 RNA 樣品製備的材料，並在感性對照品系 'TN1' 病斑長度達全葉 3/4 時，記錄病斑。

### 總量 RNA 之萃取

依據 Chirgwin *et al.* (1979) 的方法，進行水稻總體 RNA 的萃取。取 0.3–0.5 g 新鮮水稻葉片，經液態氮急凍後，以研鉢及杵磨成細粉，並逐次加入 10 mL 萃取緩衝液 (100 mM Tris-base、20 mM EDTA- $\text{Na}_2$ 、200 mM NaCl、4% SDS、16 mM DTT、1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  2-mercaptobenzothiazole) 及等體積 phenol，以 12,000 $\times$  g 離心 10 min。接著，取上清液加入等體積的氯仿混合均勻後，以 12,000 $\times$  g 離心 10 min。之後，取上清液加入 1/3 倍體積的 8 M 氯化鋰，混合均勻後，置於 4 $^{\circ}\text{C}$  進行過夜沉澱。然後，於 4 $^{\circ}\text{C}$  下 12,000 $\times$  g 離心 30 min，取得沉澱物，並回溶於 2 mL 無菌去離子水，再加入 0.1 倍體積 3 M 醋酸鈉緩衝液 (pH 5.2) 及 2.5 倍體積絕對酒精，再次沉澱 RNA。最後，RNA 回溶於含 RNasecure (Ambion) 之無菌去離子水。取適量樣品，以 320–220 nm 吸光值測定其濃度及品質，並進行 RNA 甲醯瓊脂膠體電泳分析，以確定 RNA 的完整性，隨後即分裝保存於 -70 $^{\circ}\text{C}$  備用。

### 水稻 cDNA 微晶片 (microarray) 之設計

水稻基因轉錄體序列由 MSU Rice Genome Annotation Project (Version 6.1) 下載，共有 56,797 個基因座 (loci)，去除同一基因上替代剪切 (alternative splicing sequences) 的轉錄子，其獨特基因 (unique gene) 數為 47,154。使用 Agilent Oligo Microarray (60K, custom-made, Agilent Technologies) 晶片，其上分布 8 個雜合區 (8 sub-arrays)。探針序列的設計是使用 Agilent eArray system 軟體，針對 56,797 個基因座轉錄體之 3' 端 1 kb 長度範圍內，設計約 60 mers 的序列作為探針，故每

個 sub-array 均含完整且完全一致的水稻轉錄子探針。

### cDNA 微陣列雜合反應 (hybridization) 及轉錄體分析

取兩品種 (系) 接種後 0、0.5、1、2 及 6 h 的 RNA 樣品進行雜合反應。RNA 的需求濃度為 2–3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ，總量為 25  $\mu\text{g}$ 。於中央研究院微矩陣核心實驗室進行晶片雜合反應。送件 RNA 樣品通過 Bioanalyzer RNA QC 檢驗達微晶片分析標準後 [品質必須符合 (OD260–OD320)/(OD280–OD320)  $\geq$  1.9、(OD260–OD320)/(OD230–OD320)  $\geq$  1.8]，取 1  $\mu\text{g}$  RNA 使用 Amino Allyl MessageAmp aRNA Kit (Ambion Cat. Am1753) 複製 RNA，並以 Alexa Flour 555 Reactive Dyes (Invitrogen) 進行 RNA 樣品的標註，再將 RNA 碎片化 (fragmentation) 後，進行 cDNA 微晶片的雜合反應。於 65 $^{\circ}\text{C}$  雜合反應 17 h 後，使用 Agilent DNA microarray scanner (G2565CA, Agilent Technologies) 掃描 cDNA 微晶片，再利用 Feature Extraction software (version 10.7.1.1) 分析掃描之影像。最後，產生的轉錄體數據，利用 GeneSpring 11.5 軟體 (Agilent Technologies)，進行 One-way ANOVA 及 SNK 檢定 (Student-Newman-Keuls test) 分析。

轉錄子功能分析首先利用 g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gconvert.cgi>) 網站，將轉錄子序號 (MSU accession number) 轉換 UNIPROT TSPREMBL\_ACC 的序號，再以 DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discover) 網站 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)，分析每個轉錄子可能參與的代謝路徑。

### 抗性基因座及水稻抗病生理代謝途徑資料庫之檢索與比對

檢索中國水稻數據中心 (<http://www.ricedata.cn>)、Oryzabase (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabaseV4>) 及 Gramene (<http://www.gramene.org>) 網站所發表的白葉枯病抗性基因座，並整合以上資料與相關文獻，檢索鄰近基因座的 SSR 分子標誌，再利用 Gramene 網站

的「Comparative map」工具，將基因座定位在水稻基因體的物理圖譜。接著，利用 OryGenesDB 網站 (<http://orygenesdb.cirad.fr/>) 檢索差異表現轉錄子在物理圖譜的位置，並與上述基因座位置進行比對，檢索座落此區間的差異表現轉錄子的物理圖譜位置。另一方面，自 KEGG 網站 (<http://www.genome.jp/kegg>)，檢索水稻細胞中參與抗病生理代謝 (plant-pathogen interaction-*Oryza sativa japonica*) 之基因，並檢視其是否為本次分析所得的差異表現轉錄子。

### 轉錄子表現分群

由統計分析後得到之差異轉錄子，經 BioLayout Express3D (Version 2.2) 進行表現分群 (clustering) (Theocharidis *et al.* 2009)。生物資訊分析條件：相關係數設定為 0.95，minimum component size 設定 5，inflation 設定 2.2，smallest cluster allowed 設定 4。

