

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所

碩士論文

Institute of Plant Biology


College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

探討茄科鋅指蛋白與 EAS 基因在病害與非生物性逆境反應之功能

**Study of Solanaceae zinc finger protein and EAS genes
in disease and abiotic stress responses**



陳雅婷

Ya-Ting Chen

指導教授：鄭秋萍 博士

Advisor: Dr. Chiu-Ping Cheng

中華民國一百年一月

January, 2011

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

探討茄科鋅指蛋白與 EAS 基因在病害
與非生物性逆境反應之功能

Study of Solanaceae zinc finger protein and EAS
genes in disease and abiotic stress responses

本論文係陳雅婷君 (R97B42034) 在國立臺灣大學植物科學研究所完成之碩士學位論文，於民國一百年一月二十七日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

中央研究院農業生物科技研究中心

詹明才 博士

詹明才

中央研究院植物暨微生物學研究所

符宏勇 博士

符宏勇

臺灣大學農藝學系暨研究所

常玉強 博士

常玉強

臺灣大學農藝學系暨研究所

張孟基 博士

張孟基

臺灣大學植物科學研究所

鄭秋萍 博士 (指導教授)

鄭秋萍

謝誌

呼~終於!這應該是第一個念頭吧,終於堅持走到最後。感謝曾經經歷過的許多挫折和教訓,讓我更加學會如何面對與成長。也何極其幸運在碩士生涯能遇上這麼多願意教導及幫助自己的人:首先感謝鄭秋萍老師兩年來的教誨,很謝謝老師提供了我們豐富的資源和環境供我們學習,在個別談時間也給予我寶貴的意見和方向,讓我得以窺探生科學術殿堂的奧妙和驚奇。也謝謝符宏勇老師、張孟基老師、詹明才老師和常玉強老師撥冗參加我的口試,詳細審閱我的論文並給予最珍貴的建議和指導,對於一本還不夠完整的論文,您的寶貴經驗將使我的研究內容更加嚴謹和成熟。另外,也要謝謝鐸駿學長(丁丁)帶領我進入植物組團隊,你教會我操作實驗應有的態度和邏輯,讓我得以為鋅指蛋白(還是戒環蛋白??)寫下新的一頁;謝謝淑蓮,謝謝你為 EAS 所打下的一切基礎,並且在離開這麼久後,還願意替我解決困難和疑惑;謝謝冠中,你帶我開始認識台大生活週遭的一切,許多美食因你而可品嚐!謝謝康哥:坐在門口的緊張生活是你陪我一起渡過;還有給剛進來就懂忤逆學長姐的新血們,給益敏:一起上專討的日子很溫馨,沒有我的日子你可以更專心了;給盈茹:你讓我見識到小女生的撒嬌功夫了得,真是忘塵莫及啊;給張芯:你沒神經的個性和開朗讓我好佩服,還有 welcome to 植物組;給詠竹:你總是帶著 O 型腿來找我討論許多無解和無奈的問題,但我相信以你的聰明才智可以為未知 28 找到一片天 XD。另外,也謝謝葉家學長們總是不辭辛勞地回答我們許多無知的問題;謝謝 TechComm 工作坊的技術人員,是你們協助我滿足虛榮的幻想,讓我完成許多表面看起來好像很威的成果。

以下,獻給陪伴我兩年的夥伴,以最真實之生活點滴記錄曾參與過的一切:

怡君:告訴你(指):有一天我一定要買下整座山頭讓所有流浪動物在上面奔跑~~~

(您不但恩威並重,同時也是我認識最具有愛心的人,好人一定有好報的啦)

玉梅:阿..就是這樣的嘛..你知道的...ㄟ....這也不是重點..隨便啦(Lab meeting 中)

(您對我教導之恩沒齒難忘;也謝謝您教會我...原來很多事可以不要太在乎)

安琪:對...我就是命賤(泣)!所以活到這把歲數還要被你們這些學弟妹這樣糟蹋...

(最佩服的就是您問不倒的 NCBI 資料庫,您教會我太多太多知識了!!!)

千惠:我們什麼時候去吃飯??今天要吃什麼??(他鄉遇故知,好想這樣跟你說)

(椰子千一直都是我們大家的開心果+模仿達人+刻苦耐勞+有苦說不出+%&%%*)

文潔:千千...我們去廁所好不好~(永遠忘不了玩賤人實果時您的冷靜害我尖叫被罵)

(你的牛奶片總是好吃的讓我飛上天~而且不管歌仔戲還是投資我都好佩服)

季穎:怎麼辦...我剛剛才發現我的 *tol-pal* *\$&%*(%%)....哭哭@@~~~(冏)

(即使很多時後我都聽不懂,但我很捧你的場吧:D,更要謝謝你帶我進入宅界)

芸璐:機斃了!!!來呀~誰怕誰呀!! 齁...你很弱耶...閃開,讓我來啦(always 挑釁詞...)

(很開心和你默默守候著天蠍座 bench,一起做實驗+鬥嘴的日子永遠不會忘記)

宗霖:要不是我長這樣,我早就出去花了...(一位堅持沒有很胖並隨時生活在關鍵時刻~)

(植物組許多龐大實驗都是與你共同完成,一起奮鬥的心酸和血淚謹記在心!)

最後,更要謝謝我的家人,謝謝你們如此支持我的學業,您們堅強的後盾,是我堅持下去的動力,雖然你們總是搞不清楚我唸幾年級和研究什麼,但最終慶幸自己沒有讓你們失望!另外,也謝謝佩樺、冠涵、庭郁和珮君,在台北的日子,有你們真好!!

僅將此論文送給每一位我愛的人,願大家都能豁達開朗地邁開步伐向前走。

雅婷 於 2011 · 台北 · 春

中文摘要

植物生長常會遭受生物性與非生物性逆境的影響，其中由 *Ralstonia solanacearum* 引起之青枯病 (bacterial wilt, BW) 與缺水逆境 (water deficit, WD) 更是造成全球作物生產重大損失的重要因子。本研究針對番茄 *SIZFP* 基因 (C3HC4-RING zinc finger type) 與茄科抗菌蛋白合成之關鍵酵素 5-Epi-aristolochene synthase (EAS) 在病害與非生物逆境反應之功能進行探討。首先，先前短暫靜默番茄 *SIZFP* 基因試驗發現此基因參與番茄抗青枯病機制中，本研究進一步發現在正常生長條件下，*SIZFP* 蛋白主要表現在花及成熟果實，蛋白質則坐落於細胞骨架；在抗/感品系處理青枯病菌及各式病原相關物質後，*SIZFP* 在轉錄層次之表現皆受到抑制，但不受乾旱逆境或荷爾蒙調控。此外，*SIZFP* 基因被靜默後導致番茄較不耐乾旱，而過量表現 *SIZFP* 可使轉基因菸草植株更抗青枯病菌、缺水、氧化逆境和鹽害，且在正常生長條件下其 SA 路徑相關防禦基因之表現已明顯提升。綜合以上結果證實 *SIZFP* 基因在青枯病和多種非生物逆境防禦反應中皆扮演正面的重要角色。另一方面，當 *SIZFP* 之阿拉伯芥同源基因 *At5g24870* 基因缺失時，其種子萌芽率在鹽害、模擬乾旱、糖分、滲透壓及 ABA 等逆境下皆較低，但並不影響對青枯病與軟腐病菌之反應，顯示 *At5g27870* 基因在植物對抗多數非生物逆境上亦具正面功能。第二部分的研究係探討茄科 *EAS* 基因在逆境反應之功能，先前研究短暫靜默番茄 *SIEAS* 基因試驗發現此基因參與番茄抗青枯病機制中，本研究進一步發現過量表現煙草 *NtEAS* 之轉基因菸草可更抗青枯病菌、氧化逆境和鹽害，且其 SA 路徑相關防禦基因之表現亦明顯提升。此外，先前研究顯示在不同煙草品種中，以 *Nicotiana glutinosa EAS (NgEAS)* 基因受青枯病菌及氧化逆境誘導表現最為顯著，經進一步釣取啟動子序列並分析後發現，*NgEAS* 啟動子可受多種重要植物病原菌與病原相關物質誘導，並經由維管束傳導達成系統性的表現，而 GT-1 box 為誘發訊號傳遞之必需 *cis-element*。綜合本研究顯示 *SIZFP* 與 *EAS* 基因在青枯病、乾旱、氧化逆境和鹽害逆境防禦反應皆具正面功能，除在學術上提供更多關於植物抗逆機制的重要資訊外，未來也可將之應用在培育抗病/逆新品種的研發工作上。

關鍵字: 鋅指蛋白、青枯病菌、乾旱、茄科抗菌蛋白、誘導性啟動子

Abstract

Plant constantly encounters environmental stresses, including biotic and abiotic factors. Bacterial wilt (BW, caused by *Ralstonia solanacearum* or *Rs*) and water deficit (WD) are very important factors limiting crop production worldwide. The aim of this work was to study function of a tomato zinc-finger protein *SIZFP* (a C3HC4-RING finger protein) and a *Solanaceae* gene encoding 5-epi-aristolochene synthase (*EAS*) in biotic and abiotic stresses. Previously, *SIZFP* was suggested to involve in tomato BW defense mechanism by virus-induced gene silencing (VIGS). This study further revealed that *SIZFP* was abundantly expressed in tomato flower and mature fruit, and that GFP::*SIZFP* recombinant protein localized on cytoskeleton in *Arabidopsis* protoplasts. *SIZFP* expression at transcriptional level was suppressed by *Rs* and various pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), but not significantly changed under drought and phytohormone treatments. In addition, VIGS of *SIZFP* in tomato resulted in increased sensitivity to drought stress, and the 35S::*SIZFP* transgenic tobacco displayed enhanced tolerance to BW, drought, oxidative stress and salinity. Furthermore, expression of SA-dependent pathway-related genes was enhanced in 35S::*SIZFP* transgenic tobacco under normal growth condition. These results together evidences an important and positive role of *SIZFP* in defense response to multiple stresses. On the other hand, null mutants of the *Arabidopsis* orthologous gene *At5g24870* of *SIZFP* exhibited significantly increased susceptibility to various abiotic stresses during seed germination stage, but their response to *Rs* and *Pectobacterium chrysanthemi* infection was not obviously affected, suggesting that *At5g24870* is involved in plant defense to various abiotic stresses. Secondly, tomato *SIEAS* was suggested to involve in tomato BW defense mechanism by VIGS. Current study further showed that 35S::*NtEAS* transgenic tobacco conferred enhanced tolerance to BW, oxidative and salinity, and that

expression of SA-dependent pathway-related genes in these transgenic plants was enhanced under normal growth condition. In addition, our previous study identified and isolated a *Nicotiana glutinosa* *EAS* (*NgEAS*) whose expression could be significantly induced by *Rs* and oxidative stress. This study further revealed that *NgEAS* promoter can be systemically induced by a group of economically important phytopathogenic bacteria and fungi, as well as PAMP in vascular tissues, and the GT-1 box is an essential *cis*-element for systemic activation. These results consistently demonstrate that *Solanaceae* *EAS* positively regulate defense response to microbial pathogens and various abiotic stresses. Collectively, current study paves the way not only for elucidating mechanisms and determinants involved in plant stress defense responses, but also for potentially the establishing useful means of breeding crops with enhanced tolerance to diseases and abiotic stresses.

Keywords: Zinc finger protein, *Ralstonia solanacearum*, drought, *5-epi-aristolochene synthase*, inducible promoter

縮寫與全名對照表

縮寫	全名
<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
ABA	Abscisic acid
Amp	Ampicillin
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
BW	Bacterial wilt
CFU	Colony formation unit
CFP	Cyan fluorescence protein
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
<i>Pch</i>	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>
ET	Ethylene
EtBr	Ethidium bromide
EtOH	Ethanol
EPS	Exopolysaccharide
EF1a	Elongation factor 1a
GFP	Green fluorescence protein
GUS	β -glucuronidase reporter gene
GW	Gateway
HR	Hypersensitive response
JA	Jasmonic acid
Kan	Kanamycin
LB medium	Luria-Bertani medium
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
MS medium	Mijrashige and Skoog medium
MU	4-methyl umbelliferone
MUG	4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide
MV	Methyl viologen
MS	Murasghige and Skoog

<i>NgEAS</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i> 5-Epi-aristolochene synthase
ORF	Open reading frame
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCD	Programmed cell death
PCR	Polymerase chain reaction
PEG 4000	Polyethylene glycol 4000
PLACE	Plant <i>cis</i> -acting regulatory DNA elements
<i>PR</i> gene	Pathogenesis-related gene
Pss	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
RING domain	Really interesting new gene domain
Rpm	Rotation per minutes
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcription PCR
<i>Rs</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
SA	Salicylic acid
SAR	Systemic acquired resistance
SDS	Sodium dodecyl sulfate
<i>SIEAS</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> 5-Epi-aristolochene synthase
<i>SIZFP</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> zinc finger protein
SM1	Semi-selective medium
TAIR	The Arabidopsis information resource
Tet	Tetracycline
Tris	Tris (hydroxymethyl aminomethane)
TTC	2, 3, 5-triphenyl- tetrazolium chloride
VIGS	Virus-induced gene silencing
WD	Water deficit
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
YFP	Yellow fluorescence protein

目錄

口試委員會審定書	i
謝誌	ii
中文摘要	iii
英文摘要	iv
縮寫與全名對照表	vi
目錄	viii
表目錄	xiii
圖目錄	xiv
附錄目錄	xvi
第一章 前言	1
1. 番茄簡介	1
2. 青枯病 (Bacterial wilt)	1
3. 植物與病原菌交互作用	2
4. 植物荷爾蒙在抗逆境之功能扮演	3
5. 植物對於青枯病害之相關研究	4
6. 植物非生物逆境之研究	8
7. 植物細胞骨架	9
8. 鋅指蛋白 (Zinc finger proteins, ZFP)	10
9. 病毒誘導性基因靜默 (Virus-induced gene silencing, VIGS)	11
10. 研究動機	12

第二章 材料與方法	13
1. 植物材料簡介	13
2. 供試質體及菌體培養條件	13
3. 常用實驗方法	14
4. 植物 RNA 萃取及 cDNA 之製備	17
5. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription PCR, RT-PCR)	19
6. 半定量 RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR, sqRT-PCR)	19
7. 核酸即時定量 PCR (Real-time PCR)	20
8. 番茄短暫性病毒誘導性基因靜默	20
9. 番茄澆灌青枯病菌	21
10. 番茄乾旱逆境測試	22
11. 番茄不同組織之 RNA 樣品製備	22
12. 番茄處理各式逆境及植物荷爾蒙 RNA 樣品製備	22
13. 螢光重組蛋白質之定位分析 (sub-cellular localization)	24
14. 菸草基因轉殖 (農桿菌轉殖法)	25
15. 阿拉伯芥花序浸潤轉殖法	25
16. 植物 DNA 萃取	26
17. 菸草轉殖株各式逆境測試	27
18. 阿拉伯芥各式逆境測試	29
19. 菸草轉殖株 <i>Nicotiana tabacum</i> W38 接種茄科病害後 NgEAS 啟動子之活性 分析	30
第三章 結果	33

I. <i>SIZFP</i> 基因之功能性分析	33
1. 番茄 <i>SIZFP</i> 基因之全長選殖、結構組成及其序列比對及分析.....	33
2. <i>SIZFP</i> 蛋白質在細胞之表現位置.....	34
3. <i>SIZFP</i> 基因在轉錄層次之調控.....	34
3.1 <i>SIZFP</i> 基因在番茄植株的內在分佈表現情形.....	34
3.2 <i>SIZFP</i> 基因於番茄接種青枯病菌後之調控情形.....	34
3.3 <i>SIZFP</i> 基因於番茄接種各式 PAMPs 後之調控情形.....	35
3.4 <i>SIZFP</i> 基因於乾旱逆境下之調控情形.....	35
3.5 <i>SIZFP</i> 基因於番茄植株處理植物荷爾蒙後之調控情形.....	35
4. 短暫靜默番茄 <i>SIZFP</i> 基因進行乾旱耐受性測試.....	36
5. 檢測番茄 <i>SIZFP</i> 基因靜默植株其防禦路徑相關基因表現情形.....	36
6. 表現番茄 <i>SIZFP</i> 之轉殖 <i>N. benthamiana</i> 植物分子檢驗及逆境分析.....	36
6.1 過量表現番茄 <i>SIZFP</i> 之轉基因植物分析.....	36
6.2 青枯病菌抗性測試.....	37
6.3 菸草幼苗於非生物逆境下之耐受性測試.....	37
6.4 乾旱耐受性測試.....	38
6.5 氧化及鹽害逆境耐受性測試.....	38
7. 過量表現 <i>SIZFP</i> 之菸草中參與生物與非生物逆境反應之基因表現情形.....	38
8. 阿拉伯芥同源基因之功能分析.....	39
8.1 同源基因之尋找與表現預測.....	39
8.2 同源基因突變體之分子檢驗.....	39
8.3 各式非生物逆境下之萌芽率測試.....	39
8.4 接種青枯病菌及軟腐病菌抗病性測試.....	40
II. 茄科作物抗菌蛋白合成酵素 (5-Epi-aristolochene synthase, EAS) 之功能性分	

析	40
1. 表現菸草 <i>NtEAS</i> 之轉殖 <i>N. benthamiana</i> 植物分子檢驗及逆境分析	40
1.1 過量表現番茄 <i>NtEAS</i> 之轉基因植物分析	40
1.2 青枯病菌抗性測試	41
1.3 氧化及鹽害逆境耐受性測試	41
2. 過量表現 <i>NtEAS</i> 之菸草中病害防禦相關基因表現情形	41
3. 分離及分析新的逆境誘導性茄科基因啟動子	42
3.1 各啟動子片段受青枯病菌之誘發活性測試	42
3.2 真菌與細菌病原菌之誘發表現情形	42
3.3 不同病原型式之誘發表現	43
3.4 在植物不同組織中之表現	43
第四章 討論	44
I. <i>SIZFP</i> 基因之功能探討	44
1. <i>SIZFP</i> 主要表現於細胞骨架與植物的花與成熟果實	44
2. 番茄 <i>SIZFP</i> 基因正調控青枯病防禦反應	45
3. 番茄 <i>SIZFP</i> 基因正調控乾旱、氧化逆境及鹽害之防禦反應	46
4. 阿拉伯芥同源基因 <i>at5g24870</i> 突變體對多數非生物逆境耐受性降低	48
5. <i>At5g24870</i> 基因在病害防禦之功能探討	48
6. <i>SIZFP</i> 基因功能分析結語	49
II. 茄科 <i>EAS</i> 基因之功能探討	49
1. 表現菸草 <i>NtEAS</i> 基因之轉殖菸草增加對青枯病菌及非生物逆境抗性	49
2. <i>NgEAS</i> 基因啟動子可受多種病菌誘導，且可能具未知受病原菌誘導 <i>cis</i> -elements	50

3. <i>NgEAS</i> 基因啟動子專一表現在維管束組織	51
4. GT-1 box 為 <i>NgEAS</i> 啟動子誘發訊號接收之必須 <i>cis</i> -element.....	52
5. 茄科 <i>EAS</i> 基因功能分析結語.....	53
III. 本論文總結	53
第五章 未來展望	54
參考文獻	56



表目錄

表一、分析番茄 <i>SIZFP</i> 基因其上游 3000 bp 啟動子區域之 putative <i>cis</i> -elements	68
表二、比對 <i>SIZFP</i> 基因在阿拉伯芥中同源基因及其胺基酸序列分析.....	69
表三、阿拉伯芥同源基因於生物/非生物逆境及特定條件下之表現分析.....	70
表四、分析番茄 <i>SIEAS</i> 基因其上游 3000 bp 啟動子區域之 putative <i>cis</i> -elements	72



圖目錄

圖一、 <i>SIZFP</i> 基因全長序列、組成結構、與序列比對分析.....	74
圖二、 <i>SIZFP</i> 蛋白質細胞中表現位置.....	75
圖三、 <i>SIZFP</i> 基因於抗病品系番茄 (H7996) 各組織中之表現情況.....	76
圖四、 <i>SIZFP</i> 基因於抗病/感病蕃茄品系葉部接種青枯病菌後之表現情況.....	77
圖五、 <i>SIZFP</i> 基因於抗病番茄 (H7996) 葉部接種 PAMPs 後 RNA 表現情形..	78
圖六、 <i>SIZFP</i> 基因於抗病品系番茄 (H7996) 處理乾旱及復水後之表現情形.....	79
圖七、 <i>SIZFP</i> 基因於抗病品系番茄 (H7996) 處理荷爾蒙後之表現情形.....	80
圖八、抗病品系番茄 (H7996) VIGS 番茄 <i>SIZFP</i> 基因進行乾旱測試.....	81
圖九、抗病番茄 (H7996) VIGS 番茄 <i>SIZFP</i> 基因後檢測 <i>GluB</i> 基因表現情形..	82
圖十、過量表現 <i>SIZFP</i> 之轉基因菸草表現量分析.....	83
圖十一、過量表現 <i>SIZFP</i> 之轉基因菸草植物感染青枯病菌之抗病測試.....	84
圖十二、過量表現 <i>SIZFP</i> 轉基因菸草幼苗在非生物逆境培養基之耐受性檢測..	85
圖十三、表現番茄 <i>SIZFP</i> 之轉基因菸草乾旱逆境下耐受性測試.....	86
圖十四、表現番茄 <i>SIZFP</i> 之轉基因菸草氧化及鹽份逆境下耐受性測試.....	87
圖十五、表現番茄 <i>SIZFP</i> 之轉基因菸草中內生性逆境相關標誌基因表現.....	88
圖十六、阿拉伯芥同源基因 <i>at5g24870</i> 突變體分子檢驗.....	89
圖十七、阿拉伯芥同源基因 <i>at5g24870</i> 突變體於含有各式非生物逆境培養基下之 萌芽率測試.....	90
圖十八、阿拉伯芥同源基因 <i>at5g24870</i> 突變體接種青枯病菌 (Rd15) 與軟腐病菌 (<i>Pch</i>) 之抗病性測試.....	91
圖十九、過量表現菸草 <i>NtEAS</i> 之轉基因菸草表現量分析.....	92
圖二十、表現菸草 <i>NtEAS</i> 之轉殖菸草植物之青枯病菌抗病測試.....	93
圖二十一、表現菸草 <i>NtEAS</i> 之轉殖菸草植物氧化及鹽份逆境下耐受性測試.....	94
圖二十二、表現菸草 <i>NtEAS</i> 之轉殖菸草植物其生物逆境基因檢測.....	95

圖二十三、菸草 *N. glutinosa* EAS (NgEAS) 啟動子序列及其片段活性分析..... 96

圖二十四、菸草 NgEAS 啟動子接種真菌及細菌病原菌之活性測試..... 97

圖二十五、菸草 NgEAS 啟動子接種青枯病菌不同病原形式之活性測試..... 98

圖二十六、菸草 NgEAS 啟動子於植物不同組織中之活性測試..... 99



附錄目錄

附錄一、番茄抗病品系 (H7996) 短暫靜默 <i>SIZFP</i> 基因降低對青枯病菌抗性 ..	100
附錄二、不同煙草之 <i>EAS4</i> 基因逆境下表現情形	101
附錄三、青枯病菌 (<i>Ralstonia solanacearum</i>) 感染植物過程.....	102
附錄四、不同網站分析番茄 <i>SIZFP</i> 可能位於細胞表現之表位置	103
附錄五、預測 <i>SIZFP</i> 基因於番茄 EST 資料庫之組織表現情形.....	104
附錄六、 <i>SIZFP</i> 基因於蕃茄處理乾旱後之表現情形	105
附錄七、 <i>SIAIM</i> 指標基因於蕃茄處理 ABA 後之表現情況.....	106
附錄八、VIGS 植物防禦訊息傳導途徑關鍵調控子並檢測 <i>SIZFP</i> 基因表現情形	107
附錄九、分析番茄 <i>SIZFP</i> 基因在阿拉伯芥中之同源基因組織表現情形.....	108
附錄十、阿拉伯芥同源基因 <i>at5g24870</i> 突變體 (T6 世代) 之分子檢定.....	109
附錄十一、反轉錄 PCR 檢測 <i>SIZFP</i> 基因在 <i>AtNPR1</i> 轉殖番茄中表現情況....	110
附錄十二、番茄抗病品系 (H7996) 短暫靜默 <i>SIEAS</i> 基因降低對青枯病菌抗性	111
附錄十三、 <i>Nicotiana glutinosa</i> <i>EAS</i> 基因啟動子之鈎取與分離.....	112
附錄十四、不同長度之 <i>NgEAS</i> 基因啟動子 R1 植物受青枯病菌誘導情形.....	113
附錄十五、 <i>NgEAS</i> 基因於逆境下在植株的內在分部表現情形.....	114
附錄十六、不同長度之 <i>NgEAS</i> 基因啟動子 R1 植物受各式病原菌誘導情形...	115
附錄十七：VIGS 或過量表現 <i>SIZFP</i> 及阿拉伯芥同源基因突變體對內生基因表現 和各式逆境下之影響	116
附錄十八、VIGS 或過量表現茄科抗菌蛋白 <i>EAS</i> 對內生基因表現和各式逆境下之 影響	117
附錄十九、本研究所使用之引子	118
附錄二十、常用培養基及藥劑	120
附錄二十一、用於 TA clone 的 pCR8 [®] /GW/TOPO [®] 載體.....	124

附錄二十二、用於 TA clone 的 pCRII® /GW/TOPO® 載體	125
附錄二十三、表現 SIZFP 綠色螢光重組蛋白所使用的載體	126
附錄二十四、TRV-based VIGS vectors	127
附錄二十五、菸草轉殖載體之構築	128
附錄二十六、真菌 <i>Alternaria alternate</i> 的製備	129



第一章 前言

1. 番茄簡介

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 分類上屬於茄科 (*Solanaceae*) 茄屬番茄亞屬，以中美洲的秘魯為其原產地的多年生草本植物，為繼馬鈴薯之後，成為世界上第二重要的高經濟價值之茄科作物，且近年來其果肉細胞質內的茄紅素被評估具有許多醫療效用 (Dorais *et al.*, 2008)。由於台灣地區屬於高溫多濕之環境，番茄於生長過程中易遭受病原菌感染而發生病害，造成產量的損失。因此關於如何增加番茄作物產量的研究以及相關病害的防治措施便顯得格外重要。

番茄帶有 12 對染色體，基因體大小為 9.5×10^8 bp，相較其他茄科植物之基因體顯得較小。2005 年番茄的基因組開始即開始進行解序，其計畫稱為「國際茄科基因組計劃」，分別由中國大陸、美國、義大利、英國、印度、法國、荷蘭、西班牙、日本、韓國等十個團隊共同執行，並已於 2009 年底初步完成解序，且其基因組之 Shotgun Sequence 發表於國際茄科基因組網站 (SOL genomic network, <http://solgenomics.net/>)。

2. 青枯病 (Bacterial wilt)

青枯病又稱為細菌性萎凋病害 (bacterial wilt)，是由革蘭氏陰性病原菌 *Ralstonia solanacearum* 所引起的土壤傳播性維管束病害 (Wang *et al.*, 2000; Denny, 2006)，該病害分佈遍及全世界，尤其熱帶及亞熱帶地區之發生更是相當普遍且具威脅性。青枯病菌其寄主範圍非常廣泛，危害之作物範圍包括五十幾屬，超過 200 多種作物，包括果樹、蔬菜、花卉、觀賞植物以及多年生的木本植物等等，且許多重要經濟作物，如馬鈴薯、番茄、香蕉等 (Denny, 2006)，其中番茄更為前五大病害之一。青枯病主要發生於根、莖、葉等部位，甚少發生在果實；常由根部感染後，細根褐化並腐爛，影響根部水分吸收造成發病初期在下位葉的葉柄呈現下垂，而後葉片漸次萎凋，導致植株快速萎凋枯死時葉仍呈青綠色，故稱為「青枯病」。橫切植株莖稈，以手擠壓維管束可見有乳白色黏性的菌液流出。病菌可由根部直接感染或經由植物的自然開口，如葉表的氣孔、組織的傷口等侵入植物體內進而感染植株，並於維管束內進行增生，產生胞外多醣體 (Exopolysaccharide, EPS)

阻塞維管束系統的水份運輸，遭受感染的植物致死率極高，且罹病株因根部釋放大量病原菌到土壤中再感染鄰近健康植株根部，因此，且常造成百分之百的大量作物損失 (Hayward, 1991; Vasse *et al.*, 1995; Saile *et al.*, 1997; Genin, 2010) (附錄三)。由於台灣氣候屬於高溫多溼，青枯病菌常是台灣夏季番茄生產的重要病害之一，又因青枯病自發病到枯萎極為迅速，至目前為止尚無任何有效的化學防治方式；且由於青枯病造成植物體內水分輸送之困難，其所造成的萎凋外表性狀與植物缺水之現象極為雷同，因此青枯病與乾旱逆境也有一定程度上之關聯性。

R. solanacearum 其習性為好氣、桿菌，具有極生的長鞭毛，屬於 β -proteobacteria (Denny, 2006)。在土壤中，本病原細菌可殘存 14 個月以上，最長可達 25 年之久。青枯病菌要成功感染寄主植物是一相當複雜的過程，目前已知的致病性相關因子包含胞外多醣體 (EPS)、第二型蛋白分泌系統 (Type II secretion system) 分泌之細胞壁分解酵素 (Cell wall degrading enzymes, CWDE)、第三型蛋白分泌系統 (Type III secretion system) 及其分泌之蛋白 (effectors) (Huang and Allen, 1997; Saile *et al.*, 1997; Gonzalez and Allen, 2003; Liu *et al.*, 2005; Poueymiro *et al.*, 2009)。其中，第三型蛋白分泌系統廣泛存在於許多革蘭氏陰性菌中，病原菌經由該一系統可將一些毒力蛋白 (effector) 藉以類似針筒狀之構造直接送入寄主體內，促使養分的獲得亦或是抑制寄主的防禦反應 (Jones and Dangl, 2006)，為致病性上不可或缺的分秘系統 (Hueck, 1998)。

3. 植物與病原菌交互作用

在自然環境下，當植物遭受病原菌攻擊時，會引起許多生理及生化上的改變，除了植物本身第一道的防禦 (如：細胞壁、葉片上的蠟質和氣孔)，植物亦會啟動兩種誘發性防禦，分別為專一性和非專一性之防禦反應保護自己。非專一性防禦反應可廣效性地受 Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) 所誘發，如：細菌鞭毛 (flagellin)、脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS)、真菌幾丁質 (chitin) 及 β -glucans 等分子，其引發之防禦反應稱為 PAMP-triggered immunity (PTI) (Zipfel, 2008; Boller and He, 2009)。許多文獻指出，在植物細胞感受到 PAMPs 後，會引發一連串體內生化變化，包括改變細胞膜上離子通道之通透性、產生 oxidative burst，誘導大量活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) (Karpinski *et al.*, 1999;

Kovtun *et al.*, 2000) 以及活化 mitogen-activated protein kinase 訊息傳遞等防禦反應 (Kovtun *et al.*, 2000; Nühse *et al.*, 2000)。專一性反應即基因對基因理論 (gene for gene theory)，抗病植物體內會有一個抗病基因 (disease-resistance gene 或簡稱 *R* gene)，可以非常專一地辨識病原菌特定基因 (avirulent gene 或簡稱 *Avr* gene) (Boller and He, 2009)，並引發過敏性反應 (hypersensitive response, HR)。被感染的組織會產生大量的活性氧族 (reactive oxygen species, ROS)，進而引發程序性細胞死亡 (programed cell death, PCD)，以抑制病原菌生長，使病原菌無法擴散 (Lam *et al.*, 2001)。這種藉由辨識病菌所分泌之 effector 所引發的防禦反應即稱為 effector-triggered immunity (ETI)。

除了在病菌感染的部位有病徵及組織壞死外，植物亦會藉由木質化 (lignification) 使細胞壁增厚，並產生及累積一些抗病菌的物質，如：植物抗毒素 (phytoalexin) 及一些防禦相關蛋白質 (pathogenesis-related protein, PR) (Ryals *et al.*, 1996)。植物抗毒素為二次代謝物，是當植物因受傷害、生理刺激、感染病原菌或其產物之刺激後才會產生。現在已知能產生植物抗菌素的植物多達 21 科，約 100 多種以上，多數為類異黃酮和類萜化合物。其中，茄科植物所產生之植物抗菌素多為 capsidiol 此化合物。1975 年由 Burden 等人最先從受菸草鑲嵌病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 感染之 *Nicotiana glutinosa* 植株其葉片中分離出 glutinosone，該物質於健康葉片中檢測不到，只有在感染植株中才會產生；同時，該團隊又從感染菸草壞死病毒 (*Tobacco necrotic virus*, TNV) 之植株分離出 capsidiol 該物質，自此以後，陸陸續續許多新的植物抗菌素則不斷從被不同病害感染之植株所分離出來。

4 植物荷爾蒙在抗逆境之功能扮演

植物荷爾蒙是植物器官間進行訊息傳遞之重要化學分子，在生長發育調控及對抗各種逆境上之訊息傳遞都扮演著非常重要的角色，其中最被廣泛研究所熟知的是水楊酸 (salicylic acid, SA)、乙烯 (ethylene, ET) 和茉莉酸 (jasmonates, JA) (Broekaert *et al.*, 2006; Loake and Grant, 2007; Balbi and Devoto, 2008)，而近年來，陸續發現離層酸 (abscisic acid, ABA)、生長素 (auxin)、吉貝素 (gibberellin)、細胞分裂素 (cytokinins, CK) 和菜素甾醇類化合物 (brassinosteroids, BR) 等植物激素

在植物防禦反應中，亦都扮演著一定角色 (Bari and Jones, 2009)。

當植物遭受到病原菌侵染時，會促進植物體內生性 SA 生成，並引起感染區域 HR 反應。Ryals 等人 (1996) 指出，SA 亦會引起系統性抗病 (systemic acquired resistance, SAR) 反應；而近年來，Park 等人 (2007) 於菸草之研究更指出 SAR 之抗病機制是藉由甲基水楊酸 (methyl salicylate) 於感染區域被誘導，隨後作為訊號傳遞分子使植物達到系統性之防禦反應。此外，SA 之訊息啟動亦會透過活化 PR 等下游基因，以有效且系統性地抵抗病原菌攻擊 (Cutt *et al.*, 1989)。

乙烯是一種氣態植物荷爾蒙，在遭遇病原菌感染、乾旱、臭氧、鎘毒害等逆境時，會大量生成內生性的乙烯 (Bari and Jones, 2009)。此外，乙烯可經空氣散播至鄰近區域，促進木質素 (lignin) 產生並活化植物抗毒素等酵素活性，以達抗病效果。另一方面，當植物受到昆蟲咬傷、病原菌感染或處於滲透及乾旱逆境時，都會迅速誘導內生性 JA 合成，並正向調控合成植物抗毒素相關基因、PR 蛋白和細胞壁強化相關蛋白合成 (Ellis *et al.*, 1998)。此外，JA 亦可作為訊號傳遞分子，將訊息從受傷葉片傳達到鄰近未受傷之葉片 (Gao *et al.*, 2004)。許多文獻報導，JA 與 SA 會產生相互拮抗之作用，當阿拉伯芥受到病原菌侵染時，會誘導 SA 累積，而當 SA 訊息傳遞重要中樞調控 *NPR1* (*non-expressor of PR gene 1, NPR1*) 突變後，該植株若受病原菌感染，則會促進 JA 的累積 (Bari and Jones, 2009)。此外，在 *npr1* 突變株中，會促進 JA 生合成途徑關鍵酵素 LOX (lipoxygenase) 與下游 *PDF1.2* 之基因表現 (Spoel *et al.*, 2003)。另外，ABA 於植物對抗乾旱逆境時會被誘導合成，植物體內藉由 ABA-dependent 途徑進一步活化 bZIP 轉錄因子，進而結合至抗乾旱相關基因之啟動子上游的 ABREs (ABA-responsive regulatory elements) 順式因子 (*cis*-element)，藉以活化啟動抗乾旱相關基因 (Seki *et al.*, 2007)，此外，阿拉伯芥的 MYB96 轉錄因子藉由 ABA-dependent 途徑調控 *RD22* (*RESPONSIVE TO DEHYDRATION22*) 基因抵抗乾旱逆境 (Seo *et al.*, 2009)，以上報導均顯示植物荷爾蒙及其傳導途徑對於植物防禦的作用有很大的影響。

5. 植物對於青枯病害之相關研究

由於目前抗青枯病之植物防禦機制研究並不多，而是多著重於青枯致病病菌其生態及演化方面的探討，且經研究發現可感染番茄的青枯病第一生理小種 (race

1) 在基因型及毒力上都有非常大之差異性且複雜 (Jaunet and Wang, 1999); 而抗病品種在不同地區及針對不同菌株其抗病穩定性亦有差異 (Chellemi *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 1994; Hanson *et al.*, 1998), 因此, 若以傳統育種方法培育同時抗多種青枯病菌菌株之植物其廣效性亦不佳, 其中, Hawaii 7996 (H7996) 品系已是目前發現可在不同地區抵抗不同青枯病菌菌系的抗病品系番茄, 但其抗病程度亦無法達到完全免疫 (Prior *et al.*, 1994)。

目前, 針對尋找抗青枯病基因之研究指出, 以基因定位 (mapping) 之方式分析可發現, 當以不同接種方法或不同菌株在同一抗病品種可定位到不同或相同的 QTL (Quantitative trait locus), 從中顯示出青枯病之抗病機制其實極為複雜 (Wang *et al.*, 2000)。另外, 過去研究亦指出, 番茄青枯病害之萎凋程度被認為與植物體內的青枯病菌濃度有關, 當菌量高達 $10^9 - 10^{10}$ CFU g^{-1} 時會使番茄出現萎凋病徵 (Grimault *et al.*, 1994; Wang and Lin, 2005)。另一方面, 由於目前植物對於青枯病其抗病分子研究機制多著重於十字花科物種的阿拉伯芥, 以下則針對目前之研究進展做介紹。

5.1 植物生理結構對抗青枯病菌之探討

當植物遭受病原菌感染時, 除了會引發 PTI 和 ETI 反應外, 植物本身生理結構所扮演的第一道防線亦非常重要。Somerville 等人 (2004) 即提出植物細胞壁其結構組成與成分會影響其植物抗病能力程度; Hernandez-Blanco 等學者於 2007 年亦發現, 當突變合成初級細胞壁相關基因時, 會增加對其青枯病菌及真菌 *Plectosphaerella cucumerina* 之抗病能力; 反之, 若突變合成次級細胞壁相關基因時, 則對病原菌之感染較為敏感, 而進一步檢測相關生物和非生物逆境所誘導之下游基因, 發現合成細胞壁相關基因突變時, 其影響了 ABA 生合成及調控相關基因, 包含 *NCED3*、*ABI1*、*ABI2* 與 *ABI4* 等進而造成其所看到之外表型。

5.2 植物荷爾蒙訊息傳遞對抗青枯病之探討

在阿拉伯芥中, 已證實茉莉酸、乙烯以及離層酸的相關防禦機制會參與阿拉伯芥對抗青枯病菌的反應 (Hirsch *et al.*, 2002; Hernandez-Blanco *et al.*, 2007)。Deslandes 等學者於 2002 年從 *R. solanacearum* strain GMI1000 感病品系 Col-5

與抗病品系 Nd-1，以 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分子標誌方式成功分離出抗青枯病基因 *RESISTANT TO RALSTONIA SOLANACEARUM 1-R* (*RRS1-R*)，且於阿拉伯芥接菌實驗證實 *RRS1-R* 基因可成功限制青枯病菌之增生，且目前大部分研究指出，透過 SA 調控途徑之 *R* 基因會藉由調控 *NDR1* (*non race-specific disease resistance 1*) 或 *EDS1* (*enhanced disease susceptibility 1*) 基因進而協調其防禦反應。在 ABA 相關研究顯示，當將 ABA 相關基因如 *ABII-1*、*ABII-1* 與 *ABII-6* 等基因進行突變後，對青枯病菌之感染有降低抗性之現象，也由此證實 ABA 在阿拉伯芥抵抗青枯病上扮演著重要角色 (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007)。另一方面，Hirsh 等學者 (2002) 以阿拉伯芥 Col-0 為材料，將乙烯訊號傳遞相關之 *EIN2* 基因突變後，發現該突變體對青枯病菌 GMI1000 之感染從感病現象轉而有遲緩發病之趨勢。

5.3 特定基因或基因家族 (superfamily) 對於抗青枯病之探討

截至目前許多研究已指出，許多特定轉錄因子包括 AP2/EREBP (APETALA/Ethylene Responsive Element Binding Protein) 基因家族、WRKY 基因家族或 bZIP (basic leucine zipper domain) 基因家族等，都在植物抗病上扮演非常重要的角色。Hu 等學者於 2008 年研究指出，當阿拉伯芥 *AtWRKY53* 基因突變後，對親合性 (compatible interaction) 之青枯病菌有延遲發病之現象；另一方面，阿拉伯芥其 *WRKY27* 基因亦被發現可能扮演著負調控的角色，當該基因突變後，同樣有延遲青枯病之發病趨勢，且間接影響一氧化氮 (nitric oxide) 的代謝，並藉由調控韌皮部與木質部之間的訊息傳導進而影響萎凋病徵的產生 (Mukhtar *et al.*, 2008)。

在 ERF 相關研究方面，首先在番茄已分離到 *TSRF1* 基因 (Tomato Stress Responsive Factor1)，該基因會受 ABA 所誘導，增加其植物中內生性的 ABA 與乙烯含量，而將過量表現 *TSRF1* 基因之轉植株接種青枯病菌，發現可明顯降低青枯病菌於植株內之增生能力 (Zhou *et al.*, 2008)；另一方面，自大麥所分離出之 *HvRAF* 基因 (*Hordeum vulgare root abundant factor*)，亦屬 ERF 基因家族成員之一，可受水楊酸、離層酸與乙烯等荷爾蒙所誘導，且過量表現 *HvRAF* 基因之轉植株，其相關抗病防禦基因其表現量亦明顯增加，此經接菌試驗證實，其轉植株

可增加對青枯病菌之抗性 (Jung *et al.*, 2007)。

另一方面，Kiba 等學者，以葉部接種方式，在菸草接種有毒力之青枯病菌及第三型分泌系統 *PoPA* 基因缺失之無毒力菌株 (leaf-infiltration)，成功找到 19 個 *RsRGs* 基因 (*R. solanacearum*-responsive genes) (Kiba *et al.*, 2007)。其中，*RsRGA6* 基因經序列比對發現與 *Ntshsp17* (*tobacco small heat shock protein 17*, *Ntshsp17*) 熱休克蛋白有極高相似度；而當透過 VIGS 技術於菸草靜默該基因時，則是降低了菸草對抗青枯病的能力，顯示熱休克蛋白在抗病機制中亦有可能扮演著正調控角色 (Maimbo *et al.*, 2007)。此外，同一團隊作者於 2010 年研究報導亦指出，*RsRGA4* 編碼出 S-locus 醣蛋白 (S-locus glycoprotein, SGP)，且在菸草 VIGS 該基因後，造成對青枯病菌及其它病原菌之抗病性下降 (Maimbo *et al.*, 2010)。另外，在菸草中則是證實，一群 calmodulin isoforms 表現量下降時，菸草對抗青枯病菌的能力也跟著下降，顯示這些 calmodulin 參與抗病反應 (Takabatake *et al.*, 2007)。

5.4 植物與病原菌之識別作用對其抗青枯病之探討

由於寄主植物和病原菌交互作用後會產生兩種可能的結果：一為親合性反應 (compatible reaction)，亦即植物無法辨識病原菌而造成感病之現象；另一為不親合性反應 (incompatible reaction)，係指植物 *R* 基因可成功辨認病原菌之 *Avr* 基因進而啟動防禦機制 (Boller and He, 2009)。而關於植物 *R* 基因與病原菌 *Avr* 基因之研究，近年來亦有許多研究進展。Deslandes 等學者於 2003 年，已在阿拉伯芥上成功分離出一個具菌株專一性的抗病基因稱為 *RRS1*，其蛋白產物負責辨認經由第三型分泌系統所分泌之 *PopP2* (*Pseudomonas* outer protein P2, *PopP2*) 蛋白，藉以誘發後續抵抗青枯病菌 *GMI1000* 之防禦機制 (Deslandes *et al.*, 2002; Deslandes *et al.*, 2003; Lahaye, 2004)；而近期文獻更找到與 *PopP2* 有交互作用之蛋白 *RD19* (*RESPONSIVE TO DEHYDRATION19*)，其 *RD19* 可能是 *RRS1* 啟動的防禦機制中一個重要的調控蛋白 (Bernoux *et al.*, 2008)。

由上述文獻可知，不同物種間其對抗青枯病菌之機制是非常複雜的，且近期文獻亦報導，當過量表現 *Arabidopsis non-expressor of pathogenesis-related genes 1* (*AtNPR1*) 轉殖番茄能夠提高青枯病耐受性，顯示水楊酸防禦途徑可能有助於幫助番茄抵抗青枯病菌 (Lin *et al.*, 2004)，而這顯示出當茄科作物面對青枯病菌感染

時，其所產生之分子機制反應可能與阿拉伯芥並不完全相同 (Robatzek *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008)，因此，針對抗病品系番茄對抗青枯病菌其分子機制作深入探討是有其必要性的。

6. 植物非生物逆境之研究

缺水逆境形成的原因包括乾旱逆境、高鹽、高溫下水分快速散失及冷逆境下之脫水現象。一旦逆境形成，會導致植物細胞膜通透性增加而造成膨壓失衡、胞內電解質濃度升高、胞內酵素活性降低或者蛋白質變性等破壞細胞正常代謝之功能；氣孔關閉導致光合作用速率下降 (Mahajan and Tuteja, 2005)。目前許多研究皆已指出，當植物遭遇乾旱時，會誘發其體內離層酸 (Abscisic acid, ABA) 之含量上升，促使葉部之保衛細胞鉀離子流出，進而降低膨壓以關閉氣孔；然而關閉氣孔會連帶使植物 CO₂ 含量下降，促使過多光能累積，而導致活性氧族產生 (Reactive oxygen species, ROS)，造成蛋白質變性、脂肪過氧化及 DNA 突變等傷害。Ratnayaka 等學者於 2003 年則指出，植物為避免乾旱逆境產生的 ROS 傷害植物本身，會促使增加 glutathione reductase (GR) 及 ascorbate peroxidase (APX) 之合成幫助去除細胞中的 ROS。另外，有文獻卻也指出，H₂O₂ 亦可作為一種訊息傳遞分子，進而促使阿拉伯芥氣孔關閉 (Desikan *et al.*, 2004)。另一方面，ABA 之產生亦會誘導許多非生物逆境相關基因表現，如 *AREB1* (*ABA-responsive element binding protein 1*) 和 *ABF2* (*ABA-responsive element factor 2*)，其中，*RD29A* 是目前最被廣為研究的指標基因之一 (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。此外，ABA 之產生亦會活化 *MYB*、*MYC* 及 *bZIP* 等基因家族的表現，其中 *bZIP* 轉錄因子會結合至具有 *ABREs cis-element* (*ABA-responsive regulatory elements*) 之相關抗逆境基因，進而啟動抗旱之防禦反應 (Seki *et al.* 2007)。

