

# 葉表綠膿桿菌 *plcSR* 基因之選殖與表現及其在植物致病上扮演之角色

林宜賢<sup>1</sup> 徐世典<sup>1</sup> 黃秀珍<sup>2</sup> 曾國欽<sup>1,3</sup>

1 國立中興大學植物病理學系

2 國立中興大學生物科技學研究所

3 聯絡作者，電子郵件：kctzeng@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-22854633

接受日期：中華民國 93 年 7 月 7 日

## 摘要

林宜賢、徐世典、黃秀珍、曾國欽. 2004. 葉表綠膿桿菌 *plcSR* 基因之選殖與表現及其在植物致病上扮演之角色. 植病會刊 13:183-190.

綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 為人類及動物的伺機性病原菌，其 *plcS* 基因所產生之溶血性磷脂質分解酵素 C (hemolytic phospholipase C, PLC-H) 在毒力上扮演重要的角色。本研究應用依據綠膿桿菌 PAO1 菌株 *plcS* 基因序列所設計之引子對 PLC-F/ PLC-R，以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 測試台灣作物葉表分離之螢光假單胞菌 24 個菌株中，發現供試之 15 個綠膿桿菌菌株及 1 個 *P. fluorescens* 菌株具有 *plcS* 基因及溶血能力。本研究為植物來源 *P. fluorescens* 菌株具有 *plcS* 基因及溶血能力之首次報導。接種 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株於大蒜蒜瓣及洋蔥切片上可造成水浸狀褐化之病徵，且在密閉圓柱盒系統中可引起萵苣幼苗之軟腐，為探討 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株 *plcS* 基因在植物致病上之角色，本研究利用 PCR 技術選殖 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株之 *plcSR* 基因 (含構造基因 *plcS* 與調控基因 *plcR*)，並構築於廣寄主範圍載體 pBBR1MCS-5 中，將獲得之重組質體 pPFG1 以電轉形 (electro-transformation) 法送入不具有 *plcSR* 基因之 *P. putida* YLFP44 菌株，得到具有 PLC-H 活性，可在綿羊血培養基上形成透化溶血圈之衍生菌株 Y44P1。接種 *P. putida* Y44P1 菌株於大蒜蒜瓣、洋蔥切片及萵苣幼苗上，結果顯示 Y44P1 可在大蒜蒜瓣上引起水浸狀褐化之病徵，但不引起洋蔥切片之水浸狀褐化病徵及萵苣幼苗之軟腐，而接種僅具有選殖載體 pBBR1MCS-5 之 YLFP44 衍生菌株 Y44C1，則在大蒜蒜瓣、洋蔥切片及萵苣幼苗上皆無法形成病徵，說明 PLC-H 為 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株及 *P. putida* Y44P1 引起大蒜蒜瓣水浸狀褐化病徵之致病因子，而 PLC-H 在綠膿桿菌對洋蔥切片與萵苣幼苗之致病過程中所扮演之角色則仍待進一步探討。

關鍵詞：綠膿桿菌、*plcSR* 基因、大蒜、萵苣、洋蔥、致病因子

## 緒言

綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 為革蘭氏陰性細菌，常存在於自然環境中，一般為腐生，然有時為動物或人類之伺機性病原菌 (opportunistic pathogen)，可感染免疫能力較差，抵抗能力較弱之患者，為引起院內感染 (nosocomial infection) 之重要病菌<sup>(10)</sup>，為肺部纖維囊腫病患之主要病原 (cystic fibrosis)，嚴重時可導致病患之死亡<sup>(8)</sup>。綠膿桿菌可產生二種磷脂分解酵素 C (phospholipase C, PLC)，其中一種為溶血性的 PLC (PLC-H)，另一種為非溶血性的 PLC (PLC-N)<sup>(13)</sup>。溶血性之 PLC-H 除可在綿羊血

培養基上造成溶血圈外，亦可水解植物細胞膜的主要成分 sphingomyelin<sup>(13, 20)</sup>。由臨床所分離之綠膿桿菌菌株可產生 PLC-H，其在綠膿桿菌對人體肺部之感染扮演著重要的角色<sup>(12)</sup>。綠膿桿菌所產生溶血性之 PLC-H 係由 *plcS* 基因所轉譯出之熱不安定蛋白，而在 *plcS* 基因的下游則有二個重疊的基因 *plcR1* 及 *plcR2* (合稱 *plcR*)，雖然 *plcR* 基因產物的功能尚不甚清楚，但其基因產物可能與 PLC-H 由細胞中分泌出細胞外與調控有關<sup>(4, 14)</sup>。Rahme *et al.*<sup>(17)</sup> 將人體來源綠膿桿菌 UCBPP-PA14 菌株中與溶血有關之 *plcS* 基因進行突變，此基因之突變菌株在阿拉伯芥與老鼠上之致