### 即時逆轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR)

使用 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 將總量 RNA 反轉錄成 cDNA：加 1  $\mu\text{L}$  10 mM oligo d(T)18 引子 (表 1) 於 2  $\mu\text{g}$  總量 RNA 樣品，經 80°C、10 min 變性後，隨即置於 4°C 下，再逐一加入 1  $\mu\text{L}$  0.1 M DTT、4  $\mu\text{L}$  2.5 mM dNTP (TaKaRa)、4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  first-strand buffer、1  $\mu\text{L}$  RNaseOUT、1  $\mu\text{L}$  SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U  $\mu\text{L}^{-1}$ )，並調整總體積為 20  $\mu\text{L}$ 。於 25°C、10 min 及 42°C、90 min 作用後，再以 95°C、5 min 終止反應，所得即為 cDNA。接著再以 KAPA™ SYBR® FAST qPCR 試劑組進行 PCR，取 4  $\mu\text{L}$  稀釋 20 倍的 cDNA，加入 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$  master mix、0.4  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  引子 (表 1)、0.4  $\mu\text{L}$  50 $\times$  ROX Low 及 4.8  $\mu\text{L}$  去離子水，置於多重螢光基因定量光譜分析儀 (ABI 7500, Life Technologies Co., Ltd.)，進行即時定量 PCR 反應。PCR 條件設定如下：95°C、2 min 30 s，將模版變性；接著，進行增幅階段，95°C 變性 30 s，黏合反應於 60°C 下進行 30 s，72°C 聚合反應 32 s，此反應進行 40 次循環。解離反應 (dis-

表 1. 即時定量 RT-PCR 引子之序列。

Table 1. Sequences of primer for real-time RT-PCR analysis.

Primer	Sequence (5' → 3')
Ankyrin F	TACGCATTCTTCCATCATCA
Ankyrin R	TTTCTCCACCCACATTCC
ATG1_F	GAGGCACAGATAGATTTG
ATG1_R	GTCACCTCAGTCGTTATTC
CaM_chr1-1_F	GGTCAGATCAATTACGAAGA
CaM_chr1-1_R	TTACTACCACCAGGAGAG
CaM_chr1-2_F	TTCAGAGACATCCTATGCT
CaM_chr1-2_R	ACAACAGAATGGCTACAC
CaM_chr2_F	ATCCGCTTGTGTICAGAAG
CaM_chr2_R	CGAATGAATCAACCAATGTCTC
CaM_chr5_F	GGAGTTCGTTAAGGTCAT
CaM_chr5_R	TACCACCAGCAAAGATAG
CMPG1_F	GCTAGGTCAAGAACACAATCAA
CMPG1_R	ACTGCCAAATACGGTCTGT
DUF1c_F	TTACTTCTATGTCCGATCCA
DUF1c_R	TGATTACTGTCCACTGTCT
FMO_2F	GAGCATTCAATCGTTCGT
FMO_2R	ATCATCTCGAAGGTGTAG
JOM_F	ATCTATCGACGTGTTACAC
JOM_R	CACCTTCTCCTTGTGTGA
Oligo g (T)18	GTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
PxMP_F	CCACGAGTTCATAATCAGA
PxMP_R	CGCATCATAGTCCAGTTA
SAM_F	GGAAGGATGAGGATGTAT
SAM_R	ATAGGTAGGTAGGTTGAAG
SNARE_F	GGCTGTTCAATCTGTATCA
SNARE_R	TGGACTCGTGGATGTTAT
Ubi-F1	ACACTTGTGATTCAAGTTCCA
Ubi-R1	TGCAGTGTGATGAAACC
Xa2_F	TGGTGGTCTGAATCTGAT
Xa2_R	GCCTCCTCATCAAGAAAG
xa5-2F'	CATGTGCCTCACTGAGAC
xa5-2R	ATAGACTTATCAAAGTGGACAAGA
Xa25_F	TTTGGGATGGTATGGTA
Xa25_R	TACAACAGAAGCGGAAAC

sociation) 在 95°C 進行 15 s，60°C 進行 1 min，95°C 進行 15 s，60°C 進行 15 s。

## 結果與討論

### SA0423 與 ‘TNG67’ 接種 XF89b 之 cDNA 微晶片分析

最高分蘗期時將抗病之 SA0423 突變體與感病之 ‘TNG67’，接種本土高致病性的分離株 XF89b，並於接種後第 7、14、21 及 28 d，觀察接種葉片的病斑形成 (圖 1)，結果發現 ‘TNG67’ 及感性對照品系 ‘TN1’ 的病斑隨著接種時間而增長，但 SA0423 突變體的病斑幾乎維持在一定長度，顯示 SA0423 確實對 XF89b 分離株有明顯的抗性。接著，進行 ‘TNG67’ 及 SA0423 接種後不同時間之轉錄體分析 (表 2)，結果發現接種後的 SA0423 細胞內具有 21,159 個差異表現轉錄子，‘TNG67’ 則有 22,017 個，進一步排除非品系專一性之差異表現的 18,432 個轉錄子，得知於 SA0423 專一差異表現轉錄子有 2,727 個，而在 ‘TNG67’ 專一差異表現轉錄子則有 3,585 個。

將上述所發現的差異表現轉錄子，依品種 (系) 分別利用 DAVID Web site 進行 GO (gene ontology) 的註解，並建構水稻細胞接種後所

誘導的代謝路徑 (圖 2)。目前本研究已完成所有發現的差異表現轉錄子之 GO 註解，可作為重建「水稻宿主受病原菌入侵後的生理代謝」的基礎資料。同時，亦可利用參與代謝路徑的註解，進一步探討與植物與病原菌反應有關的代謝，進而篩選抗性相關基因。