另一方面，當植物遭受各式逆境時，植物細胞中的氧分子常會被局部還原而產生 ROS (Miller *et al.*, 2008)，適量濃度的 ROS 可將逆境訊息傳遞至各個細胞，進而啟動各種逆境防禦反應。Segond 等學者於 2009 年研究即指出，阿拉伯芥 *AtNRAMP3* (natural resistance associated macrophage 3) 與 *AtNRAMP4* 為鐵離子運輸蛋白質，位於液泡膜上。*AtNRAMP3* 會因病原菌感染而增加表現量，*AtNRAMP4* 則否，當利用 *nramp3* 與 *nramp4* 突變體及其雙重突變體 *nramp3*

nramp4 進行研究時，可發現 *nramp3 nramp4* 突變株會降低 ROS 的累積，並對病原菌之感染較為敏感；相反地，當大量表現 *AtNRAMP3* 與 *AtNRAMP4* 則可增加阿拉伯芥對軟腐病菌之抗性。

鹽害逆境亦是植物常見非物性逆境之一，係指土壤或所處環境中含有過量的離子，尤其是 Na^+ 離子和 Cl^- 離子，且當高濃度的鹽分進入植物體內時，過多的鈉離子即會破壞細胞膜和抑制酵素作用，導致代謝不正常等問題進而毒害植物；另一方面，一旦鹽害逆境形成，對植物會產生一種生理性的乾旱 (physiological drought)，導致獲得水分和養分上較為困難 (Mahajan and Tuteja, 2005)，此外亦會對植物會造成兩階段式傷害：初期係指短時間大量離子流入細胞內，導致破壞胞內代謝失衡；而植物若是無法及時排除過多之離子，則會造成植物胞內滲透壓失衡，即是所謂鹽害後期的滲透壓逆境 (Munns and Tester, 2008)。目前較為大家所熟知的抗鹽機制包括 Ca^{2+} 離子和 SOS 路徑。當植物細胞感受到高鹽後會自胞內 apoplast 釋出 Ca^{2+} 離子，以作為訊息傳導分子進而啟動抗鹽機制 (Knight *et al.*, 1997)，SOS 路徑則是在鹽害逆境下控制細胞膜上 Na^+/H^+ antiporter，進而將多餘的鈉離子移出細胞或運入液胞，以維持細胞滲透壓的衡定 (Zhu, *et al.*, 2002)。

7. 植物細胞骨架

細胞骨架 (cytoskeleton) 主要是由蛋白質構成的複雜且精細之網絡結構，相互交錯地分布在細胞質中，以維護細胞形狀及保護細胞。依據其蛋白質纖維的直徑大小、組成和結構等不同，可區分為微絲 (microfilament)、微管 (microtubule) 和中間絲 (intermediate filaments) 三者。在植物細胞中，細胞骨架主要參與在細胞壁的組成，但許多研究文獻發現，植物細胞骨架在抵抗生物逆境和非生物逆境中亦扮演重要角色，Kobayashi 等學者 (1994) 指出，病菌侵入細胞的位置，細胞骨架其微絲的數量多寡以及分佈位置均會影響植物的抗病性；另外，Waigmann 等學者的研究也指出病毒之移動蛋白 (movement protein, MP) 在植物體內會隨著細胞骨架移動，調控植物細胞與細胞間的 Plasmodesmata 孔道大小，改變此孔徑之間的大小，以利幫助病毒在植物細胞間之擴散感染 (Waigmann *et al.*, 1994)；當細胞骨架的微絲其聚合受到抑制時，植物的 HR 過敏性反應 (hypersensitive response) 呈現延遲的現象 (Takemoto *et al.*, 1999)；細菌性病原菌 *Xanthomonas campestris* 的

effector 蛋白 AvrBs3，進入到植物細胞內可能會破壞微管的聚集活動，使葉肉細胞膨脹變形 (Marois *et al.*, 2002)。另外，在非生物性逆境的研究上，發現植物細胞骨架參與在鹽害逆境的反應，其主要作用是藉由微管進一步去調控鈣離子通道，進而調節鈣離子的流通量，進而幫助植物對鹽害作出保護的作用機轉 (Thion *et al.*, 1998; Chinnusamy *et al.*, 2005)；植物誘導所產生的 ABA 同樣也會調控微管的分佈與組成 (Shibaoka and Nagai 1994)；磷脂酶 Phospholipase D (PLD) 會受 ABA 與 ROS 的調控並且參與植物非生物性逆境反應，研究指出 PLD 酵素活化時，會使細胞中微管的順序重新排列，對於逆境產生抗性的反應 (Dhonukshe *et al.*, 2003)。

8. 鋅指蛋白 (Zinc finger proteins, ZFP)

ZFP 是一群廣泛存在真核生物中的重要轉錄因子 (transcription factors)，藉由轉錄因子對特定基因之活化，進而調控完成許多複雜且多變之生理現象。ZFP 是以其胺基酸序列中 Cys 和 His 與鋅離子形成類似手指狀的結構故稱之，其中 RING (really interesting new gene) 蛋白被歸類為 ZFP 中的一類 (Freemont *et al.*, 1991)。在植物中已有許多 RING 蛋白質被證實參與在植物重要生理調控，如光形態發生抑制子 COP1 (constitutive photomorphogenic 1, COP1)，其蛋白質 N 端具有 RING domain，並具有 E3 ubiquitin-protein ligase 之功能進而將光形態發生促進之轉錄因子 HY5 進行蛋白質降解 (Osterlund *et al.*, 2000)。在非生物逆境中，Lee 等學者 (2001) 年於阿拉伯芥發現 AtHOS1 (high expression of osmotically responsive genes) 在低溫逆境下扮演負調控角色。而在生物性逆境中亦有許多 RING 蛋白被證實參與在植物抗病反應 (Devoto *et al.*, 2003; Goritsching *et al.*, 2007)：在阿拉伯芥中有一群 RING 蛋白稱作 ATL 家族，其中 ATL2 可快速被真菌幾丁質 (chitin) 所誘導表現，並證實 ATL2 所轉譯之 RING-H2 蛋白參與在植物早期抗病之防禦反應 (Salinas-Mondragón *et al.*, 1999)。另一自阿拉伯芥所鑑定之 AtBRH1，會受到 BR 植物激素負調控，但可快速被真菌幾丁質 (chitin) 所誘導；再者，Guo 等學者於 2003 年在馬鈴薯發現 HIP1 所轉譯之 RING 蛋白更可直接與病毒之 HCpro 蛋白可進行交互作用。另一方面，水稻中之 OsBIRF1 會受到 SA 及 JA 的誘導，且過量 OsBIRF1 之植物可增加對抗細菌性斑點病之抗性 (Liu *et al.*, 2008)。

近年來研究發現，RING 蛋白在 ubiquitination 過程中亦佔有重要調控功能，

一些 RING 蛋白可以連結到 E2 ubiquitin-conjugating enzymes 上；E3 ubiquitin-protein ligase 的活性亦與 RING domain 相關 (Joazeiro *et al.*, 1999; Freemont, 2000; Joazeiro and Weissman, 2000)。

9. 病毒誘導性基因靜默 (Virus-induced gene silencing, VIGS)

VIGS 係指利用植物為抵抗外來核酸片段（包括病毒及人工基因轉殖的核酸）之入侵所產生的防禦系統，而將目標片段進行 RNA 降解（RNA degradation），以達到短暫降低 (knock-down) 目標基因之方法，其優點包括：(1) 技術上操作簡單且可大量快速篩選之目標性狀，避免了植物基因轉殖期耗時及費力及後續篩選過程 (Liu *et al.*, 2002a; Constantin *et al.*, 2004; Valentine *et al.*, 2004)；(2) 可快速跨物種比較基因功能性上異同，如 *Tobacco rattle virus* (TRV)-based 載體是目前普遍使用的 VIGS 載體，可運用於多種不同植物的研究 (Ekengren *et al.* 2003; Liu *et al.* 2002a; Liu *et al.* 2002b)；(3) 針對尚未有轉殖系統之特定物種提供了基因缺失之研究平台；(4) 解決同一物種但在其不同遺傳背景下研究目標基因（如：模式植物阿拉伯芥其 SALK_lines 遺傳背景大都來自 Col-0) (Burch-Smith *et al.*, 2004)；(5) 可克服基因剔除後造成植物致死之特殊狀況。基於以上所述，VIGS 系統成為植物基因研究的有效工具。以阿拉伯芥而言，當靜默 *RARI*、*HSP90* 或 *NDR1* 等基因皆會造成對 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 的抗性能力降低 (Cai *et al.*, 2006)；此外，在菸草 (*N. benthamiana*) 將 *SGT1* 基因短暫靜默化後，發現植物對於抗病性的程度亦降低 (Liu *et al.*, 2002c)，顯示這些基因可能在植物抗病反應中扮演著正調控角色。反之；亦有文獻指出當靜默 *AtRIN4* 基因後，反而增加植物對病原菌之抗性能力，即顯示著 *RIN4* 可能於植物防禦反應中扮演著負調控角色 (Cai *et al.*, 2006)。此外，TRV-VIGS 系統亦被用來揭示番茄與維管束病害青枯病菌之間的複雜關係。在植物生長發育及代謝路徑調控機制，包括分生組織發育相關之 *NFL* 基因 (*Nicotiana FLO/LFY*) 和花器發育相關之 *DEFICIENS* 基因，皆是透過 VIGS 系統之研究而有所發現 (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004)。然而，VIGS 技術發展至今亦有其限制條件，包括 (1) 植物可能會因受到病毒感染而造成生長型態上的變化或病徵出現，但該現象可藉由選擇不同載體加以避免；(2) 殘留之 RNA 可能會產生有功能性的蛋白質；(3) 若病毒載體攜帶之目標片段不專一，可能會造成

非目標基因共同靜默化 (co-silencing) 現象。最後，由於 VIGS 是短暫性 (transient) 地降低目標基因的表現，其性狀之維持有一定的時間限制，所以這較轉殖株而言，較難有穩定且長時間的性狀觀察 (Burch-Smith *et al.*, 2004)。

10. 研究動機

本論文研究有二：一為由於實驗室先前研究成果指出，當番茄短暫靜默化 *SIZFP* 基因時，造成抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 抗病能力下降，導致植物體菌量上升 (附錄一)，推測該基因可能於番茄對抗青枯病中扮演著一定角色，因此，本論文將進一步探討該基因於植物遭受環境逆境時其可能扮演的功能。

二為由於過往文獻報導指出 5-Epi-aristolochene synthase (*EAS*) 基因為參與茄科作物抗菌蛋白 phytoalexin 合成的關鍵基因，實驗室過去發現短暫靜默番茄 *SIEAS* 造成抗病品系對抗青枯病菌能力下降 (附錄十二)，且不同煙草品種中之 *EAS* 基因表現受逆境調控之情況並不相同，其中以 *Nicotiana glutinosa* *EAS* 受青枯病菌及氧化逆境誘導的表現最為顯著 (附錄二)，然而進一步搜尋相關文獻後，關於 *EAS* 基因相關之研究並不多，故本研究將進一步深入研究茄科 *EAS* 基因及番茄 *SIEAS* 基因在植物遭遇逆境下可能所扮演的角色。

第二章 材料與方法

1. 植物材料簡介

1.1 番茄 (Tomato)

本研究所使用之番茄 (*Solanum lycopersicum*) 主要以抗青枯病品系 Hawaii 7996 (BW resistant H7996, BW^R) 與感病品系 L390 (BW susceptible, BW^S) 為主，該兩種品系種子主要由亞洲蔬菜研究發展中心 (Asian Vegetable Research and Development Center, AVRDC) 王肇芬老師所提供。將種子浸泡於乾淨水質中，以震盪 (shaking) 方式培養兩天進行種子萌發前處理，其目的為使其發芽均一化。接著將已發根之種子種植於 2.5 英吋花盆，含蛭石：珍珠石：泥炭土比例分別為 1：1：1 的培養土中，並放置於 12 小時光照 25°C，12 小時黑暗 25°C，75% 相對溼度 (humidity) 之人工照光氣候室。

1.2 菸草 (Tobacco)

基因轉殖植物所使用之材料為茄科植物菸草品系 *Nicotiana benthamiana* 及 *Nicotiana tabacum* W38，將種子灑播於無菌 Murashige and Skoog (MS) 培養基中，生長於 16 小時光照 25°C，8 小時黑暗 25°C 之組織培養室，或直接灑播於土盆種植於人工照光溫室。

1.3 阿拉伯芥 (Arabidopsis)

本研究所使用之阿拉伯芥為哥倫比亞品系野生型 (Col-0)，欲研究之目標基因突變體 (SALK_lines)，購自於 ABRC 機構 (Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC)。將種子無菌灑播於 MS 固體培養基，生長於 16 小時光照 25°C，8 小時黑暗 25°C 之組織培養室，或直接灑播於土盆種植於人工照光生長室。

2. 供試質體及菌體培養條件

本研究所使用之培養基及藥劑配方列於附錄二十。

細菌性青枯病菌 (*R. solanacearum*) 以 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride medium (TTC) 固體培養基或 523 液體培養基置於 28°C 培養；大腸桿菌 (*E. coli*) 以 Luria Bertani agar (LB) 固體或液體培養基置於 37°C 培養；農桿菌 (*A. tumefaciens*) 以 YEP 固體或液體培養基置於 28°C 培養；細菌性軟腐病菌 (*E. carotovora* pv.

carotovora) 以 LB 固體或液體培養基置於 28°C 培養；細菌性斑點病 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) 以 523 固體或液體培養基置於 28°C 培養；真菌性落葉葉斑病 (*A. alternata*) 以 potato-dextrose-agar (PDA) 固體培養基置於 28°C 培養。依所需添加抗生素：ampicillin (Amp, 50 µg/mL)；kanamycin (Kan, 50 µg/mL)；tetracyclin (Tet, 10 µg/mL)；gentamycin (Gm, 10 µg/mL)；rifampicin (25 µg/mL)。

3. 常用實驗方法

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

利用特定引子 (附錄十九) 以聚合酶連鎖反應增幅目標片段之全長，反應液中以 1 ng 染色體 DNA 或 100 ng cDNA 作為模板，並加入 2.5 mM dNTP mixture、10 µM forward 引子、10 µM reverse 引子、1× PCR buffer 及 1U DNA Taq polymerase。混合均勻後放入聚合酶連鎖反應器中進行反應。PCR 反應溫度與時間如下所示：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	94°C/5 分鐘		
30	94°C/30 秒	T°C/30 秒	72°C/t 分鐘
1			72°C/7-10 分鐘

T: 溫度依據引子 T_m 值，t: 時間依據增幅長度，1 kb/min。

經 PCR 擴增之產物，取 2 µL 進行 0.8-1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100 V/30 分鐘)，以確定基因之長度。

3.2 DNA 瓊脂糖凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis)

根據所增幅之目標片段大小決定瓊脂糖凝膠之濃度 (如下所示): 秤取適量克數之瓊脂糖凝膠，加入 0.5×TBE 緩衝液 (Tris-borate-EDTA buffer) 適量體積，以微波方式加熱溶解，待溫度稍冷卻後即可鑄模。如欲製作內染膠，則換算 EtBr (Ethidium bromide) 濃度為 0.5 mg/L 之比例，並待溫度稍冷卻後搖勻後即可鑄模。跑膠時依據 DNA 片段大小決定電流伏特數 (volts)，當樣品到達適當位置後，以 UV transillunator box 檢視分離條帶的位置與亮度。

Amount of agarose in gel (%[w/v])	Efficient range of separation of linear DNA molecules (Kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2	0.1-2

3.3 TOPO[®] cloning (Invitrogen)

根據 TA cloning 原理構築目標片段於 pCR8[®]/GW/TOPO[®] 及 pCR[®] II-TOPO[®] 載體上 (附錄二十一、二十二), 每次 TA cloning 反應的條件為: PCR 產物 0.5~4.5 μ L、1 μ L salt solution (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂)、0.5 μ L pCR8[®]/GW/TOPO[®] 或 pCR[®] II-TOPO[®] vector, 最後總體積補 ddH₂O 至 6 μ L, 於室溫中進行反應 30 分鐘至 1 小時, 結束後放置於冰上即可進行轉型作用。

3.4 LR recombination (Invitrogen)

本實驗使用 Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix kit (Invitrogen) 進行載體 LR recombination 之製備。將目標片段如上述 3.3 步驟構築於 pCR8[®]/GW/TOPO[®] 載體後, 再將與其所選之 Gateway 系統載體進行同源重組互換 (homo-recombination), 其反應條件為: entry vector 1-7 μ L、destination vector 1 μ L、0.5 μ L 5 \times LR Clonase[™] II enzyme mix, 並以 TE buffer (pH 8.0) 補至總體積 8 μ L。混勻後於室溫反應 1 小時後, 最後需要加入 1 μ L (2 μ g/ μ L) proteinase K 溶液並置於 37 $^{\circ}$ C 10 分鐘, 目的為停止 LR recombination 之反應。

3.5 微量製備質體 DNA (Miniprep of plasmid DNA)

本步驟試藥購於 PROTECH Gene-spin[™] miniprep purification kit-V² 進行微量質體之萃取。將單一菌落 (single colony) 挑入含有適當抗生素之培養液, 於 37 $^{\circ}$ C 震盪隔夜培養 16 個小時。取 1.5 mL 菌液至微量離心管以 13,000 rpm 短暫離心 1 分鐘, 去除上清液。加入 200 μ L solution I 重新震盪懸浮細胞, 再加入 200 μ L solution II, 輕柔上下反轉數次, 最後加入 300 μ L solution III 上下反轉數次後, 以 13,000 rpm 離心 15 分鐘。取其上清液至過濾管柱, 以 13,000 rpm 短暫離心 1 分鐘, 去除濾液並加入 700 μ L wash buffer 沖洗沉澱物。短暫離心後再次去除下層濾

液，再以 13,000 rpm 離心 3 分鐘，並置於室溫下使其揮發酒精，最後加入 50 μ L 無菌去離子水回溶質體 DNA，保存於 -20°C 備用。

3.6 限制酶剪切作用 (Digestion) 及膠體純化

將目標片段與載體利用限制酶進行剪切作用，其作法如下：取 5 μ L 的 DNA，加入 0.5 μ L (20U/ μ L) 之限制酵素、2 μ L 10X NEBuffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT pH7.9)、0.2 μ L BSA (10 mg/mL) 與去離子滅菌水，加至最後體積 20 μ L，混合均勻後加入微量離心管內，置於 37°C 反應 2-3 小時，進行消化水解之 DNA 後，再取 2 μ L 進行以 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100 V/30 分鐘)，以確定基因之長度。

利用 Micro-Elute DNA clean/Extraction Kit (GeneMark) 進行膠體純化，以 0.8% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100 V/30 分鐘) 而得 DNA 濃度或可取 1 μ L 經全光譜微量分光光度分析儀 (NanoDrop, ND-1000) 測量 A_{260}/A_{280} 之比值確定 DNA 濃度。

3.7 載體與目標片段接合 (Ligation)

將目標片段與載體利用接合酶 (T4 DNA ligase) (New England Biolabs, U.S.A.) 接合。載體與目標 DNA 片段比例調為 3:1，加入 2 μ L 的 10X T4 ligation buffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol) 及 0.5 μ L 的 T4 DNA ligase (400 U/ μ L) (New England Biolabs, U.S.A.)，最後以無菌去離子水補至最終體積 20 μ L，均勻混合後於 16°C 下進行接合反應 16 小時。

3.8 大腸桿菌勝任細胞轉型作用 (Transformation of *E. Coli* by heat-shock)

取目標質體 DNA 10 μ L 加入 100 μ L 之大腸桿菌 DH5 α strain 勝任細胞，置於冰上 30 分鐘，放置 42°C 水浴器熱刺激 45 秒 (heat shock)，增加細菌細胞膜之通透性，使細菌易攝入 DNA，將勝任細胞立刻置於冰上 3 分鐘使其細胞膜關閉。加入 1 mL SOC 培養液混合均勻，置於 37°C ，以 200 rpm 震盪培養 1 小時後，將菌液以 6,000 rpm 離心 2 分鐘沉澱大腸桿菌，留下約 100 μ L 培養液懸浮大腸桿菌，塗抹於含適當抗生素之 LB 固體培養基，於 37°C 下隔夜培養 16 小時，挑取單一菌落。

3.9 農桿菌勝任細胞製備

將農桿菌以 YEP 液體培養基於 28°C 隔夜震盪培養至 OD_{600} 為 0.3~0.5，於

4°C 下以 6000 rpm 離心 10 分鐘。去除上清液，以 10 mL 冰的無菌去離子水重新懸浮細菌，於 4°C 以 6000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，再重複以無菌水清洗及離心一次。去除上清液，加入 5 mL 冰的 10% 甘油重新懸浮細菌，4°C 下以 6000 rpm 離心 20 分鐘。去除上清液，加入 1.5 mL 冰的 10% 甘油重新懸浮細菌，取 100 μ L 懸浮液分裝至微量離心管，並以液態氮急速冷凍，保存於 -80°C 冰箱備用。

3.10 農桿菌電穿孔法 (Transformation of *A. tumefaciens* by electroporation)

自 -80°C 取出農桿菌勝任細胞放置冰上，待約 5 分鐘使其解凍，並加入 2 μ L 質體 DNA 混合後，放入事先預冷之 0.2 cm 電極距離之電穿孔小管 (cuvette)，以 2.5 kV 的電壓進行電穿孔作用 (MicroPulsar, BIO-RAD)，並立即加入 1 mL YEP 液體培養基，28°C 下震盪培養 2 小時，以低速 6,000 rpm 離心 1 分鐘，去除 900 μ L 之上清液，混合剩餘液體與細胞沉澱物後，塗抹在含有適當抗生素的 YEP 固體培養基，於 28°C 下黑暗培養 2~3 天，挑取單一菌落。

4. 植物 RNA 萃取及 cDNA 之製備

4.1 RNeasy Mini Kit (Invitrogen)

收取 0.1 克植物組織，放入研鉢並加入適量液態氮，以研杵研磨組織至粉末狀，將粉末移至已加好 445 μ L RLT buffer 及 5 μ L β -mercaptoethanol 之 1.5 mL 微量離心管並混合均勻，置於 56°C，3 分鐘。將細胞萃取液吸取至 QIAshredder 離心管柱 (Qiagen, Hilden, Germany)，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，吸取通過 QIAshredder 離心管柱之上層澄清液至新的 1.5 mL 微量離心管，並加入 1/2 V (約 250 μ L) 100% RNA 用酒精，混合均勻後吸取至 RNA 專用微量離心管 (Qiagen, Hilden, Germany- RNeasy spin column)，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄通過管柱之液體，加入 700 μ L RW1 buffer，以 13,000 rpm 離心 15 秒，去除通過管柱之 RW1 buffer，加入 500 μ L RPE buffer，以 13,000 rpm 離心 15 秒，去除通過管柱之 RPE buffer，再加入 500 μ L RPE buffer，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，去除通過管柱之 RPE buffer，最後以 13,000 rpm 空轉離心 2 分鐘，去除管柱中所殘留的酒精成分。將 QIAshredder 離心管柱放置新的 1.5 mL 微量離心管，加入 30~50 μ L DEPC-H₂O (Diethylpyrocarbonate water)，以 13,000 rpm 短暫離心 1 分

鐘，可得回溶之 RNA (保存於 -80°C)，可取 $1\ \mu\text{L}$ 以全光譜微量分光光度分析儀 (NanoDrop, ND-1000) 測量 A_{260}/A_{280} 之比值確定 RNA 濃度。

4.2 Trizol method

收取 1g 植物組織，放入研鉢並加入適量液態氮，以研杵研磨組織至粉末狀，將粉末放入新的 50 mL 離心管，加入 15 mL TRIZOL 試劑，混合均勻置於室溫 30 分鐘。其後加入 3 mL chloroform，上下反轉離心管數次均勻混合後，以 4°C 10000 rpm 離心 20 分鐘，取上層上清液至新的 50 mL 離心管，加入 12 mL 異丙醇，置於 -80°C 。隔夜後室溫 $10,000\text{ rpm}$ 離心 20 分鐘，去除上清液，將離心管放入抽風櫥自然烘乾沉澱物，加入 $400\ \mu\text{L}$ DEPC- H_2O ，回溶 RNA 後並吸取至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 $800\ \mu\text{L}$ phenol: chloroform(1:1)，上下反轉數次混合均勻後，以 4°C $13,000\text{ rpm}$ 離心 15 分鐘，吸取上層上清液 (約 $200\ \mu\text{L}$)，分裝至兩管新的 1.5 mL 微量離心管，加入 $30\ \mu\text{L}$ 3M 醋酸鈉及 1 mL 100% RNA 用酒精，置於 -80°C 。其中一管作長期保存備用；另一管隔夜沉澱過後，以 4°C 13000 rpm 離心 20 分鐘，去除上清液之 100% 酒精，加入 $500\ \mu\text{L}$ 75% RNA 用酒精，以 $13,000\text{ rpm}$ 離心 2 分鐘並去除酒精，再加入 $500\ \mu\text{L}$ 75% RNA 用酒精，以 $13,000\text{ rpm}$ 離心 2 分鐘，完全去除酒精後，以 $200\ \mu\text{L}$ DEPC- H_2O 回溶 RNA，取 $1\ \mu\text{L}$ 以全光譜微量分光光度分析儀 (NanoDrop, ND-1000) 測量 A_{260}/A_{280} 之比值確定 RNA 濃度。

4.3 DNA 消化水解作用 (DNase treatment)

本步驟所使用之試藥購於 Promega RNase-free DNase I kit，其做法如下：取 $5\ \mu\text{g}$ 的 RNA，加入 $5\ \mu\text{L}$ ($1\text{U}/\mu\text{L}$) 之 DNase 酵素、 $5\ \mu\text{L}$ RNase-free DNase 10X buffer (400 mM Tris-HCl, $\text{pH } 8.0$, 100 mM MgSO_4 , 10 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2)，以 DEPC- H_2O 補至最後體積 $50\ \mu\text{L}$ ，混合均勻後加入微量離心管內，置於 37°C 反應 $1-2$ 小時，進行 DNA 之消化水解。待作用完，加入 $150\ \mu\text{L}$ 之 DEPC- H_2O ，並再加入等體積之 $200\ \mu\text{L}$ RNA 用之 phenol:chloroform(1:1)，上下反轉均勻混合 5 分鐘，以 4°C $13,000\text{ rpm}$ 離心 20 分鐘，取其上層澄清液至新的 1.5 mL 微量離心管，並加入 $1/10\text{ V}$ 的 3 M 醋酸鈉 ($\text{pH } 5.3$) 及等體積的 100% RNA 用酒精，混合均勻後，置於 -80°C 隔夜靜置沉澱。待沉澱後，以 4°C $13,000\text{ rpm}$ 離心 30 分鐘，去除上清液之 100% 酒精，加入 $500\ \mu\text{L}$ 75% RNA 用酒精，以 $13,000\text{ rpm}$ 離心 1 分鐘並去除酒精，再加入 $500\ \mu\text{L}$ 75% RNA 用酒精，以 $13,000\text{ rpm}$

離心 1 分鐘，待酒精完全去除揮發後，以 20 μL DEPC- H_2O 回溶 RNA，取 1 μL 以全光譜微量分光光度分析儀 (NanoDrop, ND-1000) 測量 A_{260}/A_{280} 之比值確定 RNA 濃度。

5. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription PCR, RT-PCR)

本步驟試藥購於 Promega Reverse Transcription System kit (Cat.#3500) 進行反轉錄之聚合酶連鎖反應。其做法如下：取 1 μg 的 RNA，以 DEPC- H_2O 補至 10.2 μL ，以 70 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 10 分鐘後立即置於冰上 3 分鐘。接著加入 4 μL 25 mM MgCl_2 、2 μL 10x reverse transcription buffer、2 μL 10 mM dNTP mix、1 μL Oligo (dT)₁₅ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、0.4 μL recombinant RNasin ribonuclease inhibitor、0.4 μL Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (15U/1 μL)，混合均勻後放入聚合酶連鎖反應器中進行反應。PCR 反應溫度與時間如下所示：42 $^{\circ}\text{C}$ ，1.5 小時、95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘。合成之 cDNA 以無菌去離子水補至總體積 80 μL ，保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 備用。

6. 半定量 RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR, sqRT-PCR)

該實驗為利用特定引子 (附錄十九) 進行聚合酶連鎖反應，藉以收取不同增幅數，分析目標片段於各個增幅數之表現情形。反應中取 8 μL 內含 100~200 ng cDNA 作為模板，並加入 1 μL 10 μM forward 引子、1 μL 10 μM reverse 引子、4.9 μL reverse Transcription 10 \times buffer、25 mM 3.75 μL MgCl_2 、0.36 μL 25 mM dNTP mixture、0.15 μL Taq polymerase (2U/ μL)，並以無菌去離子水補至總體積 50 μL ，混合均勻後放入聚合酶連鎖反應器中進行反應。PCR 反應溫度與時間如下所示：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	94 $^{\circ}\text{C}$ /5 分鐘		
20	94 $^{\circ}\text{C}$ /30 秒	T $^{\circ}\text{C}$ /30 秒	72 $^{\circ}\text{C}$ /t 分鐘
N	94 $^{\circ}\text{C}$ /30 秒	T $^{\circ}\text{C}$ /30 秒	72 $^{\circ}\text{C}$ /t 分鐘
1			72 $^{\circ}\text{C}$ /7-10 分鐘

T：溫度依據引子 T_m 值，t：時間依據增幅長度，1 kb/min，N：不同增幅數。

取 5 μL 不同增幅數之 PCR 產物，以內含 1% (w/v) EtBr 之 0.8-1% 瓊脂糖

凝膠進行電泳分析 (100 V/30 分鐘)，以確定目標基因之表現情形。

7. 核酸即時定量 PCR (Real-time PCR)

該實驗為利用特定引子 (附錄十九) 進行核酸即時定量之聚合酶連鎖反應，儀器使用為 Bio-Rad-Real-Time PCR Detection Systems (BIO-RAD MyiQ™)，試劑使用為 KAPA SYBR® qPCR Kit (Universal, ABI Prism®, Bio-Rad iCycler™, or Roche LightCycler™ 480)。反應中取 8 μ L 內含 120 ng cDNA 作為模板，並加入 9 μ L 2x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix，0.5 μ L 10 μ M forward 引子、0.5 μ L 10 μ M reverse 引子，其反應總體積為 18 μ L，混合均勻後放入核酸即時定量偵測反應器中進行反應。Real-Time PCR 反應溫度與時間如下所示：

	Cycle 1	Cycle 2-40X		Cycle 3	Cycle 4	Cycle 5-81X
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 1	Step 1
Temperature	95°C	95°C	T°C	95°C	55°C	65°C
Time	3 分鐘	10 秒	30 秒	1 分鐘	1 分鐘	10 秒
Detection			*			*

*：Real-Time PCR Detection。

待程式執行完畢，即可利用 Bio-Ra-iQ™5 Optical system version 2.0 版軟體，進一步做資料分析。此外，該實驗所使用之引子，除了須具備目標片段之專一性外，同時須進行 NTC (No template control) 之前測，確認引子是否發生互黏情況 (primer dimmer) 之情況。

8. 番茄短暫性病毒誘導性基因靜默

利用特定引子 (附錄十九) 將欲靜默之目標基因以聚合酶連鎖反應擴增專一性片段，其所設計之靜默片段大小約為 300 bp 為佳。將該目標片段以 TA cloning 之方式構築於 pCR8®/GW/TOPO® 載體上，並利用 LR recombination 同源互換方式裝載於 TRV RNA2 (pTRV2) (附錄二十四) 之載體上，再以農桿菌電穿孔法進一步轉型至農桿菌 GV3101 菌系。將帶有目標基因片段的 pTRV2 和 TRV RNA1 (pTRV1) 之農桿菌培養在含有適當抗生素的 3 mL YEP 液體培養基 (50 μ g/mL kanamycin, 50 μ g/mL gentamycin, 25 μ g/mL rifampicin)，置於 28°C 隔夜培養 16 小時。隔天取小量菌液至 25-mL YEP 液體培養基 (50 μ g/mL kanamycin, 50 μ g/mL

gentamycin, 25 µg/mL rifampicin, 10 mM MES, 20 mM acetosyringone) 進行隔夜次培養。以 3,000 rpm 室溫離心，去除上清液收集細胞，利用培養液 (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 200 mM acetosyringone, pH 5.6) 懸浮農桿菌細胞調整至 OD₆₀₀ 為 1.5 後，依等比例體積均勻混合該兩種農桿菌，置於 28°C 培養 3 小時，即可進行感染動作。感染動作利用針頭於七天大之番茄子葉戳一小洞，以 1 mL 之注射針筒將農桿菌注入，感染後之番茄置於 16 小時光照 22°C，8 小時黑暗 22°C 之生長箱進行約達十天之 VIGS 效應。

9. 番茄澆灌青枯病菌

以生長三週大之抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 和感病品系 L390 番茄植株作為接種材料。青枯病菌菌系 Pss4 (phylo type I, biovar 3) 於 -80°C 取出劃於 TTC 固體培養基，28°C 培養兩天，再次培養於 3 mL 523 液體培養基。隔天將菌液塗於數個 523 固體培養基進行隔夜培養。利用無菌去離子水將青枯病菌自培養基洗下，調整懸浮菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.6 (2×10⁸ CFU/mL)，每一植株以刀片斷根後，直接澆灌 25 mL 之菌液，放置於 25°C 人工照光溫室，逐日觀察病徵發展程度及檢測植物體內其菌量濃度。每次實驗為 12 棵植物，並重複至少三次。

9.1 番茄青枯病萎凋級數 (wilting score) 分析

每棵植物依照下列規則逐日記錄萎凋指數 (Wilting score, ws): 0 為無病徵；1 為一片葉片萎凋；2 為二至三片葉片萎凋；3 為除了頂部二至三片葉片未萎凋，其餘皆萎凋；4 為全部葉片萎凋；5 為植株死亡。

9.2 番茄植株青枯病菌量濃度檢測

於番茄感染青枯病菌後第五天，收取離子葉以上 0.5 公分之 1 公分植株長度作為莖部 (mid-stem) 及離子葉以下 0.5 公分之 1 公分之植株長度處作為莖基部 (stem base)，以該兩植株部位，分別檢測菌量濃度，其做法如下：將所剪取之莖部及莖基部分別裝入夾鏈袋內，測量其重量並記錄之，接著加入 1 mL 無菌去離子水以研杵搗碎，取其 100 µL 組織液以無菌去離子水做連續十倍序列稀釋，並從各稀釋濃度取 10 µL 點盤至僅能青枯病菌生長之半篩選培養基 SM1 培養基 (Lin *et al.*, 2008)，28°C 培養兩天，並記錄青枯病菌之菌落數 (colony) 生長情況。

10. 番茄乾旱逆境測試

以生長三週大之抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 和感病品系 L390 番茄植株作為測試材料，予以斷水處理 (holding irrigation)，逐日觀察乾旱萎凋程度及測其各個植株之葉綠素含量。每次實驗為 15 棵植物，並重複至少三次。

10.1 番茄乾旱萎凋級數分析

每棵植物依照下列規則逐日記錄乾旱萎凋指數: 0 為無乾枯; 1 為一片葉片乾枯; 2 為二至三片葉片乾枯; 3 為除了頂部二至三片葉片未乾枯，其餘皆乾枯; 4 為全部葉片乾枯; 5 為植株乾枯致死。

10.2 番茄葉綠素含量測量

逢機收取葉部尖端組織並放於微量離心管內，以微量天平秤其重量並記錄之，接著倒入少許液態氮，以小型研磨棒研磨組織至粉末狀，加入 1 mL 80% 丙酮，混合均勻後於室溫下作用 10 分鐘，接著以 4°C 10,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液測量 OD₆₆₃ 及 OD₆₄₅。依照下列公式計算葉綠素含量 (Arnon *et al.*, 1949)。

$$\text{葉綠素總量 / 植物葉片 (mg/g)} = [20.2(\text{OD}_{645}) + 8.02(\text{OD}_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

V: 葉綠素萃取液 (80% 丙酮) 總體積 (mL)

W: 葉片重量 (g)

11. 番茄不同組織之 RNA 樣品製備

以抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 為材料，分別收取的部位為: 七天大之子葉; 三週大之根、莖、莖基部 (Stem-base) 及真葉; 六週大之尚未開花之花苞; 八週大之未成熟綠果和三個月之完全成熟果，以液態氮急速冷凍，保存於 -80°C 備用。

12. 番茄處理各式逆境及植物荷爾蒙 RNA 樣品製備

12.1 番茄真空吸引浸透法 (vacuum-infiltration) 接種青枯病菌菌系 Pss4

本實驗參考自 Gu *et al.* 2000 所發表之文獻。以生長三週大之抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 和感病品系 L390 番茄植株作為接種材料，調整青枯病菌菌

系 Pss4 菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.03 (1×10⁶ CFU/mL)，並懸浮於含有 0.005% 展著劑 (Silwet) 之無菌去離子水。處理方式如下：將番茄植株浸漬懸浮菌液 10 秒，接著將沾有菌液之植株放置於真空抽氣機內，以 500 毫米汞柱 (mmHg) 壓力進行 2 分鐘真空吸引浸透，待全株葉片皆浸透菌液，收取處理後的 0、1、2、4、8、12 及 24 小時之三、四、五片真葉組織，以液態氮急速冷凍，保存於 -80°C 備用。該實驗處理對照組為含有 0.005% 展著劑之無菌去離子水。

12.2 番茄針筒注射法 (syringe infiltration without a needle) 接種青枯病菌病原相關分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)

以生長三週大之抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 番茄植株為接種材料，調整青枯病菌菌系 Pss4 菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.03 (1×10⁶ CFU/mL)、第三型分泌系統特定基因缺失突變體 (*Rs-hrpG* defective) 之青枯病菌濃度 OD₆₀₀ 為 0.03、懸浮於含 10 mM MES 緩衝液之 3 ug/μL 青枯病菌煮沸後總菌物 (*Rs* lysate) 和 10 μM 之細菌鞭毛保守性 22 個氨基酸合成肽鏈 (Flg22)。處理方式如下：於番茄第三、四、五片真葉的五片小葉以針頭的戳一小洞，再利用 1 mL 針筒充分注入上述之各式病原菌，收取處理後第 0、0.5、1、2 和 4 小時之三、四、五片真葉組織，以液態氮急速冷凍，保存於 -80°C 備用。該實驗之處理對照組為含有 10 mM MES 之緩衝液。

12.3 番茄處理乾旱逆境

以生長三週大之抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 番茄植株為試驗材料，將植株在土壤水分飽和情況之下，停止給水灌溉便予以開始乾旱。乾旱後二天，混合收取兩棵植株之莖基部組織，作為第一個時間點的樣品；收取樣品後進行第一次回水，於回水後第 6、12 與 24 小時，分別收混合取兩棵植株之莖基部組織，最後，於第一次回水後 24 小時，進行第二次回水，並收取第二次回水 24 小時之莖基部組織，將其收取的 5 個時間點之樣品，以液態氮急速冷凍，保存於 -80 °C 備用。

12.4 番茄處理荷爾蒙: 乙烯、水楊酸、茉莉酸、離層酸

該實驗處理均以生長三週大之抗青枯病品系 Hawaii 7996 (H7996) 番茄植株為材料。首先，處理乙烯方式如下：將 2 棵植株放入 9.4 升的壓克力呼吸缸，接著灌入乙烯吸收劑之高壓空氣，進行呼吸缸換氣約 30 秒，之後使用膠帶密封呼

吸缸，並進一步以 50 mL 的塑膠針筒抽出缸內 100 mL 氣體，然後注入 100 mL 之 1000 ppm 的乙烯氣體，製造缸內最終處理乙烯濃度為 10 ppm 之環境。為確認缸內乙烯氣體濃度之一致，於反應進行約 30 分鐘後，再以注射針取樣 1 mL 氣體，注入氣相層析火焰離子偵測系統 (GC-FID) 以確認缸內之乙烯濃度。該處理以灌入乙烯吸收劑之高壓空氣為處理對照組。

處理水楊酸方法如下：以 100% 酒精配製 1 M 水楊酸，再以無菌去離子水稀釋為 2 mM 水楊酸，並將其均勻噴灑於番茄葉子。處理茉莉酸方法如下：以 100% 酒精配製 100 mM 茉莉酸，再以無菌去離子水稀釋為 0.1 mM 茉莉酸，並將其均勻噴灑於番茄葉子。處理離層酸方法如下：以 100% 酒精配製離層酸 100 mM 離層酸，再以無菌去離子水稀釋為 0.1 mM 離層酸，並將其均勻噴灑於番茄葉子。以上所述之實驗均收取處理後第 0、1、2、4、8 和 24 小時後第三、四、五片之真葉組織，每個時間點各收兩棵，並以液態氮急速冷凍，保存於 -80°C 備用。

13. 螢光重組蛋白質之定位分析 (sub-cellular localization)

利用特定引子 (附錄十九) 釣取 SIZFP-cDNA 之全長片段，以 TA cloning 之方式構築於 pCR8®/GW/TOPO® 載體上，並利用 LR recombination 同源互換方式裝載於 p2GWF7.0 (附錄二十三) 之載體，進一步藉由 PEG 轉型作用，送入阿拉伯芥之原生質體，始得執行綠色螢光重組蛋白質之短暫表現，並觀察該蛋白質於細胞中之坐落位置。其做法如下：

13.1 阿拉伯芥原生質體之分離

本實驗參考自 Yoo *et al.* 2007 所發表之文獻。取生長於短日照 3-4 周之阿拉伯芥葉片，在葉片上劃上數刀，置於培養皿中，加入 20 mL 之酵素溶液，室溫下以 50 rpm 震盪 1.5 個小時後，吸取含原生質體之酵素溶液以紗布過濾至新的圓底塑膠離心管，以 900 rpm 離心 2 分鐘，去除酵素溶液，加入 2-4 mL W5 緩衝液，以 900 rpm 離心 2 分鐘，該步驟重複三次。最後以 5 mL W5 緩衝液懸浮所有原生質體，並以血球計數器定量原生質體數目。接著將其原生質體放置冰上 30 分鐘，待其自然沉降後，去除 W5 緩衝液，並以 MMg 緩衝液懸浮原生質體定量濃度為 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。

13.2 PEG 轉型作用 (transfection)

利用 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) 抽取質體 DNA，取 20 uL 含有 20-40 ng 之質體 DNA 加至新的圓底塑膠離心管，接著加入 200 uL MMg 懸浮之原生質體，最後加入 200 uL PEG，輕彈離心管使其混合均勻，室溫下作用 7 分鐘後加入 4 mL W5 緩衝液，以 900 rpm 離心 2 分鐘，去除 PEG，該步驟重複兩次。最後以 1 mL W5 緩衝液懸浮原生質體，並取出滴於事先以 1.5 mL 5% BSA 處理至少 30 分鐘的六孔盤中，以一般日光燈照射，室溫下放置 16-24 個小時後，使用高解析度活細胞影像系統 DeltaVision Core 觀察及拍攝。

14. 菸草基因轉殖 (農桿菌轉殖法)

基因轉殖植物所使用之材料為茄科植物菸草品系 *Nicotiana benthamiana*。種子以 75% 酒精進行表面消毒，接著以 10% 漂白水震盪消毒 15 分鐘，最後以無菌水稀釋清洗種子至少十次，以達完全去除漂白水之作用。將種子無菌播種至 Murashige and Skoog (MS) 固體培養基中 (1/2 MS salt, 1% sucrose, 0.2% gelrite media)，置於 16 小時光照 25°C，8 小時黑暗 25°C 之組織培養室。待第三對真葉展開後，即可進行農桿菌之感染。其感染方式如下：

挑取攜有目標基因構築之農桿菌單一菌落，培養於 5 mL 含適當抗生素之 YEP 液體培養基，28°C 隔夜培養。以 6,000 rpm 離心，去除上清液，並以 co-culture medium 重新懸浮細胞調菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.6-1，並倒置培養皿中。

選取第三對真葉展開之成熟葉片，避開中肋切成 0.5-1 cm 見方大小，並以鑷子輕戳製造傷口，浸於菌液中感染 3-5 分鐘，接著以無菌水清洗葉片 5-6 次，並用滅過菌之擦手紙吸乾水分，置於 TSM 固體培養基上。五天後，將葉片移至含適當抗生素之 TSM 固體培養基中，每週繼代一次 (繼代頻率為篩選之重要步驟，根據抗生素的有效期限調整其繼代頻率)。三至五週後，待葉緣長出 shoots，且長至 2-3 公分時，分離 shoots 並移至含有適當抗生素之 TRM 固體培養基，待發根後，即可移至土盆中培養。

15. 阿拉伯芥花序浸潤轉殖法

農桿菌 GV3101 以帶有適當抗生素的 3 mL YEP 培養液培養在 28°C 生長

箱，隔夜後以 200 mL YEP 培養液放大培養一天，再以 3000 rpm 25°C 離心 20 分鐘，去除上清液後用 inoculation medium 懸浮農桿菌使其濃度為 OD₆₀₀ 0.8。將剪去果莢的阿拉伯芥花序浸泡於農桿菌懸浮液中 30 秒，浸泡後的阿拉伯芥放置於黑暗中過夜，再放回植物培養室培養 (22°C, 16 小時光照/8 小時黑暗)。約一個半月果莢乾燥後即可收取種子 (Clough and Bent, 1998)。轉植株之篩選是將種子撥種於荷蘭土，一星期後噴灑 25 mg/L 殺草劑使子葉完全濕潤，轉植株之載體 (pEarleyGate 201) 帶有抗殺草劑基因可以正常生長，約四天後將不受殺草劑抑制之阿拉伯藉推測為轉植株，再以 genomic PCR 以及 RT-PCR 驗證。

16. 植物 DNA 萃取

16.1 快速萃取植物 DNA

本方法參照 Kasajima *et al.*, 2004，配製 DNA 萃取液如下：200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS。以 TE buffer 10 倍稀釋 DNA 萃取液，放入微量離心管並加入 3-5 mg 植物葉片組織，利用小型研磨棒磨碎組織後，即可取其 1 µL 萃取液進行 PCR 反應。

16.2 CTAB method

本實驗參照 Saghai-Marroof *et al.*, 1984，配製 2X CTAB 萃取液如下：100 mM 1M Tris-HCl (pH 7.5), 2% CTAB: mixed-alkyltrimethyl-ammonium bromide, 700 mM 5M NaCl, 20 mM 0.5M EDTA (pH 7.5), 1% β-mercaptoethanol, 1% sodium bisulfite。其萃取方法如下：

