

# 貝萊斯芽孢桿菌FZB42之*dfn*基因簇拮抗 馬鈴薯瘡痂病菌之角色探討

江庭曜<sup>1</sup>、林芝榕<sup>2</sup>、蔡佳欣<sup>3</sup>、陳穎練<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 國立臺灣大學植物病理與微生物學系，臺灣臺北市。

<sup>2</sup> 臺北市立第一女子高級中學，臺灣臺北市。

<sup>3</sup> 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組，臺灣臺中市。

\* 聯絡作者，E-mail: ychen28@ntu.edu.tw

## 摘要

江庭曜、林芝榕、蔡佳欣、陳穎練。2021。貝萊斯芽孢桿菌FZB42之*dfn*基因簇拮抗馬鈴薯瘡痂病菌之角色探討。植物醫學64(1): 25-34。

馬鈴薯為世界上四大重要作物之一，而瘡痂病為馬鈴薯常見病害，主要病原為馬鈴薯瘡痂病菌 (*Streptomyces scabies*)，造成薯塊表面木栓化病斑，使馬鈴薯薯塊品質降低。本實驗室研究發現液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) Ba01能有效抑制瘡痂病菌生長及降低罹病度。為找出可能影響芽孢桿菌抑制瘡痂病菌的作用機制，本實驗利用模式菌株貝萊斯芽孢桿菌 (*Bacillus velezensis*) FZB42搭配隨機突變系統進行試驗，再以突變株比較野生株拮抗瘡痂病菌之能力差異，推測二次代謝物difficidin (*dfn*) 基因影響其抑制瘡痂病菌的能力。為證實此一推測，本實驗以*dfn*基因簇 (gene cluster) 及基因簇中J區域 (*dfnJ* domain) 進行目標基因突變。發現*dfn*基因簇與*dfnJ* domain突變株與野生株*B. velezensis* FZB42比較，其抑制瘡痂病菌能力皆顯著降低，而*dfnJ* domain互補株則回復似野生株抑菌能力。以上結果顯示*B. velezensis* FZB42 *dfn*基因簇與*dfnJ* domain於抑制馬鈴薯瘡痂病菌機制扮演重要角色。

關鍵詞：馬鈴薯瘡痂病，馬鈴薯瘡痂病菌，貝萊斯芽孢桿菌，difficidin

## 緒言

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 為茄屬的一年生草本植物，是世界上最重要的糧食作物之一，並與小麥、玉米及稻米並稱四大糧食作物。根據聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 的數據，2019年世界上

馬鈴薯產量約為370,436,581公噸，在台灣馬鈴薯每年總產量約為52,000公噸，產值達6億新台幣。

馬鈴薯易遭受病害所侵染，常見馬鈴薯病害包括晚疫病 (late blight)、瘡痂病 (common scab)、青枯病 (bacterial wilt)、軟腐病 (soft rot) 及病毒病害。馬鈴薯瘡痂病由三種以上放線菌目 (Actinomycetales) 的革蘭氏陽性菌鏈黴菌屬 (*Streptomyces* spp.) 病原造成，包含*Streptomyces scabies*、*S. acidiscabies*、*S. turgidiscabies*等多種病原，其中又以*S. scabies*為最主要的病原<sup>(10, 17)</sup>。鏈黴菌屬為絲狀細菌，菌絲有分枝可分化形成鏈狀成熟的孢子絲，而後分割生成大量孢子<sup>(11)</sup>。馬鈴薯瘡痂病原可藉由腐生行為在土壤、植株殘體及薯塊越冬，再經由薯塊的氣孔或皮目等天然開口及傷口進入並感染薯塊。典型的病徵為薯塊表面突起並形成黑褐色木栓化瘡痂，嚴重病徵則可發現薯塊凹陷腐爛，此病徵使商品價值大幅減少。馬鈴薯瘡痂病的病原性源自於植物毒素thaxtomins、concanamycins、borrelidin及FD-891造成<sup>(1, 18)</sup>，其中又以thaxtomin A為主，其會作用於植物細胞壁上並作為纖維素合成酶的抑制劑造成植物細胞壁肥大、細胞肥大及破壞細胞壁完整性，而使植物產生系統性細胞凋亡<sup>(11, 15)</sup>。

馬鈴薯瘡痂病造成馬鈴薯經濟價值上的嚴重損失，然而目前台灣沒有推薦的預防方法及藥劑施用。因此，近年來，學術研究上琢磨在生物防治對於馬鈴薯瘡痂病的效果，而常見的生物防治拮抗菌含非病原性的*Streptomyces*、*Pseudomonas*和*Bacillus*等。根據實驗室前人研究，發現液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) Ba01在盆栽試驗及田間試驗都具有抑制馬鈴薯瘡痂病的能力，且二次代謝物表面素 (surfactin) 扮演抑制瘡痂病菌之重要角色，但由於Ba01為非馴化菌株，於基因層次研究不易進行，而食品工業發展研究所提供之菌株貝萊斯芽孢桿菌 (*B. velezensis*) FZB42，原分類於液化澱粉芽孢桿菌，近年來研究中，與液化澱粉芽孢桿菌之多個菌株常被鑑定為枯草桿菌群 (*Bacillus subtilis* group) 下之種類，且此菌為全基因體解序的標

準菌株，經實驗亦對於馬鈴薯瘡痂病菌具有顯著的抑制效果，因此本實驗選用貝萊斯芽孢桿菌更易於完成後續基因層次實驗。

貝萊斯芽孢桿菌為革蘭氏陽性菌，可生長條件極廣、活性強，生長最適溫度為30-40°C，可適應pH 5-10的環境<sup>(6)</sup>。根據前人研究，在農業上，貝萊斯芽孢桿菌可做為生物防治菌及生物肥料等之應用，為一促進植物生長之根圈細菌 (plant-growth-promoting-rhizobacteria, PGPR)<sup>(27)</sup>。國內外已有許多貝萊斯芽孢桿菌抑制植物病害的研究，其能抑制空氣及土壤傳播的病害<sup>(6, 7)</sup>。

芽孢桿菌 (*Bacillus*) 能分泌許多抗生物質、酵素蛋白、外泌蛋白等誘發植物系統性抗病 (induced systemic resistance, ISR) 反應<sup>(13, 20, 21)</sup>，實驗室前人亦發現表面素為 *B. amyloliquefaciens* Ba01 生長及抑制瘡痂病菌的重要二次代謝物<sup>(8)</sup>。因此本實驗欲利用含有隨機突變系統之質體 pMarA，隨機突變模式菌株 *B. velezensis* FZB42，探討隨機突變株及野生株拮抗瘡痂病菌之能力差異，再篩選出影響芽孢桿菌拮抗瘡痂病菌之基因，並利用目標基因剔除實驗確認。

本研究目標基因為 *B. velezensis* FZB42 之 *dfn* 基因簇，此基因表現聚酮類 (polyketide) 二次代謝物 difficidin<sup>(3)</sup>，其能抑制病原菌的蛋白合成，但具體作用機制仍然未知。根據文獻報導，difficidin 亦可扮演 FZB42 抑制細菌病害的關鍵角色<sup>(25)</sup>；此二次代謝物已被證實與 FZB42 能抑制多種病害的能力相關，但目前未有抑制馬鈴薯瘡痂病菌之研究。

## 材料與方法

### 試驗菌株與培養基製備

本實驗使用之貝萊斯芽孢桿菌 (*Bacillus velezensis* FZB42)、馬鈴薯瘡痂病菌 (*Streptomyces scabies* PS07)、大腸桿菌 (*Escherichia coli* S17-1) 及質體列舉於表一。本研究所用之引子列舉於表二。