接種後在兩品種 (系) 間均有差異表現轉錄子的 GO 註解結果部分，發現轉錄子可能參與在澱粉、蔗糖、含硫胺基酸 (cysteine、methionine) 及含醇基的胺基酸 (serine、threonine) 等代謝。目前，這些代謝路徑與病原菌入侵植物細胞間的關聯性，仍不清楚。而 SA0423 突變體於接種後之專一差異表現轉錄子，則可能參與胺醣 (amino sugar)、核苷酸醣 (nucleotide sugar)、乙醛酸鹽 (glyoxylate)、二羧酸鹽 (dicarboxylate) 及胺基酸 (alanine、aspartate、glutamate、arginine 及 proline) 等代謝路徑。同時，亦有部分轉錄子參與甘油磷脂 (glycerophospholipid) 及維生素 B1 (thiamine) 的代謝。其中，甘油磷脂為細胞膜的主要組成成分；而維生素 B1 可能在植物抗病機制中，扮演活化因子的角色，可誘導植物的免

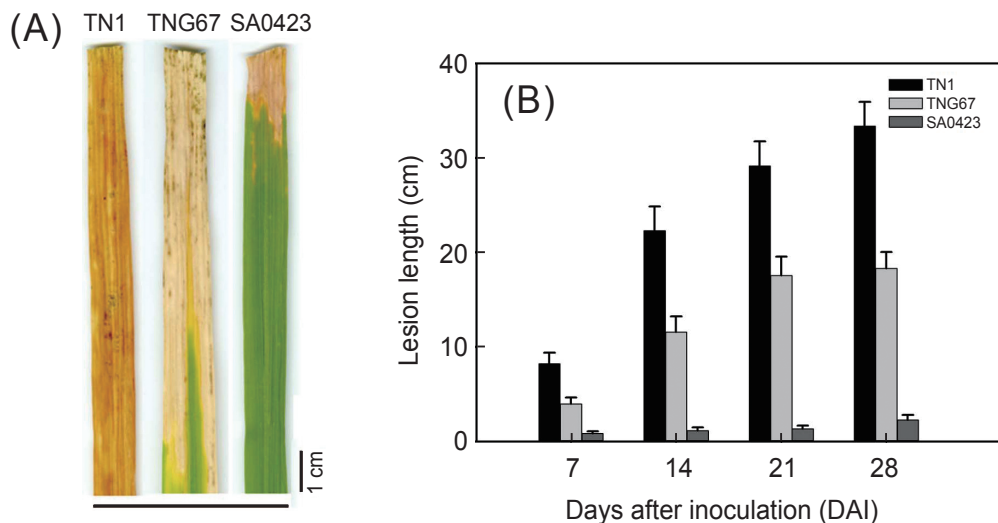


圖 1. ‘TN1’、‘TNG67’ 及 SA0423 接種白葉枯病菌 XF89b 之抗性調查。(A) 接種 28 d 的病斑外觀；(B) 接種後之病斑長度調查 (bar = Standard deviation)。

**Fig. 1.** The disease response by leaf lesion (cm) in ‘TN1’, ‘TNG67’ and SA0423 after inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b. (A) Morphology of leaf lesion at 28 days after inoculation (DAI); (B) Leaf lesion investigated at various DAI. (bar = standard deviation).

表 2. 微陣列晶片分析：轉錄子之篩選步驟、條件及數量。

Table 2. Microarray analysis: steps, conditions and number of transcripts screening.

Step	Condition	Time after infection (h)	Transcripts	
			SA0423	TNG67
Preliminary screening	Total transcript		61,713	61,713
	Deduct the controls		61,657	61,657
One-way ANOVA	Deduct expression < 50		26,900	26,900
	Compare each transcriptome of TNG67 and SA0423		22,506	23,260
Post-hoc test (SNK)	Compare the transcriptomes after inoculation with the transcriptomes at 0 h in each line	0.5	9,592	10,901
		1	12,893	11,775
		2	14,964	14,825
		6	15,466	15,102
Comparative analysis(Union)	Contain the non-line specific transcripts and line specific transcripts		21,159	22,017
Comparative analysis(Intersection)	Deduct the non-line specific transcripts (18,432 transcripts)		2,727	3,585

疫系統，使植物獲得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) (Ahn *et al.* 2005)。另一方面，‘TNG67’ 於接種後之專一差異表現轉錄子，則主要參與多醣 (N-glycan) 的合成及遺傳訊息處理 (genetic information processing)，如鹼基的切除修復 (base excision repair)、DNA 複製、核苷酸的切除修復 (nucleotide excision repair) 及同源重組 (homologous recombination) 等。此結果顯示，接種後的‘TNG67’細胞可能受到 XF89b 病菌的入侵與破壞，因而啟動核酸的修復及複製機制。但這些結果仍需進一步試驗方能證實。

### 抗性候選基因的篩選

篩選步驟首先自中國水稻數據中心、Oryzabase 及 Gramene 等網站，檢索目前已發表的白葉枯病抗性基因座。結果發現，水稻基因體中含有 42 個可能的白葉枯病抗性基因座。其中，*Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa21*、*Xa3*/*Xa26* 和 *Xa27* 等基因已被選殖及定序 (Song *et al.* 1995; Yoshimura *et al.* 1998; Iyer & McCouch 2004; Sun *et al.* 2004; Gu *et al.* 2005; Chu *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2006; Xiang *et al.* 2006)。利用「Comparative map」(Gramene Web site) 檢索這些基因座在物理圖譜的位置，