收取 1-2 g 植物組織，放入研鉢並加入適量液態氮，以研杵研磨組織至粉末狀，利用事先預冷之刮勺取至微量離心管，加入 1 mL 2X CTAB 萃取液，混合均勻，置於 60°C，30-35 分鐘，過程中上下反轉數次。待溫度冷卻，加入 1 mL chloroform:isoamylol (24:1)，上下反轉五分鐘使之均勻混合，以 5,000 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液至新的微量離心管，加入 1 µL RNase (10 mg/mL)，置於 37°C 反應 1 小時。待 RNA 消化水解後，加入 1 mL -20°C isopropanol，上下反轉數次。短暫離心後，去除上清液，加入 1 mL 76% EtOH/0.2 M Na Acetate，置於室溫下 20 分鐘，以 5,000 rpm 短暫離心，去除上清液，加入 1 mL 76% EtOH/10 mM NH₄ Acetate

，以 5,000 rpm 短暫離心，去除上清液，待酒精完全揮發，以 1X TE 緩衝液回溶 DNA，取 1 μ L 以全光譜微量分光光度分析儀 (NanoDrop, ND-1000) 測量 A_{260}/A_{280} 之比值確定 RNA 濃度。

17. 菸草轉殖株各式逆境測試

由於該試驗之材料為 R1 世代轉殖株，故須先以適當抗生素進行非轉殖株之篩選動作。其做法如下：將菸草以 75% 酒精進行表面消毒，接著以 10% 漂白水震盪消毒 15 分鐘，最後以無菌水稀釋清洗種子至少十次，並將種子無菌播種在含有 8 ppm Hygromycin 之 MS 固體培養基上，待兩週後，其存活之植株，方得進行下列之測試。

17.1 菸草幼苗對非生物逆境之根抑制測試

將篩選過後存活之植株，將幼苗分別移至含有 200 mM NaCl、3% PEG 和 10 μ M ABA 之 MS 固體培養基，藉以模擬各式非生物逆境之環境。該試驗以無添加任何逆境成分之 1/2 MS 固體培養基作為處理對照組，置於 16 小時光照 25°C，8 小時黑暗 25°C 組織培養室，連續觀察三週根抑制情況並記錄之。

17.2 菸草轉殖株澆灌青枯病菌菌系 Pss4 接種測試

將篩選過後存活之植株，移置土盆並置於 25°C 人工照光溫室，待生長至四週大即可作為接種材料。其接種方法如下：調整青枯病菌菌系 Pss4 菌液濃度 OD_{600} 為 0.3 (1×10^8 CFU/mL)，每一植株直接澆灌 25 mL 之菌液，放置於 25°C 人工照光溫室，逐日觀察病徵發展程度及檢測植物體內其菌量濃度。每次實驗為 12 棵植物，並重複三次。

17.2.1 菸草青枯病萎凋級數分析

每棵植物為一個體單位，針對每一個體每日記錄萎凋葉片數占所有葉片數之百分比，並依照下列規則給予萎凋級數之判定：0 為無病徵；1 為 1-25% 葉片萎凋；2 為 26-50% 葉片萎凋；3 為 51-75% 葉片萎凋；4 為 76-100% 葉片萎凋。

17.3 菸草植株青枯病菌量濃度檢測

將篩選過後存活之植株，移置土盆並置於 25°C 人工照光溫室，待生長至四週大即可作為接種材料。其接種方法如下：調整青枯病菌菌系 Pss4 菌液濃度 OD_{600}

為 $0.03 (1 \times 10^7 \text{ CFU/mL})$ ，每棵植株選取固定葉齡之葉片，以針筒注射菌液並打滿葉片，並於處理後 18 和 24 小時，回收接種葉片，分別檢測其菌量濃度。其做法如下：將回收之葉片放入夾鏈袋內，測量其重量並記錄之，接著加入 1 mL 無菌去離子水以研杵搗碎，取其 100 μL 組織液以無菌去離子水做連續十倍序列稀釋，並從各稀釋濃度取 10 μL 點盤至僅能青枯病菌生長之半篩選培養基 SM1 培養基， 28°C 培養兩天，並記錄青枯病菌之菌落數生長情況。該實驗每個時間點收取 12 棵植物葉片，並重複三次。

17.4 菸草乾旱逆境測試

將篩選過後存活之空載體轉植株及過量表現目標基因之轉植株，移置同一個三英吋土盆，並置於 25°C 人工照光溫室，待生長至四週大即可予以斷水處理，並逐日觀察乾旱萎凋程度及測其各個植株之水分喪失程度，每次實驗為 15 棵植物。

17.4.1 菸草乾旱萎凋級數分析

每棵植物為一個體單位，針對每一個體每日記錄萎凋葉片數占所有葉片數之百分比，並依照下列規則給予萎凋級數之判定：0 為無萎凋；1 為 1-25% 葉片萎凋；2 為 26-50% 葉片萎凋；3 為 51-75% 葉片萎凋；4 為 76-100% 葉片萎凋。

17.4.2 菸草水分喪失測試

收取乾旱逆境植株之地上部，測其鮮重並記錄之，接著置於 70°C 烘箱烘乾兩天，再次記錄其乾重重量，並依照下列公式計算水分喪失比例。

$$[1 - (\text{鮮重} - \text{乾重}) / \text{鮮重}] \times 100\%$$

17.5 菸草葉片 (leaf-disc) 之鹽分逆境測試

每一植株選取固定葉齡之葉片，以打洞器鑽取直徑 1 公分之面積大小，浸泡於含有 400 mM NaCl 的培養皿，處理 48 小時後，拍照記錄型態並檢測葉綠素含量。此實驗以無菌去離子水作為處理對照組，每個處理每個 lines 共計五片葉片，並重複兩次。

17.6 菸草葉片 (leaf-disc) 之氧化逆境測試

每一植株選取固定葉齡之葉片，以打洞器鑽取直徑 1 公分之面積大小，浸泡於含有 10 μM MV (paraquat) 的培養皿，處理 48 小時後，拍照記錄型態並檢測葉綠素含量。此實驗以無菌去離子水作為處理對照組，每個處理每個 lines 共計五片

葉片，並重複兩次。

18. 阿拉伯芥各式逆境測試

該試驗所使用之材料為購自 ABRC 之種子，是以哥倫比亞品系為遺傳背景，藉由 T-DNA 插入基因體，而獲得之目標基因功能完全缺失突變體。下述試驗皆以 T7 世代之突變體為材料，依據實驗所需不同，可分為無菌播種或直接灑播土盆兩種方式栽培植株。無菌播種方式如下：將種子以 75% 酒精進行表面消毒，接著以 10% 漂白水震盪消毒 15 分鐘，最後以無菌水稀釋清洗種子至少十次後，加水置於 4°C 低溫春化兩天後，即可將種子無菌灑播於 1/2 MS 固體培養基；若無需無菌栽培，只需於兩天前加水置於 4°C 進行春化，即可灑播於土盆。

18.1 阿拉伯芥種子萌芽率測試

以上述之無菌播種方式，將種子分別灑播於含有 75 mM NaCl、100 mM NaCl、7% PEG、0.2 M Mannitol、2% glucose、4% glucose、0.1 μ M ABA 和 0.3 μ M ABA 之 1/2 MS 固體培養基，藉以模擬各式非生物逆境之環境。該試驗以無添加任何逆境成分之 1/2 MS 固體培養基作為處理對照組，置於 16 小時光照 25°C，8 小時黑暗 25°C 組織培養室，並連續觀察七天。

18.2 阿拉伯芥幼苗對非生物逆境之根長抑制測試

以上述之無菌播種方式，待生長四天後，將幼苗分別移至含有 200 mM NaCl、3% PEG 和 10 μ M ABA 之 1/2 MS 固體培養基，藉以模擬各式非生物逆境之環境。該試驗以無添加任何逆境成分之 1/2 MS 固體培養基作為處理對照組，置於 16 小時光照 25°C，8 小時黑暗 25°C 組織培養室，逐日觀察根長抑制情況並記錄之。

18.3 阿拉伯芥澆灌青枯病菌菌系 Rd15 測試

調整青枯病菌菌系 Rd15 菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.3 (1×10^8 CFU/mL)，並以 140 mL 菌液均勻和於 700g 之栽培土內，作為移盆用之菌土；接著將三周大之阿拉伯芥野生型和突變體作斷根處理，重新移植上述之菌土，進行青枯病菌之感染。接種後之植物於一周後開始紀錄植物萎凋狀況，並依照下列之規則，給予萎凋級數之判定：0 為無病徵；1 為 1-25% 的葉片萎凋；2 為 26-50% 的葉片萎凋；3 為 51-75% 的葉片萎凋；4 為 76-100% 的葉片萎凋。

18.4 阿拉伯芥接種細菌性軟腐病菌測試

以四周大之阿拉伯芥為接種材料，以 0.9% NaCl 之等張溶液調整軟腐病菌 *Pch* 菌液濃度 OD₆₀₀ 至 0.001，取 10 μL 之菌液滴於葉片上，觀察感後第 24、48 和 72 小時之病徵程度記錄之，並參照 Higashi *et al.* 2008，給予病徵級數之判定：Level 0：無明顯病徵；Level 1：接種部位出現輕微；Level 2：葉部出現嚴重水浸狀病徵。

18.5 阿拉伯芥乾旱逆境測試

將阿拉伯芥之野生型與突變株種子灑播於同一個三英吋土盆，待植株生長四週大，即予以斷水處理二至三週，再重新給水，觀察植株是否恢復其生長。

19. 菸草轉殖株 *Nicotiana tabacum* W38 接種茄科病害後 *NgEAS* 啟動子之活性分析

由於該試驗之材料為 R1 世代轉殖株，故須先以適當抗生素進行非轉殖株之篩選動作。其做法如下：將菸草以 75% 酒精進行表面消毒，接著以 10% 漂白水震盪消毒 15 分鐘，最後以無菌水稀釋清洗種子至少十次，並將種子無菌播種在含有 4 ppm hygromycin 之 MS 固體培養基上，待兩週後，其存活之植株，方得進行下列之測試。

19.1 各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子受細菌性病害誘導活性測試

將經篩選過後存活之植株，移置土盆並置於 25°C 人工照光溫室，待生長至六週大即可作為接種材料。其接種方法如下：調整青枯病菌 *Rs* 菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.3 (1×10⁸ CFU/mL)、軟腐病菌菌系 *Pch* OD₆₀₀ 為 0.3 和細菌斑點病菌 *Xcv* OD₆₀₀ 為 0.3，每一植株選取固定葉齡之葉片，分別以針筒注射菌液且打滿直徑 1 公分之面積，於處理後 24 小時，以打洞器回收接種區域，分別檢測其 GUS 活性。每次處理每個 lines 為 3 棵植物，共六片接種葉片，並重複三次。

19.2 各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子受真菌病害誘導活性測試

將經篩選過後存活之植株，移置土盆並置於 25°C 人工照光溫室，待生長至六週大即可作為接種材料。其接種方法如下：首先，配置 water agar 倒於 15-cm 培養皿，並於 water agar 舖上一層 filter paper；接著剪取固定葉齡之葉片置於 filter paper 上，挖取 *Alternaria alternata* 直徑 1 cm 菌絲塊大小之面積放於葉片中央

後，加入些許無菌水，密封培養皿後進行感染動作。觀察植物 4-5 天，待出現病癥後，即可以打洞器挖取直徑 1 公分之感染面積，檢測其 GUS 活性。每次處理每個 lines 共六片接種葉片，並重複兩次。

19.3 各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子接種青枯病菌病原相關分子 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 活性測試

將經篩選過後存活之植株，移置土盆並置於 25°C 人工照光溫室，待生長至六週大即可作為接種材料。其接種方法如下：調整青枯病菌菌系 Pss4 菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.3 (1×10^8 CFU/mL)、第三型分泌系統特定基因缺失突變體 (*Rs-hrpG* defective) 之青枯病菌濃度 OD₆₀₀ 為 0.3、懸浮於含 10 mM MES 緩衝液之 3 ug/ μ L 青枯病菌煮沸後總菌物 (*Rs* lysate)，每一植株選取固定葉齡之葉片，分別以針筒注射菌液且打滿直徑 1 公分之面積，於處理後 24 小時，以打洞器回收接種區域，分別檢測其 GUS 活性。該實驗之處理對照組為含有 10 mM MES 之緩衝液，每次處理每個 lines 為 3 棵植物，共六片接種葉片，並重複三次。

19.4 各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子不同組織及不同時間點活性分析

將經篩選過後存活之植株，移置土盆並置於 25°C 人工照光溫室，待生長至六週大即可作為接種材料。其接種方法如下：調整青枯病菌菌系 Pss4 菌液濃度 OD₆₀₀ 為 0.3 (1×10^8 CFU/mL) 及懸浮於含 10 mM MES 緩衝液之 3 ug/ μ L 青枯病菌煮沸後總菌物 (*Rs* lysate)，每一植株選取固定葉齡之葉片，分別以針筒注射菌液且打滿直徑 1 公分之面積，於處理後 24 小時，以打洞器回收接種區域；於處理後 48 小時後，回收接種區域其上位葉及下位葉，分別檢測其 GUS 活性。該實驗以無菌去離子水作為處理對照組，每次處理每個 lines 為 3 棵植物，共六片接種葉片，並重複兩次。

19.5 GUS 組織染色

將植物之葉片以 leaf discs 方式切取下來，並加入 staining solution (1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronide, 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, 5 mM K₃ [Fe(CN)₆], 5 mM K₄ [Fe(CN)₆], and 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) 至可淹沒 sample 為止，放於 37°C 下作用 18-24 小時，再以 70% EtOH 洗掉葉綠素。

19.6 MUG 定量分析 (GUS 活性測定)

將植物之葉片以 leaf discs 方式切取下來，加入 GUS extraction buffer (50 mM Na_2HPO_4 ，50 mM KH_2PO_4 ，10 mM EDTA，0.1% Triton X-100 and 10 mM β -mercaptoethanol) 將 sample 以研杵磨碎，於 4°C ，10000 rpm，離心 15 分鐘。取其上清液加入 MUG solution (50 mM Na_2HPO_4 ，50 mM KH_2PO_4 ，10 mM 4-methylumbelliferyl- β -glucuronide)，於 37°C 下反應 20 分鐘，再加入 stop solution (0.2 M Na_2CO_3 ，pH 11.2) 終止反應，並對照以 MU 不同濃度測試而得之標準曲線換算出 MU 濃度。

19.7 蛋白質濃度測定

將植物之葉片以 leaf discs 方式切取下來，加入上述 GUS extraction buffer，於 4°C ，10,000 rpm，離心 15 分鐘。取其上清液加入 dye reagent (Bradford solution) 置於 96 孔盤洞中混合均勻，室溫下作用 10 分鐘。以免疫酵素分析儀偵測 OD_{570} nm 吸光值，並對照以 BSA 不同濃度測試而得之標準曲線換算出蛋白質濃度。



第三章 結果

I. *SIZFP* 基因之功能性分析

1. 番茄 *SIZFP* 基因之全長選殖、結構組成及其序列比對及分析

利用 Tomato expression database 網站 (<http://ted.bti.cornell.edu/>) 鈎取番茄 *SIZFP* (基因序號: TC122455) 其序列全長, 所得到之全長為 2097 bp, 並利用 Vector NTI 分析 *SIZFP* 的轉譯區 (open reading frame, ORF) 為 1653 bp, 轉譯後為具有 551 個氨基酸序列的蛋白質約 60 kDa。經由 ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server 網站 (<http://www.expasy.ch/>) 進行保守序列 (conserved domain) 分析後, 證實 *SIZFP* 在轉譯區的 500-540 個胺基酸具有 zinc finger domain 中的 C3HC4 RING domain (圖一, A)。為進一步了解 *SIZFP* 在不同物種之同源基因可能扮演的角色或已知的功能, 因此, 藉以分析演化上之親緣關係。將 *SIZFP* 蛋白質序列做跨物種相似序列搜尋 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST), 並進行蛋白質比對 (MEGA 4.0 程式), 可發現不同物種間, 包括雙子葉 (如: 阿拉伯芥、葡萄、蓖麻和白楊樹, 以及單子葉的水稻都具有非常保守的 C3HC4 RING domain 結構 (圖一, B), 但在演化上與各物種間之相似程度並不高 (圖一, C)。

為了解 *SIZFP* 還可能參與哪些逆境之調控, 故分析 *SIZFP* 啟動子 (promoter) 區域所包含的可能 *cis*-elements。利用國際茄科基因組網站 SOL genomic network (<http://solgenomics.net/>) 選取 *SIZFP* 基因上游 3 Kb 之啟動子序列, 利用 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), 將該序列以每次 1,500 bp 進行目前已知的 *cis*-elements 的預測及分析, 共進行兩次。由分析結果發現 *SIZFP* 其啟動子區域包含各式可能的 *cis*-elements (表一)。在生物逆境相關分別包含了可被真菌激發因子 (fungal elicitor) 誘導之 BOX-W1 及其他病原菌激發子誘導之 EIRE *cis*-elements; 在非生物逆境, 則分別包含了與熱逆境及低氧環境相關之 HSE 和 ARE *cis*-elements; 生長調控方面則包含: 胚乳形成相關的 Skn-1 motif、分生組織形成相關的 CAT-box、細胞複製調控相關的 MSA-like 以及與光調控相關之 ATCT-motif 等; 在植物荷爾蒙則分別預測到與生長素及離層酸相關之 CARE-motif 和 ABRE *cis*-elements。由該網站之預測結果初步推測 *SIZFP*

與植物生長發育和各式逆境反應可能有所關聯。

2. *SIZFP* 蛋白質在細胞之表現位置

由於蛋白質在細胞中之坐落位置往往與其所扮演的功能有著相關性，因此需進一步了解 *SIZFP* 在植物細胞中可能表現的位置。首先利用不同軟體進行預測，發現 *SIZFP* 在細胞中坐落位置並不一致，其中，利用 Eukaryotic Linear Motif (ELM, <http://elm.eu.org/browse.html>) 軟體可預測出蛋白質序列中有一非典型 Mono NLS (nuclear localization signal) motif (附錄四)。為驗證 *SIZFP* 蛋白質是否表現在細胞核，因此構築 GFP-*SIZFP* (green fluorescent protein-*SIZFP*) 載體於阿拉伯芥原生質體系統觀察蛋白質表現位置。

結果顯示，以 p2FGW7 空載體單獨表現 GFP 之原生質體之對照組，綠色螢光均勻表現在整個細胞 (圖二，A、B)，GFP-*SIZFP* 則在細胞中呈現絲狀分佈 (圖二，C、D)，推測該表現位置可能位於細胞骨架。進一步利用微管標示蛋白 (CFP-MAP4) 與微絲標示蛋白 (talin-YFP) 與 GFP-*SIZFP* 融合蛋白同時表現到阿拉伯芥原生質體，GFP-*SIZFP* 在細胞中表現位置與 CFP-MAP4 和 talin-YFP 其表現位置皆有重疊現象 (圖二，E-L)，故 *SIZFP* 蛋白質在阿拉伯芥原生質體中是坐落在細胞骨架。

3. *SIZFP* 基因在轉錄層次之調控

3.1 *SIZFP* 基因在番茄植株的內在分佈表現情形

一般而言，當基因於植物組織上有特定之表現位置時，即暗示該基因可能於該部位或階段有特定之功能。因此分別收取抗青枯病品系 H7996 之不同部位和時期檢測 *SIZFP* 之表現情形。結果顯示 *SIZFP* 於各個部位皆可偵測到表現量，但主要在花大量表現，其次為成熟果實，其它如子葉、根、莖基部、莖、葉和綠果等部位間則無太大差異 (圖三)。

3.2 *SIZFP* 基因於番茄接種青枯病菌後之調控情形

為了解 *SIZFP* 基因表現是否受到青枯病菌感染而被調控，故將番茄抗病品系與感病品系同步接種青枯病菌，並檢測 *SIZFP* 基因之表現情形。首先，檢測已知會受青枯病菌誘導表現的指標基因 (marker gene) *SIGluB* 基因表現情形，可知

SlGluB 基因不論於抗病品系或感病品系，在其接種青枯病菌 12 或 24 小時後皆被大量誘導表現 (圖四)；反觀 *SIZFP* 基因在抗病品系接種青枯病菌 1 小時後表現量明顯下降，相同地；在感病品系中於接種後各個時間點其表現量亦是明顯受到抑制 (圖四)，但值得注意的是，*SIZFP* 基因在抗病品系雖受到抑制，但其表現量隨著接菌後有逐漸增加趨勢，於接種後 8 小時有最高表現量；反之，在感病品系中，*SIZFP* 基因表現量受到抑制的情形更為明顯，在接菌後 4-8 小時表現量最低，並於接菌後 12-24 後其表現量才些微增加。該結果顯示在抗/感品系接種青枯菌後，*SIZFP* 基因表現量雖皆受到抑制，但其調控情形仍有不同。

3.3 *SIZFP* 基因於番茄接種各式 PAMPs 後之調控情形

為了解 *SIZFP* 基因表現是否會受其它 PAMPs 處理影響，因此利用針筒注射方式在抗青枯病品系分別接種青枯病菌 Pss4 菌系、青枯病菌煮沸總菌物 (*Rs* total lysate)、青枯病菌第三型分泌系統缺失 (*Rs*-hrpG-defective) 及鞭毛保守胜肽序列化合物 (Flg22) 等不同病原菌。已知會受 PAMPs 所誘導的指標基因 *SlPti5* 其基因的表現在上述四種處理後，確實皆被誘導 (圖五，A)；反觀 *SIZFP* 基因於處理後 1 至 4 小時，其表現量較對照組皆受到抑制 (圖五、B)；顯示當番茄處理青枯病菌與其相關 PAMPs 後，*SIZFP* 基因表現會受抑制。

3.4 *SIZFP* 基因於乾旱逆境下之調控情形

由於青枯病菌感染植物其病癥伴隨著缺水逆境之形成，故進一步了解 *SIZFP* 基因表現是否受到乾旱逆境影響。隨著乾旱環境形成，已知會受乾旱逆境誘導表現的指標基因 *SlDec17* 其表現量確實受到誘導表現；反之，當予以復水後，其表現量則逐漸下降 (圖六)；相同地，*SIZFP* 基因於乾旱後兩天 (0 小時時間點)，其表現量有些微增加之趨勢；伴隨第一次回水後，*SIZFP* 基因表現量有些許下降，該情況與 *SlDec17* 標誌基因有相似情形；而當回水後 24 小時，*SIZFP* 基因亦隨著乾旱因子之形成，其表現量有增加趨勢 (圖六)，但該實驗在不同次實驗其趨勢並不明顯 (附錄六)，因此，目前推測在乾旱逆境下，*SIZFP* 基因可能不在轉錄層受調控。

3.5 *SIZFP* 基因於番茄植株處理植物荷爾蒙後之調控情形

由於植物荷爾蒙參與在眾多逆境訊息的調控，故測試 *SIZFP* 基因表現是否受防禦荷爾蒙調控。首先，已知可被水楊酸和乙烯誘導之指標基因 *SlPti4* 其表現量

在處理 1 小時確實受到誘導表現 (圖七, A、C); *SIWIPI2* 基因於處理甲基茉莉酸 8 至 24 小時後明顯被大量誘導表現 (圖七, E); 在離層酸處理下, *TSRF* 基因則未受誘導表現 (圖七, G)。進一步分析 *SIZFP* 基因之調控情形, 可發現處理水楊酸 8 小時和甲基茉莉酸 24 小時後, *SIZFP* 基因表現量受到抑制 (圖七, B、F), 而在乙烯和離層酸的處理下, 則無明顯受到調控 (圖七, D、H)。

4. 短暫靜默番茄 *SIZFP* 基因進行乾旱耐受性測試

由於青枯病所造成的植物萎凋現象與水份運輸受阻有極大關連性, 故希望進一步了解 *SIZFP* 基因在乾旱逆境之可能功能, 故將 *SIZFP* 基因 VIGS 後進行乾旱測試。首先, 以 qRT-PCR 檢測 *SIZFP* 基因靜默化程度, 顯示 *SIZFP* 基因表現量較感染空載體之植株 (對照組) 確實降低許多, 僅為對照組約十分之一的表現量 (圖八, A), 證實基因靜默效率極佳。乾旱後第八天, *TRV::SIZFP* 植株與對照組植株, 均開始出現萎凋性狀, 但於乾旱逆境試驗期間, 靜默 *SIZFP* 之番茄植株其萎凋速度一直比對照組植株快 (圖八, B、C), 且萎凋性狀較為嚴重 (圖八, D)。檢測葉部葉綠素含量後結果也顯示 *TRV::SIZFP* 植株平均含量僅為對照組 50% (圖八, E)。綜合上述結果, 可知降低 *SIZFP* 基因表現量, 會使番茄在乾旱逆境下之耐受性下降。

5. 檢測番茄 *SIZFP* 基因靜默植株其防禦路徑相關基因表現情形

由於先前結果顯示, 短暫靜默番茄 *SIZFP* 基因會降低抗番茄抗病品系對青枯病菌之抗性能力 (附錄一), 為了解 *SIZFP* 基因如何參與調控植物重要防禦基因, 故在 *SIZFP* 基因靜默之番茄植株中檢測已知參與防禦路徑的關鍵基因表現情形。發現在靜默化 *SIZFP* 基因之番茄植株中, *GluB* 基因其表現量明顯比對照組植株低 (圖九), 初步推測可能參與在 SA/ET 訊息傳導。

6. 表現番茄 *SIZFP* 之轉殖 *N. benthamiana* 植物分子檢驗及逆境分析

6.1 過量表現番茄 *SIZFP* 之轉基因植物分析

為更進一步探討 *SIZFP* 基因在植物遭遇逆境下所扮演的角色, 故採用基因過

量表現之研究策略。經基因轉殖所得之 *N. benthamiana* R1 植株中，編號 P23-26 轉殖株 RNA 表現量為最高，其它轉殖株則分別有 1.6 至 5 倍不等的表現量，而 P27-8 植株則與空載體植株表現量並無差異（圖十）。因此後續之逆境測試選擇 P23-4、P23-26、P27-15、P27-18 和 P27-22 等五個轉殖系 (independent lines) 作為觀察的目標植株。

另外，亦在阿拉伯芥 Col-0 中過量表現 *SIZFP* 基因，目前則已收取 T1 植株，待以抗生素做進一步篩選。

6.2 青枯病菌抗性測試

由於先前結果顯示，短暫靜默番茄 *SIZFP* 基因會降低抗病品系對青枯病菌之抗性能力（附錄一），推測 *SIZFP* 基因在番茄抗青枯病菌防禦機制中可能扮演重要角色。轉基因菸草之青枯病抗性檢測實驗結果顯示，帶有空載體（對照組）及番茄 *SIZFP* 基因之轉殖植物於第八天皆開始出現萎凋病徵，但於觀察期間，35S::*SIZFP* 轉殖株其發病速度比空載體植物慢，且各獨立轉殖系間有一致趨勢（圖十一，A），經量化分析後，可知 35S::*SIZFP* 各獨立轉殖系與對照組間在接種後第十天及十一天達顯著差異（圖十一，B）。進一步以微觀角度觀察感染青枯病菌後植株產生的變化，觀察菌量於植物葉中之增生情形。結果發現表現番茄 *SIZFP* 基因之轉殖植物其菌量增生較空載體植株來的低（圖十一，C）。綜合上述結果顯示，表現番茄 *SIZFP* 基因之轉殖 *N. benthamiana* 植物對青枯病之抗性增加。

6.3 菸草幼苗於非生物逆境下之耐受性測試

為了解過量表現 *SIZFP* 基因於菸草時，是否能增加植株抵抗外在之逆境，首先選擇菸草幼苗作為材料，於含有各式非生物逆境之培養基觀察其生長情況。結果顯示，帶有 *SIZFP* 基因之轉殖植物在處理鹽害逆境 14 天後，較空載體植株有稍高之耐受性（圖十二，A）；另外，以 PEG4000 處理模擬乾旱逆境 7 天後，帶有 *SIZFP* 之轉基因植物其耐受性亦比空載體植株高（圖十二，B）；在處理 ABA 後，*SIZFP* 基因轉殖株反應情況不盡相同，編號 P23-26 和 P27-22 轉殖株對 ABA 較不敏感，其根延長率約可達到 20 % 至 30 %，P27-15 和 P27-18 轉殖株對 ABA 反應與空載體植株較為類似（圖十二，C）。綜合上述結果，顯示表現番茄 *SIZFP* 基因之菸草幼苗植株對其非生物逆境之耐受性並不明顯，且對於 ABA 之感受性相較對照組植株亦並無太大差異。

6.4 乾旱耐受性測試

先前實驗結果顯示，短暫靜默番茄 *SIZFP* 基因會降低抗番茄對乾旱之耐受性 (圖八)，故推測 *SIZFP* 基因可能在番茄抗旱防禦機制中扮演著重要角色。以四週大之菸草轉植株進行乾旱耐受性測試之。實驗結果顯示，帶有空載體 (對照組) 及番茄 *SIZFP* 基因之轉殖植物於缺水 12 天後開始出現萎凋，但在觀察期間，*35S::SIZFP* 轉植株其萎凋速度比空載體植物有明顯延遲，且各獨立轉殖系間有著雷同趨勢 (圖十三，A)，而經量化分析後可知於乾旱後 13 至 20 天，*35S::SIZFP* 各獨立品系與對照組間達顯著差異 (圖十三、B)。接著進一步檢測其植株體內水分喪失情況，結果顯示，空載體植株水分平均喪失比率為 60%，但 *35S::SIZFP* 各轉殖系植株僅約 40% 左右，故 *35S::SIZFP* 轉植株之水分明顯比空載體植株低 (圖十三，C)，上述結果顯示，表現番茄 *SIZFP* 基因之菸草轉植株可增加菸草於乾旱逆境下之耐受性。

6.5 氧化及鹽害逆境耐受性測試

由於先前生物資訊分析後顯示 *SIZFP* 基因其上游啟動子序列包含許多非生物逆境相關之 *cis-elements* (表一)，因此，為了解 *SIZFP* 基因是否還參與其它非生物逆境之調控，取轉殖菸草成株固定葉齡之圓盤葉片 (leaf-disc)，以 MV (paraquat) 及 NaCl 分別模擬植物常遭受之氧化逆境及鹽分逆境，觀察其逆境耐受性。實驗結果發現，不論於氧化或鹽害逆境下，表現 *SIZFP* 之菸草植株葉片皆比空載體植株耐此兩種逆境因子 (圖十四，A、B)，且進一步檢測葉綠素含量，可知過量表現 *SIZFP* 基因之葉片葉綠素含量的確明顯比對照組植株高許多 (圖十四，C、D)。上述結果顯示，表現番茄 *SIZFP* 基因確實可增加菸草對氧化逆境及鹽害逆境之耐受性。

7. 過量表現 *SIZFP* 之菸草中參與生物與非生物逆境反應之基因表現情形

為進一步釐清 *SIZFP* 基因參與植物抗逆境之可能機制，故檢測過量表現 *SIZFP* 基因之菸草植株其內生性相關生物與非生物逆境基因之表現情形。結果顯示，在正常生長條件下，在表現 *SIZFP* 之菸草植株中 *PR1*、*PR2* 及 *SAR8.2* 等 SA 調控路徑之下游基因的表現量明顯增加，然而受 ET 和 JA 調控之下游 *PR4* 基因表現則無明顯改變 (圖十五，A)。在非生物逆境之基因檢測方面，*NtEDR10A*

(early responsive to dehydration 10A) 及 *NtEDR10C* (early responsive to dehydration 10C) 等基因在表現 *SIZFP* 之菸草各轉殖系中之表現不盡相同；其中只有編號 P23-4、P27-15 和 P27-18 之轉植株中 *NtEDR10A* 和 *NtEDR10C* 之表現較明顯增加 (圖十五, B)。由上述結果可知 *SIZFP* 基因可能參與調控植物防禦路徑之相關基因，進而達到提高植物對逆境之耐受性。

8. 阿拉伯芥同源基因之功能分析

8.1 同源基因之尋找與表現預測

由於許多文獻報導已指出，同源基因在不同物種之功能可能不盡相同，因此，進一步研究 *SIZFP* 之阿拉伯芥同源基因的功能。

序列比對可知 *SIZFP* 在阿拉伯芥有三個同源基因，分別為 *At5g24870*、*At5g10650* 及 *At4g31450* (表二)。整理阿拉伯芥微陣列資料庫 (microarray database) 後發現，此三個基因在花及種子部位皆有較高的表現量 (附錄九)，且此三個基因之表現在轉錄層次亦受許多環境逆境所調控，包含乾旱逆境、缺氧逆境、熱逆境及冷逆境等環境因子 (表三)。另一方面，在植物 MAPK 路徑基因有所缺失時 (如: *MPK4*、*MKK2* 及 *MKK4* 等)，此三個基因其表現量會下降。因此，初步推測此三個基因可能參與非生物逆境反應。

8.2 同源基因突變體之分子檢驗

為進一步了解阿拉伯芥同源基因於逆境下所扮演的角色，故自 ABRC 機構購買 *At5g24870* 基因突變體，分別為 T-DNA 插於第一個 exon 的 SALK_020143 及插在第二個 exon 的 SALK_015310，所購自之種子皆為 T6 世代突變體 (圖十六, A)，以下分別簡稱為 *Atzfp-1* 及 *Atzfp-2*。首先，在 genomic DNA 層次的檢驗，以 T-DNA 和 *At5g24870* 基因上特有之序列作為引子，可增幅出目標預期片段大小約 850 bp (附錄十)；在 RNA 層次的檢驗上，則以 *At5g24870* 基因 5' 端和 3' 端兩端序列作為引子，發現 *Atzfp-1* 及 *Atzfp-2* 突變體皆無法增幅出預期全長片段 1563 bp (圖十六, B)，因此 *Atzfp-1* 及 *Atzfp-2* 皆為完全基因功能喪失之 null mutants。

8.3 各式非生物逆境下之萌芽率測試

為探討 *At5g24870* 基因在非生物逆境可能參與的調控角色，故檢測 *Atzfp-1*

及 *Atzfp-2* 基因突變株在各式非生物逆境下其種子萌芽狀況。實驗結果顯示，在 1/2 MS 培養基的生長情況下，*at5g24870* 基因突變株與野生型植株 (Col-0) 其萌芽率皆正常，但於鹽害 (NaCl)、模擬乾旱 (PEG)、糖分 (glucose)、滲透壓 (mannitol) 及 ABA 等逆境下，*Atzfp-1* 及 *Atzfp-2* 基因突變株其萌芽率皆較野生型植株來的差 (圖十七)，因此，當 *At5g24870* 基因缺失時，對其這些非生物逆境皆較敏感。

8.4 接種青枯病菌及軟腐病菌抗病性測試

為了解 *At5g24870* 基因是否亦參與病害防禦機制，經斷根處理後，以根部接種方式澆灌青枯病菌 Rd15 測試對青枯菌之反應。實驗結果顯示，於接種後六天，*at5g24870* 突變株與野生型植株皆開始出現黃化病徵，但於觀察期間，*Atzfp-1* 及 *Atzfp-2* 突變株與野生型植株之病程發展並無顯著差異 (圖十八，A)。此外，以葉部滴菌方式接種軟腐病菌，實驗結果顯示，*at5g24870* 突變株之發病情形與野生型植株亦無顯著性差異 (圖十八，B)。因此初步推論 *At5g24870* 並不影響阿拉伯芥對青枯病菌及軟腐病菌這兩種 necrotrophic 病菌之反應。

II. 茄科作物抗菌蛋白合成酵素 (5-Epi-aristolochene synthase, EAS)

之功能性分析

1. 表現菸草 *NtEAS* 之轉殖 *N. benthamiana* 植物分子檢驗及逆境分析

1.1 過量表現番茄 *NtEAS* 之轉基因植物分析

實驗室先前已發現短暫靜默番茄 *SlEAS* 基因會降低抗番茄抗病品系對青枯病菌之抗性能力 (附錄十二)，顯示茄科 *EAS* 在抗青枯病菌防禦上可能扮演重要角色。因此，本研究進一步以基因過量表現研究策略，探討 *NtEAS* 基因在植物遭遇逆境下之功能。經基因轉殖所得之 *N. benthamiana* R1 植株中，編號 E2-8、E2-1 和 E1-5 轉殖株有較高轉基因之表現，為空載體植株 4 至 5 倍不等；其次為 E1-2 和 E2-5，較空載體約為 3 至 4 倍，E1-3 植株則僅約為 1.8 倍 (圖十九)，因此後續之逆境測試將以上述之六個轉殖系作為觀察的目標植株。

另外，亦在阿拉伯芥 Col-0 中過量表現 *NtEAS* 基因，目前則已收取 T1 植株，待以抗生素做進一步篩選。

1.2 青枯病菌抗性測試

首先，先分析過量表現菸草 *NtEAS* 基因之菸草植株，是否能增加對青枯病菌之抗性能力。實驗結果顯示，帶有空載體（對照組）及菸草 *NtEAS* 基因之轉殖植物於第八天皆開始出現萎凋病徵，但於觀察期間，*35S::NtEAS* 轉殖株其發病速度比空載體植物慢，且各獨立轉殖系間有一致趨勢（圖二十，A），經量化分析後，可知 *35S::NtEAS* 各獨立轉殖系與對照組間在接種九天後皆達顯著差異（圖二十，B）。進一步以微觀角度觀察感染青枯病菌後植株產生的變化，觀察菌量於植物葉中之增生情形。結果發現表現菸草 *NtEAS* 基因之轉殖植物其菌量增生較空載體植株來的低（圖二十，C）。綜合上述結果顯示，表現菸草 *NtEAS* 基因之轉殖 *N. benthamiana* 植物對青枯病之抗性增加。

1.3 氧化及鹽害逆境耐受性測試

為了解 *NtEAS* 基因是否還參與其它非生物逆境之調控，取轉殖菸草成株固定葉齡之圓盤葉片（leaf-disc），以 MV (paraquat) 及 NaCl 分別模擬植物常遭受之氧化逆境及鹽分逆境，觀察其逆境耐受性。實驗結果發現，不論於氧化或鹽害逆境下，表現 *NtEAS* 之菸草植株葉片皆比空載體植株耐此兩種逆境因子（圖二十一，A、B），且進一步檢測葉綠素含量，可知過量表現 *NtEAS* 基因之葉片葉綠素含量的確明顯比對照組植株高許多（圖二十一，C、D）。上述結果顯示，表現菸草 *NtEAS* 基因確實可增加菸草對氧化逆境及鹽害逆境之耐受性。

2. 過量表現 *NtEAS* 之菸草中病害防禦相關基因表現情形

進一步檢測過量表現 *NtEAS* 基因菸草植株其相關生物與非生物逆境基因表現以釐清 *NtEAS* 基因是否間接調控植物重要防禦基因。結果顯示，在無逆境環境下，過量表現 *NtEAS* 基因菸草植株之 *PR1*、*PR2* 及 *SAR8.2* 等 SA 調控路徑之下游基因其表現量已有明顯增加的現象；然而受 ET 和 JA 調控之下游 *PR4* 基因則無明顯受到調控（圖二十二）。因此推測 *NtEAS* 基因係參與 SA 相關防禦路徑，進而達到提高植物對逆境之耐受性。

3. 分離及分析新的逆境誘導性茄科基因啟動子

由於 *NgEAS* 基因受青枯病菌及氧化逆境誘導的表現最為顯著，有別於其它菸草品系（附錄二），因此，將此基因啟動子利用 genomic walking 之方法選殖鈎取約 1Kb 長度，並於 PLACE (Plant *cis*-acting regulatory DNA elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 網站分析序列預測其具有的可能 *cis*-element。分析結果顯示 *NgEAS* 啟動子有幾個已知的 *cis*-elements，包括與病原菌及鹽分逆境有關的 GT-1 及可被病菌誘發之 W box（附錄十三）。為分析啟動子各片段之活性，因此利用 PCR 增幅反應，構築結合了 GUS (β -glucuronidase) 報導基因 (report gene) 之不同片段長度的 P_{EAS} 啟動子載體 (圖二十三，A)，以作後續進一步研究及分析。

3.1 各啟動子片段受青枯病菌之誘發活性測試

為了解 *NgEAS* 受青枯病菌之誘發表現是否為特定 *cis*-elements 有關，因此，以農桿菌感染之短暫表現方式 (transient expression assays) 分析各啟動子片段之活性表現。研究結果顯示，在沒有逆境處理時，各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子在煙草葉片中並無活性，但經青枯病菌處理後，發現除了 pNg200 構築植株無法誘導其表現外，其它各式不同長度的 *NgEAS* 啟動子皆可誘導其活性表現 (圖二十三，B、C)，進一步培育帶有不同長度 *NgEAS* 啟動子的 R1 世代轉殖植物後，結果亦顯示 pNg900、pN730 與 pNg600 轉殖株其活性可明顯受青枯病菌誘導 (附錄十四)，由上述結果亦可知 *NgEAS* 基因受青枯病菌之誘導表現可能與 GT-1 及 W box 的存在無關係，而是在 -280 bp ~ -200 bp 之序列另有未知且可被病菌誘導之 *cis*-elements。

3.2 真菌與細菌病原菌之誘發表現情形

為測試 *NgEAS* 啟動子是否可受不同病原菌誘導，首先，以真菌葉斑病 *Alternaria alternata* 處理 R1 轉殖植物進行測試。經由 GUS 定量分析可發現，各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子在無逆境之處理下，於轉殖煙草葉片中並無活性；而經葉斑真菌處理後，各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子其活性則皆可被明顯誘導 (圖二十四，A)。此外，亦以葉部針筒注射方式施以多種常見嚴重危害茄科作物之細菌病原菌處理，實驗結果顯示，處理青枯病菌、細菌斑點病菌及軟腐病菌後，各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子亦可受其誘導啟動 (圖二十四，B)。綜合上述結果證

實 *NgEAS* 啟動子可受多種重要植物病原細菌與真菌誘導表現。

3.3 不同病原型式之誘發表現

本研究進一步釐清該啟動子對各式 PAMPs 是否亦具有相同反應，包括青枯病菌、第三型分泌系統特定基因缺失突變體 (*Rs-hrpG* defective) 以及青枯病菌煮沸後總菌物 (*Rs* total lysate)。經由 GUS 定量分析顯示，各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子經上述各種不同型式之 PAMPs 處理後，皆可被強烈誘導啟動 (圖二十五)，但受 PAMPs 之誘導活性僅約活菌感染下的 50%。

3.4 在植物不同組織中之表現

為進一步探討 *NgEAS* 啟動子之誘導表現，是否可達成系統性防禦機制，因此施以不同病菌之處理，包括青枯病菌及青枯病菌煮沸後總菌物 (*Rs* total lysate)。經由 GUS 定量分析，可知接種葉區域之各式不同長度 *NgEAS* 啟動子的確可受誘導表現；進一步檢測上位葉及下位葉性活性分析，顯示除了 pNg600 構築植株無法誘導其表現外，其它各式不同長度的 *NgEAS* 啟動子皆可誘導其活性表現 (圖二十六)，該實驗顯示 *NgEAS* 啟動子具有系統性訊息傳導之誘導表現特性，而 GT-1 box 可能為訊號接收所必須之重要 *cis-elements*。此外，為了解 *NgEAS* 啟動子之表現是否具有組織專一性，因此，觀察 GFP 其螢光表現及 GUS 染色分佈情況。由實驗結果可發現，各式 *NgEAS* 啟動子於正常植物生長條件下幾乎不表現，而經青枯病菌處理後，其所誘導表現之部位主要是在維管束 (附錄十五)。

第四章 討論

I. *SIZFP* 基因之功能探討

1. *SIZFP* 主要表現於細胞骨架與植物的花與成熟果實

本研究實驗結果顯示，C3HC4-RING *SIZFP* 基因於花及成熟果實表現量較高(圖三)，該結果與番茄 EST 資料庫所預測之表現位置是一致的(附錄五)，且與同為茄科之 C3HC4-RING finger *CaRFPI* 基因有雷同趨勢(Hong *et al.*, 2007)。另一方面，阿拉伯芥同之源基因亦在開花時期與種子其表現量較高(附錄九)，亦有一致趨勢。一般而言，當基因於植物組織上有特定其分部位置或有較高表現量時，即暗示此基因可能在該組織部位或階段扮演著重要角色(Ma *et al.*, 2009)，因此推測番茄 *SIZFP* 與其阿拉伯芥同源基因可能皆參與在正常生長條件下植物開花時期或生殖時期之生理功能。針對 *SIZFP* 轉基因之 R1 菸草植株觀察開花時期及型態，目前則尚無發現與空載體植株有任何不同，因此，未來可藉由培育過量表現 *SIZFP* 之番茄/阿拉伯芥轉殖株或 RNAi *SIZFP* 之番茄植株及同源基因 *At5g24870* 突變株，觀察在開花時間或其型態上是否有所差異，且亦可進一步檢測開花相關基因等表現情形來加以驗證。另一值得注意的是，在轉錄層次之調控上，在水(對照組)的處理下，*SIZFP* 基因表現已有波動，而這樣的現象不管是在接菌亦或是荷爾蒙處理下皆存在，而由生物資訊分析發現，*SIZFP* 基因啟動子包含許多光調控之 *cis*-elements，因此，*SIZFP* 是否真因受光週期調控其表現量才有所波動，尚須進一步實驗驗證。

另一方面，利用阿拉伯芥原生質體系統短暫表現 *SIZFP* 蛋白可發現坐落在細胞骨架上，是截至目前在 ZFP 相關研究中從未被報導過的，十分特別，也許 *SIZFP* 有獨特功能，未來則可在茄科植物再做驗證，並採用微管及微絲抑制劑以釐清 *SIZFP* 蛋白之確切表現位置。此外，蛋白質之坐落位置會隨著遭遇逆境因子而有所改變(Bernoux *et al.*, 2008)，且由生物資訊可知 *SIZFP* 蛋白質具有一非典型 NLS (nuclear localization signal) 序列(附錄四)。因此，未來可利用菸草表皮細胞輔以青枯病菌或其它逆境處理，觀察 *SIZFP* 蛋白質之坐落位置是否改變。另一值得注意的是，*SIZFP* 與現有已知的細胞骨架蛋白無顯著序列相似性，且亦不具有已知的 microtubule binding domain，故推測其坐落於細胞骨架的原因可能有二：一

為 *SIZFP* 可能帶有新型的蛋白質區域使其與細胞骨架產生連結，未來可藉由逐步刪除蛋白質序列，來搜尋 *SIZFP* 坐落於細胞骨架上之關鍵胺基酸序列為何。另一可能原因則為 *SIZFP* 與其他蛋白質有交互作用，而該蛋白與微管或微絲亦有交互作用，因此導致 *SIZFP* 坐落在細胞骨架上。