病能力皆顯著下降，證明 *plcS* 基因在綠膿桿菌對阿拉伯芥與老鼠之致病上為一共同之重要毒力因子。

在台灣，由葉表上分離的綠膿桿菌可在洋蔥鱗莖上造成水浸狀褐變之現象<sup>(2)</sup>，此外綠膿桿菌亦可引起儲藏時期的大蒜蒜瓣之水浸狀褐化的病徵(未發表資料)，而許多由葉表分離之綠膿桿菌菌株，在蔬菜作物之組織上造成水浸狀病徵，並可引起馬鈴薯輕微之軟腐<sup>(1)</sup>，另 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株在密閉圓柱盒系統中亦可感染萵苣，造成萵苣軟腐之現象(未發表資料)。本研究利用聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)的方式，增幅與選殖葉表 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株之 *plcSR* 基因(包括構造基因 *plcS* 與調控基因 *plcR*)，並將其構築於可在螢光假單胞菌中穩定存在之廣寄主範圍載體 pBBR1MCS-5 中，將所獲得之重組質體送入不具 *plcSR* 基因之螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP44 中表現，並進行接種試驗，以探討綠膿桿菌 PLC-H 在植物致病上之角色。

## 材料與方法

### 供試菌株與培養基

本研究供試之 *P. aeruginosa*、*P. fluorescens*、*P. putida* 菌株及 *Escherichia coli* 菌株及質體分別列於表一及表二。

表一、本研究中所使用之供試菌株及質體

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study for *plcSR* genes cloning

Strain or plasmid	Genotype, phenotype	Reference
<b>Strains</b>		
<i>P. aeruginosa</i>		
WFP11r	Wild type strain with $\beta$ -hemolytic activity	(1)
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1</i>	(3)
TOP10F'	F' <i>{lacI<sup>q</sup>Tn10 (Tet<sup>r</sup>)}</i> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>P. putida</i>		
YLFP44	Wild type strain without $\beta$ -hemolytic activity	(2)
Y44C1	YLFP44 harboring pBBR1MCS-5; Gm <sup>r</sup>	This study
Y44P1	YLFP44 harboring pPFG1; Gm <sup>r</sup>	This study
<b>Plasmid</b>		
pCRII-TOPO	TA Cloning vector; Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pPF3	pCRII-TOPO::3.0kb <i>plcSR</i> genes; Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	This study
pP1	pCRII-TOPO::2.2kb <i>plcS</i> gene; Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	This study
pBBR1MCS-5	Broad host range cloning vector; Gm <sup>r</sup>	(11)
pPFG1	pBBR1MCS-5::3.0kb <i>HindIII</i> fragment of <i>plcSR</i> genes from pPF3; Gm <sup>r</sup>	This study

綠膿桿菌及其他螢光假單胞菌供試菌株於進行各項試驗前，先將其劃線於 King's medium B (KB)<sup>(9)</sup> 培養基上培養於 30°C，經 16 小時培養後再製備成接種源；而螢光假單胞菌之衍生菌株則使用含 20  $\mu$ g/ml gentamycin 之 KB (KBG) 培養基培養；供試之 *E. coli* 菌株培養於 Luria-Bertani (LB)<sup>(18)</sup> 培養基，必要時於培養基中添加 50  $\mu$ g/ml 之 kanamycin 或 20  $\mu$ g/ml 之 gentamycin。

### 綠膿桿菌 *plcSR* 基因之選殖、解序與偵測

*P. aeruginosa* WFP11r 菌株及其他供試菌株染色體 DNA 之抽取係參照 Sambrook *et al.*<sup>(18)</sup> 之流程進行，而 PCR 產物之選殖則依 TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Netherlands) 中廠商建議之流程進行。本研究中所使用之引子如圖一所示，而引子係依據 *P. aeruginosa* PAO1 中 *plcSR* 基因之核酸序列<sup>(16)</sup> (accession number: M13047) 所設計。引子對 PFFH/ NP-R 係用於 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株全長度 *plc* 基因 (*plcSR*) 之選殖。由於 *P. aeruginosa* PAO1 之核酸序列在 *plcSR* 基因中並無限制酵素 *HindIII* 之切位，故於此對引子上分別設計有限制酵素 *HindIII* 之切位(圖一)，使增幅產物在選殖後可利用 *HindIII* 截切，以利於將 *plcSR* 基因構築於廣寄主範圍載體 pBBR1MCS-5 中。而 PLC-F/ PLC-R 則應用於偵測供試之 *P. aeruginosa*、*P. fluorescens* 與 *P. putida* 菌株中是否有 *plcS* 基因，其餘之引