馬鈴薯瘡痂病菌培養於 Yeast Malt Extract (YME) 固態培養基 28°C，若要大量產孢則將 100 μL 孢子懸浮液塗盤於 Magnesium Potassium Yeast Starch Casein (MPYSC) 固態培養基 28°C 培養 14 天，生成灰黑色孢子後，以無菌棉花棒沾取 1% PBS (phosphate buffered saline) + 0.1% Tween 20 溶液將孢子刮下，加入最終濃度 25 % 之甘油，放置於 -80°C 冰箱長期保存。*B. velezensis* FZB42 與 *E. coli* S17-1 培養於 Lysogeny Broth (LB) 液態或固態培養基 37°C。

本實驗所用之培養基配方及藥品如下：YME 固態培養基 (0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% dextrose, 2% agar)、MPYSC 固態培養基 (0.1% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% yeast extract, 1% soluble starch, 0.1% casein, 0.2% agar)、LB 液

表一、本研究使用之菌株及質體

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Description	Source or Reference
<b>Strains</b>		
<i>Bacillus velezensis</i>		
FZB42	Purchased from Food Industry Research and Development Institute	(6,7)
CTY1	FZB42 with <i>dfn</i> gene cluster deletion	This study
CTY2	FZB42 with <i>dfn</i> gene cluster deletion	This study
CTY3	FZB42 with <i>dfnJ</i> domain deletion	This study
CTY4	<i>dfnJ</i> domain complementary strain from CTY3, carrying Erm <sup>R</sup> cassette	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 Δ lacU169(80lacZΔ M15) recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) thi1 gyrA relA1 F-Δ (lacZYA-argF)</i>	Bethesda Research Laboratories
S17-1	<i>E. coli</i> for conjugation	(14)
<i>Streptomyces scabies</i>		
PS07	Isolated from Houli, Taichung, Taiwan	(17)
<b>Plasmids</b>		
pMarA	Carrying TnYLB-1 transposon with the <i>mariner</i> transposable element <i>Himar1</i> , Erm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(14)
pMiniMad2	<i>E. coli-Bacillus</i> shuttle vector, Erm <sup>R</sup>	(22)
pPK2	Vector, Kan <sup>R</sup>	(19)
pTY1	pMiniMad2 carrying 5' and 3' NCR of the <i>dfn</i> gene cluster	This study
pTY2	pPK2 carrying 5' and 3' NCR of the <i>dfnJ</i> domain	This study
pTY3	pPK2 carrying 5'NCR, <i>dfnJ</i> domain, Erm <sup>R</sup> cassette and 3' NCR	This study

態培養基 (0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl)/固態 (agar 1.5%)。培養基依據不同菌株或質體帶之抗生素基因，分別添加抗生素如下：1 μg/mL 紅黴素 (erythromycin, BioBasic, Canada; 溶於乙醇)，5 μg/mL 卡納黴素 (kanamycin, BioShop, Canada; 溶於純水)，10 μg/mL 多粘黴素 (polymyxin B, BioShop, Canada; 溶於純水)。

### pMarA 質體經由接合作用轉型進入 *B. velezensis* FZB42

pMarA 質體包含一個跳躍子 (transposon) TnYLB-1，且可表現 *Himar1* 轉座酶以達到跳躍作用，另外含有一個紅黴素抗性基因 (Erm<sup>R</sup>) 標誌於質體及一個卡納黴素抗性基因 (Kan<sup>R</sup>) 夾在 TnYLB-1 之中，pMarA 質體保存於 *E. coli* S17-1。將含有 pMarA 質體的 *E. coli* S17-1 培養於 LB 培養液並添加 1 μg/mL 紅黴素過夜；*B. velezensis* FZB42 培養於 LB 培養液過夜。將 *E. coli* S17-1

表二、本研究使用之引子

TABLE 2. Primers used in this study

Primer	Use	Sequence (5'→3')
JC1310	IPCR-F	GCTTGTAATTCATCATAATTG
JC1311	IPCR-R	AGGGAATCATTTGAAGGTTGG
JC1312	IPCR sequencing	GCATTTAATACTAGCGACGCC
JC1512	Erm <sup>R</sup> cassette-F	TAGGCACACGAAAAACAAGTTAAGG
JC1513	Erm <sup>R</sup> cassette-R	AACCGTGTGCTCTACGACC
JC2068	<i>dfn</i> 5'-F (Sall)	aaaGTCGACGATGCCCAATCAACGCT
JC2074	<i>dfn</i> 5'-R (fusion)	ATCTCACCATGCACAGTTTATCTCCGCTTCGGT
JC2075	<i>dfn</i> 3'-F (fusion)	AGCGGAAGATAAACTGTGCATGGTGAGATGCTGAA
JC2071	<i>dfn</i> 3'-R (BamHI)	aaaGGATCCAAAAAGTGGGAAAGCGCGAT
JC2072	<i>dfn</i> gene cluster-F	AGAGGGGAGTCAGGCATTATT
JC2073	<i>dfn</i> gene cluster-R	CGTTTCAATGTTTCAGCCA
JC2272	<i>dfnJ</i> 5'-F (Sall)	aaaGTCGACGCCTAACCTGGTCTGGGATA
JC2273	<i>dfnJ</i> 5'-R (fusion)	GCGCAAGTAGCGCGAATCATAAAATTG
JC2274	<i>dfnJ</i> 3'-F (fusion)	TCGCCGCTAGTTGCGCTTCCATCAGTCT
JC2275	<i>dfnJ</i> 3'-R (BamHI)	aaaGGATCCAGCAGTTCCGATATGCTGCT
JC2276	<i>dfnJ</i> domain-F	ACTTTACAGGGCCGTC AATG
JC2277	<i>dfnJ</i> domain-R	GCCGAAAGCAGAAACAGAAC
JC2199	<i>dfnJ</i> ORF-R (fusion)	TGTGCCTAAGGCGCAGATTCACCTGTTTT
JC2200	<i>dfnJ</i> 3'-F (for complement)	ACACGGTTAGTTGCGCTTCCATCAGTCT
JC2201	Erm <sup>R</sup> cassette-F (for complement)	CTGCGCCTTAGGCACACGAAAAACAAGTTAAGG
JC2202	Erm <sup>R</sup> cassette-R (for complement)	GCGCAACTAACCGTGTGCTCTACGACC

\* bold letters represent restriction sites used for cloning

\* underline letters represent overlapping PCR sequences

及*B. velezensis* FZB42菌液調整至1 OD<sub>600</sub> (約2 x 10<sup>7</sup> CFU/mL)，之後將兩菌液以1:1比例混合，再將混合菌液滴至LB固態培養37°C培養過夜以促進兩菌株進行接合作用 (conjugation)。待菌落生成後，以無菌水將FZB42與S17-1混合菌落洗下並塗盤於含有多粘黴素及紅黴素的LB培養基，培養於30°C 2-3天。並將於限制性培養基中長出之抗紅黴素菌株，以colony PCR (polymerase chain reaction)搭配引子對JC1512/JC1513增幅，測試其Erm<sup>R</sup> 標誌約1.1 kb，以確認pMarA質體存在與否。

### 跳躍子TnYLB-1隨機插入FAB42染色體

將帶有pMarA質體的*B. velezensis* FZB42培養於含有紅黴素之LB培養液中，28°C過夜，誘導質體之跳躍子TnYLB-1隨機插入*B. velezensis* FZB42染色體。在完成誘導之後，將菌液塗佈於含有卡納黴素的LB培養基，培養於50°C，2-3天。此步驟可於高溫限制pMarA質體之自我複製，導致只含有Kan<sup>R</sup>標誌基因的跳躍子插入染色體的菌株能在此抗生素培養基上生存，進而達到篩選的效果。之後利用colony PCR搭配引子對JC1816及