2. 番茄 *SIZFP* 基因正調控青枯病防禦反應

統整過去研究過之基因可發現 RING finger 所扮演之生物功能非常多元 (Xu and Li, 2003; Sonoda *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008)，但目前茄科植物 RING finger 之研究極少。先前本研究已知短暫靜默 *SIZFP* 基因會導致抗青枯病能力降低 (附錄一)，而本研究亦進一步證明過量表現番茄 *SIZFP* 基因對青枯病菌感染有較高抗性 (圖十一)，因此，番茄 *SIZFP* 基因的確參與在抗青枯病菌之防禦機制中。然而，不論在抗病品系或感病品系處理青枯菌時，*SIZFP* 基因之表現量皆有被抑制趨勢 (圖四)，故初步推論 *SIZFP* 基因之表現可能不利於青枯病菌感染寄主，因此病菌在感染時會抑制該基因表現，以利其感染；而當以基轉技術過量表現 *SIZFP* 基因於菸草時，此時該基因表現是受 *CaMV 35S* 啟動子調控呈現經常性過量表現的狀態，病原菌並無法抑制其威脅性，因而呈現出植物對青枯病菌感染有較高抗性。另一方面，先前實驗室成果指出 *SIZFP* 基因會在阿拉伯芥 *NPR1* 過量表現的番茄轉植株中大量表現 (附錄十一)，暗示 *SIZFP* 基因表現量可能間接受到 *AtNPR1* 的調控，而本研究也發現過量表現 *SIZFP* 基因轉植株已明顯增加 SA 相關下游基因現象 (圖十五，A)，顯示 *SIZFP* 基因確實參與番茄 SA 路徑調控，進而在其過量表現之轉植株於正常情況下已開啟 SA 相關抗病機制，達到提高耐病之效果。

此外，*SIZFP* 基因的確參與在抗青枯病菌防禦機制之結論，其實有另一問題值得思考，由於本研究發現，過量表現 *SIZFP* 基因轉植株亦具有較佳抗旱能力 (圖十三)，那麼，表現 *SIZFP* 之轉基因菸草對青枯病抗性高，是否有可能只是來自抗旱能力較高？而針對此點，其實可做以下釐清：首先，在靜默化 *SIZFP* 基因之番茄植株中，*GluB* 基因表現量明顯下降 (圖九)；其次，過量表現 *SIZFP* 基因轉植株已可明顯增加 *PR1*、*PR2*、及 *SAR8.2* 等病害防禦基因表現 (圖十五，A)，由於上述之 *PR* 基因並不受乾旱調控，故目前推測，表現 *SIZFP* 之轉基因菸草對青

枯病之抗性的確是因 *SIZFP* 參與在抗青枯病菌防禦機制中。

另一方面，本研究亦發現 *SIZFP* 基因在青枯病菌相關 PAMPs 和 flg22 的處理下，表現量亦受到抑制（圖五），由該結果可推論以下小結。首先，由於 *SIZFP* 基因在活菌、煮沸總菌物和第三型分泌系統缺失 (*Rs-hrpG-defective*) 之病菌處理下，其受抑制之情況並無程度上之差異，因此可知 *SIZFP* 基因受青枯病菌調控情形與病原菌分泌 effector 所引起之 ETI 防禦反應可能無直接關聯性。其次，*SIZFP* 基因在 flg22 處理下表現量亦有下降趨勢，但值得注意的是，青枯病菌鞭毛構造並不屬於植物辨認之分子標誌之一 (Go´mez-Go´mez *et al.*, 2001; Pfund *et al.*, 2004)。因此，*SIZFP* 基因除了會受青枯病菌調控外，可能亦會廣泛地受其它病原菌所調控；且由微陣列資料庫顯示，阿拉伯芥同源基因表現亦皆會受到 PAMPs 所抑制（表三）。然而，植物整體的防禦反應和最終所呈現出的抗/感病外表型，是很難藉由一個基因的轉錄層次調控而說明其所代表的意義的，因此，若欲探討 *ZFP* 基因在針對 PAMPs 所感染時所扮演的功能，未來可將過量表現 *SIZFP* 及其阿拉伯芥同源基 *at5g24870* 突變株幼苗，同時培養於含各式 PAMPs 之培養基，藉以觀察並比較兩者生長型態以釐清這兩個基因在不同物種的抗病反應是否有所異同。此外，目前研究指出，許多植物 RING finger 蛋白在其生物體中藉由執行 ubiquitin ligase 的功能，進而調控植物防禦反應 (Devoto *et al.*, 2003; Goritsching *et al.*, 2007)。因此，未來除可透過 *in vitro* ubiquitination assay 驗證 *SIZFP* 蛋白是否真具有 E3 ligase 活性外，若經驗證屬實，則可進一步 Δ RING domain，再輔以逆境處理，加以釐清 *SIZFP* 所調控之 ubiquitination 路徑是否參與在植物抗逆境反應中。

3. *SIZFP* 基因正調控乾旱、氧化逆境及鹽害之防禦反應

本研究發現番茄之 *SIZFP* 被靜默後植物對乾旱逆境較為敏感（圖八），而過量表現 *SIZFP* 基因則可明顯提高菸草對乾旱之耐受性（圖十三），因此，番茄 *SIZFP* 基因的確參與在缺水之機制防禦中，且可能扮演著正面角色。本研究亦發現番茄 *SIZFP* 基因隨著乾旱因子之形成，其表現量雖有少量增加，但趨勢並不明顯（圖六），且不同次實驗結果並不一致（附錄六）；而在荷爾蒙 ABA 的處理下，亦無明顯受到調控（圖七，F），推測 *SIZFP* 所參與之抗旱機制可能有以下兩種情況：一

為 *SIZFP* 並不在轉錄層次受 ABA 調控，另一則為 *SIZFP* 基因誘導 ABA-independent 路徑反應。由於生物資訊分析可知，*SIZFP* 基因其啟動子序列具有 ABRE cis-element (ABA response element) (表一)，故不排除 *SIZFP* 基因受 ABA 調控之可能性。但 *SIZFP* 基因所參與之抗旱機制究竟屬於何者，亦或是兩者兼具，目前則還尚需更多的實驗證據來加以驗證。除了可檢測 *SIZFP* 蛋白質表現外，亦可觀察在乾旱逆境下氣孔開閉之情形及檢測 ABA-dependent 路徑 (如: *ABA1/2*、*ABI1/2* 及 *NCED*) 及 ABA-independent 路徑 (如: *DREB*) 之重要調控基因表現情形。另外，在 ABA 處理實驗中，在抗病品中，已知會受 ABA 誘導之 *SLAIM1* 與 *TSRF* 指標基因並未被誘導表現，但在 MicroTom 番茄品系中卻可被誘導 (附錄七)，故初步推論也可能是因番茄品系不同所導致，未來則可選擇多個抗青枯病品系施以 ABA 處理加以驗證。

本研究也指出，過量表現番茄 *SIZFP* 基因之菸草植株亦可增加對氧化及鹽害逆境抗性 (圖十四)。由於抗氧化現象是一極複雜及連續生理反應所共同調控而成，因此，若欲釐清表現番茄 *SIZFP* 轉植株是因其本身對氧化逆境耐受度較高，亦或是因藉由消除 ROS 能力較佳，可有以下幾個方向：一為可進行 DAB (diamino benzidine, DAB) 染色，由於植物所產生之 ROS 主要係以 H_2O_2 之型式存在於植物中 (Pastori and Foyer, 2002)，因此當 H_2O_2 累積速度較分解速度快時，即可利用 DAB 染色偵測 H_2O_2 於組織中累積之情形；此外，亦可藉由檢測 ROS 相關酵素活性及其氧化下游相關基因表現情形加以釐清其中機制。另一方面，在鹽害耐受性之可能機制，則可針對其抗性是因具有較佳排除多餘離子能力 (如 SOS pathway) 亦或是對滲透壓逆境忍受力較高之觀點做進一步探討 (Zhu, *et al.*, 2002; Munns and Tester, 2008)。

另外，由於 *SIZFP* 之細胞表現位置位於細胞骨架 (圖二)，過去許多文獻指出，在非生物性逆境下會使植物的細胞骨架重新組織 (Olinevich *et al.*, 2002; Abdrakhamanova *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007)；因此，未來若欲探討 *SIZFP* 位於細胞骨架與逆境耐受性之可能關係，可透過處理各式環境逆境下觀察其細胞之表現位改變與否，另一方面，亦可處理細胞骨架抑制劑後，再輔以各種逆境處理，觀察其生長狀況及存活率。

4. 阿拉伯芥同源基因 *At5g24870* 突變體對多數非生物逆境耐受性降低

本研究發現當 *At5g24870* 基因缺失時，其種子在鹽害、模擬乾旱、糖分、滲透壓及 ABA 等逆境下之萌芽率皆較低（圖十七），顯示突變株在這些逆境下耐受性較差；同時，這些結果也與過量表現番茄 *SIZFP* 之菸草植物對鹽害與乾旱逆境有較佳抗性之結論一致，亦即顯示番茄 *SIZFP* 基因及其阿拉伯芥同源基因皆參與在鹽害與乾旱逆境之調控，且亦都扮演著正面角色；另外，當 *At5g24870* 基因缺失時，其種子對於糖分逆境、ABA 刺激與 mannitol 處理等逆境都較為敏感，該結果與微陣列資料庫所示 *At5g24870* 基因表現會被許多非生物性逆境中是一致的（表三）。故綜合目前結果，可知番茄 *SIZFP* 其阿拉伯芥同源基因的確在非生物逆境中扮演重要角色，但未來應於阿拉伯芥不同生長時期反覆驗證此推論，同時也可參考微陣列資料庫所暗示之方向，進行冷逆境及熱逆境等處理，加以驗證 *At5g24870* 於各式非生物性逆境反應中之功能，並進一步分析個別逆境訊息傳導之相關基因表現，以釐清其中機制。

5. *At5g24870* 基因在病害防禦之功能探討

目前本研究結果顯示，當阿拉伯芥 *At5g24870* 基因缺失後，並不影響對青枯病與軟腐病菌之抗感性（圖十八），故此基因在抗病上之功能似乎與其番茄同源不同，但目前仍無最後定論，原因有三。首先，阿拉伯芥 *At5g24870* 基因可能有功能重複 (functional redundancy) 現象；由於阿拉伯芥 RING finger 蛋白為一龐大基因家族 (Stone *et al.*, 2005; Katoh *et al.*, 2005)，所執行之生物功能可能有重複，所以導致單一基因之缺失並無法突顯此基因在抗病上功能，針對此點，未來可進一步培育多基因突變株加以驗證。其次，接種病原菌之方式可能不適合，目前實驗接種方法係將植物施以嚴重斷根處理後再處理青枯病菌 (Lin *et al.*, 2008)，推測斷根方式可能導致每棵植株傷害程度並不一致，且亦有可能因斷根造成的逆境可能太過劇烈，因此無法正確比較植株間之病害反應是否有差異性，故未來可將接種方式改為不斷根之直接澆灌方式，以期更精準的觀察青枯病菌發病情況。第三種可能的原因是，用來測試之病原菌並不適合，而此推論可從生物資訊分析和番茄 *SIZFP* 基因之調控機制得到支持，由微陣列資料庫分析可知，*At5g24870* 只受少數病原菌所調控（表三），顯示處理病菌之種類若不適合，即可能無法觀察到

At5g24870 在抗病上可能的反應變化，因此，未來可測試對更多各式病原菌之反應。最後，若上述推論方向經實驗驗證後依舊沒差異，則指向 *At5g24870* 基因可能不參與與病害防禦反應，顯示不同物種間之同源基因所扮演角色的確有所異同。

6. *SIZFP* 基因功能分析結語

本研究藉由深入研究番茄 *SIZFP* 基因，首次報導 C3HC4-RING ZFP 基因可正調控抗青枯病、乾旱、氧化及鹽害等逆境能力；此外，在阿拉伯芥同源基因之研究亦顯示，*At5g24870* 基因之缺失對非生物逆境耐受性較差。因此，綜合所有結果顯示，確認不同物種之 *ZFP* 基因在許多生物逆境/非生物逆境中皆扮演重要角色，除在植物抗逆境之防禦機制提供了重要訊息，亦同時驗證 *SIZFP* 基因在植物保護上之研究潛力 (附錄十七)。

II. 茄科 *EAS* 基因之功能探討

1. 表現菸草 *NtEAS* 基因之轉殖菸草增加對青枯病菌及非生物逆境抗性

本研究發現過量表現菸草 *NtEAS* 基因對青枯病菌感染有較佳抗性 (圖二十)，且實驗室過去結果亦發現短暫靜默番茄 *SlEAS* 造成抗病品系對抗青枯病菌能力下降 (附錄十二，A、B)，因此，茄科 *EAS* 基因的確參與在青枯病菌之防禦反應。另外，本研究亦發現，過量表現 *NtEAS* 基因轉殖株中之 SA 調控路徑下游基因表現已明顯增加 (圖二十二)，顯示過量表現菸草 *NtEAS* 基因之轉殖株於正常情況下已啟動 SA-dependent 防禦路徑。另一方面，短暫靜默 *SlEAS* 之番茄植物其內生性 *GluB* 基因 (受 SA 與 ET 荷爾蒙調控) 表現量明顯降低 (附錄十二，C)，這顯示 *NgEAS* 與 *SlEAS* 可能皆透過 SA 訊息傳遞路徑進而啟動抗病機制。但該現象與菸草 *Nicotiana tabacum* 所分離之 *TEAS4* 基因特性透露著些許相關，但無法比較，*TEAS4* 基因在 SA 處理下並無明顯受到調控 (Yin *et al.*, 1997)，但由於本研究與該篇作者之實驗策略與手法皆有許多不同，因此尚無法有確切定論，但未來可藉由處理 SA 並檢測 *NtEAS* 與 *SlEAS* 表現情形以釐清茄科抗菌蛋白所活化之防禦路徑是否有所不同。

另一方面，在非生性逆境之測試中，發現表現菸草 *NtEAS* 基因之菸草植株對

氧化及鹽害逆境亦都有較高耐受性 (圖二十一)，該結果顯示了一個抗菌蛋白的活化，除了開啟抗病的防禦機制外，亦可能藉由複雜之訊息傳遞及生理改變，進而連同提高對非生物性逆境抗性。因此，未來可進一步檢測 *NgEAS* 轉殖植物在更多生物逆境 (如：細菌性病害、真菌及病毒) 和非生物逆境 (如：乾旱、滲透壓) 下之耐受性，以深入探討 *NgEAS* 在廣泛病害與非生物性逆境之防禦功能與其中之分子機制。此外，在番茄 *SIEAS* 研究上，除已發現短暫靜默 *SIEAS* 基因後會降低抗番茄抗病品系對青枯病菌之抗性能力 (附錄十二)，經分析 *SIEAS* 啟動子區域後可知該區域包含各式可能的 *cis*-elements (表四)，因此，未來亦可透過 VIGS 策略並輔以各式逆境處理，加以探討 *SIEAS* 與 *NtEAS* 此兩基因在功能上之異同。

2. *NgEAS* 基因啟動子可受多種病菌誘導，且可能具未知受病原菌誘導

cis-elements

經分析 *NgEAS* 啟動子 900 bp 序列發現包含了可被 WRKY 轉錄因所辨認之 W box (TTGAC) 與受病原菌及鹽分逆境誘導的 GT-1 box (GAAAAA) (附錄十三)。統整過去 *EAS* 研究可知，植物 *TEAS4* 與 *PEAS1* 基因其啟動子皆具有 W box、乙烯反應序列 (EREs)、bZIP 與 bHLH 辨認序列 (E box) 及 cysteine protease 辨認序列 (LeCp) 等多元 *cis*-elements，但無 GT-1 box。由此可知，*NgEAS* 啟動子較目前所研究過之 *EAS* 特性不同，且具有獨特的 GT-1 box，但由於目前所鈎取序列可能並非全長，因此 *NgEAS* 啟動子是否尚具有其它 *cis*-elements 還可進一步釐清 (Yin *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2004; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008)。

本研究發現，經青枯病菌處理後，除了 pNg200 構築植株無法誘導其表現外，其它各式不同長度的 *NgEAS* 啟動子皆可誘導其活性表現 (圖二十四)，雖隨著序列遞減其誘導活性亦漸下降，但可知 *NgEAS* 啟動子受青枯病菌之誘導與否，與 GT-1 及 W box 的存在並無關係，但由於 *NgEAS* 基因同時可受青枯病菌及氧化逆境強烈誘導 (附錄二)，因此，GT-1 及 W box 是否扮演氧化逆境下之誘導關鍵因子仍待進一步實驗釐清。此外，前人研究曾指出，含有 GT-1 box 的 *SCaM-4* 基因並不受氧化逆境所誘導 (Park *et al.*, 2004)，因此，若經啟動子分析後驗證 GT-1 的確為調控 *NgEAS* 受氧化逆境誘導的關鍵因子之一，則值得進一步思考 GT-1 box 是否在不同物種調控植物逆境反應亦有所不同，亦或可輔以

yeast-one-hybridization 方式釣取可能與之交互作用之蛋白加以釐清機制。另一方面，由於 pNg200 之構築植株完全無法受青枯病菌所誘導，故推測 *NgEAS* 啟動子序列 -280~-200 bp 可能具有可受青枯病菌調控之未知重要 *cis-elements*。未來可將該 80 bp 序列再逐一縮短長度，並檢測青枯病菌之誘導情形，以期分離出可受誘導之未知 *cis-elements*。

本研究顯示 *NgEAS* 啟動子可受多種細菌及真菌葉斑病所誘導 (圖二十四)，其中，可受青枯病菌強烈誘導之特性與先前結果顯示過量表現 *NtEAS* 轉植株對青枯病菌有較佳抗性方向一致，亦即當抗菌蛋白受誘導活化時，的確可啟動下游植物相關之防禦機制進而抵抗病原菌侵染。因此，未來可考慮接種更多病害，如：嚴重危害農業的白粉菌。此外，由於 *NgEAS* 啟動子上序列亦包含可被 WRKY 轉錄因子所辨認之 W box，故亦可進一步 *NgEAS* 啟動子檢測於不同非生物逆境下 (如：缺水、滲透壓、過量 ABA) 之誘發情況。

另一方面，各式不同長度之 *NgEAS* 啟動子亦可受青枯病菌相關 PAMPs 誘導表現 (圖二十五)，這與 Maldonado-Bonilla 等學者 (2008) 研究發現，*PEAS1* 基因啟動子可受 cellulase 和 Pep-13 等不同 PAMPs 所誘導是一致的 (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008)，但值得注意的是，*NgEAS* 啟動子並不受革蘭性陰性菌鞭毛化學合成物質 flg22 處理誘導表現 (附錄十六)，這顯示出 *NgEAS* 雖可廣泛受多種活菌誘導，但對於 PAMPs 之誘導反應可能具有選擇性，未來可以藉以處理更多不同 PAMPs (如：真菌細胞壁成分 chitin、革蘭性陽性菌細胞壁成分 PNG、EF-Tu) 進一步分析。此外，本研究亦發現，不同長度 *NgEAS* 基因啟動子受青枯病菌 PAMPs 之誘發程度相較活菌下皆降低許多 (圖二十五)，故推測當植物辨認到 PAMPs 存在時，其植物抗菌蛋白具有基本活性之誘導表現，而當病原菌進一步啟動第三型分泌系統注入 effector 時，抗菌蛋白被誘導得亦更強烈，以增強植物整體防禦力。

3. *NgEAS* 基因啟動子專一表現在維管束組織

本研究室先前研究發現，*NgEAS* 基因啟動子在青枯病菌感染後主要表現於維管束 (附錄十五)，與 *PEAS1* 基因啟動子一致 (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008)。根據過去研究指出，組織特异性啟動子除具備一般啟動子結構外，也可能同時有其

它控制特定組織表現之 *cis*-element，通常不超過 30 bp，且在不同種屬之相同基因常具有高度保守性 (Scherntnaner *et al.*, 1988; Keller *et al.*, 1989)。因此，目前雖無法藉由生物資訊預測出主導表現在維管束的關鍵序列，但或許可藉由比對 *PEAS1* 與 *NgEAS* 此兩基因啟動子序列保守性進而找出調控之可能 *cis*-element。另一方面，針對 *NgEAS* 表現在維管束的可能意義進一步探討，本研究發現，*NgEAS* 啟動子在青枯病菌及其煮沸物處理下（無移動能力），於接種之上位葉和下位葉可受到誘導（圖二十六），顯示 *NgEAS* 所誘發之防禦為系統性反應；另一方面，由於前人研究指出，當植物察覺到被病原菌感染時，除了在感染部位引起 HR 反應使其組織壞死，並藉由木質化使細胞壁增厚抵抗病菌外，此外，訊息亦會從韌皮部 (phloem)，釋放到沒有被感染的部位 (Uknes *et al.*, 1992; Ryals *et al.*, 1996)，故目前推論 *NgEAS* 表現在維管束可能與系統性之訊息傳遞有關連。

4. GT-1 box 為 *NgEAS* 啟動子誘發訊號接收之必須 *cis*-element

前人研究報導指出，甜椒 *PEAS1::GUS* 基因在 PAMPs 刺激下，可在非接種區域偵測到 GUS 活性，顯示抗菌蛋白的誘導反應可達系統性反應，然而箇中防禦機制並未釐清 (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008)。本研究發現，pNg900 (GT-1 box × 2 / W box × 1) 與 pNg730 (GT-1 × 1 / W box × 1) 植株在青枯病菌煮沸物處理下（無移動能力），於接種之上位葉和下位葉可受到誘導，然而 pNg600 (GT-1 box-defective / W box × 1) 則否（圖二十六），顯示唯具有 GT-1 box 之 *NgEAS* 啟動子才具有接受訊息傳達能力，此發現是抗菌蛋白研究中首次揭露植物防禦訊息傳遞與 *cis*-element 在調控上的直接關係。此外，由於前人研究指出，當植物累積內生性 SA 或外加 SA 或其結構物相似物，均會活化系統性抗病機制 (Uknes *et al.*, 1992)，因此由 *NtEAS* 基因轉植株大量誘導 SA 防禦路徑相關基因之結果，或許能解釋同為茄科之 *NgEAS* 啟動子受青枯病菌感染後具有系統性防禦現象（圖二十六）。另一值得思考的是，*PEAS1* 基因啟動子並無 GT-1 box 序列，但也具有訊息傳遞傳遞能力 (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008)，由此顯示，不同之菸草品系啟動植物系統性防禦之關鍵 *cis*-element 可能不同；此外，亦可仿 Maldonado-Bonilla 等學者 (2008) 探討 *PEAS1* 基因的研究，在接種上位葉和下位葉偵測菸草內生性之 *EAS* 基因表現和 capsidiol 與 ROS 的累積情形，藉以釐清 GT-1 box 調控之

系統反應其可能機制。綜合以上所述可知，在菸草 *Nicotiana glutinosa* 品系中，GT-1 box 與 W box 與 *NgEAS* 基因啟動子被廣泛因子誘導有關，且 GT-1 為接受訊號傳遞時所必須之重要 *cis-element*；另外，同為茄科之番茄 *SlEAS* 基因與菸草 *NtEAS* 基因則皆是透過 SA 調控路徑參與在抗病防禦反應中（附錄十二，C、圖二十二），但是否同時參與在其它防禦路徑，未來可藉由施以不同荷爾蒙處理，觀察 *EAS* 基因之表現情形加以探討。

5. 茄科 *EAS* 基因功能分析結語

長久以來，作物病害一直是造成全球農作物產量及品質受損之主要因素，本論文藉由深入研究菸草合成抗菌蛋白之 *EAS* 關鍵基因，發現過量表現 *NtEAS* 基因之菸草植物不但可增加對青枯病菌之抗性，亦同時提升在氧化和鹽害逆境下之耐受性。此外，經分析啟動子特性後發現，可知 *NgEAS* 不但可受多種病菌所誘導，並具有組織專一性表現，且本研究首次指出 GT-1 box 為訊息傳遞之必要 *cis-elements*，在學術和應用價值上皆有其突破（附錄十八）。

III. 本論文總結

本研究報導 *SIZFP* 與 *NgEAS* 基因在青枯病、乾旱、氧化逆境和鹽害防禦反應之功能，顯示此兩基因具有抗多種逆境優點。此外，*EAS* 基因啟動子不但可受多種重要病原菌誘導，亦具備組織表現專一特性，顯示相較持續啟動子可更精密且有效調控植物防禦系統。故綜合本研究所得結果，除在學術上提供植物抗逆境機制更多了解外，未來也可將之應用在培育抗病新品種的研究上。

第五章 未來展望

I、建立 *SIZFP* 及 *At5g24870* 基因在不同生物逆境與非生物逆境下之表現模式

針對逆境處理實驗結果顯示，*SIZFP* 與 *At5g24870* 基因的確參與在許多防禦機制，因此，若能進一步檢測不同逆境下（如：氧化、高鹽、乾旱、ABA 及 PAMPs）*SIZFP* 及 *At5g24870* 之基因表現情形，以期可對兩基因在逆境下呈現之抗/感性在分子機制上提供更明確的證明。此外，亦可檢測 *SIZFP* 基因靜默番茄植株、*35S::SIZFP* 轉殖菸草與 *At5g24870* 突變株其內生性相關防禦基因表現，以釐清調控之可能防禦網絡。

II. 廣泛測試 *SIZFP* 轉基因植株與阿拉伯芥同源基因突變體在各式逆境下反應

目前結果顯示，番茄與阿拉伯芥 *C3HC4-RING ZFP* 基因參與在多數非生物逆境，而由生物資訊分析可發現 *SIZFP* 與其阿拉伯芥同源基因似乎與低溫、熱逆境很有關係。因此，除了目前 *35S::SIZFP* 轉基因菸草植物外，亦可培育表現 *SIZFP* 阿拉伯芥轉基因植物和 *RNAi SIZFP* 之番茄植株，並測試更多不同非生物逆境因子和生物逆境（如：*Pseudomonas syringae*、*Xanthomonas campestris*、真菌細胞壁成分、革蘭性陽性菌細胞壁成分和 EF-Tu 等各式 PAMPs，以交叉分析 *ZFP* 基因在不同物種間所扮演的功能。

III. *SIZFP* 蛋白質功能分析

本研究結果發現許多令人感興趣的現象，如蛋白質位於細胞骨架上。若欲釐清其確切位置或是否隨著逆境因子而改變位置，可利用 (1) 微管及微絲抑制劑處理釐清表現位置；(2) 以青枯病菌或其它逆境處理菸草表皮細胞，觀察坐落位置是否改變。此外，由於許多研究指出，植物許多 RING finger 蛋白質具有 E3 ligase 活性，針對此點，可藉由 *in vitro* ubiquitination assay 加以驗證。

IV. 測試 *NgEAS* 啟動子誘導廣泛性並分離病菌誘導之新穎 *cis*-elements

除目前測試的細菌和真菌外，未來可測試更多不同寄生特性病原菌，如卵菌

綱 (Oomycetes)、真菌病害可包含葉斑病、白粉病、灰黴病等病原菌。在非生物逆境方面，可測試在氧化逆境下，*NgEAS* 啟動子誘導情形，以釐清 GT-1 box 與 W box 扮演功能。此外，亦可施以 SA、JA、與 ET 等不同荷爾蒙處理，加以探討 *NgEAS* 基因之活化參與在哪些防禦路徑中。此外，目前結果顯示，*NgEAS* 啟動子 -280 bp~-200 bp 有一病菌誘導之關鍵序列，未來可將該 80 bp 序列逐一縮短長度，並檢測青枯病菌誘導情形，以期分離新穎 *cis-elements*。另一方面，若欲深入 *NtEAS* 在廣泛病害與非生物性逆境之防禦功能，可進一步檢測表現 *NtEAS* 之轉殖植物對其他重要病害及非生物性逆境的耐受性，其病害可包括：細菌病病害如細菌斑點病菌、軟腐病菌及各式病原菌相關衍生物等；真菌病害則可測試葉斑病、白粉病、灰黴病等病原菌，非生物逆境則可測試乾旱、滲透壓。



參考文獻

- 郭如玉 (2004). AtNPR1 轉殖番茄之性狀分析及抗病機制研究。國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。
- 趙鐸駿 (2009). 一個番茄鋅指蛋白基因之鑑任與功能分析。國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。
- Abdrakhamanova, A., Wang, Q.Y., Khokhlova, L., and Nick, P. (2003). Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol* **44**, 676-686.
- AbuQamar, S., Luo, H., Laluk, K., Mickelbart, M.V., and Mengiste, T. (2009). Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the *AIM1* transcription factor. *Plant J* **58**, 347-360.
- Arnon, D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1-5.
- Balbi, V., and Devoto, A. (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol* **177**, 301-318.
- Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**, 473-488.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P.J., Marco, Y., and Deslandes, L. (2008). RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* **20**, 2252-2264.
- Boller, T., and He, S.Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**, 742-744.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F. C., and Cammue, B.P.A. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 393-416.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., and Dinesh-Kumar, S.P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J* **39**, 734-746.
- Bruden, R.S., Bailey, J.A., Vincent G.G. (1975). Glutinosone, a new antifungal sesquiterpene from *Nicotiana glutinosa* infected with *tobacco mosaic virus*. *Phytochemistry* **14**, 221-223.
- Cai, X.Z., Xu, Q.F., Wang, C.C., and Zheng, Z. (2006). Development of a virus-induced gene-silencing system for functional analysis of the

- RPS2-dependent resistance signalling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **62**, 223-232.
- Chellemi, D.O., Dankers, H.A., Olson, S.M., Hodge, N.C., and Scott, J.W.** (1994). Evaluating bacterial wilt-resistant tomato genotypes using a regional approach. *J Am Soc Hortic Sci* **119**, 325-329.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., and Zhu, J.K.** (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci* **45**, 437-448.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E., and Lund, O.S.** (2004). Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant J* **40**, 622-631.
- Cutt, J.R., Harpster, M.H., Dixon, D.C., Carr, J.P., Dunsmuir, P., and Klessig, D.F.** (1989). Disease response to *tobacco mosaic virus* in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related *PR1b* gene. *Virology* **173**, 89-97.
- Denny, T.P.** (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In plant-associated bacteria, S.S. Gnanamanickam, ed (Dordrecht, The Netherlands: Springer Publishing), pp. 573-644.
- Denny, T.P., and Hayward, A.C.** (2001). *Ralstonia solanacearum*. In NW Schaad, JB Jones, W Chun, eds, Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, U.S.A.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* **55**, 205-212.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounloham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8024-8029.
- Devoto, A., Muskett, P.R., and Shirasu, K.** (2003). Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 307-311.
- Dhonukshe, P., Laxalt, A.M., Goedhart, J., Gadella, T.W.J., and Munnik, T.** (2003). Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell* **15**, 2666-2679.
- Dorais, M., Ehret, D. L., and Papadopoulos, A.P.** (2008) Tomato (*Solanum*

- lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem Rev* **7**, 231-250.
- Ellis, C., Karafyllidis, J., Wasternack, C., and Turner, J.G.** (1998). The *Arabidopsis* mutant *cevl* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**, 1557-1566.
- Ekengren, S. K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P., and Martin, G. B.** (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J* **36**, 905-917.
- Freemont, P.S.** (2000). RING for destruction? *Curr Biol* **10**, R84-87.
- Freemont, P.S., Hanson, I.M., and Trowsdale, J.** (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* **64**, 483-484.
- Gao, X. P., Wang, X. F., Lu, Y. F., Zhang, L. Y., Shen, Y. Y., Liang, Z., and Zhang, D. P.** (2004). Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. *Plant Cell Environ* **27**, 497-507.
- Genin, S.** (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol* **187**, 920-928.
- Go ´mez-Go ´mez L, Bauer Z, Boller T** (2001) Both the extracellular leucinerich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1155-1163.
- Gonzalez, E.T., and Allen, C.** (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 536-544.
- Goritschnig, S., Zhang, Y., and Li, X.** (2007). The ubiquitin pathway is required for innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant journal for cell and molecular biology*. **v. 49, no. 3**, 540-551.
- Grimault, V., Anais, G., and Prior, P.** (1994). Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathology* **43**, 663-668.
- Gu, Y., Yang, C., Thara, V. K., Zhou, J., and Martin, G. B.** (2000). Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto Kinase. *Plant Cell* **12**, 771-785.
- Guo, D., Spetz, C., Saarma, M., and Valkonen, J. P.T.** (2003). Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 405-410.
- Hanson, P.M., Licardo, O., Hanudin, Wang, J.F., and Chen, J.** (1998). Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. *Plant Dis* **82**, 74-78.
- Hayward, A.C.** (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**, 65-87.

- Hernandez-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sanchez-Rodriguez, C., Anderson, L.K., Somerville, S., Marco, Y., and Molina, A. (2007).** Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* **19**, 890-903.
- Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2008).** Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **279**, 303-312.
- Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D.X., Balague, C., and Marco, Y. (2002).** Delayed symptom development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **92**, 1142-1148.
- Hong, J. K., Choi, H. W., Hwang, I. S., and Hwang, B. K. (2007).** Role of a novel pathogen-inducible pepper C3-H-C4 type RING-finger protein gene, *CaRFP1*, in disease susceptibility and osmotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* **63**, 571-588.
- Hu, J., Barlet, X., Deslandes, L., Hirsch, J., Feng, D. X., Somssich, I., and Marco, Y. (2008).** Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One* **3**, e2589.
- Huang, Q., and Allen, C. (1997).** An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **179**, 7369-7378.
- Hueck, C.J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Jaunet, T.X., and Wang, J.F. (1999).** Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* **89**, 320-327.
- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000).** RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-552.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T., and Liu, Y.C. (1999).** The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**, 309-312.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006).** The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jung, J., Won, S. Y., Suh, S. C., Kim, H., Wing R., Jeong Y., Hwang, I., Kim, M. (2007).** The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 575-588.
- Kado, C. I., and Heslett, M. G. (1970).** Selective media for isolation of *Agrobacterium*,

Corynebacterium, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**, 969-976.

- Karpinski, S., Reynolds, H., and Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, and Mullineaux P.** (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 654-657.
- Kasajima, I., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Fujiwara, T.** (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Mol Biol Reporter* **22**, 49-52.
- Katoh S, Tsunoda Y, Murata K, Minami E, Katoh E.** (2005). Active site residues and amino acid specificity of the ubiquitin carrier protein-binding RING-H2 finger domain. *J Biol Chem* **280**, 41015–41024
- Keller, B., and Lamb, C.J.,** (1989). Specific expression of a novel cell wall hydroxypoline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Dev* **3**, 1639-1646.
- Kiba, A., Maimbo, M., Kanda, A., Tomiyama, H., Ohnishi, K., and Hikichi Y.** (2007). Isolation and expression analysis of candidate genes related to *Ralstonia solanacearum*–tobacco interaction. *Plant Biotechnol* **24**, 409–416.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R.** (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* **12**, 1067-1078.
- Ko, J.H., Yang, S.H., and Han, K.H.** (2006). Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant J* **47**, 343-355.
- Kobayashi, I., Kobayashi, Y., and Hardham, A.R.** (1994). Dynamic reorganization of microtubules and microfilaments in flax cells during the resistance response to flax rust infection. *Planta* **195**, 237-247.
- Kovtun, Y., Chiu, W., Tena, G., and Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2040-2045.
- Lahaye T.** (2004). Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana* RRS1-R and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. *Trends Plant Sci* **9**, 1-4.
- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lee, H., Xiong, L., Gong, Z., Ishitani, M., Stevenson, B., and Zhu, J.** (2001). The *Arabidopsis* HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo–cytoplasmic partitioning. *Genes Dev* **15**, 912-924.
- Lin, W.C., Lu, C.F., Wu, J.W., Cheng, M.L., Lin, Y.M., Yang, N.S., Black, L., Green, S.K., Wang, J.F., and Cheng, C.P.** (2004). Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal

- and bacterial diseases. *Transgenic Res* **13**, 567-581.
- Lin, Y.M., Chou, I.C., Wang, J.F., Ho, F.I., Chu, Y.J., Huang, P.C., Lu, D.K., Shen, H.L., Elbaz, M., Huang, S.M., and Cheng, C.P.** (2008). Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1261-1270.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (2005). Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1296-1305.
- Liu, H., Zhang, H., Yang, Y., Li, G., Wang, X., Basnayake, B.M., Li, D., and Song, F.** (2008). Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene OsBIRF1 on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses. *Plant Mol Biol* **68**, 17-30.
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002a). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* **31**, 777-786.
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002b). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to *tobacco mosaic virus*. *Plant J.* **30**, 415-429.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002c). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *tobacco mosaic virus*. *Plant Cell* **14**, 1483-1496.
- Liu, Y., Nakayama, N., Schiff, M., Litt, A., Irish, V. F., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2004). Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol* **54**, 701-711.
- Loake, G., and Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 466-472.
- Lopes C.A., Quezado-Soares A.M., Melo P.E.,** (1994). Differential resistance of tomato cultigens to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* **78**, 1091-1094.
- Maldonado-Bonilla, L. D., Betancourt-Jiménez, M., and Lozoya-Gloria, E.** (2008). Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *Eur J Plant Pathol* **121**, 439-449.
- Ma, K., Xiao, J., Li, X., Zhang, Q., Lian, X.** (2009). Sequence and expression analysis of the C3HC4-type RING finger family in rice. *Gene* **444**, 33-45.
- Mahajan, S., and Tuteja, N.** (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* **444**, 139-158.
- Maimbo, M., Ohnishi, K., Hikichi, Y., Yoshioka, H., and Kiba, A.** (2007). Induction of a small heat shock protein and its functional roles in *Nicotiana* plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol* **145**,

- 1588-1599.
- Maimbo, M., Ohnishi, K., Hikichi, Y., Yoshioka H., and Kiba, A.** (2010). S-glycoprotein-like protein regulates defense responses in *Nicotiana* plants against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol* **152**, 2023-2035.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U.** (2002). The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 637-646.
- Miller, G., Shulaev, V., and Mittler, R.** (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant* **133**, 481-489.
- Mukhtar, M.S., Deslandes, L., Auriac, M.C., Marco, Y., and Somssich, I.E.** (2008). The *Arabidopsis* transcription factor WRKY27 influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant J* **56**, 935-947.
- Munns, R. and Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 651-681.
- Nühse, T. S., Peck, S. C., Hirt, H., and Boller T.,** (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J Biol Chem* **275**, 7521-7526.
- Olinevich, O.V., and Khokhlova, L.P.** (2002). Reorganization of the tubulin and actin cytoskeleton under acclimation and abscisic acid treatment of *Triticum aestivum* L. plants. *Tsitologiya* **44**, 532-544.
- Osterlund, M., Wei, N., and Deng, X. W.** (2000). The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol* **124**, 1520-1524.
- Park, H.C., Kim, M. L., Kang, Y. H., Jeon, J. M., Yoo, J. H., Kim, M. C., Park, C. Y., Jeong, J. C., Moon, B. C., Lee, J. H., Yoon, H. W., Lee, S., Chung, W. S., Lim, C. O., Lee, S. Y., Hong J. C., and Cho, M. J.** (2004). Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol* **135**, 2150-2161.
- Park, S., Kaimoyo E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D. F.** (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**, 113-116.
- Pastori, G. M., and Foyer, C. H.** (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* **129**, 460-468.
- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F. M., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Allen, C., and Bent, A. F.** (2004). Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 696-706.

- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., and Genin, S.** (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 538-550.
- Prior P., Grimault V., Schmit J.** (1994). Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospects. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, pp 209–223.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M., and Baulcombe, D. C.** (2001). *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* **25**, 237-245.
- Ratnayaka, H.H., Molin, W.T., and Sterling, T.M.** (2003). Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *J Exp Bot* **54**, 2293-2305.
- Robatzek, S., Bittel, P., Chinchilla, D., Kochner, P., Felix, G., Shiu, S.H., and Boller, T.** (2007). Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of *Arabidopsis* FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol Biol* **64**, 539-547.
- Rojo, E., Solano, R., and Sa´nchez-Serrano, J. J.** (2003). Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J Plant Growth Regul* **22**, 82–98.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., and Hunt, M. D.** (1996). Systemic Acquired Ewsistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- Ryals, J., Lawton, K. A., Delaney, T. P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B., and Weymann, K.** (1995). Singal transduction in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4202-4205.
- Saghai-marroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., and Allard, R. W.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 8014-8018.
- Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (1997). Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **87**, 1264-1271.
- Salinas-Mondrag´on, R. E., Garcidueñas-Piña, C., and Guzm´an P.** (1999). Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **40**, 579–590.
- Sambrook, J., Fritsch E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* Ed 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, U.S.A.
- Scherntnaner, J.P., Matzke, M.A., and Matzke. A.J.M.,** (1988). Endorsperm-specific

- activity of a zein gene promoter in transgenic tobacco plants. *EMBO J* **7**, 1249-1256.
- Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., and Expert, D.** (2009). *NRAMP* genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia Chrysanthemi* infection. *Plant J* **58**, 159-207.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., and Shinozaki, K.** (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 296–302.
- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.Y., Lee, Y.N., Kim, S.G., Lee, Y.H., Park, W.J., and Park, C.M.** (2009). The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**, 275-289.
- Shibaoka, H., and Nagai, R.** (1994). The plant cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 10-15.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs, H.** (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306**, 2206-2211.
- Sonoda, Y., Yao, S., Sako, K., Sato, T., Kato, W., Ohto, M., Ichikawa T., Matsui, M., Yamaguchi, J., and Ikeda A.** (2007). SHA1, a novel RING finger protein, functions in shoot apical meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Plant J* **50**, 586-596.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Pelt, J. A. V., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J., Brown, R., Kazan, K., Loon, L. C. V., Dong, X., and Pieterse, C. M. J.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**, 760-770.
- Stone SL, Hauksdottir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J.** (2005) Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**, 13-30.
- Takabatake, R., Karita, E., Seo, S., Mitsuhashi, I., Kuchitsu, K., and Ohashi, Y.** (2007). Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco. *Plant Cell Physiol* **48**, 414-423.
- Takemoto, D., Maeda, H., Yoshioka, H., Doke, N., and Kawakita, K.** (1999). Effect of cytochalasin D on defense responses of potato tuber discs treated with hyphal wall components of *Phytophthora infestans*. *Plant Sci* **141**, 219-226.
- Thion, L., Mazars, C., Nacry, P., Bouchez, D., Moreau, M., Ranjeva, R., and Thuleau, P.** (1998). Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a

longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *Plant J* **13**, 603-610.

- Thomma, B. BHJ., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F., and Cammue B. PA.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* **13**, 63-68.
- Thompson, J.D., G. Higgins, D., and J. Gibson, T.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Tsai, J. W., Hsu, S.T., and Chen, L. C.** (1985). Bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* and their effect on development of bacteria wilt of tomato . *Plant Prot Bull (Taiwan)* **27**, 267-268.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 645-656.
- Valentine, T., Shaw, J., Blok, V.C., Phillips, M.S., Oparka, K.J., and Lacomme, C.** (2004). Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified *tobacco rattle virus* vector. *Plant Physiol* **136**, 3999-4009.
- Vasse, J., Vasse, J., Frey, P., and Trigalet, A.** (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 241-251.
- Waigmann, E., and Zambryski, P.** (1994). Plasmodesmata. Gateways for rapid information-transfer. *Curr Biol* **4**, 713-716.
- Wang, C., Li, J., and Yuan, M.** (2007). Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **48**, 1534-1547.
- Wang J.F., Lin C.H.** (2005) Colonization capacity of *Ralstonia solanacearum* tomato strains differing in aggressiveness on tomatoes and weeds. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. APS St Paul Germany pp 73–79.
- Wang, J.F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N.H.** (2000). Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 6-13.
- Wei, C.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.C., Martin, G.B., Huang, H.C., and Collmer, A.** (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **51**, 32-46.
- Xu, R., and Li, Q.Q.** (2003). A RING-H2 zinc-finger protein gene RIE1 is essential for

- seed development in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **53**, 37-50.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 781-803.
- Yang, X., Sun, C., Hu, Y., and Lin, Z.** (2008). Molecular cloning and characterization a gene encoding RING zinc finger ankyrin from drought-tolerant *Artemisia desertorum*. *J Biosci* **33**, 103-112.
- Yin, S., Mei, L., Newman, J., Back, K., and Chappell, J.** (1997). Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. *Plant physiol* **115**, 437-451.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2**, 1565-1572.
- Zavala-Pa'ramo, G., Cha'vez-Moctezuma, M. P., Garc'ia-Pineda, E., Yin, S., Chappellb, J., and Lozoya-Gloria, E.** (2000). Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEASI*) from chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol Plant* **110**, 410-418.
- Zeba, N., Isbat, M., Kwon, N.J., Lee, M.O., Kim, S.R., and Hong, C.B.** (2009). Heat-inducible C3HC4 type RING zinc finger protein gene from *Capsicum annuum* enhances growth of transgenic tobacco. *Planta* **229**, 861-871.
- Zhang, H., Zhang, D., Chen, J., Yang, Y., Huang, Z., Huang, D., Wang, X.C., and Huang, R.** (2004). Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Mol Biol* **55**, 825-834.
- Zhang S.Z., Yang B.P., Feng C.L., and Tang H.L.** (2005). Genetic transformation of tobacco with the trehalose synthase gene from grifola frondosa Fr. Enhances the resistance to drought and salt in tobacco. *J Integr Plant Biol* **47**, 579-587.
- Zhang, Y., Yang, C., Li, Y., Zheng, N., Chen, H., Zhao, Q., Gao, T., Guo, H., and Xie, Q.** (2007). SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1912-1929.
- Zhang, Y., Li, Y., Gao, T., Zhu, H., Wang, D., Zhang, H., Ning, Y., Liu, L., Wu, Y., Chu, C., Guo, H., and Xie, Q.** (2008). *Arabidopsis* SDIR1 enhances drought tolerance in crop plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 2251-2254.
- Zhou, J., Zhang, H., Yang, Y., Zhang, Z., Hu, X., Chen, J., Wang, X.C., and Huang, R.** (2008). Abscisic acid regulates TSRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *J Exp Bot* **59**, 645-652.
- Zhu, J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-273.

Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**, 10-16.