子則應用於 *plcSR* 基因之解序(圖一)。PCR 增幅為在 20  $\mu$ l 總反應液中包括 200ng 的模版 DNA、0.25  $\mu$ M 的各個引子、0.25mM 的 dNTP、1 $\times$ PCR 緩衝液，DNA 聚合酵素於 *plcSR* 基因選殖時，使用 0.8U Ex Taq DNA polymerase (Takara Shuzo, Japan)，而於 *plcS* 基因之偵測時則使用 0.8U GenTaq DNA polymerase (GeneMark Technology, Taiwan)。反應液於 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer, CT.) 中進行增幅反應 (Step 1: 94 $^{\circ}$ C, 10min. Step 2: 94 $^{\circ}$ C, 1min; 55 $^{\circ}$ C, 30 sec; 72 $^{\circ}$ C, 1min; 30 cycles. Step 3: 72 $^{\circ}$ C, 10min)。將上述由引子對 PFFH/ NP-R 及 PLC-F/ PLC-R 增幅 *P. aeruginosa* WFP11r 之模版 DNA 所得到大小分別約為 3.0kb (*plcSR*) 及 2.2kb (*plcS*) 之條帶回收後，以 TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Netherlands) 選殖於 *E. coli* TOP10F' 中。進一步將選殖於 *E. coli* TOP10F' 中之重組質體分別以限制酵素 (New England Biolabs, England) 截切，再利用凝膠電泳分析，確認重組質體 pPF3 及 pP1 中選殖片段之大小分別與 *plcSR* 及 *plcS* 基因片段之大小一致後，將選殖株委由明欣生物科技公司 (Mission Biotech, Taiwan) 進行選殖基因片段核酸序列之解序，再依據解序之結果設計引子向基因內繼續解序(圖一)，並將選殖基因之完整序列於 NCBI 以 BLAST2<sup>(19)</sup> 與線上基因庫進行比對分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

## 南方雜合反應

為確認在螢光假單胞菌 *plcS* 基因之偵測試驗中，各菌

表二、以綠膿桿菌及其他螢光假單胞菌菌株之溶血能力及應用 PCR 技術偵測 *plcS* 基因

Table 2. Hemolytic activity assay and detection of *plcS* gene in strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* by polymerase chain reaction with primer pairs PLC-F/ PLC-R

Strain <sup>1</sup>	PCR product (2.2kb)	Hemolytic activity
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
WFP11r, WFP23, WFP25, WFP33, WFP34, WFP35, WFP36, WFP52, WFP63, WFP66, WFP68, WFP125, WFP131, WFP135r, WFP171	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>		
YLFP6, YLFP10, YLFP14, YLFP44, YLFP56, YLFP63	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
YLFP83, FP45	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
YLFP8	+	+

<sup>1</sup> All strains were isolated from plants in Taiwan and maintained in the Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan<sup>(1,2)</sup>.

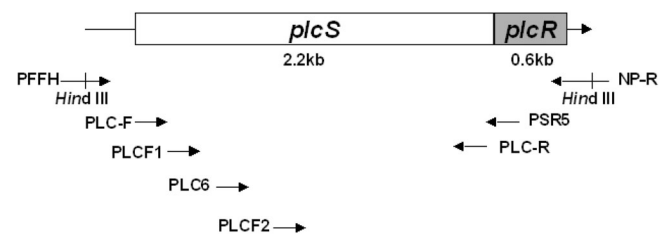
株利用引子對 PLC-F/ PLC-R 所增幅出之 2.2kb 大小之片段具同源性，本研究以南方雜合反應進行測試。南方雜合反應係參照 Sambrook *et al.*<sup>(18)</sup> 之流程進行，將瓊脂凝膠上的 PCR 產物轉漬於尼龍 (nylon) 膜上。而探針之製備係採用非放射性之 NEBlot Phototope kit (New England BioLabs, England) 進行標幟，將含有 *plcS* 之重組質體 pP1 經限制酵素截切後，回收大小為 2.2kb 之片段進行標幟，並將所得帶 Biotin 標幟之探針 P-PLC 與上述固定於尼龍膜上之 DNA 於 60 $^{\circ}$ C 中進行雜合反應，經 Streptavidin-alkaline phosphatase (NEN, Boston, MA) 與 Biotin 結合後，利用 CDP-Star (Tropix, MA) 作為基質，反應 15 分鐘後，將其壓片於 Scientific Imaging Film (Biomax- ML, Kodak, NY) 上，並觀察底片上是否產生專一性之雜合訊號。

## 溶血能力之測定

以牙籤挑取新鮮培養於 KB 培養基上供試細菌之菌落，將其點於含有 5% 綿羊血之培養基 (Becton Dickinson, NJ) 上，於 30 $^{\circ}$ C 培養 48 小時之後，觀察是否可造成綿羊血培養基之溶血透化現象。

## 含 *plcSR* 基因重組質體之構築

將選殖有 *plcSR* 基因之重組質體 pPF3 以限制酵素 *Hind*III (New England Biolab, England) 截切後回收大小為 3.0kb 之片段，並利用 T4 DNA ligase (Epicentre technologies, WI) 將 *plcSR* 基因構築於一可在 *Pseudomonas*