利用 OryGenesDB 網站，分析位在這些區間的差異表現轉錄子。結果發現接種後有 1,141 個為 SA0423 突變體專一表現轉錄子。進一步比對被註解的生化功能，發現有 32 個轉錄子可能與抗性有關，其中包含 *xa5* 與 *Xa25* 兩個已被選殖的抗性基因。*xa5* 編碼 RNA 聚合酶的  $\gamma$  次元 (subunit)，因發生兩個鹼基的突變，而導致胺基酸的置換，失去功能 (Iyer & McCouch 2004)。學者推論，白葉枯病菌利用第 III 型分泌系統，運送 transcription activator like effectors (TALEs) 至宿主細胞時，因 *xa5* 導致相對應的 RNA 聚合酶失活，無法與 TALEs 結合，進而無法啟動下游感性基因的表現，造成水稻的抗性表現 (Bogdanove *et al.* 2010)。然而，*Xa25* 的抗性機制，目前仍不清楚。

利用 KEGG Web site 檢索水稻中植物-病原菌交互作用路徑 (Plant-pathogen interaction-*Oryza sativa japonica*, osa04626)，發現其中 69 個基因參與此代謝路徑 (圖 3)。進一步與 SA0423 突變體專一表現轉錄子比對，結果發現 14 個轉錄子 (來自 6 個基因) 可能參與此代謝路徑 (圖 3)。其中，包含離子調控有關的基因，如 calcium-dependent protein kinase (CDPK) 與 calmodulin/calcium-binding protein (CaM/CML)；與過敏反應有關的基

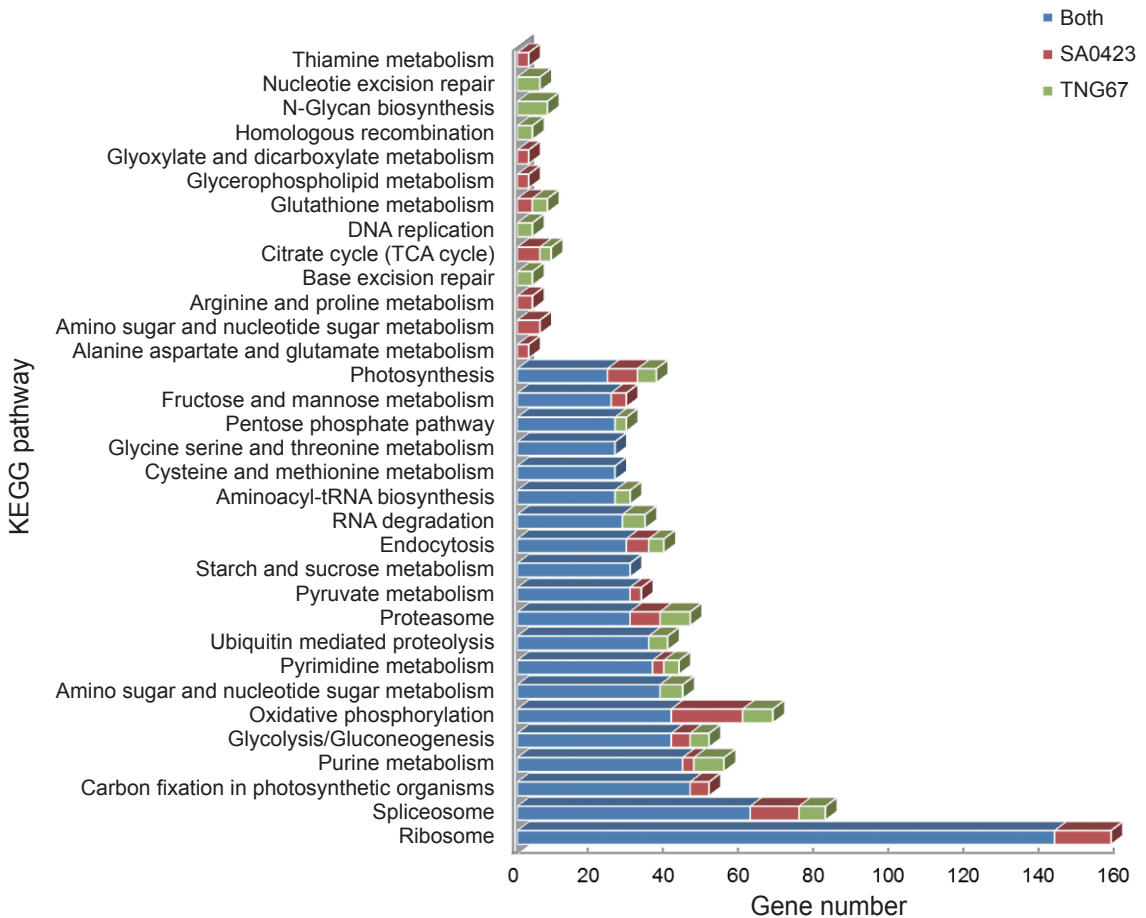


圖 2. 接種病原菌 XF89b 後，SA0423、‘TNG67’ 及同時存在兩品系之差異轉錄子所參與的代謝路徑。

**Fig. 2.** The metabolic pathways of differentially displayed transcripts present in SA0423, ‘TNG67’ and both lines in response to pathogen (XF89b) inoculation.