表一、分析番茄 *SIZFP* 基因其上游 3000 bp 啟動子區域之 putative *cis*-elements。

Function ^a	Description ^b	<i>cis</i> -elements ^c	Sequence ^d	No ^e	Position ^f
Biotic stresses	Fungal elicitor	BOX-W1	TTGACC	2	-2496, -2579
	Elicitor response	EIRE	TTCGACC	3	-2329, -2663, -2746
	Defense and stress	TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	3	-875, -1561, -1927
Abiotic stresses	Heat	HSE	AGAAAATTCG	2	-2676, -2841
	Anaerobic induction	ARE	TGGTTT	4	-32, -443, -513, -567
Development	Endosperm expression	Skn-1 motif	GTCAT	3	-270, -579, -624
	Meristem expression	CAT-box	GCCACT	1	-729
	Cell cycle regulation	MSA-like	TCCAACGGT	1	-2027
	Light response	ATCT-motif, ACE	AATCTAATCT, AAAACGTTTA	1,1	-2109, -2984
		Box-II, GA-motif	TCCACGTGGC, AAAGATGA	1,1	-391, -2076
		G-Box, GAG-motif	TACGTG, AGAGATG	1,1	-915, -1104
		Box 4	ATTAAT	4	-1825, -2174, -2316, -2886
Hormones	Gibberellin	GARE-motif	TCTGTTG	1	-1846
	ABA response	ABRE	TACGTG	1	-776
Other	Protein-binding site	Box-III	CATTTTCAC	1	-582

^a 表示功能分類。

^b 表示作用反應。

^c 表示該 *cis*-element 名稱。

^d 表示該 *cis*-element 序列。

^e 表示該 *cis*-element 在啟動子區域出現次數。

^f 表示該 *cis*-element 在啟動子之位置，以 ATG 往前推算起，如: ATG 往前推 1bp 即為 -1。

表二、比對 *SIZFP* 基因在阿拉伯芥中之同源基因及其胺基酸序列分析。

Tomato	Arabidopsis ortholog ^a	Identity ^b (a.a.)	Similarity ^c (a.a.)
<i>SIZFP</i> (TC122455)	<i>At5g24870</i>	34.3%	44.5%
	<i>At5g10650</i>	37.8%	44.8%
	<i>At4g31450</i>	40.4%	48%

^a 番茄 *SIZFP* 基因在阿拉伯芥中所對應之 ortholog。

^b 胺基酸序列 identity 的相同程度。

^c 胺基酸序列 similarity 的相似程度。



表三、阿拉伯芥同源基因於生物/非生物逆境及特定條件下之表現分析。

Conditions	<i>Arabidopsis</i> ortholog of <i>SIZFP</i>		
	<i>At5g24870</i>	<i>At5g10650</i>	<i>At4g31450</i>
Biotic stress			
<i>Bemisia tabaci</i> type B	2.67	2.34	---
<i>Pseudomonas syringae</i>	2.28	2.74	---
Cabbage leaf curl virus	2.12	7.2	---
<i>Phytophthora parasitica</i>	-2	---	---
Pathogen elicitor			
Flg22	-3.7	-2.44	---
HrpZ	-2.32	---	---
NAA+Flg22	---	-2.56	---
Abiotic stress			
Drought	7.38	2.59	---
Cold	-3.3	-3.33	-2.56
Heat	-2.3	---	---
Iron deficiency(LZ2)	-2.9	-2.22	---
Low CO ₂	3.9	2.12	---
Hypoxia	-2.4	---	---
Light	-2.32	-2.08	---
Glucose	-2.1	---	---
Osmotic	---	3.58	---
night extension	---	2.82	---
genotoxic	---	2.05	---
decapitation	---	-2.78	---
nitrate (0mM)/sucrose (30mM)	---	-2.63	---
nitrate (0mM)/sucrose (90mM)	---	-2.17	-2.22
nitrate (45mM)/sucrose (90mM)	---	-2.13	---
Chemical			
KNO ₃	2.24	4.54	---
2,4-D	2.2	---	---
Fe	-3.7	---	-4
AgNO ₃	---	---	- 2.04
Cycloheximide (CHX)	-2.2	---	---
Hormones			
Salicylic acid (SA)	2.07	---	---
IAA	2.04	---	---

續表三、阿拉伯芥同源基因於生物/非生物逆境及特定條件下之表現分析。

Conditions	<i>Arabidopsis</i> ortholog of <i>SIZFP</i>		
	<i>At5g24870</i>	<i>At5g10650</i>	<i>At4g31450</i>
Mutation/Overexpression			
<i>dor</i>	5.94	2.06	---
<i>35S::amir-white-2(MIR172a)</i>	4.65	2.98	---
<i>agl65/66/104</i>	3.64	---	---
<i>pvip1 pvip2</i>	3.55	3.87	---
<i>mkk1/mkk2</i>	2.51	4.08	---
<i>agl66/104</i>	2.44	---	---
<i>csn3-1</i>	2.29	2.95	---
<i>csn4-1</i>	---	2.26	---
<i>vip6</i>	2.23	---	---
<i>nudt7-1 sid2-1</i>	2.23	---	---
<i>psae1-3/stn7-1</i>	2.16	-2.13	---
<i>csn5 (csn5a-2 csn5b)</i>	2.13	2.43	---
<i>pmr5:pmr6</i>	2.08	2.07	---
<i>aoxla (sai1)</i>	-3	-2.27	---
<i>cngc1-3</i>	-2.86	-2.13	---
<i>myb50</i>	-2.22	---	---
<i>35S-AtMTB44</i>	-2.22	-2.04	---
<i>cpr5</i>	---	2.03	---
<i>cpr5:scv1</i>	---	2.67	---
<i>ARP22-ox</i>	---	2.24	---
<i>ARP21 Cox</i>	---	---	2.45
<i>gh3.5-1D</i>	---	2.24	---
<i>psad1-1</i>	---	---	-2.08
<i>det3</i>	---	---	-2.5

—：表示與對照組比較後表現量下降倍數，如：-2.0 即相較對照組下降 2.0 倍。

---：表示該基因在此條件下其表現量未受調控兩倍以上，故不予採記。

表四、分析番茄 *SIEAS* 基因其上游 3000 bp 啟動子區域之 putative *cis*-elements。

Function ^a	Description ^b	<i>cis</i> -elements ^c	Sequence ^d	No ^e	Position ^f	
Biotic stresses	Defense and stress	TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	2	-70, -85	
Abiotic stresses	Heat	HSE	AGAAAATTCG	2	-720, -1974	
	Anaerobic induction	ARE	TGGTTT	2	-1420, -2681	
Development	Endosperm expression	GCN4- motif	CAAGCCA	2	-1368, -1930	
	Meristem expression	CAT-box	GCCACT	1	-172	
	Circadian control	Circadian	CAANNNNATC	1	-2062	
	Light response	3-AF1 binding site		AAGAGATATTT	1	-2420
		I-box, LAMP-element		CATATCCAAT	1,1	-1553, -1936
		G-BOX, GT1-motif		TACGTG,	1,3	-736, -1407, -2845, -2380
		Box 4		ATTAAT	8	-1482, -940, -1097, -914, -2574, -1775, -2561, -1760
Hormones	SA response	TCA-element	GAGAAGAATA	4	-1197, -262, -841, -1838	
	Me-JA response	TGACG-motif	TGACG	1	-2617	
Other	Associated TGAGTCA	ATGCAAAT-motif	ATACAAAT	1	-1157	
	MYB binding site	MBS	TAACTG	2	-1268, -2347	

^a 表示功能分類。

^b 表示作用反應。

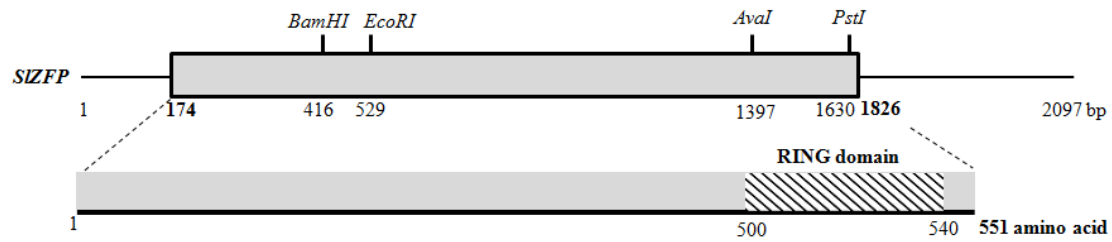
^c 表示該 *cis*-element 名稱。

^d 表示該 *cis*-element 序列。

^e 表示該 *cis*-element 在啟動子區域出現次數。

^f 表示該 *cis*-element 在啟動子之位置，以 ATG 往前推算起，如: ATG 往前推 1bp 即為 -1。

(A)



(B)

<i>SIZFP</i>	MD E Y P V K R A G N G L V A A R R G L R D T A E N K D K N . . . V Q Y C S R L G C S G R V N Y T K S T R V G G M E K P R P L R P T F G S S N G K E V V G S S S . V
<i>V. vinifera</i>	M D E Y S G K R A I N E L V V S R K S S G L R P G V I I R D T A N N R D R N . . . A Q F C N R L G C R G R L N S M K G T Q L G S L E K P K S S R P S S F T S S S G K E I I G S S S . .
<i>R. communis</i>	M D E Y S G K R A G D G L A V S R K S S I I L R D T A N N R D R N . . . A Q F C N R I G C S G R L N S A K G T Q I S C S E K A K S S R P S F R S S T N G K E I I G S S S . R
<i>P. trichocarpa</i>	M D D Y S G K R A G D R F I V S R K S P H V L R D T A N N R D Q K . . . A Q F C N R I G C S G R L N S S R K T Q I S . . . S E R A K S S R P R P L I S S S S S G K E A N G S S S N R
<i>At5g10650</i>	M D G C A G K R S V D R L V V P R K A S G L T I R E N N K T D Q K . . . N V P F C S R V G C T A K V T S T K R S R I G S T D N N T K V G L P P V P S T L N R K E I V G S S S . R
<i>At5g24870</i>	M D G F R G K R . T S R P I M P R E A S G L V L H E N M K K M D D K S V V P I C S R I G C S S R V S S T K G D L I D H K A K A T V S S F R S P L S G K E I V G S S S . R
<i>O. sativa</i>	M E D S G R S I S T T G F L R R P S S V S L K D Q G N E E R F N K T L N . . . P M N A R W A D S K E K P R Y L R E P F R S S G T K A A C P S S S K A P V R K Y F E E K G E T F L G E A D N J
<i>At4g31450</i>	M D R W S S K R A M E A R P D S S R K G G V V F R D R F N S N S C K . . . V P I C S D E K K S M N F T R . . . F V G S S D K E K S V L S T Y R S S P N G K E V I G T S S K I

<i>SIZFP</i>	M T T A R R S G K E S . H K Y S S V I E D K R S D T S S L R K E S Q V L K Q M Q S S T E R Q F Q F D S A K R D T G S S . K V V F T E V G C S S G T S N S R P R K I F G H G P G S S N Q K S P A
<i>V. vinifera</i>	G P S V R K S L Q T P . R K L S A H L E T D S S E T S S V P D E S E V L E L I P P P G K I Q R G H H P K A D D T E S S . E I I T P M E V G S S S I A S N T R P R R N F H Q K S G F T N Q A T L M
<i>R. communis</i>	T N N S R K S L P G P . R K L S S P E R D S S E T G G S P D D N E V P E L V S P P G K I Q K G L H S E D D S G S S . E N T S M E V G T S S I S N . T R S R K G I H R K A G F G K P D T S I
<i>P. trichocarpa</i>	I S K P R N S L Q E P . R K F S S S L E S S L E T G S G Q D E V T P P S G R I K L D L R P E T D G A A S S . D I T S M E A G S S F I S K S T R S H W N F H Q K S G L V N P E T V V
<i>At5g10650</i>	F G Y L R K P A K V T A R R Q P S S S L D T E S S E T S C I H D D P A A T E P T L P R Q T K R V T I N V H P Q S A V S R E V V I T A G S S S R G T S R I S H P K S E L G T R D A L I
<i>At5g24870</i>	F G G T K K A S K V I G R Q L S S L L D M D S S E S S V N E D S P T S R S L P R G K T K E S T I S V H S E S V S G E V V T . E A G S S S R G T G R S I H Q R P D L V S R D A R V
<i>O. sativa</i>	R T E A N R L Q C S . R K A V V E D V H P Y G Q Q D E P E D L L S T T T E D Q P A E L D P E L L D S S V S S G V S A H A I G S V V R N A A L R S K S R Q Q K G K E L C Q I R P Q T A S J
<i>At4g31450</i>	S S S V S G E R P P F S I A I D S S E S S R G S E D E V E S E I L Q V P L G R D K R R M N N K L I Y G K V I T P A E C S K L P S S S R I K R G F R Q R F G L S K Q E F H I

<i>SIZFP</i>	S S S S S I S A G T R S S S S G E G Y R L R N L K C N S T P D V L P Y S S S S S E S S I S R R . E T V K R N T H G E S S S S S K C K M S G A S P N E G R A V R P . A T G I
<i>V. vinifera</i>	A L A S K T A G Q V A R H G A N A S Y T G L R N L R C N S I S D A M P S . C S S E S E N L T R K K D I G R H R L S E T E S S S S A R C A K S G G P S S E Y G R N S I S . S Y G I
<i>R. communis</i>	S L L S A N T S Q A A R A G A G R Y G L R N L R C S I S D A V S T G S S T S D S K L T R Q K D T I R R I C G G E S S S S A R G A K I S G S S L E . G R N I S S . S S G I
<i>P. trichocarpa</i>	S L A S S T I Q G T R L N A S R F G H R N L R C N T V S D S S S S G S S S D L N L S R R K D T F N R R I C D G E S S S F A R G A R M I G S S L E . G R S S S S . N S G I
<i>At5g10650</i>	S T S S N S E H T V R G G L S R H R L R N L S C N S V S D V L P T N S N S A T K I S V T R K N A D G E S S S S K G S K T S V L V P K V R N Q I S S H G N G V
<i>At5g24870</i> N S E Q N A R A S V N K N G L R D L R N S S C S D V L P N S T P T R K S N I F R H T S D G E S S S S S R G N K T E G S V V G G K I S S P Q G N G I
<i>O. sativa</i>	S T I P R N S T N G V K S S N A A G P G V Q R T L R N L G C T S I S D V L P S G C S S A N S I H N K R A E V M R N R A F D G E S S S S R P R G L N G H S S L G H S P A M Y S G I T G P R V R T J
<i>At4g31450</i> S G Q S T S A N R G C S P L L S G V I P S G F L D K R L S R K A D T I S K T K V Y G E S S S S S A R G K N V T E P P P V E R R R S F N P R G S

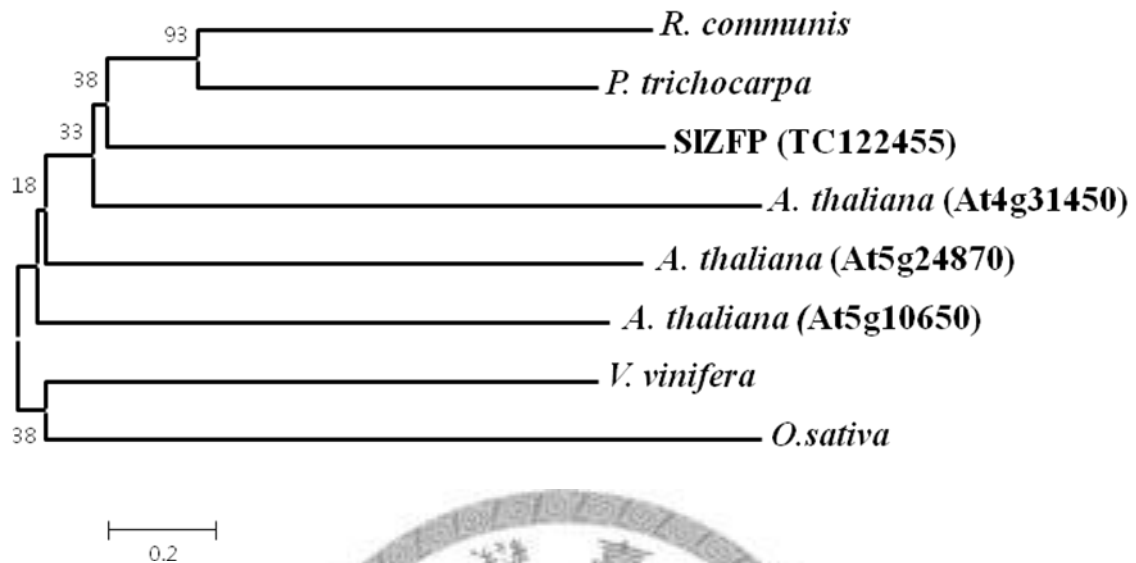
<i>SIZFP</i>	S R S S R S S D F S D G N R A V S V R T R S M N . V S T R L R G P V Q D S L H T K S S G L S Q N L P E H G T P N L D M P S S S S Q L F M D S S S S D Y S T Y S L P A N D Y D D D D E D E D E I
<i>V. vinifera</i>	S R R S R N W T P S R D N G V A S V R T R S I N G N T S R P S S S N Q G I R N N L L P T E P S I T I P Q M P Q P E I S I G A N D P S L S H Q F S I G S . P S S F L N S Y S Q S D S S S
<i>R. communis</i>	S R R T R N G T S S R D N G P A S V R T P S F G Y T R S R A A N Q G R G N N L P P N E P . H V I P Q M S Q P I M P I N S N S P S S S H Q F S L G S . P L S R S R A T G L P S S T N
<i>P. trichocarpa</i>	S R R A R T G T L N R D S S A A S I G S R R P L S G . Y T R A R V A N Q S G N N L S A N E I P L T S Q P D M S L D L N A P S S S H H F S V E A . S L G R P S S Y S R P G S S N
<i>At5g10650</i>	N R R N R V V P S I R D S S T V V S N G C R A G Y F G R S E L L G A T A S S A T S R Q M P H P T T P T D P . N P S L S F C P S N I Y S S T
<i>At5g24870</i>	I R R N R N L P S V R D N S V V S S T R S T G Y Y G R T G R A G A V A T L Q A P R P P T R A D L . N P S R S A E A S R S P L N S Y S R P I S S N
<i>O. sativa</i>	S Q Q R T S S R S I Q E S A D S S R I R P S T Q H A R V R V P N E E D S V F A L R E T L A R D R Q P E W A H F S L G E A A P R S M R P F S M E L P . H E I Y S S S R Q G S S N Q I
<i>At4g31450</i>	S R R A R H C I L D D D N D V A S V G S Q R L A N R N N S R I R I G S G R D G L S S V T A A E M S Q T E T S N N L N S P V S L E L F S G F P

<i>SIZFP</i>	G . V V P F T S A E I C I N G N N R E A L Q R Y N M D G I A Q V L L A L E R I E Q D E E L S Y E R L L A L E S N L F L S G L N . F H D Q H R D M R L D I D N M S Y E L L A L E E R I G S V
<i>V. vinifera</i>	S . I M P I S P T E V G I S R S S N R D S L R R Y N M D G I A E V L L A L E R I E Q D E E L T Y E Q L L V L E T N L F L G G L S . F H D Q H R E M R L D I D N M S Y E L L A L E E K N G V
<i>R. communis</i>	G . I R P S S P A E V G N I R S A Y N N E S F R R Y N M D G I A E V L L A L E R I E D E E L S Y E Q L L V L E T S M F L N G L N . F H D Q H R D M R L D I D N M S Y E L L A L E E R M G N V
<i>P. trichocarpa</i>	G . I R P S S P . E V S N A Q S L N R E S F Q R Y N M G I A E V L L A L E R I E Q D E E L T Y E Q L L V L E T S L V L N G L N . F H D Q H R D M R L D I D N M S Y E L L A L E E R M G N V
<i>At5g10650</i>	S . N M P C S P T E A D P S S L N R D G L S H Y N M G I A E V L L A L E R I E D E E L T Y E Q L A S I E T N L F S G M F R F H D Q H R D M R L D I D N M S Y E L L A L E E D K M G H V
<i>At5g24870</i>	S L M M P G S P S E A G L S R S L N R D T F R R Y N M G I A E V L L A L E R I E Q D E E L T Y E Q L A V L E T N L F L N G M S S F H D Q H R D M R L D I D N M S Y E L L A L E E K N G V
<i>O. sativa</i>	S S Y R P D E S P F Q M F H G L L V E R E N Y R R I N M E G I A E V L L A L E R I E Q D E L T Y E Q L L V L E T N L F L S G L G . L H D Q H R D M R L D I D N M S Y E L L A L E E R I G S V
<i>At4g31450</i> F G L S G S L L S H D S F R S Y N L D G I S E L L P E L D R I E Q D E L N Y E D L L V L E T S L L S G L S . F H D Q H R D M R L D I D N M S Y E L L A L E E R I G V

<i>SIZFP</i>	F E E L L K C L R N T Y T G M A S E T E T L E A D E D G D D I K C S I C Q E E Y I G D E I G N L S C E H S Y H V E C I K Q W F K L K N W C P I C K A A V E S S K P T S . . .
<i>V. vinifera</i>	T E E A L S K C L E R S I Y H T L P T E P G T M D C A G D G D D I K C S I C Q E E Y I V G D E I G N L S C E H S Y H V A C I H Q W L R L R K N W C P I C K A A A L
<i>R. communis</i>	T E E A L S E C L K T S I F Q S A S L E A S S D L C G E R D D I K C S I C Q E E Y I V G D E I G N L S C E H S Y H V A C V Q W L R L R K N W C P I C K A S A A P S T T S P P L S P N Q
<i>P. trichocarpa</i>	T E E A L S E C L K T S I Y H T S P M E D A T A N L E G D R D D I K C S I C Q E E Y I V G D E I G N L S C E H S Y H S C I H Q W L S L R K N W C P I C K A S V A P S P S S . . .
<i>At5g10650</i>	S E E A L S R S L Q S I Y R . E T D E T G S I S L Y K D . D D I K C S I C Q E E Y I V G D E I G T I P C H H Y H V S C V Q W L R L R K N W C P I C K T S A E E E K S I
<i>At5g24870</i>	S E E A L L K S L K S S I Y R . P N D E S D D I C L N K D . D D I K C S I C Q E E Y I V G D E I G T I P C H H Y H V S C A Q W L R L R K N W C P I C K T S A E S Q P H P F S . . .
<i>O. sativa</i>	S D E L L V K C L R N T Y T K L P N S D L E A N R A V L D D A K C S I C Q E E Y I E G E I G R M Q C E H S Y H V S C I H E W L R L R K N W C P I C K T S A I P S E M D R G G T
<i>At4g31450</i>	T E E A R S K C L K T S I Y H M P L S Y G S I T K P S P D N K E D A K C S I C Q E E Y I G D E I G R L S C E H S Y H V R C V Q W L R L R K S W C P I C K A T A E T S S K

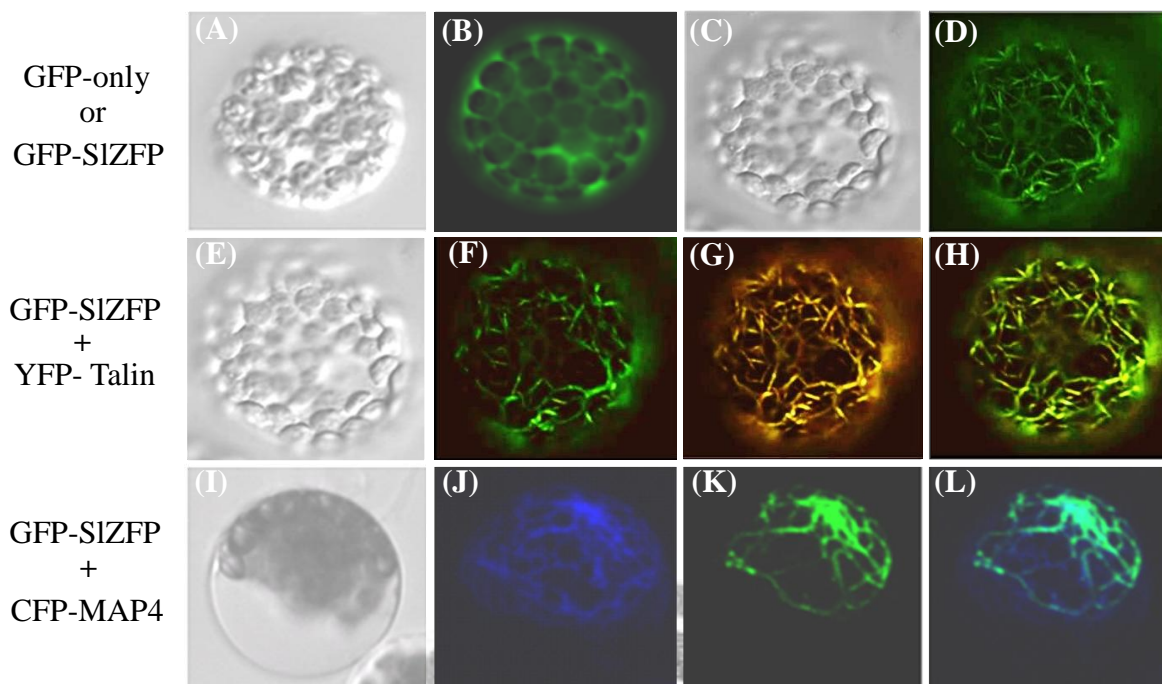
C3HC4-RING domain

(C)



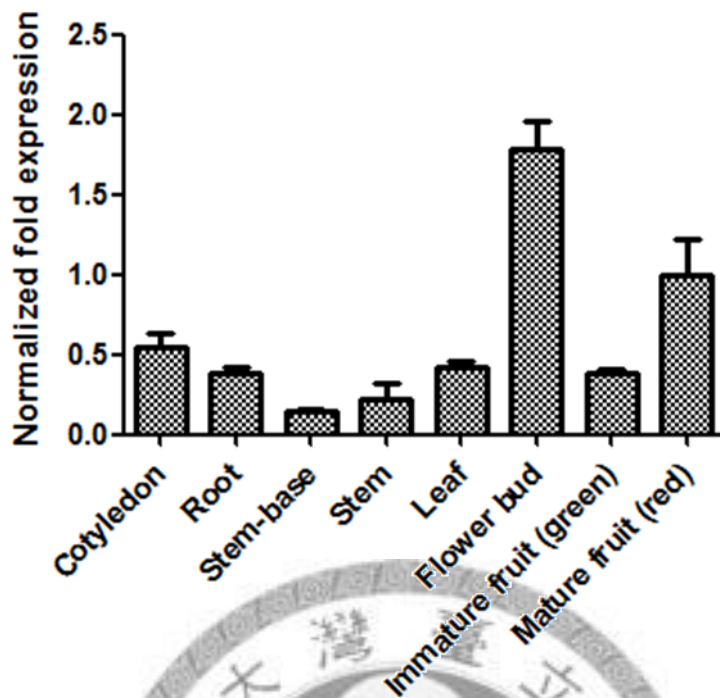
圖一、*SIZFP* 基因全長序列、組成結構、與序列比對分析。

(A) 黑色線條為登錄於 Tomato expression database 網站的基因 (TC122455) 的基因序列，為 2,097 bp，灰框區則表示全長轉譯區，為 1,653 bp，轉譯出 551 個胺基酸，其中於 500–540 個胺基酸具有 RING domain，序列下方標註對應之核苷酸與胺基酸數目。(B) 將 *SIZFP* 序列於 NCBI GenBank 資料庫比對相似之蛋白質序列，及結果可描繪出較保守之功能區 (黑色) 及較不保守的功能區 (灰色)。(C) 利用 MEGA4.0 程式進行 neighbor-joining 演化樹分析，比較 *SIZFP* 與其它物種間之親緣關係。數值代表 Bootstrap 運算結果，數值越小表示序列相似度越小，樹狀直線距離越長則代表序列之間的歧異度越大。*Vitis vinifera*: 葡萄；*Ricinus communis*: 蓖麻；*Populus Trichocarpa*: 白楊樹；*Oryza sativa*: 水稻；*Arabidopsis thaliana*: 阿拉伯芥。



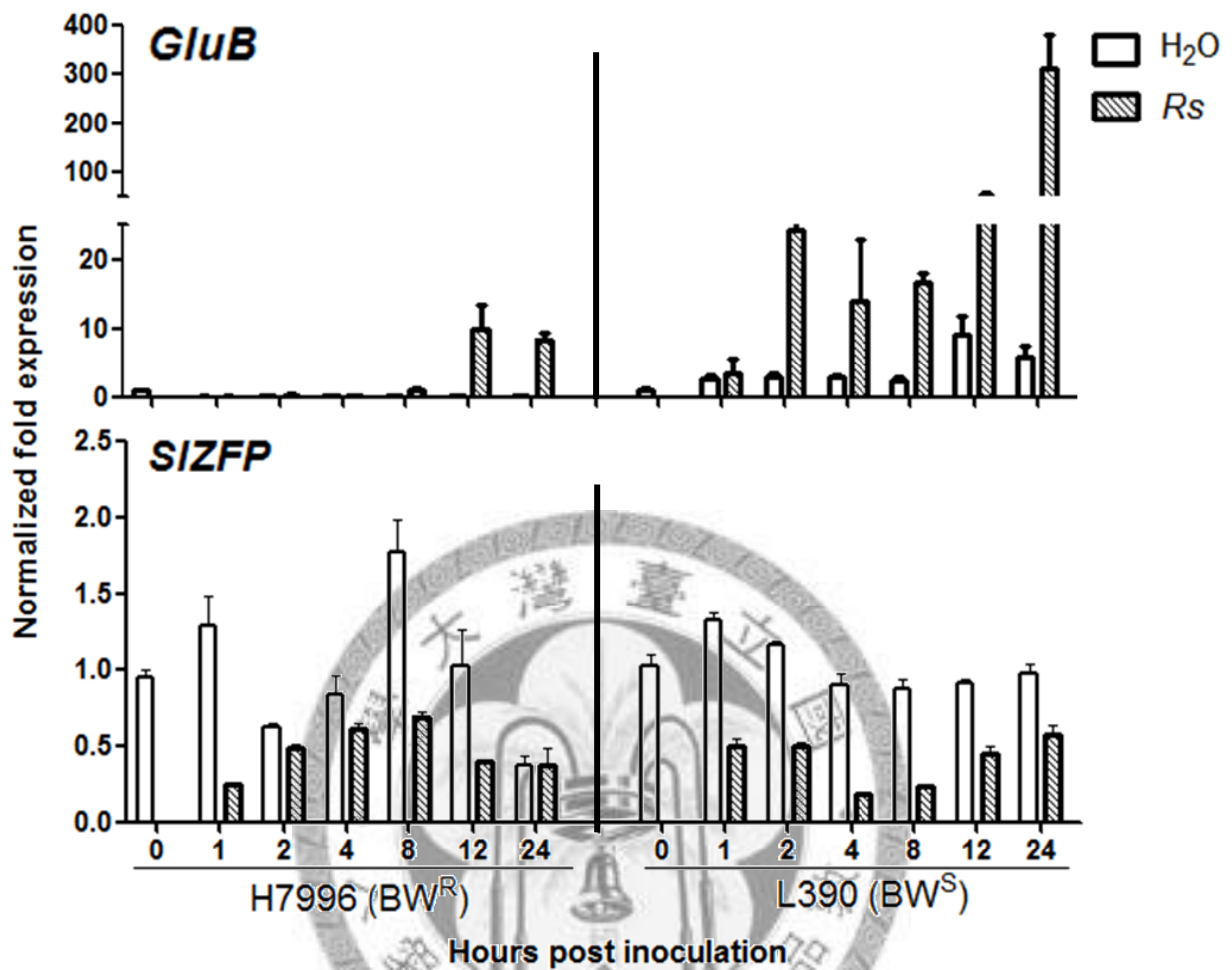
圖二、SIZFP 蛋白質細胞中表現位置。

(A)(B) GFP- p2FGW7 白光下及激發光源下之影像。(C)(D) GFP-SIZFP 白光下及激發光源下之影像。(E)-(H) 同時表現 GFP-SIZFP 與 YFP-Talin 白光下及激發光源下之影像。(I)-(L) 同時表現 GFP-SIZFP 與 CFP-MAP4 白光下及激發光源下之影像。本實驗三次重複結果一致，呈現完整重要具代表性的一次結果。



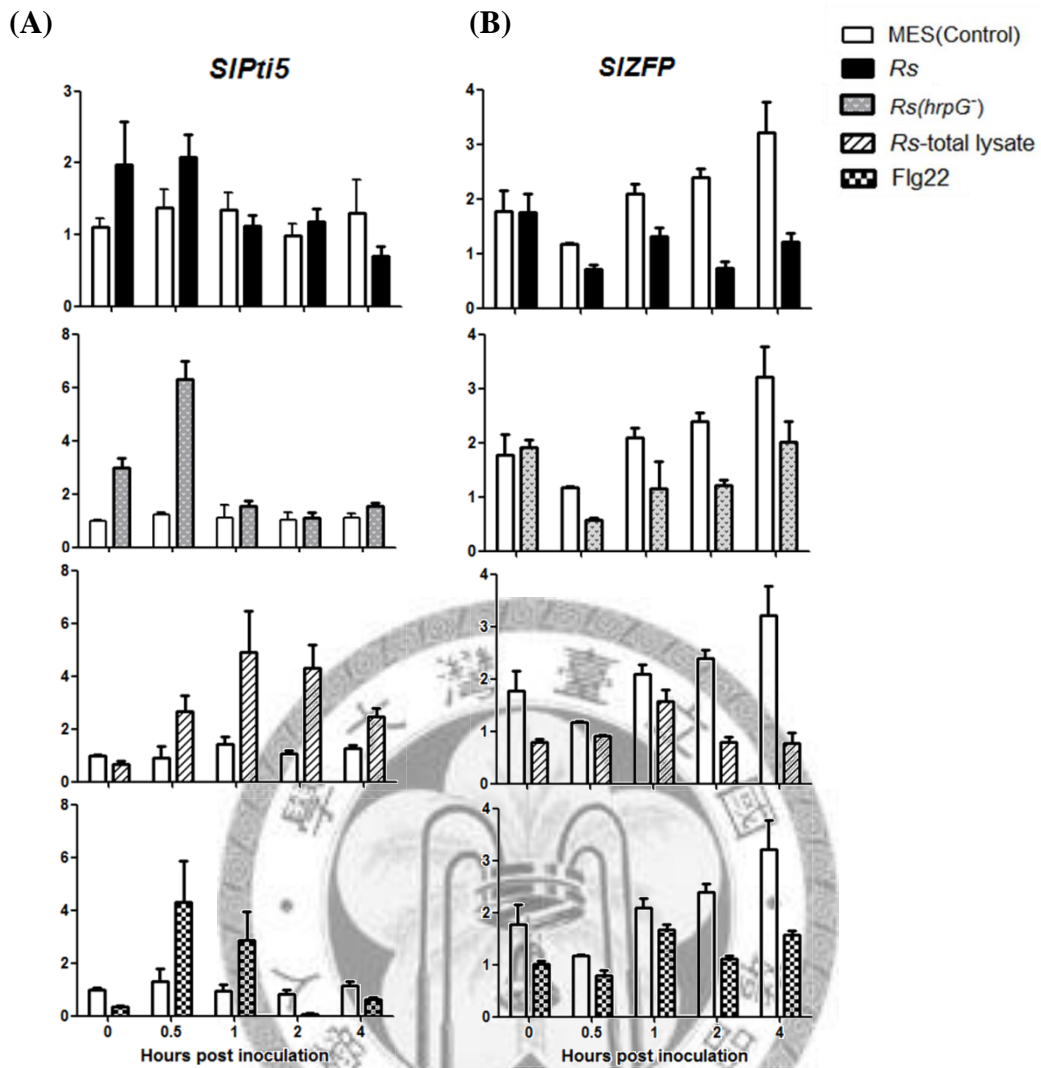
圖三、*SIZFP* 基因於抗病品系番茄 (H7996) 各組織中之表現情況。

收取的組織為生長 7 天大的子葉 (Cotyledon)、3 個禮拜成熟植株的根 (Root)、莖基部 (Stem-base)、莖 (Stem)、真葉 (Leaf)、6 個禮拜尚未開花之花苞 (Flower buds) 以及生殖生長階段的果實包含 8 個禮拜未成熟的綠果 (immature green fruit) 以及 3 個月成熟的紅果 (mature red fruit)。抽取 RNA 反轉錄為 cDNA 進行檢測。Real-time PCR internal control 為 *elongation factor 1a* (*EF1a*)，各個時間點 *SIZFP* 其表現量以 *EF1a* 為基準，計算成標準化之表現量後進行比較。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示各個組織之部位，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗進行兩次，實驗結果一致，故呈現具代表性一次結果。



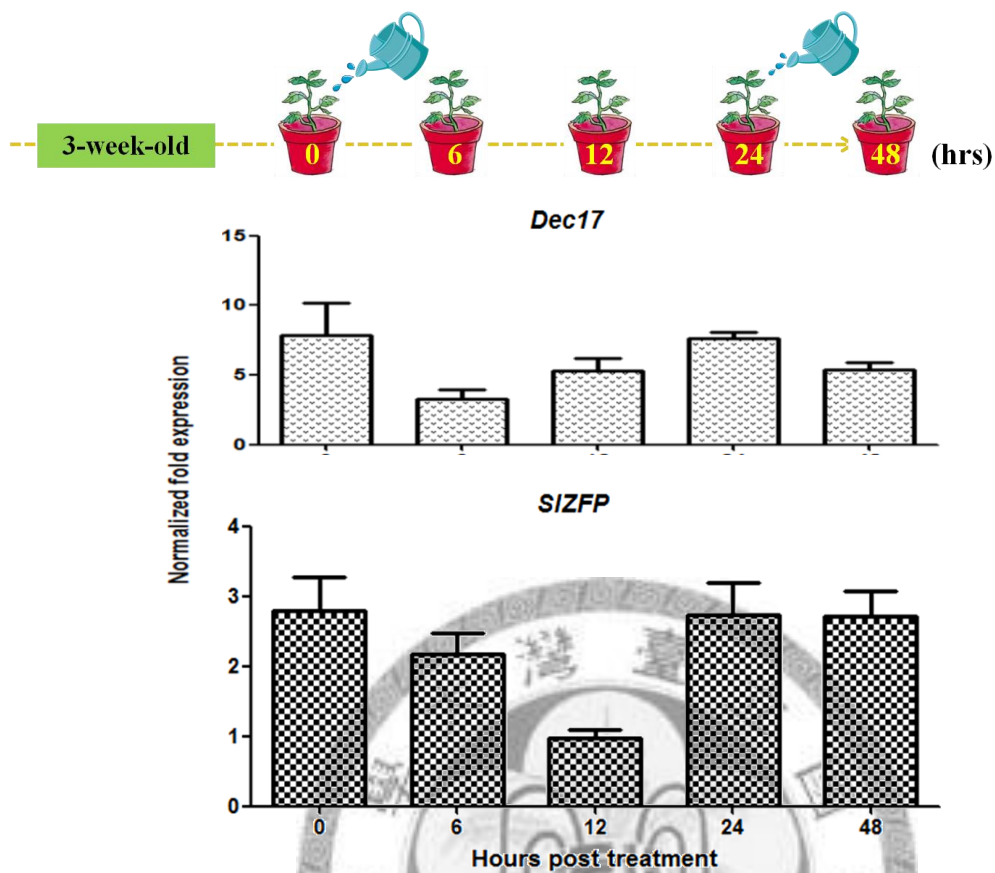
圖四、*SIZFP* 基因於抗病/感病蕃茄品系葉部接種青枯病菌後之表現情況。

將三週大番茄抗病品系與感病品系同步以接種青枯病菌，於 0、1、2、4、8、24 小時各個時間點隨機收取兩棵植物的葉部組織進行基因表現分析。各個時間點其基因表現以 *elongation factor 1a* (*EF1a*) 作為 internal control 並予以標準化分析。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示處理青枯病菌後之各個時間點，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗進行三次，實驗結果一致，故呈現具代表性一次結果。



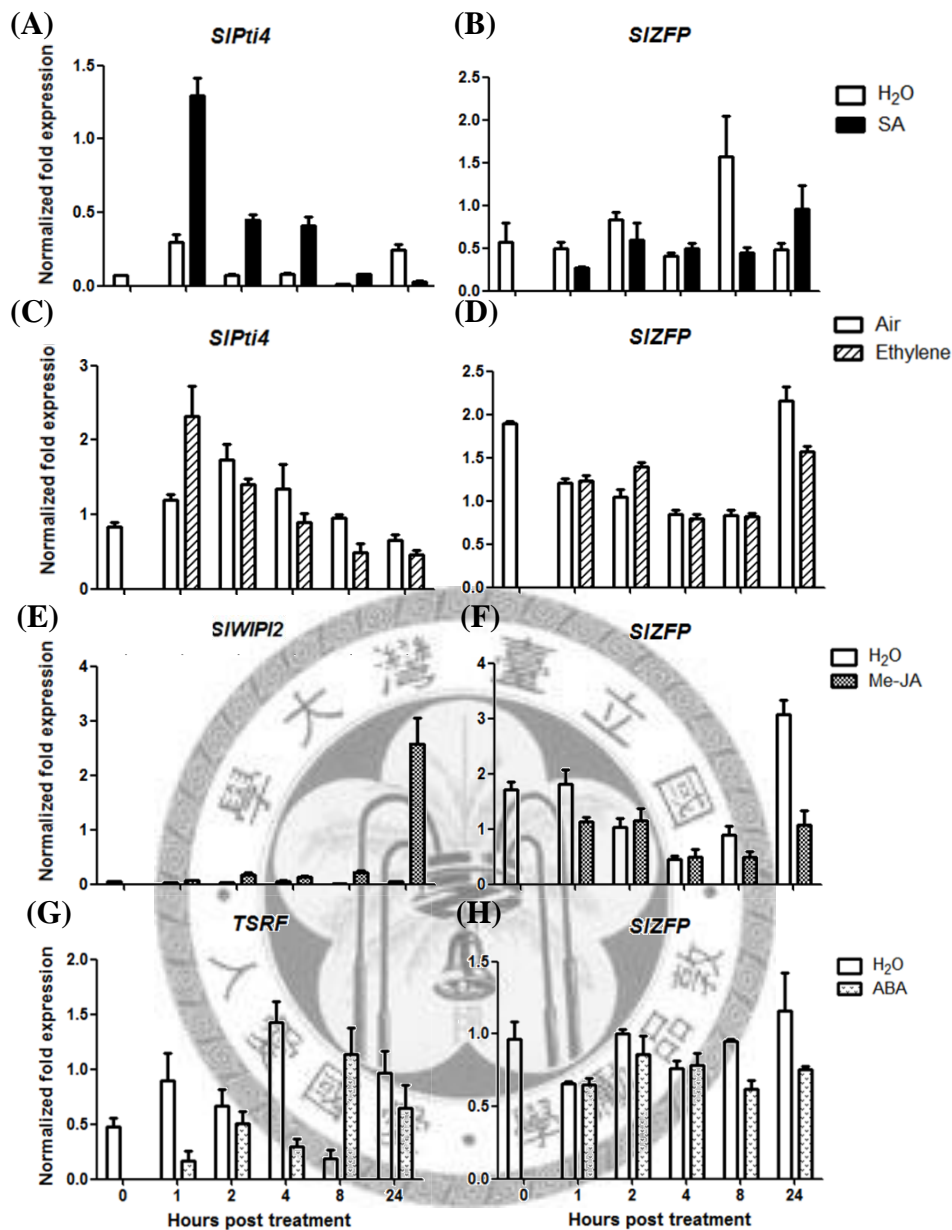
圖五、*SIZFP* 基因於抗病番茄 (H7996) 葉部接種 PAMPs 後 RNA 表現情形。

(A,B) 分別為標誌基因 (marker gene) *SIPti5* 與 *SIZFP* 基因之表現情形。*SIZFP* 基因表現以 *elongation factor 1a (EF1a)* 作為 internal control 並予以標準化分析。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示處理 PAMPs 後之各個時間點，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗進行三次，實驗結果一致，故呈現具代表性一次結果。



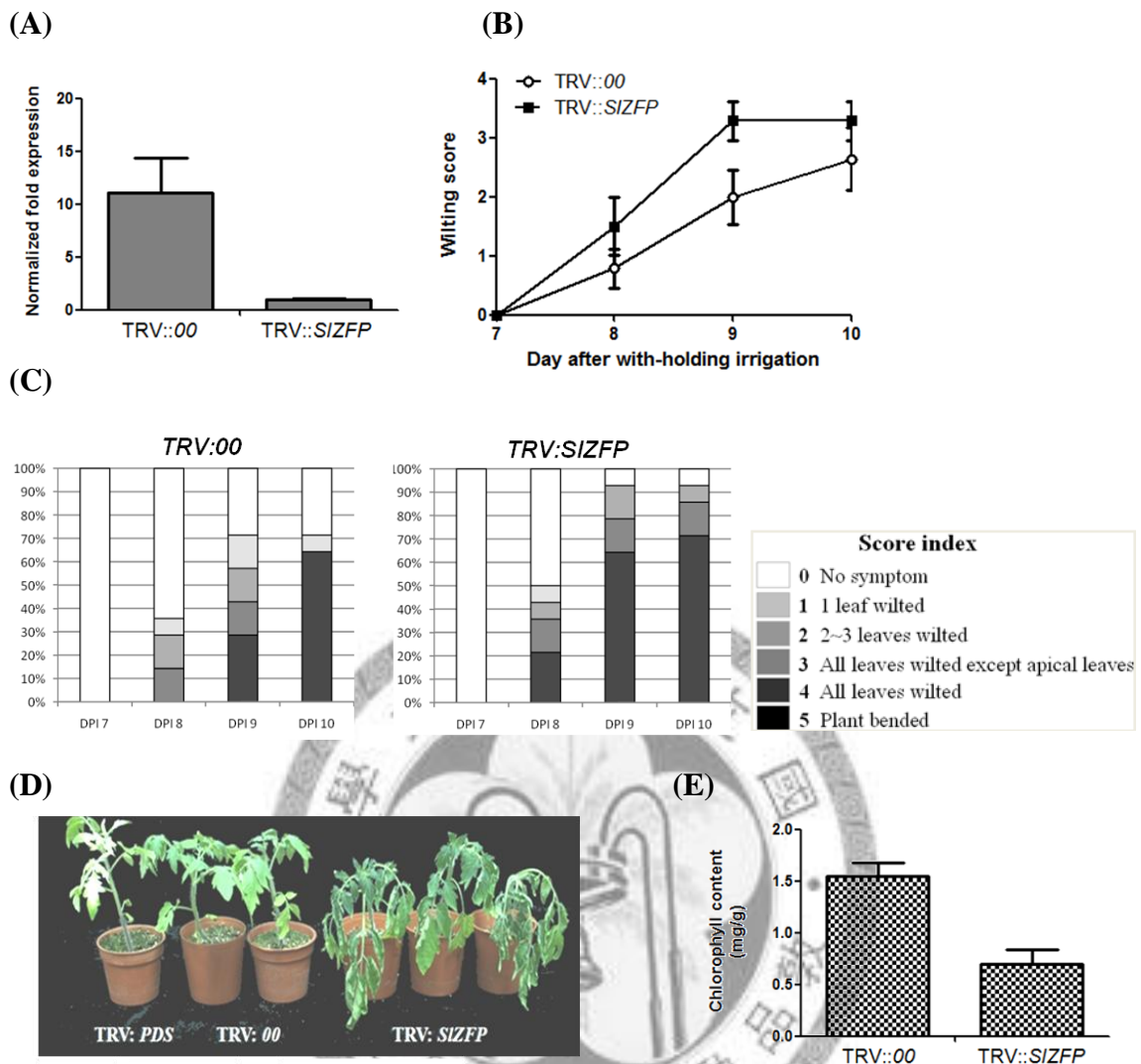
圖六、*SIZFP* 基因於抗病品系番茄 (H7996) 處理乾旱及復水後之表現情形。