JC1512/JC1513測試候選菌株，判斷目標菌株是否有跳躍子插入與pMarA質體是否確實剔除以降低實驗誤判。

### 利用inverse-PCR分析跳躍子插入位置

在跳躍子隨機突變實驗中，取得五FZB42隨機插入突變株(以下簡稱隨機突變株)並培養於3 mL含有5 μg/mL卡納黴素的LB培養液中，37°C隔夜後抽取菌株DNA。將5 μg DNA以限制酶Taq α I酶切30分鐘後以Gel/PCR DNA isolation system kit (Viogene, Taiwan) 進行純化。將100 ng純化後的DNA以T4 DNA ligase (NEB #M0202S, BioLabs, USA) 處理16小時，促使其自行環狀黏合 (self-ligation)。最後將環狀黏合的DNA搭配引子對JC1310/JC1311進行反向PCR (inverse-PCR)，達到增幅出跳躍子插入片段的功效。將反向PCR增幅出的片段送定序分析 (明欣生物科技股份有限公司，台灣) 及進行資料庫 (National Center of Biotechnology Information, USA, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比對，以得知跳躍子TnYLB-1插入FZB42基因體的位置。

### 利用南方雜合法 (Southern Blot) 檢測隨機突變株

抽取五隨機突變株DNA，再將5 μg DNA以限制酶HindIII (NEB #R3104, Ipswich, MA, USA) 酶切，並進行膠體電泳。爾後，將完成膠體電泳之洋菜膠，放置於0.25 N HCl溶液 15分鐘、denaturing buffer (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl in 1L) 25分鐘、neutralization buffer (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl in 1L) 30分鐘。完成denaturing後的洋菜膠，利用虹吸作用將洋菜膠體上染色體吸附至PVDF轉印膜 (GE Healthcare, UK)，並以跳躍子TnYLB-1為模板DNA參照Amersham™ GE AlkPhos labeling system (GE Healthcare, UK) 製備探針及利用hybridization buffer (0.5 M NaCl, 4% blocking reagent) 完成雜合步驟。之後，將轉印膜取出，以1<sup>st</sup> wash buffer (2 M Urea, 3.5 mM SDS, 50 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% blocking reagents in 1L)於55°C潤洗10分鐘，再以2<sup>nd</sup> wash buffer (1 M Tris Base, 2 M NaCl in 1L, pH=10) 於常溫下潤洗5分鐘，最後加入Amersham™ CDP-Star Detection Reagent進行檢測與X光片之呈現。

### 隨機突變株對抗馬鈴薯瘡痂病菌之濾紙片擴散試驗

野生株*B. velezensis* FZB42與五隨機突變株以濾紙片試驗測試其對*S. scabies* PS07的拮抗能力。將菌株培養於LB培養液隔夜，去除上清液後以無菌水回溶，並將菌液稀釋至1 OD<sub>600</sub>。將100 μL的*S. scabies* PS07孢子 (10<sup>7</sup> spores/mL) 塗佈於YME培養基上，待風乾後，再將兩片直徑6-mm的濾紙片 (ADVENTEC®, Japan) 放置於培養基上，並滴定3 μL 1 OD<sub>600</sub>的突變株或野生株。最後，濾紙片測試之YME培養基培養於28°C，2-3天後測量其抑制圈大小及拍照記錄，此實驗進行三技術性重複。抑制圈計算方式為：(抑制圈外圍直徑-菌落大小直徑)/2 = 抑制圈大小 (mm)，以Prism 5.0軟體 (GraphPad Software, San Diego, USA)



進行 *t* test 統計。

### 建立 *B. velezensis* FZB42 *dfn* 基因簇與 *dfnJ* domain 突變株基因卡匣 (cassette)

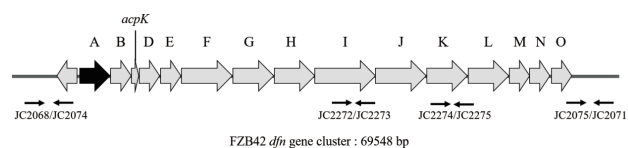
*B. velezensis* FZB42 之 *dfn* 基因簇約 70 kb，包含 A~O domain，而其中的 *dfnJ* domain 約 9 kb 並帶有聚酮合酶基因 (polyketide synthase, PKS) 影響整個聚酮合酶作用<sup>(3)</sup>(圖一)。在建立 *B. velezensis* FZB42 *dfn* 基因簇突變株基因卡匣的實驗部份，首先以 FZB42 染色體 DNA 為模板，分別以引子對 JC2068/JC2074 (*dfn* 5'-NCR) 及 JC2075/JC2071 (*dfn* 3'-NCR) 進行增幅 *dfn* 基因簇 5' 及 3' noncoding region (NCR) 片段約 1 kb，接著將 PCR 產物以 Gel/PCR DNA Isolation kit (Viogen, Taiwan) 純化後，將 5'-NCR 及 3'-NCR 片段混合為模板利用引子對 JC2068/JC2075 進行 fusion PCR 取得黏接成功之條帶後再以上述 kit 進行純化。

在建立 *dfnJ* domain 突變株基因卡匣的實驗部份，先以 FZB42 染色體 DNA 為模板，分別以引子對 JC2272/JC2273 (*dfnJ* 5'-NCR) 及 JC2274/JC2275 (*dfnJ* 3'-NCR) 進行 PCR 實驗增幅，得到 *dfnJ* 5'-NCR 及 3'-NCR 片段各約 900 bp，接著將 PCR 產物進行純化後，以 5'-NCR 及 3'-NCR 片段混合為模板利用引子對 JC2272/JC2275 進行 fusion PCR，並以切膠取得黏接成功之 5'-NCR+3'-NCR PCR 產物進行純化。

### 建構 *dfn* 基因簇及 *dfnJ* domain 突變株質體

建立 *dfn* 基因簇突變株之質體以 pMiniMad2 為載體<sup>(2, 22)</sup>，將 pMiniMad2 與上述黏接後的 5'-NCR+3'-NCR 片段分別以限制酶 Sall (NEB #R3138, Ipswich, MA, USA) 及 BamHI (NEB #R0136, Ipswich, MA, USA) 進行酶切與純化，完成後進行黏接，得到 pTY1 質體 (表一)。黏接反應完成之 pTY1 質體再參照 Cheng 等人的電穿孔方式<sup>(4)</sup>轉型至 *E. coli* S17-1 勝任細胞中保存。

建立 *dfnJ* domain 突變株之質體以 pPK2 為載體<sup>(19)</sup>，將此質體與上述黏接後的 *dfnJ* 5'-NCR+3'-NCR 片段分別以限制酶 Sall 及



圖一、貝萊斯芽孢桿菌 FZB42 之 *dfn* 基因簇模式圖

貝萊斯芽孢桿菌 FZB42 之 *dfn* 基因簇大小為 69,548 bp，黑色實心箭頭為 *dfnA* domain，內含醃基轉移酶 (transacylase) 基因，其餘灰色實心箭頭為聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 基因。標示 *acpK* 處為醃基載體蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 基因。此圖參考 Chen 等人研究<sup>(3)</sup>繪製。

Fig. 1. Diagram of *dfn* gene cluster in *B. velezensis* FZB42

The size of *dfn* gene cluster in *Bacillus velezensis* FZB42 is 69,548 bp. The *dfn* A domain including transacylase gene is indicated by black filled arrow, while other domains including polyketide synthase (PKS) genes are indicated by gray filled arrows. Acyl carrier protein (ACP) is indicated as *acpK*. This figure was modified from Chen et al.<sup>(3)</sup>