圖一、*Pseudomonas aeruginosa* WFP11r *plcSR* 基因之選殖、解序及偵測用之引子

Fig. 1. Primers used for cloning, sequencing and detection of *plcSR* genes from *Pseudomonas aeruginosa* WFP11r (Primers for cloning: PFFH, GAA\*AGCTTTCAATAA AATGTGA; NP-R, GTGGA\*AGCTTTCAGCGTTGCAG; sequence recognized by restriction enzyme *Hind*III is underlined; \* indicates where the *Hind*III cuts. Primers for detection: PLC-F, GATGACCGAAAAGTGG; PLC-R, GCTTCAGGTCGCTGCGA. Primers for sequencing: PLCF1, GCGCTCAAGCGCCAG; PLCF2, GAACCGCC TCTACCAC; PLCF2, GACCAGTTGCGCAAGGAT; PSR5, GTTGCTGTTCCAGGTTGTC.)

*putida* 等多種革蘭氏陰性細菌內複製之廣寄主範圍質體 pBBR1MCS-5<sup>(11)</sup> 中，再將重組質體經熱休克轉形作用送入 *E. coli* DH5  $\alpha$  中，於含 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之 gentamycin 之 LB 平板上篩選及利用限制酵素確認選殖片段之大小，以獲得含 *plcSR* 基因可在螢光假單胞菌中表現 PLC-H 之重組質體。

### 螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP44 之轉形作用

本項試驗係利用電轉形 (electro-transformation) 法進行螢光假單胞菌之轉形作用，參照 Enderle 及 Farwell<sup>(6)</sup> 所述之方式進行勝任細胞之製備，先挑取不具 *plcS* 基因與不具溶血能力之 *P. putida* YLFP44 之單一菌落，培養於 KB 平板上 16 個小時 (30°C)，再利用 5% 甘油將菌體由 KB 平板洗下。將細菌懸浮液分裝於離心管中以 5000  $\times g$  離心後，再以 10ml 5% 甘油清洗二次，最後以 1ml 5% 甘油懸浮使其最終濃度達  $1 \times 10^9$  CFU/ml，並分裝 100  $\mu\text{l}$  於微量離心管中。再將含 *plcSR* 基因之重組質體 DNA 或載體 pBBR1MCS-5 加入上述含 *P. putida* YLFP44 勝任細胞之微量離心管中，均勻混合後吸取至溝槽寬度為 0.2 cm 之 Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad Laboratories, CA)，並利用 Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, CA) 進行電轉形，其條件如下：2.5 kV (12.5kV/cm)、25  $\mu\text{F}$  及 200  $\Omega$ <sup>(5,7)</sup>。在電轉形完成後迅速加入 250  $\mu\text{l}$  之 LB 液態培養基，並將此混合液吸取至新的微量離心管中震盪培養 1 小時 (200 rpm, 30°C)。吸取 100  $\mu\text{l}$  之培養液塗抹於 KBG 培養基，篩選出具有重組質體或載體 pBBR1MCS-5 之衍生菌株，以供進一步分析此些衍生菌株之溶血能力及病原性。

### 病原性測定

為探討 PLC-H 在植物致病上之角色，將 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株及 *P. putida* 衍生菌株接種於植物組織上測試其病原性。將去皮之大蒜蒜瓣及洋蔥切片以 70% 之酒精表面消毒，並於無菌水中漂洗三次後，再將 *P. aeruginosa* WFP11r 及所獲得之 *P. putida* 衍生菌株以牙籤由 KB 或 KBG 培養基上挑取一菌落，穿刺接種於上述消毒過之大蒜蒜瓣或洋蔥切片，放置於含浸濕濾紙之培養皿中，於 30°C 中經 2 天後觀察有無病徵之出現。萵苣幼苗之接種則於含泥炭土之透明塑膠圓柱盒 (直徑 11 公分，高 9.5 公分) 系統中進行，將 150ml 由各供試菌株製備之細菌懸浮液 (約  $3 \times 10^8$  CFU/ml) 與滅過菌之泥炭土 150g (1:1) 混合後，平均分裝於 3 個透明塑膠圓柱盒中，並分別在每個圓柱盒中播種 16 顆消毒過的萵苣種子，將盒蓋蓋上並以 parafilm 密封放置於日溫 28°C (16 小時)、夜溫 24°C (8 小時) 之生長箱中，於 7 天後觀察發芽之幼苗有無軟腐病徵。