將三周大番茄進行乾旱處理，如圖上方所示分別施以乾旱及回水 (re-water)，分別收取 0、6、12、24 及 48 小時等五個時間點的莖基部組織進行基因檢測。*SIZFP* 基因表現以 *elongation factor 1a (EF1a)* 作為 internal control 並予以標準化分析。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示收取樣品後之各時間點，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗為其中一次結果。



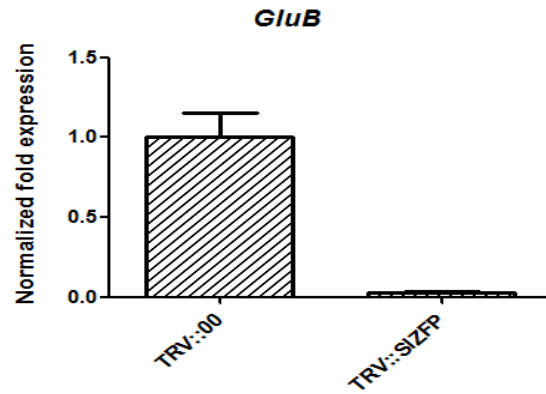
圖七、*SIZFP* 基因於抗病品系番茄 (H7996) 處理荷爾蒙後之表現情形。

番茄處理各式植物荷爾蒙後，於 0、1、2、4、8、24 小時各個時間點隨機收取兩棵植物的葉部組織進行檢測。(A, C, E, G) 分別為處理水楊酸、乙烯、甲基茉莉酸及離層酸後標誌基因 (marker genes) 之表現情形。(B, D, F, H) 為 *SIZFP* 基因之表現情形。各個時間點之基因表現以 *elongation factor 1a (EF1a)* 作為 internal control 並予以標準化分析。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示處理荷爾蒙後之各時間點，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗進行三次，實驗結果一致，故呈現具代表性一次結果。



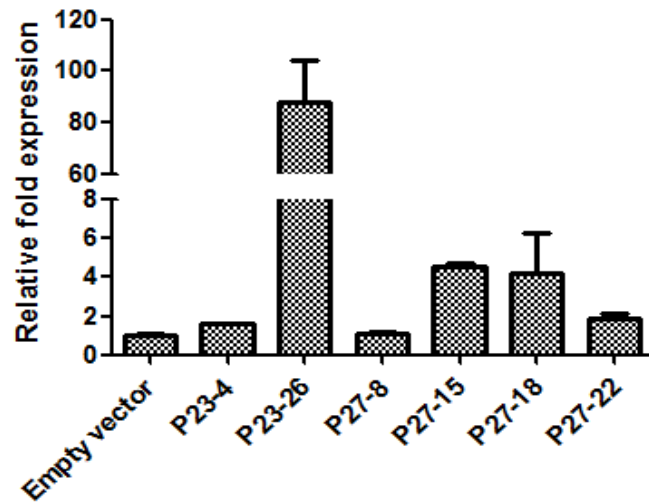
圖八、在抗病品系番茄 (H7996) VIGS 番茄 *SIZFP* 基因進行乾旱測試。

利用番茄七天大的子葉注射帶有 pTRV1 及 pTRV2-*SIZFP*、pTRV2-*PDS* (VIGS 效率之對照組) 或 pTRV2-00 (空載體) 之農桿菌後十天後，進行乾旱斷水測試。(A) qRT-PCR 檢測 *SIZFP* 基因之靜默效率。(B) VIGS 番茄 *SIZFP* 乾旱處理萎凋折線圖示意圖。(C) 乾旱處理後其第七天至第十天乾旱萎凋級數百分比堆疊示意圖。(D) 乾旱處理第十天其外表型性狀觀察。(E) VIGS 番茄 *SIZFP* 進行乾旱處理後之葉綠素含量。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗進行三次，實驗結果一致，故呈現具代表性一次結果。



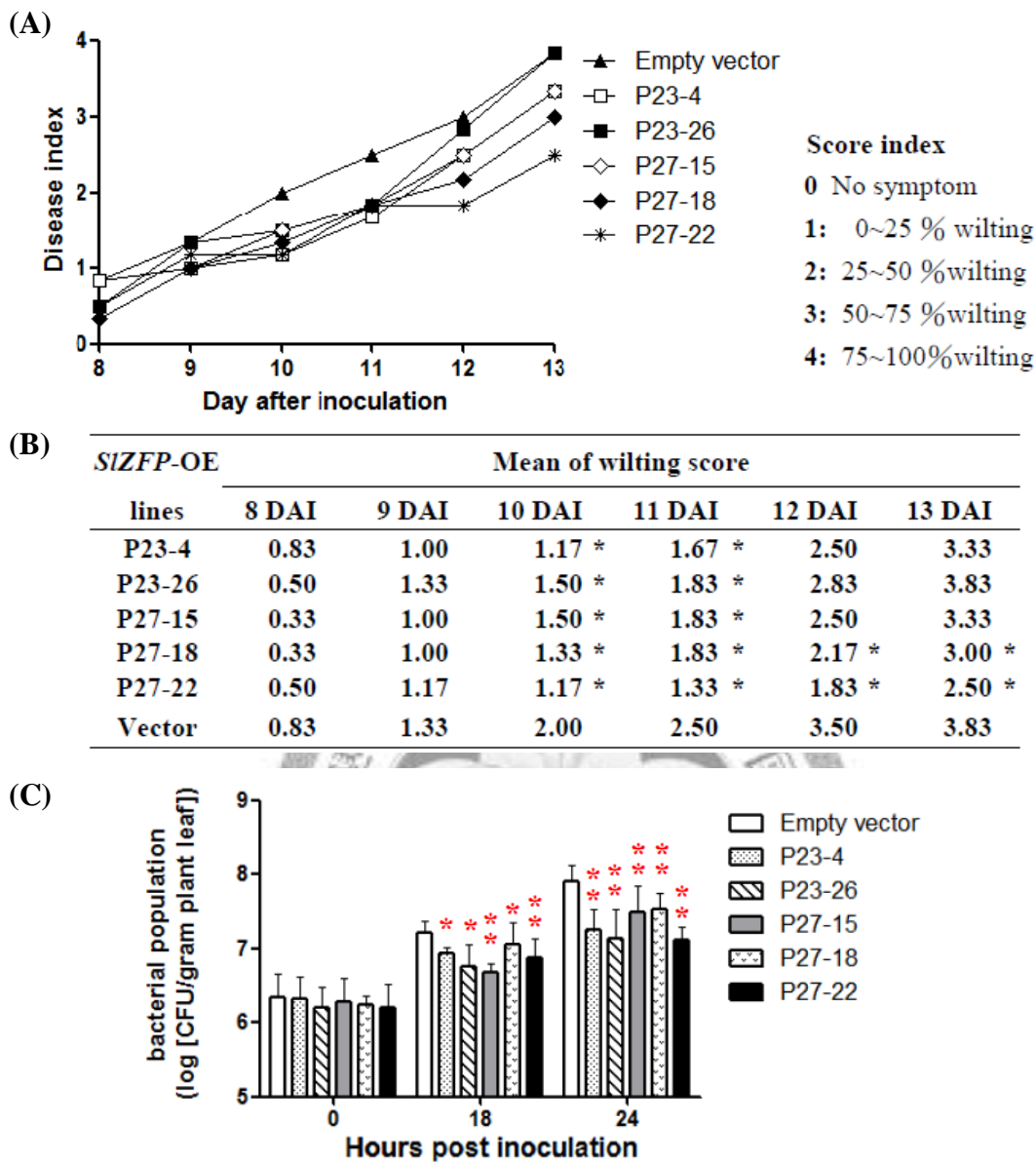
圖九、抗病番茄 (H7996) VIGS 番茄 *SIZFP* 基因後檢測 *GluB* 基因表現情形。利用 VIGS 技術於 抗青枯病品系 H7996 短暫靜默 *SIZFP* 基因後，收取其莖基部組織，抽取 RNA 後反轉錄為 cDNA，以 Real-time PCR 檢測受水楊酸及乙烯調控之下游基因其 *GluB* 基因表現量。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗進行兩次，實驗結果一致，故呈現具代表性一次結果。





圖十、過量表現 *SIZFP* 之轉基因菸草表現量分析。

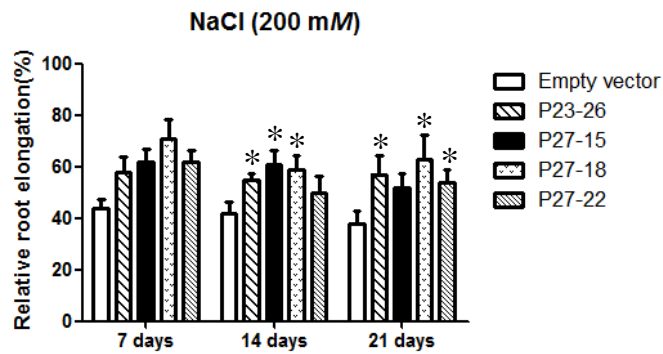
抽取各個菸草轉殖獨立系 (independent lines) 三週大葉片之 RNA，並反轉錄為 cDNA。Real-time PCR 分析以 *elongation factor 1a* (*EF1a*) 作為 internal control 並予以標準化。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示不同轉殖系編號，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。本實驗重複 2 次，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性的一次結果。



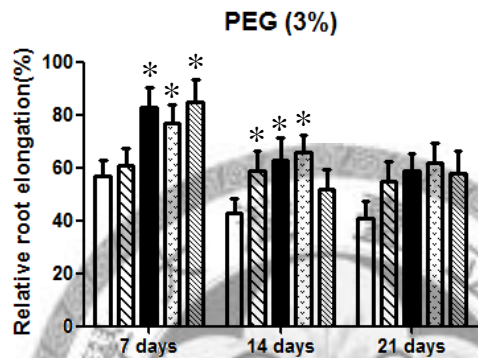
圖十一、過量表現 *SIZFP* 之轉基因菸草植物感染青枯病菌之抗病測試。

(A,B) 為帶有空載體或番茄 *SIZFP* 之四周大轉殖植物經過根部澆灌青枯病菌後之萎凋出現狀況與統計分析結果。(C) 為帶有空載體或番茄 *SIZFP* 之四周大轉殖植物經過葉部注射青枯病菌後，病菌在葉中之增生情況與統計分析結果。* 與 * 分別表示 student's *t*-test 分析後其 *p*-value 小於 0.05 與 0.01。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。每次實驗植物數量為 12 棵，共重複 2 次，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。

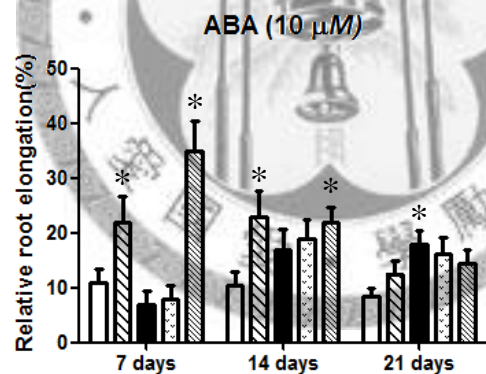
(A)



(B)

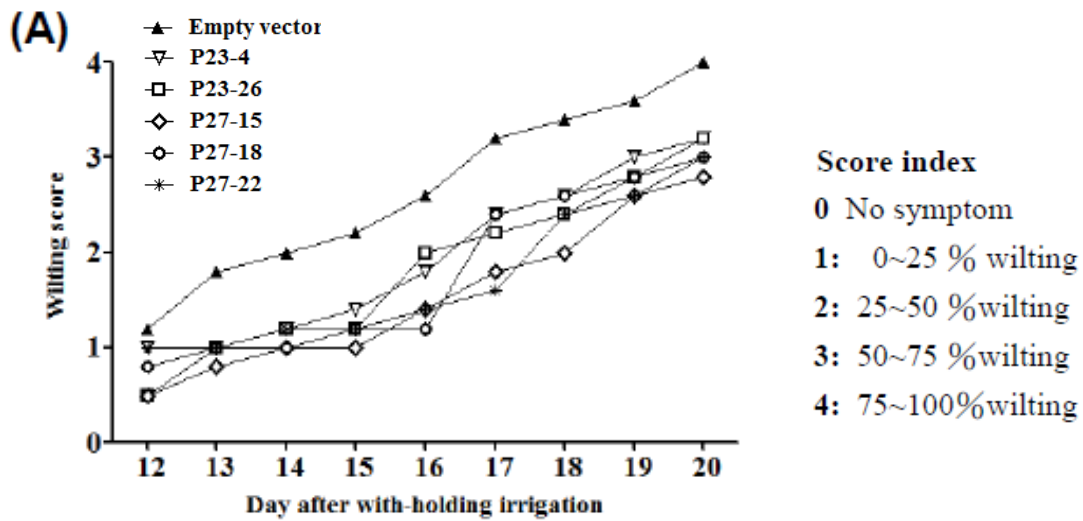


(C)



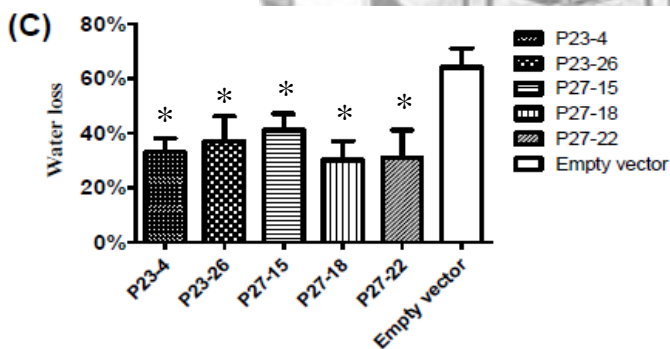
圖十二、過量表現 *SIZFP* 轉基因菸草幼苗在非生物逆境培養基之耐受性檢測。

利用 hygromycin 篩選的幼苗移至帶有非生物逆境的培養基中，觀察植株其根部延長之生長情形。(A)(B)(C) 分別在鹽害逆境、模擬乾旱逆境及 ABA 處理下第 7、14 與 21 天其相對根延長百分比。每次實驗的植物數量為 15 棵，本實驗重複 3 次，在此呈現 3 次實驗所合併的實驗結果，* 表示 student's *t*-test 分析後其 *p*-value 小於 0.05。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



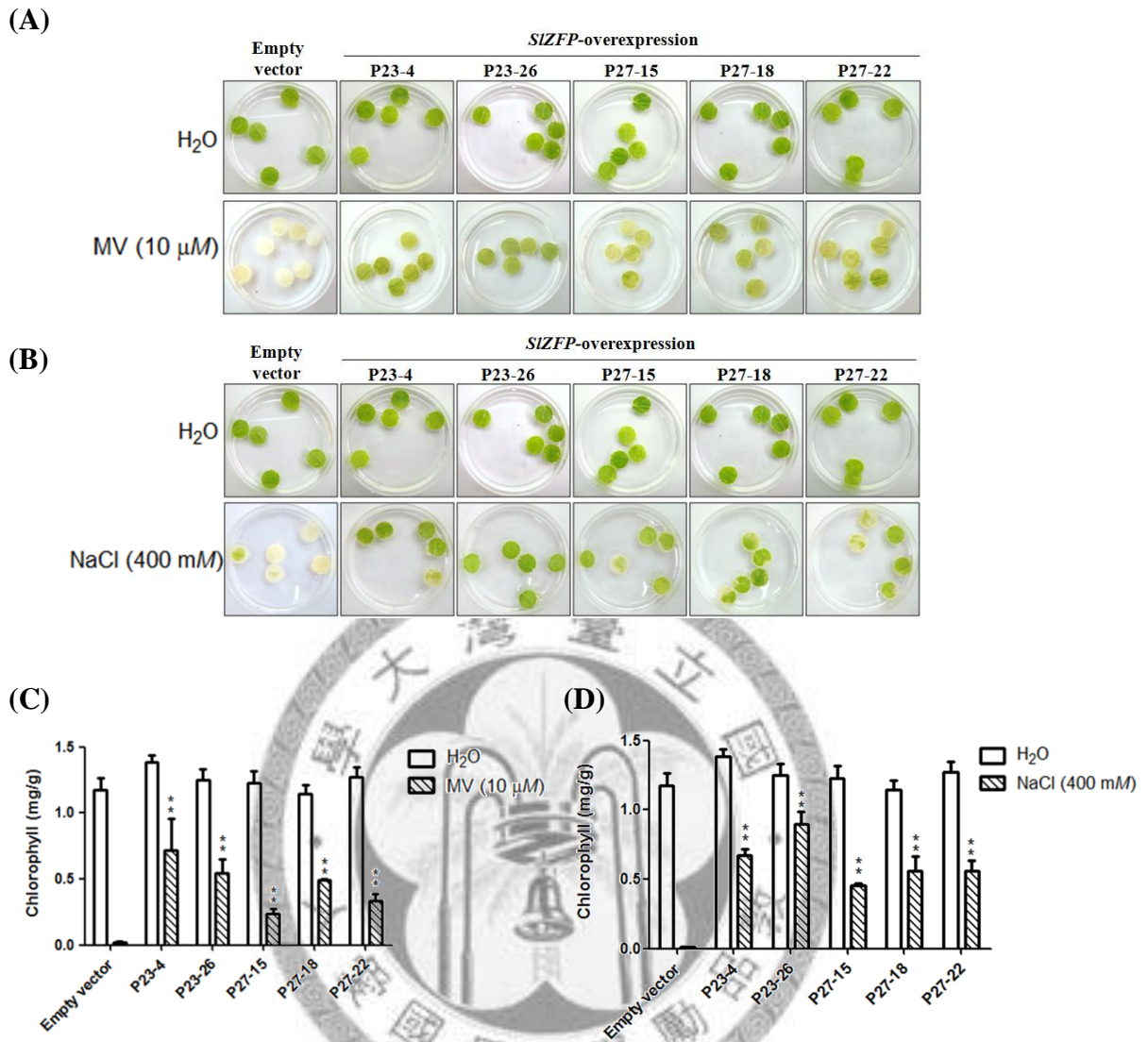
(B) *SIZFP*-OE

lines	Mean of wilting score (DPI)									
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
P23-4	1.00	1.00 *	1.20 *	1.40 *	1.80 *	2.40 *	2.60 *	3.00	3.20 *	
P23-26	0.50	1.00 *	1.20 *	1.20 *	2.00 *	2.20 *	2.40 *	2.80 *	3.20 *	
P27-15	0.50	0.80 *	1.00 *	1.00 *	1.40 **	1.80 **	2.00 **	2.60 *	2.80 *	
P27-18	0.80	1.00 *	1.00 *	1.20 *	1.20 **	2.40 *	2.60 *	2.80 *	3.00 *	
P27-22	1.00	1.00 *	1.20 *	1.20 *	1.40 **	1.60 **	2.40 *	2.60 *	3.00 *	
Vector	1.20	1.80	2.00	2.20	2.60	3.20	3.40	3.60	4.00	



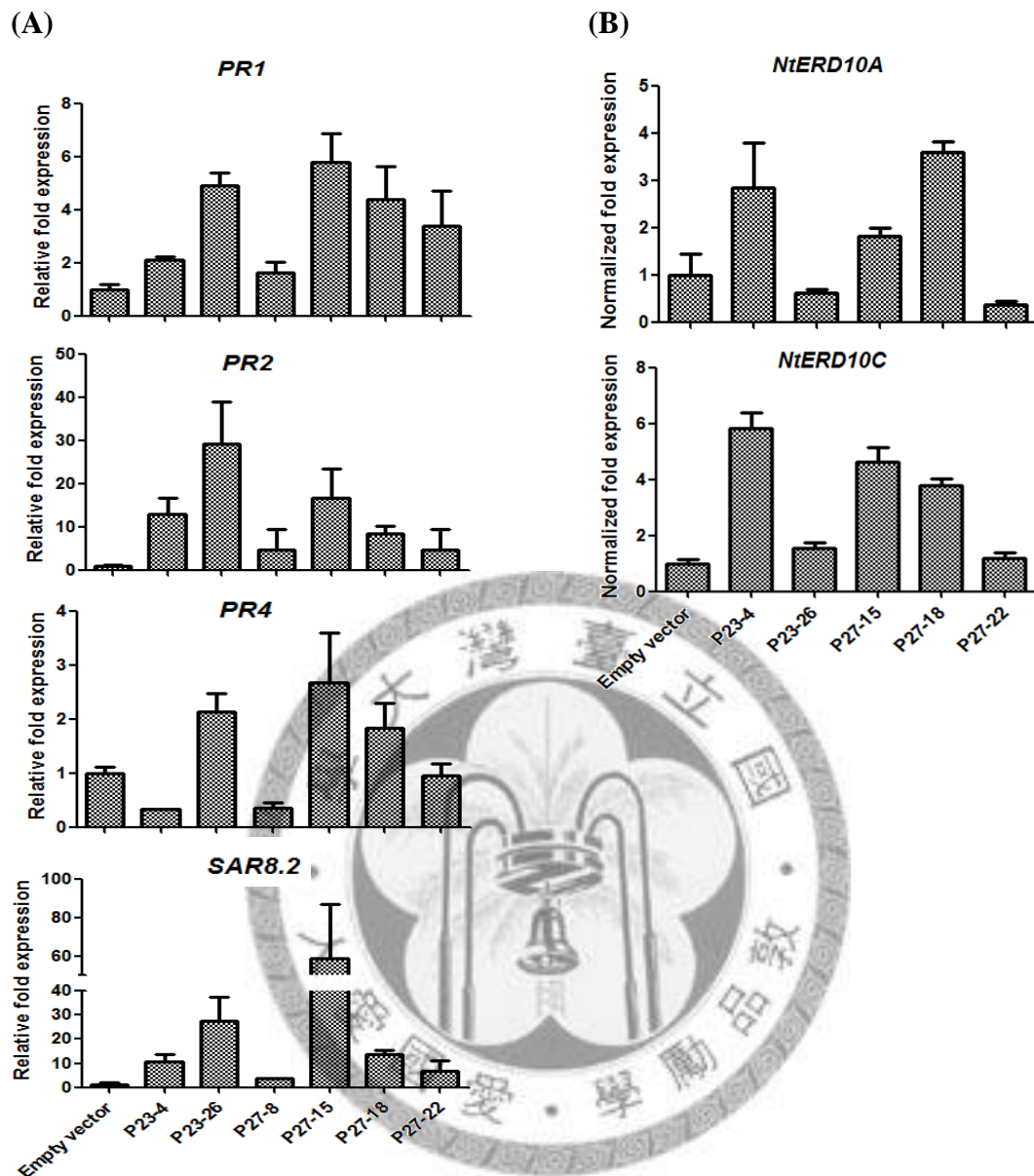
圖十三、表現番茄 *SIZFP* 之轉基因菸草乾旱逆境下耐受性測試。

(A,B) 帶有空載體或番茄 *SIZFP* 之四周大轉殖植物持續不澆水後之萎凋出現狀況與統計分析結果。* 與 ** 分別表示 student's *t*-test 分析後其 *p*-value 小於 0.05 與 0.01。(C) 植物持續不澆水後 20 天在葉部測得之失水量比較。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。每次實驗植物數量為 15 棵，共重複 2 次，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。



圖十四、表現番茄 *SIZFP* 之轉基因於草氧化及鹽份逆境下耐受性測試。

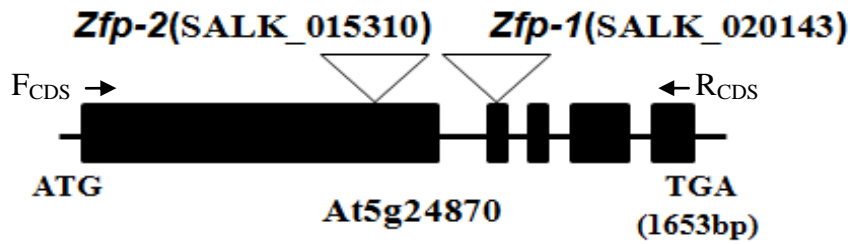
(A,B) 為帶有空載體或番茄 *SIZFP* 之四周大轉殖植物葉片分別處理氧化逆境 36 小時及鹽分逆境 72 小時之外表型態。(C, D) 為葉部測得之葉綠素比較與統計分析結果。* 與 ** 分別表示處理逆境後帶有 *SIZFP* 基因與空載體植株經 student's *t*-test 分析 *p*-value 小於 0.05 與 0.01。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。每次實驗葉片為 15 片，共重複 2 次，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。



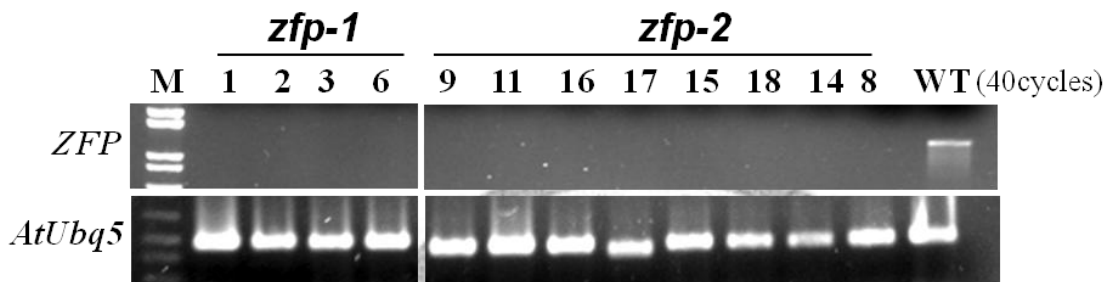
圖十五、表現番茄 *SIZFP* 之轉基因菸草中內生性逆境相關標誌基因表現。

取四周大 *35S::SIZFP* 轉殖菸草葉部抽取 RNA，以 qRT-PCR 進行基因檢測。(A) 病原相關標誌基因。(B) 乾旱相關標誌基因。Y 軸表示基因的相對表現量，X 軸表示各個獨立轉植株。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。本實驗重複 2 次且趨勢一致，在此只呈現具代表性的一次結果。

(A)

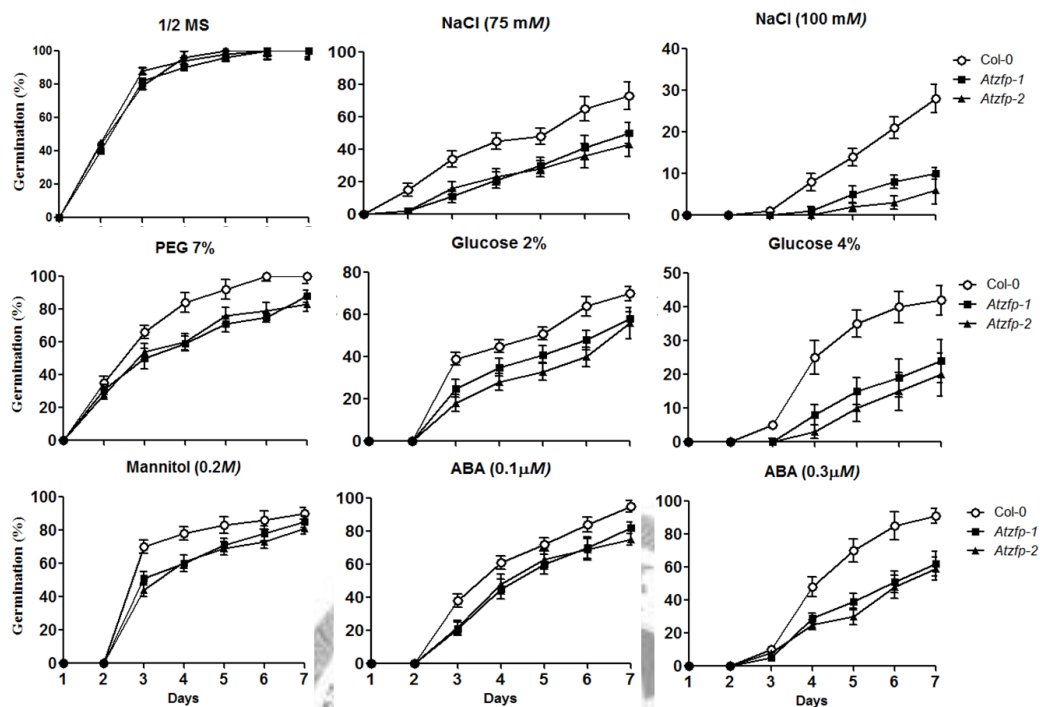


(B)



圖十六、阿拉伯芥同源基因 *at5g24870* 突變體分子檢驗。

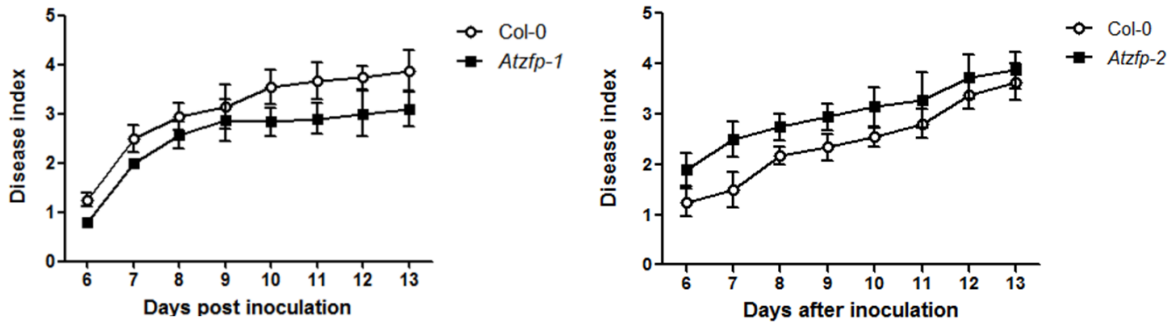
At5g24870 比對胺基酸序列的 identity 為 36.8 %，similarity 48.8 %，本研究進一步自 ABRC 中心 (Arabidopsis biological resource center) 購買此 *At5g24870* 基因被 T-DNA 插入的突變體並檢測其 RNA 表現量。(A) *At5g24870* 基因結構示意圖，黑色方塊代表 exon。該基因被 T-DNA 分別插入兩個不同位置之突變體 (三角形表示 T-DNA 插入位置)，其分別為插入第一個 exon 的 *zfp-2* (SALK_015310) 及第二個 exon 的 *zfp-1* (SALK_021043)。(B) 利用半定量 RT-PCR 分析 *zfp-1* 及 *zfp-2* 突變體其不同 mutant line RNA 之表現量。M 表示 DNA marker，WT 表示 Col-0 植株。設計 gDNA 進行 PCR 的引子分別為 F_{CDS}、R_{CDS}。



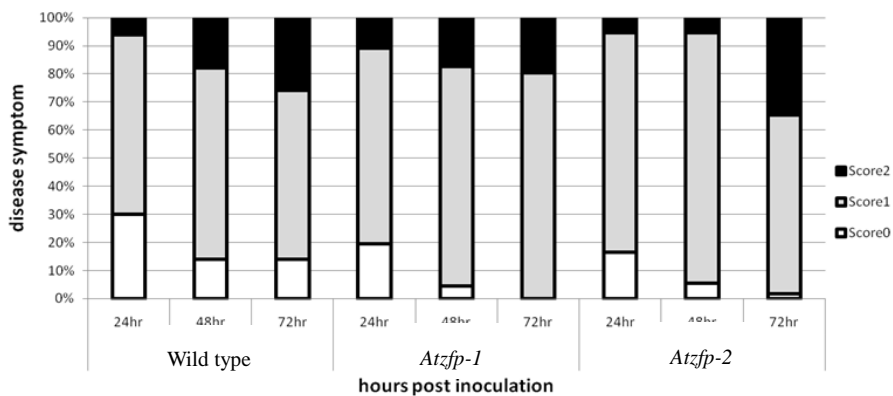
圖十七、阿拉伯芥同源基因 *at5g24870* 突變體於含有各式非生物逆境培養基下之萌芽率測試。

將經春化作用後之種子，以無菌播種方式將種子分別灑播於含有各式模擬非生物逆境之 MS 固體培養基，比較 Col-0 與突變體在種子發芽期間之情形。每盤各播種 50 棵野生型、*Atzfp-1* 及 *Atzfp-2* 種子，該試驗以無添加任何逆境成分之 1/2 MS 固體培養基作為處理對照組。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。每次實驗利用 3 盤 (每盤各 50 顆種子) 進行測試，共進行 3 重複，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。

(A)

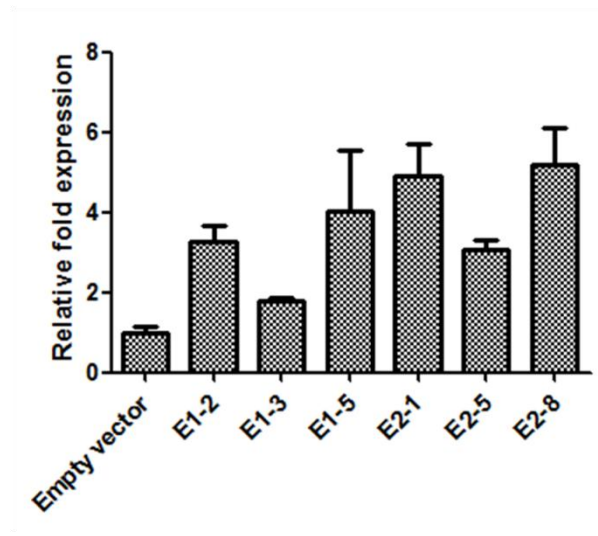


(B)



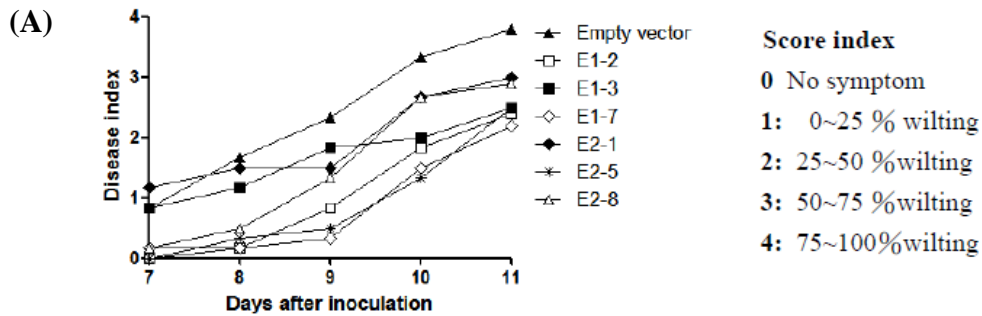
圖十八、阿拉伯芥同源基因 *at5g24870* 突變體接種青枯病菌 (Rd15) 與軟腐病菌 (*Pch*) 之抗病性測試。

(A)青枯病菌 Rd15 接種根部後之病程發展。Level 0：無病徵；Level 1：25%的葉片萎凋；Level 2：50%的葉片萎凋；Level 3：75%的葉片萎凋；Level 4：葉片完全萎凋。以 Student' s *t*-test 進行統計分析後皆無差異。每次實驗為 18 棵，共進行 2 重複，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次。(B)接種軟腐病菌後 48 hr 及 72 hr 計算阿拉伯芥病徵級數，病徵級數分級，Level 0：無明顯病徵；Level 1：接種部位有些微水浸狀病徵；Level 2：葉部出現明顯水浸狀病徵 (Higashi *et al.*, 2008)。每次實驗每個 line 以五棵植株共包含 40 片葉片進行抗病性測試。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。本實驗總共進行 2 重複，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。



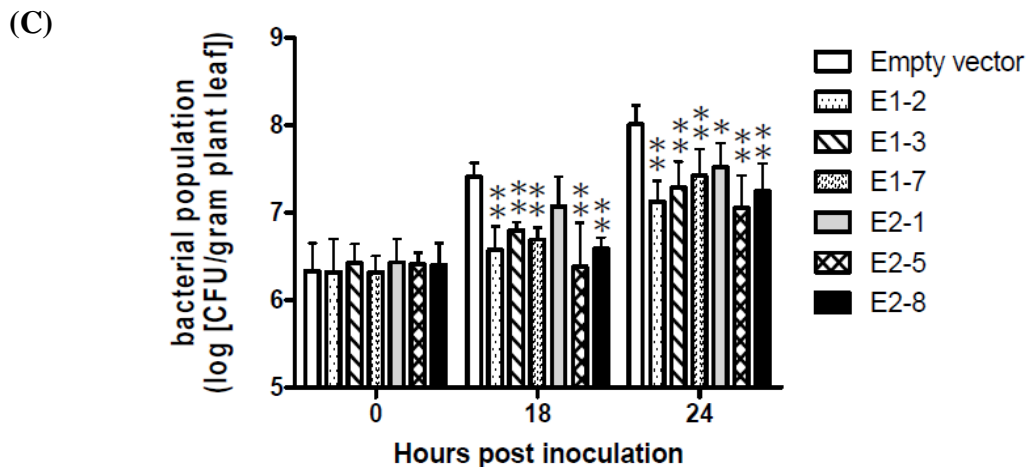
圖十九、過量表現菸草 *NiEAS* 之轉基因菸草表現量分析。

抽取各個菸草轉殖獨立系 (independent lines) 三週大葉片之 RNA，並反轉錄為 cDNA。Real-time PCR 分析以 *elongation factor 1a (EF1a)* 作為 internal control 並予以標準化。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示不同轉殖系編號，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。本實驗重複 2 次，實驗結果趨勢一致，在此只呈現具代表性的一次結果。



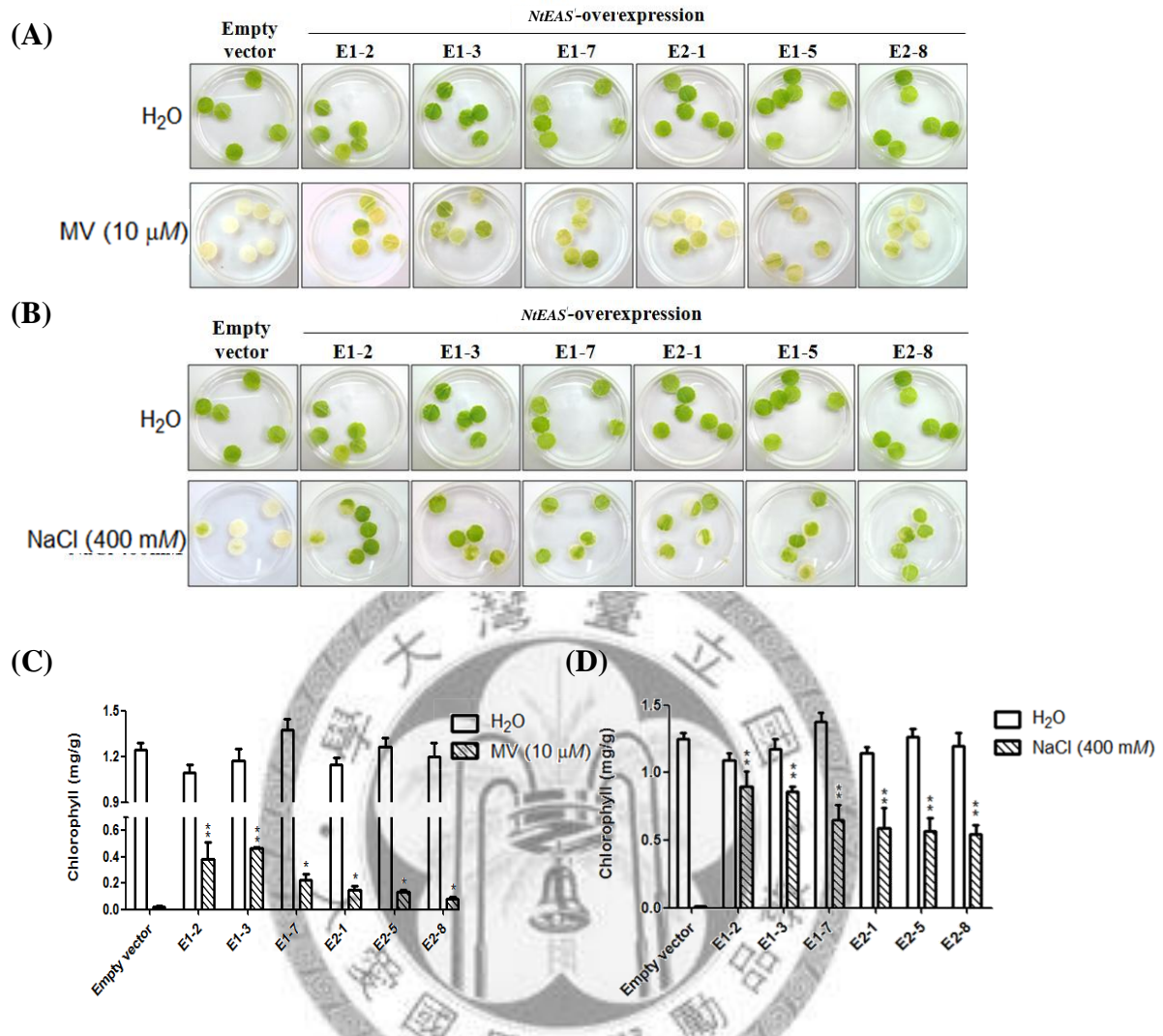
(B)

NgEAS-OE lines	Samples No.	Mean of wilting score				
		7 DAI	8 DAI	9 DAI	10 DAI	11 DAI
E1-2	12	0.00 *	0.17 *	0.83 **	1.83 **	2.40 **
E1-3	12	0.83	1.17	1.83	2.00 **	2.50 **
E1-7	12	0.17 *	0.17 *	0.33 **	1.50 **	2.20 **
E2-1	12	1.17	1.50	1.50 **	2.67 *	3.00 *
E2-5	12	0.00 *	0.33 *	0.50 **	1.33 **	2.50 **
E2-8	12	0.17 *	0.50 *	1.30 **	2.67 *	2.90 *
Empty vector	12	0.83	1.67	2.33	3.33	3.80



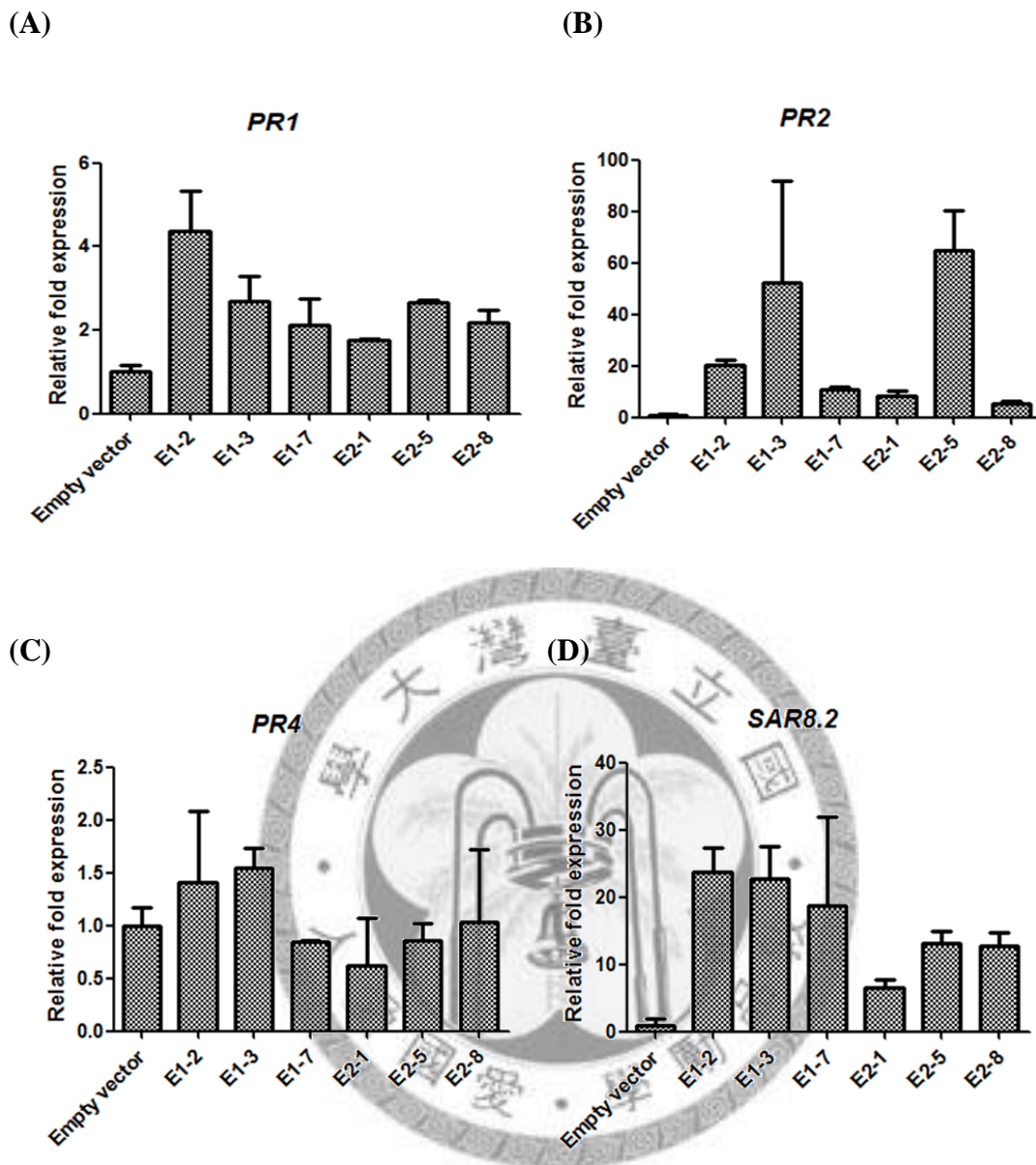
圖二十、表現菸草 *NtEAS* 之轉殖菸草植物之青枯病菌抗病測試。

(A,B) 為帶有空載體或菸草 *NtEAS* 之四周大轉殖植物經過根部澆灌青枯病菌後之萎凋出現狀況與統計分析結果。(C) 為帶有空載體或菸草 *NtEAS* 之四周大轉殖植物經過葉部注射青枯病菌後，病菌在葉中之增生情況與統計分析結果。* 與 ** 分別表示 student's *t*-test 分析後其 p-value 小於 0.05 與 0.01。每次實驗植物數量為 12 棵，共重複 2 次，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次。