BamHI 進行酶切與純化後進行黏接，得到 pTY2 質體 (表一)，再以電穿孔轉型進入 *E. coli* S17-1 中保存。

### 以 In-frame deletion 建立 *B. velezensis* FZB42 *dfn* 基因簇及 *dfnJ* domain 突變株

將帶有 pTY1 或 pTY2 質體之 *E. coli* S17-1 與 FZB42 野生株共同培養於含有紅黴素之 LB 液態培養基，參照前述接合作用轉型方法利用 *E. coli* S17-1 共培養誘導質體轉型進入 FZB42。將轉型株培養於含有紅黴素之 LB 液態培養基，28°C 搖瓶培養隔夜後序列稀釋塗盤於含有紅黴素 LB 固態培養基上，並培養於 37°C，此有利於第一次 crossover 發生 (質體 5'-NCR 或 3'-NCR 會插入 FZB42 染色體)，1 天後挑取長出之菌落繼代培養於 LB 液態培養基，以 25°C 搖瓶培養 12 小時以誘使第二次 crossover 發生，並將質體從 FZB42 細胞內剔除，最後以 PCR 搭配引子對 JC1512/JC1513 (Erm<sup>R</sup> cassette)、JC2068/JC2071 (5'+3' NCR) 及 JC2072/JC2073 (*dfn* gene cluster) 進行測試，可確認獲得兩獨立 *dfn* 基因簇突變株 (CTY1 與 CTY2)；或以 PCR 搭配引子對 JC2272/JC2275 (5'+3' NCR) 及 JC2276/JC2277 (*dfnJ* domain)，可確認獲得 *dfnJ* domain 突變株 (CTY3)。

### *dfnJ* domain 互補株之建立

以 FZB42 染色體 DNA 為模板，分別以引子對 JC2272/JC2199、JC2200/JC2275 進行 PCR 增幅 *dfnJ* 5'-NCR+ORF 及 *dfnJ* 3'-NCR 片段，再以 JC2201/JC2202 增幅紅黴素抗性基因 (Erm<sup>R</sup> cassette)。DNA 純化後先以 Erm<sup>R</sup> cassette 及 *dfnJ* 3'-NCR 片段混合為模板，利用引子對 JC2201/JC2275 進行 fusion PCR，得到 Erm<sup>R</sup>+*dfnJ* 3'-NCR 片段；再以 *dfnJ* 5'-NCR+ORF 片段及 Erm<sup>R</sup>+3'-NCR 片段為模板，利用 PCR 搭配引子對 JC2272/JC2275 增幅，得到 *dfnJ* 5'-NCR+ORF+Erm<sup>R</sup>+3'-NCR 片段。選用 pPK2 為互補株基因卡匣質體，並得到 pTY3 (表一)，參照上述方法將 pTY3 質體電穿孔轉型進入 *E. coli* S17-1，再利用接合作用將 pTY3 轉型進入 CTY3 突變株，而後以 in-frame deletion 技術誘導 *dfnJ* domain 互補基因卡匣進行 crossover 修復 *dfnJ* domain，以菌落 PCR 搭配引子對 JC2276/JC2277 (*dfnJ* domain)、JC2201/JC2202 (Erm<sup>R</sup> cassette) 及 JC2276/JC2202 (*dfnJ*+Erm<sup>R</sup>) 進行測試，並獲得 *dfnJ* domain 互補株 (CTY4)。

### 貝萊斯芽孢桿菌突變株對抗馬鈴薯瘡痂病菌之濾紙片擴散試驗

以濾紙片擴散試驗測試野生株、*dfn* 基因簇突變株 (CTY1、CTY2)、*dfnJ* domain 突變株 (CTY3) 及 *dfnJ* domain 互補株 (CTY4) 對 *S. scabiei* PS07 的拮抗能力變化。參照上述濾紙片擴散試驗方法，並滴定 3 μL 1 OD<sub>600</sub> 的野生株、突變株或互補株。測量其抑制圈大小及拍照記錄，此實驗進行三技術性重複。統計方式同上述。

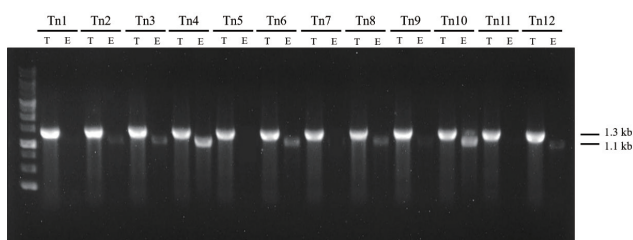
## 結果

## 貝萊斯芽孢桿菌隨機突變株之獲得

能表現HimarI轉座酶的pMarA質體保存於*E. coli* S17-1，透過接合作用 (conjugation) 將此質體轉型進入貝萊斯芽孢桿菌 FZB42，質體中的跳躍子TnYLB-1即可隨機插入FZB42的染色體。在將菌液塗盤於選擇性培養基後，利用菌落PCR搭配引子對JC1512/JC1513及JC1816進行測試。含有TnYLB-1之菌株可透過PCR被引子對JC1816增幅，而若含有pMarA質體則可被引子對JC1512/JC1513增幅，因此須從候選菌株中挑選含有JC1816增幅條帶且不具有JC1512/JC1513增幅訊號的菌株，代表跳躍子隨機插入FZB42染色體，且質體被細胞剔除。在實驗結果中，利用菌落PCR測試12個候選菌株Tn1-Tn12 (圖二)，從圖中可看出五個候選菌株Tn1、Tn5、Tn7、Tn9及Tn11表現JC1816增幅訊號，而不表現JC1512/1513訊號，其餘菌株則兩種訊號都有表現，因此可以推論此五菌株是跳躍子隨機插入的菌株，其餘菌株之質體未被剔除可能影響後續實驗結果，因此不採用。

跳躍子TnYLB-1隨機插入*B. velezensis* FZB42染色體位置分析

獲得五隨機突變株後，分別利用inverse-PCR及南方墨點法測試跳躍子TnYLB-1隨機插入FZB42染色體的位置及數目。首先萃取五突變株 (Tn1、Tn5、Tn7、Tn9及Tn11) 之DNA，並進行inverse-PCR及南方墨點法實驗。在inverse-PCR實驗中，搭配引子對JC1310/JC1311反向增幅自體環形黏接的DNA片段，此些增幅出的條帶，即為跳躍子插入FZB42染色體DNA的位置。送定序分析及NCBI資料庫比對後，得知四突變株Tn1、Tn5、



圖二、貝萊斯芽孢桿菌隨機突變實驗得到之候選菌株隨機突變實驗得到12候選菌株，於LB液態培養基中37°C搖瓶培養隔夜後，抽取菌株DNA並利用引子對JC1512/JC1513及JC1816做PCR確認，得到五隨機突變株Tn1、Tn5、Tn7、Tn9及Tn11，具有跳躍子1.3 kb訊號 (lane T) 而無質體Erm<sup>R</sup> cassette 1.1 kb (lane E) 訊號。

Fig. 2. Candidate strains of random insertion mutants from *B. velezensis* FZB42

Twelve candidate strains from random insertional mutation were cultured in LB medium at 37°C overnight. The DNA was then extracted and checked by PCR with primer JC1512/JC1513 and JC1816. Five random insertion mutants Tn1, Tn5, Tn7, Tn9, and Tn11 were obtained and exhibited 1.3 kb transposon band (lane T), while without 1.1 kb Erm<sup>R</sup> cassette band (lane E).