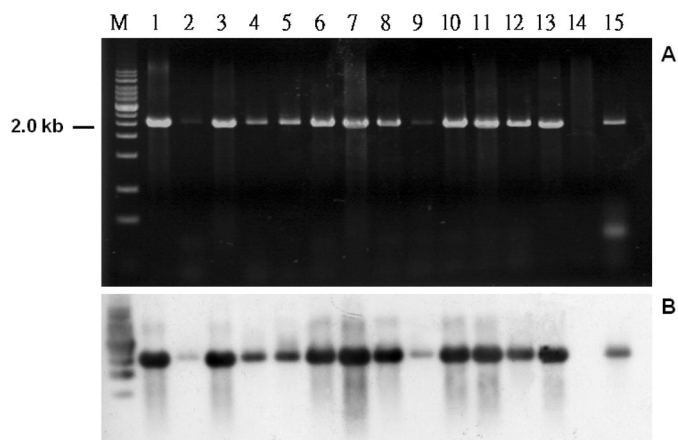
## 結 果

### 綠膿桿菌 *plcSR* 基因之選殖與解序

以引子對 PFFH/ NP-R 增幅 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株之 DNA，可增幅出大小為 3.0kb 之 *plcSR* 基因，經選殖於 pCRII-TOPO 載體後得到 pPF3 重組質體。利用本研究中設計之引子 PLCF1、PLCF2、PLC6、PLC-R、PSR5 進行重組質體 pPF3 中 *plcSR* 基因之解序，並將所得核酸序列於線上基因庫進行比對後，結果顯示與 *P. aeruginosa* PAO1 菌株之 *plcS* 基因與 *plcR* 基因皆有 99% 之相同度 (identity)，將其核酸序列轉譯為氨基酸序列，經比對後亦顯示與 *P. aeruginosa* PAO1 菌株之 PLC-H 及 *PlcR* 分別有 97% 及 99% 之相似度 (similarity)。

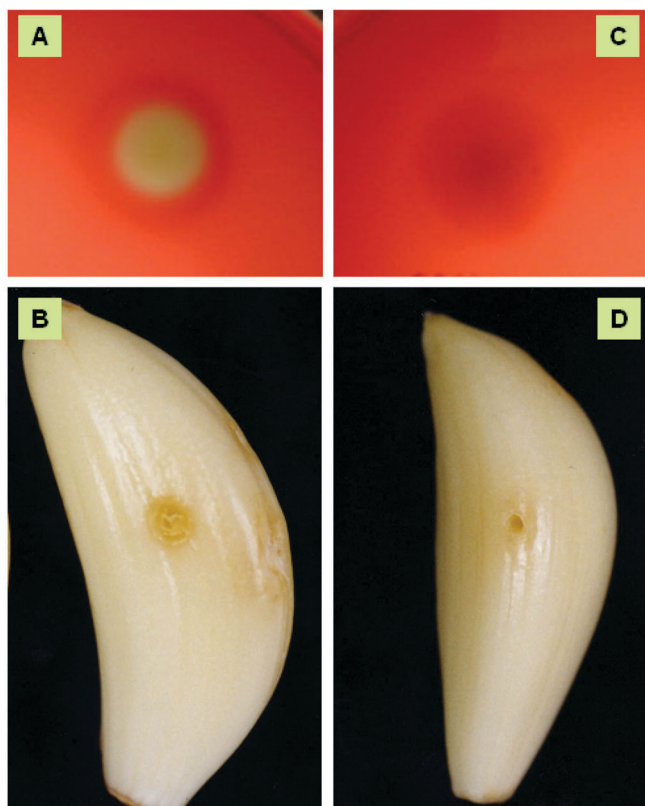
### 螢光假單胞菌 *plcS* 基因之偵測與溶血能力之測定

以引子對 PLC-F/ PLC-R 偵測葉表螢光假單胞菌菌株中之 *plcS* 基因，結果顯示所有供試之 15 個 *P. aeruginosa* 菌株均能增幅出 2.2kb 之條帶，而除了 *P. fluorescens* YLFP8 菌株外，供試之其餘 8 個 *P. fluorescens* 與 *P. putida* 菌株皆無法增幅出此 2.2kb 大小之條帶 (圖二A、表二)。



圖二、以偵測 *plcS* 基因之引子對 PLC-F/ PLC-R 應用聚合酶連鎖反應對供試之綠膿桿菌及其他螢光假單胞菌菌株全 DNA 增幅之瓊脂凝膠電泳圖譜 (A) 及利用選殖自 *Pseudomonas aeruginosa* WFP11r 菌株之 P-PLC 探針進行之南方雜合反應 (B)。

Fig. 2. Agarose gel of electrophoretic patterns of polymerase chain reaction products of total DNAs from strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* strains with primer pairs PLC-F/ PLC-R for detection of *plcS* gene (A) and southern hybridization of the patterns with P-PLC probe cloned from *P. aeruginosa* WFP11r (B). Lanes 1-13: *P. aeruginosa* strains WFP11r, WFP23, WFP25, WFP33, WFP34, WFP35, WFP52, WFP63, WFP66, WFP125, WFP131, WFP135r and WFP171; Lanes 14-15: *P. putida* YLFP44 and *P. fluorescens* YLFP8, respectively; M, Gen-KB DNA ladder (GeneMark Technology, Taiwan).