因，如 heat shock protein (*HSP*) 與 respiratory burst oxidase (*Rboh*)；與茉莉酸代謝途徑相關之 coronatine-insensitive protein 1 (*COII*)；及訊息傳遞相關之 mitogen-activated protein kinase kinase (*MKK*)。由轉錄體分析結果顯示，*Rboh*、*COII* 及 *MKK* 都於接種後表現量上升；*HSP* 則是表現下降；而 *CDPK* 與 *CAM/CML* 則呈現波動的表现。

再利用 BioLayout Express3D，將 SA0423 突變體專一表現轉錄子，依表現情形可分成 942 群，有 256 群在 SA0423 與 ‘TNG67’ 間呈現相反的表现趨勢。由於多數的轉錄子被註解為轉位子、逆轉位子及未知功能的蛋白質，因

而剔除這些功能未知的基因群組，結果發現僅有 18 個群組，包含有參與生理代謝的轉錄子。再依據它們被註解的生化功能，從而篩選獲得 13 個可能與抗性相關的轉錄子。

將上述篩選模式所發現的 59 個抗性相關的轉錄子，利用即時定量逆轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR) 再次分析這些基因在接種後的表现情形，發現其中 17 個轉錄子的表现與微晶片相符 (圖 4、表 3)，利用文獻探索探討這些基因與植物免疫反應的關聯性。目前已知的植物免疫系統，主要分為 3 大部分：病原相關分子型式 (microbe/pathogen-associated molecular patterns, MAMP) 的辨識、病原菌



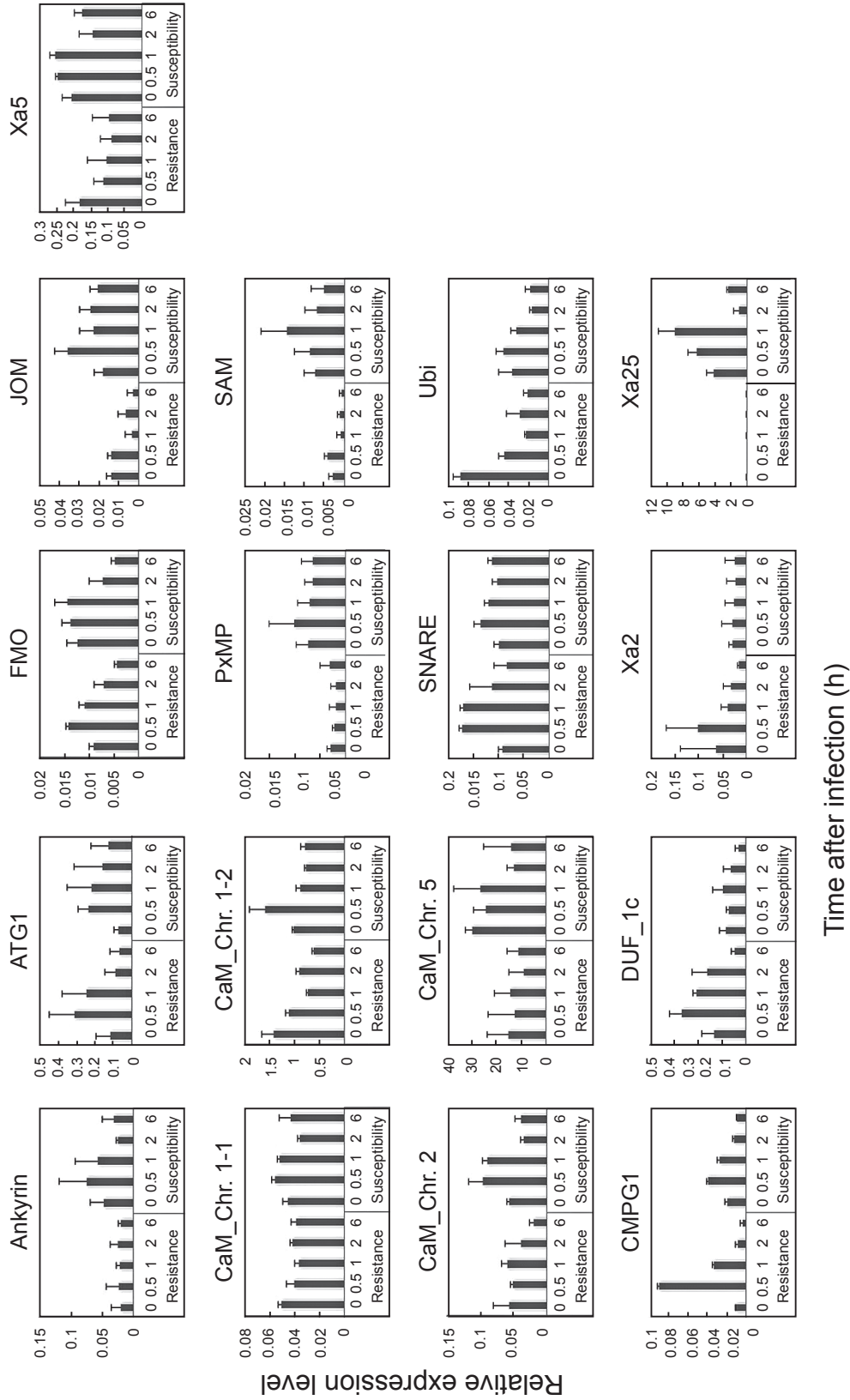


圖 4. 抗性候選基因之即時定量 RT-PCR 分析。  
Fig. 4. Real-time RT-PCR analysis of the candidate resistance genes.

表 3. 本研究篩選所得之抗性候選基因。

Table 3. The resistance gene candidates screened in this study.