Tn7及Tn11皆比對到枯草桿菌*Bacillus subtilis*的optogenetic control基因，推論此四突變株可能來自於單一菌落，此基因可影響菌株生長；而Tn9則比對到*B. velezensis*之dfnA基因，此基因為*B. velezensis*之二次代謝物difficidin (dfn)基因簇的次單元，且與*B. velezensis*的抑菌能力相關，因此後續實驗以此dfn基因簇為目標進行研究。爾後利用南方墨點法偵測五隨機突變株之插入位置差異，偵測結果發現各菌株皆呈現單一條帶，惟Tn5訊號表現較為不明顯 (圖三)，據以上結果推論五株隨機突變株都為單點隨機插入。

## 貝萊斯芽孢桿菌之Tn9隨機突變株拮抗馬鈴薯瘡痂病菌之能力降低

五突變株 (Tn1、Tn5、Tn7、Tn9及Tn11) 利用濾紙片擴散試驗，測試其對於*S. scabies* PS07的拮抗能力差異，統計抑制圈大小並記錄結果如圖四。從圖中發現ddH<sub>2</sub>O對照組沒有抑制圈生成，野生株 (*B. velezensis* FZB42) 產生10±0.7 mm的抑制圈，表現出極佳的拮抗能力；四突變株Tn1、Tn5、Tn7、Tn11產生8±0.9 mm的抑制圈，經*t* test統計分析，與野生株相比並無顯著差異；突變株Tn9產生6.7±0.3 mm的抑制圈，經*t* test統計分析，相較於野生株具有顯著性差異 ( $p < 0.01$ )。

## Tn1 Tn5 Tn7 Tn9 Tn11

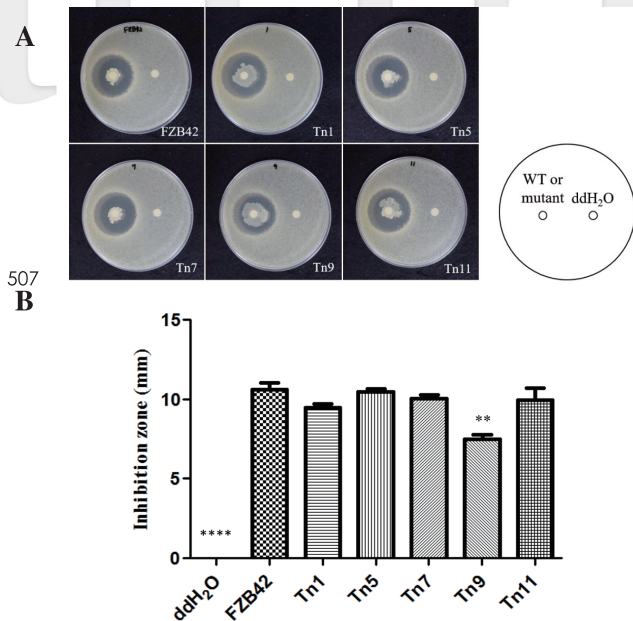


圖三、五隨機突變株以南方墨點雜合法分析插入位點

將五隨機突變株 (Tn1、Tn5、Tn7、Tn9及Tn11) 於LB液態培養基中37°C搖瓶培養隔夜後，抽取菌株DNA，並轉印至PVDF膜，利用南方墨點雜合法搭配TnYLB-1探針標記目標DNA，再將訊號呈現於X光片以分析隨機突變為單位點或多位點插入的突變株。此圖中南方雜合訊號皆顯示為單一條帶，可推斷突變株為單位點插入。

Fig. 3. Five random insertion mutants analyzed by Southern blot

To analyze mutation site and number, five random insertion mutants (Tn1, Tn5, Tn7, Tn9, and Tn11) were cultured in LB medium at 37°C overnight. The DNA was then extracted and transferred to PVDF membrane. The target DNA was marked with TnYLB-1 probe by Southern blot, then signals were developed on X-ray film. The signals show only one band in each mutant, indicating single insertion harbored.



圖四、五隨機突變株拮抗馬鈴薯瘡病菌之濾紙片擴散試驗經由濾紙片擴散試驗(A)，統計得到(B)之統計圖。*S. scabies* PS07孢子塗盤於YME培養基上，並在濾紙片上滴加3  $\mu$ L ( $OD_{600}=1$ )的野生株或突變株菌液，28 $^{\circ}$ C 培養兩天後進行統計分析，此實驗進行三技術性重複。抑制圈計算方式為：(抑制圈外圍直徑-菌落大小直徑)/2 = 抑制圈大小 (mm)，以Prism 5.0軟體進行統計。突變株與野生株進行比較，並以 *t* test統計 *p* 值。\*\*表示 *p* 值小於0.01；\*\*\*\*表示 *p* 值小於0.0001。

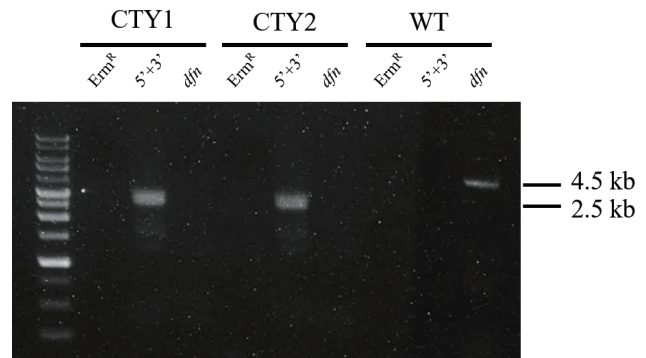
**Fig. 4.** Disc diffusion assays of five random insertion mutants against *S. scabies* PS07

(A) disc diffusion assay. (B) statistics diagram of (A). *S. scabies* PS07 spores were spread on YME agar plate and discs containing 3  $\mu$ L wild type or mutant culture ( $OD_{600}=1$ ). The plates were incubated at 28 $^{\circ}$ C for 2 days. Inhibition zone (mm)=(outer diameter of inhibition zone-inner diameter of inhibition zone)/2. The statistical analysis was performed by Prism 5.0. *P* values were calculated by *t* test, \*\*represented *p* < 0.01. \*\*\*\*represented *p* < 0.0001.

#### 貝萊斯芽孢桿菌 *dfn* 基因簇與 *dfnJ* domain 突變株之獲得

為了闡明 difficidin (*dfn*) 基因簇在 *B. velezensis* FZB42 中是否扮演拮抗馬鈴薯瘡病菌的角色，本實驗利用接合作用將突變基因卡匣轉型進入 FZB42，並以 in-frame deletion 技術將 *dfn* 基因簇及 *dfnJ* domain 進行剔除 (knock out)。本實驗取得兩株 *dfn* 基因簇的獨立突變株 (CTY1 與 CTY2)，並利用 PCR 搭配引子對 JC1512/JC1513 (*Erm<sup>R</sup>* cassette)、JC2068/JC2071 (5'+3'-NCR) 及 JC2072/JC2073 (*dfn* gene cluster) 進行確認。野生株 (FZB42) 具有 *dfn* 基因簇條帶，不具有 pMiniMad2 質體的 *Erm<sup>R</sup>* 條帶及 5'+3'-NCR 的條帶，由於野生株 *dfn* 基因簇過大約 70 kb，因此無法以 PCR 增幅 (圖五)。*dfn* 基因簇突變株 CTY1 及 CTY2 則具有 5'+3'-NCR 條帶 (因缺失 *dfn* 基因簇，故增幅出約為 2 kb 之條帶)，不具有 *dfn* 基因簇條帶及 *Erm<sup>R</sup>* 條帶，顯示 *dfn* 基因簇被置換且帶有 *Erm<sup>R</sup>* 之質體在細胞內被分解。

此外，*dfnJ* domain 突變卡匣的 in-frame deletion 實驗取得



圖五、貝萊斯芽孢桿菌 *dfn* 基因簇突變株 CTY1 及 CTY2 之電泳分析。抽取 *dfn* 基因簇突變株 CTY1 與 CTY2 之 DNA，以 PCR 搭配下列引子對進行分析。Lane *Erm<sup>R</sup>* 表示由引子對 JC1512/JC1513 增幅 pMiniMad2 質體上之 *Erm<sup>R</sup>* 訊號；Lane 5'+3' 表示由引子對 JC2068/JC2071 增幅 5'-NCR 到 3'-NCR 之訊號 (~2.5 kb)；Lane *dfn* 表示由引子對 JC2072/JC2073 增幅 *dfn* 基因簇其中片段之訊號 (~4.5 kb)。

**Fig. 5.** Electrophoresis analysis of *B. velezensis* *dfn* gene cluster mutants CTY1 and CTY2

We extract DNAs of the wild type and mutants (CTY1 and CTY2), and perform PCR amplification with the following primers. Lane *Erm<sup>R</sup>* represented signal on pMiniMad2 amplified by primer JC1512/JC1513. Lane 5'+3' represented signal (~2.5 kb) from 5'-NCR to 3'-NCR amplified by primer JC2068/JC2071. Lane *dfn* represented signal (~4.5 kb) of *dfn* gene cluster fragment amplified by primer JC2072/JC2073.