圖二十一、表現菸草 *NiEAS* 之轉殖菸草植物氧化及鹽份逆境下耐受性測試。

(A,B) 為帶有空載體或菸草 *NiEAS* 之四周大轉殖植物葉片分別處理氧化逆境 36 小時及鹽分逆境 72 小時之外表型態。(C, D) 為葉部測得之葉綠素比較與統計分析結果。* 與 ** 分別表示處理逆境後帶有 *NiEAS* 基因與空載體植株經 student's *t*-test 分析 *p*-value 小於 0.05 與 0.01。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。每次實驗葉片為 15 片，共重複 2 次，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。

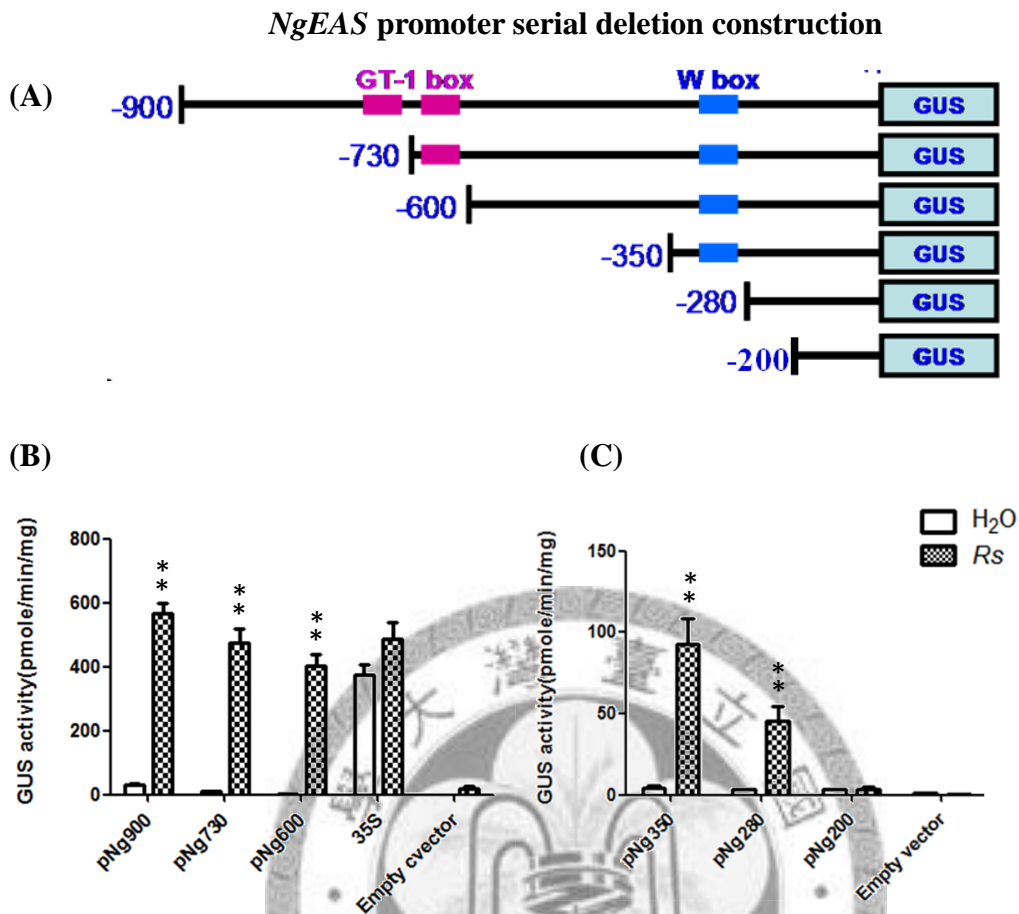


圖二十二、表現菸草 *NtEAS* 之轉殖菸草植物其生物逆境基因檢測。

將四周大 *35S::NtEAS* 轉殖株轉殖菸草葉部之 RNA，以 RT-qPCR 進行基因檢測。

(A) (B) (C) (D) 分別為 *PR1*、*PR2*、*PR4* 與 *SAR8.2* 等病原相關指標基因表現情形。

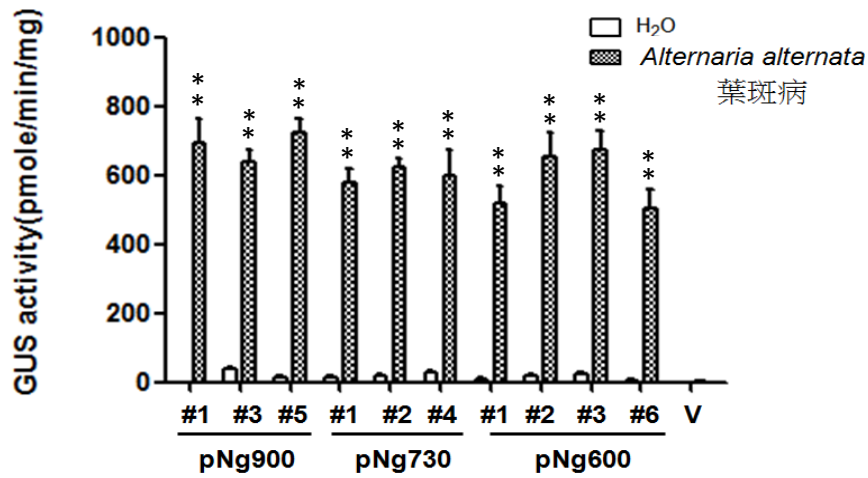
Y 軸表示基因的相對表現量，X 軸表示各個獨立轉殖株。本實驗重複 2 次且趨勢一致，在此只呈現具代表性的一次結果。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。



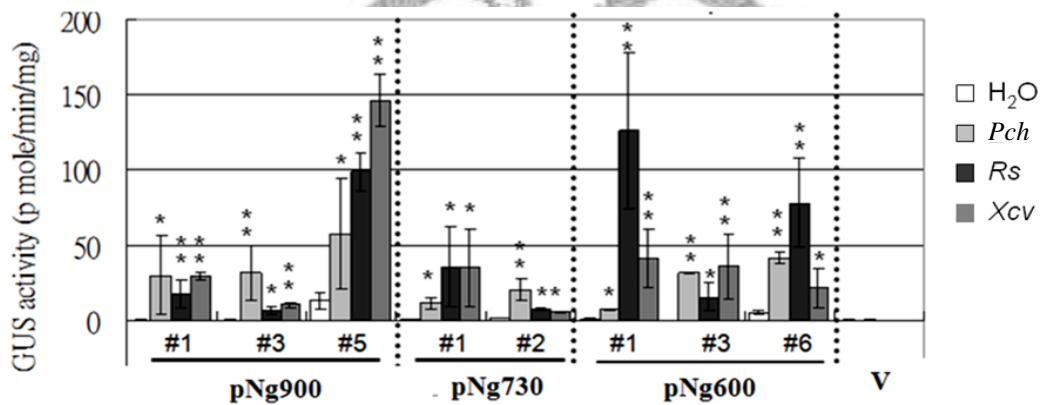
圖二十三、菸草 *N. glutinosa* *EAS* (*NgEAS*) 啟動子序列及其片段活性分析。

(A) 不同 *NgEAS* 啟動子長度之表現載體示意圖。(B,C) 在 *N. tabacum* W38 植物短暫表現不同長度 *NgEAS* 啟動子並感染青枯病菌 *Pss4* 菌系 24 小時後之 GUS 活性分析。Empty vector, 空載體控制組；pNg900, 帶有 *NgEAS* 啟動子 900 bp 序列；pNg730, 帶有 *NgEAS* 啟動子 730 bp 序列；pNg600, 帶有 *NgEAS* 啟動子 600 bp 序列；pNg350, 帶有 *NgEAS* 啟動子 350 bp 序列；pNg280, 帶有 *NgEAS* 啟動子 280 bp 序列；pNg200, 帶有 *NgEAS* 啟動子 200 bp 序列；*Rs*, *Ralstonia solanacearum*。* 與 ** 分別表示處理逆境後帶有不同長度 *NgEAS* 啟動子與空載體植株經 student's *t*-test 分析後其 *p*-value 小於 0.05 與 0.01, 垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。每次實驗 6 片葉片, 共重複 3 次, 實驗結果趨勢一致, 故合併呈現之。

(A)

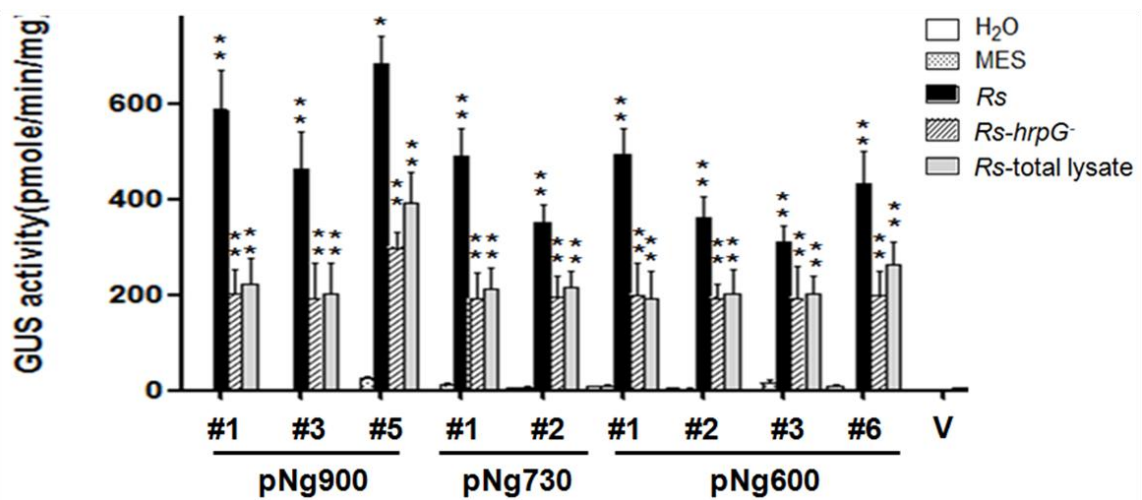


(B)



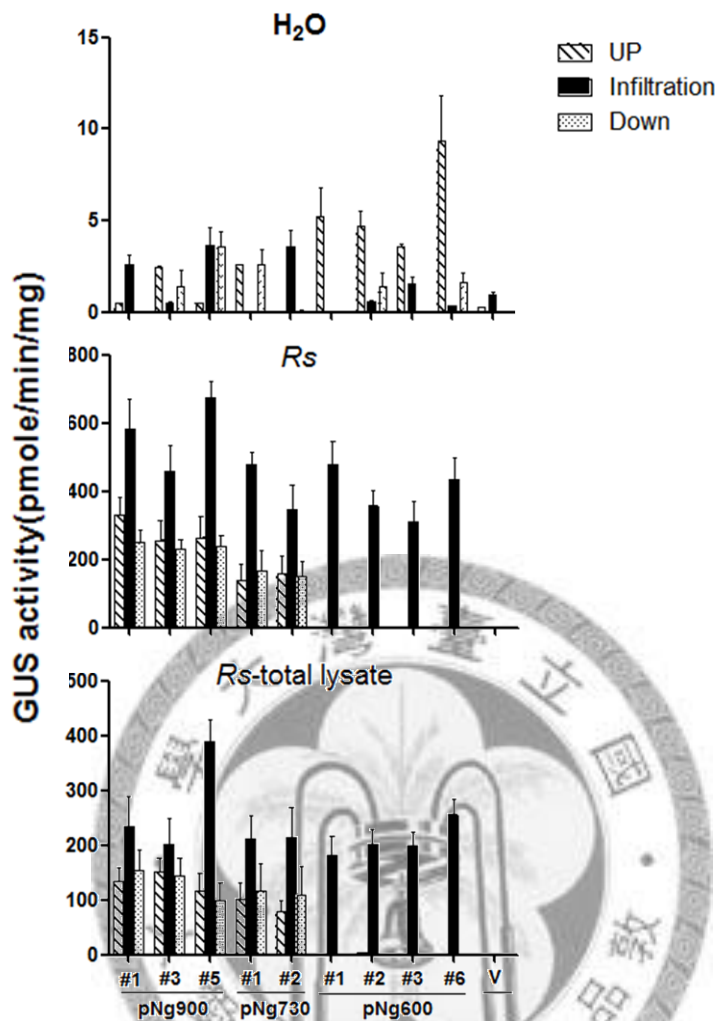
圖二十四、菸草 *NgEAS* 啟動子接種真菌及細菌病原菌之活性測試。

(A) 不同長度啟動子之 R1 植株處理真菌葉斑病 7 天後之 GUS 活性分析與統計結果。(B) 不同長度啟動子處理各種細菌 24 小時後之 GUS 活性分析與統計結果。* 與 ** 分別表示處理逆境後帶有不同長度 *NgEAS* 啟動子與空載體植株經 student's *t*-test 分析後其 *p*-value 小於 0.05 與 0.01，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。Rs, *Ralstonia solanacearum* ; Xcv, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ; Pch, *Pectobacterium chrysanthemi*。每次實驗 6 片葉片，共重複 2 次，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。



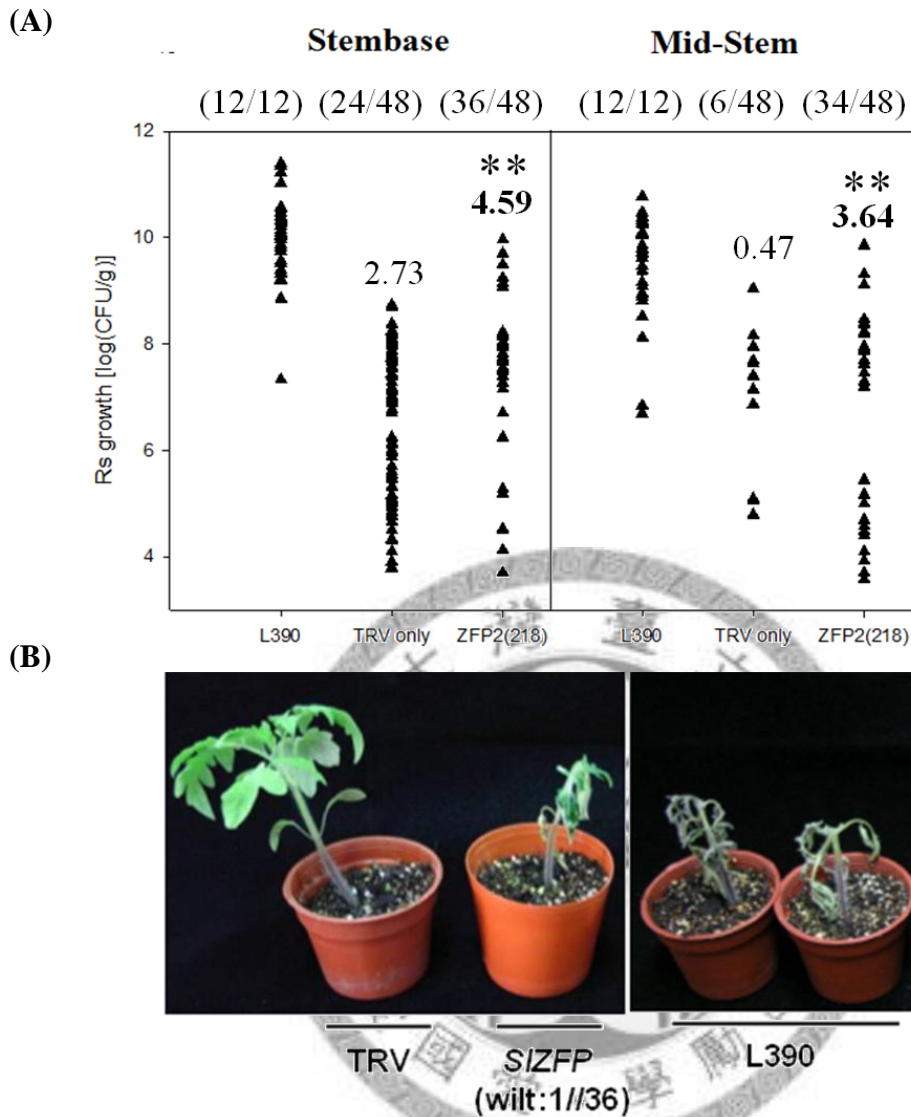
圖二十五、菸草 *NgEAS* 啟動子接種青枯病菌不同病原形式之活性測試。

不同長度啟動子 R1 植株分別處理各式病原形式青枯病菌 24 小時後之 GUS 活性分析與統計結果。*Rs*, *Ralstonia solanacearum*。* 與 ** 分別表示處理逆境後帶有不同長度 *NgEAS* 啟動子與空載體植株經 student's *t*-test 分析後其 *p*-value 小於 0.05 與 0.01，垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。每次實驗 6 片葉片，共重複 2 次，實驗結果趨勢一致，故呈現具代表性一次結果。



圖二十六、菸草 *NgEAS* 啟動子於植物不同組織中之活性測試。

不同長度啟動子 R1 植株處理 *Rs* 及 *Rs*-total lysate 之 GUS 活性分析與統計結果。UP, 處理 48 小時後上位葉之活性分析；Infiltration, 處理 24 小時後接種葉之活性分析；Down, 處理 48 小時後下位葉之活性分析。*Rs*, *Ralstonia solanacearum*。垂直線距表示標準差 (standard deviation, S.D.)。該實驗帶有不同長度 *NgEAS* 啟動子與空載體植株經處理青枯病菌及青枯病菌 total lysate, 以 student's *t*-test 分析後皆達高度顯著差異 (*p*-value 小於 0.01)。每次實驗 6 片葉片, 共重複 2 次, 實驗結果趨勢一致, 故呈現具代表性一次結果。



附錄一、在番茄抗病品系 (H7996) 短暫靜默 *SIZFP* 基因降低對青枯病菌之抗性。番茄注射帶有 pTRV1 及 pTRV2-*SIZFP* 或者 pTRV2 empty vector 的農桿菌後十天並接種青枯病菌後五天之情形。(A) *SIZFP* 基因靜默化使得番茄植株其植株體內菌量上升。(B) *SIZFP* 基因靜默化出現萎凋的外表型。其中，*PDS* 靜默後番茄葉部白化作為 VIGS 效率對照組；L390 植株則作為接菌處理之對照組。

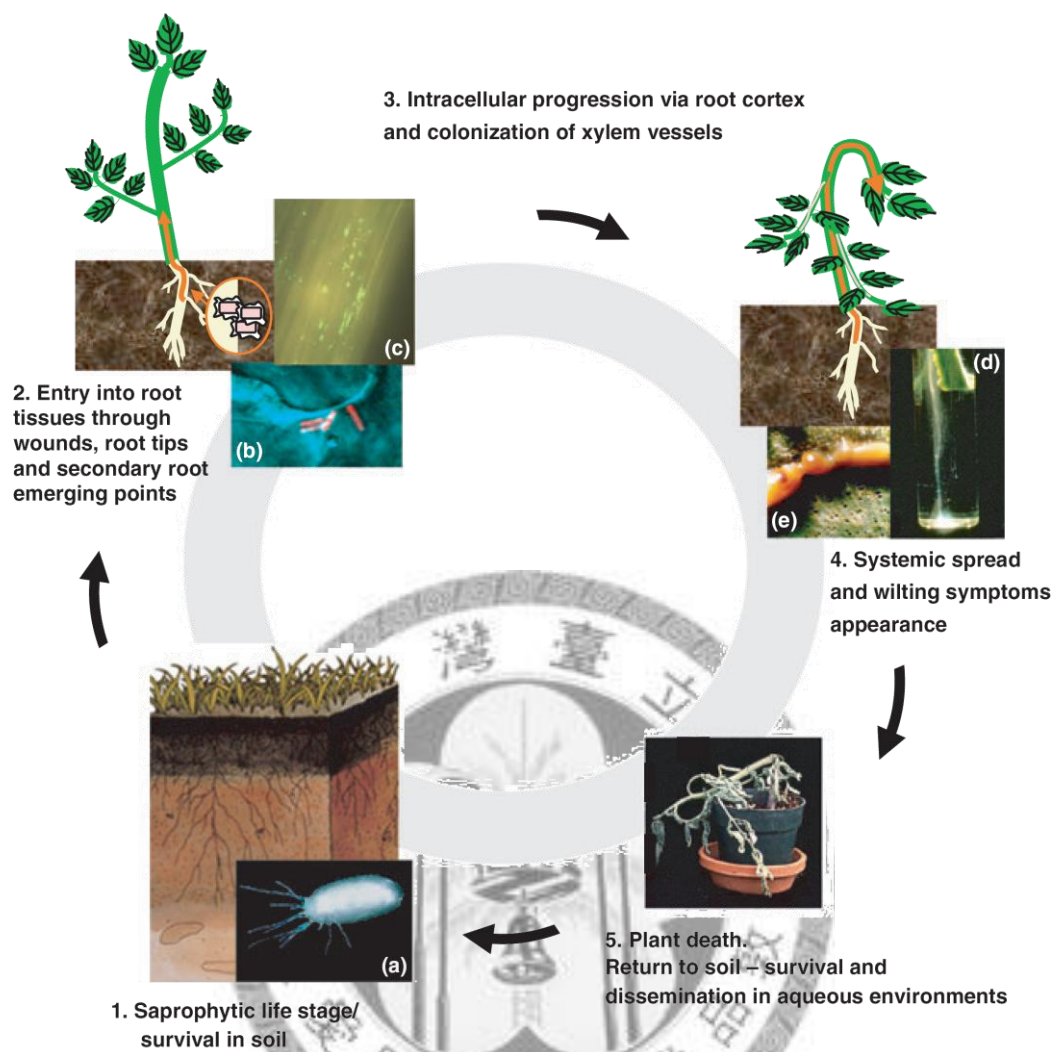
(A)



附錄二、不同煙草之 *EAS4* 基因逆境下表現情形。

以北方雜合法 (northern blotting) 分析 *EAS4* 基因在不同煙草處理各種生物性及非生物性逆境因子後之表現情形。





(Genin, 2010)

附錄三、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 感染植物過程。

(A) PREDICTION RESULTS

Selected organism: plant
Computational time: 0.244765 [s]

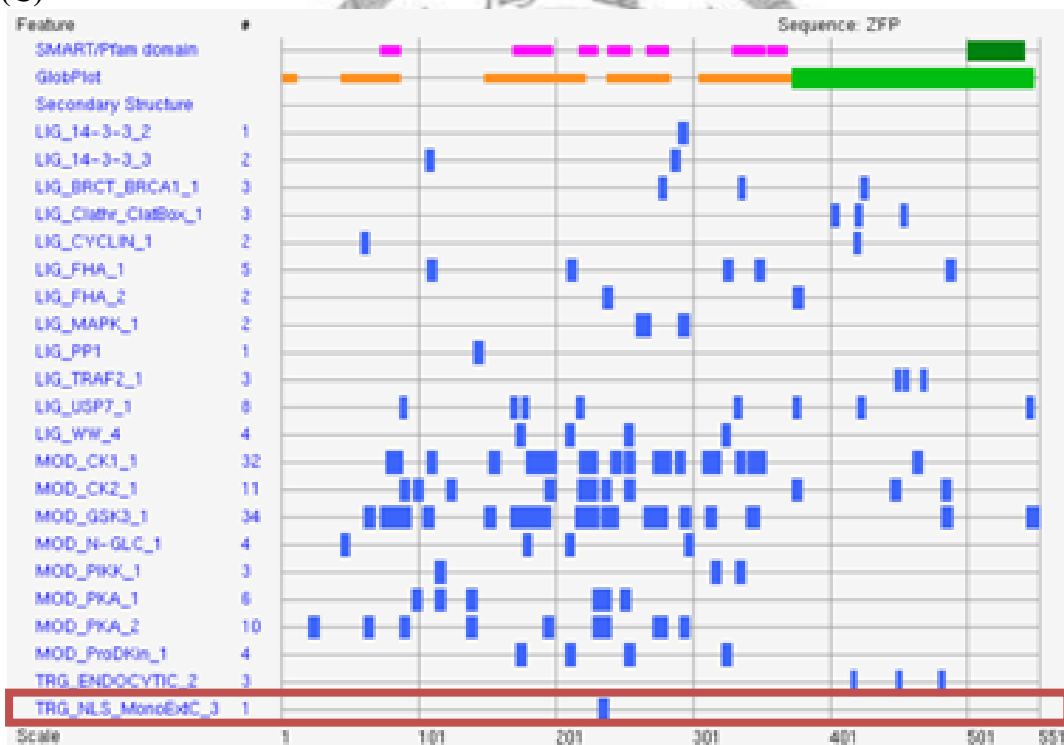
No.	Sequence label	First candidate		Second candidate		RI (1-10)
		Predicted location	SVM score	Predicted location	SVM score	
1	SLZFP	nucleus_or_cytosol	0.42946824	mitochondria	-0.63850228	2

(B)

```

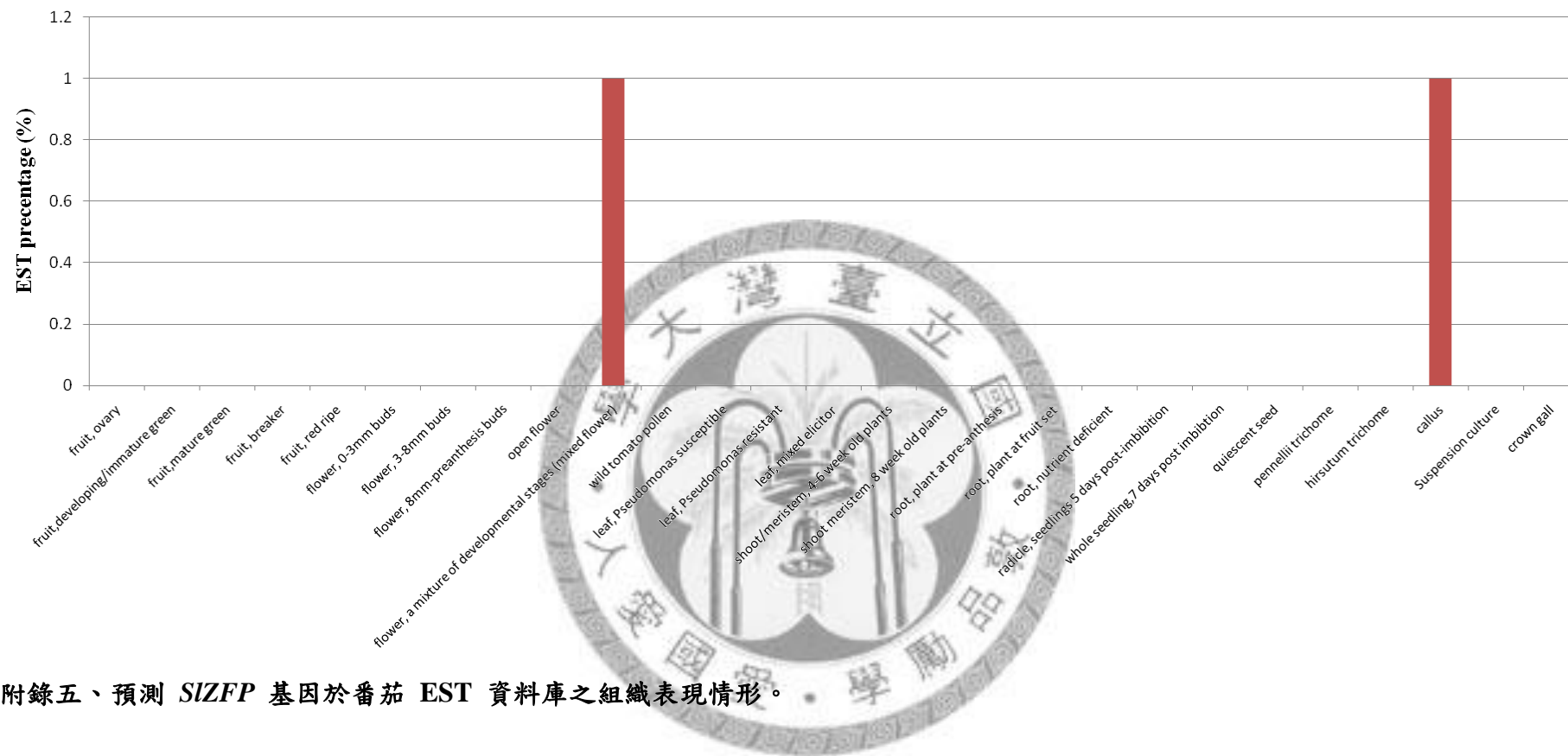
ProtComp Version 9.0. Identifying sub-cellular location (Plant)
Seq name: SLZFP. Length=551
Significant similarity by DBSCAN-P - NONE
Predicted by Neural Nets - Golgi with score 2.4
Integral Prediction of protein location: Golgi with score 6.6
Location weights:
LocDB / PotLocDB / Neural Nets / Pentamers / Integral
Nuclear 0.0 / 0.0 / 0.00 / 1.60 / 0.18
Plasma membrane 0.0 / 0.0 / 0.00 / 1.08 / 2.55
Extracellular 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.00 / 0.00
Cytoplasmic 0.0 / 0.0 / 0.36 / 0.16 / 0.00
Mitochondrial 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.67 / 0.00
Endoplasmic retic. 0.0 / 0.0 / 0.14 / 0.15 / 0.00
Peroxisomal 0.0 / 0.0 / 0.10 / 0.00 / 0.00
Golgi 0.0 / 0.0 / 2.40 / 0.00 / 6.61
Chloroplast 0.0 / 0.0 / 0.00 / 1.49 / 0.00
Vacuolar 0.0 / 0.0 / 0.00 / 0.10 / 0.67
  
```

(C)

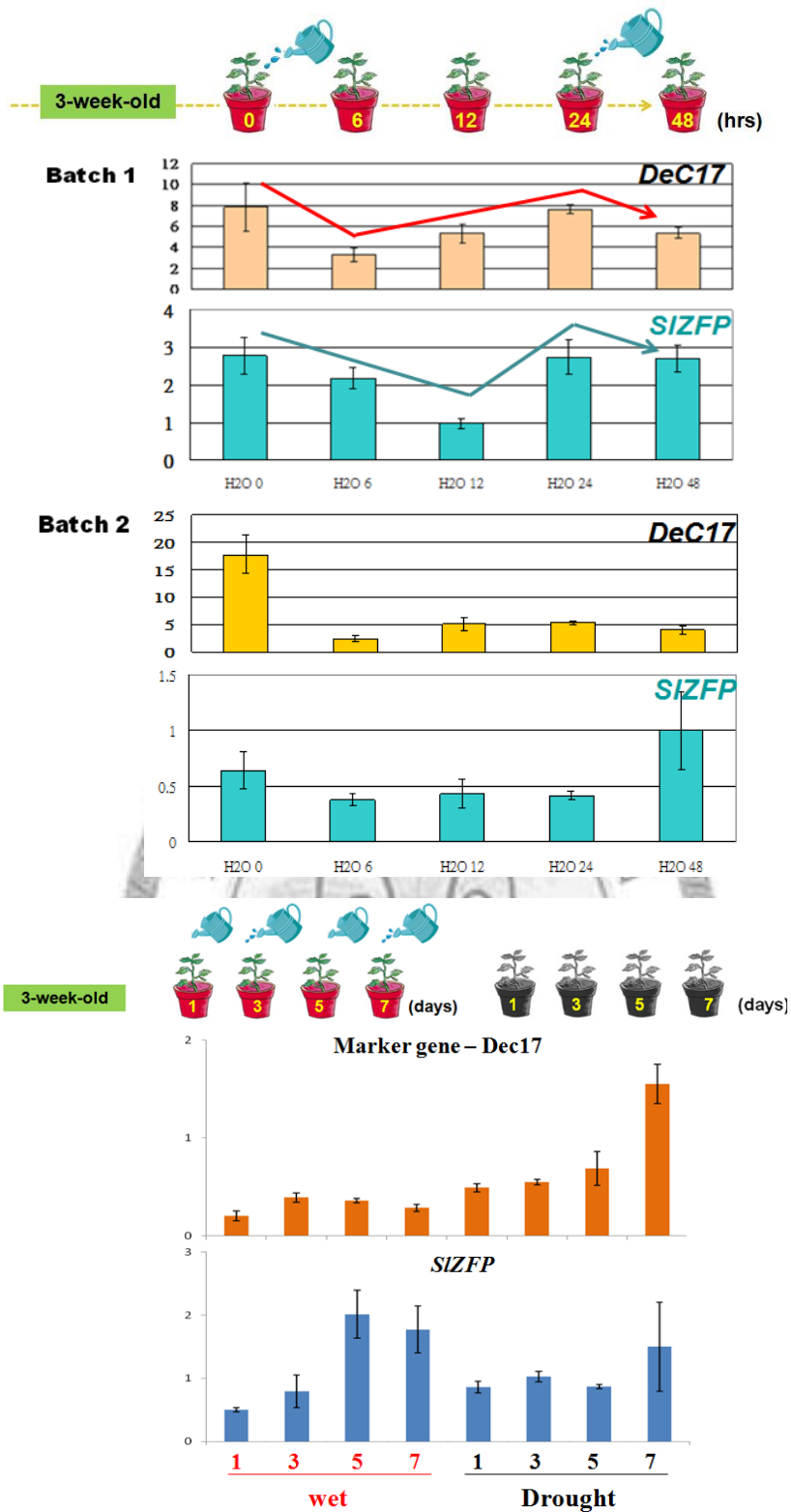


附錄四、不同網站分析番茄 SIZFP 可能位於細胞表現之表位置。

(A) 利用 SLP-Loca 線上軟體 (<http://tinyurl.com/4pkcq72>) 預測位於細胞核內或細胞質。(B) 利用 Softberry 線上軟體 (<http://tinyurl.com/4oupujs>) 預測位於高基氏體。(C) 利用 ELM 線上軟體 (<http://tinyurl.com/4b9kjfz>) 預測具有一非典型 NLS 序列。



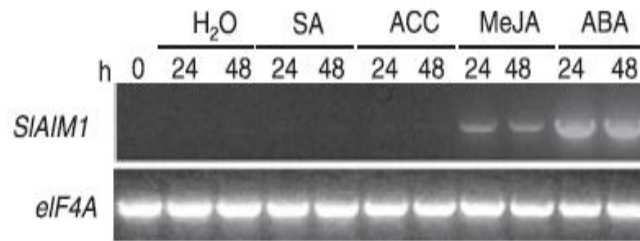
附錄五、預測 *SIZFP* 基因於番茄 EST 資料庫之組織表現情形。



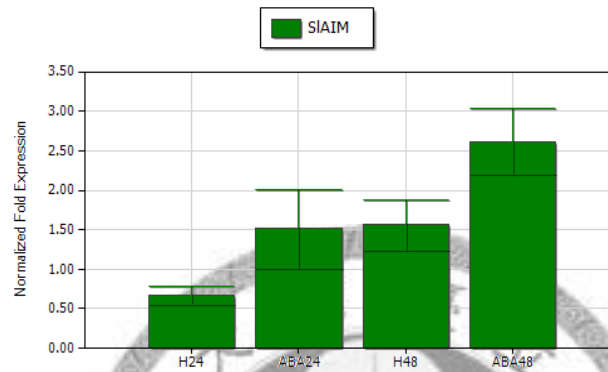
附錄六、*SIZFP* 基因於蕃茄處理乾旱後之表現情形。

(A)(B) *SIZFP* 基因處理乾旱及復水後表現情形之不同次實驗結果。(C) *SIZFP* 基因乾旱後且不復水之表現情形。Y 軸表示基因標準化表現量，X 軸表示收取樣品之時間點，垂直線距表示標準差 (standa deviation, S.D.)。

(A)



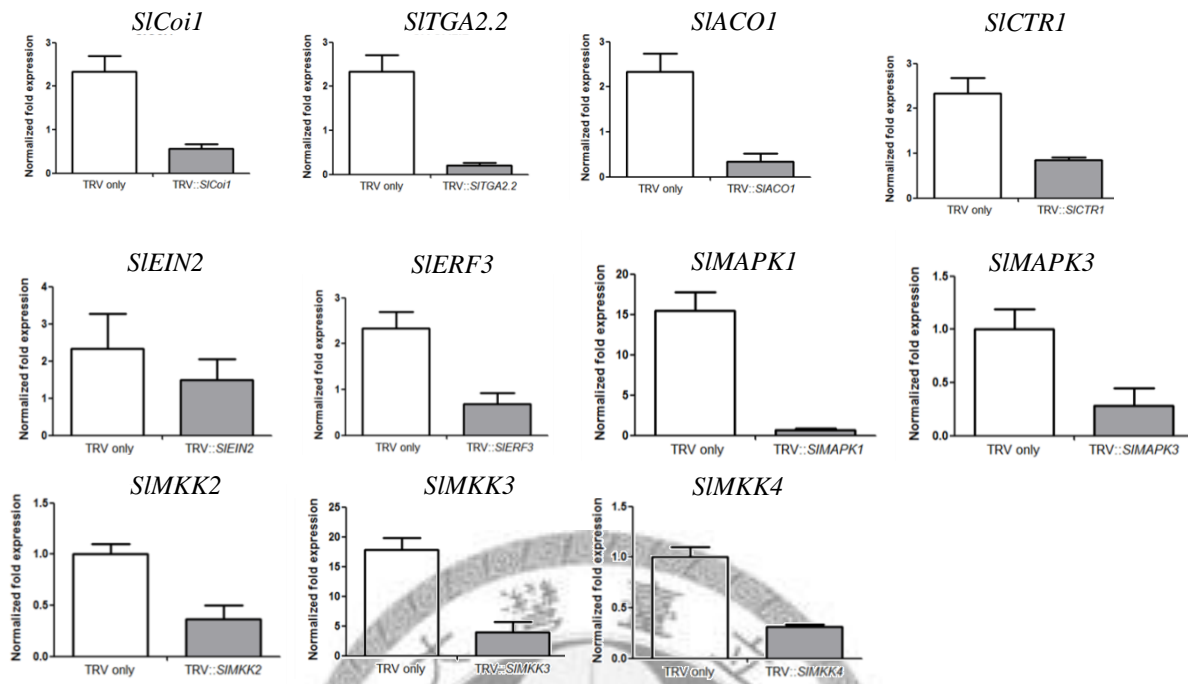
(B)



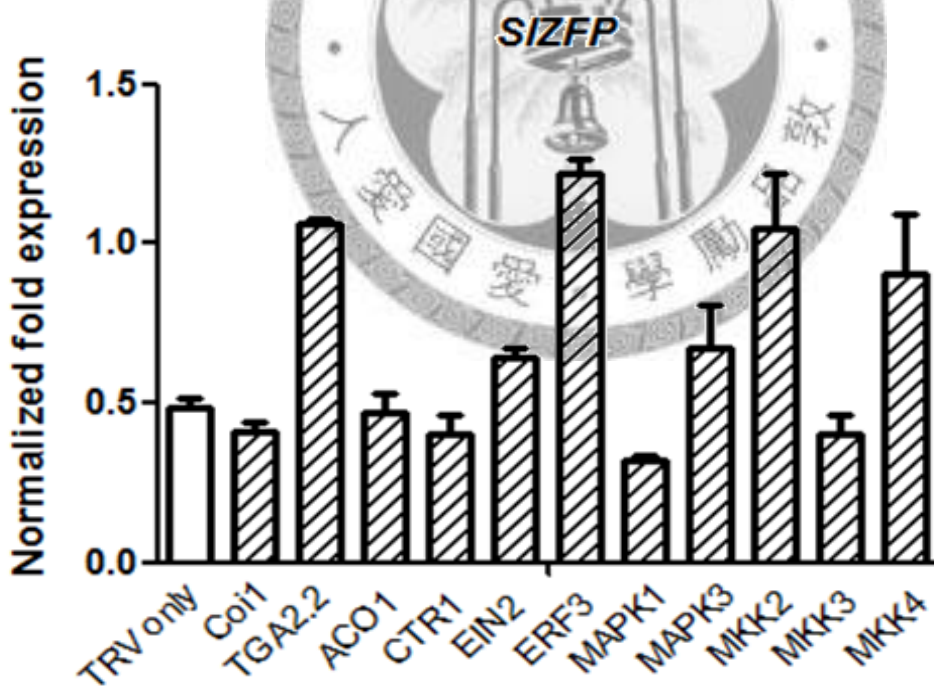
附錄七、*SIAIM* 指標基因於蕃茄處理 ABA 後之表現情況。

(A) AbuQamar 等學者 (2009) 所發表文獻指出 *SIAIM1* 基因可受 ABA 誘導。(B) 本研究依據文獻以 MicroTom 品系作為材料，施以 ABA 處理後之情形。

(A)



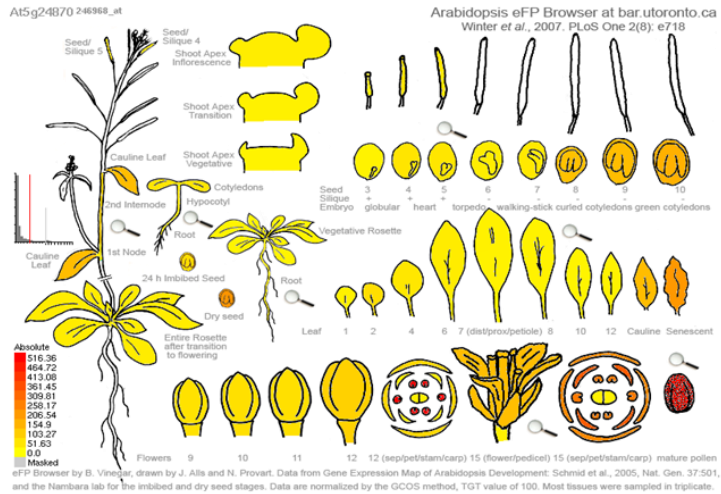
(B)



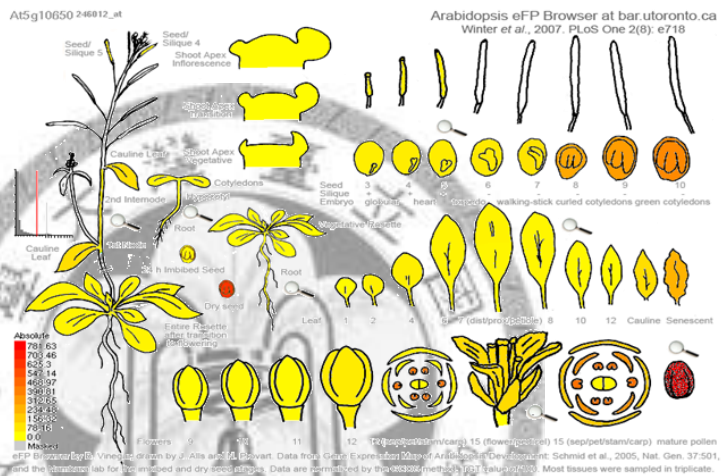
附錄八、VIGS 植物防禦訊息傳導途徑關鍵調控子並檢測 *SIZFP* 基因表現情形。

(A) 各基因 VIGS 效率檢測。(B) *SIZFP* 基因表現情形。

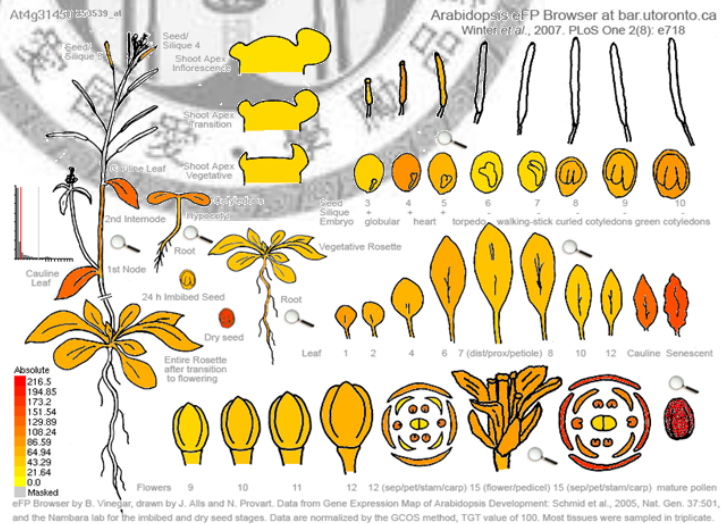
At5g24870



At5g10650



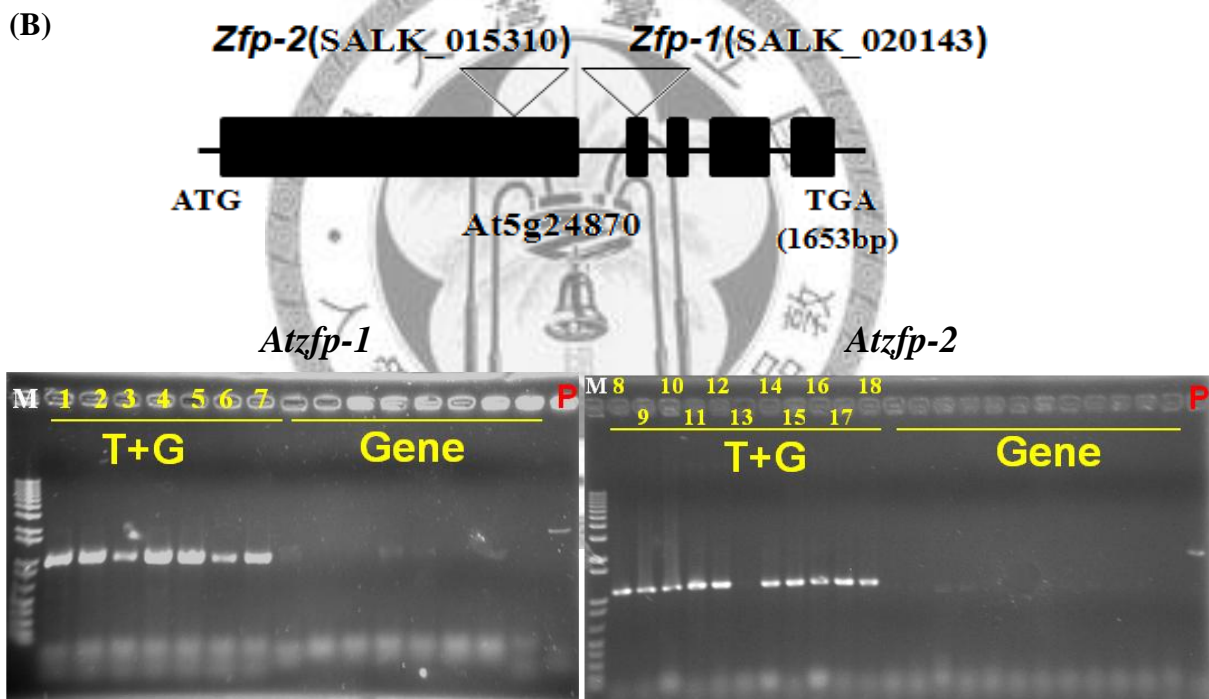
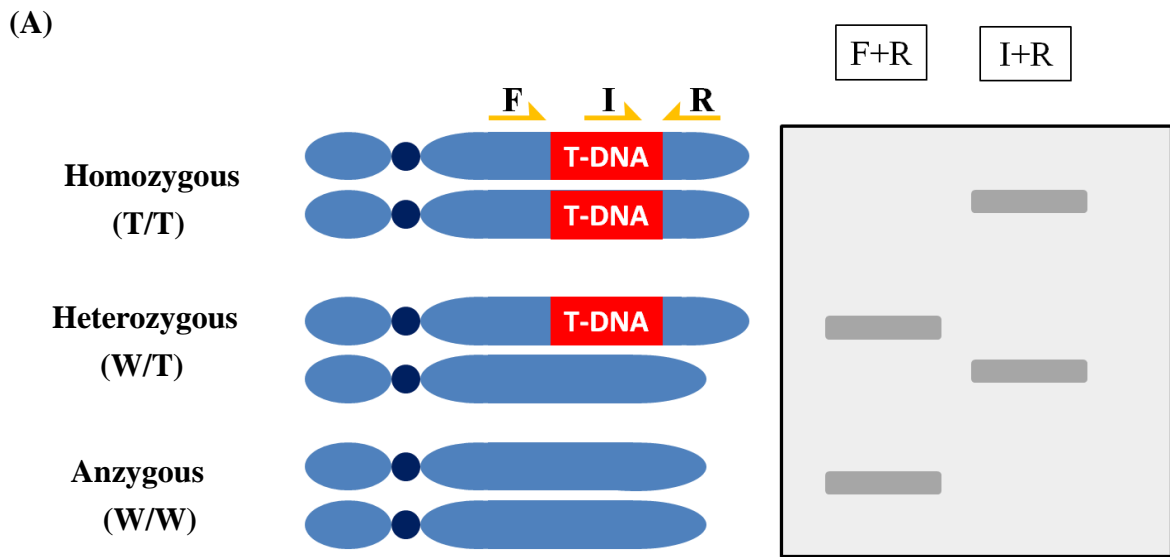
At4g31450