圖三、含綠膿桿菌 *plcSR* 基因之 *Pseudomonas putida* 衍生菌株 Y44P1 及僅含選殖載體 pBBR1MCS-5 之衍生菌株 Y44C1 在 5% 綿羊血培養基上之溶血能力 (A: Y44P1; C: Y44C1) 及接種此兩種衍生菌株於大蒜蒜瓣 48 小時後之病徵 (B: Y44P1; D: Y44C1)。

Fig. 3. Hemolytic activity of *Pseudomonas putida* derivative Y44P1 (harboring *plcSR* genes cloned from *P. aeruginosa* WFP11r) and derivative Y44C1 (harboring only the cloning vector pBBR1MCS-5) on 5% sheep blood agar (A: Y44P1; C: Y44C1) and symptoms showed on garlic bulb tissues 48hr after inoculation with *P. putida* derivative Y44P1 and *P. putida* derivative Y44C1, respectively (B: Y44P1; D: Y44C1).

利用 *P. aeruginosa* WFP11r 之 *plcS* 所製備成之探針 P-PLC 進行南方雜合反應，結果顯示所有供試之 *P. aeruginosa* 菌株及 *P. fluorescens* YLFP8 菌株所增幅出之條帶均呈現專一性之雜合訊號 (圖二B)。測試綠膿桿菌及其他螢光假單胞菌菌株之溶血能力，結果顯示供試之綠膿桿菌菌株均可在綿羊血培養基上造成溶血透化圈；而其他螢光假單胞菌菌株中，則僅 *P. fluorescens* YLFP8 菌株可造成溶血透化圈 (表二)。

### *Pseudomonas fluorescens* YLFP8 菌株 *plcS* 基因之核酸序列

將 *P. fluorescens* YLFP8 菌株增幅出之 2.2kb 條帶，進一步以選殖 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株 *plcS* 基因之相同方



圖四、在大蒜蒜瓣接種 *Pseudomonas aeruginosa* WFP11r 菌株 48 小時後所形成之水浸狀褐化病徵 (A: 不接種細菌之對照組; B: 接種 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株)。

Fig. 4. Water-soaked browning symptoms on garlic bulb tissues 48hr after inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* strain WFP11r (A: The control garlic bulb tissues; B: The garlic bulb tissues inoculated with *P. aeruginosa* WFP11r).

法進行選殖及解序，於 NCBI 以 BLAST2 與線上基因庫比對之結果顯示，其核酸序列分別與 *P. aeruginosa* PAO1 及 WFP11r 菌株之 *plcS* 基因皆有 99% 之相同度。

### 綠膿桿菌 *plcSR* 基因在 *Pseudomonas putida* YLFP44 菌株中之表現

將綠膿桿菌 *plcSR* 基因構築於 pBBR1MCS-5 載體中所獲得之重組質體 pPFG1，以電轉形法送入不具 *plcS* 基因與溶血能力之 *P. putida* YLFP44 菌株後，得到具 *plcSR* 基因之衍生菌株 Y44P1，在含 5% 綿羊血之培養基中可造成溶血之透化圈 (圖三A)，而將上述未構築任何基因之 pBBR1MCS-5 載體亦以電轉形法送入 *P. putida* YLFP44 菌株中，所獲得只含 pBBR1MCS-5 載體之衍生菌株 Y44C1 在綿羊血培養基中，則無法產生溶血之透化圈 (圖三C)。

### 病原性測定

在大蒜蒜瓣上，接種 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株可造成水浸狀褐化之病徵，之後由於綠膿桿菌可產生綠膿素 (pyocyanin)，在接種部位常呈現藍綠色 (圖四)。在大蒜蒜瓣上接種具溶血能力之衍生菌株 Y44P1，亦可引起水浸狀褐化之病徵 (圖三B)，而接種具溶血性之 *P. fluorescens* YLFP8 菌株於大蒜蒜瓣上，所引起之水浸狀褐化之病徵，亦與圖三B 相似，顯示供試具溶血能力之菌株，皆可引起大蒜蒜瓣之水浸狀褐化病徵，但接種不溶血之 *P. putida* YLFP44 及其不具溶血能力之衍生菌株 Y44C1，則不引起大蒜蒜瓣之水浸狀褐化之病徵 (圖三D)。在洋蔥切片上，接種 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株可引起洋蔥組織之水浸狀

褐化病徵，然接種 *P. fluorescens* YLFP8 或 *P. putida* 衍生菌株 Y44P1 及 Y44C1，則皆不引起上述病徵；在萵苣上，*P. aeruginosa* WFP11r 菌株可造成 76.7% 萵苣幼苗之軟腐，而 *P. putida* 衍生菌株 Y44P1 與 Y44C1，則均無法引起萵苣幼苗之軟腐。