一株 *dfnJ* domain 突變株，利用 PCR 搭配引子對 JC2272/JC2275 (5'+3'-NCR) 及 JC2276/JC2277 (*dfnJ* domain) 進行確認。野生株具有 *dfnJ* domain 檢測部分的條帶大小為 900 bp，而突變株 CTY3 則無此條帶，顯示 *dfnJ* domain 被置換 (圖六)。進一步以 5'+3'-NCR 引子對確認突變株，發現野生株 5'-NCR 及 3'-NCR 之間的 *dfnJ* domain 太大 (~9 kb) 而 PCR 增幅時間不足，故無法增幅出訊號；而成功剔除基因之 CTY3 菌株則能增幅出約 2 kb 的訊號 (圖六)。

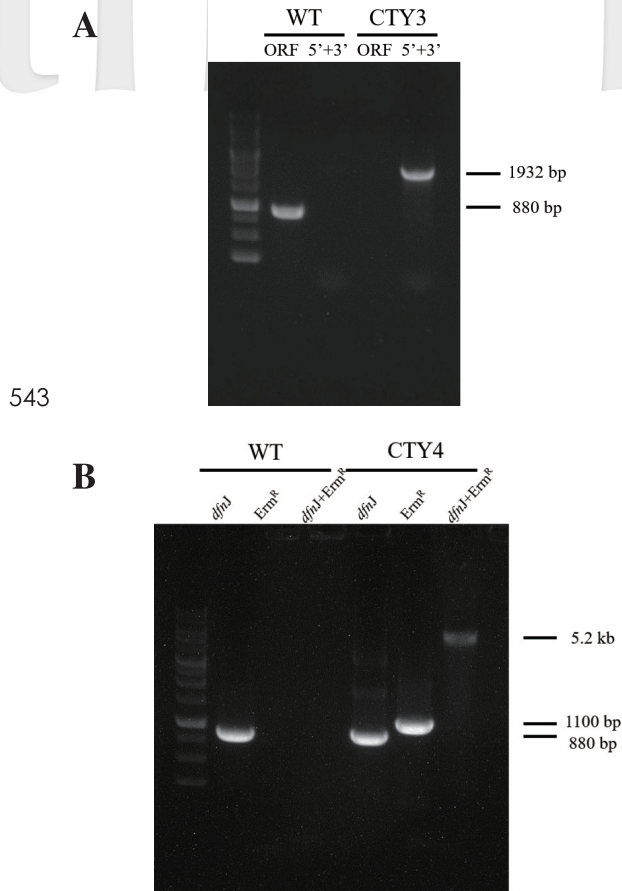
#### 獲得 *dfnJ* domain 突變株之互補株

在取得 *dfnJ* domain 突變株 CTY3 後，利用質體 pPK2 攜帶互補基因卡匣轉型進入 CTY3 菌株，再以 in-frame deletion 技術誘導基因互換，得到互補菌株 CTY4，再以 PCR 搭配引子對 JC2276/JC2277 (*dfnJ* domain)、JC2201/JC2202 (*Erm<sup>R</sup>* cassette) 及 JC2276/JC2202 (*dfnJ*+*Erm<sup>R</sup>*) 進行確認。野生株與互補株 CTY4 皆具有 *dfnJ* domain (~900 bp) (圖六)，因此可確認突變株 CTY3 互補得到 *dfnJ* domain。之後再利用互補卡匣置入之 *Erm<sup>R</sup>* cassette 做野生株與互補株之辨別，野生株無 *Erm<sup>R</sup>* cassette 條帶，而 CTY4 則可出現約 1 kb 之條帶 (圖六)。另外，以引子對 JC2276/JC2202 增幅 CTY4 出現約 5.2 kb 條帶，由此得知 *Erm<sup>R</sup>* cassette 確實存在 *dfnJ* ORF 與 5'-NCR 之間 (圖六)。

#### 貝萊斯芽孢桿菌 *dfn* 基因簇與 *dfnJ* domain 扮演拮抗馬鈴薯瘡病菌之角色

*B. velezensis* FZB42 以 in frame-deletion 方法進行突變後，





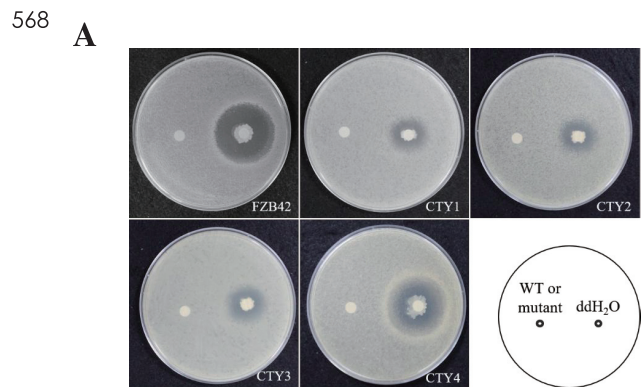
圖六、貝萊斯芽孢桿菌 *dfnJ* domain突變株CTY3與互補株CTY4之電泳分析

抽取 *dfnJ* domain突變株CTY3與互補株CTY4的DNA，以PCR搭配下列引子對進行分析。圖(A) *dfnJ* domain突變株之電泳分析。Lane ORF表示由引子對JC2276/JC2277增幅 *dfnJ* domain片段訊號(880 bp)；Lane 5'+3'表示由引子對JC2272/JC2275增幅5'-NCR到3'-NCR之訊號(1932 bp)；圖(B) 互補株CTY4之電泳分析。Lane *dfnJ*表示由引子對JC2276/JC2277增幅 *dfnJ* domain之片段訊號(880 bp)；Lane *Erm<sup>R</sup>*表示由引子對JC2201/JC2202增幅夾於基因卡匣中之 *Erm<sup>R</sup>* 訊號(1100 bp)；Lane *dfnJ*+*Erm<sup>R</sup>*表示由引子對JC2276/JC2202增幅 *dfnJ* 片段中間至 *Erm<sup>R</sup>* 之訊號(~5.2 kb)。

**Fig. 6.** Electrophoresis analysis of *B. velezensis* *dfnJ* domain mutant CTY3 and complementary strain CTY4

We extract DNAs of the wild type, CTY3 mutant and complementary strain CTY4, and perform PCR amplification with the following primers. (A) Electrophoresis analysis of CTY3 mutant. Lane ORF represented signal (880 bp) of *dfnJ* domain amplified by primer JC2276/JC2277. Lane 5'+3' represented signal (1900 bp) from 5'-NCR to 3'-NCR amplified by primers JC2272/JC2275. (B) Electrophoresis analysis of CTY4 mutant. Lane *dfnJ* represented signal (880 bp) of *dfnJ* domain amplified by primer JC2276/JC2277. Lane *Erm<sup>R</sup>* represented signal (1100 bp) of *Erm<sup>R</sup>* cassette amplified by primer JC2201/JC2202. Lane *dfnJ*+*Erm<sup>R</sup>* represented signal (~5.2 kb) from *dfnJ* to *Erm<sup>R</sup>* cassette amplified by primer JC2276/JC2202.