附錄九、分析番茄 *SIZFP* 基因在阿拉伯芥中之同源基因組織表現情形。

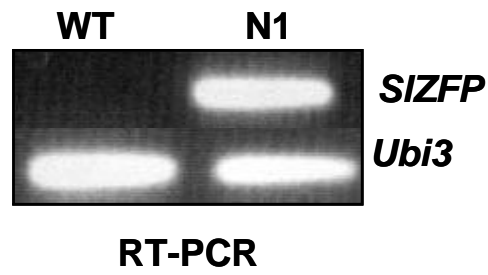
藉由 Arabidopsis eFP Browser 網站 (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

預測其 ortholog 基因可能表現之位置。



附錄十、阿拉伯芥同源基因 *at5g24870* 突變體 (T6 世代) 之分子檢定。

(A) PCR Genotyping 引子設計位置及 PCR 反應之結果鑑定示意圖。(B) 阿拉伯芥 *Atzfp* 與 *Atzfp-2* 突變株 PCR 分子鑑定結果。F/R: 目標基因於全長兩端引子；I: T-DNA 之專一引子；T+G: T-DNA 專一引子與目標基因引子搭配 (亦即 I+R)；Gene: 目標基因於全長兩端引子 (亦即 F+R)。

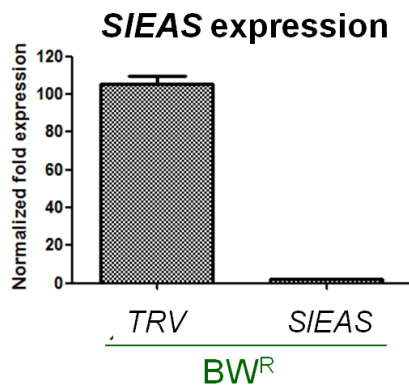


附錄十一、反轉錄 PCR 檢測 *SIZFP* 基因在 *AtNPR1* 轉殖番茄中表現情況。

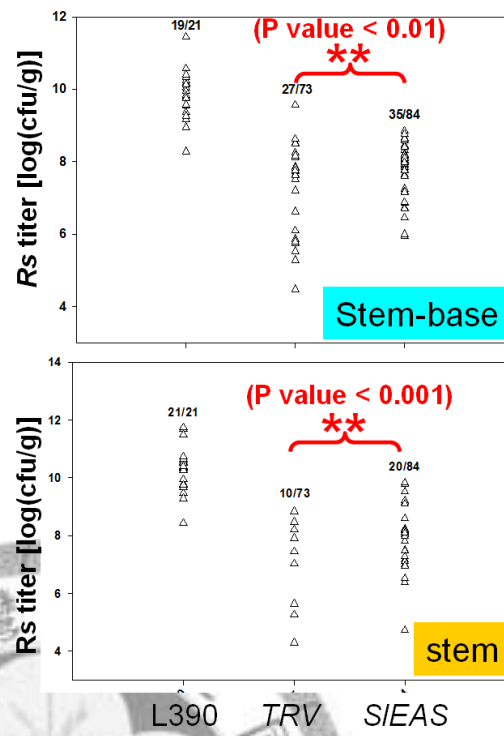
WT 為野生型番茄，N1 為過量表現 *AtNPR1* 的轉殖番茄，*Ubi3* 為 RNA 定量對照組。(郭，2004)



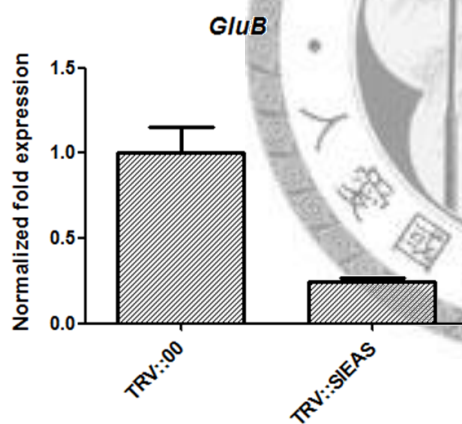
(A)



(B)



(C)



附錄十二、在番茄抗病品系 (H7996) 短暫靜默 *SIEAS* 基因降低對青枯病菌抗性。番茄注射帶有 pTRV1 及 pTRV2-*SIEAS* 或者 pTRV2 empty vector 的農桿菌後十天並接種青枯病菌後五天之情形。(A) *SIEAS* 靜默效率檢測。(B) *SIEAS* 靜默植物檢測青枯病菌的菌量增生情形。L390 作為接種青枯病菌處理對照組。

(A)

```
atcgctaggagaccaaggtagtcctgcaggcgttcgcaggccctggcgtcccctctatactttgcatttctgtttat
ttctctcgagacagatgtacttttcttttagactcatactttagctattcatagaatgttcgtgagttgcgacaccagttc
tgggtgataatagttcgggtgtattaatattgcaaggataatcggtaattatgtacttccgctttttatttcgttgagttag

                                     GT-1 box
-768 tttgttaaatttgataataaaagaaaaagtaatgaaaaagtaaatagaactctaaggttgctgcctagcaggt
gcgatgtagacgctatcacgatccggacggtgggaaatcggggccgacatttcgattaatataatgagcaactca
aatacgctaatagaaaggagtattatactaaaagtatttttaatatctcacaatttggtatctatgtaagtatgtgtatt
-527 gatcgtgcatcgcgctagtagcaataaaggggagattgtgtgtcgttagaagtaggggaattttaaaagttt

                                     CAAT box
-418 gctagaggtatgagtaaatttgttcaaataataaacgataaaggtaaatttgattcaatagtatactagaggataaat

                                     W box                                     TATA box 5
-339 atagataatattaaaaagtaggaaggtaaatttgactcgttccaggagtagttgcagtaaacattatttccgacat

                                     CAAT box
-260 atgatgtcacaattaacataagaaaacttaaagaataacaacttctgttatattggatcaactgagacgccaagg
-182 aagaaatattggatcactagactatgtctatatagtcaagtaaggcaactgaaatgaagaaataagaagagat

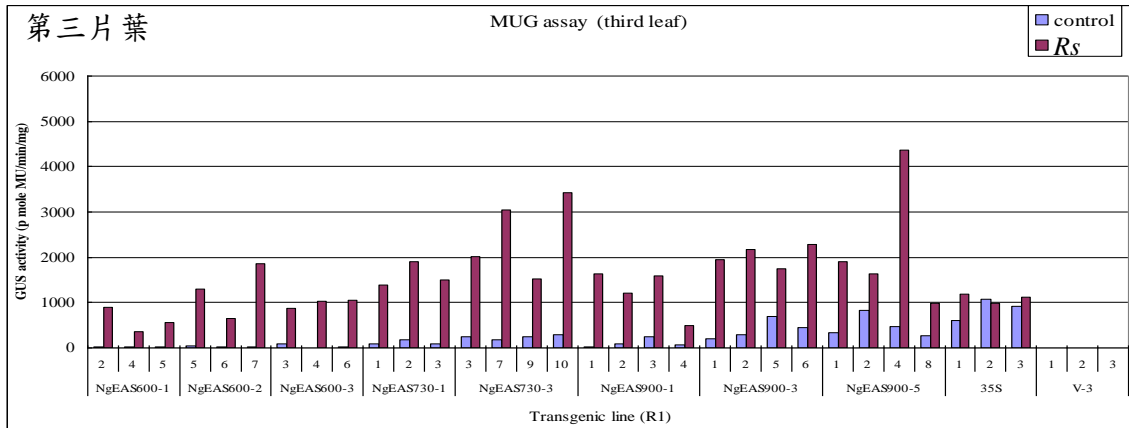
                                     TATA box 2
-109 tataaatacttatgccttcttccatttgtgcatctcactcatcactcgacttcttcttcccagagaattaataacaca

aaattctcctataactttattgca-1
```

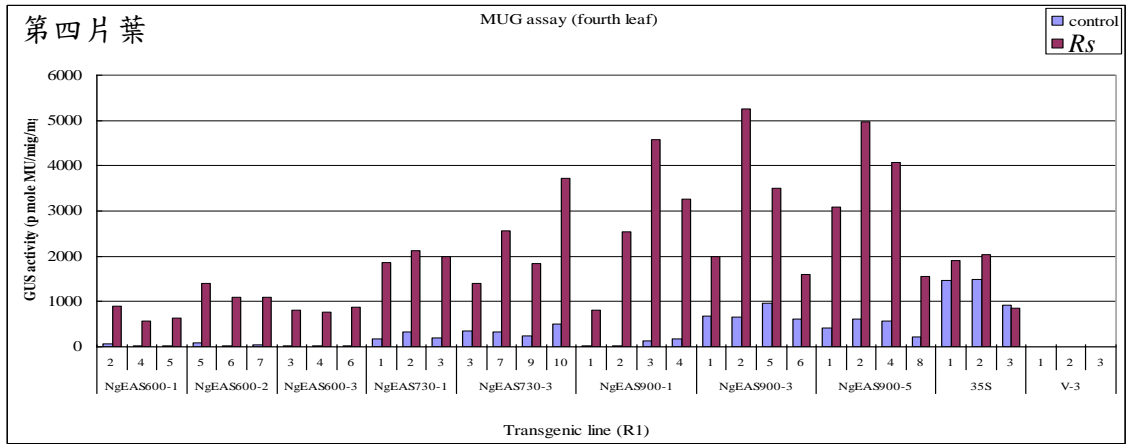
附錄十三、*Nicotiana glutinosa* EAS 基因啟動子之鈎取與分離。

(A) NgEAS 啟動子序列及以生物資訊軟體分析後顯示與啟動子基本活性相關及病菌誘發調控相關之可能 *cis*-elements (GT-1 box, W box)。

(A)



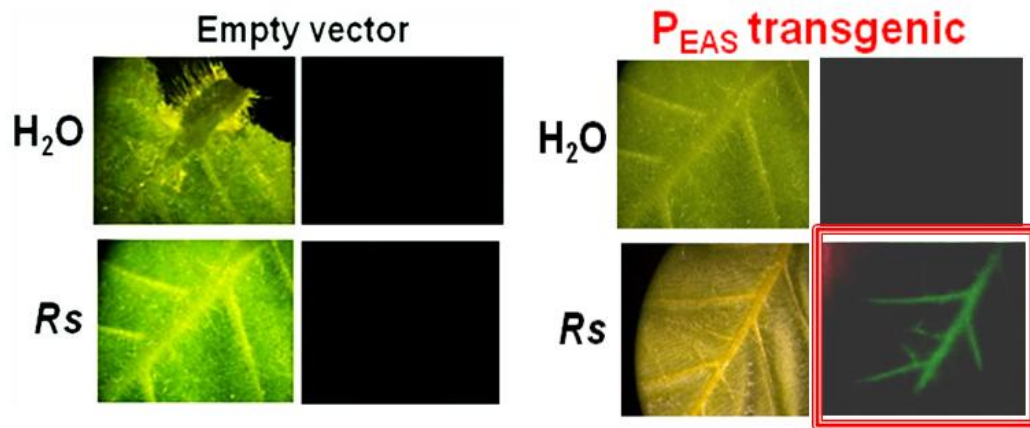
(B)



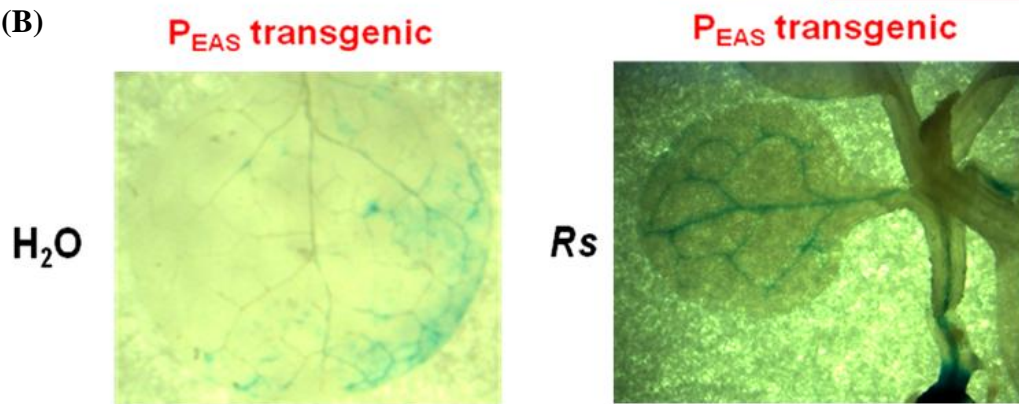
附錄十四、不同長度之 *NgEAS* 基因啟動子 R1 植物受青枯病菌誘導情形。

(A)(B) pNg900、pNg730 與 pNg600 不同轉殖系植物其不同葉片接種青枯病菌後之誘發情形。

(A)



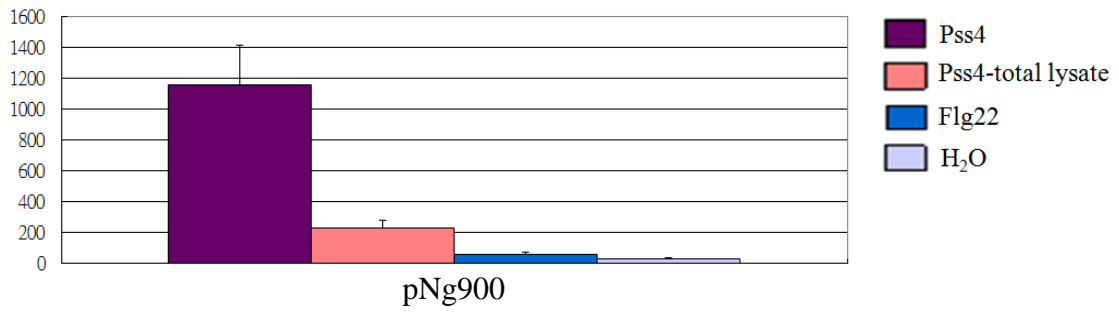
(B)



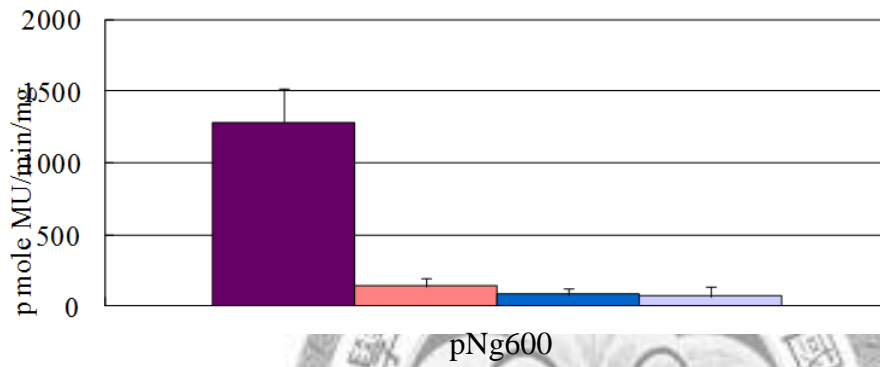
附錄十五、 *NgEAS* 基因於逆境下在植株的內在分部表現情形。

(A) 在 R1 轉基因植物中，*NgEAS* 啟動子在處理青枯病菌 24 小時後綠色螢光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)定性分析。(B) 在 R1 轉基因植物中，*NgEAS* 啟動子在處理青枯病菌 24 小時後 GUS 活性染色定性分析。*Rs*, *Ralstonia solanacearum*。

(A)

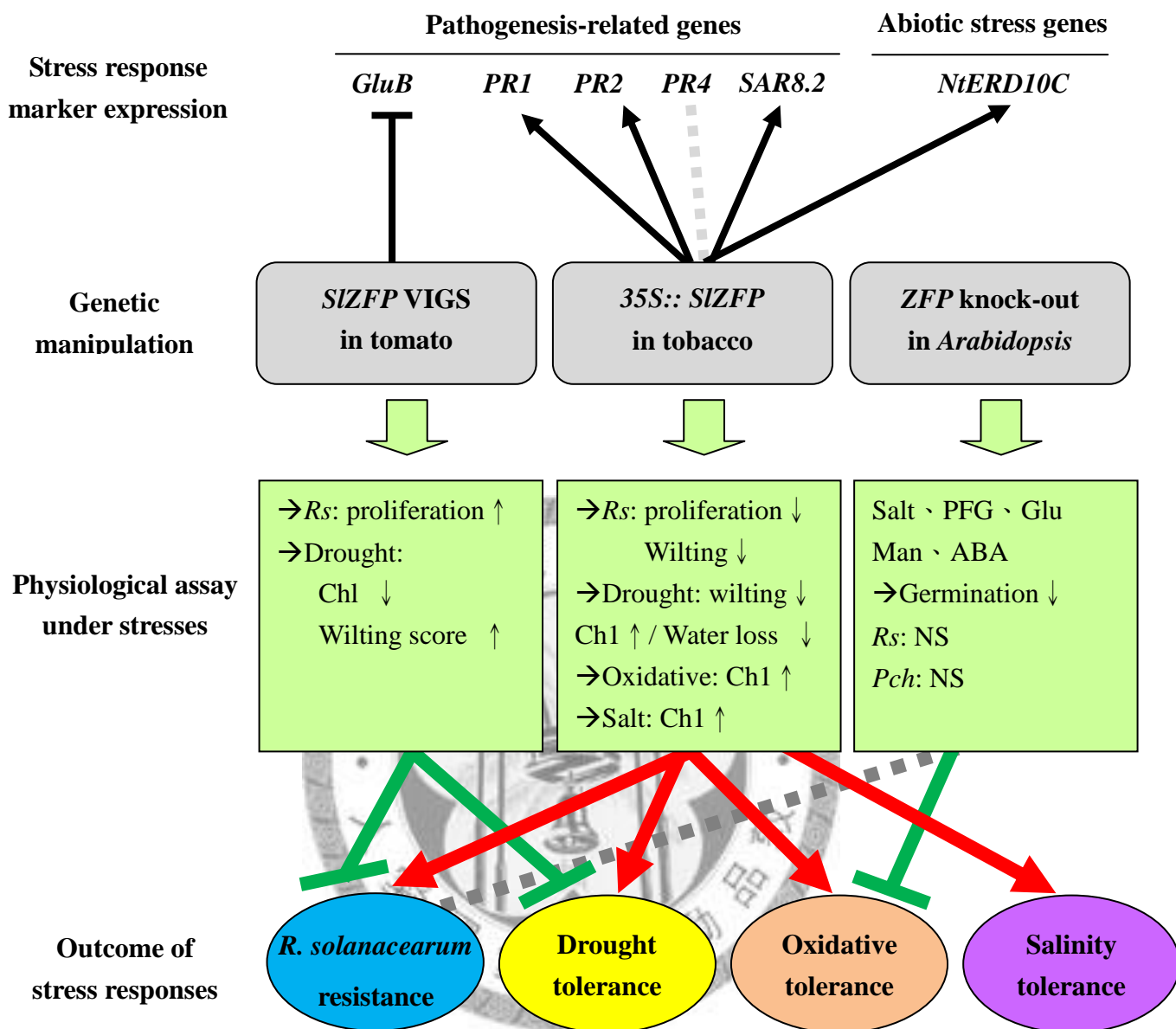


(B)



附錄十六、不同長度之 *NgEAS* 基因啟動子 R1 植物受各式病原菌誘導情形。

(A)(B) pNt900 與 pNt600 植物其不同葉片接種青枯病菌、青枯菌煮沸總菌物及鞭毛胜肽 Flg22 之誘發情形。



附錄十七：VIGS 或過量表現 *SIZFP* 及阿拉伯芥同源基因突變體對內生基因表現和各式逆境下之影響。

註： \rightarrow ：表示該基因表現增加或提高該逆境抗性

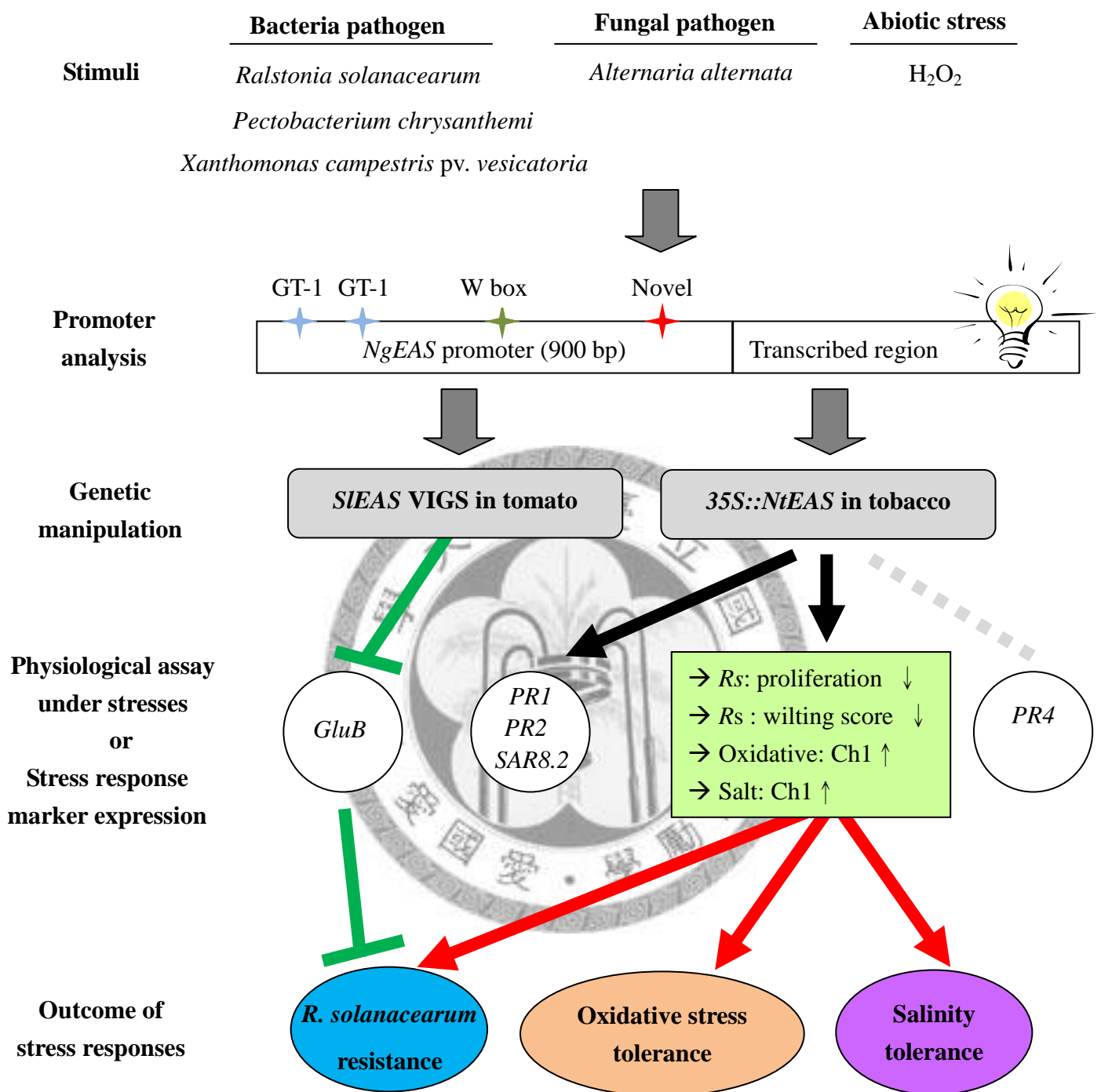
—| ：表示該基因表現下降或降低該逆境抗性

■■■：表示該基因無明顯受調控或逆境下外表型無差異

Chl： Chlorophyll content

Proliferation： Bacteria number

NS： Non-significant (未達顯著性差異)



附錄十八、VIGS 或過量表現茄科抗菌蛋白 EAS 對內生基因表現和各式逆境下之影響。

註：→：表示該基因表現增加或提高該逆境抗性。

■ ■ ■：表示該基因無明顯受調控或逆境下外表型無差異。

Chl：Chlorophyll content。

附錄十九、本研究所使用之引子

Genes	Gene-Specific primers
Sub-cellular localization	
<i>SIZFP</i>	F: 5'-ATGGATGAATATCCTGTATAAAAGAGCTGGG-3' R: 5'-AGATGTCGGTTTCGATGATTCTACTG-3' ^a R: 5'-CTAAGATGTCGGTTTCGATGATTCTACTG-3' ^b
VIGS of tomato genes	
<i>SIZFP</i>	F: 5'-GGAGTGCATAAAGCAGTGGT-3' R: 5'-ACAAAGCCAGAAGAAGGCCT-3'
<i>SIEAS</i>	F: 5'-GAAGAAGAGATTGTTTCGCCC-3' R: 5'-GCACAAATCGTCGCAGTTTG-3'
VIGS efficiency	
<i>SIZFP</i>	F: 5'-AACGGTATGAACCGTGAAGC-3' R: 5'-GGGCAGAGCGGTACTAACAG-3'
<i>SIEAS</i>	F: 5'-CGAATGGTTGGCCAAGAACCCT-3' R: 5'-TCCAGTTGCGATTTGGCCCCT-3'
Overexpression	
<i>SIZFP</i>	F: 5'-CACTAGTATGGATGAATATCCTG-3' R: 5'-TCCCCCGGAGATGTCGGTTTCGATG-3'
<i>NtEAS</i>	F: 5'-GACTAGTATGGCCTCAGCAGCAGTTGC-3' R: 5'-TCCCCCGGAATTTTGATGGAGTCCACAAG-3'
Real-time PCR	
<i>SIZFP</i>	F: 5'-AACGGTATGAACCGTGAAGC-3' R: 5'-GGGCAGAGCGGTACTAACAG-3'
<i>SlPti4</i>	F: 5'-GGATCAACAGTTACCACCGACG-3' R: 5'-ACCATCCGACGCTTAGAGCG-3'
<i>SlWIPI-2</i>	F: 5'-GACAAGGTACTAGTAATCAATTATCC-3' R: 5'-GGGCATATCCCGAACCCAAGA-3'
<i>SlGluB</i>	F: 5'-TCTTGCCCCATTTCAAGTTC-3' R: 5'-TGCCAATCAACGTCATGTCT-3'
<i>SlEF1a</i>	F: 5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTGC-3' R: 5'-AGCTTCGTGGTGCATCTC-3'
<i>SlPti5</i>	F: 5'-ATTCGCGATTTCGGCTAGACATGGT-3' R: 5'-AGTAGTGCCTTAGCACCTCGCATT-3'
<i>SlLRR2</i>	F: 5'-AAGATTGGAGGTTGCCATTGGAGC-3' R: 5'-ATCGCGATGAATGATCGGTGGAGT-3'
<i>SlGRAS2</i>	F: 5'-TAATCCAAGGGATGAGCTTCT-3'

	R: 5'-CCACCAACGTGACCACCTT-3'
<i>NtERD10A</i>	F: 5'-GCTGCGAAACAATAAATACC-3'
	R: 5'-ACACTGCTTCCACTAGCACT-3'
<i>NtERD10B</i>	F: 5'-AGAAGAAAGGGATGAAGGAG-3'
	R: 5'-TTCCATACCATAACCGGTAG-3'
<i>NtERD10C</i>	F: 5'-GAACATGCTATTTCCCTCTGAGT-3'
	R: 5'-CTATTTCTTCCTCCTCATCACT-3'
<i>NtERD10D</i>	F: 5'-AGGAGAAGAAAGGATTCCTAGA-3'
	R: 5'-GGTCTTTGAGTGATATCCTGGTA-3'
<i>NtPR1</i>	F: 5'-GGTCAACACGGCGAAAACC-3'
	F: 5'-GCCTTAGCAGCCGTCATGA-3'
<i>NtPR2</i>	F: 5'-GAGTCCAAAGTGTTTCTCTGTGATA-3'
	R: 5'-GCAAACAATTTACCATCAGACCA-3'
<i>NtPR4</i>	F: 5'-GGCCAAGATTCCTGTGGTAGAT-3'
	R: 5'-CACTGTTGTTTGAGTTCCTGTTCCCT-3'
<i>NtSAR8.2</i>	F: 5'-AAGTTGATGCAAGGGAGATGTCT-3'
	R: 5'-ATGACATTTAGGACATTTGCTGC-3'
Check for constructions	
BP(LBa1)	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'
GUS	F: 5'-GCGAAGTCTTTATACCGAAAGGT-3'
	R: 5'-GAAACCAATGCCTAAAGAGAGGT-3'
Hygromycin	F: 5'-ACTGACAGAACCGCAACGTT-3'
	R: 5'-CCAGTCAATGACCGCTGTTA-3'
Arabidopsis	
<i>At5g24870</i>	F: 5'-ACTGACAGAACCGCAACGTT-3'
	R: 5'-CCAGTCAATGACCGCTGTTA-3'

^a 包含停止密碼子的引子。

^b 不含停止密碼子的引子。

附錄二十、常用培養基及藥劑

TTC medium (Denny and Hayward, 2001)

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

523 medium (Kado and Heskett, 1970)

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

LB medium (Sambrook *et al.*, 1989)

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

SOC medium (Sambrook *et al.*, 1989)

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

SM1 medium (Tsai *et al.*, 1985)

Component	per Liter
Casein hydrolysate	10 g
Glucose Peptone	5 g
Agar	10 g
→Autoclave	
5% TTC	1 mL
0.5% Chloramphenicol	1 mL
1% Cycloheximide	0.5 mL
1% Crystal violet	0.5 mL
5% Polymyxin B	2 mL
1% Tyrothricin	2 mL

YEP medium

Component	per Liter
Peptone	5 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Additional 15 g agar for agar medium	

植物轉殖培養基配方

MS medium	阿拉伯芥	菸草
Component	per Liter	
MS salt	4.313g	4.313g
Sucrose	5 g	15g
→Adjust pH to 5.6		
Additional 4 g agar for agar medium		

Co-culture	菸草
Component	per Liter
MS salt	4.313g
Sucrose	15 g
→Adjust pH to 5.6	
0.1 mg/L NAA	
1 mg/L BA	
20mg/L Timentin	

TSM medium	菸草
Component	per Liter
MS salt	4.313g
Sucrose	15 g
→Adjust pH to 5.6	
Additional 4 g agar for agar medium	
0.1 mg/L	NAA
1 mg/L	BA
20mg/L	Timentin

TRM medium	菸草
Component	per Liter
MS salt	4.313g
Sucrose	15 g
→Adjust pH to 5.6	
Additional 4 g agar for agar medium	
0.1 mg/L	NAA
20mg/L	Timentin
10mg/L	hygromycin

阿拉伯芥原生質體實驗的藥品備製

Enzyme solution	
Component	per 10 mL
cellulase R10	0.15 g
macerozyme	0.03 g
0.8 M mannitol	5 mL
0.2 KCl	1 mL
0.1 MES, pH 5.7	2 mL
→water bath at 55°C for 10 minutes	
→cool to room temperature	
1 M CaCl ₂	100 µL
10% BSA	100 µL
ddH ₂ O	1.2 mL

W5 solution

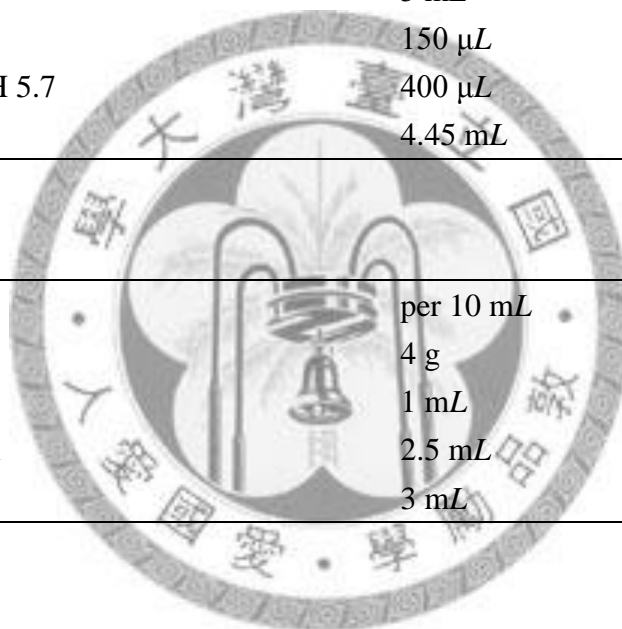
component	per 200 mL
3 M NaCl	10.3 mL
1 M CaCl ₂	25 mL
0.2 M KCl	5 mL
0.1 M MES, pH 5.7	4 mL
0.1 M glucose	10 mL
ddH ₂ O	145.7 mL

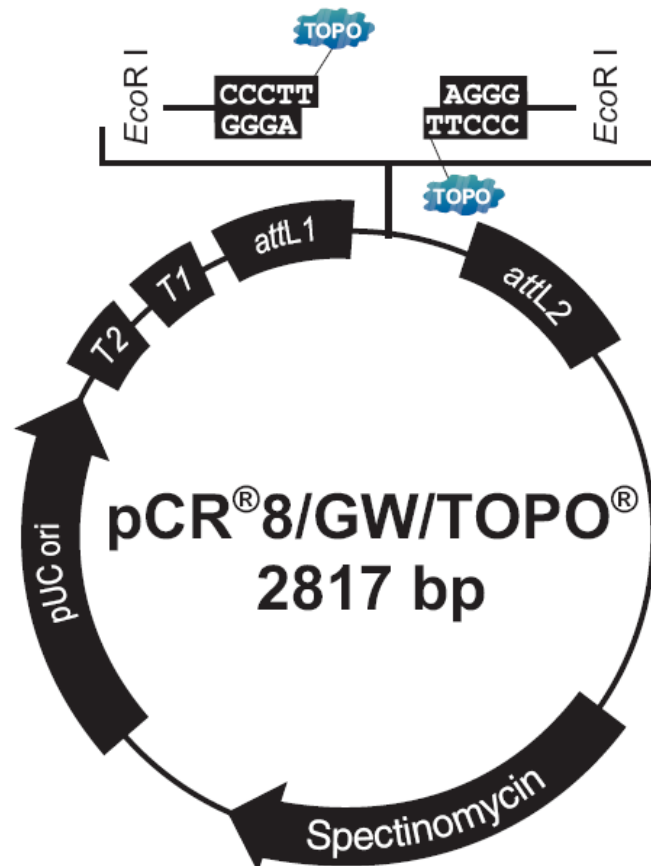
MMg solution

component	per 10 mL
0.8 mannitol	5 mL
1 M MgCl ₂	150 μ L
0.1 M MES, pH 5.7	400 μ L
ddH ₂ O	4.45 mL

PEG solution

component	per 10 mL
PEG 4000	4 g
1 M CaCl ₂	1 mL
0.8 M mannitol	2.5 mL
ddH ₂ O	3 mL

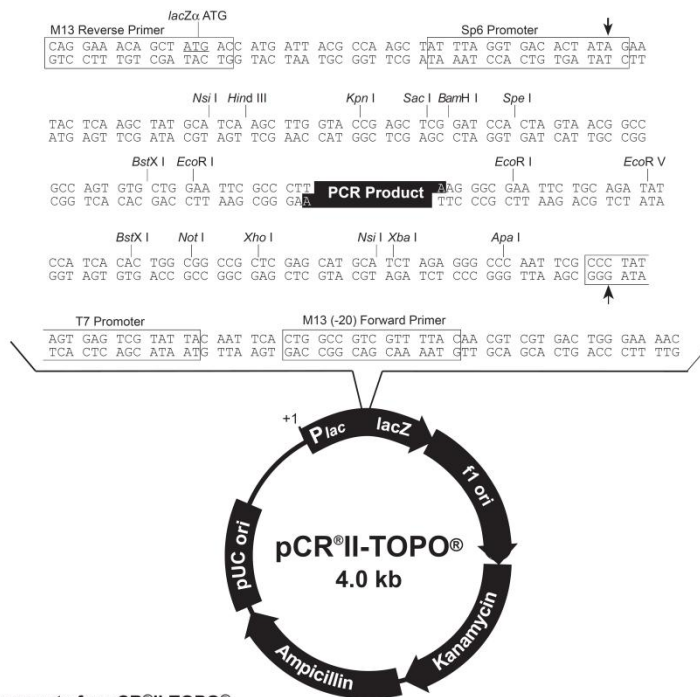




附錄二十一、用於 TA clone 的 pCR[®]8/GW/TOPO[®] 載體。

購買自 invitrogen 公司，圖片截取來自以下網站：

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcr8gwtopo_man.pdf



Comments for pCRII-TOPO®
3973 nucleotides

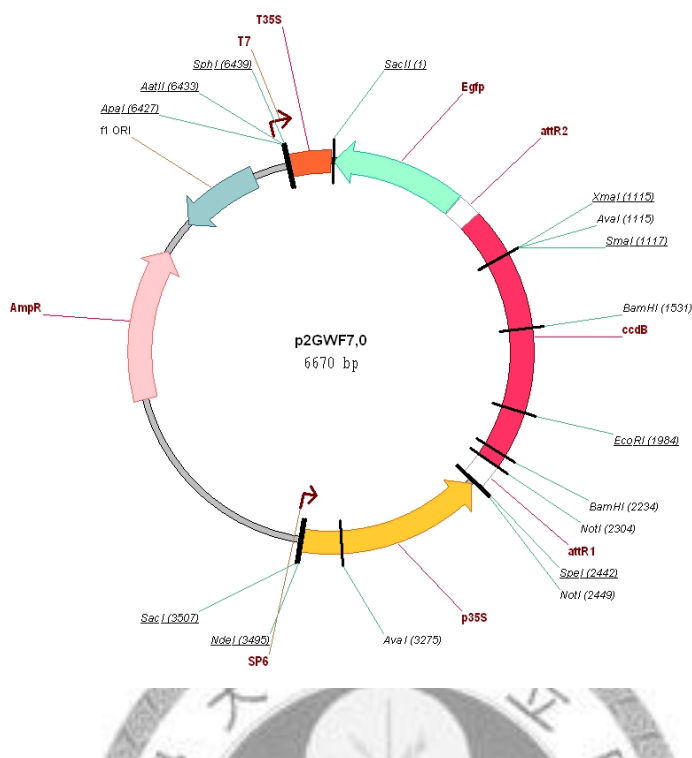
LacZα gene: bases 1-589
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-383
T7 promoter: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
f1 origin: bases 590-1027
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
pUC origin: bases 3178-3851

附錄二十二、用於 TA clone 的 pCRII®/GW/TOPO® 載體。

購買自 invitrogen 公司，圖片截取來自以下網站：

http://www.genomex.com/vector_maps/pcritopo_map.pdf

A.

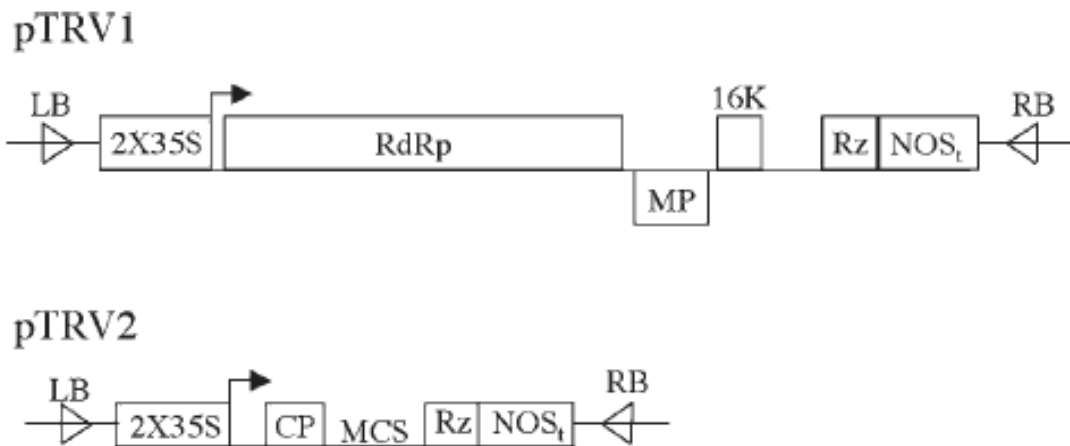


B.



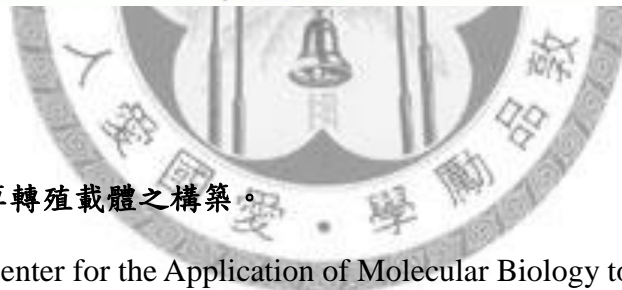
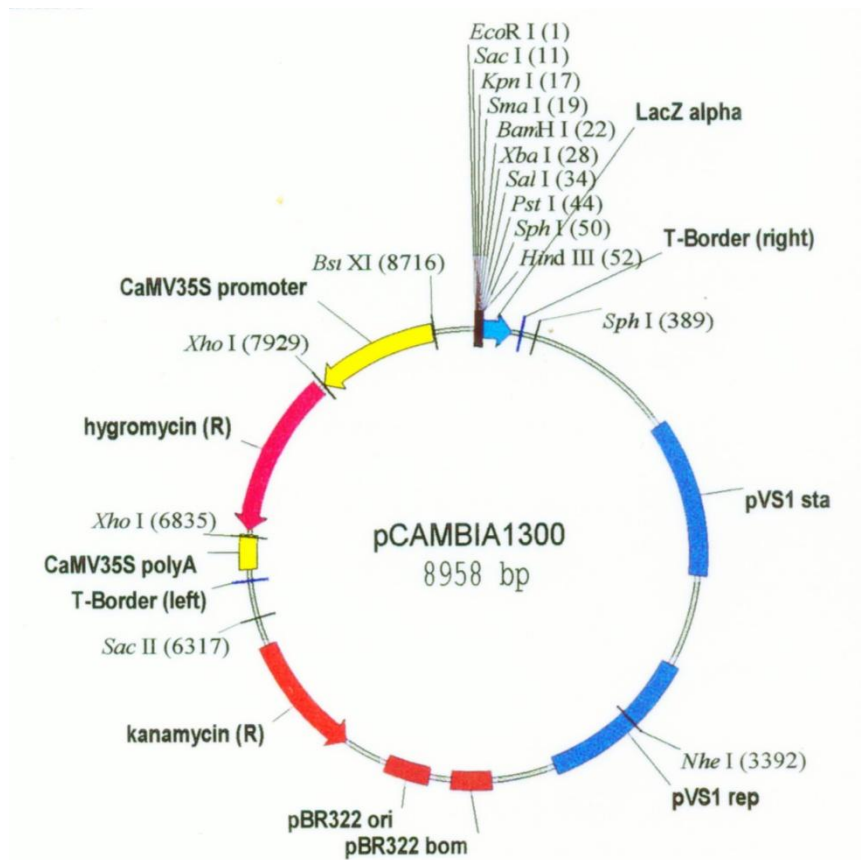
附錄二十三、表現 SIZFP 綠色螢光重組蛋白所使用的載體。

(A) p2FGW7: GFP 重組在 SIZFP 的 C 端, 以 35S 啟動子過量表現 SIZFP 綠色螢光重組蛋白。(B) p2GWF7: GFP 重組在 SIZFP 的 N 端, 以 35S 啟動子過量表現 SIZFP 綠色螢光重組蛋白。



附錄二十四、TRV-based VIGS vectors.

進行 VIGS 實驗時總共需兩種載體分別為 TRV-RNA1 (pTRV1) 與 TRV-RNA2 (pTRV2)，TRV-RNA1 載體具有兩倍重複 CaMV 35S 啟動子 (2 X 35S) 以編碼出相關蛋白，如 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)、16 kDa cysteine rich (16K) 蛋白、移動蛋白(movement protein, MP)，與 RNA 酵素 (self-cleaving ribozyme, Rz) 等；另亦具 nopaline synthase terminator (NOS_t) 以終止結束轉錄。T-DNA 兩端有 LB (left borders) 與 RB (right borders) 可備嵌入植物細胞內，而 TRV-RNA1 主要的功能為幫助複製以及在植物體內進行系統性移動；另一方面，TRV-RNA2 與 TRV-RNA1 不同之處則是具備鞘蛋白 (coat protein, CP)，以及目標基因之選殖位置 (multiple cloning sites, MCS)，可將欲靜默的植物 cDNA 基因片段選殖至 TRV-RNA2。



附錄二十五、菸草轉殖載體之構築。

pCAMBIA1300 (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture, CAMBIA, Inc., Canberra, ACT, Australia)。



附錄二十六、真菌 *Alternaria alternata* 的製備。

利用鑽孔器鑽出直徑約 1 公分的圓型菌絲塊，繼代生長於真菌專用馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA)，將菌絲塊置於培養基中央，並且培養生長於 28℃，此時菌絲會漸漸由中央往外圓周狀的擴散生長，等待菌絲的生長擴展至培養皿的邊界時，即為真菌生長最佳活性階段。