## 討 論

本研究應用以綠膿桿菌 *plcS* 基因所設計之引子對 PLC-F/ PLC-R，偵測 *plcS* 基因在葉表螢光假單胞菌存在之情形，結果顯示 *plcS* 基因廣泛存在於綠膿桿菌中。而以此引子對偵測其他葉表 *P. fluorescens* 及 *P. putida* 菌株時，發現在 *P. fluorescens* YLFP8 菌株亦可增幅出 2.2kb 之條帶。以核酸探針 P-PLC 進行之南方雜合反應中，亦顯示其與綠膿桿菌之 *plcS* 基因具同源性，此菌株在綿羊血培養基上亦可造成溶血現象，而其他無法增幅出 2.2kb 專一性條帶之葉表 *P. fluorescens* 及 *P. putida* 菌株，將其染色體 DNA 經核酸探針 P-PLC 雜合後，均未顯現雜合訊號，可證實在此些菌株中不具有 *plcS* 基因之存在(未發表資料)。由 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株選殖之 *plcS* 基因，在核酸序列上與 *P. aeruginosa* PAO1 菌株之 *plcS* 基因具有 99% 之相同度；而由 *P. fluorescens* YLFP8 菌株 DNA 所增幅片段之核酸序列，與 *P. aeruginosa* PAO1 及 WFP11r 菌株之 *plcS* 基因亦有 99% 之相同度；然由 *P. fluorescens* YLFP8 菌株中選殖之 *plcS* 基因，與 *P. fluorescens* DSMZ50090 菌株中一不造成溶血之 *pc-plc* 基因(accession number: AJ304443) 則不具相似性<sup>(15)</sup>。本研究為植物來源 *P. fluorescens* 菌株中發現具有 *plcS* 基因及溶血能力之首次報導。由於螢光假單胞菌染色體基因間常有轉移之現象<sup>(21)</sup>，因此推測 *P. fluorescens* YLFP8 菌株之 *plcS* 基因可能是由綠膿桿菌經水平轉移而得。

溶血性之 PLC-H 在綠膿桿菌對人體肺部的感染上扮演著重要的毒力因子<sup>(12)</sup>，而有關 PLC-H 在綠膿桿菌對植物致病機制上之探討則甚少。本研究應用引子對 PFFH/ NP-R 增幅 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株之 *plcSR* 基因，將其構築於 pBBR1MCS-5 中，再以電轉形法送入不具 *plcSR* 基因與溶血能力之 *P. putida* YLFP44 菌株中，結果顯示獲得綠膿桿菌 *plcSR* 基因之衍生菌株 Y44P1 可在含綿羊血之培養基上產生溶血透化之現象，而僅含有載體之衍生菌株 Y44C1 則不具有溶血能力，證明此溶血透化之現象，係由所選殖之 *plcSR* 基因在衍生菌株 Y44P1 中表現出 PLC-H 所致。綠膿桿菌可引起儲藏期之大蒜蒜瓣之水浸狀褐化病徵，本研究也顯示葉表分離之 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株及具溶血能力之 *P. fluorescens* YLFP8 菌株，亦可引起大蒜蒜瓣之水浸狀褐化的病徵，與綠膿桿菌在儲藏期於大蒜蒜瓣上所造成之病徵相似。本研究將電轉形後獲得 *plcSR* 基因與溶血能力之衍生菌株 Y44P1 接種於大蒜蒜瓣上，發現

亦能引起相似之褐化水浸狀病徵，而不帶 *plcSR* 基因及不具溶血能力的 Y44C1 衍生菌株則否，此結果顯示綠膿桿菌在大蒜上所造成的病徵與溶血性 PLC-H 的產生有關。Rahme *et al.*<sup>(17)</sup> 之研究將 *plcS* 基因突變後，造成綠膿桿菌於阿拉伯芥生態型 *Llagostera* 葉片上之致腐能力消失，顯示 *plcS* 基因與綠膿桿菌在阿拉伯芥上之致腐能力有關。然本研究中具溶血能力之 *P. aeruginosa* WFP11r 菌株可引起洋蔥切片水浸狀褐化之病徵，且在密閉圓柱盒系統中亦可引起萵苣幼苗之軟腐，然接種具 PLC-H 之 *P. fluorescens* YLFP8 菌株或衍生菌株 Y44P1 則均不會引起洋蔥水浸狀褐化及萵苣幼苗軟腐之病徵，顯示僅有 PLC-H 仍無法使 *P. fluorescens* YLFP8 及 Y44P1 引起洋蔥之水浸狀褐化與萵苣軟腐，因此推測綠膿桿菌在造成洋蔥水浸狀褐化及萵苣軟腐的致病過程上可能需要其他因子之參與。由於 Rahme *et al.*<sup>(17)</sup> 的研究中亦顯示綠膿桿菌對生態型 *Argentat* 之阿拉伯芥葉片亦不具致腐能力，可推測具 *plcS* 基因之 *P. fluorescens* YLFP8 菌株或衍生菌株 Y44P1 不引起洋蔥水浸狀褐化及萵苣軟腐之病徵，亦可能受作物種類之不同而影響。而 PLC-H 在綠膿桿菌對洋蔥切片或萵苣幼苗之致病過程中，PLC-H 所扮演的角色則仍待進一步探討。