本研究取得 *dfnJ* 基因簇突變株CTY1、CTY2，*dfnJ* domain突變株CTY3及其互補株CTY4。初步進行濾紙片測試突變株抑制馬鈴薯瘡痂病菌的能力。野生株FZB42產生10.5±0.23 mm的抑制圈，CTY1抑制圈為4±1.37 mm，CTY2抑制圈為3.6±0.74 mm，CTY3抑制圈為4.5±0.72 mm，互補株CTY4抑制圈為7.8±0.74 mm(圖七)。其中CTY1、CTY2及CTY3對 *S. scabiei* PS07產生之抑制圈多為半抑制情形 (*S. scabiei* PS07失去分化產孢能力)。經由 *t* test統計分析，CTY1、CTY2及CTY3與野生株FZB42相比，*p* 值皆小於0.01，其中CTY2之 *p* 值小於0.001，顯示 *dfnJ* 基因簇與 *dfnJ* domain扮演拮抗馬鈴薯瘡痂病菌之角色，而互補株CTY4則與野生株無顯著差異，表示其抑制馬鈴薯瘡痂病菌之能力回復。

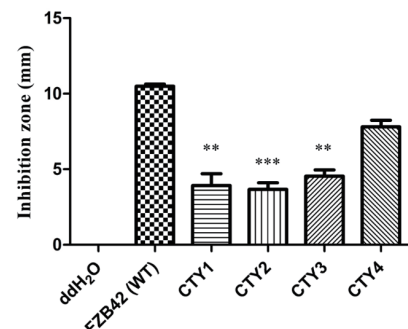


568

**A**

569

**B**



圖七、突變株CTY1、CTY2、CTY3及互補株CTY4與野生株拮抗馬鈴薯瘡痂病菌之能力測試

經由濾紙片擴散試驗(A)，統計得到(B)之統計圖。

*S. scabiei* PS07孢子塗盤於YME培養基，並在濾紙片上滴加3  $\mu$ L ( $OD_{600}=1$ ) 的野生株或突變株菌液，28°C培養兩天後進行分析。突變株、互補株與野生株分別進行比較，並以 *t* test統計 *p* 值。\*\*表示 *p* 值小於0.01，\*\*\*表示 *p* 值小於0.001。

**Fig. 7.** Inhibition ability test of *B. velezensis* mutants CTY1, CTY2, CTY3, and complementary strain CTY4 compared with wild type against *S. scabiei* PS07 by disc diffusion assays

(A) disc diffusion assay. (B) statistics diagram of (A). *S. scabiei* PS07 spores were spread on YME agar plate and discs containing 3  $\mu$ L wild type or mutant culture ( $OD_{600}=1$ ). The plates were incubated at 28°C for 2 days. *P* values were calculated by *t* test, \*\*represented  $p < 0.01$ , \*\*\*represented  $p < 0.001$ .

在臺灣，近幾年除了晚疫病為害馬鈴薯產業發展以外，馬鈴薯瘡痂病也普遍發生於各田區，更有罹病率上升現象，其病原菌容易殘存田間，並導致連作障礙，病害持續發生且愈發嚴重，而帶病原薯塊也是下期種植的初次感染源<sup>(8)</sup>。目前瘡痂病的防治包含種植健康種薯、田間衛生管理、土壤酸鹼值調整及非寄主輪作等方法，但效果有限<sup>(17)</sup>。近年來，臺灣諸多學者以生物防治研究各種病害的控制，較為常見的生物防治菌株為芽孢桿菌屬、鏈黴菌屬、假單胞菌屬等，其中芽孢桿菌屬拮抗菌株最為常見，亦推出許多生物製劑如*B. amyloliquefaciens* Ba-BPD1能促進植物生長及防治蝴蝶蘭黃葉病、細菌性軟腐病等病害<sup>(16)</sup>。前人研究發現*B. amyloliquefaciens* Ba01施用於田間能有效防治馬鈴薯瘡痂病<sup>(17)</sup>；此外，亦發現Ba01具有抑制馬鈴薯青枯病之能力<sup>(12)</sup>。生物防治菌具有防治多種病害潛力，同時可改善土壤環境、提升有益微生物族群數量及促進植物生長能力，未來可推薦農民施用。

前人研究推測表面素為抑制馬鈴薯瘡痂病之重要二次代謝物<sup>(8)</sup>，並以*B. amyloliquefaciens* Ba01證明其生成表面素的srf基因簇被剔除後，其防治馬鈴薯瘡痂病能力下降。於基因研究方面，芽孢桿菌屬轉型效率極低<sup>(28, 29)</sup>，原因為芽孢桿菌為革蘭氏陽性菌，細胞壁厚導致轉型困難；芽孢桿菌具有限制修飾系統(restriction-modification system)，會保護細菌免於外來DNA的侵入；轉型後質體於細菌中穩定性也會影響後續實驗，而前人所選用之*B. amyloliquefaciens* Ba01為田區薯塊分離而得，並非馴化菌株，基因層次研究不易進行，突變株實驗期間常遇瓶頸且轉型效率極低，因此本實驗選用原本分類為*B. amyloliquefaciens*，後分類改為*Bacillus velezensis*的菌株FZB42，為芽孢桿菌屬基因層次研究的模式菌株且其基因體已全解序<sup>(7)</sup>，較利於實驗操作。

本實驗於質體轉型進入*B. velezensis* FZB42中嘗試三種轉型方法，第一種方法參考實驗室前人以電穿孔方法將質體送入細菌<sup>(8)</sup>；第二種方法參考邵等人研究<sup>(24)</sup>，建立細菌原生質體(protoplast) 勝任細胞，以此將質體送入勝任細胞；第三種方法參考Rachinger等人於*Bacillus licheniformis*研究<sup>(23)</sup>，先將質體送入*E. coli* S17-1，再將質體利用細菌接合作用轉型進入FZB42。在嘗試上述三種方式後，發現前兩種方式轉型效率極低，且多有菌落能於抗生素培養基長出、經菌落PCR確認卻沒有訊號顯現的偽陽性菌株，或初步確認有訊號，但於繼代培養後訊號消失的菌株，推測此情形可能為芽孢桿菌屬多具有限制修飾系統抵禦外來DNA<sup>(22)</sup>，因此質體無法穩定保存於細菌內。經多次嘗試後，接合作用轉型效率最高，雖仍有偽陽性菌株問題，但比率低，較利於實驗篩選，因此本研究選擇以接合作用完成質體轉型進入FZB42之實驗操作。

前人研究中，發現*B. velezensis* FZB42具有多種抑制病害

的二次代謝物，其中difficidin被發現在FZB42抑制細菌病害的能力扮演重要的角色。Wu等人研究發現difficidin (*dfn*) 基因簇突變株抑制水稻白葉枯病菌(*Xanthomonas oryzae*) 能力下降，且文獻記載difficidin為FZB42抑制細菌病原最為重要之二次代謝物<sup>(26)</sup>，但過往研究皆無針對馬鈴薯瘡痂病菌進行研究。本研究選擇以difficidin作為目標基因進行突變，且過往研究皆無互補株的文獻，推測由於前人研究皆以*dfn*基因簇突變為主，而整個基因簇過於龐大(~70kb)以致無法完成互補株實驗。故此研究除基因簇突變外，另外挑選*dfnJ* domain進行突變及互補株試驗，*dfnJ* domain大小約9 kb，帶有多種polyketide synthase (PKS) 基因<sup>(5, 6)</sup>。經濾紙片擴散實驗後發現，雖然*dfnJ* domain突變株CTY3相比基因簇突變株CTY1及CTY2抑菌能力的降低較少，但經過*t* test統計亦顯示CTY3與野生株抑菌能力仍具有顯著差異( $p < 0.01$ )，且互補株CTY4抑菌能力回復似野生株。根據Goodson等人研究，發現*dfnJ* domain可能含有difficidin後半段基因調控之啟動子(promoter)<sup>(9)</sup>，因此基因突變後，可能會影響基因簇後半段基因如*dfnK*、L及M domain的表現能力，導致其與野生株相比抑制能力差異比預期中更為顯著。