Gene name		Gene ontology
<i>Ankyrin</i> , Ankyrin repeat-rich protein	BP <sup>z</sup>	Cellular process, biosynthetic process, protein modification process, post-embryonic development, anatomical structure morphogenesis, response to endogenous stimulus
	MF	Binding, protein binding, catalytic activity,
<i>ATG1</i> , ATG1	BP	Cellular process, cellular component organization, protein modification process
	CC	Plasma membrane
	MF	Molecular_function
<i>CaM_Chr.1-1</i> , OsCam1-3- Calmodulin	BP	Biological_process, response to abiotic stimulus, post-embryonic development, signal transduction
	MF	Binding, protein binding
<i>CaM_Chr.1-2</i> , OsCam3- Calmodulin	BP	Biological_process, response to abiotic stimulus, post-embryonic development, signal transduction
	MF	Binding, protein binding
<i>CaM_Chr.2</i> , EF hand family protein	BP	Protein modification process, biosynthetic process
	CC	Cytoplasm
	MF	Binding
<i>CaM_Chr.5</i> , OsCam2- Calmodulin	BP	Signal transduction
	CC	Plasma membrane
	MF	Signal transducer activity, binding, protein binding
<i>CMPG</i> , Immediate-early fungal elicitor protein CMPG1	BP	Protein modification process, biological_process
	CC	Intracellular
	MF	Catalytic activity, binding
<i>DUF26</i> , Domain of Unknown Function 26-1c	BP	Protein modification process, cellular process, metabolic process
	CC	Plasma membrane
	MF	Kinase activity, protein binding, cellular process,
<i>FMO</i> , Flavin-containing monooxygenase family protein	BP	Cell death, signal transduction, metabolic process, response to biotic stimulus, cellular process, response to stress
	CC	Endoplasmic reticulum, membrane, cell
	MF	Nucleotide binding, catalytic activity, binding
<i>JOM</i> , Jasmonate O-methyltransferase	BP	Multicellular organismal development, cellular process, metabolic process
	CC	Cellular_component
	MF	Binding, protein binding, transferase activity
<i>PxMP</i> , Peroxisomal membrane protein	BP	Biological_process
	CC	Peroxisome, membrane
	MF	Molecular_function
<i>SAM</i> , SAM dependent carboxyl methyltransferase	BP	Biological_process, cellular process, metabolic process
	CC	Cellular_component
	MF	Transferase activity
<i>SNARE</i> , SNARE associated Golgi protein	CC	Cytosol
<i>Ubi</i> , Ubiquitin family protein	MF	Molecular_function

表 3. 本研究篩選所得之抗性候選基因 (續)。

Table 3. The resistance gene candidates screened in this study. (continued)

Gene name	Gene ontology	
<i>Xa2</i> , OsSAUR21—Auxin-responsive SAUR gene family member	BP	Response to endogenous stimulus
	MF	Molecular_function
<i>Xa25</i> , Nodulin MtN3 family protein	BP	Biological_process, cellular process, transport
	CC	Plasma membrane, membrane, cell
	MF	Transporter activity
xa5, Transcription initiation factor IIA gamma chain	BP	Biosynthetic process, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
	CC	Nucleoplasm

<sup>z</sup> BP: biological\_process; CC: cellular\_component; MF: molecular\_function.

effector 蛋白質的分泌與辨識及植物宿主內部荷爾蒙合成及生理調節 (Panstruga *et al.* 2009)。而本次轉錄體分析結果發現, *CaM* 及 SNARE associated Golgi protein (*SNARE*) 可能參與在「MAMP 的辨識」機制。當植物細胞受到病原菌攻擊時, 會快速累積鈣離子, 誘導 *CaM* 的產生, 進而啟動後續免疫系統的防禦基因 (Poovaiah *et al.* 2013)。*SNARE* 是一種多功能的跨膜蛋白質, 可能藉由改變細胞壁組成份及提供抗性蛋白質等機制, 抵抗病原菌入侵 (Bassham & Blatt 2008)。另一方面, flavin-containing monooxygenase family protein (*FMO*) (Schlauch 2007)、jasmonate O-methyltransferase (*JOM*)、peroxisomal membrane protein (*PxMP*)、SAM dependent carboxyl methyltransferase (*SAM*) (Loake & Grant 2007) 及 *Xa2* (Ghanashyam & Jain 2009) 等基因, 可能參與「植物荷爾蒙合成」。

從病原菌感染至細胞內訊號傳遞等一連串的免疫反應過程, 泛素化 (ubiquitination) 扮演關鍵的角色。而泛素化過程主要受 3 種酵素的調控, 包括泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, *E1*)、泛素結合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, *E2*) 及泛素連接酶 (ubiquitin ligase, *E3*) (Furlan *et al.* 2012)。抗性相關之差異表現轉錄子 ankyrin, 經由蛋白質序列比對的分析發現與阿拉伯芥的 *E3* 具有高達 76% 的相似度, 顯示它們可能有類似的生理功能。在阿拉伯芥的研究發現, *E3* 負調控乙烯的生

合成 (Lyzenga *et al.* 2012)。因此, 水稻的 ankyrin 有可能參與乙烯生合成的調控。

我們利用上述的蛋白質序列比對模式, 結合文獻檢索, 進行其他抗性相關之差異表現轉錄子的功能預測及註解發現, *ATG1* 可能與細胞的自噬作用 (autophagy) 有關, 參與誘導受感染區域的細胞死亡, 避免病原菌持續入侵 (Zhou *et al.* 2014)。而 DUF26 是植物細胞中 15 種受體蛋白激酶 (receptor protein kinase) 家族的一員, 在阿拉伯芥的研究顯示, 受病原菌的感染、活化氧族 (reactive oxygen species, ROS) 及水楊酸等誘導, 可能參與在植物認知 (plant perception) 及逆境反應等訊息傳導路徑 (Czernic *et al.* 1999; Du & Chen 2000)。