## 引用文獻

1. 汪鴻文. 1997. 植物葉表綠膿桿菌之特性分析。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 56pp。
2. 曾國欽、林元春、徐世典. 1994. 台灣作物葉表螢光假單胞菌及其對植物病原細菌之拮抗作用. 植病會刊 3: 24-33。
3. Brown, T. A. 1991. Molecular Biology LABFAX. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
4. Cota-Gomez, A., Vasil, A. I., Kadurugamuwa, J., Beveridge, T. J., Schweizer, H. P., and Vasil, M. L. 1997. PlcR1 and PlcR2 are putative calcium-binding proteins required for secretion of the hemolytic phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 65:2904-2913.
5. Diver, J. M., Bryan, L. E., and Sokal, P. A. 1990. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. Anal. Biochem. 189:75-79.
6. Enderle, P. J., and Farwell, M. A. 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. Biotechnology 25:955-957.
7. Francois, A., Vilagines, R., and Danglot, C. 1997. High-efficiency transposon mutagenesis by electroporation of a *Pseudomonas fluorescens* strain. FEMS Microbiol. Lett. 152:363-369.
8. Govan, J. R. W., and Deretic, V. 1996. Microbial

- pathogenesis cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60:539-574.
9. King, E. O., Ward, M. D., and Raney, E. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
  10. Kominos, S. D., Copeland, C. E., Grosiak, B., and Postic, B. 1972. Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Appl. Microbiol.* 24:567-570.
  11. Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., and Peterson, K. M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
  12. Kurioka, S., and Liu, P. V. 1967. Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase C activity. *J. Bacteriol.* 93:670-674.
  13. Ostroff, R. M., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172:5915-5923.
  14. Ostroff, R. M., and Vasil, M. L. 1987. Identification of a new phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 169:4597-4601.
  15. Preuss, I., Kaiser, I., and Gehring, U. 2001. Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Eur. J. Biochem.* 268:5081-5091.
  16. Pritchard, A. E., and Vasil, M. L. 1986. Nucleotide sequence and expression of a phosphate-regulated gene encoding a secreted hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 167:291-298.
  17. Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., and Ausubel, F. M. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268:1899-1902.
  18. Sambrook, J., Maniatis, T. I., and Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York.
  19. Tatusova, T. A., and Madden, T. L. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250.
  20. Topfer, R., Martini, N., and Schell, J. 1995. Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268:681-686.
  21. Troxler, J., Azelvandre, P., Zala, M., Defago, G., and Haas, D. 1997. Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:213-219.

## ABSTRACT

Lin, Y. H.<sup>1</sup>, Hsu, S. T.<sup>1</sup>, Huang, H. C.<sup>2</sup>, and Tzeng, K. C.<sup>1,3</sup> 2004. Cloning of *plcSR* genes from foliar *Pseudomonas aeruginosa* WFP11r and the role of hemolytic phospholipase C in pathogenesis on plants. *Plant Pathol. Bull.* 13:183-190. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan; <sup>2</sup> Graduate Institute of Biotechnology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan; <sup>3</sup> Corresponding author, E-mail: kctzeng@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22854633)

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen of human and animal. Hemolytic phospholipase C (PLC-H) encoded on *plcS* gene plays an important role in its virulence factor on animal and human host. We detected the presence of *plcS* gene in 24 strains of foliar fluorescent pseudomonads in Taiwan by PCR with primer pair PLC-F/ PLC-R designed based on the sequence of *plcS* gene of *P. aeruginosa* PAO1 (accession number: M13047). All 15 strains of *P. aeruginosa* and one strain of *P. fluorescens* strain YLFP8 were found to carry *plcS* gene and were hemolytic. This is the first report of hemolytic *P. fluorescens* strain occurred on plant. *P. aeruginosa* WFP11r induced water-soaked browning symptoms on garlic and onion bulb tissues and caused soft rot of lettuce seedlings. To elucidate the role of *plcSR* genes in the pathogenesis on plants, *plcSR* genes from *P. aeruginosa* WFP11r were cloned by PCR. The cloned *plcSR* genes were further constructed into a broad host range plasmid pBBR1MCS-5, and a resulted recombinant plasmid pPFG1 was then transformed into *P. putida* YLFP44 (a strain without *plcSR* genes) by electroporation. A derivative Y44P1 with *plcSR* genes and hemolytic activity was obtained. Inoculation of garlic bulb tissues with Y44P1 produced similar water-soaked browning symptoms on garlic bulb tissues, whereas Y44C1 (a strain derived from YLFP44, harboring only the cloning vector pBBR1MCS-5) did not, indicating PLC-H played an important role in pathogenesis on the garlic tissues. However, soft rot on lettuce seedlings and water-soaked browning symptoms on onion bulb tissues, which could be caused by *P. aeruginosa* WFP11r, were not induced by both derivatives Y44P1 and Y44C1. The results suggested that other factors might be involved in the pathogenesis on lettuce and onion caused by *P. aeruginosa* WFP11r.

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, *plcSR* genes, garlic, lettuce, onion, pathogenesis