Wu等人研究指出*B. velezensis* FZB42分泌之difficidin不僅具有抑制病原菌生長能力，更具有誘導植物系統性抗病能力，能間接影響乙烯生成<sup>(25)</sup>，推測FZB42能藉由分泌difficidin增加植物抗性，同時又能抑制植物病原菌生長，因此才能具有良好的生物防治菌特性。未來規劃以MALDI-TOF質譜儀進行分析<sup>(8)</sup>，確認*dfn* gene cluster與二次代謝物difficidin生合成關係，佐證此實驗difficidin對於抑制馬鈴薯瘡痂病菌具關鍵影響力之推論，並以盆栽試驗模擬田間測試，澆灌處理得到之突變株、互補株與野生株，比較防治馬鈴薯瘡痂病的效果，以此進一步證明difficidin於抑制馬鈴薯瘡痂病菌扮演重要角色。

總體而言，芽孢桿菌有諸多菌株具潛力作為生物製劑，而其防治機制目前研究仍未完整，但從諸多前人研究可發現二次代謝物為生物防治菌株不可或缺的重要物質，例如表面素，影響細菌抑制病原菌生長、生物膜生成、產孢能力等諸多作用。而本研究目標difficidin基因雖較少人研究，但經由文獻記載及本研究結果，我們可以推論*dfn*基因簇與*dfnJ* domain影響*B. velezensis* FZB42抑制馬鈴薯瘡痂病菌的能力，但其詳細機制，仍待後續深入研究。

## 引用文獻

1. Bignell, D., Fyans, J., and Cheng, Z. 2014. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *J. Appl. Microbiol.* 116:223-235.
2. Chan, J. M., Guttenplan, S. B., and Kearns, D. B. 2014. Defects in the flagellar motor increase synthesis of poly- $\gamma$ -glutamate in



- Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 196:740-753.
3. Chen, X. H., Vater, J., Piel, J. R., *et al.* 2006. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. J. Bacteriol. 188:4024-4036.
  4. Cheng, K., Lu, F., and Liang, X. 2010. An effective electroporation protocol for *Bacillus alcalophilus* TCCC11004. IEEE. 1-4.
  5. Chen, X., Koumoutsis, A., Scholz, R., *et al.* 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. J. Biotechnol. 140:27-37.
  6. Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., and Borriss, R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. Front. Microbiol. 6:780.
  7. Fan, B., Wang, C., Song, X., *et al.* 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. Front. Microbiol. 9:2491.
  8. Feng, R. Y. 2019. Surfactin is the major secondary metabolite of *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 for combating potato common scab demonstrated by *urf* gene cluster deletion mutants. Master Thesis, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. 73 pp. (in Chinese)
  9. Goodson, J. R., Klupt, S., Zhang, C., Straight, P., and Winkler, W. C. 2017. LoaP is a broadly conserved antiterminator protein that regulates antibiotic gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens*. Nat. Microbiol. 2:1-10.
  10. Healy, F. G., Wach, M., Krasnoff, S. B., Gibson, D. M., and Loria, R. 2000. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. Mol. Microbiol. 38:794-804.
  11. Huang, C. W. 2008. Potato common scab caused by *Streptomyces scabies* in Taiwan – biological characteristics of the pathogen and an attempted biocontrol by antagonistic *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* WG6-14. Master Thesis, National Chung Hsiang University, Taichung, Taiwan. 92 pp. (in Chinese)
  12. Huang, R. C., Wu, Y. F., Tsai, C. H., *et al.* 2021. Biological control of potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. J. Taiwan Agric. Res. 70. 24-42. (in Chinese)
  13. Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94:1259-1266.
  14. Le Breton, Y., Mohapatra, N. P., and Haldenwang, W. G. 2006. In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon. Appl. Environ. Microbiol. 72:327-333.
  15. Lerat, S., Simao-Beauvoir, A. M., and Beaulieu, C. 2009. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. Mol. Plant Pathol. 10:579-585.
  16. Liao, J. H. 2017. Biocontrol of crop disease with *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 and its major antifungal lipopeptide. Master Thesis, National Chung Hsiang University, Taichung, Taiwan. (in Chinese)
  17. Lin, C., Tsai, C. H., Chen, P. Y., *et al.* 2018. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. PLoS One 13:e0196520.
  18. Loria, R., Kers, J., and Joshi, M. 2006. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. Annu. Rev. Phytopathol. 44:469-487.
  19. Michielse, C. B., Van, W. R., Reijnen, L., Cornelissen, B. J., and Rep, M. 2009. Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. Genome Biol. 10:1-18.
  20. Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., *et al.* 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9:1084-1090.
  21. Pérez-García, A., Romero, D., and De Vicente, A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. Curr. Opin. Biotechnol. 22:187-193.
  22. Patrick, J. E. and Kearns, D. B. 2008. MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 70:1166-1179.
  23. Rachinger, M., Bauch, M., Strittmatter, A., *et al.* 2013. Size unlimited markerless deletions by a transconjugative plasmid-system in *Bacillus licheniformis*. J. Biotechnol. 167:365-369.
  24. Shao, Y. H. 2017. An improved method for efficient transformation and regeneration of diverse *Bacillus* species. Master Thesis, National Chung Hsiang University, Taichung, Taiwan. (in Chinese)
  25. Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., and Zhang, R. 2018. Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. Mol. Plant. Microbe. Interact. 31, 560-567.
  26. Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., and Gao, X. 2015. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. Sci. Rep. 5:1-9.

27. Ye, M., Tang, X., Yang, R., *et al.* 2018. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. ACS Chem. Biol. 13:500-505.
28. Zhang, W., Xie, H., He, Y., *et al.* 2013. Chromosome integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) mediated by temperature-sensitive plasmid enhances  $\gamma$ -PGA production in *Bacillus amyloliquefaciens*. FEMS Microbiol. Lett. 343:127-134.
29. Zhang, Z., Ding, Z. T., Shu, D., Luo, D., and Tan, H. 2015. Development of an efficient electroporation method for iturin A-producing *Bacillus subtilis* ZK. Int. J. Mol. Sci. 16:7334-7351.

**Keywords:** potato common scab, *Streptomyces scabies*, *Bacillus velezensis*, difficidin

## ABSTRACT

Ting-Yao Chiang, Chih-Jung Lin, Chia-Hsin Tsai and Ying-Lien Chen\*. 2021. Roles of *dfn* gene cluster of *Bacillus velezensis* FZB42 in combating *Streptomyces scabies*. J. Plant Med. 64(1): 25-34.

\*Corresponding author, E-mail: ychen28@ntu.edu.tw

Potato is one of four major food crops in the world. Potato common scab mainly caused by *Streptomyces scabies* widely occurs in planting fields. It causes cork symptoms on the surface of potato tubers and decreases the quality of potato tuber. Previous study in our laboratory found that *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 can inhibit the growth ability of *S. scabies* and decrease the disease severity of potato common scab. To further investigate antibacterial mechanism of *Bacillus* spp., we conduct random insertion mutation by TnYLB-1 transposon system in *Bacillus velezensis* FZB42. Mutants were obtained and tested whether these mutants affect the inhibition ability against *S. scabies*. According to the experiments above, we speculated that difficidin gene (*dfn*) encoding a secondary metabolite of *B. velezensis* FZB42, affects the inhibition ability against *S. scabies*. To test whether *dfn* plays important role in anti-*S. scabies* activity, we knock out *dfn* gene cluster and *dfnJ* domain in *B. velezensis* FZB42. We found that *dfn* gene cluster and *dfnJ* domain mutants have significantly reduced inhibition zones compared to the wild type, while complementary strain of *dfnJ* domain behaved wild type inhibition level against *S. scabies*. Based on above results, we suggest that *dfn* gene cluster and *dfnJ* domain play important roles in combating *S. scabies*.