## 結論

本研究針對具優良白葉枯病抗性之 SA0423 突變體, 利用微晶片分析技術, 探討其接種病原菌後轉錄體的變化, 分析所得之差異表現轉錄子, 利用 GO 註解來探索其所參與的代謝路徑, 發現 SA0423 突變體專一表現轉錄子, 可能參與胺醣 (amino sugar)、核苷酸醣 (nucleotide sugar)、乙醛酸鹽 (glyoxylate)、二羧酸鹽 (dicarboxylate) 及胺基酸 (alanine、aspartate、glutamate、arginine 及 proline)、甘油磷脂 (glycerophospholipid) 及維生素 B1 (thiamine) 等代謝路徑。其中, 維生素 B1 可能誘導植物的系統獲得抗性 (systemic ac-

quired resistance; SAR) (Ahn *et al.* 2005)。接著利用「是否可能與抗性機制相關」及「是否受接種所誘導表現」作為篩選原則，探索差異表現轉錄子是否參與 SA0423 突變體的抗性機制，以「已知抗性基因座的比對」、「已知『植物-病原菌交互作用』代謝路徑的比對」及「BioLayout Express3D 表現分群」等 3 種生物資訊學的分析方法，發現 59 個差異表現轉錄子可能與 SA0423 突變體的抗性機制有關。再以 real-time RT-PCR 確認基因表現，發現有 17 個候選基因可能參與 SA0423 的抗性。最後，利用「蛋白質序列比對」及「文獻檢索」，進行這 17 個候選基因的功能預測及註解，以探討其與抗病的關聯性，結果發現 *CaM* 及 *SNARE* 可能參與在已知「植物-病原菌交互作用」代謝路徑；而 *FMO*、*JOM*、*PxMP*、*SAM*、*Xa2* 及 *ankyrin* 等基因，則可能參與「植物荷爾蒙合成」；*ATG1* 可能與細胞的自噬作用有關；*DUF26* 可能參與免疫機制啟動前的訊息傳遞路徑。

這些結果顯示，本研究所建立生物資訊學的篩選模式，具有極佳的篩選效率，可快速、有效地自轉錄體分析結果，篩選出可能的抗性功能基因。未來這些基因將以功能分析確認其在 SA0423 的抗性機制中所扮演的角色，冀能開發 eQTL 分子標誌以應用於白葉枯病抗性的分子育種。

## 引用文獻

- Ahn, I. P., S. Kim, and Y. H. Lee. 2005. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol.* 138:1505–1515.
- Bai, H., L. Y. Li, and G. Z. Liu. 2006. Advances of rice bacterial blight disease resistance gene *Xa21*. *Yi Chuan* 28:745–753. (in Chinese)
- Bassham, D. C. and M. R. Blatt. 2008. SNAREs: Cogs and coordinators in signaling an development. *J. Plant Physiol.* 147:1504–1515.
- Bogdanove, A. J., S. Schornack, and T. Lahaye. 2010. TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:394–401.
- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294–5299.
- Chu, Z., M. Yuan, J. Yao, X. Ge, B. Yuan, C. Xu, X. Li, B. Fu, Z. Li, J. L. Bennetzen, Q. Zhang, and S. Wang. 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes Dev.* 20:1250–1255.
- Czernic, P., B. Visser, W. Sun, A. Savoure, L. Deslandes, Y. Marco, M. Van Montagu, and N. Verbruggen. 1999. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. *Plant J.* 18:321–327.
- Du, L. and Z. Chen. 2000. Identification of genes encoding receptor like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24:837–847.
- Furlan, G., J. Klinkenberg, and M. Trujillo. 2012. Regulation of plant immune receptors by ubiquitination. *Front. Plant Sci.* 3:1–6.
- Ghanashyam, C. and M. Jain. 2009. Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signal. Behav.* 4:846–848.
- 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.
- Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. L. Wang, and F. F. White. 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435:1122–1125.
- Hsieh, S. P. Y. 2003. Rice bacterial blight. p.317–338. *in: Plant Protection Illustrations 8: Rice Protection* (Cheng, C. H. ed.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei. 550 pp. (in Chinese)
- Huang, N., E. R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadeivel, J. Bennett, and G. S. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet.* 95:313–320.
- Iyer, A. S. and S. R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:1348–1354.
- Jiang, G. H., Z. H. Xia, Y. L. Zhou, J. Wan, D. Y. Li, R. S. Chen, W. X. Zhai, and L. H. Zhu. 2006. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog TFIIA $\gamma$ 1. *Mol. Genet. Genom.* 275:354–366.
- 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.
- Khush, G. S., D. J. Mackill, and G. S. Sidhu. 1989. Breeding rice for resistance to bacterial blight. p.207–217. in: Bacterial Blight of Rice. International Rice Research Institute. Manila. 235 pp.
- Kottapalli, K. R., N. Sarla, and S. Kikuchi. 2006. In silico insight into two rice chromosomal regions associated with submergence tolerance and resistance to bacterial leaf blight and gall midge. Biotechnol. Adv. 24:561–589.
- Lee, S. W., M. Han, C. J. Park, Y. S. Seo, L. E. Bartley, and J. S. Jeon. 2011. The molecular mechanisms of rice resistance to the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. Bot. Res. 60:52–87.
- Lee, S. W., S. W. Han, M. Sririyanyum, C. J. Park, Y. S. Seo, and P. C. Ronald. 2009. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. Science 326:850–853.
- Lin, X. H., D. P. Zhang, Y. F. Xie, H. P. Gao, and Q. Zhang. 1996. Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers. Phytopathology 86:1156–1159.
- Loake, G. and M. Grant. 2007. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. Curr. Opin. Plant Biol. 10:466–472.
- Lyzenga, W. J., J. K. Booth, and S. L. Stone. 2012. The arabidopsis ring-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropanae-1-carboxylate synthase7. Plant J. 71:23–34.
- Mew, T. W., C. M. Vera Cruz, and E. S. Medalla. 1992. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to the planting of rice cultivars in Philippines. Plant Dis. 76:1029–1032.
- Nino-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.
- Panstruga, R., J. E. Parker, and P. Schulze-Lefert. 2009. SnapShot: Plant immune response pathways. Cell 136:978e1–978e3.
- Poovaiah, B. W., L. Du, H. Wang, and T. Yang. 2013. Recent advances in calcium/calmodulin mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. J. Plant Physiol. 163:531–542.
- Sama, V. S., N. Rawat, R. M. Sundaram, K. Himabindu, B. S. Naik, B. C. Viraktamath, and J. S. Bentur. 2014. A putative candidate for the recessive gall midge resistance gene *gm3* in rice identified and validated. Theor. Appl. Genet. 127:113–124.
- Schlauch, N. L. 2007. Flavin-containing monooxygenases in plants: Looking beyond detox. TRENDS Plant Sci. 12:412–418.
- Shanti, M. L., V. V. Shenoy, G. L. Devi, V. M. Kumar, P. Premalatha, G. N. Kumar, H. E. Shashidhar, U. B. Zehr, and W. H. Freeman. 2010. Marker-assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivar and parental lines of hybrid rice. J. Plant Pathol. 92:495–501.
- Song, W. Y., G. L. Wang, L. L. Chen, H. S. Kim, L. Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. X. Zhai, L. H. Zhu, C. Fauquet, and P. Ronald. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science 270:1804–1806.
- Sun, X., Y. Cao, Z. Yang, C. Xu, X. Li, S. Wang, and Q. Zhang. 2004. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. Plant J. 37:517–527.
- Theocharidis, A., S. van Dongen, A. J. Enright, and T. C. Freeman. 2009. Network visualization and analysis of gene expression data using BioLayout Express (3D). Nat. Protoc. 4:1535–1550.
- Wang, C. S., T. H. Tseng, and C. Y. Lin. 2002. Rice biotech research at the Taiwan Agricultural Research Institute. Asia Pacific Biotech. News 6:950–956.
- Wang, C. S., A. Z. Wang, and D. G. Lin. 2013. The application of mutants in breeding disease resistance in rice. in: Special Issue or the Symposium on Important Crop Pathogen Detection and Management. (Wang, A. Z., C. S. Wang, P. J. Ann, Z. X. Yu, and H. S. Wu, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taichung. 193 pp. (in Chinese with English abstract)
- Xiang, Y., Y. Cao, C. Xu, X. Li, and S. Wang. 2006. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. Theor. Appl. Genet. 113:1347–1355.
- Yang, Z., X. Sun, S. Wang, and Q. Zhang. 2003. Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. Theor. Appl. Genet. 106:1467–1472.
- Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata, and T. Sasaki. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:1663–1668.
- Zhang, Q. 2007. Strategies for developing Green Super Rice. Proc. Natl. Acad. Sci USA 104:16402–16409.
- Zhou, J., J. Q. Yu, and Z. Chen. 2014. The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. Mol. Plant Pathol. 15:637–645.

# Transcriptomic Analysis of a Resistant Mutant in Response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Infection

Chiao-Yi Huang<sup>1</sup>, Szu-Yi Chou<sup>2</sup>, Ya-Lin Lee<sup>3</sup>, Wen-Bin Tseng<sup>1</sup>, Chun-Wei Chen<sup>4</sup>,  
Chang-Sheng Wang<sup>5,\*</sup>, and Da-Gin Lin<sup>6,\*</sup>

## Abstract

Huang, C. Y., S. Y. Chou, Y. L. Lee, W. B. Tseng, C. W. Chen, C. S. Wang, and D. G. Lin. 2015. Transcriptomic analysis of a resistant mutant in response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(2):145–158.

Bacterial blight disease, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, is one of the most serious diseases in rice. To explore novel resistant genes in SA0423, harbored with broadly resistance against rice bacterial blight disease (RBB), the transcriptomes of ‘TNG67’ and SA0423 were determined by microarray technologies with the RNA samples prepared from the leaves collected at 0, 0.5, 1, 2, and 6 h, respectively, after inoculation of XF89b, atypical isolate used in Taiwan nursery. One-way analysis of variance and Student-Newman-Keuls (SNK) test displayed that 2,727, 3,585, and 18,432 differentially displayed transcripts were found only in SA0423, ‘TNG67’, and both lines, respectively. Fifty-nine genes that might involve in providing the resistance in SA0423 were determined by bioinformatics analysis such as annotation of metabolic pathway, comparative mapping analysis with published resistance loci, “plant-pathogen interaction” pathway, and clustering with BioLayout Express3D. By confirming with real-time RT-PCR, 17 resistance gene candidates were selected in this work. Through bioinformatic analysis, results showed that they might be involved in the published “plant-pathogen interaction” pathway, biosynthetic pathway of plant hormones, autophagy and signal transduction before the plant immune system was induced. The function of these candidates will be further defined to understand the resistance mechanism of SA0423 and to develop eQTL and/or SSR markers to apply in marker-assisted selection for improving disease resistance.

**Key words:** Rice, Bacterial blight disease, Resistance, Mutant, Transcriptomes.

---

Received: August 6, 2014; Accepted: January 17, 2015.

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

<sup>1</sup> Research Assistants, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

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

<sup>5</sup> Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>6</sup> Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.